



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**NUEVOS COMPUESTOS HETEROLÉPTICOS DE
VANADIO, POTENCIALES AGENTES
ANTIPARASITARIOS**

Gonzalo Daniel Scalese Barreto

Tesis de Doctorado en Química

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de

Química Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Febrero de 2023

Montevideo, Uruguay

**Nuevos compuestos heterolépticos de vanadio,
potenciales agentes antiparasitarios**

Tribunal:

Dra. Ana Rey

Dr. Hugo Cerecetto

Dra. Patricia Williams

Directora de tesis: Dra. Dinorah Gambino

Co-directora: Dra. Leticia Pérez Díaz

Agradecimientos

En primer lugar, les doy las gracias a mis directoras de tesis, Dinorah y Leticia, quienes me han visto crecer y me han formado y guiado tanto a nivel laboral como personal.

Agradezco también a toda el Área Química Inorgánica por el apoyo académico y por todos los momentos compartidos en estos años. Del grupo humano que me acompañó me llevo grandes amigos que trascienden los intereses académicos. En especial, quiero agradecer a Delfi, quien estuvo apoyándome en cada paso que di; y a Santi, con quien compartimos la vida académica codo a codo desde hace 10 años. A Fery, con quien compartimos el doctorado a la par. A Marcos, Seba, Carlos, con los a pesar de la distancia no perdí nuestro estrecho contacto. A Julio, por motivarme a emprender mi carrera académica. A todos los que me aconsejaron y me brindaron palabras valiosas: Lu, Raúl, Julia, Caro, Giane, Ali, Nico, Nati, Lore, Lore G., Mario, Esteban y Mai. A todos mis compañeros docentes grados 1 y 2. A los integrantes del grupo de investigación, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudar: Mariano, Caro, Mica, Meche y Rodri. A las nuevas generaciones del Área que siempre me brindaron una sonrisa. Agradezco a Nicolás P., Yasmina y Josefina por su excelente trabajo en el marco del Proyecto PAIE 2020, el cual tuvo importantes frutos que fueron parte de esta tesis.

Por otra parte, agradezco al Laboratorio de Interacciones Moleculares (actual Sección Genómica Funcional) por el espacio de trabajo que me brindaron y por incluirme como un integrante más del laboratorio. Especialmente, agradezco a Flo por las enseñanzas, discusiones y aportes a mi trabajo.

Agradezco también a los colaboradores, en especial a Ignacio y a Leopoldo por entregarme conocimiento y aportar sustancialmente a mi trabajo. Agradezco a Isabel Correia y Joao Costa Pessoa, del Instituto Superior Técnico, por recibirme con toda la disposición en su laboratorio para realizar mi pasantía de investigación y disponer voluntad para enseñarme tanto aspectos teóricos y prácticos de las técnicas utilizadas como aspectos culturales de su país.

Agradezco a la Prof. Debbie Crans por abrirme las puertas de su laboratorio en el marco de mi pasantía en Colorado State University y todo su grupo de investigación que siempre estuvo dispuesto a integrarme, especialmente a Andrew.

Doy las gracias, además, al Dr. Carlos Robello y a la Dra. Lucía Piacenza por abrirme las puertas de sus laboratorios y poner a disposición su equipamiento en épocas en las que lo necesitaba.

Fuera del ámbito académico, quiero agradecer a mi familia, en especial a mi madre y hermanos por su apoyo constante en este proceso. Agradezco a mi compañera de ruta, Faus, por tanto amor, paciencia y apoyo en esta etapa. A mis amigo Diego por el aguante, las charlas y las experiencias compartidas los últimos años. A mis amigos y compañeros de la música, sin ella no hubiera sido posible lograr las metas.

A Arya por darme la mejor compañía para escribir esta tesis.

Nuevos compuestos heterolépticos de vanadio, potenciales agentes antiparasitarios

Gonzalo Scalese

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2023

Directora de Tesis: Dra. Dinorah Gambino

Área Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de

Química, Universidad de la República

Co-directora: Dra. Leticia Pérez Díaz

Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Las enfermedades producidas por parásitos tripanosomátidos, como la Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y las Leishmaniasis han sido clasificadas por la OMS como enfermedades desatendidas, caracterizadas por concentrarse en zonas de alta pobreza y por proliferar en ambientes tropicales y subtropicales. La Tripanosomiasis americana es una zoonosis endémica de América Latina causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* que afecta a 6-7 millones de personas y produce anualmente cerca de 12.000 muertes. La Leishmaniasis es causada por *Leishmania*, que abarca un género de protozoarios caracterizado por invadir y multiplicarse en células del sistema inmune (macrófagos) de hospederos mamíferos. Los fármacos en uso clínico contra ambas enfermedades datan de hace décadas, presentan importante toxicidad en el humano, no resultan efectivos en todas las fases de las enfermedades, necesitándose tratamientos prolongados y regímenes terapéuticos complicados, pudiendo desarrollar resistencia.

La Química Inorgánica Medicinal resulta una alternativa prometedora en la búsqueda de una respuesta farmacológica para estas enfermedades parasitarias. El vanadio presenta diferentes roles en sistemas biológicos. Sus compuestos han sido propuestos como potenciales fármacos, principalmente para diabetes y cáncer. Nuestro grupo de investigación comenzó hace unos años a desarrollar compuestos de oxovanadio (IV) con ligandos intercalantes del ADN que mostraron propiedades biológicas promisorias en parásitos tripanosomátidos.

En este Trabajo de Tesis se sintetizaron y caracterizaron en estado sólido y en disolución diecinueve nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) y (V) estructuralmente relacionados con ligandos bioactivos frente a *Trypanosoma cruzi*, y se exploró la potencialidad como agentes antiparasitarios. En paralelo, se exploró la potencialidad antiparasitaria de dieciocho compuestos homolépticos con los mismos ligandos, donde cuatro de ellos no habían sido reportados previamente. Todos los compuestos 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 la potencialidad de unión a proteínas plasmáticas.

Todos los compuestos explorados que incluyen ligandos bioactivos mostraron actividad frente a los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* y frente a *Leishmania infantum*. La mayoría de ellos, presentaron potencia superior a los ligandos en su forma libre y a los complejos homolépticos conteniendo los coligandos que no tienen actividad intrínseca frente a los tripanosomátidos.

Se identificaron compuestos líderes de las series exploradas y se estudió su metalómica (ingreso al parásito y distribución subcelular), tratándose de los primeros reportes de compuestos de vanadio en parásitos. Se estudiaron además posibles blancos de acción (interacción con ADN e inhibición enzimática de la

fumarato reductasa NADH dependiente). Por otra parte, se realizaron diversos ensayos biológicos con el fin de caracterizar el tipo de muerte celular asociado en este parásito tal como la activación de la apoptosis, necrosis y autofagia. De forma global, se definió que los compuestos heterolépticos desarrollados inducen la apoptosis como principal mecanismo de muerte celular, sin embargo, se postuló la necrosis y la autofagia como mecanismos de muerte alternativos activados en paralelo. Se estudió, además, la generación de especies reactivas del oxígeno y la disfunción del potencial de membrana mitocondrial como potenciales mecanismos de activación de las vías de muerte celular. Los resultados globales que surgieron de la comparación detallada de las diferentes familias constituyen un gran aporte al área Química Inorgánica Medicinal y es una información valiosa para el rediseño de nuevos potenciales agentes antiparasitarios basados en vanadio.

New heteroleptic vanadium compounds, potential antiparasitic agents

Gonzalo Scalese

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

Advisors

Dra. Dinorah Gambino

Área Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de

Química, Universidad de la República

Dra. Leticia Pérez Díaz

Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Diseases caused by trypanosomatid parasites, such as American Trypanosomiasis (Chagas disease) and Leishmaniasis have been classified by the World Health Organization as neglected tropical diseases, mainly concentrated in poverty areas, and proliferating in tropical and subtropical environments. American Trypanosomiasis is an endemic zoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* that affects 6-7 million people and produces about 12,000 deaths annually. Leishmaniasis is produced by *Leishmania* that invades and multiplies in macrophages of mammalian hosts. Available drugs are decades old and/or suffer from limited efficacy, undesirable collateral effects and development of resistance. Medicinal Inorganic Chemistry is a promising alternative in drug development for the treatment of these parasitic diseases. Vanadium compounds have been proposed as potential drugs, mainly for diabetes and cancer. Our group have developed several oxovanadium (IV) compounds with DNA

intercalating ligands that showed promising biological effects in trypanosomatid parasites.

In this thesis work, nineteen structurally related heteroleptic oxidovanadium compounds with bioactive ligands against *Trypanosoma cruzi* have been synthesized and characterized in the solid state and in solution. Eighteen homoleptic oxidovanadium compounds with the bioactive ligands, where four of them had not been previously reported, were also synthesized to compare the effects against trypanosomatids parasites.

All compounds were exhaustively characterized and their physicochemical properties such as lipophilicity, stability, and protein binding were studied. Compounds containing bioactive ligands showed activity against the different stages of *Trypanosoma cruzi* and against *Leishmania infantum*. Most of them showed higher potency than the free ligands and the homoleptic complexes containing the non-bioactive coligandos. Leader compounds of each series were identified and their metallomics (entry into the parasite and subcellular distribution) were studied, being the first report of vanadium metallomics in parasites. Furthermore, potential molecular targets were explored (DNA and NADH-dependent fumarate reductase enzyme). Several biological assays were also carried out in order to characterize the type of cell death associated, such as apoptosis, necrosis and autophagy. Overall, it was concluded that the developed heteroleptic compounds induce apoptosis as the main mechanism of cell death, however, necrosis and autophagy were postulated as alternative death mechanisms activated in parallel. In addition, the generation of reactive oxygen species and the dysfunction of the mitochondrial membrane potential were studied as potential pathway of cell death mechanisms activation. The whole set of results represent a great contribution to the Medicinal Inorganic Chemistry area and constitute valuable information for the redesign of new potential vanadium-based antiparasitic agents.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	15
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES, DISEÑO RACIONAL Y PROPUESTA	99
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	147
CAPÍTULO 4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	229
CAPÍTULO 5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	309
CAPÍTULO 6. ESTABILIDAD, LIPOFILIA E INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS	357
CAPÍTULO 7. METALÓMICA, BLANCOS DE ACCIÓN Y MUERTE CELULAR	421
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	503
APÉNDICE 1: Datos cristalográficos	
APÉNDICE 2: Trabajos publicados	

Lista de abreviaturas

δ	Desplazamiento químico
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
% PG	Porcentaje de crecimiento
% PV	Porcentaje de viabilidad
{ADN-BE}	Aducto ADN-Bromuro de etidio
AAS	Espectroscopía de absorción atómica
acac	Acetilacetato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de fuerzas atómicas
ARN	Ácido ribonucleico
aminophen	5-amino-1,10-fenantrolina
ANOVA	Análisis de varianza
AV	Anexina V-AlexaFluor 488
bipy	2,2'-bipiridina
B_0	Campo magnético externo
BE	Bromuro de etidio
BHI	Brain Heart Infusion
BrIS	N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 5-bromosalicilaldehído
BSA	Albúmina sérica bovina
Bz	Benzimidazol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CCDC	Cambridge Crystallographic data centre
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear ^1H - ^1H
CT-ADN	ADN de timo de ternero
CTZ	Clotrimazol

D ₂ O	Óxido de deuterio
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
DMF	Dimetil formamida
DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Desatendidas
dppz	dipirido 3,2-a: 2'-3'-c]fenazina
DTUs	Unidades de Tipificación Discretas
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Concentración que logra el 50 % del efecto total
EPR	Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica
epoxyphen	5,6-epoxi-1,10-fenantrolina
EROS	Especies reactivas del oxígeno
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización de electrospray
EtOH	Etanol
EXAFS	Espectroscopía de absorción de rayos X extendida a la estructura fina
FI	Fracción insoluble
FRD	Fumarato reductasa NADH dependiente
FS	Fosfatidilserina
H ₂ DCFDA	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
HAI	Hemaglutinación directa e indirecta
HMBC	Correlación heteronuclear de enlace múltiple ¹ H- ¹³ C
Hmpo	N- óxido de 2-mercaptopiridina
HSA	Albúmina sérica humana

HSCQ	Correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C
HTF	Transferrina humana
IC ₅₀	Concentración que inhibe el 50 % de la proliferación
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IF	Intensidad de fluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IN	N^2 -(4-piridinilcarbonyl)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído
IP	Ioduro de propidio
IR	Infrarrojo
IS	Índice de selectividad
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina
K_B	Constante de unión
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
KTZ	Ketoconazol
<i>L. aethiopica</i>	<i>Leishmania aethiopica</i>
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<i>L. panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
<i>L. tropica</i>	<i>Leishmania tropica</i>
<i>L. venezuelensis</i>	<i>Leishmania venezuelensis</i>

<i>L. vianna subgenus</i>	<i>Leishmania vianna subgenus</i>
MeOH	Metanol
Metvan	[V ^{IV} O(SO ₄)(4,7-metilphen) ₂]
MRI	Imagenología por resonancia magnética
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<i>M. smeg.</i>	<i>Mycocilibacterium smegmatis</i>
<i>M. tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NN	Ligandos polipiridinicos
NTDs	Enfermedades tropicales desatendidas
NTR	Nitrorreductasa
NXF	Nifurtimox
LFG	Lipofosfoglicano
LS1	5-bromosalicilaldehído semicarbazona
LS2	3-etoxisalicilaldehído semicarbazona
LS3	2,5-dibromosalicilaldehído semicarbazona
LS4	2-hidroxinaftaldehído semicarbazona
L0	8-hidroxiquinolina
L1	5,7-dicloro-8-hidroxiquinolina
L2	5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina
L3	5,7-iodo-8-hidroxiquinolina
L4	5-nitro-8-hidroxiquinolina
L5	2-carbaldehído-8-hidroxiquinolina
L'	Ligando tridentado
oda	oxidiacetato
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PBS	Buffer fosfato salino

PEP	Fosfoenolpiruvato
PFA	Paraformaldehído
phen	1,10-fenantrolina
phendiona	1,10-fenantrolina-2,5-diona
PS	Proteínas solubles
QSAR	Estudio cuantitativo de relación estructura actividad
R _f	Relación de frente
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RP-HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta redisolución en fase reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TcAPX	Hemoperoxidasa dependiente de ascorbato
TcCPX	Triparredoxin peroxidasa citosólica
TcMPX	Triparredoxin peroxidasa mitocondrial
TcGPX	Triparredoxin peroxidasa dependiente de glutatión
TGA	Análisis termogravimétrico
tdzp	[1,2,5]tidiazolo[3,4-f]-1,10-fenantrolina
TLC	Cromatografía en capa fina
THF	Tetrahidrofurano
tmp	3,4,7,8-tetrametilfenantrolina
t _R	Tiempo de retención
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V ₁	H ₂ VO ₄ ⁻

V_2	$H_2V_2O_7$
V_4	$V_4O_{12}^{4-}$
V_5	$V_5O_{15}^{5-}$
V_{10}	$V_{10}O_{28}^{6-}$, decavanadato
VO^{2+}	Vanadilo
VO_2^+	Dioxovanadio (V)

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Contenido

1.1	ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS	25
1.1.1	Enfermedad de Chagas	26
1.1.1.1	Características de la enfermedad	27
1.1.1.2	Vector biológico	29
1.1.1.3	Localización y epidemiología	30
1.1.1.4	Trypanosoma cruzi	32
1.1.1.5	Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.....	35
1.1.1.6	Tratamiento actual y desarrollo de fármacos.....	39
1.1.2	Leishmaniasis.....	43
1.1.2.1	Características de la enfermedad	43
1.1.2.2	Vector biológico	45
1.1.2.3	Localización y epidemiología	46
1.1.2.4	Leishmania	49
1.1.2.5	Ciclo de vida de Leishmania.....	50
1.1.2.6	Tratamiento actual y desarrollo de fármacos.....	52
1.2	QUÍMICA INORGÁNICA MEDICINAL	55
1.2.1	El crecimiento de la Química Inorgánica Medicinal	55
1.2.2	Del descubrimiento casual al diseño racional	58
1.2.3	Compuestos metálicos con actividad antiparasitaria	64
1.3	EL VANADIO	67
1.3.1	Origen y abundancia.....	67
1.3.2	Química en disolución acuosa.....	68
1.3.3	Antecedentes farmacológicos	70
1.4	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1.1 ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

Las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs: *Neglected tropical diseases*) han sido definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grupo de enfermedades infecciosas transmisibles causadas por microorganismos patógenos como virus, bacterias, protozoarios y helmintos, que prevalecen en zonas tropicales y subtropicales en 149 países del planeta. Las NTDs hoy en día afectan a más de 1400 millones de personas, incluyendo más de 500 millones de niños ¹⁻³. En el año 2013 se produjeron alrededor de 152 mil muertes, observándose una disminución en comparación a las 204 mil reportadas en el año 1990 ^{2,4}.

Estas condiciones médicas afectan principalmente a poblaciones pobres del planeta, que viven en zonas rurales aisladas, barrios marginales urbanos o áreas de conflicto, que carecen de saneamiento adecuado, agua y vivienda, y que están en estrecho contacto con vectores infecciosos y animales domésticos o ganado. Actualmente, la lista de enfermedades categorizadas como NTDs según la OMS comprende 20 enfermedades infecciosas: Dengue, Rabia, Tracoma, Úlcera de Buruli, Yaws (bostezo), Lepra, Enfermedad de Chagas, Enfermedad del sueño, Leishmaniasis, Teniasis y neurocisticercosis, Enfermedad del gusano de Guinea, Equinocosis, 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 ⁵.

Algunas de estas enfermedades, presentan períodos de incubación y tiempos de latencia muy largos, por lo que muchas veces no se conecta la causa de muerte con la NTD ⁶. 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 ^{7,8}.

Muchas de estas enfermedades pueden prevenirse, eliminarse e incluso erradicarse sin intervenciones médicas “complejas”, simplemente mejorando el acceso a herramientas seguras y rentables existentes tales como el uso de mosquiteros ⁴. No obstante, en algunos casos la intervención de medicamentos es inevitable. Desafortunadamente, el desarrollo de fármacos y vacunas para combatir y prevenir estas enfermedades ha sido descuidado durante décadas, principalmente por el escaso interés de las compañías farmacéuticas dado que, si bien la población objetivo es extremadamente grande, se encuentra casi exclusivamente en países en desarrollo con bajo nivel socioeconómico ^{3,9}.

Actualmente, se invierten muchos recursos en el desarrollo de nuevas terapias para disminuir la prevalencia de enfermedades como VIH/SIDA, tuberculosis y malaria, pero no existe una inversión importante para combatir las NTDs ^{7, 10}. Por esta razón, es que la mayor parte de los esfuerzos en investigaciones sobre NTDs provienen principalmente de la academia, o de organizaciones sin fines de lucro tales como la OMS, la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Desatendidas (DNDi) y las fundaciones Gate, Nuffield, y *Wellcome Trust* ⁹.

Las NTDs con mayor tasa de mortalidad refieren a tres parasitosis cuyos agentes etiológicos pertenecen a la familia taxonómica Trypanosomatidae: enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), la enfermedad del sueño (Tripanosomiasis africana humana) y Leishmaniasis ⁷.

1.1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, fue descubierta por el doctor brasilero Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909 ¹¹. Esta zoonosis, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es considerada un problema de salud pública en Latinoamérica. Las estimaciones señalan que se producen aproximadamente 20,000 muertes por

año, y que existen alrededor de 6-7 millones de personas actualmente infectadas, muchas de ellas sin saberlo, y otros 100 millones que viven en áreas de riesgo de transmisión ¹².

1.1.1.1 Características de la enfermedad

En el humano la enfermedad de Chagas presenta dos etapas clínicas claramente definidas: una **fase aguda** que suele presentar una duración de 4 a 8 semanas, y una **fase crónica** que puede llegar a persistir durante la vida del afectado. La primera de ellas comienza entre 5 y 7 días luego de la inoculación. Inicialmente, se observa una pequeña llaga en la zona de la picadura del vector y luego del período de incubación comienza la fase aguda, con una duración aproximada de dos meses ¹³.

En la mayoría de los casos esta etapa puede ser asintomática, pero dependiendo del sitio de la inoculación, el primer signo puede ser un chancro cutáneo (chagoma), el cual desencadena una reacción inflamatoria con edema intersticial y reacción por hiperplasia de los ganglios en torno a la lesión; o edema orbital púrpura unilateral (signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre (Figura 1.1) ¹⁴.

(A)



(B)



Figura 1.1. Manifestaciones clínicas típicas en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. (A) Signo de Romaña; (B) Chagoma de inoculación.

Durante la fase aguda se encuentran parásitos circulantes en sangre. Se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables, destacándose síntomas como dolores de cabeza, mialgias, disnea, edema en las extremidades inferiores o en la cara, dolor abdominal y/o torácico, hepatomegalia, erupción cutánea, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, múltiples linfadenopatías, miocarditis y más raramente meningoencefalitis. La muerte se produce ocasionalmente en la fase aguda (<5-10 % de los casos sintomáticos) como resultado de la miocarditis o meningoencefalitis severa, o ambos, particularmente en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. El 90 % de los infectados, presenta los síntomas de la fase aguda, incluso con la administración de fármacos ^{14, 15}.

Por su parte, la fase crónica de la enfermedad puede durar entre 10 y 30 años. El 70 % de los pacientes infectados se encuentran en esta etapa. Tan solo en el 5-10 % de los pacientes, se ha registrado una progresión directa de la fase aguda a una fase crónica de la enfermedad ¹⁴. Durante la fase aguda, todos los tipos de células nucleadas del huésped humano pueden ser objetivos potenciales para la infección. En la fase crónica, dado el desarrollo de la respuesta inmune, la parasitemia se reduce a bajas concentraciones y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente. Los parásitos permanecen principalmente alojados en células del músculo cardíaco y tracto digestivo y hay pocos parásitos en sangre ¹⁴. Alrededor de un 30 % de los pacientes sufren trastornos cardíacos y cerca de un 10 % presentan alteraciones digestivas (típicamente megaesófago y megacolon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco ^{13, 15, 16}.

Los pacientes con enfermedad de Chagas están en riesgo de padecer síntomas graves en caso de contraer COVID-19 por lo que han sido clasificados como un grupo prioritario para la vacunación. Esta coronavirus puede causar miocarditis, y la

enfermedad crónica de Chagas suele producir estados protrombóticos, alteraciones cardíacas y accidentes cerebrovasculares trombóticos secundarios ¹⁷.

El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse por detección de parásitos en la sangre a través de xenodiagnóstico (método muy sensible y específico para la fase aguda), microhematocrito y hemocultivo ¹⁸; o por detección de IgM específicos para el parásito por métodos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA de parásitos, la hemaaglutinación directa e indirecta (HAI) ^{15, 16}.

1.1.1.2 Vector biológico

La enfermedad es transmitida a seres humanos y más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos silvestres a través de insectos hematófagos de la subfamilia **Triatominae**, que transmiten el parásito por las heces, el cual penetra la piel o las mucosas del huésped mamífero, alcanzando los tejidos donde finalmente se establece ¹⁹. Aunque se han identificado 140 especies de triatominos ²⁰, sólo unos pocos son vectores competentes para *T. cruzi*; particularmente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* son los vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre ²¹ (Figura 1.2). Cada región geográfica posee un vector principal de la enfermedad: en el Cono Sur es *Triatoma infestans*, en Centroamérica *Rhodnius prolixus*, mientras que *Triatoma dimidiata* se encuentra diseminado desde el centro de México hasta Panamá ^{14, 16}. Los insectos triatominos proliferan fácilmente en entornos precarios de viviendas, lo que conlleva que los más vulnerables a la infección sean aquellas personas que tienen menores recursos económicos ²².

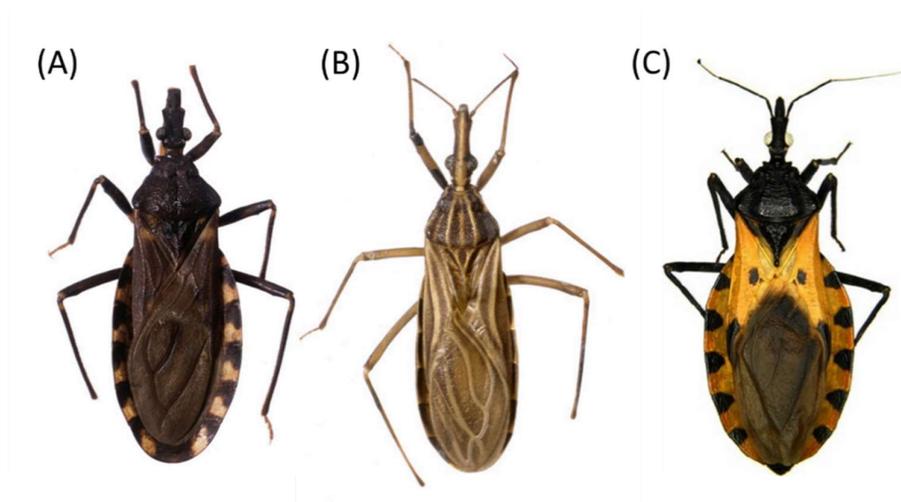


Figura 1.2. Principales especies de triatomino que transmiten la enfermedad de Chagas: (A) *Triatoma infestans*, (B) *Rhodnius prolixus* y (C) *Triatoma dimidiata*.

1.1.1.3 Localización y epidemiología

Datos de la OMS estiman que alrededor de 6-7 millones de personas en el mundo están afectadas por esta enfermedad potencialmente letal, con prevalencia en las regiones más pobres de América Latina, donde la enfermedad es endémica en 21 países (dos tercios pertenecientes al cono sur), siendo los países con más casos Argentina, Brasil, México y Bolivia ^{12, 23}. 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). De este gran número de personas afectadas, hay en promedio 10.000 muertes anuales por complicaciones en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Se estima, además, que casi 100 millones de personas en las Américas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer la enfermedad y la incidencia anual es de 200.000 nuevos casos ^{23, 24}.

En un principio, la enfermedad se limitaba a zonas rurales y marginales de Latinoamérica, pero los cambios socioeconómicos, el éxodo de la población rural, la deforestación y la urbanización han modificado el perfil epidemiológico

hacia una infección urbana. Debido a las altas tasas migratorias desde estas zonas hacia zonas no endémicas, el número de casos está aumentando en Europa, Estados Unidos y el oeste del Pacífico, planteando un problema de salud pública, incluso en países donde no hay transmisión vectorial del parásito (Figura 1.3) ²⁵. ²⁶. La transmisión no vectorial, tal como transmisión congénita, transfusiones sanguíneas, vía oral por ingestión de alimentos contaminados y trasplante de órganos han contribuido a la globalización de la enfermedad ^{13, 16, 25-28}.



Figura 1.3. Distribución mundial de casos de infección con *T. cruzi*. Se muestran los 21 países endémicos de Latinoamérica y el resto de los países donde la enfermedad de Chagas se disemina debido a las altas tasas migratorias hacia zonas no endémicas. Extraído y adaptado de la referencia ²³.

Con el objetivo de disminuir la transmisión vectorial, en el año 1991, la Organización Mundial de la Salud lideró un plan para eliminar el vector de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. Estas acciones de control permitieron que Uruguay se encuentre actualmente en un estado avanzado de control vectorial, con interrupción de la transmisión, certificada desde 1997 ²⁹.

A causa del gran número de animales silvestres que actúan de reservorio del parásito, no resulta fácil la erradicación total de la enfermedad. Dependiendo de la región, las herramientas principales para prevenir la enfermedad en América Latina son el control de vectores mediante fumigación con insecticidas, mejoramiento de la vivienda (por ejemplo, paredes de yeso, pisos de cemento, techos de hierro corrugado) y medidas preventivas personales, como el uso de mosquiteros ^{23,29-31}. En cuanto a la transmisión no vectorial, el cribado de la sangre donada es fundamental para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos. La prevención de la transmisión congénita se da mediante un diagnóstico de las mujeres embarazadas infectadas y la detección de la posible infección del recién nacido en los análisis parasitológicos y serológicos después de ocho meses de edad (con ausencia de anticuerpos de la madre). 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 ¹⁸. En laboratorios pueden prevenirse accidentes a través de protocolos estándar de seguridad, especialmente cuando se trata de la forma del parásito infectiva. Por su parte, puede prevenirse la transmisión oral mediante buenas prácticas de higiene en la preparación de alimentos, el transporte, almacenamiento y consumo ^{23, 30, 31}.

1.1.1.4 *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un organismo unicelular de la Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastidiae, Familia Trypanosomatidae, Género Trypanosoma, Subgénero Schizotrypanuma. El taxón *T. cruzi* constituye una población muy heterogénea que consiste en un gran número de cepas con diferentes características relacionadas con la forma del estadio tripomastigota, perfil antigénico, tasa de crecimiento, metaciclogenesis, patogenicidad, tropismo y sensibilidad a fármacos antichagásicos ³². La gran

diversidad genética observada entre las diferentes cepas permitió, en un principio, agrupar a las poblaciones en dos grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. El primero de ellos, *T. cruzi* I, se asocia con el ciclo de transmisión selvático e infección de los marsupiales. Por su parte, *T. cruzi* II consiste en cinco subgrupos relacionados, denominados IIa–e, asociados con el ciclo de transmisión interno y la infección de los mamíferos placentarios ³³. Actualmente, existe un consenso internacional que reconoce la existencia de seis linajes genéticos principales distribuidas en Unidades de Tipificación Discretas (DTUs) de I-VI ^{34,35}.

El microorganismo presenta al menos cuatro estadios bien diferenciados: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas celulares y amastigotas ³⁶. La Figura 1.4 señala las principales estructuras celulares del parásito, representada sobre la forma epimastigota.

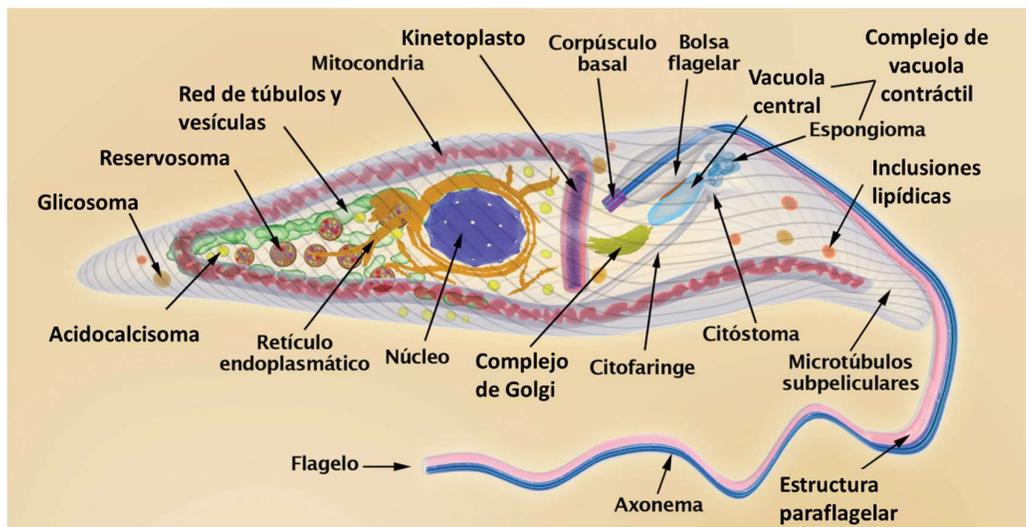


Figura 1.4. Vista esquemática de la forma epimastigota de *T. cruzi*. Se señalan las principales estructuras celulares. Adaptado de la referencia ³⁶.

El **núcleo celular** presenta una organización estructural similar al de las células eucariotas típicas. Este mide aproximadamente unos 2,5 μm de diámetro y contiene un nucleolo centralizado en la forma epimastigota ³⁷. En las formas amastigotas y epimastigotas, el núcleo tiene forma redondeada, mientras que en

tripomastigotas metacíclicos aparece como un organelo elongado con alto contenido de heterocromatina y carente de nucleolo. Presenta una membrana nuclear típica provista de poros y la cromatina dispersa a lo largo del nucleoplasma ³⁸. Los cromosomas son difíciles de distinguir ya que durante el ciclo celular la cromatina no se condensa ³⁹.

La **mitocondria** de *T. cruzi* es única y se extiende a lo largo del cuerpo celular. La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, denominado **kinetoplasto**, el cual puede llegar a representar hasta el 25 % del ADN total del parásito. Éste está formado por ADN circular en 25 maxicírculos (de tamaño 23 kb) y 5000 minicírculos (de tamaño 1 kb) concatenados, concentrados en el cuerpo basal ^{40, 41}. Los minicírculos contienen las secuencias que codifican para los ARN guías necesarios para la modificación de los transcritos mitocondriales (adición de uridinas) en un proceso conocido como edición ^{42, 43}. Los maxicírculos contienen los genes que codifican para un pequeño número de proteínas tales como las subunidades de la citocromo oxidasa, NADH deshidrogenasa y la subunidad 6 de F1F0 ATPasa ⁴⁴.

El **flagelo** emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar y es responsable de la movilidad principalmente en las formas epimastigota y tripomastigota. En amastigotas, el flagelo también puede encontrarse, pero de tamaño muy corto. El flagelo muestra una estructura típica de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central ³⁶.

Los **glicosomas** juegan un papel importante en la adaptación metabólica a diferentes entornos, en estos organelos se compartimentaliza la glicólisis ⁴⁵.

Los **acidocalcisosomas** son organelos capaces de transportar protones y calcio y han sido identificados en todos los tripanosomátidos y en muchos apicomplejos ⁴⁶. Los acidocalcisosomas están involucrados en varias funciones incluyendo almacenamiento de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro,

pirofosfato inorgánico, así como en la homeostasis del pH y la osmorregulación, participando en estrecha asociación con la vacuola contráctil. La **vacuola contráctil** es una estructura formada por varios túbulos conectados a una vacuola central localizada cerca del bolsillo flagelar. Estudios de estrés osmótico en *T. cruzi* demostraron que contribuye a la regulación del volumen celular bajo estrés hipoosmótico ⁴⁷. Por otro lado, ha sido demostrado que la vacuola contráctil alberga un transportador de poliamina que puede ser traslocado a la membrana plasmática cuando el medio de incubación es deficiente en poliaminas ⁴⁸.

Finalmente, los **reservosomas** son estructuras inusuales donde, después de la endocitosis, son dirigidas las macromoléculas endocitadas, y colocalizan con la mayor cisteín-proteinasa de *T. cruzi*, la cruzipaina ⁴⁹.

1.1.1.5 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* presenta diferentes etapas de desarrollo, tanto en el vector biológico como en el hospedero mamífero. Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, así como formas infectivas y no infectivas. En el hospedero mamífero se encuentran las formas amastigota y tripomastigota sanguíneas, mientras que las formas tripomastigota metacíclico y epimastigota se desarrollan en el insecto vector. Los tripomastigotas son infectivos, no replicativos, mientras que los epimastigotas son formas no infectivas, replicativas ^{50, 51}. Por su parte, los amastigotas, son un estadio intracelular replicativo, cuya infectividad ha sido controversial ⁵². Durante el proceso de transición de una etapa del ciclo de vida a otra el parásito exhibe cambios profundos en morfología (tamaño celular, forma celular, posición de núcleo y kinetoplasto, y longitud del flagelo) y metabolismo.

Los **epimastigotas** tienen un flagelo anclado cerca del centro del cuerpo del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo y tiene forma de disco. En

promedio miden de 10 a 20 μm de largo, pero crecen otros 10 μm a medida que viajan por el intestino del insecto donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos (Figura 1.5A).

Los **tripomastigotas** tienen un flagelo libre anclado a una membrana ondulante en el cuerpo y el kinetoplasto tiene una ubicación posterior al núcleo. Tienen un tamaño aproximado de 20 μm de largo y 3 μm de diámetro (Figura 1.5B). Los tripomastigotas sanguíneos están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del huésped, y aunque son muy similares morfológicamente a los tripomastigotas metacíclicos, existen diferencias a nivel de expresión de proteínas, en particular, proteínas de superficie ⁵³.

Los **amastigotas** son intracelulares, de forma oval o redondeada, no tienen flagelo protuberante y el kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. Pueden alcanzar un tamaño de entre 1,5 y 5 μm de largo (Figura 1.5C) ^{54,55}.

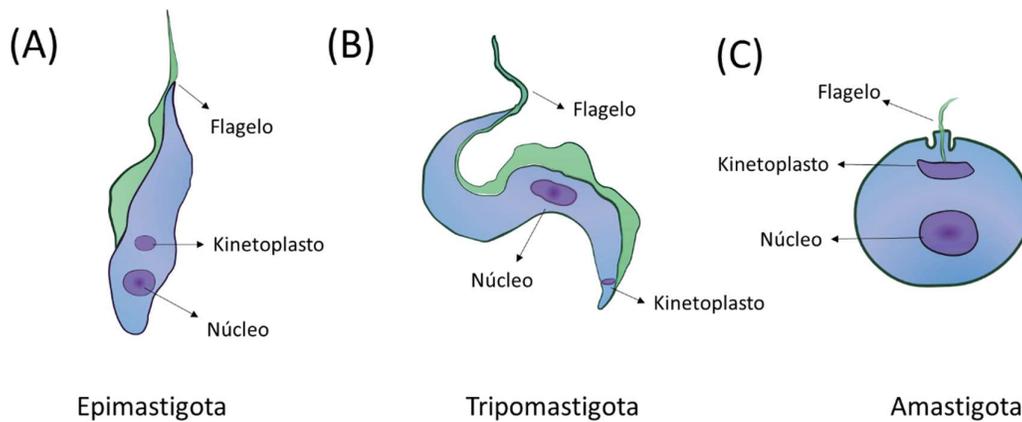


Figura 1.5. Esquema de los estadios del parásito. (A) Epimastigotas. (B) Tripomastigotas. (C) Amastigotas. La morfología de los tripomastigotas sanguíneos y de los metacíclicos es muy similar.

El ciclo de vida del parásito comienza cuando los tripomastigotas metacíclicos, ubicados en la ampolla rectal del insecto triatomino vector, son excretados en sus heces e inician la infección en vertebrados. Los parásitos

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). Una vez en el hospedero, son internalizados por macrófagos mediante vacuolas endocíticas conocidas como vacuolas parasitóforas. Luego de la acidificación del medio, y a medida que los tripomastigotas se van diferenciando a **amastigotas replicativos**, el parásito comienza a secretar la proteína lítica TcTox que en conjunto con la actividad trans-sialidasa lleva a la ruptura gradual de la vacuola parasitófora y a la liberación de los parásitos en el citoplasma. Una vez libres, los parásitos proliferan en el citoplasma de la célula infectada hasta que ocupan la mayor parte del volumen citoplasmático. Al alcanzar un número crítico, los amastigotas se diferencian en **tripomastigotas sanguíneos** flagelados que finalmente se liberan al torrente sanguíneo luego de romper la célula hospedera. Desde allí, los tripomastigotas sanguíneos pueden invadir otras células dada su alta capacidad infectiva. Existen dos tipos de tripomastigotas sanguíneos: delgados y anchos. Los primeros son más capaces de ingresar a las células de los tejidos, son más infecciosos y son más sensibles a los anticuerpos circulantes. Los tripomastigotas anchos permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo, son menos infecciosos, desarrollan parasitemia tardía y son más resistentes a los anticuerpos ^{50, 51}.

Los tripomastigotas sanguíneos pueden ser ingeridos por un insecto vector cuando se alimenta de la sangre del mamífero infectado, diferenciándose luego dentro del insecto en **epimastigotas**, los cuáles se replican en el intestino medio del insecto y en la ampolla rectal se convierten en la forma infectiva tripomastigota metacíclico para cerrar el ciclo de vida (Figura 1.6) ^{50, 51}.

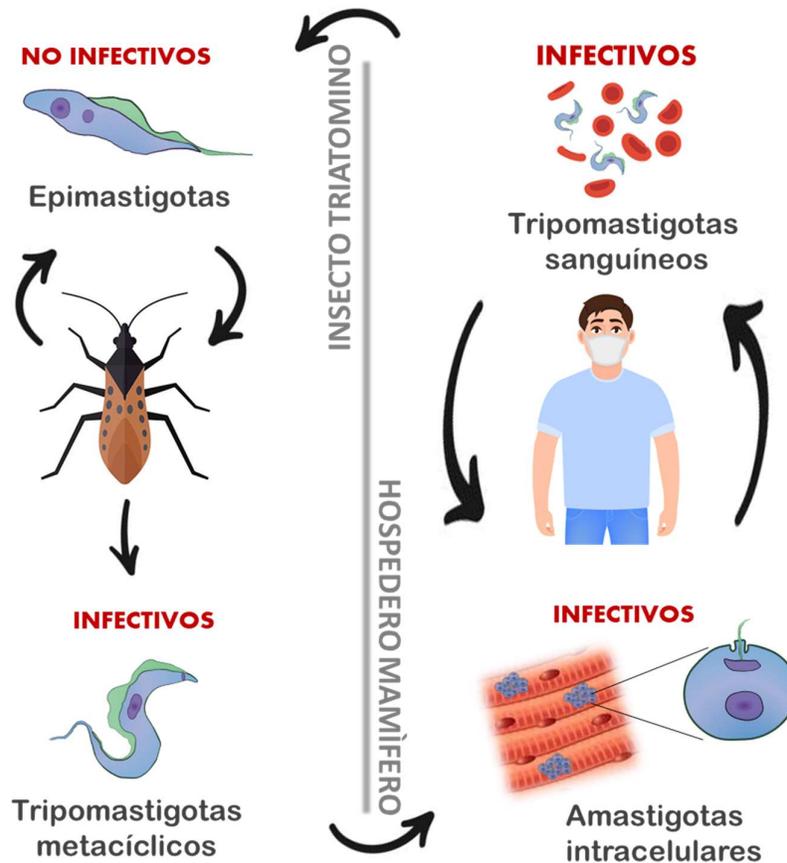


Figura 1.6. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Extraído y adaptado de ⁵⁶.

Investigaciones recientes han revelado que la visión clásica del ciclo de vida de *T. cruzi* es bastante superficial y que el ciclo durante la enfermedad, y particularmente en la etapa crónica es ciertamente más complejo ⁵⁷. En las últimas décadas, se reportaron formas intracelulares similares a epimastigotas, aunque no está claro si esta forma representa etapa intracelular del ciclo de vida o es simplemente un intermedio en la transición de amastigotas a tripomastigotas ⁵⁵. ⁵⁸ En 2014, se identificó una nueva morfología intracelular llamada *zoide*. Este *zoide* resulta de la diferenciación de tripomastigotas metacíclicos en dos unidades asimétricas, resultando en un amastigota y un *zoide*. Esta forma, con kinetoplasto pero sin núcleo, muere rápidamente degradada por la células hospederas ⁵⁹. En 2017 se observó que algunos amastigotas pueden volverse metabólicamente

inactivos, lo cual se ha vinculado con la resistencia a los medicamentos de uso actual para el tratamiento de la enfermedad de Chagas ⁶⁰.

1.1.1.6 Tratamiento actual y desarrollo de fármacos

Si bien han pasado más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad, los tratamientos actuales se basan en dos fármacos nitroaromáticos que fueron descubiertos hace más de cinco décadas: Nifurtimox y Benznidazol (Figura 1.7) ⁹.

61-63

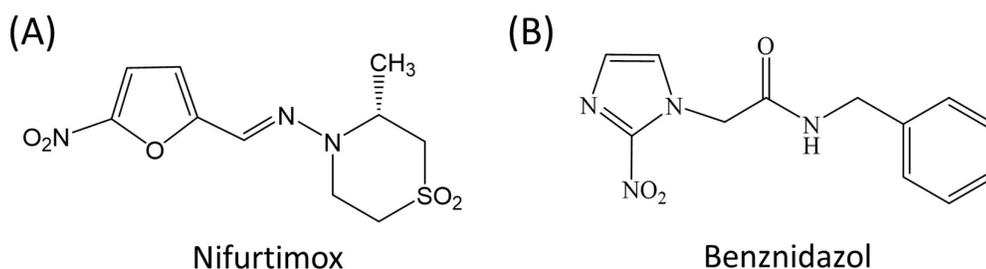


Figura 1.7. Fármacos empleados actualmente en la quimioterapia para la enfermedad de Chagas. (A) Nifurtimox y (B) Benznidazol.

El Nifurtimox (NFX), fue desarrollado originalmente por el laboratorio Bayer (Lampit®). El Benznidazol (Bz), fue desarrollado por Roche (Radanil®, Rochagan®), laboratorio que cedió la patente al gobierno brasilero. Actualmente es producido por el Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco ⁶⁴.

Ambos medicamentos, activos frente a las formas epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*, fueron usados por más de tres décadas sin conocimiento de su mecanismo de acción. En el caso de Nifurtimox, uno de los mecanismos de acción propuestos es la reducción metabólica del grupo nitro por enzimas nitrorreductasas (NTR) tipo I dependientes de NADPH/NADH como la NTR I, generando posteriormente especies reactivas de oxígeno (EROS) que son

tóxicas para el parásito ⁶⁵⁻⁶⁹. Por otra parte, se ha planteado como mecanismo alternativo el desbalance de la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial y la generación de metabolitos citotóxicos derivados del nitrilo ^{66, 70}.

Para el Benznidazol (Bz), se han propuesto numerosos mecanismos de acción. Uno de ellos implica la reducción metabólica por la enzima NTR I, formando metilgioxal, el cual forma aductos con la guanosina e impide la formación de nuevas cadenas de ADN ^{67, 71-73}. Se ha propuesto también, que el Bz induce quiebre de la doble hebra del ADN por oxidación de nucleótidos, causando la muerte de los parásitos ^{74, 75}. Adicionalmente, se ha visto que el Bz induce arresto del ciclo celular principalmente en fase G0/G1, con disminución de la actividad metabólica en células de mamífero ^{76, 77}. Se ha propuesto que el Bz también actúa mediante la inducción de estrés oxidativo en el parásito por generación de EROS ⁷⁸. *T. cruzi* no tiene actividad catalasa ni glutatión peroxidasa, y su actividad superóxido dismutasa es muy baja ^{79, 80}, por lo tanto, su principal defensa contra radicales libres, son el glutatión reducido y un conjugado de glutatión y espermidina llamado tripanotiona ^{81, 82}. Sin embargo, éstos reaccionan con los metabolitos reducidos del Bz, disminuyendo así la defensa del parásito contra radicales libres, lo cual parece ser la causa del estrés oxidativo inducido por el Bz en *T. cruzi* ⁸³. Estudios recientes han demostrado que al tratar los parásitos con Bz, se incrementa la producción de 8-oxoguanina (8-oxoG), un indicador de estrés oxidativo, así como la sensibilidad reportada al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un producto del estrés oxidativo ⁸⁴, afectando además la actividad mitocondrial ^{85, 86}. Aunque este parásito cuenta, con 5 peroxidases, de las cuales una es la triparredoxin peroxidasa citosólica (TcCPX) y otra mitocondrial (TcMPX), dos peroxidases dependientes de glutatión (TcGPX I y II) y una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (TcAPX) ⁸⁷⁻⁹¹, este sigue siendo un sistema de detoxificación deficiente.

Ambos fármacos son efectivos en la fase aguda, y en la fase crónica la disminución de la eficacia está asociada al desarrollo de resistencia por parte del parásito ^{9, 61-63, 92}.

Ambos presentan importantes efectos adversos. Entre ellos, se destacan para NFX la anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, entre otros. En el caso de Bz, las reacciones adversas más comunes 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. Ambos están contraindicados para mujeres embarazadas, personas con insuficiencia renal o hepática, trastornos neurológicos o psiquiátricos. ⁶⁴.

En la fase crónica, si bien la parasitemia y el xenodiagnóstico puedan negativizarse, la reacción serológica, la afección cardíaca, y la progresión de la enfermedad continúan. Como tratamiento alternativo para esta fase de la enfermedad se han reposicionado fármacos como el Allopurinol (utilizado para 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 ⁹³.

Hoy en día existe un número significativo de posibles candidatos como potenciales nuevos fármacos. Algunos de ellos son los compuestos inhibidores de cruzipaina ⁹⁴⁻⁹⁶, compuestos inhibidores de la actividad de enzimas que están compartimentalizadas en el glicosoma ⁹⁷, compuestos que influyen en el metabolismo del tripanotión (inhibiendo la actividad enzimática de la tripanotiona sintetasa, tripanotiona reductasa y tripanotion glioalasa) ⁹⁸⁻¹⁰⁰ y compuestos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol ¹⁰¹. En la Figura 1.8 se representan los principales blancos de acción de los fármacos actualmente en el

mercado y potenciales candidatos a fármacos en etapas tempranas de experimentación y en fases avanzadas ¹⁰².

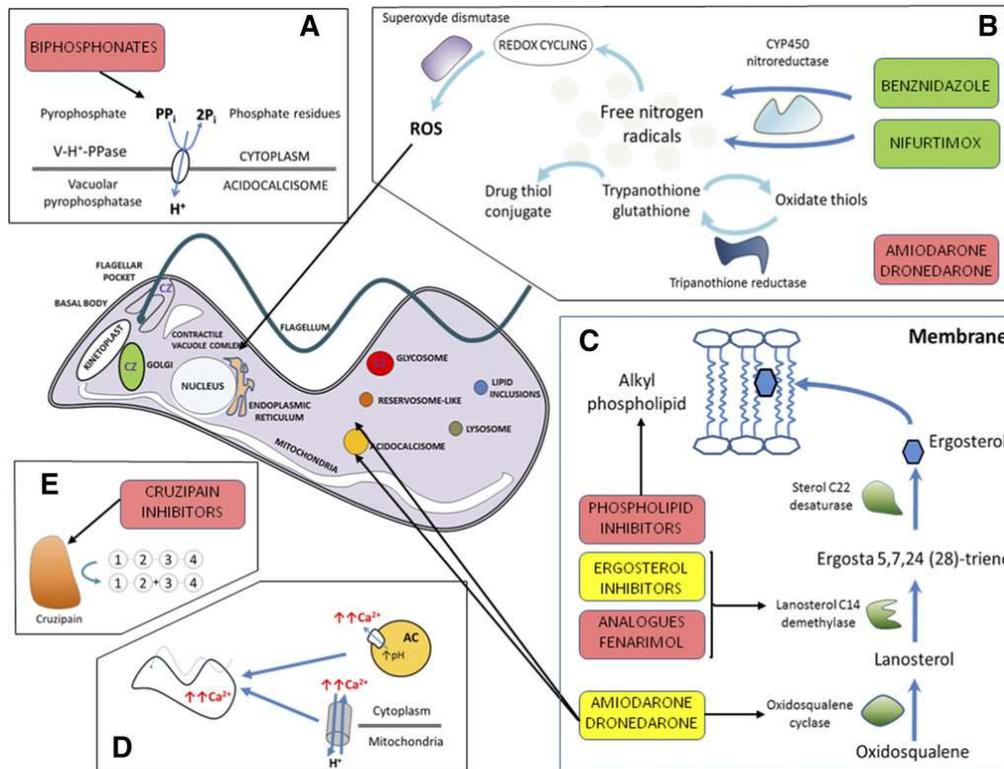


Figura 1.8. Representación esquemática del mecanismo de acción de los fármacos antichagásicos de uso en el mercado y principales candidatos a fármacos con actividad tripanocida. Los nombres en los recuadros verdes representan fármacos usados actualmente para el tratamiento de la enfermedad. Los nombres en recuadros amarillos representan fármacos que están en etapas clínicas y en recuadros rojos, potenciales compuestos en experimentación de etapas tempranas. (A) Los bifosfonatos inhiben la farnesil pirofosfato sintasa, que reduce los niveles de esteroides y otros compuestos isoprenoides esenciales, afectando la viabilidad celular. (B) NFX y Bz son reducidos por la nitroreductasa parasitaria, lo que resulta en especies tóxicas para las células, incluidas especies reactivas del oxígeno. La enzima tripanotona reductasa contribuye a disminuir los niveles de estrés oxidativo, por lo que los inhibidores de esta enzima tales como Tioridazina y Sulfoximina butionina incrementan los niveles de EROS en los parásitos. (C) La biosíntesis de ergosterol es esencial para los parásitos, por lo que bloquear esta vía conduce a la pérdida de viabilidad celular por disminución de la cantidad de

ergosterol y acumulación de intermediarios de síntesis. Los inhibidores de ergosterol y análogos del fenarimol, actúan principalmente sobre la lanosterol-14- α -demetilasa, y amiodarona y dronedarona inhiben parcialmente la oxidoescualeno ciclasa. (D) Amiodarona y Dronedarona liberan Ca^{2+} de la mitocondria y acidocalcisomas, lo que incrementa los niveles de calcio en el citoplasma y compromete la viabilidad celular. (E) La cruzipaina es una cisteín proteasa esencial para la diferenciación parasitaria, invasión celular, multiplicación y la evasión del sistema inmune, que está típicamente localizada en el aparato de Golgi, el bolsillo flagelar y glicosomas. Los inhibidores de la cruzipaina alteran el aparato de Golgi, dando lugar a la acumulación de precursores de la enzima. Extraído de la referencia ¹⁰².

1.1.2 Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una NTD de transmisión vectorial causada por los parásitos protozoarios del género *Leishmania*. La enfermedad es endémica en casi 100 países y la población de riesgo total estimada es cercana a 350 millones de personas. Cada año se estima que hay 2 millones de nuevos casos y, actualmente, la prevalencia global es cercana a los 12 millones de casos. No obstante, los números están probablemente subestimados ya que los casos no se reconocen y la notificación no es obligatoria en la mayoría de los países ^{103, 104}. Se han caracterizado más de 20 especies diferentes de *Leishmania* que se transmiten a los animales y humanos a través de la picadura de 70 tipos diferentes de insectos de la familia *Psychodidae* ¹⁰⁵.

1.1.2.1 Características de la enfermedad

La Leishmaniasis presenta tres principales categorías fenotípicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Estas tres categorías se pueden subdividir aún más para abarcar el espectro de manifestaciones clínicas en las regiones del planeta. En algunos individuos la infección puede mantenerse como

asintomática o subclínica, pero también puede manifestarse en fase aguda, subaguda o a nivel crónico ¹⁰⁵.

La **leishmaniasis cutánea** se manifiesta principalmente como una pápula en la zona de la picadura del vector biológico, particularmente en zonas de extremidades y cara, las cuales son las más expuestas. En los países asiáticos, africanos, de medio oriente y europeos, la leishmaniasis cutánea es producida principalmente por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* y *L. donovani*; mientras que, en las regiones de las américas se ha caracterizado que la enfermedad es producida por los tipos *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. viannia subgenus*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* ¹⁰⁶.

Durante semanas o meses, las pápulas progresan hasta convertirse en úlceras indoloras con bordes amontonados, que pueden sanar espontáneamente luego de meses o años, o causar cicatrices y desfiguración. Sin embargo, hay una variedad de manifestaciones cutáneas atípicas nodulares, esporotricoides, diseminadas, psoriasiformes, verrugosas, zosteriformes, eczematosas y/o erisipelosas ^{107, 108}

La **leishmaniasis mucocutánea** es la forma de la enfermedad más morbida, conduciendo a deformidades faciales típicamente después de años de la redisolución de los síntomas cutáneos iniciales. Frecuentemente es causada por el subgénero *L. viannia*, el parásito se disemina en la piel hasta la nasofaringe mucosa, a través del sistema circulatorio y linfático. Los pacientes a menudo informan síntomas nasales crónicos que incluyen secreciones, epistaxis y dolor. Además, se encuentra evidencia de ulceración, sangrado e inflamación de las mucosas, llegando a ocurrir perforación del tabique nasal o colapso de la parte anterior de la nariz. A diferencia de la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis mucosa no sana de forma espontánea ^{103, 109}.

La forma más letal de leishmaniasis, la **leishmaniasis visceral**, puede causar infección a nivel del hígado, bazo, sistema circulatorio y linfático.

Las especies que se asocian típicamente con la leishmaniasis visceral son *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* ¹¹⁰. Algunas de las manifestaciones graves son hepatoesplenomegalia, fiebre, pancitopenia e hipergammaglobulinemia. En menor medida, también existen síntomas de fatiga, dolor abdominal y pérdida de peso ¹¹¹.

El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse por detección directa (observación de la forma amastigota en tejidos) o indirectamente, por detección inmunológica, con posterior confirmación molecular por técnicas de PCR. La confirmación del diagnóstico a menudo no es práctica en países de bajos recursos, donde la enfermedad tiene la mayor concentración de casos ¹⁰³.

1.1.2.2 Vector biológico

La enfermedad es transmitida a seres humanos, animales domésticos y mamíferos silvestres a través de la picadura de insectos flebótomos hembra infectados, de la familia Psychodidae, que necesitan ingerir sangre para producir huevos. En la Figura 1.9 se muestra *Lutzomyia longipalpis*, díptero hematófago de la familia Psychodidae, vector biológico de *L. infantum* en las Américas.



Figura 1.9. Vector biológico de *L. infantum*. *Lutzomyia longipalpis*, díptero hematófago de la familia Psychodidae. Extraído de ¹¹²

La epidemiología de la leishmaniasis depende de la presencia de los flebótomos, la especie de *Leishmania* transmitida, de las características ecológicas de los lugares donde se transmite, de la exposición previa y actual de la población humana al parásito y del comportamiento humano. Hay unas 70 especies animales, entre ellas el ser humano, que son reservorios naturales de *Leishmania*. El reservorio de *L. infantum* es el perro doméstico, que presenta condiciones que lo transforman en el reservorio por excelencia de este parásito ^{103, 113}.

1.1.2.3 Localización y epidemiología

Se estima que alrededor de 12 millones de personas en el mundo están afectadas por leishmaniasis ¹⁰⁴. Principalmente, las regiones más afectadas son las zonas de más bajos recursos de los diferentes continentes. Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos o el alcantarillado a cielo abierto) pueden promover la cría y el reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre. Además, es probable que algunas pautas de comportamiento humano, como dormir a la intemperie o en el suelo, aumenten también el riesgo ¹⁰⁵.

Los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden afectar considerablemente a los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población; las pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un efecto acusado en el ciclo de desarrollo de los promastigotas de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica; las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a

desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la leishmaniasis ^{105, 109, 114}.

En África, la leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea es endémica. La epidemiología de la leishmaniasis en las Américas es muy compleja, con variaciones en los ciclos de transmisión, huéspedes reservorios, vectores flebótomos, manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento, y múltiples especies de *Leishmania* circulantes en una misma área geográfica ^{104, 105, 111}.

La región del Mediterráneo Oriental concentra el 80 % de los casos de leishmaniasis mucocutánea a nivel mundial. La leishmaniasis visceral es altamente endémica en Irak, Somalia, Sudán y Yemen y es la principal forma de la enfermedad en la región de Asia Sudoriental, siendo esta región la única con una iniciativa para eliminar la leishmaniasis visceral como problema de salud pública (Figura 1.10). En Europa, la leishmaniasis cutánea y visceral son endémicas ^{104, 105, 107, 115-117}.

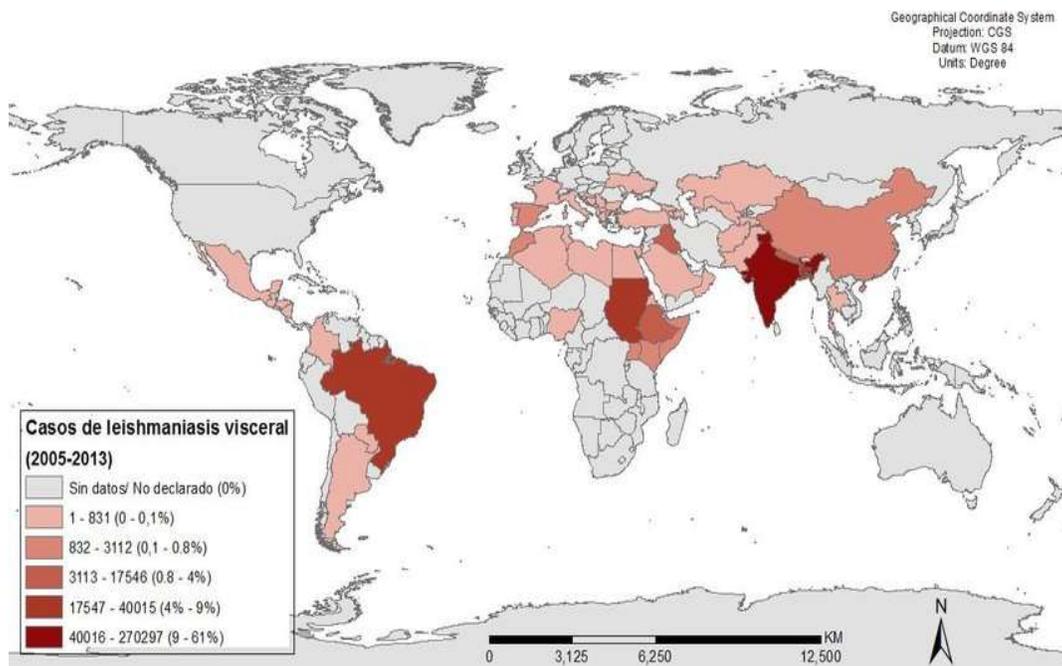


Figura 1.10. Distribución mundial de casos de Leishmaniasis visceral (2005-2013).
Extraído de ¹¹⁶.

Si no se trata, la leishmaniasis visceral es mortal en más del 95 % de los casos. La mayoría de los casos se registran en Brasil, África oriental y la India (Figura 1.10). Se calcula que anualmente se producen en todo el mundo entre 50.000 y 90.000 nuevos casos, de los que solo entre el 25 % y el 45 % se notifican a la OMS. En 2020, más del 90 % de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en 10 países: Brasil, China, Eritrea, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán, Sudán del Sur y Yemen.

La leishmaniasis mucocutánea es la más frecuente y el 95 % de los casos que se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. En 2020, más del 85 % de los nuevos casos aparecieron en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Iraq, Libia, Pakistán, Perú, República Árabe Siria y Túnez. Se calcula que cada año hay en el mundo entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos.

Las principales estrategias de la OMS para la prevención y control de la enfermedad incluyen el diagnóstico temprano y la atención eficaz a los casos, la lucha antivectorial y el control de los reservorios animales.

En el año 2010, *Lutzomyia longipalpis* fue capturado por primera vez en las localidades de Bella Unión y Salto ¹¹⁸. En febrero de 2015 se describieron los primeros casos de Leishmaniasis por *L. infantum* en perros del paraje Arenitas Blancas en el Departamento de Salto y en el 2016 en perros de la ciudad de Bella Unión. A fines del 2018 y principio del 2019, se registraron los dos primeros casos humanos de Leishmaniasis visceral en residentes del Departamento de Salto, zona urbana, con un fallecimiento. Ante esta situación la División de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública conformó un equipo multidisciplinario para la revisión y actualización de la guía de leishmaniasis visceral en los componentes humano, vector, reservorio y comunicación, destacando los principales lineamientos de actuación en nuestro país, en cada uno de los componentes ¹¹⁹.

1.1.2.4 *Leishmania*

El género *Leishmania* se clasifica dentro del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, cuya característica representativa es la presencia de kinetoplasto. Todas las especies de *Leishmania* son parásitos que poseen un único flagelo que presenta una invaginación, un kinetoplasto en el interior de una única mitocondria y una red de microtúbulos sub pelicular que conforman la mayor parte del citoesqueleto ¹²⁰.

El microorganismo presenta dos estadios bien diferenciados: promastigotas y amastigotas ¹²⁰. A su vez, la forma promastigota se manifiesta con diferentes características dependiendo de las condiciones del medio, tanto en el hospedero mamífero como dentro del insecto vector. En el tracto alimentario del flebótomo, *Leishmania* se replica de forma extracelular bajo la forma promastigota, con una motilidad alta. Esta forma es denominada promastigota procíclico, que es replicativo, pero con baja capacidad de infección. En la probóscide del flebótomo y una vez ingresan al hospedero mamífero (antes de ser fagocitados por macrófagos), los promastigotas procíclicos se diferencian a promastigotas metacíclicos a través de un proceso denominado metaciclogénesis, perdiendo la capacidad de replicarse, pero aumentando sustancialmente su capacidad infectiva en el hospedero mamífero ^{121, 122}. Los promastigotas metacíclicos expresan proteínas de membrana específicas del estadio que los vuelve resistentes dentro del hospedero mamífero. Además, se vuelven resistentes al complemento. Los promastigotas metacíclicos se diferencian en amastigotas dentro de la vacuola parasitófora, luego de ser fagocitados por macrófagos. La diferenciación incluye la reducción de tamaño, la pérdida de motilidad y la reducción del flagelo ¹²¹⁻¹²⁴. Algunos factores particulares que desencadenan el proceso de metaciclogénesis son la disminución de pH, la falta de oxígeno y el agotamiento nutricional. En cuanto a

la diferenciación en amastigotas, ésta puede ser inducida en condiciones de aumento de temperatura a 37 °C y una elevada presión de CO₂ ^{122, 125}.

La Figura 1.11 señala las principales estructuras celulares del parásito, representadas sobre la forma promastigota y amastigota.

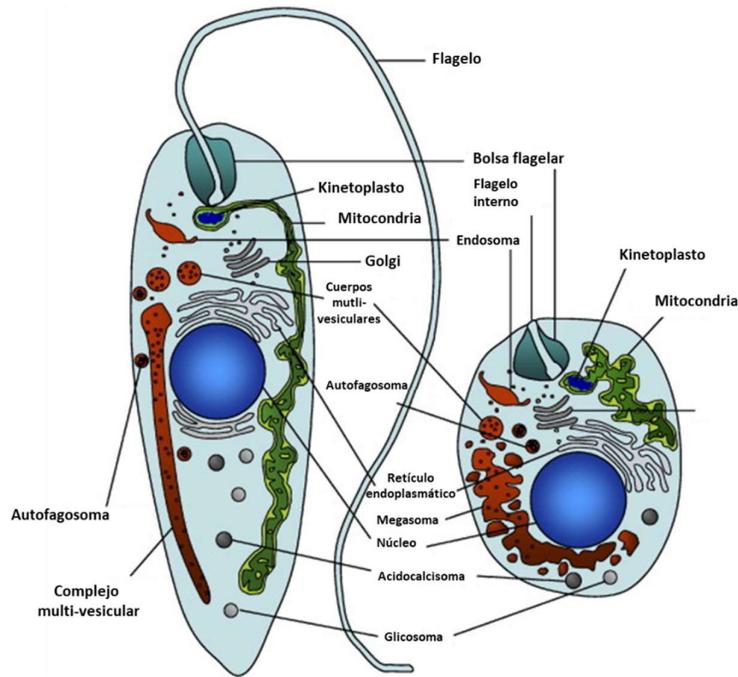


Figura 1.11. Vista esquemática de la forma promastigota (izquierda) y amastigota (derecha) de *Leishmania*. Se señalan las principales estructuras celulares. La bolsa flagelar marca el extremo anterior de la célula. Extraído y adaptado de la referencia ¹²⁵.

1.1.2.5 Ciclo de vida de *Leishmania*

Dentro del insecto, los promastigotas metacíclicos se encuentran en la sección anterior del sistema digestivo del flebótomo infectado. La alta densidad que llegan a alcanzar produce el taponamiento de su faringe, por lo que, para poder llevar a cabo la succión de la sangre del hospedero, es necesario que el mosquito regurgite este "tapón" infectivo. Estudios de imagen *in vivo* han demostrado que la picadura del vector induce una rápida infiltración de

neutrófilos y un reclutamiento sustancial de macrófagos en la piel, con independencia de la presencia o la ausencia de parásitos, demostrando por lo tanto que este reclutamiento es producto del daño tisular asociado a la picadura ¹²⁶. La fagocitosis de los parásitos metacíclicos por parte de los neutrófilos se produce por activación del complemento. El lipofosfoglicano (LFG), que presenta cadenas peptídicas de mayor longitud en las formas metacíclicas, es capaz de prevenir la unión de las C5b y C9 del complemento, mientras que la glicoproteína de superficie gp63 es capaz de convertir la proteína C3b en su forma inactiva C3bi, que se une a la superficie del parásito evitando así el ataque de la proteína C5 del complemento. Además, las proteínas C3b y C3bi favorecen la opsonización, atrayendo a los macrófagos hacia los promastigotas, que se unen a los receptores CR1 y CR3 de los macrófagos de los tejidos locales para ser fagocitados, formando una vacuola parasitófora y fusionándose con los lisosomas ^{127, 128}.

Las células dendríticas dérmicas se infectan en el sitio de inoculación en la piel y son capaces de migrar a los ganglios linfáticos vecinos drenantes de la región afectada. Una vez que están dentro de la célula hospedadora, los metacíclicos quedan encerrados en el interior de los fagosomas, rodeados por membrana originada a partir de la célula hospedadora. La diferenciación celular a la forma amastigota en el interior de las células hospedadoras conlleva marcada reordenación ultraestructural en los parásitos, incluyendo la pérdida del flagelo y un cambio del LFG de la superficie celular ^{125, 129}. Los amastigotas se multiplican activamente hasta lisis del macrófago. Una vez fuera de la célula hospedadora, los amastigotas son capaces de infectar nuevos macrófagos y monocitos en otros tejidos, que a su vez pueden ser retomados por otro insecto que se alimente del hospedador infectado. Cuando se da la lisis del macrófago infectado dentro del flebótomo, se promueve la diferenciación de los amastigotas a promastigotas procíclicos, que tienen morfología fusiforme y flagelo, replicándose en la sangre

ingerida encapsulados dentro de una matriz peritrófica secretada por el epitelio intestinal. Tras unos días, los promastigotas procíclicos retrasan su replicación para diferenciarse en a su forma metacíclica, plenamente infectiva, listos para ser nuevamente inoculados (Figura 1.12) ^{122, 125, 129}.

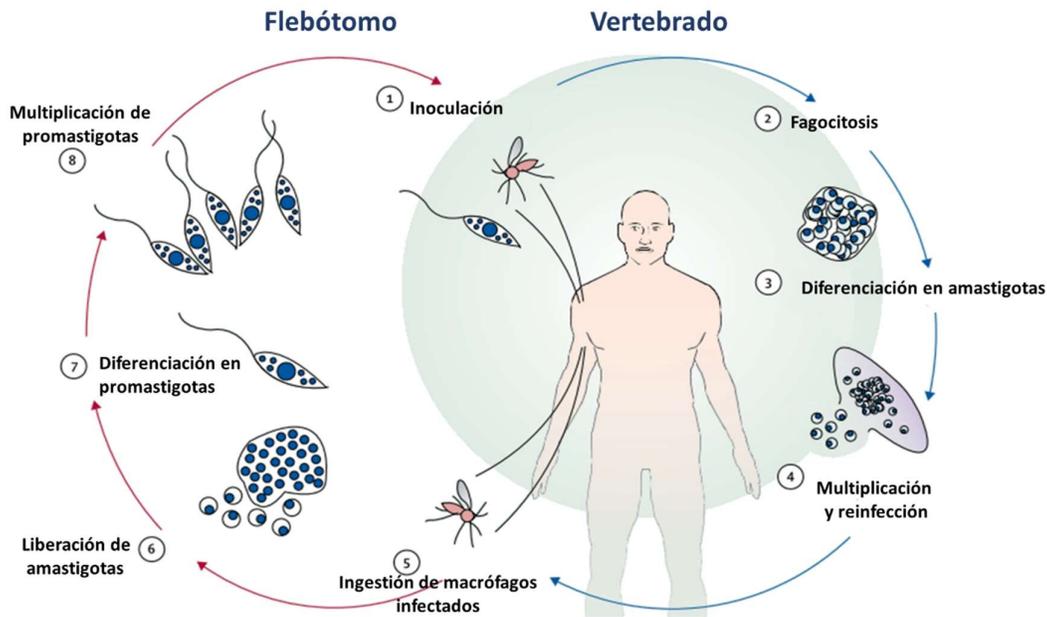


Figura 1.12. Ciclo de vida de *Leishmania*. Un insecto flebótomo infectado pica al hospedero mamífero inoculando promastigotas metacíclicos, altamente infectivos. Una vez dentro del hospedero, los promastigotas son fagocitados por macrófagos, donde se diferencian en amastigotas intracelulares. Los amastigotas se multiplican por fisión binaria y rompen la célula, liberándose y re-infectando nuevos macrófagos. Los macrófagos infectados ingeridos por los insectos se transforman en promastigotas procíclicos. Los parásitos se multiplican y se diferencian a promastigotas metacíclicos infecciosos en la probóscide del insecto. Extraído y adaptado de ¹⁰⁵.

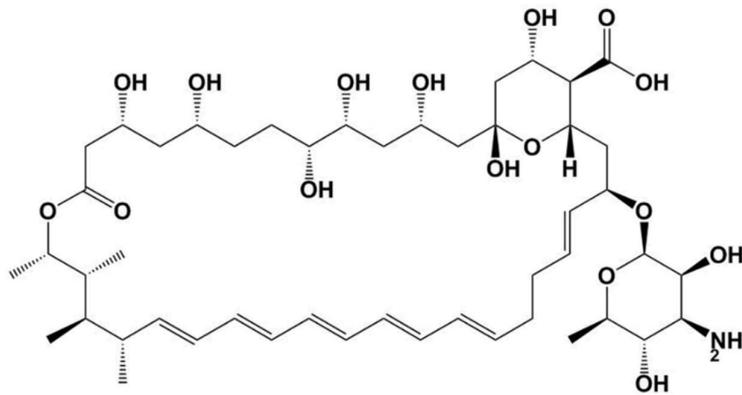
1.1.2.6 Tratamiento actual y desarrollo de fármacos

En la actualidad, la anfotericina B liposomal (L-AMB) (Figura 1.13) es considerada como el fármaco de elección para el tratamiento de la leishmaniasis

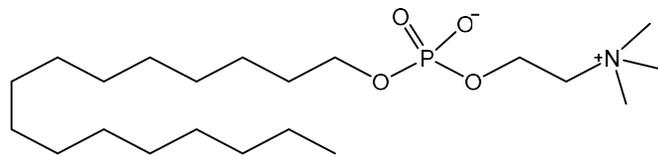
visceral en países desarrollados, sin embargo, debido a su elevado costo, el tratamiento se ha visto frenado en países menos favorecidos, donde la enfermedad es altamente prevalente debido a su carácter endémico ¹¹³. En las últimas décadas, las empresas farmacéuticas, han concertado precios más bajos y atractivos, destinados a estos países, lo cual, junto a la implementación de tratamientos de corta duración a dosis elevadas, hace cada vez más factible el uso de L-AMB en países en vías de desarrollo ¹³⁰. Por otra parte, los compuestos de Sb(V) (antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio) (Figura 1.13), desarrollados en el año 1945, continúan siendo el tratamiento de elección en la mayor parte del mundo. La eficacia de los fármacos de uso actual ha decrecido dramáticamente, tanto por la aparición y diseminación de cepas resistentes, como por su toxicidad. Las alternativas quimioterapéuticas a los compuestos de Sb(V), además de la L-AMB, incluyen la pentamidina y el alopurinol que poseen los mismos problemas asociados, aunque no de forma tan acusada, pero requieren de largos tratamientos de administración parenteral ^{62, 103, 107, 131, 132}.

Históricamente, el tratamiento de la leishmaniasis cutánea también ha hecho uso de antimoniales pentavalentes como fármaco de primera elección. La toxicidad de los fármacos disponibles, junto con la duración del tratamiento estimularon el uso de vías y fármacos alternativos para tratar la forma cutánea de la enfermedad. Por ejemplo, en casos benignos (una o pocas lesiones pequeñas en zonas corporales no críticas) causados por *L. major* se han aplicado opciones locales como Paromomicina tópica, termoterapia, crioterapia o antimoniales. La heterogeneidad de cuadros clínicos, progresión de la enfermedad, complicaciones y respuesta al tratamiento de los distintos agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea hace que la elección de la terapia sea mucho menos homogénea que para la leishmaniasis visceral. Otros fármacos sistémicos aplicables son la pentamidina, la anfotericina B y la miltefosina. No obstante, los antimoniales siguen siendo el tratamiento de primera línea. El uso de anfotericina

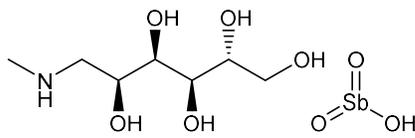
B en leishmaniasis cutánea generalmente se reserva como segunda o tercera opción tras el fracaso del tratamiento, principalmente por toxicidad ^{132, 133}.



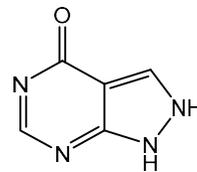
Anfotericina B



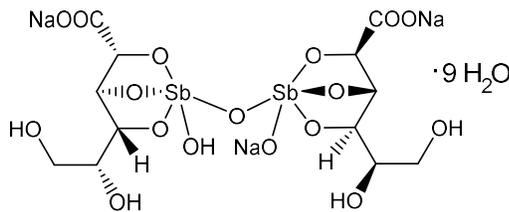
Miltefosina



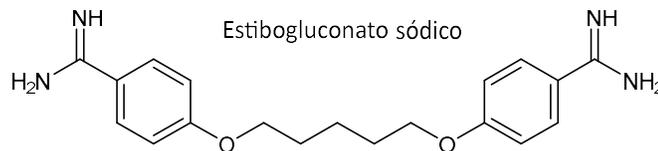
Antimoniato de meglumina



Allopurinol



Estibogluconato sódico



Pentamidina

Figura 1.13 Estructura química de los fármacos empleados actualmente en la quimioterapia de la Leishmaniasis

Todas las alternativas terapéuticas mencionadas anteriormente presentan toxicidad considerable, alto costo y deben administrarse por vía parenteral. Además, el riesgo o la demostración de resistencia del parásito se ha convertido en una preocupación importante. Además, los fármacos leishmanicidas disponibles presentan otro importante inconveniente, la frecuente indeterminación de sus blancos de acción. Este hecho dificulta la obtención de modelos simples que permitan el cribado farmacológico de un gran número de compuestos en formato de alto rendimiento ^{103, 132}.

1.2 QUÍMICA INORGÁNICA MEDICINAL

1.2.1 El crecimiento de la Química Inorgánica Medicinal

Se le denomina Química Bioinorgánica al área de la Química Inorgánica que se dedica al estudio del papel que desempeñan, en los seres vivos, los elementos distintos del carbono y de los no metales que los acompañan habitualmente en su química ¹³⁴, incluyendo el estudio de fenómenos naturales como el comportamiento de metaloproteínas, o fenómenos artificiales relacionados con la importancia de éstos en medicina y toxicología ¹³⁵.

Los iones metálicos juegan un papel importante en organismos vivos debido a que participan de numerosos procesos biológicos. Los elementos metálicos que son necesarios para el correcto funcionamiento de los seres vivos son llamados metales esenciales. Estos están ampliamente distribuidos en los sistemas biológicos y cumplen funciones vitales. De los 10 elementos de la primera serie de transición, 5 de ellos son elementos esenciales para los humanos: Mn, Fe, Co, Cu y Zn. Particularmente, los iones de Mn, Fe y Cu cumplen funciones catalíticas fundamentales como cofactores de metaloenzimas, grupo de enzimas que representan un tercio del total ¹³⁶⁻¹³⁹. Por ejemplo, el ión ferroso en la hemoglobina (Figura 1.14A) está implicado directamente en la reacción de

transporte electrónico ¹⁴⁰. Por su parte, el Cobalto ha demostrado ser un elemento esencial, formando parte de la Vitamina B12, la cual es fundamental para el funcionamiento de enzimas del metabolismo de biomoléculas (Figura 1.14B) ¹³⁶⁻¹³⁸. El quinto elemento esencial para los humanos de la primera serie de transición es el Zn, el cual tiene funciones estructurales en metaloenzimas dada su inactividad a nivel redox ^{137, 139}.

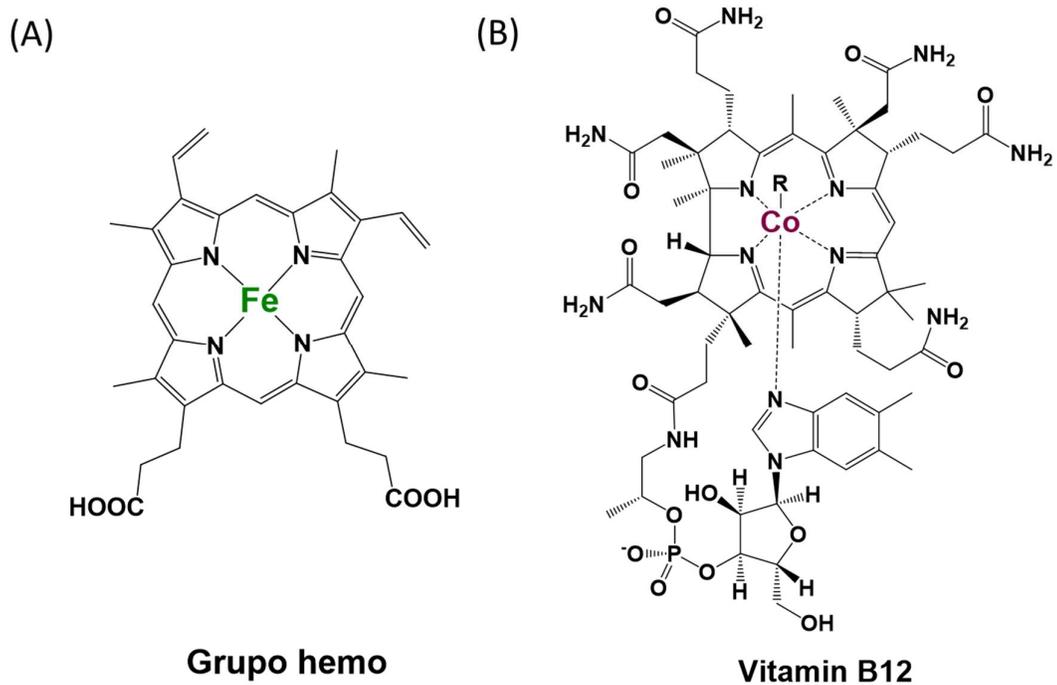


Figura 1.14. (A) Estructura del grupo hemo de la hemoglobina. (B) Estructura de la Vitamina B12.

En contraste con los elementos esenciales, se denominan *elementos tóxicos* a aquellos otros cuya presencia en un ser vivo puede perturbar seriamente su metabolismo, originando fenómenos de intoxicación. Existen, además, una gama de elementos no esenciales que se han considerados no tóxicos, éstos no provocan efecto biológico positivo ni negativo a concentraciones normales, pero muestran efectos tóxicos cuando su concentración aumenta. Los metales considerados tóxicos, incrementan su toxicidad cuando la concentración aumenta (Figura 1.15).

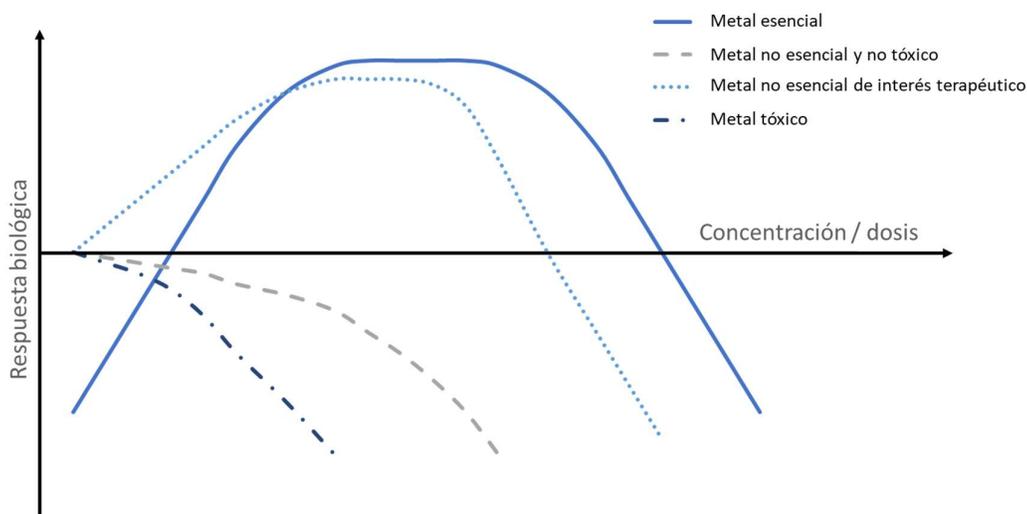


Figura 1.15. Diagrama de Bertrand para metales esenciales, metales no esenciales y no tóxicos metales tóxicos y metales no esenciales de interés terapéuticos. Extraída y adaptada de ¹⁶.

En el contexto de la Química Medicinal, la Química Inorgánica medicinal es una subárea de la Química Inorgánica que involucra clásicamente el desarrollo de compuestos metálicos con diferentes fines que se describen a continuación. Los agentes para **quelatoterapia** permiten remover el exceso de ciertos metales que causa enfermedades. Los niveles deficientes de elementos esenciales pueden generar patologías, por lo que la **suplementación** de elementos esenciales es también considerada como parte del área. Se incluyen también los **agentes de contraste** (principalmente agentes para imagen por resonancia magnética, MRI), **radiofármacos** para diagnóstico y terapia, y **agentes terapéuticos** metálicos ¹⁴¹.

En relación con el desarrollo de agentes terapéuticos o metalofármacos, el uso de compuestos metálicos en medicina se conoce desde la antigüedad. A modo de ejemplos, los egipcios utilizaban cobre para esterilizar agua en el año 3000 antes de la era común. Por otra parte, la utilización de plata, oro y hierro para “curaciones mágicas” data de hace más de cinco mil años ¹⁴².

Los agentes terapéuticos pueden ser sales simples, pero generalmente se trata de compuestos de coordinación, entendiendo por éstos a especies que contienen uno o más *átomos metálicos centrales*, rodeados por átomos o grupos de átomos llamados *ligandos*, de los cuales por lo menos uno está unido al átomo central a través de un enlace covalente coordinado. Por otra parte, pueden tratarse también de compuestos bioorganometálicos, los cuales se caracterizan por presentar al menos un enlace metal-carbono y simultáneamente tener relevancia desde el punto de vista biológico ^{134, 143}. Uno de los primeros compuestos metálicos con aplicaciones terapéuticas fue sintetizado en 1912 por el científico Paul Ehrlich, quien recibió el premio Nobel en 1908. Este fármaco llamado Salvarsan, lanzado al mercado por la empresa Hoechst, es un compuesto de As que fue utilizado para el tratamiento de la sífilis ¹⁴⁴ hasta que fue reemplazado por la penicilina después de la segunda guerra mundial ¹⁴⁵.

1.2.2 Del descubrimiento casual al diseño racional

Pese a estos antecedentes, la Química Inorgánica Medicinal se comenzó a explotar en 1965, a partir del descubrimiento por serendipia de la actividad antiproliferativa del cisplatino, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], por el biofísico Barnett Rosenberg ¹⁴⁶. Hoy en día, la disciplina ha crecido hasta alcanzar el diseño racional de fármacos basados en metales, conduciendo a la incorporación de varios compuestos metálicos al uso clínico habitual y al arsenal terapéutico disponible. Actualmente no se restringe a la terapia antitumoral, sino que también trata de resolver problemas médicos variados como infecciones bacterianas, virales y parasitarias, diabetes, artritis y enfermedades neurológicas como Parkinson y Alzheimer, entre otros ¹⁴⁷⁻¹⁵⁴.

En el área de desarrollo de agentes terapéuticos existen dos focos principales de estudio. Por un lado, fármacos que poseen blancos de acción que son determinados por la presencia de ciertos iones metálicos en los sistemas

biológicos, tales como metales presentes en los sitios activos de enzimas. Y, por otro lado, compuestos metálicos en los que el ion metálico juega un papel fundamental para la actividad farmacológica ¹³⁵.

La inclusión de metales en el diseño racional de fármacos ha ampliado las alternativas sustancialmente, incluyendo elementos metálicos no esenciales, radiactivos y metales que se han sido considerados altamente tóxicos. Los metales muestran variedad de números de coordinación, geometrías, estados de oxidación, potenciales de reducción, características termodinámicas y cinéticas, lo que demuestra la versatilidad en su química ¹³⁴.

Hoy en día, la mayoría de los elementos químicos cumplen una función en medicina, tanto de forma directa como indirecta ¹³⁸. Algunos metalofármacos diseñados como agentes terapéuticos actualmente son utilizados para tratamiento y otros se encuentran en fases clínicas avanzadas.

El cisplatino y sus derivados de segunda generación, tales como el carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, son utilizados en clínica como agentes anticancerígenos (Figura 1.16) ¹⁵⁵.

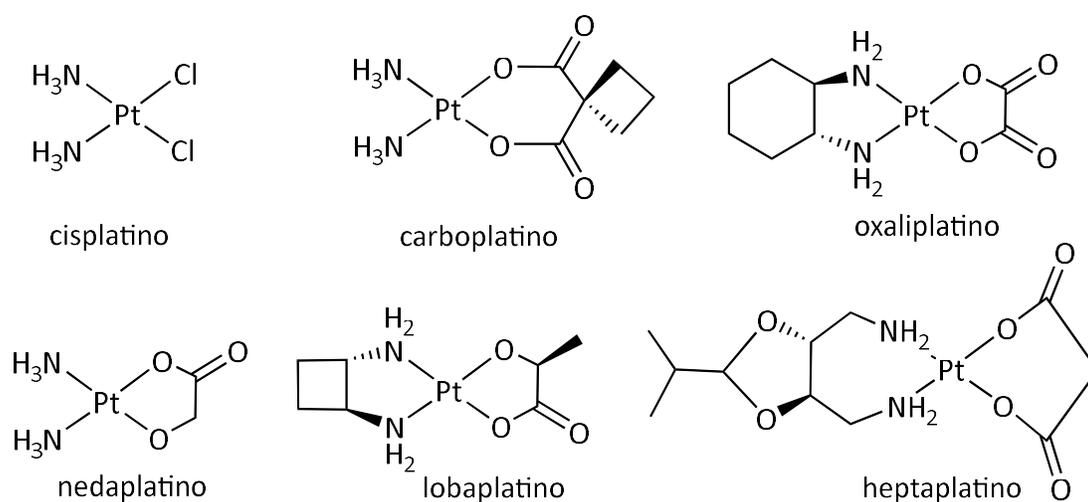


Figura 1.16. Fármacos derivados del cisplatino utilizados como antitumorales.

El mecanismo de acción del cisplatino se basa en la formación de aductos con el ADN. El compuesto sufre hidrólisis parcial e ingresa a la célula mediante transporte pasivo. Una vez en el interior de ésta, el complejo se hidroliza completamente, quedando un compuesto cargado positivamente, que es atraído por la carga negativa de la molécula de ADN. El metal se coordina al ADN a través de los átomos de nitrógeno de las bases guanina y adenina y esto provoca el desenrollamiento y flexión del ADN, evitando los procesos de transcripción y replicación, por lo que la célula activa la cascada apoptótica (Figura 1.17) ¹⁵⁶⁻¹⁵⁹

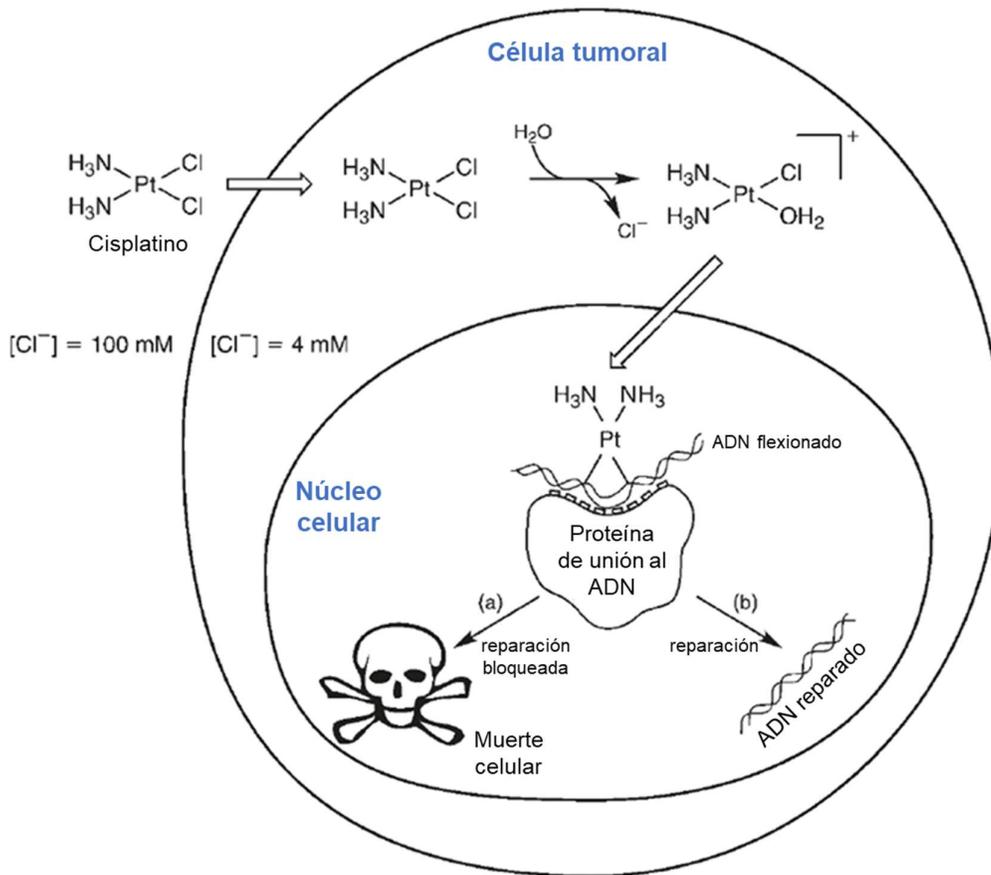


Figura 1.17. Esquema de la actividad citotóxica del cisplatino. Luego de ingresar a la célula, el cisplatino se hidroliza y se une al ADN. Si este daño no es reparado, la célula programa la apoptosis. Esquema extraído y adaptado de la referencia ¹⁶⁰.

No obstante, los compuestos de Pt(II) descritos han presentado resistencia por parte de los tumores y alta toxicidad ¹⁵⁹. Con el objetivo de disminuir los efectos tóxicos de estos compuestos y el desarrollo de resistencia frente a los mismos, se han diseñado compuestos de coordinación altamente activos conteniendo metales alternativos, tales como galio, rutenio, renio y vanadio ^{150, 161-167}.

Algunos compuestos de coordinación como el tris(8-hidroxiquinolato) de galio(III) (KP46), propuesto como metalofármaco antitumoral, se encuentran actualmente en fase clínica ¹⁶⁸. Por su parte, algunos complejos de rutenio (III) avanzaron hasta ensayos clínicos de fase II ¹⁶⁶. Estos ejemplos demuestran las posibilidades reales que esta área ofrece para el desarrollo de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos. Un gran número de compuestos metálicos bioactivos promisorios han visto retrasadas las acciones de estudio preclínico y clínico debido a reticencias de la industria farmacéutica en cuanto a la potencial toxicidad de los compuestos metálicos. Sin embargo, los investigadores del área han considerado las acusaciones como injustas y exageradas. De la misma forma que ocurre con los compuestos orgánicos, una dosis elevada puede llevar a procesos de intoxicación, tal como lo planteó Paracelso en el siglo XVI ¹⁶⁹.

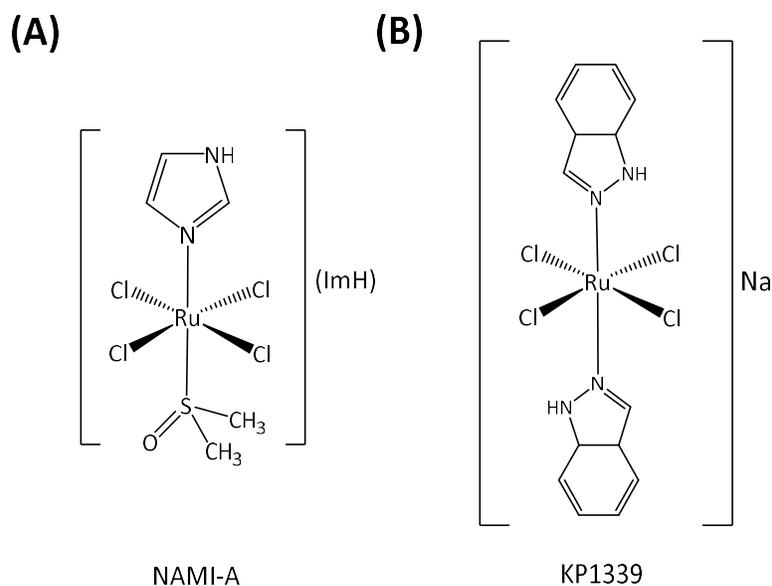


Figura 1.18. Estructura de algunos compuestos de Ru(III) con actividad antitumoral que han llegado a fases clínicas. (A) NAMI-A y (B) KP1339.

Los radiofármacos metálicos, por su parte, desempeñan un papel importante tanto en diagnóstico como en terapia dada su amplia gama de propiedades nucleares, su rica química de coordinación, condiciones suaves de radiomarcado y fácil disponibilidad. El desarrollo de radiofármacos con gran éxito clínico, tales como ^{99m}Tc -sestamibi y ^{99m}Tc -tetrofosmin, como agentes de perfusión miocárdica, ha impulsado el desarrollo de nuevos radiofármacos metálicos exitosos a nivel clínico. La imagenología funcional de tumores a través de SPECT (de sus siglas en inglés, *single-photon emission computed tomography*) y PET (de sus siglas en inglés, *positron emission tomography*) constituyen los métodos de monitoreo no invasivo de mayor sensibilidad disponibles. En general, el PET ofrece mayor sensibilidad y precisión de imagen que SPECT a través de la utilización de radionucleidos como ^{18}F y ^{11}C , sin embargo, se trata de un método más costoso debido al corto período de semidesintegración de los radionucleidos y la necesidad de ciclotrón para producirlos. Por su parte, el

monitoreo por SPECT es comparativamente menos costosa debido a la disponibilidad de isótopos de vida más larga, tales como ^{99m}Tc e ^{111}In .

En radioterapia se emplean radionucleidos de emisión de partículas. A modo de ejemplo, para el tratamiento del dolor paliativo del cáncer metastático de hueso, se utilizan soluciones salinas inyectables de ^{153}Sm y ^{89}Sr . Los 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 están actualmente en ensayos clínicos para el uso contra diversos tipos de cáncer ¹⁷⁰.

Se han desarrollado, además, metalofármacos con propiedades antimicrobianas y antiparasitarias. El fármaco llamado melarsoprol, es un compuesto de arsénico utilizado contra la Tripanosomiasis Africana Humana y el ya mencionado compuesto de antimonio (Pentostam®) es utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis ¹³². Se han utilizado además, complejos de bismuto como bactericidas frente a *Helicobacter pylori* causante de gastritis tipo B, úlceras en el tracto gastrointestinal y cáncer gástrico ¹⁷¹, y ungüentos de Ag(I) para la reparación y tratamiento de infecciones resultantes de quemaduras de segundo y tercer grado ¹⁷².

El origen de la actividad farmacológica de los compuestos de coordinación puede venir dado por la incorporación del metal, o por la presencia de un ligando bioactivo. En el primero de los casos, los ligandos en su forma libre no presentan actividad farmacológica, pero luego de la formación del enlace de coordinación, el cambio de propiedades fisicoquímicas resulta en un efecto positivo sobre el comportamiento biológico. Por otro lado, la formación de complejos con ligandos bioactivos puede resultar en la modulación de su perfil farmacológico, dando lugar a efectos aditivos y/o sinérgicos. La unión al metal puede resultar en un aumento del tiempo de residencia en el organismo del fármaco orgánico, permitiéndole así alcanzar el blanco terapéutico de manera más eficiente. Del mismo modo que la formación de compuestos de coordinación puede cambiar

las propiedades del ligando, la coordinación de ligandos a un metal puede resultar en la disminución de la toxicidad del mismo, ya que hay una disminución en la biodisponibilidad del metal libre ¹⁷³.

Algunos ejemplos del sinergismo metal-fármaco son los complejos insulinomiméticos de vanadio con ligandos biguanidas ¹⁷⁴ los complejos tripanosomicidas de rutenio con el ligando clotrimazol ¹⁷⁵ o complejos antitumorales de cobre con tiosemicarbazonas ¹⁷⁶.

1.2.3 Compuestos metálicos con actividad antiparasitaria

En las últimas décadas varios grupos académicos han centrado su investigación en la búsqueda de compuestos metálicos como nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, enfermedad del sueño y Leishmaniasis. Actualmente, el desarrollo de compuestos metálicos bioactivos frente a parásitos tripanosomátidos es considerada una estrategia atractiva y prometedora en la búsqueda de alternativas terapéuticas ¹⁶.

La formación de una entidad química única capaz de actuar sobre múltiples blancos de acción de forma simultánea por combinación de las propiedades farmacológicas de ambos: el ligando orgánico y el metal, se convirtió en una propuesta atractiva, dado que se puede lograr efectos aditivos o sinérgicos. El desarrollo de nuevos agentes que provean actividad antitripanosoma máxima podría disminuir los efectos tóxicos en el hospedero mamífero, dado que este hecho conduciría a una disminución de la dosis terapéutica. Además, la formación de un compuesto de coordinación puede combatir la generación de resistencia al ligando bioactivo por parte de los parásitos, dado que la formación del complejo lleva a un enmascaramiento. Las propiedades fisicoquímicas de importancia biológica, tales como la solubilidad y la lipofilia también se pueden ver afectadas por la formación del compuesto de

coordinación, de forma que se favorezca la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos.

Unos de los primeros pasos los dieron Sánchez-Delgado y colaboradores, utilizando esta estrategia para sintetizar complejos de diferentes metales de los fármacos comerciales clotrimazol (CTZ) y ketoconazol (KTZ). Estos actúan inhibiendo la biosíntesis del ergosterol a nivel de la enzima lanosterol-14 α -demetilasa (CYP451). Los primeros compuestos desarrollados por este grupo incluían centros metálicos de Ru(II) o Ru(III), tales como *cis, fac*-[Ru^{II}Cl₂(dmsO)₃(CTZ)], *cis, cis, trans*-[Ru^{II}Cl₂(dmsO)₂(CTZ)₂], Na[Ru^{III}Cl₄(dmsO)(CTZ)] y Na[*trans*-Ru^{III}Cl₄(CTZ)₂] (Figura 1.19) ^{175, 177, 178}.

Estos compuestos fueron enfrentados a *T. cruzi*. Particularmente, el complejo *cis, cis, trans*-[Ru^{II}Cl₂(dmsO)₂(CTZ)₂] mostró efecto tripanocida, mientras que el ligando libre CTZ resulta tripanostático. La formación del complejo incrementó 10 veces la actividad respecto al azol en su forma libre en la forma amastigota intracelular y la selectividad hacia el parásito fue mucho mayor que para CTZ. Por lo tanto, el complejo de Ru resultó más activo y menos tóxico que el ligando orgánico. Estudios más avanzados revelaron que el compuesto se hidrolizaba, liberando el CTZ, que actuaría a nivel de la biosíntesis del ergosterol, e interactuaría con ADN a través del centro de rutenio. Posteriormente, ese grupo desarrolló compuestos organometálicos que incluían el fragmento {Ru^{II}-*p*-cimeno} y el ligando CTZ, proporcionando una elevada estabilidad al compuesto

¹⁷⁸.

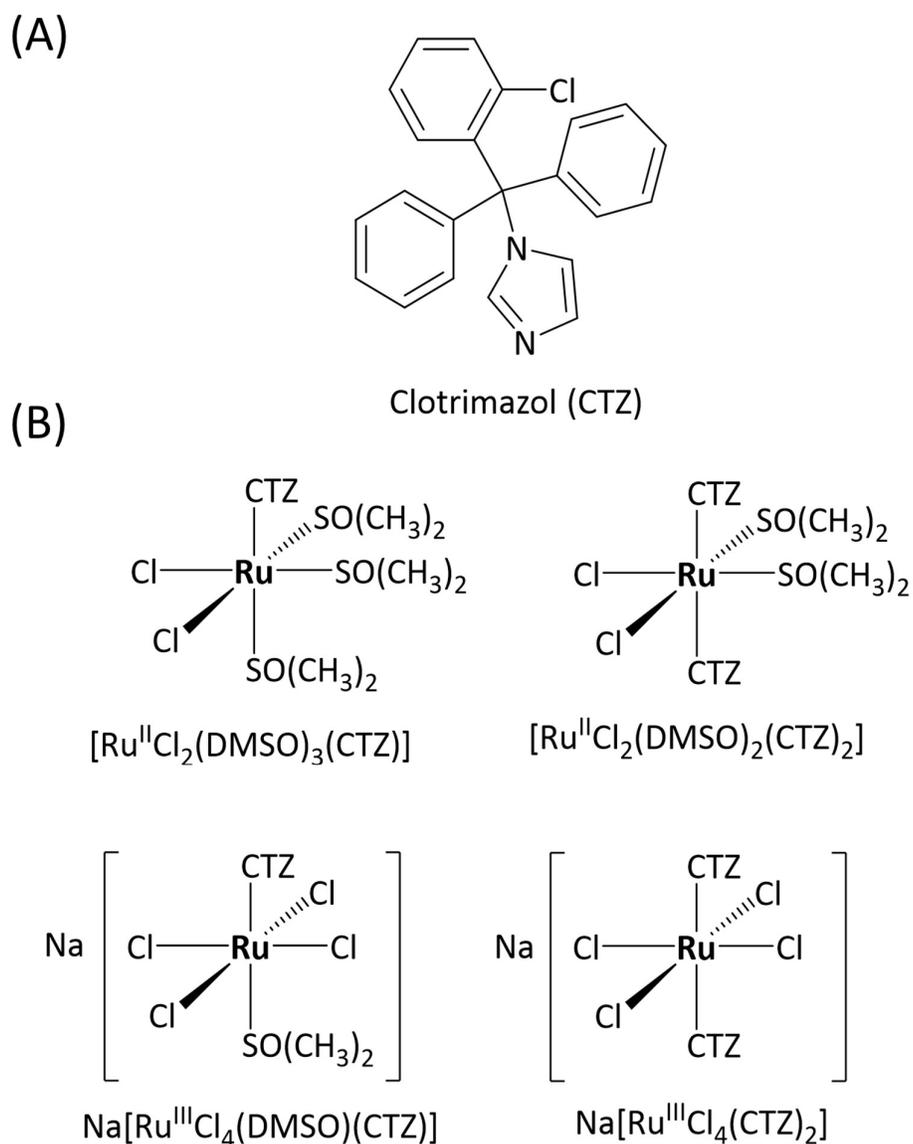


Figura 1.19 (A) Estructura del ligando libre clotrimazol (CTZ). (B) Algunos compuestos de coordinación Ru-CTZ desarrollados por Sánchez-Delgado y col.

Hoy en día, nuestro grupo de investigación cuenta con más de dos décadas de experiencia en la búsqueda de compuestos activos frente a tripanosomátidos ^{165, 173, 179-182}. El trabajo del grupo se ha enfocado fundamentalmente en el diseño racional de compuestos activos contra *T. cruzi*, basado en conocimientos adquiridos en las investigaciones previas. Éstas han demostrado que la interacción entre el metal y un ligando bioactivo puede conducir a propiedades

biológicas mejoradas y a la acción del nuevo compuesto sobre diferentes blancos terapéuticos (mecanismo de acción múltiple). En particular, se han generado un gran número de compuestos metálicos bioactivos coordinando iones metálicos de importancia farmacológica (Ru, Pt, Pd, V, Au, Cu, Ni, Co, Mn) a ligandos orgánicos bioactivos contra *T. cruzi* o a ligandos intercalantes del ADN para obtener complejos con esta biomolécula como potencial blanco de acción ^{165, 173, 179, 181, 182}. Los compuestos de vanadio desarrollados por nuestro grupo con actividad frente a los microorganismos de interés se detallarán en el Capítulo 2 de esta tesis (Antecedentes, diseño racional y objetivos).

1.3 EL VANADIO

1.3.1 Origen y abundancia

El vanadio es un metal de transición 3d ampliamente distribuido en suelos, petróleo crudo, aguas y aire, que también presenta diferentes roles en sistemas biológicos ¹⁸³. Fue descubierto por Andrés Manuel Del Río, profesor del Colegio de Minería de Nueva España (México), en un mineral que actualmente se conoce como vanadinita, $Pb_5(VO_4)_3Cl$. Inicialmente, Del Río interpretó, erróneamente, que se trataba de una nueva especie del cromo. En 1830, el sueco Nils Sefström redescubrió el vanadio en minerales de hierro, y lo bautizó con su nombre actual, en homenaje a la diosa nórdica de la belleza y la fertilidad *Vanadis* ¹⁸⁴.

El vanadio es un elemento traza que constituye un 0,02 % de la corteza terrestre, lo que corresponde a una concentración promedio de 150g/ton, similar a la del Zn. En agua, constituye el segundo metal de transición más abundante (30 nM), después del molibdeno (100 nM) ¹⁸³.

Es un elemento esencial para muchos organismos vivos. Se lo encuentra en algunos organismos marinos, tales como tunicados, que lo acumulan en

células especializadas denominadas vanadocitos, y en algas marinas, hongos y gusanos segmentados ¹⁸⁵.

En la Figura 1.20 se muestra el hongo *Amanita muscaria*, el cual se conoce como un bioacumulador de vanadio, llegando a niveles 400 veces superiores a los encontrados en la corteza terrestre. En este organismo, el vanadio se acumula en forma de amavadina, compuesto de coordinación de V(IV) con ligandos tetradentados.

(A)



(B)

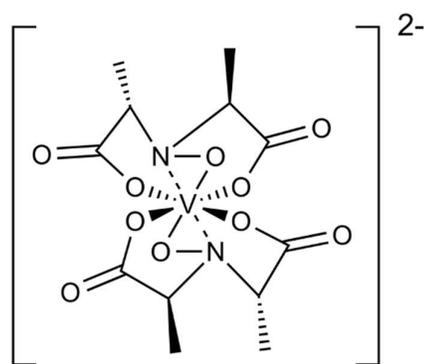


Figura 1.20. (A) *Amanita muscaria*. (B) Amavadina. La amavadina es un complejo no oxo de vanadio (IV), el vanadio se encuentra coordinado a grupos hidroxilamino y carboxilato del ácido propiónico.

1.3.2 Química en disolución acuosa

El vanadio presenta diferentes estados de oxidación (desde -1 a +5) siendo los estados +3, +4 y +5 los más relevantes en sistemas biológicos. En disolución acuosa, la especiación depende del pH, la concentración y la presencia de ligandos, mostrando numerosas especies hidrolizadas y condensadas, lo que resulta en una especiación química extremadamente compleja ¹⁸⁶.

En las soluciones acuosas ácidas de vanadio (IV), la especie mayoritaria es el catión vanadilo (VO^{2+}). Por su parte, el vanadio (V) a pH menores a 3 forma el catión dioxovanadio (V) (VO_2^+), mientras que a pH mayores se mantiene como vanadato. En presencia de medios biológicos, los estados de oxidación suelen ser

intercambiables. Para ejemplificar, el potencial del par $\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{VO}_2^+$ ronda en +0,34 V, mientras que el par $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ es de +1,24 V y el par NADH/NAD^+ es de -0,32 V a pH fisiológico. Esta comparación permite hacer notar que el vanadato puede ser reducido por moléculas biológicas que proporcionen el potencial requerido ¹⁸⁷.

A pH superior, el vanadilo comienza a oligomerizar dando lugar a la especie $[(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2(\text{OH})_5]$ como la especie mayoritaria a pH 7-7,5 (concentraciones de 1-10 μM). No obstante, se ha demostrado que, en los sistemas biológicos, el V(IV) se encuentra fundamentalmente coordinado con ligandos de baja masa molecular presentes en los fluidos, tales como fosfatos, lactato, glutatión, NAD^+ , NADP^+ y azúcares ¹⁸⁸⁻¹⁹⁵.

En cuanto a las especies de vanadio (V), en disolución, estas se condensan desde especies con nuclearidad de uno (V1), dos (V2), tres (V4) y 5 (V5) átomos, hasta alcanzar 10 átomos de vanadio (V10) a concentraciones milimolares y a pH neutro y básico. A su vez, todas esas especies pueden existir con diferentes grados de protonación ^{137, 186, 196}. Las formas deprotonadas de las especies mencionadas se muestran en la Figura 1.20.

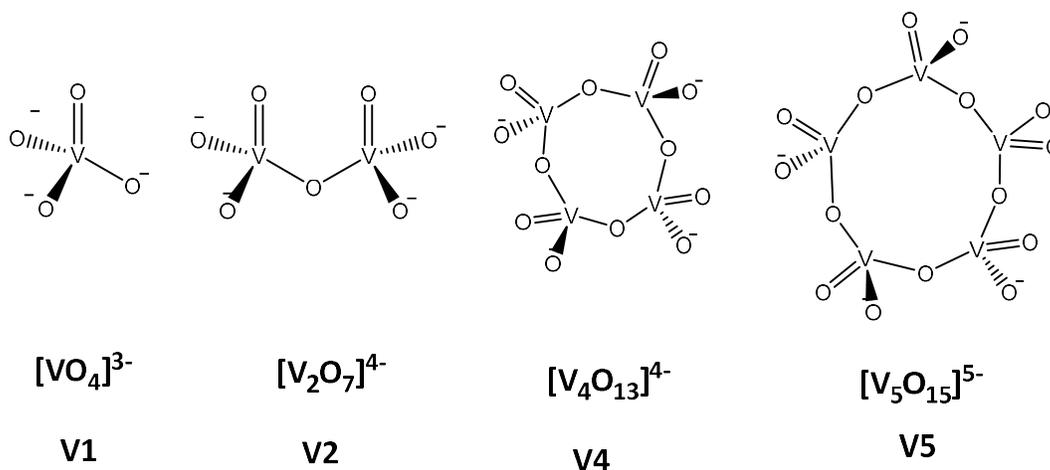


Figura 1.20. Formas deprotonadas de las especies de vanadio(V) con nuclearidad de uno (V1), dos (V2), tres (V4) y 5 (V5) átomos de vanadio.

El decavanadato (V10) es un grupo compacto de color naranja o amarillo según la concentración y los contraiones y su estructura se muestra en la Figura 1.21A. El diagrama completo de especiación en % de especies (en términos de átomos de V) en función del pH se muestra en la Figura 1.21B.

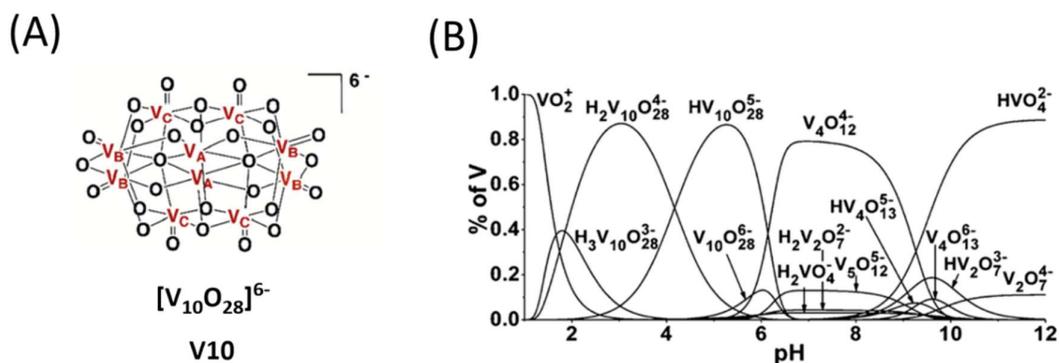


Figura 1.21. (A) Forma deprotonada del decavanadato (V₁₀). (B) Diagrama de especiación de vanadio (V) en función del pH y la concentración (en % de V).

La situación se vuelve aún más compleja si en lugar de simples sales, se disuelven compuestos de coordinación. La riqueza de especies que presentan los sistemas de vanadio lleva a que resulte una tarea muy difícil determinar la composición exacta de las especies presentes una vez que los compuestos se disuelven en los medios biológicos. Debido a la labilidad del centro metálico, además de las variables como concentración y pH, en los sistemas biológicos los compuestos están enfrentados a un gran número de bioligandos que compiten con aquellos que ocupan la esfera de coordinación del metal.

1.3.3 Antecedentes farmacológicos

El uso de compuestos de vanadio en medicina se remonta a más de un siglo atrás, cuando se recomendaba para casos de desnutrición, anemia, tuberculosis y diabetes.

Sin embargo, se empezaron a considerar como promisorios metalofármacos cuando se propusieron como agentes para el tratamiento de la

diabetes, debido a sus propiedades insulinomiméticas. La insulina es una hormona de señalización que es esencial tanto para el metabolismo de las grasas como de los carbohidratos. Es secretada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa en el torrente sanguíneo, a niveles que ocurren naturalmente después ingestión de una comida. El aumento de insulina promueve la captación de glucosa por el hígado e intestino. El efecto de promoción de la captación de glucosa puede ser replicado por compuestos de vanadio ^{174, 191, 197-200}.

Dos de los compuestos de vanadio más estudiados como insulinomiméticos son el compuesto BMOV y su derivado BEOV, compuestos de coordinación de oxovanadio (IV) con derivados del maltolato y etilmaltolato, respectivamente (Figura 1.22). Estos compuestos inhiben la proteína tirosinfosfatasa, que regula negativamente el receptor de activación y señalización de insulina, dando lugar a una disminución de la regulación negativa. A través de estudios teóricos y experimentales, se ha determinado que la inhibición se da particularmente por el centro metálico {VO₂}, lo que sugiere que la formación del compuesto de coordinación modula las propiedades fisicoquímicas que permiten un aumento de la actividad biológica ^{197, 201}.

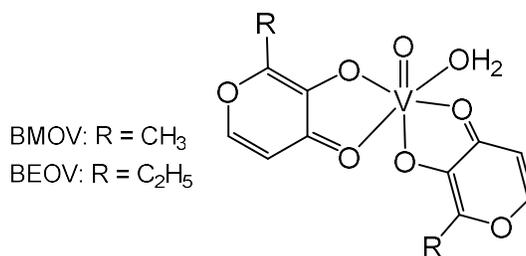


Figura 1.22. Estructura química del [V^{IV}O(maltolato)₂(H₂O)] (BMOV) y [V^{IV}O(etilmaltolato)₂(H₂O)] (BEOV)

Posterior al descubrimiento de las propiedades insulinomiméticas, surgieron otras propiedades que posicionarían definitivamente al vanadio como uno de los metales más interesantes a ser estudiados como fuente de potenciales

agentes terapéuticos. En 1984, Thompson y colaboradores publicaron el primer trabajo sobre las propiedades quimiopreventivas del vanadio *in vivo*. En ese reporte, el cáncer de mama inducido con metil-1-nitrosurea en ratas era prevenido alimentando a los animales con un suplemento de 25 mg/L de VOSO_4 administrados por día, vía oral. La presencia de vanadio reducía tanto el número de incidencias como el promedio de tumores ²⁰². Desde entonces, los efectos antitumorales y quimiopreventivos del vanadio han sido ampliamente investigados tanto en modelos animales como en diferentes tipos de líneas celulares tumorales ^{137, 165, 167, 186, 196, 203-205}.

Algunos ejemplos de compuestos de vanadio que han sido estudiados como potenciales agentes antitumorales son el Metvan, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{SO}_4)(4,7\text{-metilphen})_2]$, dicloruro de vanadoceno $[(\eta^5\text{Cp})_2\text{V}^{\text{IV}}\text{Cl}_2]$ ^{206, 207} (Figura 1.23) y los complejos V-cisteína ²⁰⁸.

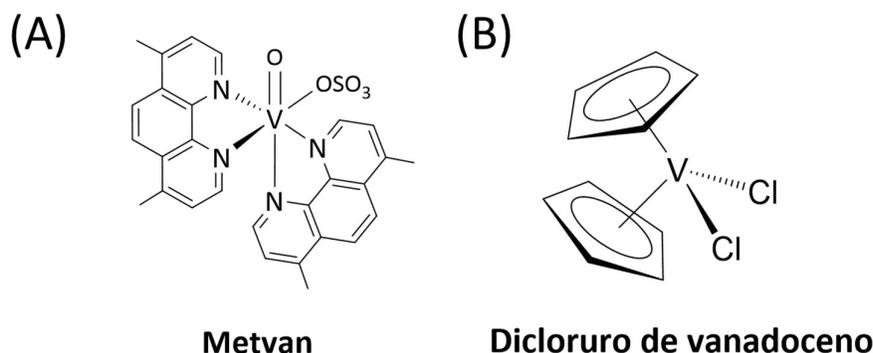


Figura 1.23. Estructura química del Metvan, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{SO}_4)(4,7\text{-metilphen})_2]$ y (B) dicloruro de vanadoceno $[(\eta^5\text{Cp})_2\text{V}^{\text{IV}}\text{Cl}_2]$

El Metvan se identificó como uno de los compuestos de vanadio anticancerígenos multiblanco más prometedores con actividad inductora de apoptosis. En concentraciones nanomolares y micromolares, Metvan induce la apoptosis en diferentes líneas de células tumorales de origen humano, como células de leucemia, células de mieloma múltiple y células tumorales sólidas

derivadas de glioblastoma, cáncer de mama, pacientes con cáncer de ovario, próstata y testículo ^{165, 206, 207}. Metvan es también altamente eficaz contra el cáncer de ovario y las líneas celulares de cáncer testicular resistentes al cisplatino. Su acción probablemente esté asociada con la generación de EROS y el agotamiento del glutatión junto con una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial. Las propiedades metastásicas de algunas células tumorales, como el glioblastoma maligno humano y el cáncer de mama, también fueron altamente inhibidas o alteradas por Metvan. Además, Metvan mostró ventajas de actividad antitumoral significativa, progresión tumoral retardada y mayor tiempo de supervivencia en modelos de xenoinjerto de ratón inmunodeficiente combinado grave de glioblastoma maligno humano y cáncer de mama. Las características farmacodinámicas favorables y la falta de toxicidad enfatizan que este compuesto tiene potencial para ser el primer complejo de vanadio como alternativa a la quimioterapia basada en platino ²⁰⁷. Por su parte, el dicloruro de vanadoceno (Figura 1.23B) induce la apoptosis en las células cancerosas humanas por un mecanismo aún desconocido.

En la década del 80, también se aisló la primera haloperoxidasa de vanadio a partir del alga *Ascophyllum nodosum*. Este hallazgo fue muy importante, dado que constituyó la primera enzima que requería un cofactor de vanadio ²⁰⁹.

En cuanto a la actividad antiparasitaria, es de destacar que nuestro grupo de investigación ha tenido un fuerte aporte en el desarrollo de compuestos de coordinación de este metal promisorio. Previo a esta tesis, se desarrollaron varias familias de compuestos con actividad interesante contra *T. cruzi* ^{165, 179}. Algunas de ellas, se describirán en el siguiente capítulo y se discutirán en relación con los compuestos desarrollados en este trabajo de tesis.

1.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO (World Health Organization), Neglected tropical diseases <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/neglected-tropical-diseases> (visitada en setiembre de 2022).
2. Warusavithana, S.; Atta, H.; Osman, M.; Hutin, Y., Review of the neglected tropical diseases programme implementation during 2012-2019 in the WHO-Eastern Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis* **2022**, *16* (9), e0010665.
3. WHO (World Health Organization), Why are some tropical diseases called 'neglected'? <https://www.who.int/features/qa/58/en/> (visitada en setiembre de 2022). **2012**.
4. Abubakar, I. I.; Tillmann, T.; Banerjee, A., 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* **2015**, *385* (9963), 117-171.
5. Hotez, P. J.; Aksoy, S.; Brindley, P. J.; Kamhawi, S., What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis* **2020**, *14* (1), e0008001.
6. Checchi, F.; Filipe, J. A.; Haydon, D. T.; Chandramohan, D.; Chappuis, F., Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infect Dis* **2008**, *8*, 16.
7. Feasey, N.; Wansbrough-Jones, M.; Mabey, D. C.; Solomon, A. W., Neglected tropical diseases. *Br Med Bull* **2010**, *93*, 179-200.
8. Malecela, M. N.; Ducker, C., A road map for neglected tropical diseases 2021-2030. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2021**, *115* (2), 121-123.
9. De Rycker, M.; Baragana, B.; Duce, S. L.; Gilbert, I. H., Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. *Nature* **2018**, *559* (7715), 498-506.

10. Payne, L.; Fitchett, J. R., Bringing neglected tropical diseases into the spotlight. *Trends in Parasitology* **2010**, *26* (9).
11. Chagas, C., Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1909**, *1*, 159-219.
12. WHO (World Health Organization), Chagas disease (American trypanosomiasis). https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1 (visitada en setiembre de 2022).
13. Molina, I.; Salvador, F.; Sanchez-Montalva, A., Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2016**, *34* (2), 132-8.
14. Jr, A. R.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A., Chagas disease. *Lancet* **2010**, *375*, 1388-1402.
15. Engman, D. M.; Leon, J. S., Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica* **2002**, *81*, 123-132.
16. H. Cerecetto, M. G., D. Gambino, A. Rojas de Arias, 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.
17. Zaidel, E. J.; Forsyth, C. J.; Novick, G.; Marcus, R.; Ribeiro, A. L. P.; Pinazo, M. J.; Morillo, C. A.; Echeverria, L. E.; Shikanai-Yasuda, M. A.; Buekens, P.; Perel, P.; Meymandi, S. K.; Ralston, K.; Pinto, F.; Sosa-Estani, S., COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. *Glob Heart* **2020**, *15* (1), 69.
18. Chiarpenello, J., Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Evidencia, Actualización En La práctica Ambulatoria. **7** **2004**, *4*.

19. Souza, W. D., Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* **2002**, *8*, 269-285.
20. Schofield, C. J.; Galvao, C., Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* **2009**, *110* (2-3), 88-100.
21. WHO (World Health Organization), Serie de informes técnicos, Control de la Enfermedad del Chagas, 905; Ginebra, 2002.
22. Tarleton, R. L.; Reithinger, R.; Urbina, J. A.; Kitron, U.; Gurtler, R. E., The challenges of Chagas Disease-grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* **2007**, *4* (12), e332.
23. WHO (World Health Organization), Second WHO report on neglected tropical diseases, Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases; 9789241564540; 2013.
24. PAHO (Pan American Health Organization), Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana)
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es (visitada en octubre de 2022).
25. Park, S.; Sanchez, D. R.; Traina, M. I.; Bradfield, J. S.; Hernandez, S.; Ufion, A. J. A.; Dufani, J.; Bergin, P.; Wachsner, R. Y.; Meymandi, S. K., The Prevalence of Chagas Disease Among Latin American Immigrants with Pacemakers in Los Angeles, California. *Am J Trop Med Hyg* **2017**, *96* (5), 1139-1142.
26. Traina, M. I.; Hernandez, S.; Sanchez, D. R.; Dufani, J.; Salih, M.; Abuhamidah, A. M.; Olmedo, W.; Bradfield, J. S.; Forsyth, C. J.; Meymandi, S. K., Prevalence of Chagas Disease in a U.S. Population of Latin American Immigrants with Conduction Abnormalities on Electrocardiogram. *PLoS Negl Trop Dis* **2017**, *11* (1), e0005244.
27. Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M. J.; Montgomery, S. P., *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* **2011**, *24* (4), 655-81.

28. Cantey, P. T.; Stramer, S. L.; Townsend, R. L.; Kamel, H.; Ofafa, K.; Todd, C. W.; Currier, M.; Hand, S.; Varnado, W.; Dotson, E.; Hall, C.; Jett, P. L.; Montgomery, S. P., The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion* **2012**, *52* (9), 1922-30.
29. PAHO (Pan American Health Organization), XIIIa Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15350&Itemid=270&lang=es. (visitada en octubre de 2022).
30. Otero, S.; Sulleiro, E.; Molina, I.; Espiau, M.; Suy, A.; Martín-Nalda, A.; Figueras, C., Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg* **2012**, *87*, 832-836.
31. Shikanai-Yasuda, M. A.; Carvalho, N. B., Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* **2012**, *54* (6), 845-52.
32. Buscaglia, C., *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection* **2003**, *5* (5), 419-427.
33. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A.-N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C. M.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.; Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.; Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D.; Hal, N., Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **2005**, *309*, 404-409.

34. Teixeira, S. M.; Paiva, R. M. C. d.; Kangussu-Marcolino, M. M.; Rocha, W. D. D., Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Gen Mol Biol* **2012**, *35* (1), 1-17.
35. Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G., A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104* (7), 1051-1054.
36. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., de Souza, W. , *Atlas didático Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ: Rio de Janeiro, 2011.
37. Schenkman, S.; Pascoalino Bdos, S.; Nardelli, S. C., Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* **2011**, *75*, 251-83.
38. Elias, M. C. Q. B.; Marques-Porto, R.; Freymuller, E.; Schenkman, S., Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* **2001**, *112*, 79-90.
39. De Souza, W., Meyer, H., On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. . *J Protozool* **1974**, *21*, 48-52.
40. Shapiro, T. A., Englund, P. T. , The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology*. **1995**, *49*, 117-143.
41. Trikin, R.; Doiron, N.; Hoffmann, A.; Haenni, B.; Jakob, M.; Schnauffer, A.; Schimanski, B.; Zuber, B.; Ochsenreiter, T., TAC102 Is a Novel Component of the Mitochondrial Genome Segregation Machinery in Trypanosomes. *PLoS Pathog* **2016**, *12* (5), e1005586.

42. Aphasizhev, R.; Aphasizheva, I., Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie* **2014**, *100*, 125-31.
43. Read, L. K.; Lukes, J.; Hashimi, H., Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2016**, *7* (1), 33-51.
44. Ruvalcaba-Trejo, N. I.; Sturm, N. R., The *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10 strain maxicircle sequence: the third musketeer. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 58.
45. Parsons, M., Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* **2004**, *53* (3), 717-24.
46. Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S. N. J., Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3* (3), 251-261.
47. Rohloff, P.; Docampo, R., A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* **2008**, *118* (1), 17-24.
48. Hasne, M. P.; Coppens, I.; Soysa, R.; Ullman, B., A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* **2010**, *76* (1), 78-91.
49. Batista, C. M.; Kessler, R. L.; Eger, I.; Soares, M. J., *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0130165.
50. Bern, C., Chagas' Disease. *N Engl J Med* **2015**, *373* (5), 456-66.
51. Tyler, K. M.; Engman, D. M., The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* **2001**, *31*, 472-481.
52. De Carvalho, T. U., De Souza, W, Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1986**, *28*, 205-212.

53. Minning, T. A.; Weatherly, D. B.; Atwood, J., 3rd; Orlando, R.; Tarleton, R. L., The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 370.
54. De Pablos, L. M.; Osuna, A., Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun* **2012**, *80* (7), 2258-64.
55. Frasch, A. C., Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. . *Parasitol Today* **2000**, *16*, 282-286.
56. Scalese, G.; Kostenkova, K.; Crans, D. C.; Gambino, D., Metallomics and other omics approaches in antiparasitic metal-based drug research. *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *67*, 102127.
57. Martín-Escolano, J.; Marín, C.; Rosales, M. J.; Tsaousis, A. D.; Medina-Carmona, E.; Martín-Escolano, R., An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infect Dis* **2022**, *8*, 1107-1115.
58. Francisco, A. F.; Jayawardhana, S.; Lewis, M. D.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M., Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology* **2017**, *144* (14), 1871-1880.
59. Kurup, S. P.; Tarleton, R. L., The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8(+) T cells. *Cell Host Microbe* **2014**, *16* (4), 439-49.
60. Resende, B. C.; Oliveira, A. C. S.; Guanabens, A. C. P.; Repoles, B. M.; Santana, V.; Hiraiwa, P. M.; Pena, S. D. J.; Franco, G. R.; Macedo, A. M.; Tahara, E. B.; Fragoso, S. P.; Andrade, L. O.; Machado, C. R., The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 5.
61. Chatelain, E.; Ioset, J. R., Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **2018**, *13* (2), 141-153.

62. Santos, S. S.; de Araujo, R. V.; Giarolla, J.; Seoud, O. E.; Ferreira, E. I., Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *Int J Antimicrob Agents* **2020**, *55* (4), 105906.
63. Kourbeli, V.; Chontzopoulou, E.; Moschovou, K.; Pavlos, D.; Mavromoustakos, T.; Papanastasiou, I. P., An Overview on Target-Based Drug Design against Kinetoplastid Protozoan Infections: Human African Trypanosomiasis, Chagas Disease and Leishmaniasis. *Molecules* **2021**, *26* (15), 4629.
64. Coura, J. R.; Castro, S. L. d., A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2002**, *97* (1), 3-24.
65. Cerecetto, H.; González, M., Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. *Future Microbiol* **2011**, *6*, 847-850.
66. Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R., Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* **2011**, *286* (15), 13088-95.
67. Hall, B. S.; Wilkinson, S. R., Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56* (1), 115-23.
68. Hall, B. S.; Wu, X.; Hu, L.; Wilkinson, S. R., Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, *54* (3), 1193-9.
69. Wilkinson, S.; Kelly, J., Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2009**, *11*, e31.
70. Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernandez, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Denicola, A., Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol* **2010**, *79* (12), 1736-45.

71. Docampo, R., Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact* **1990**, *73*, 1-27.
72. Urbina, J. A.; Docampo, R., Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* **2003**, *19* (11), 495-501.
73. Greig, N.; Wyllie, S.; Patterson, S.; Fairlamb, A. H., A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *FEBS J* **2009**, *276* (2), 376-86.
74. Goijman, S. G. F., A. C.; Stoppani, A. O. , Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. . *Biochem pharmacol* **1985**, *34*, 1457-1461.
75. Rajao, M. A.; Furtado, C.; Alves, C. L.; Passos-Silva, D. G.; de Moura, M. B.; Schamber-Reis, B. L.; Kunrath-Lima, M.; Zuma, A. A.; Vieira-da-Rocha, J. P.; Garcia, J. B.; Mendes, I. C.; Pena, S. D.; Macedo, A. M.; Franco, G. R.; de Souza-Pinto, N. C.; de Medeiros, M. H.; Cruz, A. K.; Motta, M. C.; Teixeira, S. M.; Machado, C. R., Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environ Mol Mutagen* **2014**, *55* (4), 309-21.
76. Calvo, K. L.; Ronco, M. T.; Noguera, N. I.; Garcia, F., Benznidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2013**, *35* (4), 478-86.
77. Pascutti, M. F.; Campodonico, G.; Garcia, F.; Manarin, R.; Bottasso, O.; Revelli, S.; Serra, E., Novel cytostatic activity of the trypanocidal drug Benznidazole. *Int Immunopharmacol* **2009**, *9* (6), 739-45.
78. Pedrosa, R. C.; De Bem, A. F.; Locatelli, C.; Pedrosa, R. C.; Geremias, R.; Wilhelm Filho, D., Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep* **2001**, *6* (4), 265-70.
79. Turrens, J. F., Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med* **2004**, *25* (1-2), 211-20.

80. Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M., The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological chemistry* **2003**, *384*, 517-525.
81. Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H., Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **2001**, *115*, 189-198.
82. Fairlamb, A. H. B., P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. , Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **1985**, *227*, 1485-1487.
83. Maya, J. D.; Repetto, Y.; Agosín, M.; Ojeda, J. M.; Tellez, R.; Gaule, C.; Morello, A., Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol biochem parasitol* **1997**, *86*, 101-106.
84. Aguiar, P. H.; Furtado, C.; Repoles, B. M.; Ribeiro, G. A.; Mendes, I. C.; Peloso, E. F.; Gadelha, F. R.; Macedo, A. M.; Franco, G. R.; Pena, S. D.; Teixeira, S. M.; Vieira, L. Q.; Guarneri, A. A.; Andrade, L. O.; Machado, C. R., Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (6), e2279.
85. Salomao, K. D. S., N. A.; Molina, M. T.; De Castro, S. L.; Menna-Barreto, R. F. , *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. . *BMC microbiology* **2013** *13*, 196.
86. Yamanaka, C. N.; Giordani, R. B.; Rezende, C. O., Jr.; Eger, I.; Kessler, R. L.; Tonini, M. L.; de Moraes, M. H.; Araujo, D. P.; Zuanazzi, J. A.; de Almeida, M. V.; Steindel, M., Assessment of leishmanicidal and trypanocidal activities of aliphatic diamine derivatives. *Chem Biol Drug Des* **2013**, *82* (6), 697-704.
87. Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R.; Radi, R., Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against

- macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* **2008**, *410* (2), 359-68.
88. Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A.; Kelly, J. M., The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem* **2002**, *277* (19), 17062-71.
89. Wilkinson, S. R.; Obado, S. O.; Mauricio, I. L.; Kelly, J. M., *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 13453-13458.
90. Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Touitha, S.; Mauricio, I. L.; Meyer, D. J.; Kelly, J. M., TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **2002**, *364*, 787-794.
91. Wilkinson, S. R.; Temperton, N. J.; Mondragon, A.; Kelly, J. M., Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **2000**, *275* (11), 8220-5.
92. Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Horn, D.; Kelly, J. M.; Cheeseman, I., A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **2008**.
93. Gallerano, R. H.; Marr, J. J.; Sosa, R. R., Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease, *Am J Trop Med Hyg* **1990**, *43*, 159-166.
94. Barr, S. C.; Warner, K. L.; Kornreic, B. G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J. H., A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49* (12), 5160-1.

95. Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H., A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51* (11), 3932-9.
96. Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H., Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* **1998**, *188*, 725-734.
97. Sanz-Rodriguez, C. E.; Concepcion, J. L.; Pekerar, S.; Oldfield, E.; Urbina, J. A., Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. *J Biol Chem* **2007**, *282* (17), 12377-87.
98. Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S.; Fairlamb, A. H., A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **2002**, *277* (39), 35853-61.
99. Perez-Pineiro, R.; Burgos, A.; Jones, D. C.; Andrew, L. C.; Rodriguez, H.; Suarez, M.; Fairlamb, A. H.; Wishart, D. S., Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. *J Med Chem* **2009**, *52*, 1670-1680.
100. Greig, N.; Wyllie, S.; Vickers, T. J.; Fairlamb, A. H., Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **2006**, *400* (2), 217-23.
101. Molina, I.; Gomez i Prat, J.; Salvador, F.; Trevino, B.; Sulleiro, E.; Serre, N.; Pou, D.; Roure, S.; Cabezos, J.; Valerio, L.; Blanco-Grau, A.; Sanchez-Montalva, A.; Vidal, X.; Pahissa, A., Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* **2014**, *370* (20), 1899-908.
102. Sales Junior, P. A.; Molina, I.; Fonseca Murta, S. M.; Sanchez-Montalva, A.; Salvador, F.; Correa-Oliveira, R.; Carneiro, C. M., Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am J Trop Med Hyg* **2017**, *97* (5), 1289-1303.

103. Mann, S.; Frasca, K.; Scherrer, S.; Henao-Martinez, A. F.; Newman, S.; Ramanan, P.; Suarez, J. A., A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Rep* **2021**, 1-12.
104. WHO (World Health Organization). Leishmaniasis <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (visitada en setiembre de 2022) **2022**.
105. Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M., Leishmaniasis. *The Lancet* **2018**, 392 (10151), 951-970.
106. Maria Colmenares, S. K., Karen Goldsmith-Pestana, Diane Mc Mahon-Pratt, Mechanisms of pathogenesis: differences amongst Leishmania species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2002**, 96, 3-7.
107. Aronson, N.; Herwaldt, B. L.; Libman, M.; Pearson, R.; Lopez-Velez, R.; Weina, P.; Carvalho, E. M.; Ephros, M.; Jeronimo, S.; Magill, A., Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis* **2016**, 63 (12), 1539-1557.
108. PAHO (Pan American Health Organization), Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>.
109. Marsden, P. D., Mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1986**, 80 (6), 859-76.
110. Herwaldt, B. L., Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, 354 (9185), 1191-9.
111. Seaman, J.; Mercer, A. J.; Sondorp, H. E.; Herwaldt, B. L., Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med* **1996**, 124, 664-72.

- 112.SINAE (Sistema Nacional de Emergencias). El segundo caso de Leishmaniasis en Salto en el último mes exige extremar medidas de prevención. <https://www.gub.uy/sistema-nacional-emergencias/comunicacion/noticias/segundo-caso-leishmaniasis-salto-ultimo-mes-exige-extremar-medidas-prevencion> (visitada en diciembre de 2022).
- 113.Kumari, S.; Kumar, V.; Tiwari, R. K.; Ravidas, V.; Pandey, K.; Kumar, A., Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. *Acta Trop* **2022**, *235*, 106661.
- 114.BL, H., Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, *354* (9185), 1191-9.
- 115.Gupta, S.; Nishi, Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* **2011**, *133*, 27-39.
- 116.WHO (World Health Organization). Distribución de Leishmaniasis https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html (visitada en octubre de 2022). **2022**.
- 117.Maia-Elkhoury, A. N.; Alves, W. A.; Sousa-Gomes, M. L.; Sena, J. M.; Luna, E. A., Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica* **2010**, *24*, 2941-2947.
- 118.Salomón, O. D.; Basmajdian, Y.; Fernández, M. S.; Santini, M. S., *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2011**, *106* (3), 381-382.
119. Ministerio de Salud Pública, Guía de diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniasis visceral en Uruguay. Un enfoque desde “Una Salud”. **2019**.
- 120.Ashford, R. W., The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Intern J Parasitol* **2000**, *30*, 1269-1281.
- 121.Rodrigues, J. C.; Godinho, J. L.; de Souza, W., Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem* **2014**, *74*, 1-42.

- 122.Landfear, S. M., New Vistas in the Biology of the Flagellum-Leishmania Parasites. *Pathogens* **2022**, *11* (4).
- 123.Kaufer, A.; Barratt, J.; Stark, D.; Ellis, J., The complete coding region of the maxicircle as a superior phylogenetic marker for exploring evolutionary relationships between members of the Leishmaniinae. *Infect Genet Evol* **2019**, *70*, 90-100.
- 124.Sunter, J.; Gull, K., Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol* **2017**, *7* (9).
- 125.Besteiro, S.; Williams, R. A.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **2007**, *37* (10), 1063-75.
- 126.Peters, N. C.; Egen, J. G.; Secundino, N.; Debrabant, A.; Kimblin, N.; Kamhawi, S.; Lawyer, P.; Fay, M. P.; Germain, R. N.; Sacks, D., *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **2008**, *321*, 970-974.
- 127.Spath, G. F.; Garraway, L. A.; Turco, S. J.; Beverley, S. M., The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *PNAS* **2003**, *100* (16).
- 128.Lazaro-Souza, M.; Matte, C.; Lima, J. B.; Arango Duque, G.; Quintela-Carvalho, G.; de Carvalho Vivarini, A.; Moura-Pontes, S.; Figueira, C. P.; Jesus-Santos, F. H.; Gazos Lopes, U.; Farias, L. P.; Araujo-Santos, T.; Descoteaux, A.; Borges, V. M., *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 626.
- 129.McConville, M. J.; de Souza, D.; Saunders, E.; Likic, V. A.; Naderer, T., Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol* **2007**, *23* (8), 368-75.
- 130.Shyam Sundar, M. D.; Jaya Chakravarty, M. D.; Dipti Agarwal, M. D.; Madhukar Rai, M. D.; Henry W. Murray, M. D., Single-dose liposomal

- amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* **2010**, *362* (6), 504-5013.
- 131.Brindha, J.; Balamurali, M.; Chanda, K., An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases-Leishmaniasis and Chagas diseases. *Front Chem* **2021**, *9*, 1-19.
- 132.Uliana, S. R. B.; Trinconi, C. T.; Coelho, A. C., Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* **2018**, *145* (4), 464-480.
- 133.González, U.; Pinart, M.; Reveiz, L.; Alvar, J., Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane database of systematic reviews* **2008**, *4*.
- 134.Casas, J. S.; Moreno, V.; Sánchez, Á.; Sánchez, J. L.; Sordo, J., *Química Bioinorgánica*. España, 2002.
- 135.Farrell, N., *Uses of inorganic chemistry in medicine*. Royal Society of Chemistry, Virginia Commonwealth University: Richmond, Virginia, USA, 1999.
- 136.Crans, D. C.; Kostenkova, K., Open questions on the biological roles of first-row transition metals. *Communications Chemistry* **2020**, *3* (1).
- 137.Kostenkova, K.; Scalese, G.; Gambino, D.; Crans, D. C., Highlighting the roles of transition metals and speciation in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *69*, 102155.
- 138.Van Cleave, C.; Crans, D. C., The First-Row Transition Metals in the Periodic Table of Medicine. *Inorganics* **2019**, *7* (9).
- 139.Maret, W., *Metallomics: the science of biometals and biometalloids*. In *Metallomics: the science of biometals*. 2018.
- 140.Hsia, C. C. W., Respiratory Function of Hemoglobin. *N Engl J Med* **1998**, *338*, 239-247.
- 141.Guo, Z.; Sadler, P. J., Metals in medicine. *Angew Chem* **1999**, *38*, 1512-1531.
- 142.Katja, S., *Essentials of inorganic chemistry*. United Kingdom, 2015.
- 143.Housecroft, C.; Sharpe, A., *Inorganic Chemistry*. 5th ed.; 2022.

144. Ehrlich, P.; Bertheim, A., Ober das salzsaure 3.3diamino-4.4'-dioxym-
asenobenzol und seine niichsten Verwandten. *Berichte Dtsch Chem Ges* **1912**,
45, 756-766.
145. Wermuth, C., The practice of medicinal chemistry. 3rd ed.; Elsevier Ltd:
Burlington, MA 01803, USA, 2008.
146. Ghosh, S., Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* **2019**,
88, 102925.
147. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J., Metal-based drugs that break the rules. *Dalton
Trans* **2016**, 45 (8), 3201-9.
148. Chen, A. Y.; Adamek, R. N.; Dick, B. L.; Credille, C. V.; Morrison, C. N.;
Cohen, S. M., Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. *Chem
Rev* **2019**, 119 (2), 1323-1455.
149. Coverdale, J.; Laroiya-McCarron, T.; Romero-Canelón, I., Designing
Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug
Candidates? *Inorganics* **2019**, 7 (3).
150. Englinger, B.; Pirker, C.; Heffeter, P.; Terenzi, A.; Kowol, C. R.; Keppler, B.
K.; Berger, W., Metal Drugs and the Anticancer Immune Response. *Chem Rev*
2019, 119 (2), 1519-1624.
151. Hoonjan, M.; Jadhav, V.; Bhatt, P., Arsenic trioxide: insights into its evolution
to an anticancer agent. *J Biol Inorg Chem* **2018**, 23 (3), 313-329.
152. Medici, S.; Peana, M. F.; Zoroddu, M. A., Noble Metals in Pharmaceuticals:
Applications and Limitations. In *Biomedical Applications of Metals*, 2018; pp 3-
48.
153. Murray, B. S.; Dyson, P. J., Recent progress in the development of
organometallics for the treatment of cancer. *Curr Opin Chem Biol* **2020**, 56, 28-
34.

154. Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodriguez-Rodriguez, A.; Caravan, P., Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem Rev* **2019**, *119* (2), 957-1057.
155. Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J., The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev* **2016**, *116* (5), 3436-86.
156. Bugarcic, Z. D.; Bogojeski, J.; Petrovic, B.; Hochreuther, S.; van Eldik, R., Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans* **2012**, *41* (40), 12329-45.
157. Arnesano, F.; Natile, G., Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (15-16), 2070-2081.
158. P. Takahara, A. R., C. Frederick, S. Lippard, Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* **1995**, *377*, 649-652.
159. Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J., The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* **2018**, *47* (19), 6645-6653.
160. Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W., The Discovery and Development of Cisplatin. *J Chem Ed* **2006**, *83* (5), 728-734.
161. Anthony, E. J.; Bolitho, E. M.; Bridgewater, H. E.; Carter, O. W. L.; Donnelly, J. M.; Imberti, C.; Lant, E. C.; Lermyte, F.; Needham, R. J.; Palau, M.; Sadler, P. J.; Shi, H.; Wang, F. X.; Zhang, W. Y.; Zhang, Z., Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chem Sci* **2020**, *11* (48), 12888-12917.
162. Boros, E.; Dyson, P. J.; Gasser, G., Classification of Metal-based Drugs According to Their Mechanisms of Action. *Chem* **2020**, *6* (1), 41-60.

163. Cirri, D.; Bartoli, F.; Pratesi, A.; Baglini, E.; Barresi, E.; Marzo, T., Strategies for the Improvement of Metal-Based Chemotherapeutic Treatments. *Biomedicines* **2021**, *9* (5).
164. Meier-Menches, S. M.; Gerner, C.; Berger, W.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K., Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents - towards clinical development. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (3), 909-928.
165. Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D., Vanadium compounds in medicine. *Coord Chem Rev* **2015**, *301*, 24-48.
166. Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Crans, D. C.; Barreiro, E. J., Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem* **2018**, *61* (14), 5805-5821.
167. Crans, D. C.; Yang, L.; Haase, A.; Yang, X., Health benefits of vanadium and its potential as an anticancer agent. *Met Ions Life Sci* **2018**, *18*, 251-279.
168. Collery, P.; Domingo, J.; Keppler, L., Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III). *Anticancer Res* **1996**, *16*, 687-691.
169. Manuel Repetto Jiménez, G. R. K., *Toxicología Fundamental*. 4ta ed.; Diaz De Santos: 2021.
170. Bhattacharyya, S. Inorganic Radiopharmaceuticals for Imaging and Therapy: Current Trends and Future Directions. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (2011), 1-16.
171. Malfertheiner, P.; Bazzoli, F.; Delchier, J. C.; Celinski, K.; Giguere, M.; Riviere, M.; Megraud, F.; Pylora Study, G., 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. *Lancet* **2011**, *377* (9769), 905-13.

172. Aziz, Z.; Abu, S. F.; Chong, N. J., A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. *Burns* **2012**, *38* (3), 307-18.
173. Gambino, D.; Otero, L., Metal compounds in the development of antiparasitic agents; rational design from basic chemistry to the clinic. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*, Carver, P., Ed. De Gruyter: 2019; pp 331-358.
174. Lenny C.Y. Woo, V. G. Y., Katherine H. Thompson, John H. McNeill, Chris Orvig, Vanadyl–biguanide complexes as potential synergistic insulin mimics. *J Inorg Biochem* **1999**, *76* 251–257.
175. R. Sanchez-Delgado, K. L., 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 RuCl₂(clotrimazole). *J Med Chem* **1993**, *36*, 2041-2043.
176. Singh, N. K.; Kumbhar, A. A.; Pokharel, Y. R.; Yadav, P. N., Anticancer potency of copper(II) complexes of thiosemicarbazones. *J Inorg Biochem* **2020**, *210*, 111134.
177. Sánchez-Delgado RA, A. A., Suárez L, Metal ions and their complexes in medication. In *Metal ions in biological systems*, In: Sigel H, S. A. e., Ed. Marcel Dekker: New York, 2004; p p. 379.
178. Ong, Y. C.; Roy, S.; Andrews, P. C.; Gasser, G., Metal compounds against neglected tropical diseases. *Chem Rev* **2019**, *119* (2), 730-796.
179. Gambino, D., Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255* (19-20), 2193-2203.
180. Gambino, D.; Otero, L., Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorg Chim Acta* **2012**, *393*, 103-114.

181. Gambino, D.; Otero, L., Design of prospective antiparasitic metal-based compounds including selected organometallic cores. *Inorg Chim Acta* **2018**, *472*, 58-75.
182. Gambino, D.; Otero, L., Facing Diseases Caused by Trypanosomatid Parasites: Rational design of Pd and Pt complexes with bioactive ligands. *Front Chem* **2021**, *9*, 816266.
183. Rehder, D., Vanadium in health issues. *ChemTexts* **2018**, *4* (4).
184. Nriagu, J. O., History, Occurrence, and Uses of Vanadium. In *Vanadium in the environment, chemistry and biochemistry*, John Wiley & Sons: New York, 1998.
185. Mukherjee, B.; Patra, B.; Mahapatra, S.; Banerjee, P.; Tiwari, A.; Chatterjee, M., Vanadium--an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett* **2004**, *150* (2), 135-43.
186. Crans, D. C.; Woll, K. A.; Prusinskas, K.; Johnson, M. D.; Norkus, E., Metal speciation in health and medicine represented by iron and vanadium. *Inorg Chem* **2013**, *52* (21), 12262-75.
187. Crans, D. C.; Smee, J. J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L., The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev* **2004**, *104*, 849-902.
188. Jakusch, T.; Costa Pessoa, J.; Kiss, T., The speciation of vanadium in human serum. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255* (19-20), 2218-2226.
189. Jakusch, T.; Hollender, D.; Enyedy, E. A.; Gonzalez, C. S.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel, A.; Costa Pessoa, J.; Tomaz, I.; Kiss, T., Biospeciation of various antidiabetic V(IV)O compounds in serum. *Dalton Trans* **2009**, (13), 2428-37.
190. Kiss, T.; Jakusch, T.; Hollender, D.; Dörnyei, Á.; Enyedy, É. A.; Pessoa, J. C.; Sakurai, H.; Sanz-Medel, A., Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252* (10-11), 1153-1162.

191. Kiss, T.; Kiss, E.; Garribba, E.; Sakurai, H., Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J Inorg Biochem* **2000**, *80*, 65-73.
192. Mehtab, S.; Goncalves, G.; Roy, S.; Tomaz, A. I.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F.; Romao, M. J.; Jakusch, T.; Kiss, T.; Pessoa, J. C., Interaction of vanadium(IV) with human serum apo-transferrin. *J Inorg Biochem* **2013**, *121*, 187-95.
193. Banerjee, A.; Dash, S. P.; Mohanty, M.; Sahu, G.; Sciortino, G.; Garribba, E.; Carvalho, M.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Kaminsky, W.; Brzezinski, K.; Dinda, R., New V(IV), V(IV)O, V(V)O, and V(V)O₂ Systems: Exploring their Interconversion in Solution, Protein Interactions, and Cytotoxicity. *Inorg Chem* **2020**, *59* (19), 14042-14057.
194. Costa Pessoa, J., Thirty years through vanadium chemistry. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 4-24.
195. Santos, M. F. A.; Sciortino, G.; Correia, I.; Fernandes, A. C. P.; Santos-Silva, T.; Pisanu, F.; Garribba, E.; Pessoa, J. C., Binding of V^{IV}O²⁺, V^{IV}OL, V^{IV}OL₂ and V^VO₂L Moieties to Proteins: X-ray/Theoretical Characterization and Biological Implications. *Chem Eur J* **2022**, e202200105
196. Crans, D. C.; Smee, J. J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L., The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev* **2004**, *104*, 849-902.
197. Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C., Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem Rev* **1999**, *99*, 2561-2571.
198. Amin SS, C. K., Zhang B, Dutta SK, Eaton SS, Anderson OP, Miller SM, Reul BA, Brichard SM, Crans DC, Chemistry and insulin-mimetic properties of bis(acetylacetonate)oxovanadium(IV) and derivatives. *Inorg Chem* **2000**, *39*, 406-416.

- 199.Sanna, D.; Micera, G.; Garribba, E., New developments in the comprehension of the biotransformation and transport of insulin-enhancing vanadium compounds in the blood serum. *Inorg Chem* **2010**, *49* (1), 174-87.
- 200.Xie, M. J.; Yang, X. D.; Liu, W. P.; Yan, S. P.; Meng, Z. H., Insulin-enhancing activity of a dinuclear vanadium complex: 5-chloro-salicylaldehyde ethylenediamine oxovanadium(V) and its permeability and cytotoxicity. *J Inorg Biochem* **2010**, *104* (8), 851-7.
- 201.Peters, K. G.; Davis, M. G.; Howard, B. W.; Pokross, M.; Rastogi, V.; Diven, C.; Greis, K. D.; Eby-Wilkens, E.; Maier, M.; Evdokimov, A.; Soper, S.; Genbauffe, F., Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); unliganded vanadium (VO₄) as the active component. *J Inorg Biochem* **2003**, *96* (2-3), 321-30.
- 202.Thompson, H. J.; Chasteen, N. D.; Meeker, L. D., Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Cardnogen* **1984**, *5*, 849-851.
- 203.Althumairy, D.; Murakami, H. A.; Zhang, D.; Barisas, B. G.; Roess, D. A.; Crans, D. C., Effects of vanadium(IV) compounds on plasma membrane lipids lead to G protein-coupled receptor signal transduction. *J Inorg Biochem* **2020**, *203*, 110873.
- 204.Bergeron, A.; Kostenkova, K.; Selman, M.; Murakami, H. A.; Owens, E.; Haribabu, N.; Arulanandam, R.; Diallo, J. S.; Crans, D. C., Enhancement of oncolytic virotherapy by vanadium(V) dipicolinates. *Biometals* **2019**, *32* (3), 545-561.
- 205.Feng, B.; Dong, Y.; Shang, B.; Zhang, B.; Crans, D. C.; Yang, X., Convergent Protein Phosphatase Inhibitor Design for PTP1B and TCPTP: Exchangeable Vanadium Coordination Complexes on Graphene Quantum Dots. *Ad Funct Mat* **2021**, *2021*, 1-14

206. Evangelou, A. M., Vanadium in cancer treatment. *Critical Rev OncolnHematology* 42 (2002) 249–265 **2002**, 42, 249-265.
207. D’Cruz, O. J.; Uckun, F. M., Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs* **2002**, 11 (12), 1830.
208. Papaioannou, A.; Manos, M.; Karkabounas, S.; Liasko, R.; Evangelou, A. M.; Correia, I.; Kalfakakou, V.; Pessoa, J. C.; Kabanos, T., Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. *J Inorg Biochem* **2004**, 98 (6), 959-68.
209. Ghosh, P.; D’Cruz, O. J.; Narla, R. K.; Uckun, F. M., Apoptosis-inducing Vanadocene Compounds against Human Testicular Cancer. *Clinical Cancer Research* **2000**, 6, 1536.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES, DISEÑO RACIONAL Y PROPUESTA

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES, DISEÑO RACIONAL Y PROPUESTA

Contenido

2.1 INTRODUCCIÓN.....	103
2.2 ANTECEDENTES.....	103
2.2.1 Compuestos de coordinación con ligandos intercalantes del ADN.....	104
2.2.2 Compuestos de coordinación con ligandos bioactivos	111
2.3 LIGANDOS SELECCIONADOS	112
2.3.1 Ligandos bioactivos	113
2.3.1.1 Derivados de la 8-hidroxiquinolina.....	113
2.3.1.2 N-óxido de 2-mercaptopiridina.....	116
2.3.2 Ligandos tridentados.....	121
2.3.2.1 Semicarbazonas derivadas del salicilaldehído.....	121
2.3.2.2 Hidrazonas derivadas de la isoniazida	124
2.4 PROPUESTA	128
2.4.1 Objetivos generales y específicos.....	128
2.4.1.1 Objetivo general.....	128
2.4.1.2 Objetivos específicos	129
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentarán los antecedentes bibliográficos relevantes de los ligandos seleccionados y el centro metálico que dieron lugar a los objetivos e hipótesis planteados en este trabajo de tesis de doctorado. Se analizará el estado del arte y se fundamentará el diseño racional de los nuevos compuestos formulados con potencial actividad antiparasitaria.

2.2 ANTECEDENTES

El grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis, Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos, liderado por la Dra. Dinorah Gambino, cuenta con más de dos décadas de experiencia en el desarrollo de nuevos potenciales fármacos inorgánicos para el tratamiento de diabetes, enfermedades parasitarias, tuberculosis y cáncer ¹⁻⁶.

El grupo ha desarrollado un extenso número de compuestos metálicos activos en parásitos tripanosomátidos, basándose particularmente en dos estrategias de diseño:

- 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.

2.2.1 Compuestos de coordinación con ligandos intercalantes del ADN

Se han demostrado las propiedades anticancerígenas de algunos compuestos de vanadio y se han propuesto diversos blancos de acción. Los principales mecanismos propuestos son la interrupción del metabolismo celular a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS), la alteración de organelos celulares como lisosomas o mitocondrias, la alteración de proteínas como actina y tubulina, señales de transducción, ciclinas y caspasas, entre otras. Pero, sin embargo, también se ha observado genotoxicidad y daños en el ADN de las células tumorales ^{6,7}.

Además del metvan y del dicloruro de vanadoceno (descritos y detallados en el Capítulo 1), se han desarrollado distintos grupos de compuestos de oxovanadio (IV) con ligandos conteniendo múltiples átomos donores, con interesante comportamiento biológico. Durante el desarrollo, se ha puesto énfasis en aumentar la estabilidad de los compuestos obtenidos a través de la formación de enlaces de coordinación más fuertes y quelatos más estables termodinámicamente. El ligando oxidiacetato (oda), conteniendo tres oxígenos como átomos donores disponibles para coordinar con vanadio y formar dos anillos quelato de 5 miembros fue propuesto y desarrollado de forma exitosa ^{8,9}. Además del compuesto $[V^{IV}O(oda)(H_2O)_2]$, se desarrollaron los compuestos heterolépticos $[V^{IV}O(oda)(bipy)]$ y $[V^{IV}O(oda)(phen)]$ (Figura 2.1), donde bipy = 2,2'-bipiridina y phen = 1,10-fenantrolina son ligandos que han demostrado ser intercalantes del ADN por ser moléculas planas ¹⁰. Se determinó que estos tres compuestos tienen efecto inhibiendo la proliferación de líneas celulares tumorales derivadas de osteoblastos y causan inhibición de fosfatasa alcalina que participan en su diferenciación ¹¹.

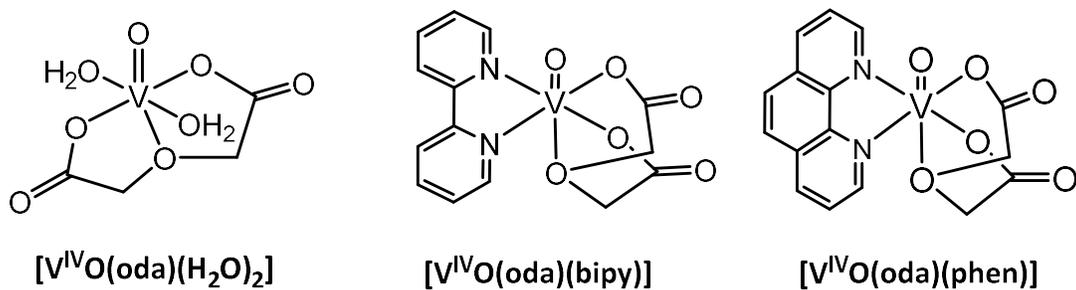


Figura 2.1. Compuestos de coordinación $[V^{IV}O(oda)(H_2O)_2]$, $[V^{IV}O(oda)(bipy)]$ y $[V^{IV}O(oda)(phen)]$.

Se han reportado numerosos efectos celulares asociados a los compuestos mostrados en la Figura 2.1. Entre ellos, se destaca la inhibición de la fosfatasa alcalina, alteraciones morfológicas, inducción de la generación de EROS, depleción del potencial de membrana mitocondrial y el incremento en las cascadas de fosforilación que regula la muerte celular en líneas tumorales ¹¹⁻¹⁵. En cuanto a su interacción con el ADN, no se observó daño del ADN con el compuesto $[V^{IV}O(oda)(H_2O)_2]$, mientras que para los compuestos heterolépticos $[V^{IV}O(oda)(bipy)]$ y $[V^{IV}O(oda)(phen)]$, se observó ruptura de la biomolécula a concentraciones de 100 y 2,5 μM , respectivamente. Estos resultados tuvieron buena correlación con la actividad antitumoral, donde el más activo es $[V^{IV}O(oda)(phen)]$, seguido por $[V^{IV}O(oda)(bipy)]$ y $[V^{IV}O(oda)(H_2O)_2]$, sugiriendo el ADN como blanco de acción de estos compuestos ⁶.

Tal como se discutió en el Capítulo 1, el ADN se ha postulado como principal blanco de los compuestos metálicos antitumorales que se encuentran en uso clínico, como los compuestos de platino disparadores del desarrollo de metalofármacos ¹⁶⁻²⁰. Las células tumorales guardan cierta relación con las células parasitarias tales como algunos procesos metabólicos comunes o la velocidad de replicación, por lo que se ha propuesto que aquellos compuestos que actúan eficientemente con el ADN, podrían mostrar propiedades antitripanosoma ^{21, 22}.

Los hechos anteriormente descritos dieron lugar al diseño racional de nuevos potenciales antiparasitarios de vanadio, proponiendo el ADN como potencial diana en los parásitos.

En este marco, nuestro grupo de investigación ha diseñado nuevas familias de compuestos de oxovanadio (IV) incluyendo ligandos polipiridínicos (NN) derivados de la 1,10-fenantrolina, con capacidad demostrada de intercalación con ADN ²²⁻²⁴ (Figura 2.2).

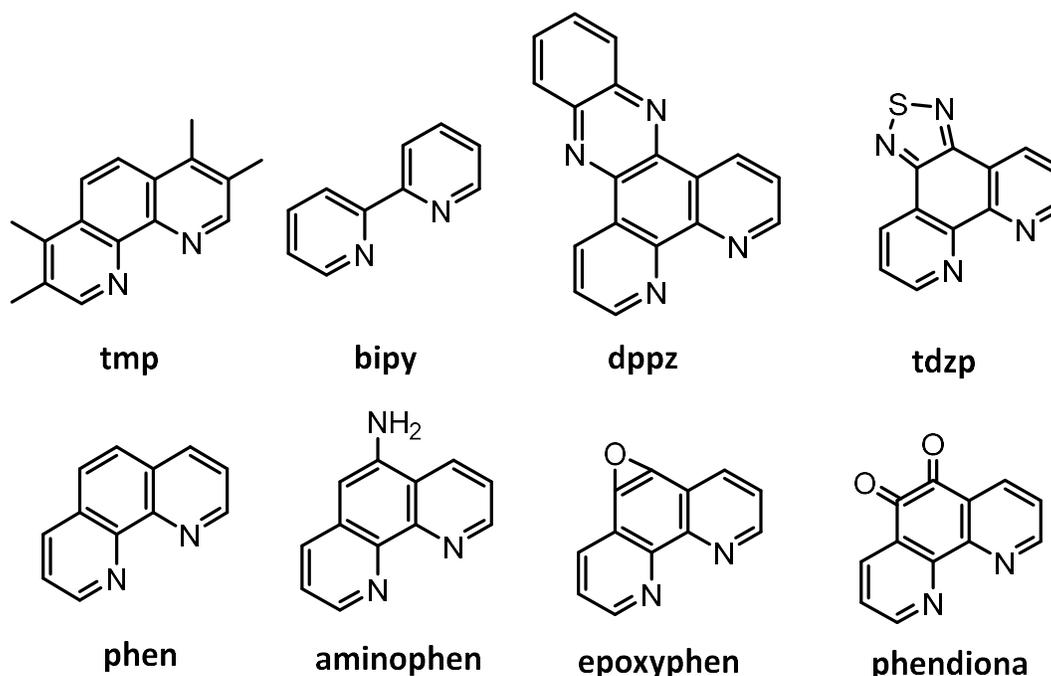


Figura 2.2. Compuestos polipiridínicos utilizados como ligandos bidentados intercalantes del ADN en los compuestos desarrollados con actividad antiparasitaria: 1,10-fenantrolina (phen); 5-amino-1,10-fenantrolina (aminophen); 5,6-epoxi-1,10-fenantrolina (epoxyphen); 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione); 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (tmp); 2,2'-bipiridina (bipy); dipirido 3,2-a: 2'-3'-c]fenazina (dppz); [1,2,5]tiazolo[3,4-f]-1,10-fenantrolina (tdzp).

A través de esta estrategia, el grupo sintetizó y caracterizó dos grandes familias de compuestos de oxovanadio (IV) estructuralmente relacionados con ligandos NN: $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(NN)]$ y $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$ (Figura 2.3). Los

ligandos NN en su forma libre mostraron actividad sobre *T. cruzi* (cepas Dm28c y Tulahuen), pero se demostró además que la coordinación al centro de oxovanadio (IV) incrementa la misma, resultando en valores de IC₅₀ del mismo orden que el fármaco de referencia Nifurtimox. Si bien los complejos son estructuralmente relacionados, la variación en la naturaleza química del ligando NN incluido resultó tener incidencia en los valores de actividad antiparasitaria ¹,

25-31

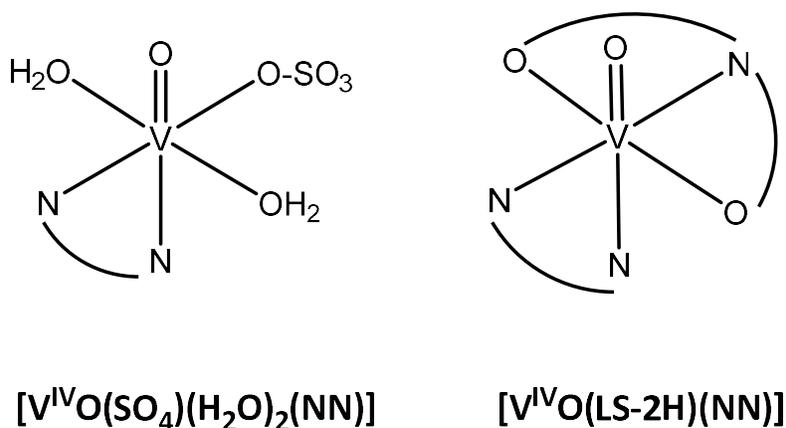


Figura 2.3. Estructura general esquemática de las dos familias de compuestos de oxovanadio (IV) con derivados de la 1-10-fenantrolina ²⁵⁻³¹

Utilizando técnicas de microscopía de fuerzas atómicas (AFM), el grupo demostró que los complejos $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(NN)]$ modifican la estructura terciaria del ADN plasmídico (pBR322), lo que indica una fuerte interacción con la biomolécula ²⁸. Si bien solo se comparó una serie reducida de compuestos estructuralmente relacionados y los estudios de AFM por sí solos no son suficientes para juzgar la capacidad de los compuestos para afectar el ADN, parece existir una correlación entre la actividad anti-*T. cruzi* y la intensidad del efecto observado sobre el plásmido ²⁸.

La serie de compuestos $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$, donde LS representa un conjunto de ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de

salicilaldehído (Figura 2.4), se trata de una serie de mayor extensión, que incluye 37 compuestos estructuralmente relacionados con interesante actividad antiparasitaria ^{25, 29-31}.

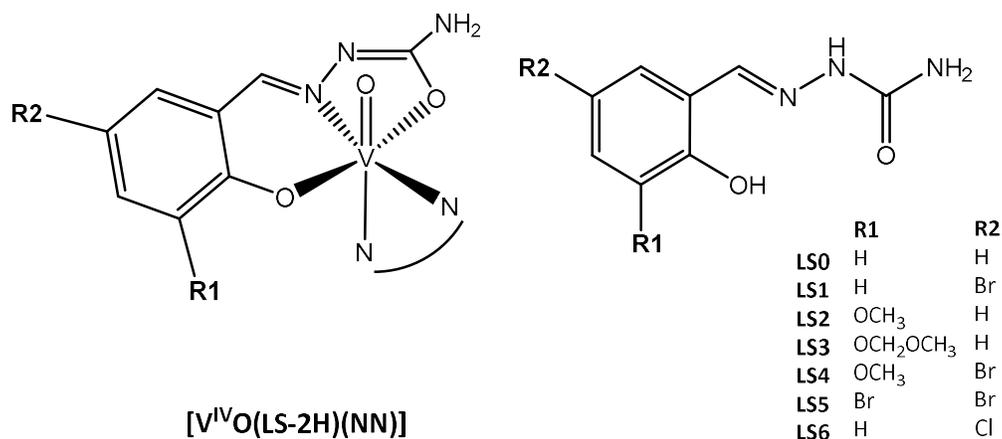


Figura 2.4. Estructura general de los complejos [V^{IV}O(LS-2H)(NN)] y ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído utilizados como co-ligandos. ²⁸⁻³¹

La actividad *in vitro* de estos compuestos sobre *T. cruzi* resultó, fundamentalmente, dependiente de la naturaleza del ligando NN y casi independiente de los sustituyentes R1 y R2 sobre el fragmento de ligando tridentado. Los ligandos tridentados en su forma libre presentaron actividad antiparasitaria insignificante y los complejos fueron más activos que el ligando polipiridínico incluido en su forma libre ²⁸⁻³¹. Los compuestos que incluyen el ligando aminophen (5-amino-1,10-fenantrolina) fueron los más activos de la serie, mostrando valores de IC₅₀ de 9,6 a 18,5 veces más bajos que el NN en su forma libre. Además, ninguno de los compuestos conteniendo aminophen mostró citotoxicidad relevante en células de mamífero (macrófagos murinos J774). El estudio de gran número de compuestos químicamente relacionados permitió realizar estudios cuantitativos de estructura-actividad (QSAR, de sus

siglas en inglés *quantitative structure activity relationship study*) para retroalimentar el diseño racional de nuevas especies ³⁰.

Los resultados de esta correlación destacaron la relevancia de la lipofilia del compuesto sobre la bioactividad deseada, obteniéndose una relación parabólica entre las mismas. Además, se refleja la importancia de la estructura del co-ligando sobre el efecto anti-*T. cruzi*, siendo los compuestos más activos de toda la serie los que incluyen los NN epoxyphen y aminophen.

Para intentar incursionar en el mecanismo de acción de los compuestos, se evaluó la interacción con el ADN de los complejos mediante diferentes técnicas: electroforesis en gel de agarosa, medición de la viscosidad de las soluciones de ADN y AFM ³⁰. Además, se realizó un estudio metabolómico con dos de los compuestos más activos de toda la serie, [V^{IV}O (LS1-2H)(aminophen)] y [V^{IV}O (LS1-2H)(epoxyphen)], donde LS1 corresponde al ligando tridentado 5-bromosalicilaldehído semicarbazona, con fines de caracterizar cambios relevantes sobre vías metabólicas. En particular, el consumo de glucosa por parte de los parásitos tripanosomátidos se caracteriza por la excreción de productos reducidos como succinato, piruvato o lactato y se ha descrito que está compartimentado en un organelo particular denominado glicosoma ³². Las modificaciones en los metabolitos excretados producidos por la incubación del parásito con los compuestos de oxovanadio (IV) seleccionados se siguieron mediante espectroscopía de ¹H RMN ³⁰. Se observó un incremento de glicina, acetato y alanina excretados. Acetato y glicina son catabolitos producidos en la mitocondria del parásito. Por su parte, la alanina se produce en el citosol de la célula del parásito a partir del piruvato que se origina en el glicosoma. Este piruvato también se utiliza en la mitocondria, en el ciclo de Krebs ³³. En consecuencia, un incremento en la cantidad de alanina podría ser indicativo de un incremento de piruvato citosólico debido a una absorción mitocondrial deficiente que emerge de efectos nocivos sobre la integridad de esta. De estos

resultados se concluyó que la mitocondria podría señalarse como un blanco potencial para estos complejos ³⁰.

Con el objetivo de tener un panorama integral del comportamiento a nivel biológico del compuesto líder [V^{IV}O(LS1-2H)(aminophen)], en investigaciones paralelas a esta tesis, se realizaron aproximaciones ómicas de alto rendimiento que incluyeron metalómica, proteómica y transcriptómica, proporcionando una descripción detallada de las respuestas celulares y moleculares de *T. cruzi* a este compuesto de vanadio. En primer lugar, la metalómica proporcionó información acerca del ingreso de vanadio al parásito (2,4 %) y su distribución subcelular en cuatro fracciones del parásito (ADN < 4 %, ARN ~ 1 %, proteínas solubles ~ 4 % y fracción insoluble que incluye principalmente proteínas insolubles y lípidos de membrana >90 %). El porcentaje captado por el parásito es similar al informado para otros compuestos antiproliferativos metálicos conocidos como el cisplatino en células tumorales. La respuesta temprana del parásito al compuesto no mostró cambios drásticos en los niveles de ARNm (transcriptoma del parásito). El análisis proteómico identificó la modulación de proteínas específicas involucradas en diferentes procesos, como el metabolismo energético y redox, los sistemas de transporte, las vías de desintoxicación, la síntesis de proteínas ribosómicas y la degradación de proteínas del proteosoma ³⁴. En suma, aunque [V^{IV}O(LS1-2H)(aminophen)] y sus derivados fueron diseñados racionalmente para afectar el ADN, es claro que los compuestos actúan sobre múltiples blancos de acción. Estos hallazgos, destacaron la importancia del estudio integral de los efectos de los compuestos a través de la combinación de técnicas que permitan detectar los blancos moleculares afectados, permitiendo comprender los efectos celulares observados ³⁵.

2.2.2 Compuestos de coordinación con ligandos bioactivos

En cuanto a la segunda estrategia nombrada anteriormente, el grupo ha diseñado compuestos de coordinación clásicos y organometálicos que incluyen iones o centros metálicos con potencialidad terapéutica y ligandos orgánicos bioactivos frente a tripanosomátidos. En contraste con la estrategia anterior, esta estrategia no pretende incrementar la afinidad de los compuestos por un blanco molecular en particular, sino que aprovecha la potencialidad terapéutica de los iones metálicos involucrados en conjunto con las propiedades conocidas de ciertos ligandos orgánicos. En particular, la formación de compuestos de coordinación pretende modular las propiedades fisicoquímicas de interés biológico del propio ligando bioactivo, de forma que resulte en efectos aditivos o sinérgicos, con probabilidad de actuar sobre más de un blanco de acción.

Antes de este trabajo de tesis, esta estrategia fue utilizada por el grupo para desarrollar compuestos de diversos metales con potencialidad terapéutica, tales como paladio, platino, rutenio, renio, y oro, utilizando principalmente tres familias de ligandos bioactivos en parásitos: semicarbazonas y tiosemicarbazonas derivadas del 5- nitrofurano, *N*-óxidos de aminas aromáticas y bisfosfonatos comerciales^{2,4,5}. Además, en los últimos años, los estudios de la potencialidad antiparasitaria de los compuestos metálicos se han expandido a compuestos bioorganometálicos³⁶⁻⁴¹.

Dada la similitud genómica encontrada para *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* en cuanto a codificación de un importante porcentaje de proteínas similares que podrían representar blancos parasitarios comunes a los tres parásitos⁴²⁻⁴⁴, en años recientes nuestro grupo procuró extender su trabajo incluyendo la evaluación de nuevos compuestos en *T. brucei* y/o *Leishmania* en busca de potenciales metalofármacos de amplio espectro que pudieran ser efectivos también contra estos parásitos tripanosomátidos relacionados.

La estrategia de coordinación a ligandos bioactivos para usarse como agente contra otros microorganismos o parásitos similares, no había sido explotada para compuestos de vanadio. En este marco de trabajo, en este Trabajo de Tesis se comenzó a explorar la potencialidad de nuevos compuestos de oxovanadio frente a los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *L. infantum*, utilizando esta estrategia de diseño.

2.3 LIGANDOS SELECCIONADOS

Para determinar el efecto de la coordinación (unión vanadio-ligando bioactivo) sobre el comportamiento a nivel biológico y las propiedades fisicoquímicas, los compuestos desarrollados han sido diseñados de forma racional incluyendo ligandos bioactivos y ligandos que proporcionen estabilidad a la nueva entidad.

Se seleccionaron dos tipos de ligandos bioactivos a ser incluidos en la esfera de coordinación de los nuevos compuestos: derivados de la 8-hidroxiquinolina (L) y el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina.

En cuanto a los ligandos estabilizadores, se seleccionaron algunos ligandos ONO tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (LS), previamente incluidos en los compuestos $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$ con NN derivados de la 1-10-fenantrolina²⁸⁻³¹. Además, se propuso incluir ligandos ONO tridentados de estructura similar a los ligandos LS, obtenidos por condensación de derivados del salicilaldehído con el ligando isoniazida.

A continuación, se exponen los aspectos relevantes desde el punto de vista químico y biológico de los ligandos seleccionados, que motivaron su elección para el desarrollo de los nuevos compuestos de oxovanadio objetivo, así como algunos antecedentes relevantes en cuanto a su química de coordinación.

2.3.1 Ligandos bioactivos

2.3.1.1 Derivados de la 8-hidroxiquinolina

La Figura 2.5 muestra la estructura de la 8-hidroxiquinolina y sus derivados seleccionados para desarrollar nuevos compuestos de coordinación de vanadio con potencial actividad antiparasitaria.

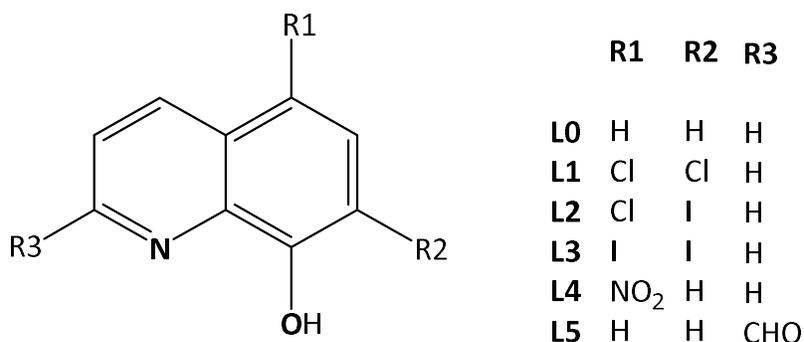


Figura 2.5. Ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina seleccionados para generar nuevos compuestos de vanadio con potencial actividad contra *T. cruzi* y/o *L. infantum*.

La 8-hidroxiquinolina (L0) es considerada una "estructura privilegiada" desde el punto de vista de la Química Medicinal mostrando un amplio rango de potencial farmacológico ⁴⁵. Esta denominación refiere a una estructura con química versátil con potencialidad frente a blancos biológicos específicos, la cual puede ser modulada a través de modificaciones estructurales ^{46, 47}.

En el marco del descubrimiento de nuevos fármacos, existe una variedad de artículos publicados sobre identificación de estructuras privilegiadas, donde se incluyen las quinolinas ^{45, 48-50}. Su estructura ha atraído la atención como un importante farmacóforo heterocíclico y se explora ampliamente por sus efectos biológicos de amplio espectro ^{49, 50}. La 8-hidroxiquinolina, constituye uno de los ligandos quelantes de iones metálicos fuertes más importantes y su inclusión en moléculas más complejas ha resultado en compuestos con amplia potencialidad

farmacológica, tales como agentes de neuroprotección ^{51,52}, agentes antitumorales ^{53,54}, quelantes de metaloproteínas ^{55,56}, agentes anti-VIH ^{57,58}, agentes antifúngicos ⁵⁹, agentes leishmanicidas ⁶⁰, agentes inhibidores del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* ⁶¹, inhibidores de neurotoxinas botulínicas ⁶² entre otras aplicaciones.

Sus derivados halogenados, y en particular el 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina, comúnmente denominado Clioquinol (L2, Figura 2.5), fueron utilizados como fármacos presentando actividades antibacteriana y antifúngica comprobadas ⁶³. En años recientes se ha comprobado también que el Clioquinol muestra actividad citotóxica en diferentes líneas tumorales ⁶⁴⁻⁶⁷. Por su parte, el ligando L5, 2-carbaldehído-8-hidroxiquinolina (Figura 2.5), también ha demostrado propiedades como agente antitumoral ⁵³.

El derivado 5-nitro-8-hidroxiquinolina (L4, Figura 2.5), denominado Nitroxaline, es un antibiótico aprobado por la *Food and Drug Administration* (EEUU) para el tratamiento de infecciones urinarias que, recientemente, ha demostrado también actividad antitumoral en modelos de cáncer de mama y vejiga ⁶⁸.

Esta familia de compuestos bioactivos presenta átomos donores adecuados para su coordinación a iones metálicos actuando como ligandos bidentados. Esta propiedad en conjunto con su versatilidad farmacológica ha hecho a estos ligandos atractivos desde el punto de vista del diseño racional de compuestos metálicos con potencial actividad biológica. En las últimas décadas ha habido un creciente interés en desarrollar compuestos de coordinación con metales de importancia biológica. En este marco, se han investigado diferentes compuestos como antitumorales y muchos de ellos han mostrado actividades citotóxicas interesantes ⁵⁰. Particularmente, se ha sintetizado compuestos de coordinación de Pt(II), Pt(IV) Mn(III), V(IV), V(V), Cu(II), Fe(III), Ru(III), Zn(II), Sn(IV), Ga(III) y Bi(III) ⁶⁹⁻⁷⁸. Vale la pena resaltar el complejo de Ga(III) de la 8-

hidroxiquinolina, $[\text{Ga}(\text{L0-H})_3]$ (Figura 2.6), el cual ha ingresado a fases clínicas como potencial agente antitumoral oral ^{77,78}.

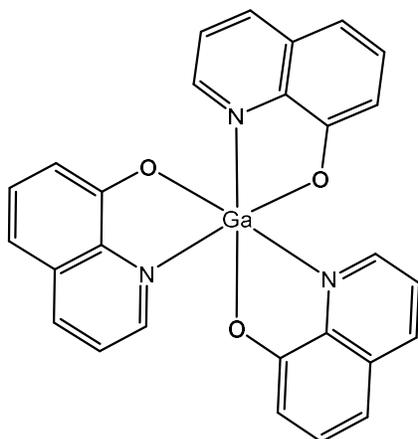


Figura 2.6. Compuesto $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{L0-H})_3]$ ingresado a fase clínica como potencial agente antitumoral.

Previo a esta tesis, se ha reportado la síntesis y caracterización de algunos compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina (Figura 2.7). El compuesto $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L0-H})_2]$ y sus derivados $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$ fueron sintetizados y caracterizados, y su química en disolución acuosa fue ampliamente explorada ^{79,80}. Por su parte, los compuestos homolépticos de oxovanadio (V) $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{L-H})_2(\text{OCH}_3)]$, donde $\text{L} = \text{L0-L4}$ fueron desarrollados, como potenciales catalizadores en reacciones de oxidación de alcanos con peróxido de hidrógeno ⁸¹.

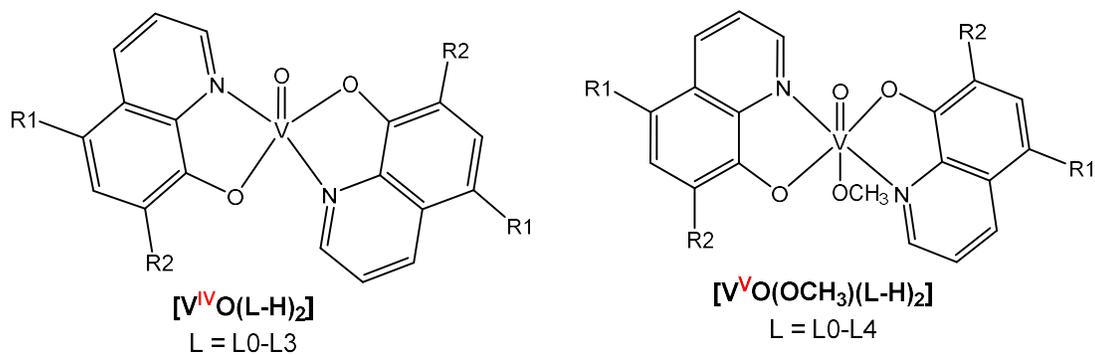


Figura 2.7. Compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina previamente desarrollados ^{71, 79-81}.

En el año 2014, Correia y colaboradores estudiaron el efecto del compuesto $[V^{VO}(L0-H)_2(OCH_3)]$ y de otros compuestos heterolépticos conteniendo L0, sobre *Mycobacterium tuberculosis*, encontrando actividades en el orden micromolar y resultando hasta 5 veces más potentes que el ligando L0 en su forma libre ⁷¹.

En paralelo a esta tesis, se ha estudiado en profundidad el mecanismo de acción del compuesto $[V^{IV}O(L2-H)_2]$ sobre células tumorales ⁸² y se han desarrollado otros compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina y co-ligandos tridentados con actividad anticancerígena ⁸³. Nuestro grupo ha desarrollado diversos compuestos heterobimetálicos M-Fe de Pd(II), Pt(II) y Ru(II) con 8-hidroxiquinolinas y sus derivados, que han demostrado actividad sobre parásitos tripanosomátidos ^{38, 41, 84}.

2.3.1.2 N-óxido de 2-mercaptopiridina

El N-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) es uno de los precursores del fármaco L-092,201 (Figura 2.8). El fármaco L-092,201 es un inhibidor de la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH (FRD), presente en los parásitos *Haemonchus contortus*. Su actividad inhibitoria de FRD ha sido detectada también sobre *T. brucei* ⁸⁵. El Hmpo ha mostrado alta actividad contra *T. cruzi*, siendo uno

de sus principales blancos de acción la FRD, la cual participa en el metabolismo de la glucosa en los parásitos tripanosomátidos ⁸⁶.

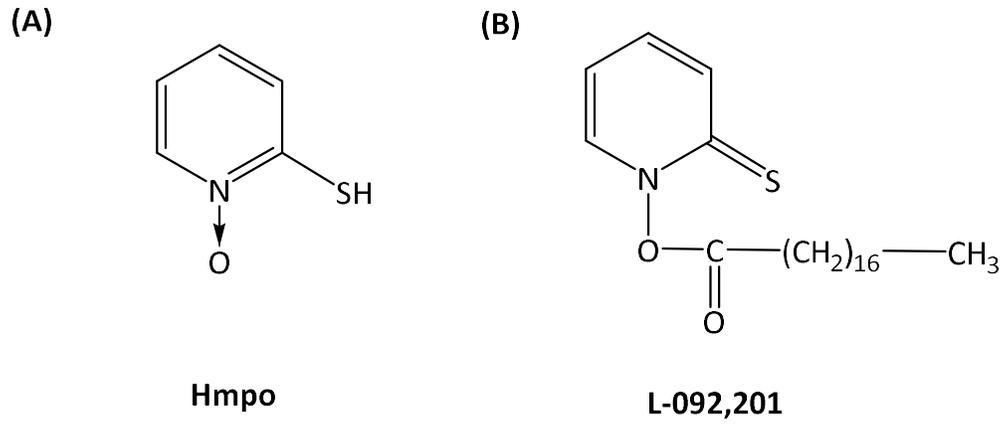


Figura 2.8. (A) Estructura del *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) (B) Estructura del fármaco L-092,201.

A excepción de algunas formas sanguíneas de *T. brucei*, que presentan un metabolismo de la glucosa muy simple, basado en la reducción de glucosa de la sangre del hospedero, los parásitos tripanosomátidos presentan un metabolismo de la glucosa más complejo que se esquematiza en la Figura 2.9. Aproximadamente el 70 % de la glucosa consumida por los tripanosomátidos es convertida en succinato a nivel mitocondrial y glicosomal, convirtiéndola en el principal producto de excreción ⁸⁷⁻⁸⁹.

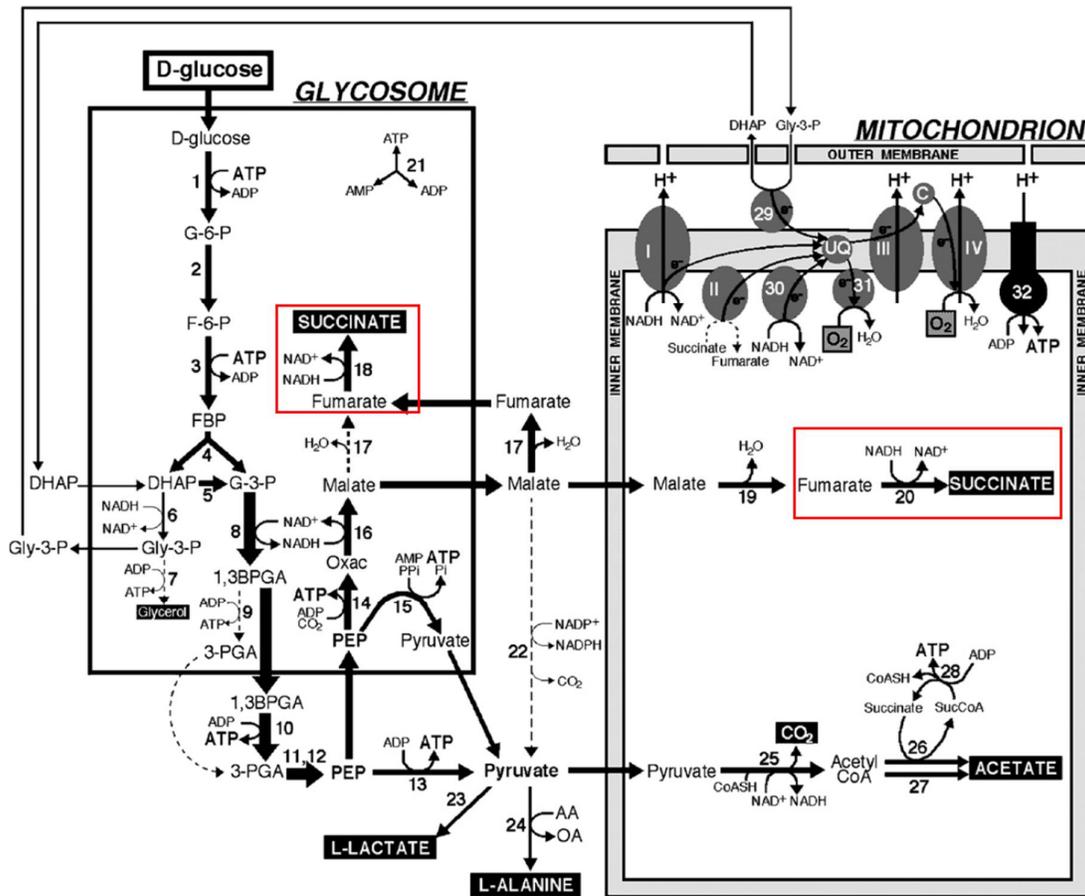


Figura 2.9. Metabolismo de la glucosa en tripanosomátidos a nivel glicosomal y mitocondrial. Los cuadros negros resaltan los productos finales de excreción (acetato, alanina, glicerol, lactato, succinato y CO₂). Los cuadros rojos señalan los pasos que cataliza la enzima FRD. El esquema fue extraído de la referencia ⁸⁹.

La producción de succinato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), producto de oxidación de la glucosa, es iniciado por acción de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (reacción 14, Figura 2.9) y la malato deshidrogenasa (reacción 16, Figura 2.9) 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, Figura 2.9) y otra mitocondrial (reacción 19, Figura 2.9). Finalmente, este compuesto es convertido a succinato por dos enzimas oxido-reductasas dependientes de NADH, la

fumarato reductasa glicosomal (reacción 18, Figura 2.9)^{87, 90} y la fumarato reductasa mitocondrial (reacción 19, Figura 2.9) (cuadros rojos)⁸⁸.

La Figura 2.10 muestra la reacción de conversión de fumarato en succinato que es catalizada por la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH. La enzima está presente en los parásitos tripanosomátidos, pero no en células normales de mamíferos⁹¹⁻⁹³. Particularmente, esta enzima se expresa en todas las etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, lo que la hace atractiva como potencial blanco para el diseño de agentes terapéuticos⁹³⁻⁹⁵

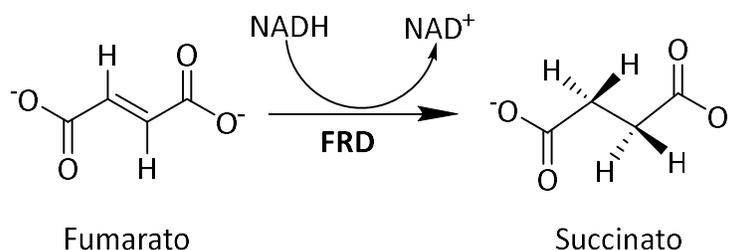


Figura 2.10. Reacción de reducción de fumarato a succinato, a expensas de NADH, catalizada por la enzima FRD.

Turrens y colaboradores, validaron el blanco de acción a través de estudios de inhibición enzimática sobre extractos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi*, determinando un IC₅₀ de inhibición de FRD de 35 μM. Adicionalmente, se realizaron experimentos de rescate suplementando el medio de cultivo con succinato, el cual revierte el efecto de Hmpo sobre los parásitos, de acuerdo con lo esperado si se considera la FRD como blanco de acción. Se determinó además que el Hmpo tiene efecto sobre la capacidad de infección de los tripomastigotas y sobre la proliferación de amastigotas intracelulares⁸⁶. En suma, el Hmpo ha demostrado tener potencialidad como agente anti-*T. cruzi*.

En cuanto a su inclusión como ligando en el desarrollo de potenciales metalofármacos, se ha utilizado el Hmpo como ligando bioactivo en el diseño de potenciales agentes activos frente a tripanosomátidos (Figura 2.11). Por un lado,

se desarrollaron los compuestos homoléticos $[M^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$ ($M = \text{Pd}$ o Pt) y $[\text{Au}_2(\text{mpo})_2(\text{PPh}_3)_2]$, los cuales mostraron un considerable aumento de la actividad antiparasitaria en comparación al ligando en su forma libre ^{96, 97}. En cuanto al compuesto homolético $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{mpo})_2]$, éste fue desarrollado previamente por Parajón-Costa y colaboradores ⁹⁸ y su actividad antiparasitaria fue evaluada por nuestro grupo, observando un efecto similar al discutido para Pd , Pt y Au ¹.

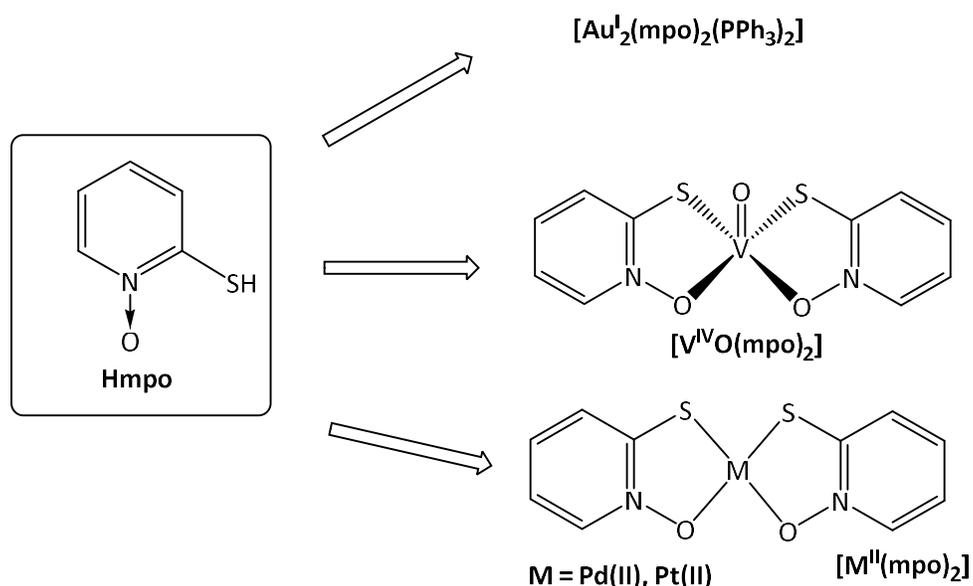


Figura 2.11. *N*-óxido de 2-mercaptopiridina y sus compuestos de coordinación de $\text{Pd}(\text{II})$, $\text{Pt}(\text{II})$, $\text{V}(\text{IV})\text{O}$ y $\text{Au}(\text{I})$. Extraída y adaptada de ¹.

Más tarde, con el objetivo de disminuir los efectos tóxicos en células de mamífero de los compuestos $[M^{\text{II}}(\text{mpo})_2]$ ($M = \text{Pd}$ o Pt), nuestro grupo desarrolló compuestos heterobimetálicos incluyendo un fragmento bis(fenilfosfino)ferroceno (dppf) en la esfera de coordinación del metal (Figura 2.12) ⁴⁰. La modificación química resultó en un aumento sustancial de la selectividad por *T. cruzi* (IS ~ 85) ^{99, 100}.

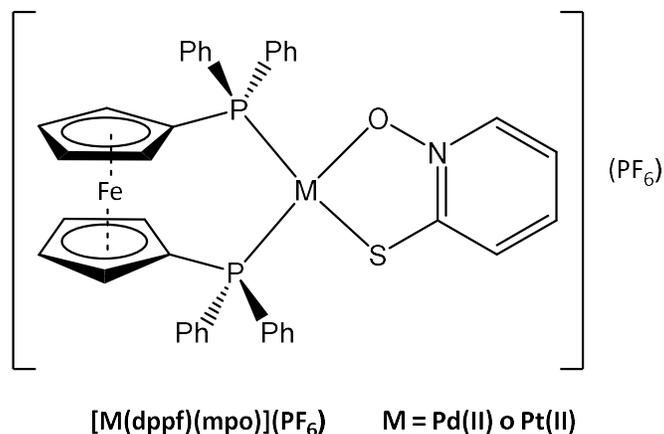


Figura 2.12. Estructura química de los compuestos $[M(dppf)(mpo)]$, donde $M = Pd$ o Pt , dppf es 1,1'-bis-(difenilfosfino)ferroceno y mpo es *N*-óxido de 2-mercaptopiridina ⁴⁰.

Se ha incluido también el ligando mpo en complejos metálicos desarrollados en el marco de la búsqueda de potenciales agentes antituberculosos. Particularmente, nuestro grupo ha desarrollado dos nuevos compuestos de coordinación, de fórmula general $[M^{III}(mpo)_3]$, donde $M = Ga(III)$ y $Bi(III)$. Estos dos compuestos y el compuesto análogo $[Fe^{III}(mpo)_3]$ (desarrollado anteriormente), resultaron activos en *Mycobacterium tuberculosis* ¹⁰¹ y en *T. cruzi* (resultados sin publicar).

2.3.2 Ligandos tridentados

2.3.2.1 Semicarbazonas derivadas del salicilaldehído

Las semicarbazonas son moléculas orgánicas que tienen una estructura química general que incluye: un átomo de nitrógeno azometínico (N1), un nitrógeno hidrazínico (N2), el grupo carbonilo (C=O) y un grupo amino (N3) (Figura 2.13).

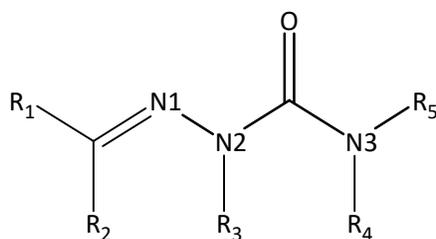


Figura 2.13. Estructura general de las semicarbazonas.

Para este trabajo, se seleccionaron semicarbazonas derivadas del salicilaldehído. Estos pueden ser obtenidos de forma sencilla por condensación de Schiff de derivados sustituidos de salicilaldehído y semicarbazida (Figura 2.14) ^{25, 27, 29-31, 102, 103}

Como ya se discutió antes en este capítulo, estas semicarbazonas en su forma libre, han demostrado tener actividad insignificante frente a tripanosomátidos, sin embargo, su versatilidad desde el punto de vista de su Química de Coordinación vuelve atractivo al ligando para ser incluido en los compuestos de coordinación conteniendo ligandos bioactivos a efectos de estabilizar el compuesto. Estas semicarbazonas disponen de átomos donores duros e intermedios (ONO) y forman anillos quelatos de 6 miembros con el metal, lo que le confiere alta estabilidad termodinámica.

Las investigaciones previas han demostrado que la inclusión del ligando semicarbazona en la esfera de coordinación (Figura 2.4) modula las propiedades fisicoquímicas de la nueva entidad y vuelve a los compuestos $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$ (LS = semicarbazona derivado de salicilaldehído), más activos frente a *T. cruzi* que sus análogos $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(NN)]$ (Figura 2.3) ^{25,}

^{27, 29-31, 102, 103}

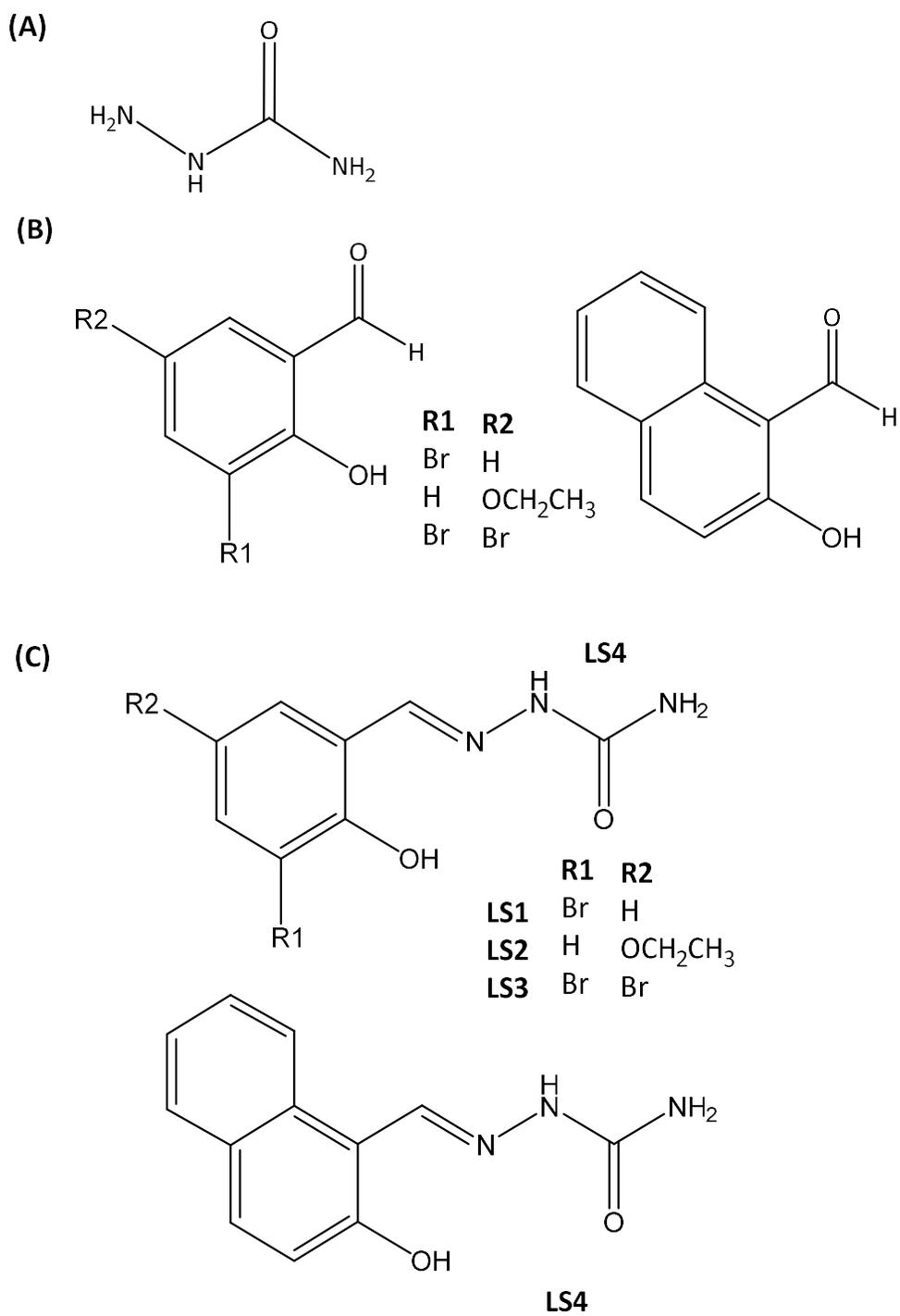


Figura 2.14. (A) Estructura de la semicarbazida. (B) Derivados del salicilaldehído. (C) Semicarbazonas derivadas de salicilaldehído seleccionadas para ser incluidas como ligandos tridentados en la síntesis de compuestos de oxovanadio.

2.3.2.2 Hidrazonas derivadas de la isoniazida

La isoniazida (Figura 2.15), es uno de los fármacos más comúnmente usados para el tratamiento de la tuberculosis humana y el más eficiente. Integra el tratamiento de combinación de primera línea sugerido por la OMS ¹⁰⁴. La isoniazida ha demostrado su habilidad como ligando en diferentes compuestos metálicos ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Sin embargo, en este trabajo no se pretende coordinar isoniazida a centros de vanadio, sino que la molécula será utilizada como bloque de construcción de hidrazonas tridentadas derivadas del salicilaldehído conteniendo el potencial farmacóforo isonicotínico, a ser incluido en compuestos heterolépticos de oxovanadio con ligandos bioactivos, tales como los derivados de la 8-hidroxiquinolina (Figura 2.15). De esta forma, se plantea la hipótesis de que la inclusión de un potente farmacóforo en el ligando tridentado podría resultar en un incremento de la actividad antiparasitaria por combinación de los efectos de ambos ligandos de forma individual.

Específicamente, se seleccionaron los derivados 5-bromosalicilaldehído y 2-hidroxinaftaldehído. El primero de ellos se seleccionó por tratarse del salicilaldehído utilizado en la síntesis del compuesto [V^{IV}O(LS1-2H)(aminophen)], el cual resultó ser el más prometedor de la serie de 37 compuestos estructuralmente relacionados ^{30, 34}. Dado que la contribución lipofílica parece ser un aporte crucial para la actividad antiparasitaria de los compuestos de oxovanadio desarrollados, el 2-hidroxinaftaldehído fue seleccionado para construir su hidrazona con la isoniazida dado que se espera que su lipofilia, y por tanto la de la hidrazona y los compuestos de coordinación obtenidos, sea mayor que la correspondiente a la hidrazona del 5-bromosalicilaldehído.

Las bases de Schiff N²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído (IN) y N²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 5-bromo

salicilaldehído (BrIS) (Figura 2.15) ya han sido sintetizadas previamente ^{108, 109}. De hecho, IN y algunos derivados orgánicos han sido evaluados como potenciales agentes antituberculosos ¹⁰⁸.

En cuanto a su química de coordinación, el compuesto IN ha sido utilizado como ligando para la preparación de complejos de Ga(III), Cu(II) y Fe(III) que han demostrado actividad antitumoral ^{110, 111}.

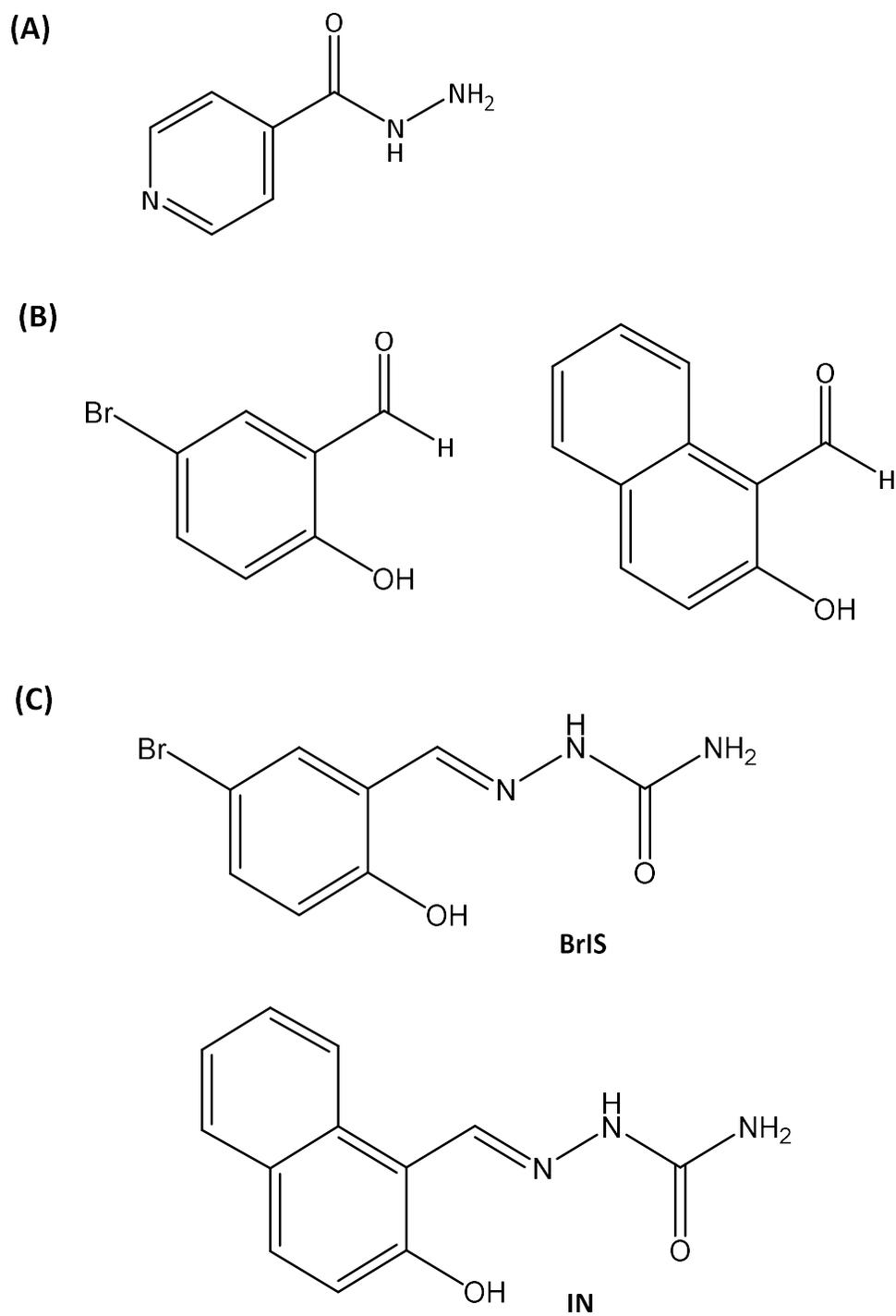


Figura 2.15. (A) Estructura de la isoniazida. (B) Derivados del salicilaldehído seleccionados para ser incluidos en las hidrazonas tridentadas. (C) Hidrazonas derivadas de salicilaldehído seleccionadas para ser incluidas como ligandos tridentados en la síntesis de compuestos de oxovanadio.

Para ambas hidrazonas, IN y BrIS, se ha sintetizado y determinado la estructura cristalina al estado sólido de los compuestos homolépticos de dioxovanadio (V), $[V^VO_2(IN-H)]$ ¹¹² y $[V^VO_2(BrIS-H)]$ (en paralelo a esta tesis)¹¹³ (Figura 2.16), pero la obtención de compuestos heterolépticos incluyendo ligandos bioactivos no había sido previamente explorada.

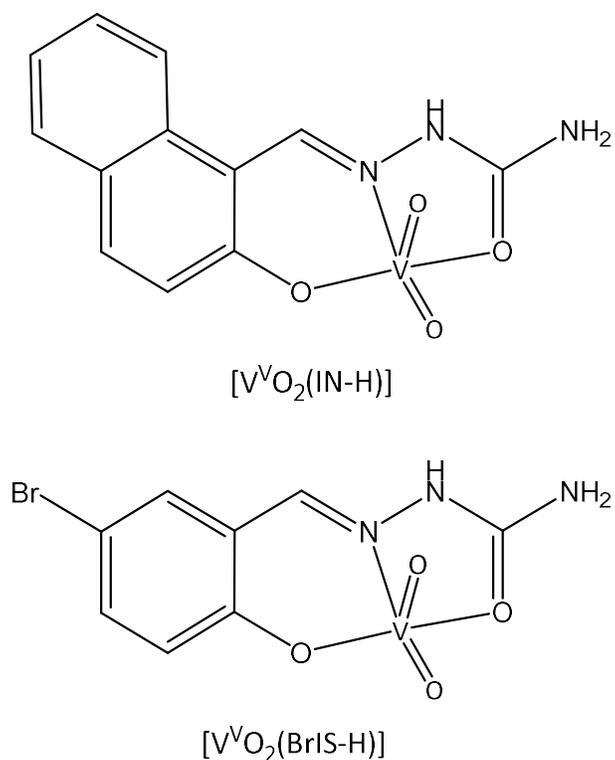


Figura 2.16. Estructura de los compuestos $[V^VO_2(IN-H)]$ ¹¹² y $[V^VO_2(BrIS-H)]$ ¹¹³

2.4 PROPUESTA

En base a todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo de tesis se propuso estudiar cuatro series de compuestos de coordinación de vanadio que incluyen ligandos bioactivos como potenciales agentes antiparasitarios:

- Complejos heterolépticos de oxovanadio (V) con 8-hidroxiquinolina como ligando bioactivo (L0, Figura 2.5) y coligandos derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (Figura 2.14C)
- Complejos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina (Figura 2.5)
- Complejos heterolépticos de oxovanadio (V) con los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina (Figura 2.5) y coligandos hidrazona derivados de la isoniazida (Figura 2.15C)
- Complejos heterolépticos de oxovanadio (IV) con dos ligandos bioactivos diferentes: *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo) (Figura 2.8A) y alguno de los derivados de la 8-hidroxiquinolina (Figura 2.5).

2.4.1 Objetivos generales y específicos

2.4.1.1 *Objetivo general*

En este trabajo de tesis se pretende explorar la potencialidad de nuevos compuestos de vanadio como agentes contra los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *L. infantum*, responsables de la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, respectivamente. Para cumplir con este objetivo se propone desarrollar nuevos compuestos heterolépticos de vanadio que incluyan ligandos bioactivos frente a microorganismos, parásitos u otros y realizar estudios fisicoquímicos y

biológicos que permitan evaluar su potencialidad como agentes contra tripanosomátidos e incursionar en el estudio de su posibles blancos de acción. También, se pretende evaluar los efectos de los compuestos homolépticos de vanadio con los ligandos bioactivos seleccionados. Para todos los compuestos obtenidos, se pretende evaluar la correspondencia entre el comportamiento biológico y la estructura química de los mismos.

2.4.1.2 *Objetivos específicos*

- Sintetizar las diferentes series de compuestos homolépticos y heterolépticos de vanadio indicadas que incluyen los ligandos bioactivos seleccionados.
- Caracterizar en estado sólido y en disolución los compuestos obtenidos desde el punto de vista analítico y estructural.
- Determinar la actividad *in vitro* de los compuestos obtenidos frente a epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* y los cambios morfológicos inducidos por los compuestos.
- Evaluar la actividad de los compuestos en promastigotas de *L. infantum* a efectos de analizar si los compuestos pudieran comportarse como antiparasitarios de amplio espectro, afectando tripanosomátidos genómicamente relacionados.
- Estudiar su toxicidad sobre células mamíferas VERO a efectos de determinar la selectividad que muestran los compuestos hacia el parásito.
- Analizar los efectos de los compuestos más promisorios sobre la capacidad de infección de tripomastigotas celulares y la replicación de amastigotas de *T. cruzi*, a efectos de comparar el comportamiento sobre los estadios de *T. cruzi* relevantes para el hospedero.
- Estudiar la estabilidad y lipofilia de los compuestos metálicos.

- Explorar la capacidad de los compuestos metálicos de unirse a albúmina como potencial proteína transportadora.
- Estudiar la interacción con ADN, blanco potencial de acción.
- Realizar estudios metalómicos de captura y distribución subcelular de los compuestos más promisorios de cada serie.
- Explorar el tipo de mecanismo de muerte celular involucrado
- Evaluar la producción de especies reactivas del oxígeno y la integridad del potencial de membrana mitocondrial.
- Estudiar la capacidad de los compuestos que incluyen el ligando bioactivo Hmpo de inhibir la enzima de *T. cruzi* fumarato reductasa NADH dependiente.
- Correlacionar la actividad biológica observada para los compuestos con los aspectos estructurales y las propiedades fisicoquímicas de los mismos.

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gambino, D., Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, 255 (19-20), 2193-2203.
2. Gambino, D.; Otero, L., Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorg Chim Acta* **2012**, 393, 103-114.
3. Gambino, D.; Otero, L., Design of prospective antiparasitic metal-based compounds including selected organometallic cores. *Inorg Chim Acta* **2018**, 472, 58-75.
4. Gambino, D.; Otero, L., Metal compounds in the development of antiparasitic agents; rational design from basic chemistry to the clinic. In *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*, Carver, P., Ed. De Gruyter: 2019; pp 331-358.
5. Gambino, D.; Otero, L., Facing Diseases Caused by Trypanosomatid Parasites: Rational Design of Pd and Pt Complexes With Bioactive Ligands. *Front Chem* **2021**, 9, 816266.
6. Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D., Vanadium compounds in medicine. *Coord Chem Rev* **2015**, 301, 24-48.
7. Evangelou, A. M., Vanadium in cancer treatment. *Critical Rev OncolnHematology* 42 (2002) 249-265 **2002**, 42, 249-265.
8. Río, D. d.; Galindo, A.; Vicente, R.; Mealli, C.; Ienco, A.; Masi, D., Synthesis, molecular structure and properties of oxo-vanadium(IV) complexes containing the oxydiacetate ligand. *Dalton Trans.* **2003**, 1813-1820.
9. Thompson, K. H.; Tsukada, Y.; Xu, Z.; Battell, M.; McNeill, J. H.; Orvig, C., Influence of chelation and oxidation state on vanadium bioavailability, and their effects on tissue concentrations of zinc, copper, and iron. *Biol Trace Elem Res* **2002**, 86, 31-45.

10. Bencini, A.; Lippolis, V., 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coord Chem Rev* **2010**, *254* (17-18), 2096-2180.
11. Rivadeneira, J.; Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B.; Baran, E. J., Spectroscopic characterization of a VO₂⁺ complex of oxodiacetic acid and its bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *Biol Trace Elem Res* **2007**, *118* (2), 159-66.
12. Rivadeneira, J.; Virgilio, A. L. D.; Barrio, D. A.; Muglia, C. I.; Bruzzone, L.; Etcheverry, S. B., Cytotoxicity of a vanadyl(IV) complex with a multidentate oxygen donor in osteoblast cell lines in culture. *Med Chem* **2010**, *6*, 6-23.
13. Leon, I. E.; Butenko, N.; Di Virgilio, A. L.; Muglia, C. I.; Baran, E. J.; Cavaco, I.; Etcheverry, S. B., Vanadium and cancer treatment: antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. *J Inorg Biochem* **2014**, *134*, 106-17.
14. Leon, I. E.; Etcheverry, S. B.; Parajon-Costa, B. S.; Baran, E. J., Spectroscopic characterization of an oxovanadium(IV) complex of oxodiacetic acid and o-phenanthroline. Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *Biol Trace Elem Res* **2012**, *147* (1-3), 403-7.
15. León, I. E.; Etcheverry, S. B.; Parajón-Costa, B. S.; Baran, E. J., Spectroscopic characterization of an oxovanadium(IV) complex of oxodiacetic acid and 2,2'-bipyridine. Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J Mex Chem Soc* **2013**, *57* (3), 175-179.
16. Arnesano, F.; Natile, G., Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coord Chem Rev* **2009**, *253* (15-16), 2070-2081.
17. Bugarcic, Z. D.; Bogojeski, J.; Petrovic, B.; Hochreuther, S.; van Eldik, R., Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans* **2012**, *41* (40), 12329-45.

18. P. Takahara, A. R., C. Frederick, S. Lippard, Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* **1995**, *377*, 649-652.
19. Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J., The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans* **2018**, *47* (19), 6645-6653.
20. Boros, E.; Dyson, P. J.; Gasser, G., Classification of Metal-based Drugs According to Their Mechanisms of Action. *Chem* **2020**, *6* (1), 41-60.
21. Farrell, N., *Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic*. Second ed.; 2003.
22. Kinnamon, K. E.; Steck, E. A.; Rane, D. S., Activity of antitumor drugs against African Trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **1979**, 157-160.
23. Sánchez-Delgado RA, A. A., Suárez L, Metal ions and their complexes in medication. In *Metal ions in biological systems*, In: Sigel H, S. A. e., Ed. Marcel Dekker: New York, 2004; p p. 379.
24. Navarro, M.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Gambino, D., Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discov Today* **2010**, *15* (23-24), 1070-8.
25. Benitez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D., Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303-12.
26. Benitez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Moreno, V.; Lorenzo, J.; Aviles, F. X.; Garat, B.; Gambino, D., A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (10), 1386-94.
27. Benitez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Arrambide, G.; Navarro, M.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (4), 609-16.

28. Benítez, J.; Correia, I.; Becco, L.; Fernández, M.; Garat, B.; Gallardo, H.; Conte, G.; Kuznetsov, M. L.; Neves, A.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Searching for Vanadium-Based Prospective Agents against *Trypanosoma cruzi*: Oxidovanadium(IV) Compounds with Phenanthroline Derivatives as Ligands. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **2013**, *639* (8-9), 1417-1425.
29. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
30. Fernandez, M.; Varela, J.; Correia, I.; Birriel, E.; Castiglioni, J.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gambino, D., A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Trans* **2013**, *42* (33), 11900-11.
31. Scalese, G.; Benitez, J.; Rostan, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Birriel, E.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Pessoa, J. C.; Gambino, D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 116-25.
32. Parsons, M., Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* **2004**, *53* (3), 717-24.
33. Bringaud, F.; Riviere, L.; Coustou, V., Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **2006**, *149* (1), 1-9.

34. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Lima, A.; Gehrke, S. A.; Scalese, G.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., High Throughput Approaches to Unravel the Mechanism of Action of a New Vanadium-Based Compound against *Trypanosoma cruzi*. *Bioinorg Chem Appl* **2020**, *2020*, 1634270.
35. Scalese, G.; Kostenkova, K.; Crans, D. C.; Gambino, D., Metallomics and other omics approaches in antiparasitic metal-based drug research. *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *67*, 102127.
36. Demoro, B.; Rossi, M.; Caruso, F.; Liebowitz, D.; Olea-Azar, C.; Kemmerling, U.; Maya, J. D.; Guiset, H.; Moreno, V.; Pizzo, C.; Mahler, G.; Otero, L.; Gambino, D., Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones. *Biol Trace Elem Res* **2013**, *153* (1-3), 371-81.
37. Demoro, B.; Sarniguet, C.; Sanchez-Delgado, R.; Rossi, M.; Liebowitz, D.; Caruso, F.; Olea-Azar, C.; Moreno, V.; Medeiros, A.; Comini, M. A.; Otero, L.; Gambino, D., New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Trans* **2012**, *41* (5), 1534-43.
38. Rivas, F.; Medeiros, A.; Comini, M.; Suescun, L.; Rodriguez Arce, E.; Martins, M.; Pinheiro, T.; Marques, F.; Gambino, D., Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells. *J Inorg Biochem* **2019**, *199*, 110779.
39. Rivas, F.; Medeiros, A.; Rodriguez Arce, E.; Comini, M.; Ribeiro, C. M.; Pavan, F. R.; Gambino, D., New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: Evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inorg Biochem* **2018**, *187*, 73-84.
40. Rodriguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Perez-Diaz, L.; Echeverria, G. A.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Maringolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q.; Pavan,

- F. R.; Otero, L.; Gambino, D., Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Trans* **2015**, 44 (32), 14453-64.
41. Rivas, F.; Del Marmol, C.; Scalese, G.; Pérez-Díaz, L.; Machado, I.; Blacque, O.; Medeiros, A.; Comini, M.; Gambino, D., New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem* **2022**, 237, 112016.
42. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L., Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Med Chem* **2009**, 52 (23), 7339-59.
43. Ribeiro, I.; Sevcsik, A. M.; Alves, F.; Diap, G.; Don, R.; Harhay, M. O.; Chang, S.; Pecoul, B., New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, 3 (7), e484.
44. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A.-N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C. M.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.; Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.; Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D.; Hal, N., Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **2005**, 309, 404-409.
45. Song, Y. n.; Xu, H.; Chen, W.; Zhan, P.; Liu, X., 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *Med Chem Comm* **2015**, 6 (1), 61-74.

46. DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A., Privileged structures: applications in drug discovery. *Combinator Chem High Throughput Screen* **2004**, *7*, 473-493.
47. Duarte, C. D.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M., Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini Rev Med Chem* **2007**, *7*, 1108-1119.
48. Song, Y. n.; Chen, W.; Kang, D.; Zhang, Q.; Zhan, P.; Liu, X., "Old friends in new guise": exploiting privileged structures for scaffold re-evolution/refining. *Comb Chem High Throughput Screening* **2014**, *17* (6), 536-553.
49. Oliveri, V.; Vecchio, G., 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *Eur J Med Chem* **2016**, *120*, 252-274.
50. Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V., 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther* **2013**, *7*, 1157-78.
51. Gogoi, S.; Antonio, T.; Rajagopalan, S.; Reith, M.; Andersen, J.; Dutta, A. K., Dopamine D(2)/D(3) agonists with potent iron chelation, antioxidant and neuroprotective properties: potential implication in symptomatic and neuroprotective treatment of Parkinson's disease. *ChemMedChem* **2011**, *6* (6), 991-5.
52. Ghosh, B.; Antonio, T.; Reith, M. E.; Dutta, A. K., Discovery of 4-(4-(2-((5-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(propyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)quinolin-8-ol and its analogues as highly potent dopamine D2/D3 agonists and as iron chelator: in vivo activity indicates potential application in symptomatic and neuroprotective therapy for Parkinson's disease. *J Med Chem* **2010**, *53* (5), 2114-25.
53. Chan, S. H.; Chui, C. H.; Chan, S. W.; Kok, S. H.; Chan, D.; Tsoi, M. Y.; Leung, P. H.; Lam, A. K.; Chan, A. S.; Lam, K. H.; Tang, J. C., Synthesis of

- 8-hydroxyquinoline derivatives as novel antitumor agents. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4* (2), 170-4.
54. Martirosyan, A.; Leonard, S.; Shi, X.; Griffith, B.; Gannett, P.; Strobl, J., Actions of a histone deacetylase inhibitor NSC3852 (5-nitroso-8-quinolinol) link reactive oxygen species to cell differentiation and apoptosis in MCF-7 human mammary tumor cells. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *317* (2), 546-52.
55. Hanaya, K.; Suetsugu, M.; Saijo, S.; Yamato, I.; Aoki, S., Potent inhibition of dinuclear zinc(II) peptidase, an aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*, by 8-quinolinol derivatives: inhibitor design based on Zn²⁺ fluorophores, kinetic, and X-ray crystallographic study. *J Biol Inorg Chem* **2012**, *17* (4), 517-29.
56. Jacobsen, J. A.; Fullagar, J. L.; Miller, M. T.; Cohen, S. M., Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. *J Med Chem* **2011**, *54* (2), 591-602.
57. Mekouar, K.; Mouscadet, J.-F.; Desmaele, D.; Subra, F.; Leh, H.; Savoure, D.; Auclair, C.; d'Angelo, J., Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells. *J Med Chem* **1998**, *41*, 2846-2857.
58. Serrao, E.; Debnath, B.; Otake, H.; Kuang, Y.; Christ, F.; Debyser, Z.; Neamati, N., Fragment-based discovery of 8-hydroxyquinoline inhibitors of the HIV-1 integrase-lens epithelium-derived growth factor/p75 (IN-LEDGF/p75) interaction. *J Med Chem* **2013**, *56* (6), 2311-22.
59. McKay, M. J.; Carroll, A. R.; Quinn, R. J., Perspicamides A and B, Quinolinecarboxylic Acid Derivatives from the Australian Ascidian *Botrylloides perspicuum*. *J Nat Prod* **2005**, *68*, 1776-1778.
60. Pandey, A. K.; Sharma, R.; Shivahare, R.; Arora, A.; Rastogi, N.; Gupta, S.; Chauhan, P. M., Synthesis of perspicamide A and related diverse analogues:

- their bioevaluation as potent antileishmanial agents. *J Org Chem* **2013**, *78* (4), 1534-46.
61. Puckett, S.; Trujillo, C.; Eoh, H.; Marrero, J.; Spencer, J.; Jackson, M.; Schnappinger, D.; Rhee, K.; Ehrt, S., Inactivation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase prevents optimal co-catabolism of glycolytic and gluconeogenic carbon substrates in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **2014**, *10* (5), e1004144.
62. Caglic, D.; Krutein, M. C.; Bompiani, K. M.; Barlow, D. J.; Benoni, G.; Pelletier, J. C.; Reitz, A. B.; Lairson, L. L.; Houseknecht, K. L.; Smith, G. R.; Dickerson, T. J., Identification of clinically viable quinolinol inhibitors of botulinum neurotoxin A light chain. *J Med Chem* **2014**, *57* (3), 669-76.
63. Croft, S. L., Antiprotozoal agents. In *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*, F. O'Grady, H. P. L., R.G. Finch, D. Greenwood, Ed. 7th ed. Churchill Livingstone: New York, 1997; pp 526–527.
64. Chan-On, W.; Huyen, N. T.; Songtawee, N.; Suwanjang, W.; Prachayasittikul, S.; Prachayasittikul, V., Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. *Drug Des Devel Ther* **2015**, *9*, 2033-47.
65. Ding, W.-Q.; Liu, B.; Vaught, J. L.; Yamauchi, H.; Lind, S. E., Anticancer activity of the antibiotic Clioquinol. *Cancer Res* **2005**, *65* (8), 3389-3395.
66. Ding, W. Q.; Liu, B.; Vaught, J. L.; Palmiter, R. D.; Lind, S. E., Clioquinol and docosahexaenoic acid act synergistically to kill tumor cells. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (7), 1864-72.
67. Cao, B.; Li, J.; Zhu, J.; Shen, M.; Han, K.; Zhang, Z.; Yu, Y.; Wang, Y.; Wu, D.; Chen, S.; Sun, A.; Tang, X.; Zhao, Y.; Qiao, C.; Hou, T.; Mao, X., The antiparasitic clioquinol induces apoptosis in leukemia and myeloma cells by inhibiting histone deacetylase activity. *J Biol Chem* **2013**, *288* (47), 34181-34189.

68. Sobke, A.; Klinger, M.; Hermann, B.; Sachse, S.; Nietzsche, S.; Makarewicz, O.; Keller, P. M.; Pfister, W.; Straube, E., The urinary antibiotic 5-nitro-8-hydroxyquinoline (Nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56* (11), 6021-5.
69. Qin, Q. P.; Chen, Z. F.; Qin, J. L.; He, X. J.; Li, Y. L.; Liu, Y. C.; Huang, K. B.; Liang, H., Studies on antitumor mechanism of two planar platinum(II) complexes with 8-hydroxyquinoline: synthesis, characterization, cytotoxicity, cell cycle and apoptosis. *Eur J Med Chem* **2015**, *92*, 302-13.
70. Thamilarasan, V.; Sengottuvelan, N.; Sudha, A.; Srinivasan, P.; Siva, A., Synthesis, molecular structure, theoretical calculation, DNA/protein interaction and cytotoxic activity of manganese(III) complex with 8-hydroxyquinoline. *J Photochem Photobiol B* **2015**, *142*, 220-31.
71. Correia, I.; Adao, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; Costa Pessoa, J., Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *J Inorg Biochem* **2014**, *141*, 83-93.
72. Barilli, A.; Atzeri, C.; Bassanetti, I.; Ingoglia, F.; Dall'Asta, V.; Bussolati, O.; Maffini, M.; Mucchino, C.; Marchio, L., Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells. *Mol Pharm* **2014**, *11* (4), 1151-63.
73. Gobec, M.; Kljun, J.; Sosic, I.; Mlinaric-Rascan, I.; Ursic, M.; Gobec, S.; Turel, I., Structural characterization and biological evaluation of a clioquinol-ruthenium complex with copper-independent antileukaemic activity. *Dalton Trans* **2014**, *43* (24), 9045-51.

74. Chen, Z. F.; Peng, Y.; Gu, Y. Q.; Liu, Y. C.; Liu, M.; Huang, K. B.; Hu, K.; Liang, H., High antitumor activity of 5,7-dihalo-8-quinolinolato tin(IV) complexes. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 51-8.
75. Liu, Y. C.; Wei, J. H.; Chen, Z. F.; Liu, M.; Gu, Y. Q.; Huang, K. B.; Li, Z. Q.; Liang, H., The antitumor activity of zinc(II) and copper(II) complexes with 5,7-dihalo-substituted-8-quinolinoline. *Eur J Med Chem* **2013**, *69*, 554-63.
76. Ferraz, K. S. O.; Reis, D. C.; Da Silva, J. G.; Souza-Fagundes, E. M.; Baran, E. J.; Beraldo, H., Investigation on the bioactivities of clioquinol and its bismuth(III) and platinum(II,IV) complexes. *Polyhedron* **2013**, *63*, 28-35.
77. Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Gallium in cancer treatment. *Curr Top Med Chem* **2004**, *4*, 1575-1583.
78. Hofheinz, R. D.; Dittrich, C.; Jakupec, M. A.; Drescher, A.; Jaehde, U.; Gneist, M.; Graf von Keyserlingk, N.; Keppler, B. K.; Hochhaus, A., Early results from a phase I study on orally administered tris(8-quinolinolato)gallium(III) (FFC11, KP46) in patients with solid tumors--a CESAR study (Central European Society for Anticancer Drug Research--EWIV). *Int J Clin Pharmacol Ther* **2005**, *43* (12), 590-1.
79. Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Lodyga-Chruscinska, E., Oxovanadium(IV) complexes of quinoline derivatives. *Inorg Chim Acta* **2003**, *348*, 97-106.
80. Gonzalez Baró, A. C.; Baran, E. J., Oxovanadium(IV) complexes of halogenated oxines. *Monats ftir Chem* **1997**, *128*, 323-335.
81. Gryca, I.; Czerwinska, K.; Machura, B.; Chrobok, A.; Shul'pina, L. S.; Kuznetsov, M. L.; Nesterov, D. S.; Kozlov, Y. N.; Pombeiro, A. J. L.; Varyan, I. A.; Shul'pin, G. B., High Catalytic Activity of Vanadium Complexes in Alkane Oxidations with Hydrogen Peroxide: An Effect of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Noninnocent Ligands. *Inorg Chem* **2018**, *57* (4), 1824-1839.

82. Leon, I. E.; Diez, P.; Baran, E. J.; Etcheverry, S. B.; Fuentes, M., Decoding the anticancer activity of VO-clioquinol compound: the mechanism of action and cell death pathways in human osteosarcoma cells. *Metallomics* **2017**, *9* (7), 891-901.
83. Ribeiro, N.; Bulut, I.; Pósa, V.; Sergi, B.; Sciortino, G.; Pessoa, J. C.; Maia, L. B.; Ugone, V.; Garribba, E.; Enyedy, É. A.; Acilan, C.; Correia, I., Solution chemical properties and anticancer potential of 8-hydroxyquinoline hydrazones and their oxidovanadium(IV) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2022**.
84. Rivas, F.; Medeiros, A.; Quiroga, C.; Benitez, D.; Comini, M.; Rodriguez-Arce, E.; Machado, I.; Cerecetto, H.; Gambino, D., New Pd-Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt-Fe analogues. *Dalton Trans* **2021**, *50* (5), 1651-1665.
85. Mracek, J.; Snyder, S. J.; Chavez, U. B.; Turrens, J. F., A soluble fumarate reductase in *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. *J Protozool* **1991**, *38* (6), 554-558.
86. Turrens, J. F.; Newton, C. L.; Zhong, L.; Hernandez, R.; Whitfield, J.; Docampo, R., Mercaptopyridine-N-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol Let* **1999** *175* 217-221.
87. Besteiro, S.; Biran, M.; Biteau, N.; Coustou, V.; Baltz, T.; Canioni, P.; Bringaud, F., Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *J Biol Chem* **2002**, *277* (41), 38001-12.
88. Coustou, V.; Besteiro, S.; Riviere, L.; Biran, M.; Biteau, N.; Franconi, J. M.; Boshart, M.; Baltz, T.; Bringaud, F., A mitochondrial NADH-dependent

- fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **2005**, *280* (17), 16559-70.
89. Michels, P. A.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V., Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1763* (12), 1463-77.
90. Opperdoes, F. R.; Markoš, A.; Steiger, R. F., 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* **1981**, *4*, 291-309.
91. Lohmeier, E.; Hagen, B. S.; Dickie, P.; Weinew, J. H., Cloning and expression of the fummate reductase gene of *Escherichia Coli*. *Can J Biochem* **1981**, *59*, 158-164.
92. Miura, A.; Kameya, M.; Arai, H.; Ishii, M.; Igarashi, Y., A soluble NADH-dependent fumarate reductase in the reductive tricarboxylic acid cycle of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *J Bacteriol* **2008**, *190* (21), 7170-7.
93. Turrens, J. F., The enzyme NADH-fumarate reductase in trypanosomatids: a potential target against parasitic diseases. *Mol Cell Pharmacol* **2012**, *4*, 117-122.
94. Boveris, A.; Hertig, C. M.; Turrens, J. F., Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **1986**, *19*, 163-169.
95. Denicola-Seoane, A.; Rubbo, H.; Prodanov, E.; Turrens, J. F., Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **1992**, *54*, 43-50.
96. Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchan, E.; Gomez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2009**, *103* (10), 1300-6.
97. Vieites, M.; Smircich, P.; Parajón-Costa, B.; Rodríguez, J.; Galaz, V.; Olea-Azar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gomez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2008**, *13* (5), 723-35.
98. Parajón-Costa, B. S.; González-Baró, A. C.; Baran, E. J., Electrochemical and spectroscopic behaviour of bis(2-mercaptopyridine-N-oxide)oxovanadium(IV). *Z Anorg Allg Chem* **2002**, *628*, 1419-1424.
99. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., Effect of a new anti-*T. cruzi* metallic compound based on palladium. *Biometals* **2018**, *31* (6), 961-974.
100. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Tissot, F.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., *Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound. *Chem Biol Drug Des* **2018**, *92* (3), 1657-1669.
101. Machado, I.; Marino, L. B.; Demoro, B.; Echeverria, G. A.; Piro, O. E.; Leite, C. Q.; Pavan, F. R.; Gambino, D., 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* **2014**, *87*, 267-73.
102. Noblía, P.; Baran, Enrique J.; Otero, L.; Draper, P.; Cerecetto, H.; González, M.; Piro, Oscar E.; Castellano, Eduardo E.; Inohara, T.; Adachi, Y.; Sakurai, H.; Gambino, D., New vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives: Synthesis, characterization, and in vitro insulin-mimetic activity- crystal structure of [V(V)O₂(salicylaldehyde semicarbazone)]. *Eur J Inorg Chem* **2004**, *2004* (2), 322-328.

103. Noblia, P.; Vieites, M.; Parajon-Costa, B. S.; Baran, E. J.; Cerecetto, H.; Draper, P.; Gonzalez, M.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Monge-Vega, A.; Gambino, D., Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [V(V)O₂(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. *J Inorg Biochem* **2005**, *99* (2), 443-51.
104. Bernardes-Genisson, V.; Deraeve, C.; Chollet, A.; Bernadou, J.; Pratviel, G., Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. *J Current medicinal chemistry* **2013**, *20* (35), 4370-4385.
105. Poggi, M.; Barroso, R. P.; Costa-Filho, A. J.; Barros, H. B. d.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Gambino, D.; Torre, M. H., New isoniazid complexes, promising agents against Mycobacterium tuberculosis. *J Mex Chem Soc* **2013**, *57* (3), 198-204.
106. Oliveira, J. S.; Sousa, E. H.; Basso, L. A.; Palaci, M.; Dietze, R.; Santos, D. S.; Moreira, Í. S. J. C. c., An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis. **2004**, (3), 312-313.
107. Sousa, E. H.; Pontes, D. L.; Diogenes, I. C.; Lopes, L. G.; Oliveira, J. S.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Moreira, Í. S. J. J. o. i. b., Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate (III)/(II) complexes: a model system for the in vitro activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. **2005**, *99* (2), 368-375.
108. Sah, P. P.; Peoples, S. A., Isonicotinyl hydrazones as antitubercular agents and derivatives for identification of aldehydes and ketones. *J Am Pharm Assoc* **1954**, *43* (9), 513-524.
109. Sravya, S.; Sruthy, S.; Aiswarya, N.; Sithambaresan, M.; Kurup, M. R., Crystal structure of (E)-N'-(5-bromo-2-hydroxy-benzyl-

- idene)nicotinohydrazide monohydrate. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun* **2015**, 71 (Pt 7), 734-6.
110. Richardson, D., Cytotoxic analogs of the iron (III) chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone: Effects of complexation with copper (II), gallium (III), and iron (III) on their antiproliferative activities. *J Antimicrobial agents chemotherapy* **1997**, 41 (9), 2061-2063.
111. Richardson, D. R.; Bernhardt, P. V., Crystal and molecular structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone (NIH) and its iron (III) complex: an iron chelator with anti-tumour activity. *J Biol Inorg Chem* **1999**, 4 (3), 266-273.
112. Li, Y.; Bian, H.; Song, H.; Wang, H., Synthesis and crystal structure of a vanadium (V) complex with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Chin J Struct Chem* **2007**, 26 (1), 37-40.
113. Kurbah, S. D.; Asthana, M.; Syiemlieh, I.; Lywait, A. A.; Longchar, M.; Lal, R. A., New dioxido-vanadium(V) complexes containing hydrazone ligands: Syntheses, crystal structure and their catalytic application toward C H bond functionalization. *Journal of Organometallic Chemistry* **2018**, 876, 10-16.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Contenido

3.1 SÍNTESIS.....	153
3.1.1 Reactivos químicos	153
3.1.2 Síntesis de los ligandos tridentados	153
3.1.2.1 Síntesis de los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído, LS1-LS4.....	153
3.1.2.2 Síntesis de los ligandos tridentados derivados de la isoniazida, IN y BrIS	154
3.1.3 Síntesis de los compuestos de coordinación de dioxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído.....	156
3.1.3.1 Síntesis de los compuestos $[V^VO_2(LS-H)]$, LS = LS1, LS2 y LS4	156
3.1.3.2 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$	157
3.1.4 Síntesis de los compuestos de coordinación de dioxovanadio (V) con hidrazonas derivadas de la isoniazida.....	158
3.1.4.1 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(IN-H)] \cdot THF$	158
3.1.4.2 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(BrIS-H)] \cdot DMF$	158
3.1.5 Síntesis de los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina	158
3.1.5.1 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L0-H)_2]$	159
3.1.5.2 Síntesis de los compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, L = L1-L4 .	160
3.1.5.3 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L5-H)_2]$	162
3.1.6 Síntesis de los compuestos homolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina.....	162
3.1.6.1 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L0-H)_2(OCH_3)]$	162
3.1.6.2 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L-H)_2(OCH_3)]$, L = L1-L4	162
3.1.6.3 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L5-H)_2(OCH_3)]$	163

3.1.7 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído [V ^{VO} (LS-2H)(L0-H)], LS =LS1-LS4	163
3.1.7.1 Método 1, obtención de [V ^{VO} (LS-2H)(L0-H)], LS = LS1-LS4	163
3.1.7.2 Método 2, obtención de [V ^{VO} (LS4-2H)(L0-H)]	164
3.1.8 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con hidrazidas derivadas de la isoniazida	165
3.1.8.1 Síntesis de los compuestos [V ^{VO} (IN-2H)(L-H)], L = L0-L4	165
3.1.8.2 Síntesis de los compuestos [V ^{VO} (BrIS-2H)(L-H)], L=L0-L4	166
3.1.9 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) [V ^{IVO} (L-H)(mpo)], L = L0-L4	167
3.2 CARACTERIZACIÓN	168
3.2.1 Caracterización en estado sólido.....	168
3.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos.....	168
3.2.1.2 Análisis termogravimétrico	169
3.2.1.3 Espectroscopía infrarroja	169
3.2.1.4 Susceptibilidad magnética	170
3.2.1.5 Difracción de rayos X en monocristal.....	171
3.2.2 Caracterización en disolución	173
3.2.2.1 Conductimetría.....	173
3.2.2.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	174
3.2.2.3 Resonancia magnética nuclear	177
3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	179
3.3.1 Soluciones.....	179
3.3.2 Medios de cultivo.....	179
3.3.2.1 Medio de cultivo BHI-Triptosa	179
3.3.2.2 Medio de cultivo RPMI.....	180
3.3.3 Cultivos	180
3.3.3.1 Epimastigotas de Trypanosoma cruzi.....	180
3.3.3.2 Células VERO.....	181
3.3.3.3 Infecciones de Trypanosoma cruzi en células VERO.....	181
3.3.3.4 Tripomastigotas de Trypanosoma cruzi	182

3.3.3.5	Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	182
3.3.4	Soluciones de los compuestos a evaluar.....	182
3.3.5	Parámetros utilizados para determinar la potencialidad de los compuestos como agentes antiparasitarios.....	183
3.3.6	Actividad <i>in vitro</i> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania infantum</i>	185
3.3.6.1	Actividad en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> y promastigotas de <i>L. infantum</i> a 5 días.....	185
3.3.6.2	Actividad en epimastigotas y tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> a 24 horas	186
3.3.7	Citotoxicidad inespecífica <i>in vitro</i> sobre células mamíferas modelo.....	188
3.3.7.1	Citotoxicidad en células VERO (ATCC CCL81).....	188
3.3.8	Ensayos sobre infecciones de <i>T. cruzi</i>	190
3.3.8.1	Efectos sobre el proceso de infección	190
3.3.8.2	Efectos sobre la replicación de amastigotas intracelulares.....	192
3.3.9	Análisis de cambios morfológicos por microscopía confocal.....	192
3.3.10	Toxicidad sobre modelos <i>in vivo</i>	193
3.3.10.1	Toxicidad <i>in vivo</i> en larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	193
3.3.10.2	Toxicidad <i>in vivo</i> en <i>Caenorhabditis elegans</i>	194
3.4	PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE INTERÉS BIOLÓGICO.....	196
3.4.1	Estabilidad de los compuestos.....	196
3.4.1.1	Estudio de estabilidad por HPLC	196
3.4.2	Lipofilia	197
3.4.3	Interacción con seroalbúmina bovina y apo-transferrina humana.....	198
3.4.3.1	Dicroísmo circular	199
3.4.3.2	Experimentos de fluorescencia.....	199
3.5	METALÓMICA Y MECANISMO DE ACCIÓN EN <i>T. CRUZI</i>	200
3.5.1	Interacción con ADN	200
3.5.2	Metalómica.....	202
3.5.2.1	Ingreso total.....	202
3.5.2.2	Distribución subcelular	203
3.5.3	Ensayos de recuperación de los parásitos	205

3.5.4 Tipo de muerte celular	206
3.5.4.2 Tinción con Anexina V y yoduro de propidio	207
3.5.4.3 Expresión de ATG7 y ATG8	208
3.5.4.3.1 Extracción de ARN.....	209
3.5.4.3.2 Síntesis de ADN copia	210
3.5.4.3.3 PCR en tiempo real.....	210
3.5.5 Producción de especies reactivas del oxígeno	211
3.5.6 Potencial de membrana mitocondrial	212
3.5.7 Efectos sobre la enzima fumarato reductasa NADH dependiente.....	213
3.5.7.1 Actividad enzimática	213
3.5.7.2 Viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan FRD	214
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	215

3.1 SÍNTESIS

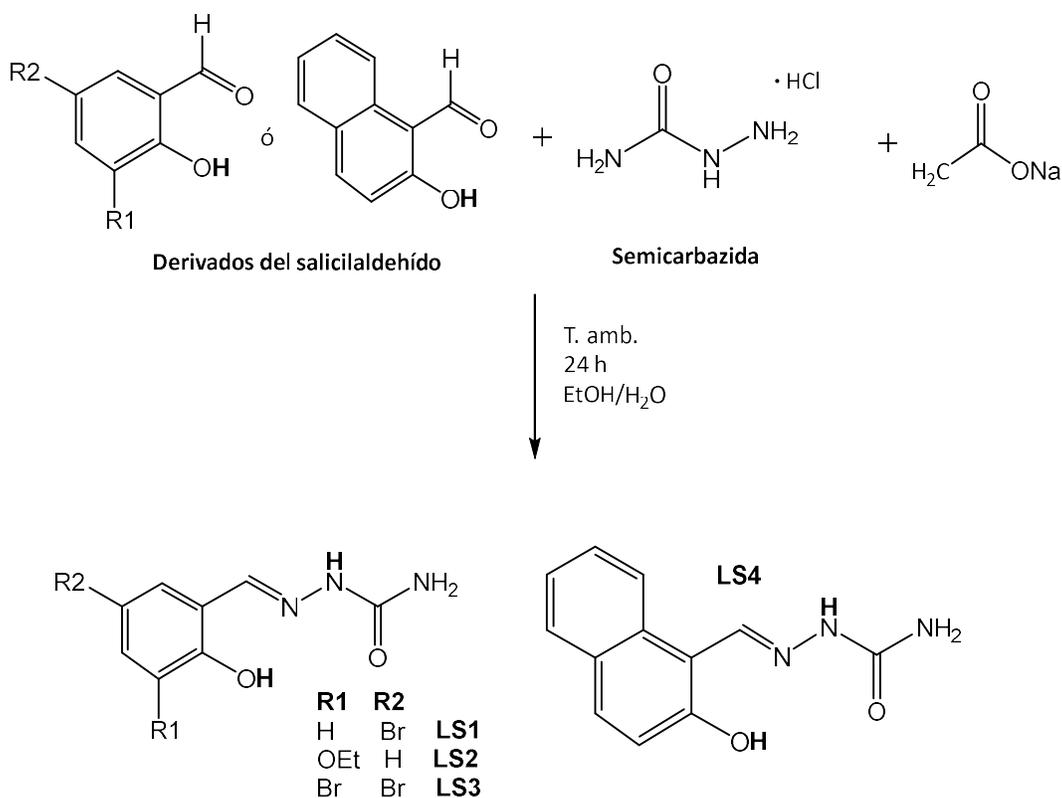
3.1.1 Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en fuentes comerciales y utilizados sin purificación adicional. Los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, la isoniazida, el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina, los derivados del salicilaldehído, la semicarbazida y los precursores de vanadio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El tetrahidrofurano (THF) utilizado en las reacciones de síntesis fue mantenido seco con tamices moleculares (Sigma Aldrich).

3.1.2 Síntesis de los ligandos tridentados

3.1.2.1 Síntesis de los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído, LS1-LS4

La síntesis de los ligandos derivados de la semicarbazona de salicilaldehído, LS1-LS4, (Figura 3.1) se realizó siguiendo un procedimiento experimental previamente descrito, haciendo reaccionar cantidades equimolares de semicarbazida con el correspondiente aldehído¹⁻⁷. Se disolvieron 190 mg (1,7 mmol) de clorhidrato de semicarbazida y 290 mg (3,5 mmol) de acetato de sodio en 7 mL de H₂O destilada. Se agregaron gota a gota a la disolución anterior 2,5 mmol de 5-bromo salicilaldehído (503 mg), 3-etoxisalicilaldehído (415 mg), 3,5-dibromosalicilaldehído (700 mg) o 2-hidroxinaftaldehído (430 mg) disueltos en 5 mL de EtOH absoluto. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Transcurrido el tiempo, el sólido obtenido se filtró y se lavó tres veces con agua helada, tres veces con EtOH frío y se secó con éter dietílico.



Ligandos tridentados derivados del salicilaldehído semicarbazona

Figura 3.1. Esquema de síntesis de los ligandos tridentados derivados de la la semicarbazona de salicilaldehído sintetizados para incluir en los compuestos heterolépticos a desarrollar. **LS1**, 5-bromo salicilaldehído semicarbazona; **LS2**, 3-etoxi salicilaldehído semicarbazona; **LS3**, 3,5-dibromo salicilaldehído semicarbazona; **LS4**, 2-hidroxinaftalen-1-carboxaldehído semicarbazona.

3.1.2.2 Síntesis de los ligandos tridentados derivados de la isoniazida, IN y BrIS

Los ligandos tridentados derivados de la isoniazida, IN y BrIS (Figura 3.2) fueron obtenidos por dos métodos: síntesis convencional y síntesis en reactor de alto rendimiento.

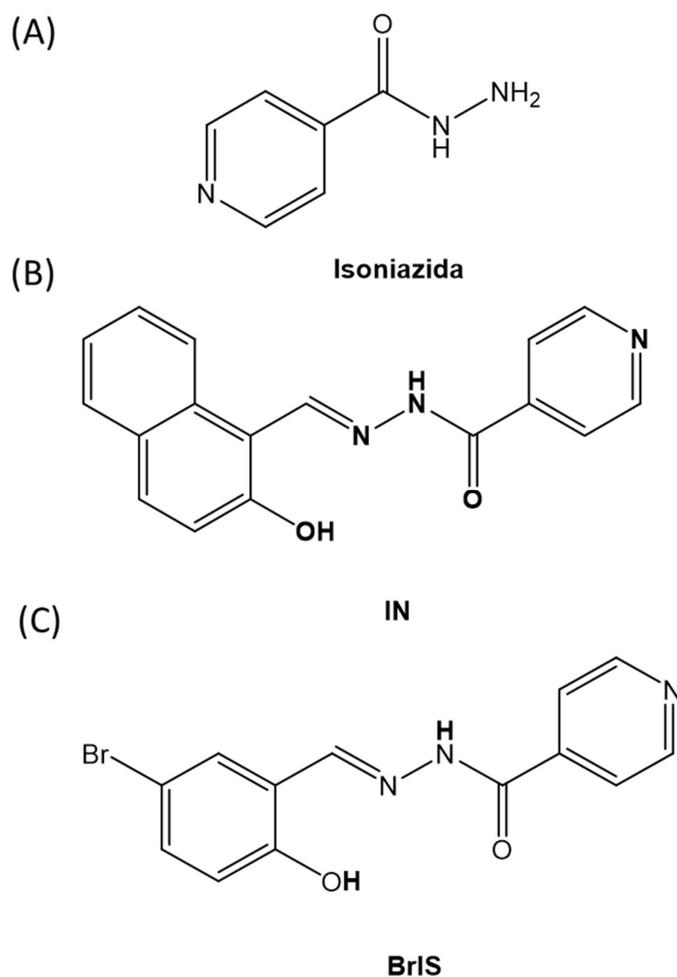


Figura 3.2. Ligandos tridentados derivados de la isoniazida. (A) **Isoniazida** (B) **IN**: 2-*N*²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído; (C) **BrIS**: *N*²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 5-bromosalicilaldehído.

Síntesis convencional

Para el caso de IN, se disolvieron 6,0 mmol de isoniazida (822 mg) en 10 mL de metanol (MeOH) y se agregó gota a gota una disolución de 6,6 mmol de 2-hidroxinaftaldehído (1135 mg) disueltos en 10 mL de MeOH. La mezcla se calentó a reflujo por 4 h. El sólido amarillo obtenido se separó por centrifugación y se recristalizó de etanol (EtOH) ⁸. Para obtener el ligando BrIS, se siguió un procedimiento similar, disolviendo 3,0 mmol de isoniazida (411 mg) en 5 mL de EtOH y se agregó gota a gota una disolución de 3,3 mmol de 5-

bromosalicilaldehído (663 mg) disueltos en 5 mL de EtOH. La mezcla se calentó a reflujo por 4 horas y el sólido blanco-amarillento obtenido se recrystalizó de EtOH.

Síntesis en reactor de alto rendimiento

Se disolvieron 206 mg de isoniazida (2,0 mmol) y 378 mg de 2-hidroxinaftaldehído o 442 mg de 5-bromosalicilaldehído (2,2 mmol) en 5 mL de MeOH. La mezcla se calentó 7 minutos a 110 °C en un reactor de alto rendimiento de calentamiento convencional Monowave 50 Anton Paar. La presión del sistema no superó los 50 bar. El sólido obtenido se filtró por papel plegado, se lavó con 3 porciones de EtOH y se secó con éter dietílico.

3.1.3 Síntesis de los compuestos de coordinación de dioxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído

3.1.3.1 Síntesis de los compuestos $[V^VO_2(LS-H)]$, LS = LS1, LS2 y LS4

Los compuestos homoléticos de dioxovanadio (V) con los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído $[V^VO_2(LS1-H)]$, $[V^VO_2(LS2-H)]$ y $[V^VO_2(LS4-H)]$, fueron sintetizados y caracterizados según procedimientos previamente reportados^{3,4}.

Para el caso de los compuestos $[V^VO_2(LS1-H)]$ y $[V^VO_2(LS4-H)]$, se disolvieron 0,375 mmol del precursor $[V^{IV}O(acac)_2]$ (100mg, acac = acetilacetato) y 0,375 mmol del ligando tridentado LS (LS1, 5-bromo salicilaldehído semicarbazona, 96 mg; LS4, 2-hidroxinaftalen-1-carboxaldehído semicarbazona, 86 mg) en 10 mL de EtOH absoluto. La mezcla se calentó a reflujo por 20 h. Los sólidos amarillentos se separaron por centrifugación y se recrystalizaron de MeOH³.

Por su parte, el compuesto $[V^VO_2(LS2-H)]$ se sintetizó disolviendo 0,375 mmol del precursor $[V^{IV}O(acac)_2]$ (100mg) y 0,375 mmol del ligando tridentado LS2 (72 mg) en 10 mL de EtOH y la mezcla se llevó a reflujo por 24 horas. Luego de transcurrido este tiempo, la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente por 5 días. El sólido verde obtenido fue recrystalizado de EtOH absoluto (Figura 3.3) ⁴.

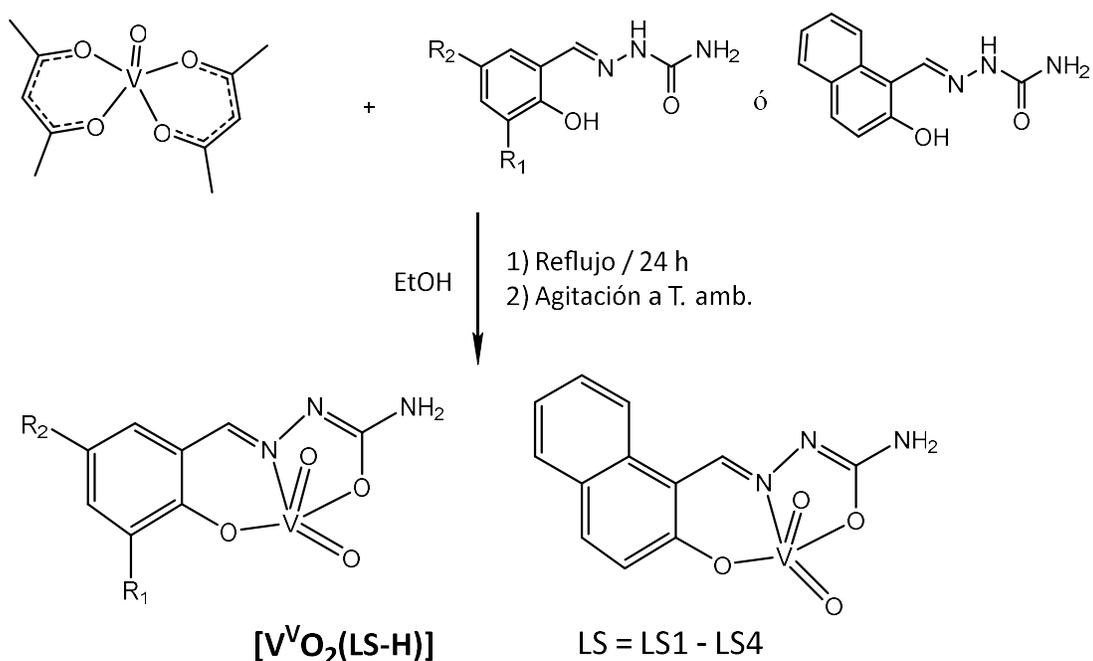


Figura 3.3. Esquema general de obtención de $[V^VO_2(LS-2H)]$, LS = LS1-LS4

3.1.3.2 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$

El nuevo compuesto $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$, donde LS3 = 3,5-dibromosalicilaldehído semicarbazona, se sintetizó adaptando el mismo procedimiento detallado en la sección 3.1.3.1 (Figura 3.3) ⁶. Se disolvieron 0,375 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (100 mg) y 0,375 mmol del ligando tridentado LS3 (126 mg) en 10 mL de EtOH y la mezcla se llevó a reflujo por 24 horas. El sólido amarillo obtenido fue separado por centrifugación y recrystalizado de EtOH a

ebullición. Se obtuvieron monocristales adecuados de $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$ para difracción de rayos X por evaporación lenta de EtOH a temperatura ambiente.

3.1.4 Síntesis de los compuestos de coordinación de dioxovanadio (V) con hidrazonas derivadas de la isoniazida

3.1.4.1 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(IN-H)] \cdot THF$

El complejo $[V^VO_2(IN-H)] \cdot THF$, donde IN = N²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído, fue sintetizado disolviendo 0,19 mmol del ligando IN (55 mg) en 3 mL de THF caliente y agregando gota a gota una disolución de 0,19 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (51 mg) disueltos en 3 mL de THF. La mezcla se llevó a reflujo por 2 horas y luego se agitó a temperatura ambiente por 4 días abierto al ambiente. Luego de transcurrido el tiempo, precipitó un sólido marrón que se filtró, se lavó 3 veces con THF y se secó a vacío ⁸.

3.1.4.2 Síntesis del compuesto $[V^VO_2(BrIS-H)] \cdot DMF$

El compuesto $[V^VO_2(BrIS-H)] \cdot DMF$, donde BrIS = N²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 5-bromosalicilaldehído fue sintetizado utilizando un procedimiento previamente descrito ⁹. Se disolvieron 0,19 mmol de BrIS (61 mg) en 3 mL de MeOH y se agregaron gota a gota 0,19 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (51 mg) disueltos en 3 mL de MeOH. La mezcla se calentó a reflujo por 2 horas y el sólido anaranjado obtenido se filtró y se lavó con MeOH. El sólido se purificó por difusión líquido-líquido de agua en DMF (2:3 v/v) durante 1 semana.

3.1.5 Síntesis de los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina

3.1.5.1 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L0-H)_2]$

El compuesto $[V^{IV}O(L0-H)_2]$, donde L = 8-hidroxiquinolina (Figura 3.4A), fue sintetizado adaptando la técnica descrita por Garriba y colaboradores ¹⁰. Trabajando en atmósfera inerte (N_2), se disolvieron 0,8 mmol de L0 (117 mg) en 50 mL de agua destilada y el pH se llevó a 2,0 con ácido sulfúrico. Una vez disuelto, se agregaron 0,4 mmol de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (107 mg). Se agregó gota a gota una disolución de NaOH 1 M hasta alcanzar un pH de 5,2. Luego de 5 minutos de agitación precipitó un sólido verde que se filtró en ausencia de oxígeno, se lavó con agua helada y se secó a vacío.

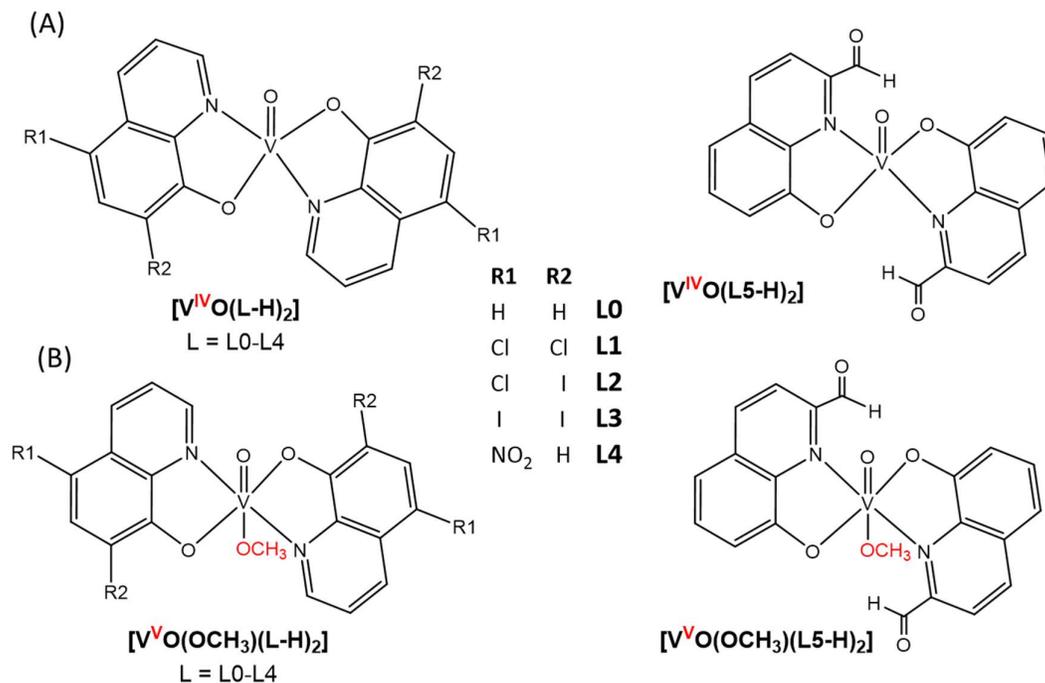


Figura 3.4. (A) Compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina; (B) Compuestos homolépticos de oxovanadio (V) análogos con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina.

3.1.5.2 Síntesis de los compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, $L = L1-L4$

Los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina sustituidos en las posiciones 5 y 7 (Figura 3.4A), fueron sintetizados por dos métodos. En primer lugar, se sintetizaron $[V^{IV}O(L1-H)_2]$, $[V^{IV}O(L2-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L3-H)_2]$ adaptando las síntesis previamente reportadas (*Método 1*)¹¹. Adicionalmente, los compuestos se sintetizaron con un método alternativo (*Método 2*), trabajando en volúmenes más pequeños y obteniendo mejores rendimientos¹². $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ se sintetizó utilizando el *Método 2*. A continuación, se describen en detalle ambos métodos.

Método 1

1. $[V^{IV}O(L1-H)_2]$

Trabajando en atmósfera inerte (N_2), se disolvieron 1,07 g de L1 (5,7-dicloro-8-hidroxiquinolina, 5 mmol) en 100 mL de una mezcla EtOH/DMF (3:1 v/v) a 60 °C. Se agregaron gota a gota sobre la disolución del ligando 635 mg de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (2,5 mmol) disueltos en 15 mL de agua destilada. Inmediatamente se formó un precipitado marrón-rojizo, que se filtró, se lavó con 5 porciones de 20 mL de EtOH caliente y se secó a vacío por una semana.

2. $[V^{IV}O(L2-H)_2]$

Trabajando en atmósfera inerte (N_2), se disolvieron 610 mg de L2 (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina, 1,5 mmol) en 150 mL de EtOH caliente. Se agregaron gota a gota sobre la disolución del ligando 250 mg de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mmol) disueltos en 10 mL de EtOH. Inmediatamente se formó un precipitado marrón-

rojizo, que se filtró, se lavó con 5 porciones de 20 mL de EtOH caliente y se secó a vacío por una semana.

3. $[V^{IV}O(L3-H)_2]$

Trabajando en atmósfera inerte (N_2), se disolvieron 250 mg de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,75 mmol) en 25 mL de EtOH. Se agregaron gota a gota sobre la disolución de la sal metálica 800 mg de L3 (5,7-diiodo-8-hidroxiquinolina, 1,6 mmol) disueltos en 70 mL de una mezcla de acetona/DMF (3:2 v/v) a 60°C. Inmediatamente se formó un precipitado amarillo, que se filtró, se lavó con 5 porciones de 20 mL de EtOH caliente y se secó a vacío por una semana.

Método 2

Los cuatro complejos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, L = L1-L4, fueron sintetizados, por un nuevo método, por sustitución de ligandos en la esfera de coordinación del centro de vanadilo ($V^{IV}O^{2+}$), en condiciones de atmósfera inerte (N_2), según el procedimiento siguiente. Se suspendieron 0,5 mmol de L (107 mg de L1; 153 mg de L2; 199 mg de L3; 95 mg de L4) en 7,5 mL de MeOH caliente. Se agregó lentamente gota a gota y con agitación constante 0,25 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (67 mg) disueltos en 7,5 mL de MeOH. La disolución se tornó marrón inmediatamente y la mezcla fue calentada a reflujo por 4 horas. Transcurrido el tiempo, el sólido marrón-rojizo (complejos conteniendo los ligandos L1 y L2) o amarillos (complejos conteniendo los ligandos L3 y L4) se filtraron y lavaron 3 veces con 1 mL de MeOH caliente. Los sólidos fueron finalmente secados a vacío

12.

3.1.5.3 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L5-H)_2]$

El nuevo compuesto de coordinación $[V^{IV}O(L5-H)_2]$ fue sintetizado utilizando el procedimiento detallado a continuación. Se disolvió el ligando L5 (8-hidroxiquinolina-2-carboxaldehído, 0,5 mmol, 86 mg) en 2 mL de EtOH y se le agregó gota a gota una disolución de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,25 mmol, 63 mg) disuelto en 1 mL de agua destilada. La disolución límpida se agitó por 15 minutos hasta que precipitó un sólido marrón que se filtró, se lavó con 3 porciones de 1 mL de EtOH y se secó con dietiléter ¹².

3.1.6 Síntesis de los compuestos homolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina

3.1.6.1 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L0-H)_2(OCH_3)]$

El compuesto $[V^VO(L0-H)_2(OCH_3)]$ (Figura 3.4B) fue sintetizado adaptando el procedimiento de síntesis previamente reportado por Correia *et al* ¹³. Se suspendieron 0,25 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (63 mg) y 0,5 mmol de L0 (8-hidroxiquinolina, 73 mg) en 15 mL de MeOH y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4 horas. El sólido negro obtenido se separó de la disolución rojo-intensa obtenida por filtración y se lavó con tres porciones de 2 mL de MeOH ¹².

3.1.6.2 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L-H)_2(OCH_3)]$, L = L1-L4

Los compuestos $[V^VO(OCH_3)(L-H)_2]$, donde L=L1-L4 (Figura 3.4B), fueron sintetizados y caracterizados según el procedimiento previamente reportado ¹⁴. Brevemente, se suspendieron 0,25 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (63 mg) en 5 mL de MeOH caliente y la disolución se agregó sobre una disolución de 0,5 mmol del ligando L (107 mg de L1; 153 mg de L2; 199 mg de L3; 95 mg de L4) disuelto en

7,5 mL de ácido acético glacial. La disolución se mantuvo a reflujo por 2 horas y se dejó cristalizar, obteniéndose sólidos violeta oscuros (L1, L2 y L3) y rojo oscuro luego de una semana. Los sólidos se separaron y se lavaron con MeOH.

3.1.6.3 Síntesis del compuesto homoléptico $[V^VO(L5-H)_2(OCH_3)]$

El nuevo compuesto $[V^VO(L5-H)_2(OCH_3)]$ fue sintetizado por modificación del procedimiento detallado en la *sección 3.1.5.2*. Se disolvieron 0,5 mmol de L5 (86 mg) en 1 mL de MeOH y se agregó gota a gota 0,25 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (63 mg) suspendidos en 1 mL de MeOH. La mezcla se mantuvo a reflujo por 15 minutos y se dejó agitando a temperatura ambiente 5 días permitiendo que la disolución entre en contacto con el aire. Se filtró el sólido oscuro obtenido, se lavó con tres porciones de 1 mL de MeOH y se secó a vacío por una semana ¹².

3.1.7 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$, LS =LS1-LS4

3.1.7.1 Método 1, obtención de $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$, LS = LS1-LS4

Los cuatro nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (ligandos LS) y 8-hidroxiquinolina (L0) fueron sintetizados utilizando el *Método 1* (Figura 3.5). Se suspendieron 0,25 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (63 mg) y 0,25 mmol de LS (65 mg de LS1, 5-bromosalicilaldehído semicarbazona; 48 mg de LS2, 3-etoxisalicilaldehído semicarbazona; 84 mg de LS3, 3,5-dibromosalicilaldehído semicarbazona; 57 mg de LS4, 2-hidroxinaftaldehído semicarbazona) en 8 mL de THF caliente. Se añadió lentamente y con agitación una disolución de 0,25 mmol

de L0 en 2 mL de THF caliente. La mezcla se tornó rojo intenso inmediatamente y se calentó a reflujo por 8 h ($[V^VO(LS1-2H)(L0-H)]$ y $[V^VO(LS2-2H)(L0-H)]$) o 4 h ($[V^VO(LS3-2H)(L0-H)]$ y $[V^VO(LS4-2H)(L0-H)]$) hasta que se obtuvo una disolución límpida violeta oscuro. El solvente se evaporó a presión reducida hasta alcanzar 2 mL. El sólido azul púrpura formado se separó por centrifugación, se lavó tres veces con 0,5 mL de THF y se secó a vacío por 24 horas⁶.

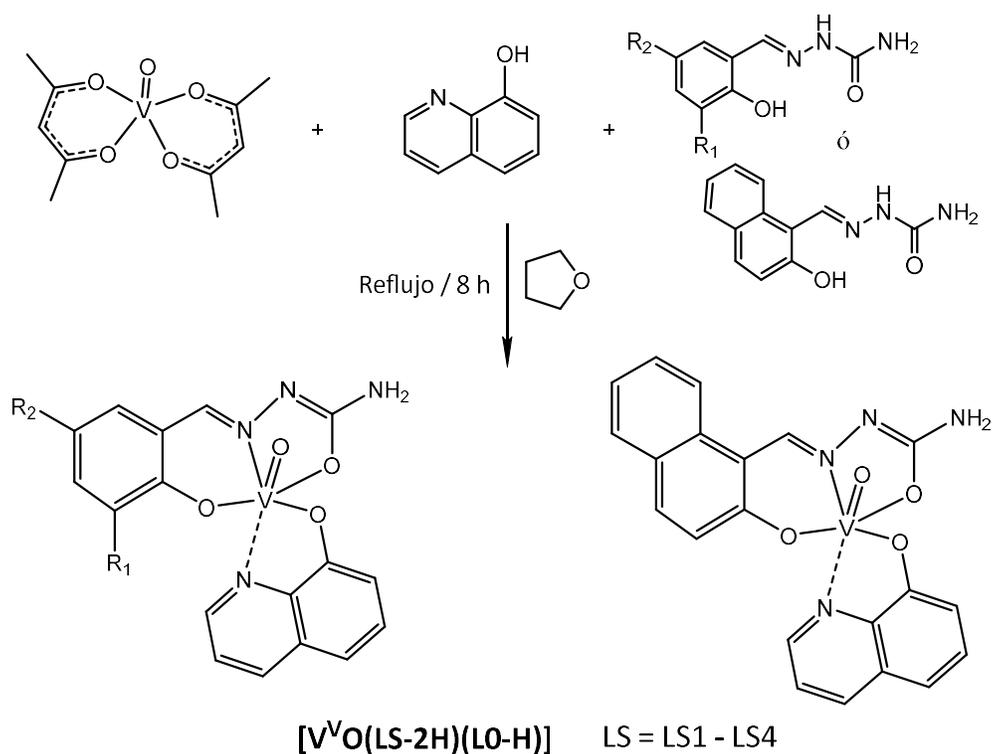


Figura 3.5. Esquema de obtención de $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$, LS=LS1-LS4 por el *Método 1*.

3.1.7.2 Método 2, obtención de $[V^VO(LS4-2H)(L0-H)]$

Dado que el rendimiento de $[V^VO(LS4-2H)(L0-H)]$ por el *Método 1* fue demasiado bajo, éste se sintetizó además utilizando el *Método 2*, partiendo de un precursor de vanadio (V) tal como se detalla a continuación.

Se disolvieron 0,375 mmol de LS4 (86 mg) y L0 (55 mg) en 13 mL de MeOH y se agregó a la disolución anterior la cantidad equimolar de NH_4VO_3 (45 mg). La

disolución rojo tenue, con metavanadato de amonio sin disolver completamente, se calentó a reflujo por 24 horas. El color se fue intensificando a lo largo del tiempo, obteniéndose luego de cumplido el tiempo una disolución violeta límpida. La disolución se evaporó a vacío en evaporador rotatorio hasta sequedad y se retomó con 3 mL de MeOH. La disolución se dejó evaporar lentamente y se obtuvo un sólido cristalino azul púrpura que se filtró y se lavó con 3 porciones de 1 mL de MeOH. El sólido fue secado a vacío por 24 h ⁶.

3.1.8 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con hidrazidas derivadas de la isoniazida

3.1.8.1 Síntesis de los compuestos $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$, $L = L0-L4$

Los nuevos compuestos $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$, donde $L = L0-L4$ (Figura 3.6), fueron sintetizados según el siguiente procedimiento. Se suspendieron 0,19 mmol de L (28 mg de L0, 40 mg de L1, 57 mg de L2, 74 mg de L3, 36 mg de L4), 0,19 mmol de IN (55 mg) y 0,19 mmol de $[V^{IV}O(acac)_2]$ (50 mg) en 5 mL de tetrahidrofurano (THF). Inmediatamente la suspensión se oscureció, dando un color marrón oscuro. La mezcla se calentó a reflujo por 4 horas. La disolución oscura obtenida se dejó enfriar y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas (complejos con L2 y L3) o 5 días (complejos con L0, L1 y L4) expuesta al oxígeno del ambiente. Se obtuvo un sólido negro-violáceo que se filtró, se lavó con tres porciones de 0,5 mL de THF y se secó a vacío. Se obtuvieron monocristales adecuados para difracción de rayos X del complejo $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ por evaporación lenta de una disolución de THF a temperatura ambiente ⁸.

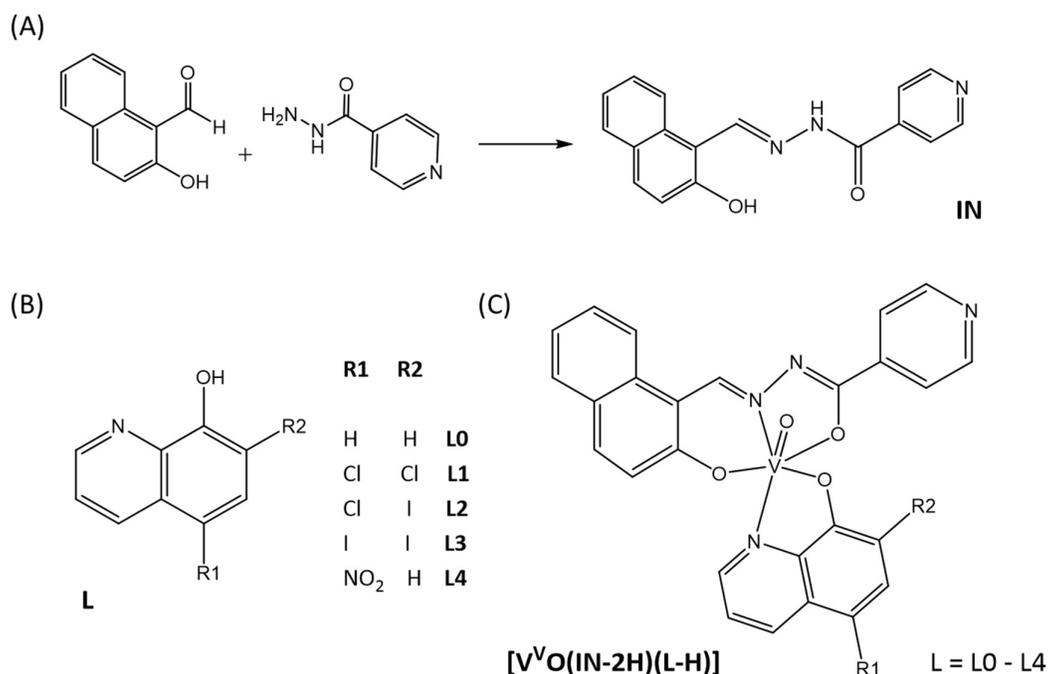


Figura 3.6. (A) Esquema de síntesis del ligando IN; (B) estructura de los derivados de la 8-hidroxiquinolina incluidos en los complejos [V^VO(IN-2H)(L-H)]; (C) Estructura molecular de los nuevos compuestos [V^VO(IN-2H)(L-H)].

3.1.8.2 Síntesis de los compuestos [V^VO(BrIS-2H)(L-H)], L=L0-L4

Los nuevos compuestos [V^VO(BrIS-2H)(L-H)], donde L=L0-L4 (Figura 3.7), fueron sintetizados utilizando un procedimiento similar al descrito para los complejos análogos [V^VO(IN-2H)(L-H)]. En detalle, se suspendieron 0,19 mmol de L (28 mg de L0, 40 mg de L1, 57 mg de L2, 74 mg de L3, 36 mg de L4), 0,19 mmol de BrIS (61 mg) y 0,19 mmol de [V^{IV}O(acac)₂] (50 mg) en 5 mL de tetrahidrofurano (THF). Inmediatamente la suspensión se oscureció, dando un color marrón oscuro. La mezcla se calienta a reflujo por 4 horas. La disolución oscura obtenida se deja enfriar y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas expuesta al oxígeno del ambiente. Todos los complejos se purificaron por difusión líquido-líquido CH₂Cl₂: hexano (3:2 v/v). Por este método se obtuvieron

monocristales adecuados para difracción de rayos X de los complejos $[V^{VO}(BrIS-2H)(L1-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]$.

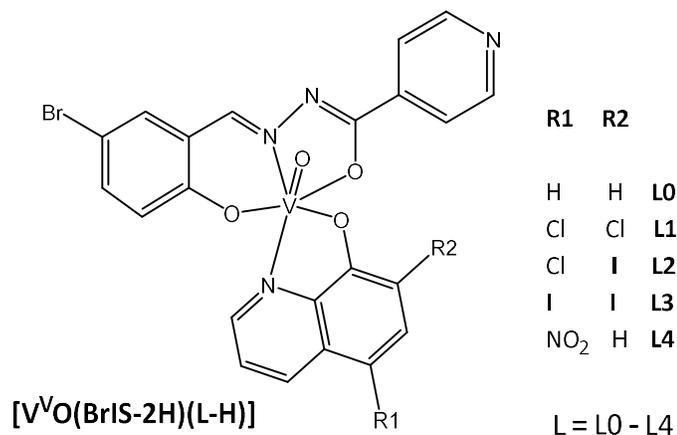


Figura 3.7. Estructura molecular de los nuevos compuestos $[V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]$, donde L = L0-L4.

3.1.9 Síntesis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, L = L0-L4

Los nuevos compuestos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, donde L = L0-L4, fueron sintetizados según el siguiente procedimiento (Figura 3.8). Trabajando en atmósfera inerte (argón), se disolvieron 0,5 mmol de L (73 mg de L0; 107 mg de L1; 153 mg de L2; 199 mg de L3; 95 mg de L4) y 0,5 mmol de Na mpo en 6 mL de una disolución acuosa de NaOH 0,2 M. A la disolución marrón-verdosa anterior se le agregaron 0,5 mmol de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ disueltos en 3 mL de agua. Inmediatamente se forma una suspensión marrón. Se agitó a temperatura ambiente por una hora. El sólido se separó y se lavó con 5 porciones de 2 mL de agua, 2 porciones de 3 mL de EtOH y se secó en desecador a vacío durante una semana.

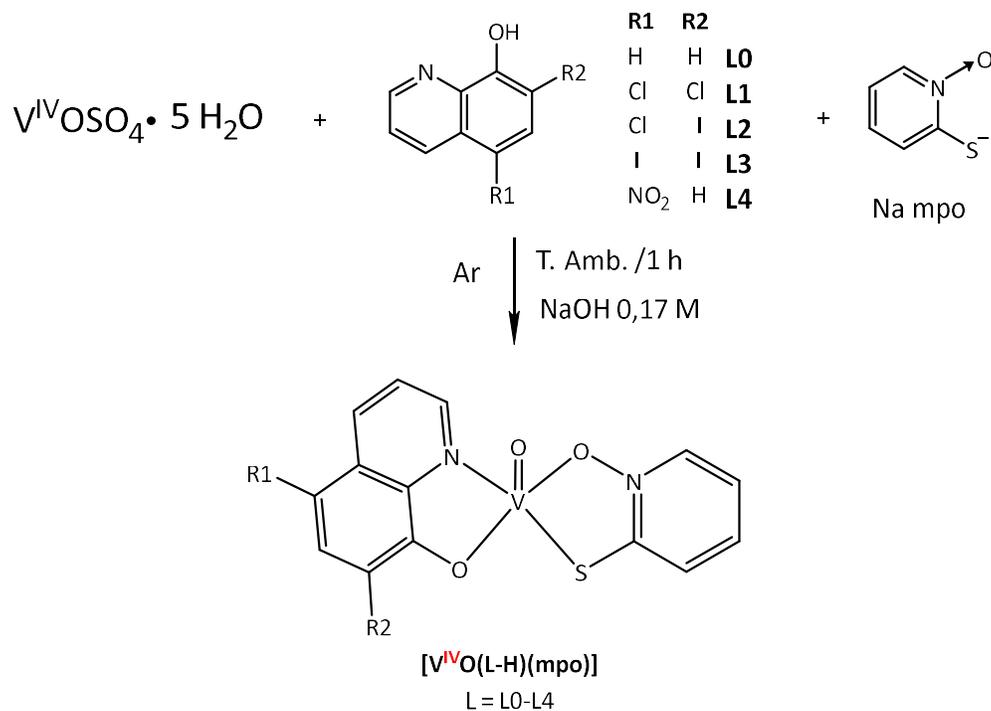


Figura 3.8. Esquema de obtención de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)], L = L0-L4.

3.2 CARACTERIZACIÓN

3.2.1 Caracterización en estado sólido

3.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos

Tanto los compuestos de coordinación como los ligandos sintetizados fueron analizados por análisis elemental de C, H, N 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 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) es un método de análisis térmico en el cual la masa de una muestra se mide a lo largo del tiempo a medida que aumenta la temperatura. Se realizaron análisis de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV), $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, como apoyo a la caracterización al estado sólido. Particularmente, se utilizó para determinar el número de moléculas de cristalización y el porcentaje de vanadio total. Los TGA fueron realizados con el apoyo del Dr. Jorge Castiglioni en el Área Físicoquímica/DETEMA de la Facultad de Química, UdelaR utilizando balanza térmica Shimadzu TGA 50 (Shimadzu, Kyoto, Japón), con una celda de platino, trabajando con un flujo de aire (50 mL/min) y utilizando un calentamiento de 0,5°C/min (de temperatura ambiente hasta 80°C), 1,0°C/min (de 80°C a 400°C) y 30°C/min (de 400°C a 700°C).

3.2.1.3 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis que permite identificar energías vibracionales de enlace de las moléculas estudiadas. Este tipo de espectroscopia vibracional es una de las primeras técnicas de caracterización que se utiliza cuando se estudia una nueva muestra en química inorgánica¹⁵. En esta tesis, los espectros de infrarrojo permitieron identificar la presencia de los ligandos coordinados al metal en los complejos sintetizados. En primer lugar, se identificaron y asignaron tentativamente las bandas de vibración características de cada ligando en los espectros de infrarrojos de éstos, y posteriormente se identificaron estas mismas en los espectros de los complejos sintetizados. Los cambios observados en las frecuencias de vibración de algunas de las bandas características asignadas, se relacionaron con los sitios y modos de coordinación de los átomos donores con el centro de vanadio. Los espectros de infrarrojo

fueron medidos al estado sólido en un rango entre 4000 y 400 cm^{-1} en pastillas de KBr (calidad IR, Sigma-Aldrich) utilizando un equipo Shimadzu IRPrestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japón) disponible en el Área Química Inorgánica de la Facultad de Química, UdelaR.

3.2.1.4 Susceptibilidad magnética

El ion vanadio (IV) tiene una configuración $[\text{Ar}]3d^1$, con solo un electrón d ocupando el término más bajo en energía. En los compuestos de coordinación, el término se dividirá por acoplamiento espín-órbita, dando lugar a dos niveles separados. Por su parte, el vanadio (V) presenta una configuración electrónica de capa llena $[\text{Ar}]$ sin electrones d fuera de la misma. Estas diferencias en la configuración electrónica han hecho al metal atractivo para su caracterización desde el punto de vista del estado de oxidación del átomo central, por medio de medidas magnéticas desde la década de los 60¹⁶. La susceptibilidad magnética (χ) indica la sensibilidad a la magnetización de un material influenciado por un campo magnético. Si la χ es positiva, este puede ser paramagnético, y un campo magnético que lo atravesase se verá favorecido por efecto de la magnetización inducida. Si χ es negativa, el material será diamagnético, debilitando el campo que lo atravesase.

La interacción internuclear puede llevar a situaciones más complejas de comportamiento magnético, tales como el ferromagnetismo y antiferromagnetismo. Para que exista, los átomos o iones metálicos deben estar o lo suficientemente cerca, o unidos a través de ligandos que permitan este tipo de interacción¹⁷.

Debido a las dificultades para la obtención de monocristales adecuados para difracción de rayos X de los complejos de la familia $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L}-\text{H})(\text{mpo})]$, se midió la susceptibilidad magnética en función de la temperatura con el fin de

caracterizar el estado de oxidación del átomo central y la nuclearidad de los compuestos al estado sólido.

La susceptibilidad magnética fue medida con el apoyo del Prof. Diego Venegas en la Universidad de Santiago de Chile utilizando un PPMS (de sus siglas en inglés, *Quantum Design Dynacool Physical Properties Measurement System*) equipado con un magnetómetro de vibración de muestra (VSM, de sus siglas en inglés *Vibrating Sample Magnetometer*)

3.2.1.5 Difracción de rayos X en monocristal

La difracción de rayos X de monocristal permite la determinación de la estructura cristalina, brindando información detallada de la disposición de los átomos en el sistema al estado sólido. La emisión de electrones de alta energía se efectúa en un cátodo e incide directamente sobre el ánodo metálico del equipo (de cobre o molibdeno), promoviendo electrones desde las capas más internas de los átomos metálicos. La vacante generada en la remoción de los electrones de la capa K, se llena con electrones ubicados en la capa L (línea K_{α}), liberando fotones de alta energía (rayos X). Según el ánodo utilizado, cada uno posee un espectro energético de rayos X característico, siendo para $MoK_{\alpha} = 0,7107 \text{ \AA}$ y para $CuK_{\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$.

Los rayos X pasan por la estructura periódica cristalizada (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. Cada muestra analizada comprende planos, con direcciones y espaciados que son características del monocristal. Conociendo los mismos a través del patrón y las intensidades de difracción, que están relacionadas con la naturaleza y la posición de los átomos en el cristal, es posible estudiar el sistema cristalino,

las dimensiones de la celda unitaria y la estructura tridimensional interna del cristal estudiado ¹⁸.

Por difracción de rayos X de monocristal se determinó la estructura cristalina del ligando libre IN y de los complejos $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$, $[V^VO(IN-2H)(L2-H)] \cdot THF$, , $[V^VO(BrIS-2H)(L1-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})0,5(CH_2Cl_2)$.

Para el complejo $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$ y el ligando libre IN, se obtuvieron monocristales amarillos adecuados para los estudios de difracción de rayos X por evaporación lenta de una disolución etanólica a temperatura ambiente. Para el complejo $[V^VO(IN-2H)(L2-H)] \cdot THF$, se obtuvieron monocristales color violeta por evaporación lenta de THF.

Para la primera de las estructuras, se contó con la tutoría del Prof. Leopoldo Suescun. Las medidas se realizaron en la Facultad de Química, UdelaR, en un difractor Bruker D8 Venture utilizando radiación $CuK\alpha$. 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 a través del programa SADABS V2014/2 (Bruker AXS Inc.), para la primera de las estructuras, y SADABS V2016/2 para IN y $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ ¹⁹. La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXT-2014 ^{20, 21} 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 ²² para la primera de las estructuras, y con SHELXL-2018/3 en la interfase SHELXle ²³. En el complejo $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$, las posiciones de los átomos de hidrógeno en la molécula de agua de cristalización no fueron encontradas. Los átomos de hidrógeno fueron posicionados en base estereoquímica y refinados con el modelo corriente.

Los cristales de $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L1}-\text{H})]\cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})]\cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})0,5(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$ fueron obtenidos por difusión líquido-líquido en diclorometano-hexano en relación 1:3.

Debido a desperfectos en el equipo disponible en la Facultad de Química, las medidas fueron adquiridas, resueltas y refinadas por el Prof. Olivier Blacque, Department of Chemistry, University of Zurich, Zurich, Suiza. Se utilizó un difractómetro Rigaku OD SuperNova/Atlas con radiación de $\text{CuK}\alpha$. Los datos fueron adquiridos a 160 K utilizando un enfriador Oxford Instruments Cryojet XL. La colección de los datos, reducción y corrección por absorción ²⁴ fueron realizadas a través del software CrysAlisPro ²⁵. La estructuras fueron resueltas por métodos directos con SHELXT-2014 ^{20, 21} 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.O.V. ²². Se utilizó Platon para evaluar los resultados del análisis de rayos X ²⁶.

Los datos de los cristales, parámetros de celda, procedimientos de colección de datos, determinación de la estructura cristalina y refinamiento se incluyeron en el Capítulo 4 (síntesis y caracterización). Otros datos cristalográficos se adjuntan en el Apéndice 1.

3.2.2 Caracterización en disolución

3.2.2.1 Conductimetría

Los compuestos de coordinación pueden comportarse como electrolitos en disolución cuando éstos son cargados positiva o negativamente y conducir la corriente eléctrica. La conducción es una magnitud que depende de las concentraciones de los iones en la disolución, la carga, el tamaño, la temperatura y la constante dieléctrica del solvente utilizado. La determinación de la

conductividad de una disolución describe si éste es cargado o neutro, y permite determinar la naturaleza del electrolito ²⁷.

En este marco, para compuestos de coordinación se han reportado valores de conductividad molar en numerosos disolventes y se han relacionado los valores obtenidos con los tipos de electrolitos presentes en las soluciones ²⁸.

En esta tesis, las medidas de conductividad fueron realizadas para caracterizar si los compuestos son cargados o neutros. Los experimentos se realizaron a 25°C en soluciones de concentración 10^{-3} M de complejo en DMSO usando un conductímetro CON 700 OAKTON. Para algunos complejos, se midió la conductividad a diferentes tiempos luego de la preparación de la disolución, de manera de identificar posibles sustituciones de ligandos cargados por moléculas de DMSO, para así estimar de forma inicial la estabilidad de los compuestos en disolución de DMSO, solvente que se utilizó para la preparación de las soluciones stock para la evaluación biológica.

3.2.2.2 Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR, de sus siglas en inglés, *Electronic Paramagnetic Resonance*) es una técnica poderosa que provee información acerca de la composición, nuclearidad y estructura electrónica del estado paramagnético. A través del EPR es posible evaluar las transiciones electrónicas entre estados de espín cuando se le aplica un campo magnético externo a la muestra a analizar. Los estados de espín son separados por una energía que depende del valor g de las especies observadas (valor teórico para un electrón libre, $g=2,0023$) y el campo magnético aplicado (Figura 3.9) ²⁹.

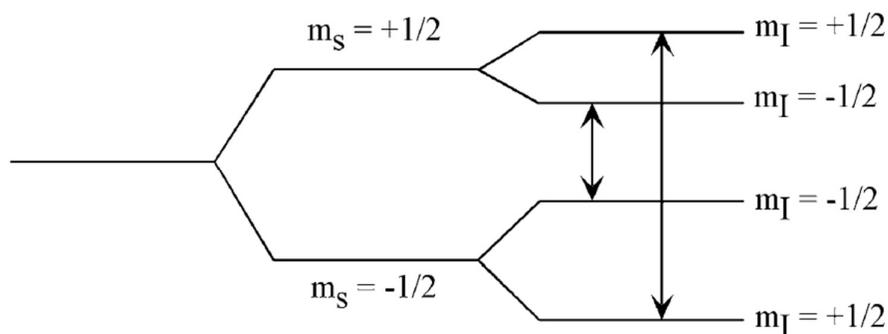


Figura 3.9. Estados de transición de espín observados en el EPR para un sistema de $S = 1/2$ y espín nuclear $I = 1/2$. Extraído de la referencia ²⁹.

Como se ha comentado previamente, el vanadio (IV) tiene una configuración electrónica $[Ar]3d^1$. El único electrón d está ubicado en el orbital d_{xy} no enlazante. Los valores de g en los espectros EPR de vanadio son algo menores que los observados para un electrón libre, siendo estos usualmente cercanos a 1,95. Las transiciones son inducidas por radiaciones de microondas de frecuencia ν , donde $h\nu = g\beta H$, siendo h la constante de Planck, β el magnetón de Bohr y H la magnitud del campo magnético aplicado. El espín nuclear del vanadio (IV), ^{51}V , es $I = 7/2$, por lo que los estados se dividen en $2I+1 = 8$ estados energéticos separados por las constantes de acoplamiento hiperfino, A . Dado que el 99 % del vanadio es ^{51}V , los espectros no se complejizan por la aparición de señales de isótopos que contengan un valor de espín nuclear diferente. La presencia de átomos donores cerca del núcleo provoca desdoblamiento de estados mayores con constantes de acoplamiento superhiperfino asociadas. Dado que el único electrón del V(IV) se encuentra en un orbital no enlazante (d_{xy}), los acoplamientos superhiperfinos no se resuelven en los experimentos tradicionales de 9 GHz. Las transiciones observadas en estos experimentos son puras del electrón desapareado, siguiendo la regla de selección $\Delta M_s = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$, lo que resulta en un espectro de 8 líneas para el caso de V(IV) ²⁹.

Cambiando la temperatura de los experimentos, es posible extraer detalles acerca de la estructura electrónica del ion paramagnético. En estos casos, las constantes de acoplamiento hiperfinas obtenidas, y en particular $A_{//}$, puede ser relacionada con el número y tipo de átomos donores que rodean al centro metálico en el plano ecuatorial^{30,31}. Esta teoría ha evolucionado de simplemente correlacionar el acoplamiento hiperfino isotrópico constante, A_0 ($A_0 = [A_{//} + 2A_{\perp}]/3$) con el número de nitrógenos y oxígenos en el plano ecuatorial, hasta extraer valores de $A_{//}$ para determinar el entorno químico del átomo central. Cada ligando tiene contribución específica al valor de $A_{//}$, y la suma de la contribución de los cuatro ligandos o átomos donores en el plano ecuatorial resultan en la $A_{//}$ observada³¹.

Las herramientas anteriormente detalladas fueron utilizadas en este trabajo para la caracterizar el entorno químico de los compuestos de vanadio (IV) y para estudiar su estabilidad en disolución.

Los espectros EPR fueron medidos con el apoyo de la Prof. Isabel Correia del Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa. La mayoría de los espectros EPR de esta tesis fueron medidos a 100 K con un espectrómetro Bruker 300E X-band acoplado a un medidor de frecuencia Bruker ER041 X-band (9,45 GHz). Algunos de ellos fueron medidos en un espectrómetro Bruker Elexys E 500 equipado con un sistema de variación de temperatura ER 4B1 VT, disponible en el Laboratorio de Resonancia Paramagnética Electrónica del Centro de Materiais de la Universidade de Porto). Los compuestos fueron disueltos a concentraciones de 3 mM, a temperatura ambiente, en dimetilformamida (DMF) previamente degasificada por barboteo de N_2 por 10 minutos y se midieron los espectros de inmediato. Para evaluar la estabilidad de la disolución, estas se dejaron expuestas al aire por 21 horas y luego de ese tiempo se les agregó 5 % de D_2O . Se volvió a medir el espectro EPR y, en paralelo, se midieron los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{51}V

(RMN) para detectar cambios en el estado de oxidación del átomo central. Los parámetros Hamiltonianos de espín fueron obtenidos por simulación con el programa desarrollado por Rockenbauer y Korecz ³².

3.2.2.3 Resonancia magnética nuclear

Tanto en química orgánica como en química organometálica y química de coordinación, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica ampliamente utilizada para la elucidación estructural de compuestos en disolución. Es posible aplicar esta técnica sobre los núcleos que poseen espín distinto de cero. Cuando se aplica un campo magnético externo (B_0) sobre la muestra, la interacción entre el momento magnético nuclear y el campo promueve la alineación de los espines en el sentido del campo aplicado en los niveles de menor energía. Al incidir pulsos intensos de radiación electromagnética del rango de las radiofrecuencias sobre la muestra, los espines de menor energía se excitan hacia los niveles en que se encuentran alineados en contra del sentido del campo, alcanzando un equilibrio de resonancia. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia se asocia con la diferencia de energía entre los estados de espín.

Las nubes electrónicas alrededor de cada núcleo se oponen al campo magnético externo, dando lugar a diferencias en el apantallamiento de los núcleos y, en consecuencia, a un campo magnético efectivo diferencial para cada uno de ellos. Por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser diferente.

En los espectros de RMN, los valores de desplazamiento químico (δ), que representa las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia debido al apantallamiento de los núcleos, y de constante de acoplamiento (J) entre

núcleos activos brindan información del entorno químico alrededor del átomo en estudio ³³.

En este trabajo de tesis se midieron espectros unidimensionales de ¹H RMN, ¹³C RMN y ⁵¹V RMN y espectros bidimensionales homonucleares ¹H-¹H COSY (*correlation spectroscopy*) y heteronucleares ¹H-¹³C HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) y ¹H-¹³C HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*).

Los espectros ¹H RMN y bidimensionales de los compuestos de la familia [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)] se midieron en DMSO-*d*₆ en un espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz perteneciente a la Facultad de Química, Universidad de la República. Para la familia de compuestos [V^{VO}(IN-H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-H)(L-H)] y [V^{VO}(OCH₃)(L-H)₂], los espectros fueron medidos en un espectrómetro Bruker Avance NEO 400 MHz perteneciente a la Facultad de Química. Los desplazamientos químicos fueron referenciados con TMS como estándar interno (δ_{H} 0,0ppm) o utilizando el pico residual del solvente (δ_{H} 2,5 ppm y δ_{C} 39,52 ppm para DMSO), Los experimentos de ⁵¹V RMN se midieron con el apoyo de la Prof. Carolina Fontana en el Departamento de Química del Litoral de la Facultad de Química utilizando un equipo Bruker Avance III 400 MHz equipado con una sonda BBO 5-mm z-gradient.

Los espectros de ⁵¹V RMN medidos para estudiar la estabilidad de las familias de compuestos de oxovanadio (IV) (tal como se describió en la *sección* 3.2.2.3), fueron medidos en DMF (con 5 % de D₂O v/v) en un Bruker Avance III 400 MHz disponible en la Universidad de Lisboa, Portugal. Las señales fueron referenciadas con V^{VO}Cl₃ como estándar externo.

3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Todos los ensayos de actividad biológica fueron realizados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares (a partir del año 2022 renombrado Sección Genómica Funcional) de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, bajo la supervisión de mi co-tutora Dra. Leticia Pérez-Díaz.

3.3.1 Soluciones

Composición de las soluciones utilizadas:

- Penicilina/estreptomicina 100X: Penicilina (1000U/mL); estreptomicina (10 mg/mL)
- Tripsina-EDTA 1x: 0,05 % tripsina; 0,02 % EDTA.
- PBS 1X (cada un litro): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄
- Buffer de lisis de parásitos: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM, CHAPS 1 %, glicerol 10 %, Tritón 0,5 % e inhibidor de proteasas (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail-Roche)
- Anexina V (AV) Alexa Fluor® 488: Disolución en 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% albúmina bovina sérica (BSA)
- Buffer de unión de Anexina: 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4
- Ioduro de propidio (IP): 1 mg/mL (1,5 mM) en agua ultrapura
- Alamar Blue: Resazurina 2 mg/mL en medio BHI-Triptosa
- MTT: 5 mg/mL en PBS 1X

3.3.2 Medios de cultivo

3.3.2.1 Medio de cultivo BHI-Triptosa

Cada 1 L de medio de cultivo BHI-Triptosa (de sus siglas en inglés *Brain-Heart Infusion-Tryptose*) se disolvieron 33 g de BHI, 3 g de triptosa, 4 g de Na_2HPO_4 , 0,4 g de KCl, 0,3 g de glucosa y 10 mL de hemina en cantidad suficiente de agua miliQ. La disolución se autoclavó 20 minutos por calor húmedo a 121°C.

El medio se suplementó con 1 % de penicilina/estreptomicina 100X y 10 % de suero fetal bovino (SFB, Capricorn) tratado 15 minutos a 65 °C para la inactivación de las proteínas del complemento.

3.3.2.2 Medio de cultivo RPMI

El medio de cultivo RPMI-1640 (de sus siglas en inglés, *Roswell Park Memorial Institute*, Gibco, Grand Island, NY, USA) se suplementó con 1 % de penicilina/estreptomicina 100X y 10 % de SFB tratado 15 minutos a 65 °C para la inactivación de las proteínas del complemento.

3.3.3 Cultivos

3.3.3.1 Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Todos los experimentos en *T. cruzi* fueron llevados a cabo con la cepa CL, clon CL Brener. El clon CL Brener es el organismo de referencia utilizado en el Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*³⁴. CL Brener se obtuvo mediante procedimientos de clonación a partir de tripomastigotas del torrente sanguíneo aislados de ratones infectados con la cepa CL³⁵.

Los cultivos axénicos de la forma epimastigota se mantuvieron a 28°C en medio BHI-Triptosa suplementado con 10 % de SFB descomplementado y 1 % de penicilina/estreptomicina 100X. Los cultivos se repicaron cada 72 horas para mantenerlos en fase exponencial de crecimiento.

3.3.3.2 Células VERO

Se utilizaron células VERO (ATCC CCL81, Manassas, VA, USA) como células de mamífero modelo para evaluar citotoxicidad inespecífica y establecer infecciones de *T. cruzi*. Este linaje celular se aisló de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) y se usa ampliamente como modelo de célula normal derivada del tejido epitelial.

Las células se cultivaron en botellas de 75 mL (T75) a 37 °C en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB descomplementado y 1 % de penicilina/estreptomicina 100X, en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂. Dado que las células VERO tienen inhibición por contacto, una vez que alcanzan 100 % de confluencia, crecen en sobrecapas y empiezan a morir. Para su mantenimiento, cada 72 horas las células se lavaron con PBS 1X, se incubaron durante 3 minutos con Tripsina-EDTA 1X, se diluyeron y se re-plaquearon ³⁶.

3.3.3.3 Infecciones de *Trypanosoma cruzi* en células VERO

Los epimastigotas se dejaron crecer sin renovar el medio de cultivo hasta que se observó una alta proporción de parásitos estresados nutricionalmente con una morfología similar a los tripomastigotas metacíclicos (aproximadamente 10 días). Estos parásitos se usaron para infectar una monocapa de células VERO en relación 10:1 (parásitos : células) a 37°C en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB descomplementado y 1 % de penicilina/estreptomicina 100X, en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂.

Luego de 24 horas, los parásitos que permanecieron fuera de las células fueron removidos por aspiración del medio de cultivo. La monocapa de células infectadas se lavó con PBS 1X tres veces y se agregó medio RPMI-1640 fresco. Los

tripomastigotas celulares que emergieron de las células VERO (12-14 días) fueron utilizados para infectar una nueva monocapa de células ³⁷.

3.3.3.4 *Tripomastigotas de Trypanosoma cruzi*

Los tripomastigotas celulares fueron obtenidos del sobrenadante de las células VERO infectadas luego de 72 h de establecida la infección. Para purificarlos, se centrifugó el sobrenadante a 900 g para bajar los restos celulares y se esperó 2 horas para colectar los tripomastigotas que nadan al sobrenadante para ser utilizados en los ensayos de actividad.

3.3.3.5 *Promastigotas de Leishmania infantum*

La forma promastigota cultivada en medios axénicos se ha utilizado ampliamente como parásitos de prueba para detectar potenciales agentes leishmanicidas debido a que es la forma en la que se multiplican libremente sin depender de una línea celular de mamífero ³⁸.

Para estudiar la respuesta de *L. infantum* a los compuestos explorados en esta tesis, se cultivaron promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263 (línea celular provista por el Dr. Marcelo Comini, Laboratorio de Biología Redox de Parásitos, Institut Pasteur de Montevideo) a 28°C en medio RPMI suplementado con 10 % de SFB descomplementado y 1 % de penicilina/estreptomicina 100X. Los cultivos se repicaron cada 72 horas para mantenerlos en fase exponencial de crecimiento.

3.3.4 Soluciones de los compuestos a evaluar

Los compuestos a evaluar *in vitro* se disolvieron en DMSO (calidad para cultivo celular) a concentraciones entre 1,125 y 11,25 mM (disolución stock). Las

soluciones stock fueron diluidas en medio de cultivo suplementado (BHI-Triptosa o RPMI-1640, según corresponda) hasta obtener las concentraciones de trabajo utilizadas. Para cada evaluación se utilizaron soluciones stock preparadas inmediatamente antes de la dilución.

La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no excedió el 1 % v/v. Esta concentración de solvente orgánico, utilizado como vehículo, no tiene efecto sobre el crecimiento celular de *T. cruzi*, *L. infantum* y células VERO ³⁹.

3.3.5 Parámetros utilizados para determinar la potencialidad de los compuestos como agentes antiparasitarios

La potencialidad de los compuestos como agentes antiparasitarios se cuantificó determinando los valores de $IC_{50, t}$ (del inglés, *50% inhibitory concentration*, siendo *t* el tiempo de exposición del compuesto al cultivo celular) y EC_{50} (del inglés, *50% effective concentration*), siendo IC_{50} la concentración molar que inhibe el 50 % del crecimiento celular y EC_{50} la concentración molar que produce el 50 % del efecto máximo posible ⁴⁰.

En el año 2008, el *NIH Chemical Genomics Center*, en la Tercera Sección de su Manual de Guía para Ensayos, definió los parámetros de forma intercambiable, introduciendo los conceptos de IC_{50}/EC_{50} **relativo y absoluto**. El primero de ellos se trata de la concentración que produce el 50% del efecto máximo que el compuesto puede lograr. El efecto máximo está definido como una asíntota horizontal en la curva dosis – respuesta, que no necesariamente coincide con la disminución total de la viabilidad celular. Esta asíntota dependerá de variables como la solubilidad del compuesto, o parámetros de ingreso celular como el porcentaje de captura por parte de las células y la lipofilia. Por su parte, el segundo término refiere a la concentración que logra disminuir la proliferación o la viabilidad celular al 50 % respecto al control sin tratar. Estos dos parámetros

coinciden numéricamente cuando la asíntota horizontal del efecto coincide con la disminución total de la viabilidad celular ⁴¹.

Si bien el IC₅₀ ha sido definido inicialmente para cuantificar diferentes efectos biológicos en desarrollo de fármacos, tales como la concentración molar de un antagonista que reduce la respuesta de una agonista al 50 %, o la concentración molar de un agonista inhibidor que reduce una respuesta en un 50 % de la inhibición máxima que se puede lograr, su concepto ha sido extendido y se ha utilizado ampliamente para hacer referencia a la concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular. Su concepto refiere a un valor de IC₅₀ absoluto, que se determina a partir una curva dosis respuesta en la que el control tiene un crecimiento celular del 100 % y la dosis más alta utilizada representa el 0 % de crecimiento. En este contexto, en esta tesis el parámetro ha sido utilizado para determinar la concentración que inhibe el 50 % de la proliferación de los cultivos replicativos utilizados: epimastigotas de *T. cruzi*, promastigotas de *L. infantum* y células VERO.

Para el caso de la forma tripomastigota de *T. cruzi*, dado que es un estadio no replicativo, la potencialidad de los compuestos fue cuantificada a través del segundo parámetro, EC₅₀, que refiere a la concentración que disminuye la población total en un 50 % (o concentración que produce el 50 % del efecto máximo posible). Asimismo, este parámetro fue utilizado para expresar la actividad a 24 h frente a la forma epimastigota de *T. cruzi*, dado que no es posible notar diferencias en el crecimiento de los cultivos luego de este tiempo de incubación, y, por lo tanto, el concepto de IC₅₀ no se ajusta a las condiciones de trabajo.

La toxicidad inespecífica de los compuestos fue evaluada determinando la selectividad de los compuestos hacia los parásitos por medio del **Índice de Selectividad (IS)**, el cual se define como la relación entre el IC₅₀ determinado en

células de mamífero modelo (células VERO) y el IC₅₀ o EC₅₀ determinado en los microorganismos patógenos.

Ambos parámetros han sido utilizados en las etapas tempranas de desarrollo de fármacos de forma intercambiable para evaluar la potencia de candidatos a fármacos ⁴¹. Evaluar la potencialidad de los compuestos desarrollados a través de estos parámetros permite reconocer cuál o cuáles podrían ser los compuestos líderes de las series estudiadas, para los cuales vale la pena estudiar en profundidad su comportamiento a nivel biológico.

3.3.6 Actividad *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum*

3.3.6.1 Actividad en epimastigotas de T. cruzi y promastigotas de L. infantum a 5 días

El estudio de inhibición de la proliferación de epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa CL Brener por efecto de los compuestos de vanadio y ligandos libres fue realizado según un procedimiento previamente reportado y ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación ^{4-7, 12, 39, 42-53}.

El IC_{50,5 días} fue determinado incubando por 5 días epimastigotas en una densidad de 1x10⁶ parásitos/mL con al menos 7 concentraciones de los compuestos en una placa de cultivo transparente de 96 pocillos. El porcentaje de crecimiento celular fue seguido por medidas de densidad óptica o absorbancia A del cultivo a 595 nm utilizando un espectrofotómetro de placas Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode.

El porcentaje de crecimiento (% PG, de su sigla en inglés *percentage of parasite growth*) se calculó según la ecuación 3.1, donde A_p corresponde a la absorbancia medida a una longitud de onda de 595 nm (A₅₉₅) del cultivo que contiene al compuesto en el día 5, A_{0p} corresponde a la absorbancia A₅₉₅ del medio de cultivo medido justo después de la adición del compuesto (día 0), A_c

corresponde a la absorbancia A_{595} del cultivo en ausencia del compuesto (control) en el día 5 y A_{0c} el valor de absorbancia del control en el día cero.

$$\%PG = \frac{A_p - A_{0p}}{A_c - A_{0c}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.1}$$

Se construyeron las curvas dosis respuesta (% PG *vs* concentración de compuesto) utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Los valores experimentales fueron ajustados a la curva que describe la Ecuación 3.2, donde *Top* y *Bottom* son las asíntotas horizontales superior e inferior, respectivamente, en las unidades del eje *y*, *C* la concentración del compuesto en concentraciones micromolares y *pend* es la pendiente entre las asíntotas; y los valores de $IC_{50, 5 \text{ días}}$ fueron extrapolados de la ecuación.

$$\%PG = \frac{Top + (Bottom - Top)}{1 + \left(\frac{IC_{50, 5 \text{ días}}}{C}\right)^{pend}} \quad \text{Ec.3.2}$$

Los resultados fueron presentados como los valores promedio \pm desviación estándar (SD, de sus siglas en inglés *standard desviation*) de tres a seis réplicas biológicas independientes.

3.3.6.2 Actividad en epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* a 24 horas

Para evaluar el efecto de los compuestos luego de 24 horas de exposición en ambas formas de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, se desarrolló una nueva técnica⁸ adaptando una previamente reportada para determinar la viabilidad celular en *Mycobacterium tuberculosis*⁵⁴.

Se cultivaron 5×10^5 parásitos por pocillo en una placa negra de 96 pocillos en medio BHI (epimastigotas) o RPMI (tripomastigotas) con al menos 7

concentraciones de los compuestos por 24 h. Luego de transcurrido el tiempo, la viabilidad celular fue evaluada utilizando alamar Blue™ (Thermo Fisher), donde la resazurina es reducida por la NADH deshidrogenasa a nivel mitocondrial a resorufina. El producto de reducción es un compuesto de color rojo altamente fluorescente, que puede ser medido tanto por espectrofotometría como por fluorescencia (Figura 3.10).

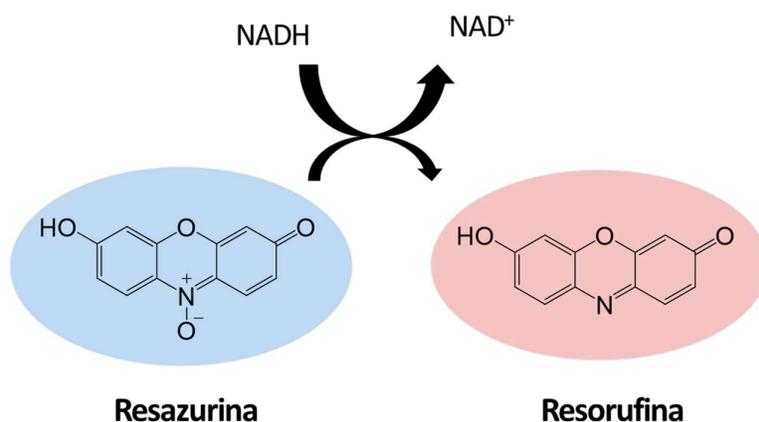


Figura 3.10. Reducción de resazurina a resorufina por la NADH deshidrogenasa. El producto es intensamente rojo y altamente fluorescente (λ_{ex} 530 nm/ λ_{em} 590 nm).

Se agregaron 10 μ L de alamar Blue a cada pocillo y las placas negras fueron incubadas entre 3 y 4 horas a 28°C (epimastigotas) o a 37°C (tripomastigotas) protegiéndolas de la luz. La viabilidad celular se evaluó por fluorescencia (λ_{ex} 530 nm/ λ_{em} 590 nm) en un fluorímetro Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode.

El porcentaje de viabilidad (%PV) fue determinado según la ecuación 3.3, donde F_p corresponde a la fluorescencia (λ_{ex} 530 nm/ λ_{em} 590 nm) del cultivo que contiene al compuesto luego de 24 h, F_{mc} corresponde a la fluorescencia (λ_{ex} 530nm / λ_{em} 590nm) del medio de cultivo y F_c corresponde a la fluorescencia (λ_{ex} 530nm / λ_{em} 590nm) del cultivo en ausencia del compuesto luego de 24 h.

$$\% PV = \left(\frac{Fp - Fmc}{Fc - Fmc} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Se construyeron las curvas dosis respuesta (% PV *vs* concentración de compuesto) utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Los valores experimentales fueron ajustados a la curva que describe la Ecuación 3.4, donde *Top* y *Bottom* son las asíntotas horizontales superior e inferior, respectivamente, en las unidades del eje *y*, *C* la concentración del compuesto en concentraciones micromolares y *pend* es la pendiente entre las asíntotas; y los valores de IC_{50, 5 días} fueron extrapolados de la ecuación.

$$\%PV = \frac{Top + (Bottom - Top)}{1 + \left(\frac{EC50}{C}\right)^{pend}} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Los resultados fueron presentados como los valores promedio \pm desviación estándar (SD, de sus siglas en inglés *standard desviation*) de tres réplicas biológicas independientes.

3.3.7 Citotoxicidad inespecífica *in vitro* sobre células mamíferas modelo

3.3.7.1 Citotoxicidad en células VERO (ATCC CCL81)

La viabilidad en células VERO luego del tratamiento con cada compuesto fue determinada mediante el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, formando un compuesto coloreado de color púrpura (formazán de MTT), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para el ensayo, se plaquearon 1×10^3 células por pocillo en 200 μL de medio RPMI en placas de 96 pocillos e incubadas a 37°C con 5% de CO_2 por 24 horas para favorecer la adhesión. Diferentes concentraciones de cada compuesto fueron añadidas e incubadas por 24 horas. Para medir la viabilidad celular, fueron agregados 20 μL de MTT (5 mg/mL en PBS) a cada pocillo. Las placas fueron incubadas por 4 horas a 37°C con 5 % de CO_2 . Después de la incubación, se removió el medio, se agregaron 100 μL de DMSO a cada pocillo, y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, con agitación constante, protegiendo la placa de la luz. La presencia de células viables fue visualizada por el desarrollo del color púrpura debido a la formación de cristales de formazán. La absorbancia fue medida a 570 nm (A_{570}) en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode.

El porcentaje de viabilidad celular (% PV) fue determinado según la ecuación 3.5, donde A_{570p} corresponde a la absorbancia a 570 nm del pocillo que contenía el cultivo incubado con el compuesto luego de 24 h y A_{570c} corresponde a la absorbancia a 570 nm del pocillo que contenía el cultivo en ausencia del compuesto luego de 24 h.

$$\% PV = \left(\frac{A_{570p}}{A_{570c}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec. 3.5}$$

Se construyeron las curvas dosis respuesta (%PV vs concentración de compuesto) utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Los valores experimentales fueron ajustados a la curva que describe la Ecuación 3.6, donde *Top* y *Bottom* son las asíntotas horizontales superior e inferior, respectivamente, en las unidades del eje *y*, *C* la concentración del compuesto en concentraciones micromolares y *pend* es la pendiente entre las asíntotas; y los valores de $\text{IC}_{50, 5 \text{ días}}$ fueron extrapolados de la ecuación.

$$\%PV = \frac{Top+(Bottom-Top)}{1+(\frac{EC50}{C})^{pend}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

Los resultados fueron presentados como los valores promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

3.3.8 Ensayos sobre infecciones de *T. cruzi*

Con el objetivo de evaluar los efectos que causan las series de compuestos de vanadio estudiadas en las infecciones de células VERO con *T. cruzi*, se seleccionaron los compuestos más promisorios de cada serie y se realizaron dos tipos de experimentos. Por un lado, se expusieron los compuestos frente a tripomastigotas celulares y éstos fueron utilizados para infectar una monocapa de células VERO, a modo de evaluar los efectos sobre el proceso de establecimiento de la infección cuantificando el número de células infectadas. Por otro lado, se expusieron los compuestos seleccionados a una infección previamente establecida, y se evaluó la persistencia de ésta, observando los cambios en la replicación de amastigotas intracelulares^{45, 46}. Considerando los IC₅₀ determinados previamente en la forma epimastigota y su selectividad hacia los parásitos, los compuestos seleccionados para este ensayo fueron [V^VO(LS4-H)(L0-H)], [V^{IV}O(L1-H)₂], [V^VO(IN-H)(L2-H)], [V^VO(BrIS-H)(L2-H)] y [V^{IV}O(L1-H)(mpo)].

3.3.8.1 Efectos sobre el proceso de infección

Para evaluar los efectos de los compuestos seleccionados sobre el proceso de infección, en primer lugar, se plaquearon 50000 células VERO por pocillo en

una placa de cultivo de 24 pocillos, en medio RPMI-1640 suplementado con 1 % de penicilina/estreptomina 100X y 10 % de SFB. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂ para favorecer la adhesión. Se trataron tripomastigotas celulares, colectados del sobrenadante de células VERO luego de 96 h de establecida la infección, con los compuestos seleccionados, [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^{VO}(L2-H)(mpo)], por 30 minutos en concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas de *T. cruzi*.

En el caso del compuesto homoléptico [V^{VO}(L1-H)₂], se plaquearon 300000 células por pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos, y las concentraciones de trabajo correspondieron a 1×, 5× y 10× el IC₅₀ determinado en la forma epimastigota, dado que en el momento de realizar el ensayo aún no se había desarrollado el método para determinar el IC₅₀ en la forma tripomastigota. Los parásitos pretratados fueron utilizados para infectar las células VERO plaqueadas previamente en una relación 10:1 (parásitos : células). Las células infectadas se evaluaron a las 24 y 48 horas. Se lavaron con PBS 1× para remover los tripomastigotas en el sobrenadante, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % por 30 minutos, se volvieron a lavar dos veces con PBS 1× y se tiñeron por 5 minutos con una disolución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0,1 µg/mL, marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y, por lo tanto, marca los núcleos de las células, permitiendo reconocer los núcleos de amastigotas en el citosol de las células VERO. Las células se lavaron nuevamente dos veces con PBS 1× y se contó cantidad de células infectadas utilizando un microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imager, utilizando el filtro azul ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}/\lambda_{em} = 433 \text{ nm}$). El porcentaje de células infectadas se comparó contra el control de células infectadas con tripomastigotas sin tratar utilizando test de análisis de varianza (ANOVA) bidireccional ^{8,12}.

3.3.8.2 Efectos sobre la replicación de amastigotas intracelulares

El efecto de los compuestos seleccionados sobre la proliferación de los amastigotas intracelulares se monitoreó plaqueando 50000 células VERO infectadas con tripomastigotas celulares por pocillo, en una placa de cultivo de 24 pocillos, en medio RPMI-1640 suplementado con 1 % de penicilina/estreptomicina 100X y 10 % de SFB. Se trataron las infecciones con los compuestos seleccionados, [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)] y [V^{IV}O(L1-H)(mpo)], por 24 y 48 h en concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas de *T. cruzi*. Al igual que fue descrito para el ensayo de infección, en el caso del compuesto homoléptico [V^{IV}O(L1-H)₂], se plaquearon 300000 células por pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos, y las concentraciones de trabajo correspondieron a 1×, 5× y 10× el IC₅₀ determinado en la forma epimastigota, dado que en el momento de realizar el ensayo aún no se había desarrollado el método para determinar el IC₅₀ en la forma tripomastigota. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS 1×, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % y se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0,1 µg/mL. Las células se lavaron nuevamente dos veces con PBS 1× y se contó el número de amastigotas por célula utilizando un microscopio de fluorescencia ZOE Fluorescent Cell Imager, utilizando el canal azul (λ_{ex} = 355 nm/ λ_{em} = 433nm). Para ambos ensayos se realizaron tres réplicas biológicas independientes y se contaron al menos 40 células en 8 campos seleccionados al azar (~300 células por condición). Para evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos, se realizaron test de análisis de varianza (ANOVA) bidireccional con corrección de Bonferroni ^{8,12}.

3.3.9 Análisis de cambios morfológicos por microscopía confocal

Para visualizar cambios en la morfología de los parásitos tratados, se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* a una densidad celular de 1×10^7 parásitos por mL con concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x el valor de EC_{50} previamente determinado sobre la forma epimastigota del compuesto más activo de todos los estudiados, [V^VO(IN-2H)(L-H)]. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos fueron centrifugados y fijados con PFA 4 % por 15 minutos. Los parásitos se tiñeron con DAPI 0,1 µg/mL para visualizar ácidos nucleicos y con faloidina 594 (Invitrogen) para visualizar filamentos de actina. Finalmente, los parásitos se lavaron y se depositaron en *slides* con glicerol 80 %. La microscopía confocal se realizó en un Confocal Zeiss LSM 800, disponible en el Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizó el software Fiji para el análisis de las imágenes ⁵⁵.

3.3.10 Toxicidad sobre modelos *in vivo*

Los ensayos de toxicidad sobre modelos *in vivo* Zebrafish y *Caenorhabditis elegans* fueron realizados en el Laboratorio de Biología de Gusanos del Instituto Pasteur de Montevideo, por el Dr. Gustavo Salinas.

3.3.10.1 Toxicidad *in vivo* en larvas de Zebrafish (*Danio rerio*)

Zebrafish (*Danio rerio*) es un pez teleósteo fisóstomo, de la familia *Cyprinidae* que se encuentra naturalmente en el río Ganges, en el sudeste asiático. El zebrafish se emplea como modelo toxicológico *in vivo* para evaluar la toxicidad de nuevos fármacos, dado que una hembra madura pone aproximadamente de 50 a 200 huevos por día, se trata de peces de fácil embriogénesis y desarrollo de órganos, tienen un tamaño pequeño, los embriones se desarrollan rápido, existen bases de datos genómicos y herramientas moleculares, y tienen alta ontología de genes humanos ⁵⁶. Este modelo ya se ha utilizado previamente para estudiar la toxicidad *in vivo* de nuevos potenciales fármacos basados en metales ^{57, 58}.

Esta colaboración se llevó a cabo en el marco del trabajo con la familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados la semicarbazona de salicilaldehído y 8-hidroxiquinolina como ligandos, por lo que se seleccionó para estudiar la toxicidad *in vivo* en zebrafish el compuesto [V^{VO}(LS1-H)(L0-H)], uno de los compuestos más activos de la serie.

Se colocaron dos machos y dos hembras adultos de zebrafish una noche antes del desove en tanques de cría para dejarlos cruzar, utilizando canicas de vidrio como sustrato de desove. Los huevos fertilizados recogidos se mantuvieron en placas de Petri con medio de embriones E3 (NaCl 5mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,33 mM y 0,0001 % de azul de metileno) a 28 °C. Pasadas 72 h de la fertilización, los embriones de zebrafish se plaquearon en placas de 96 pocillos transparentes (tres embriones por pocillo), conteniendo 225 µL de medio E3 y se incubaron por 24 h a 28 °C. Se incubó el compuesto [V^{VO}(LS1-H)(L0-H)] por 48 h en concentraciones desde 1 a 100 µM en un volumen total de 250 µL por pocillo. El porcentaje final de DMSO en la muestra no excedió el 1 %. La viabilidad de los embriones fue determinada por microscopía estereoscópica evaluando la presencia de latido cardíaco luego de 48 horas de tratamiento con el compuesto.

3.3.10.2 Toxicidad *in vivo* en *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un nemátodo de la familia *Rhabditidae*, que vive naturalmente en ambientes templados, que ha sido un importante modelo en genética del desarrollo. El uso de este gusano tiene varias ventajas: representa un organismo multicelular, es un hermafrodita que se autofertiliza, tiene una alta tasa de progenie, un ciclo de vida corto y puede ser fácilmente mantenido en el laboratorio en placas de microtitulación. Por estas razones, el nemátodo se ha vuelto un modelo *in vivo* para el rápido monitoreo de

toxicidad de un potencial fármaco ⁵⁹⁻⁶¹. Dado que el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] es el más activo de la serie de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con el ligando IN y ligandos L derivados de la 8-hidroxiquinolina, y de hecho el más activo en tripomastigotas de todos los compuestos explorados, se seleccionó para evaluar su toxicidad sobre el modelo *C. elegans*.

Los gusanos salvajes *C. elegans* (cepa Bristol N2) y *Escherichia coli* (*E. coli*, cepa OP50) fueron obtenidos en *Caenorhabditis Genomics Center* (Minneapolis, MN, USA). Los gusanos fueron mantenidos a 20 °C en agar NGM (de sus siglas en inglés, Nematode Growth Media) con *E. coli* como fuente de alimento ⁶². Para evaluar la toxicidad del compuesto seleccionado, se monitorearon los cambios en la motilidad del gusano utilizando un WMicrotracker™ ONE (PhylumTech), que detecta cambios en un haz de infrarrojo, según un procedimiento previamente descrito ^{60, 61}.

Los gusanos *C. elegans* se retiraron de las placas de cultivo y se lavaron tres veces con buffer M9 (3 g KH₂PO₄; 6 g Na₂HPO₄; 5 g NaCl; 1 ml de MgSO₄ 1 M por litro) mediante centrifugación a 1000 g. Se sembraron aproximadamente 70 gusanos por pocillo en 60 µl de buffer M9 en placas de microtitulación planas de 96 pocillos (Deltalab) conteniendo 1 % de DMSO y se midió su movimiento basal de cada pocillo por 30 minutos al comienzo del ensayo. Luego, se añadió el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] disuelto en disolución buffer M9, conteniendo 1 % de DMSO a concentraciones finales en el intervalo de 6,5-100 µM en un volumen final de 100 µL por pocillo. El vehículo solo (DMSO al 1%) y el fármaco antihelmíntico Ivermectina (2 µM) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. La motilidad de los gusanos con vehículo solo después de 18 h se consideró como referencia como 100 % de motilidad. Se realizaron cuatro réplicas instrumentales para cada concentración y tres réplicas biológicas.

3.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE INTERÉS BIOLÓGICO

3.4.1 Estabilidad de los compuestos

La alta reactividad de los compuestos de coordinación de vanadio estudiados en conjunto con la complejidad de los medios biológicos utilizados en los ensayos celulares hace que la especiación de los compuestos de oxovanadio (IV) y (V) sea una tarea difícil que requiere la conjunción de métodos analíticos adecuados. La consideración cuidadosa de la estabilidad y la especiación en los medios de cultivo celular y en los fluidos biológicos es esencial para acercarse al conocimiento de las especies activas reales. Por lo tanto, en este trabajo se incluyó un acercamiento inicial a la estabilidad de los compuestos obtenidos a través de estudios en soluciones de DMSO a diferentes tiempos luego de la disolución, utilizando las técnicas de conductimetría (*sección 3.2.2.1*), espectroscopías de EPR (*sección 3.2.2.2*), ^1H RMN y ^{51}V RMN (*sección 3.2.2.4*). Para algunas de las muestras se evaluó la estabilidad de los compuestos en mezclas DMSO:H₂O y DMSO:medio de cultivo BHI por ^{51}V RMN y por HPLC.

3.4.1. Estudio de estabilidad por HPLC

La estabilidad del compuesto más activo de los explorados, el complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ fue estudiada en DMSO y DMSO : medio de cultivo BHI utilizando cromatografía líquida de alta redisolución en fase reversa (RP-HPLC-DAD). Los ligandos en su forma libre y el complejo homoléptico $[\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{IN}-\text{H})]$ fueron evaluados en las mismas condiciones. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu Prominence LC20AT acoplado a un detector diodo Shimadzu PDM20A. Como fase estacionaria para la separación se utilizó una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm; 5 μM), termostaticada a 25 °C. Se utilizó como fase móvil un gradiente de disolución de buffer fosfato 40 mM, pH 7,4

(disolución A) y MeOH (disolución B), con un flujo de 1,0 mL min⁻¹, según la tabla 3.1. Previo al análisis, las soluciones se filtraron por filtro de 0,45 µM. Se inyectaron 50 µL por corrida. Se utilizó detección por absorción en el ultravioleta (280 nm). La estabilidad fue estudiada hasta 24 horas post disolución en las mismas condiciones cromatográficas ^{49, 63, 64}.

Tabla 3.1. Gradiente utilizado para los estudios de estabilidad en disolución por RP-HPLC-DAD

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0 – 3	100	0
3 – 6	100 – 75	0 – 25
6 – 9	75 – 66	25 – 34
9 – 20	66 – 0	34 – 100
20 – 27	0	100
27 – 30	0 – 100	100 – 0

3.4.2 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 ⁶⁵. Con el objetivo de relacionar esta propiedad fisicoquímica con la actividad antiparasitaria encontrada en las nuevas series desarrolladas, se determinó la lipofilia experimentalmente utilizando experimentos de cromatografía en capa fina (TLC) de fase reversa en placas de TLC pre-recubiertas SIL RP-18W/UV₂₅₄ y eluyendo con una mezcla MeOH: DMF: Buffer Tris-HCl (10mM), pH 7,4 (85:5:10, v/v/v). Las soluciones de los ligandos y complejos se prepararon en MeOH y THF, respectivamente, (calidad PPA), inmediatamente antes de su uso. Las placas se corrieron en una cámara de

cromatografía cerrada, se secaron y se revelaron bajo luz UV. Los valores de R_f informados son el promedio de dos a tres determinaciones. Se calcularon los valores R_M a través de la relación: $R_M = \log [(1 / R_f) - 1]$ ^{4-6, 42}.

3.4.3 Interacción con seroalbúmina bovina y apo-transferrina humana

La forma en que los complejos de vanadio se transportan en la sangre aún no está totalmente comprendida, pero se ha logrado un progreso significativo en los últimos 10 años ⁶⁶⁻⁸⁰. La mayoría de los estudios realizados coinciden en que el transporte de los compuestos de vanadio a través de la sangre se da por medio de las proteínas séricas, particularmente la transferrina sérica humana (HTF) y la albúmina sérica humana (HSA) ^{66-70, 72, 81-85}. La comprensión de las interacciones que pueden establecerse entre los complejos de vanadio y estas proteínas plasmáticas es de gran importancia para entender su farmacocinética y farmacodinamia. La albúmina sérica bovina (BSA) ha sido tomado como un modelo general y confiable para proteínas globulares solubles, tales como HSA ⁷¹. Además, es un componente principal del suero fetal bovino ⁷³, utilizado para complementar el medio de cultivo en los ensayos *in vitro* realizados en esta tesis.

Los estudios de interacción con BSA y HTF se realizaron bajo la tutoría del Prof. Joao Costa Pessoa en el Centro de Química Estrutural, Universidade de Lisboa, Portugal. Se preparó una disolución 1 mg/mL de apotransferrina (apo-THF, ATF2011-07;>95%, Akront BioTech) en buffer HEPES (50 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 1mM NaH₂PO₄·H₂O, 0,20 mM KCl). La disolución se agitó gentilmente a temperatura ambiente hasta llegar al equilibrio (aprox. 3 horas). La concentración de apo-THF en la disolución fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción de 92300 M⁻¹cm⁻¹ ^{84, 86, 87}. Las soluciones stock de BSA se prepararon hidratando la proteína en PBS 10 mM por 24 h a 4°C. La concentración de la disolución se determinó por

espectrofotometría UV utilizando el coeficiente de absorción a 278 nm $43890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 88.

Para la preparación de todas las soluciones conteniendo compuestos de vanadio (IV), se barboteó argón en el disolvente para degasificarlo y durante los experimentos las soluciones fueron manipuladas bajo atmósfera inerte.

3.4.3.1 *Dicroísmo circular*

Se evaluó la interacción de los compuestos homolépticos de vanadio (IV), $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L}-\text{H})_2]$, y los derivados de 8-hidroxiquinolina libre (ligandos L) con apo-HTF y BSA por espectroscopía de dicroísmo circular utilizando una concentración fija de la proteína con agregados incrementales de compuesto o ligando en su forma libre. Dada la baja solubilidad de los complejos en el buffer de trabajo, éstos se disolvieron inicialmente en DMSO (para interacción con apo-HTF) y en THF (para interacción con BSA), y luego fueron diluidos de forma apropiada con el buffer de trabajo hasta las concentraciones adecuadas. El contenido de solvente orgánico nunca excedió el 5 % (para DMSO) o 15 % (para THF) en la muestra final. Los espectros fueron medidos en un espectropolarímetro Jasco J-720-CD con un fotomultipeltier EXEL-208, en celdas cuarzo de 10,0 o 5,0 mm en el rango entre 300-800 nm, o con celdas de camino óptico de 1,0 o 2,0 mm para los rangos de 190-250 nm o 250-500 nm.

3.4.3.2 *Experimentos de fluorescencia*

Se estudió la interacción con BSA por espectroscopía de fluorescencia. Las soluciones stock de los compuestos a estudiar fueron preparadas en EtOH en atmósfera de nitrógeno y se diluyeron de forma tal que el contenido del solvente orgánico no supere el 5 % en la muestra final. Se midieron los espectros de

fluorescencia a temperatura ambiente entre 300 y 500 nm, excitando a una longitud de onda de 295 nm, en un espectrofluorímetro SPEX Fluorlog en configuración FL3-11. Adicionalmente, se midieron los espectros de las muestras sin proteína como blancos, los cuales fueron sustraídos al espectro de la muestra conteniendo la misma. Los espectros de fluorescencia obtenidos fueron corregidos por absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda = 295$ nm) y del máximo de emisión ($\lambda = 339$ nm).

Con el fin de estimar la afinidad de los complejos o ligandos por la BSA, se determinaron las constantes de *quenching* de Stern Volmer (K_{sv}) utilizando la ecuación 3.7⁸⁹, donde F_0 y F representan la intensidad de fluorescencia de la BSA en ausencia y presencia de compuesto, respectivamente, $[Q]$ es la concentración del compuesto agregado (*quencher*) y τ la vida media promedio de la biomolécula en el estado excitado (aproximadamente 10^{-8} s para biomacromoléculas)^{90, 91}. La constante de Stern-Volmer fue extraída del gráfico de I_{F_0}/I_F vs $[Q]$.

$$\frac{I_{F_0}}{I_F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + kq\tau[Q] \quad \text{Ec. 3.7}$$

3.5 METALÓMICA Y MECANISMO DE ACCIÓN EN *T. CRUZI*

3.5.1 Interacción con ADN

Con fines de evaluar si la molécula de ADN es un potencial blanco de acción para los compuestos explorados, se estudió la interacción de compuestos seleccionados con esta biomolécula a través de experimentos de desplazamiento de bromuro de etidio (BE) del aducto {ADN-BE}.

Los experimentos se realizaron en disolución buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7,4 y temperatura ambiente, utilizando ADN de timo de ternero (ctDNA, Sigma-Aldrich, Tipo1, No D-1501) y BE (Sigma-Aldrich). Para la preparación de todas las soluciones conteniendo compuestos de vanadio (IV), se barboteó argón sobre

el disolvente para degasificarlo y durante los experimentos las soluciones fueron manipuladas bajo atmósfera inerte. Se utilizó una concentración fija de ctADN y BE, y se realizaron agregados incrementales de los compuestos y ligandos en su forma libre.

Las soluciones stock de ADN fueron preparadas disolviendo ctADN en buffer Tris-HCl 10 mM (1 mg mL^{-1} , $\sim 2 \text{ mM nuc}^{-1}$). La disolución se dejó reposar por por al menos 24 horas a 4°C . La concentración de la disolución stock de ADN se determinó por espectrofotometría UV, utilizando el coeficiente de absorción molar a 260 nm ($6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nuc}^{-1}$)⁹². Se preparó una disolución de BE 0,5 mM en buffer Tris-HCl 10 mM. Dada la baja solubilidad de los compuestos, las soluciones stock de los estos fueron preparadas en DMSO y diluidas de forma adecuada de modo que la concentración de DMSO en la muestra final no supere el 5 % v/v. La concentración final de ADN y BE en las muestras fue de $1,5 \mu\text{M}$ y $0,75 \mu\text{M}$, respectivamente, y la relación aducto {ADN-EB} complejo se incrementó hasta alcanzar 1:10.

Se midieron los espectros de fluorescencia a temperatura ambiente entre 540 y 680 nm, excitando a una longitud de onda de 510 nm, en un espectrofluorímetro SPEX Fluorlog en configuración FL3-11, perteneciente a la Universidade de Lisboa o en un espectrofluorímetro Shimadzu RF5301 disponible en la Facultad de Química, UdelaR. Adicionalmente, se midieron los espectros de las muestras sin BE (solo compuesto y ctADN) como blancos, los cuales fueron sustraídos al espectro de la muestra conteniendo la misma. Los espectros de fluorescencia obtenidos fueron corregidos por absorción a la longitud de onda de excitación ($\lambda = 510 \text{ nm}$) y del máximo de emisión ($\lambda = 594 \text{ nm}$).

Para estimar las constantes *quenching* de Stern Volmer (K_{sv}) se utilizó la ecuación 3.7⁸⁹, donde en este caso, IF_0 y IF representan las intensidades de

fluorescencia del aducto {ADN:BE} en ausencia y en presencia del compuesto, respectivamente.

3.5.2 Metalómica

3.5.2.1 Ingreso total

Con el objetivo de estimar la cantidad de compuesto que ingresa a los parásitos, se cuantificó la cantidad total de vanadio capturada por los parásitos y/o fuertemente unida a los parásitos (no removible por lavado), así como la cantidad de vanadio que permanece en el medio de cultivo ^{6, 8, 12, 45, 46, 48}.

Las determinaciones de vanadio se realizaron adaptando un procedimiento previamente desarrollado por nuestro grupo para compuestos de coordinación de platino y paladio ^{45, 46}. Detalladamente, se incubaron parásitos (de la forma epimastigota o tripomastigota de *T. cruzi*, según corresponda) a una densidad de 1×10^7 parásitos/mL con concentraciones correspondientes al 1×, 5× y 10× el IC₅₀ previamente determinado en epimastigotas para los complejos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y [V^{IV}O(L1-H)₂], o 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas para los complejos [V^{VO}(IN-H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)] y [V^{VO}(L2-H)(mpo)]. Los parásitos se incubaron por 24, 48, 72 y 120 horas para el caso de los primeros dos compuestos nombrados; y por 4 y 24 horas para el caso de los últimos tres.

Una vez transcurrido el tiempo, el sobrenadante que contuvo el vanadio no capturado fue separado del *pellet* de parásitos por centrifugación por 10 minutos a 1000 g. El *pellet* fue lavado tres veces con PBS 1x y resuspendido en 500 µL de PBS. Se midió la cantidad de vanadio en ambas fracciones por espectrometría de absorción atómica electrotrémica en un espectrómetro Thermo iCE 3500 (Thermo Fisher Scientific) equipado con un horno atomizador de

grafito, en el Área Química Analítica de Facultad de Química, con el apoyo del Prof. Ignacio Machado.

La temperatura de pirólisis y atomización óptima fue de 1300 y 2750 °C, respectivamente. Para determinar las condiciones se utilizó una disolución stock de referencia de concentración 1000 mg L⁻¹ disolviendo VOSO₄·5H₂O en ácido nítrico 0,1 % v/v. El programa de temperatura se optimizó para lograr una vaporización completa de la muestra. El límite de detección fue de 0,15 µg L⁻¹. La precisión (expresada en % RSD) fue mayor que el 5 %. La veracidad del método fue de 95-102 %. Se realizaron tres experimentos independientes para cada una de las concentraciones analizadas a los distintos tiempos.

El porcentaje de captura de vanadio por los parásitos fue determinado de acuerdo con la ecuación 3.8, donde *P* representa la cantidad (en ng) de vanadio determinada en el *pellet* de parásitos, *S* la cantidad (en ng) de vanadio en el sobrenadante, y *P* + *S* la cantidad (en ng) total del metal incorporado en el experimento.

$$\% \text{ ingreso} = \left(\frac{P}{P + S} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3.8}$$

3.5.2.2 Distribución subcelular

Para acercarnos al concepto de distribución subcelular, se determinó la cantidad de vanadio asociadas a cuatro fracciones del parásito: ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y una fracción insoluble que contiene proteínas insolubles y lípidos de membrana entre otras moléculas insolubles (FI) por espectrometría de absorción atómica electrotérmica^{6, 8, 12, 45, 46, 48}. Los detalles experimentales de la espectrometría de absorción atómica se describen en la *sección* 3.5.2.1.

Se incubaron parásitos (epimastigotas o tripomastigotas de *T. cruzi*, según corresponda) a una densidad de 1x10⁷ parásitos/mL por 24 horas en las condiciones de incubación detalladas en la *sección* 3.5.2.1, idénticas a las

utilizadas para los experimentos de la determinación de captura total. Transcurrido el tiempo de incubación, se separaron las cuatro fracciones mencionadas anteriormente. Para separar las proteínas solubles de la fracción insoluble, se centrifugaron 3×10^7 parásitos y se resuspendieron en buffer de lisis de parásitos, conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM, CHAPS 1 %, glicerol 10 %, Tritón 0,5 % e inhibidor de proteasas (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail-Roche). Se agitó 30 minutos en hielo y el lisado fue centrifugado a 20000 g por 1 h a 4°C. Las proteínas solubles se separaron del sobrenadante y la fracción insoluble del pellet de la lisis, el cual fue resuspendido en 0,5 mL de PBS para la determinación del contenido de vanadio en la muestra. Para las extracciones de ADN y ARN se utilizaron kits de extracción y purificación de ácidos nucleicos comerciales. En la tabla 3.2 se detallan los kits comerciales utilizados para la extracción de ADN y ARN de cada uno de los experimentos realizados. Los ácidos nucleicos extraídos se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se evaluó monitoreando la relación A_{260}/A_{280} utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop Lite.

Tabla 3.2. Kits de extracción de ácidos nucleicos utilizados para separar ARN y ADN en los experimentos de asociación con macromoléculas.

Compuesto de incubación	Kit utilizado para extraer ADN	Kit utilizado para extraer ARN
[V ^v O(LS4-H)(L0-H)]	Wizard's Genomic DNA Purification Kit (Promega)	FastRNA® Pro Green Kit (MP Biomedicals)
[V ^v O(L1-H) ₂]	Wizard's Genomic DNA Purification Kit (Promega)	TRIzol reagent (Life Technologies)
[V ^v O(IN-H)(L2-H)]	Monarch Genomic DNA Purification Kit	TRIzol reagent (Life Technologies)

[V ^V O(BrIS-H)(L2-H)]	FastDNA ® Kit MPBio	TRIzol reagent (Life Technologies)
[V ^{IV} O(L2-H)(mpo)]	FastDNA ® Kit MPBio	TRIzol reagent (Life Technologies)

Se realizaron tres experimentos independientes para cada una de las concentraciones analizadas a los distintos tiempos. La cantidad de vanadio se determinó para cada fracción y los porcentajes de asociación se calcularon según la ecuación 3.9

$$\% \text{ asociación} = \left(\frac{\text{ng Ven la fracción } X}{\text{ng suma de las 4 fracciones}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3.9}$$

3.5.3 Ensayos de recuperación de los parásitos

Para evaluar si los compuestos de vanadio desarrollados en esta tesis ejercen un efecto tripanostático o tripanocida, se realizaron experimentos de recuperación incubando epimastigotas de *T. cruzi* a concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x su IC₅₀ previamente determinado por 5 días, o 1x, 5x y 10x su EC₅₀ previamente determinado a 24 horas, según el compuesto en estudio ^{45, 46, 93}. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos se recolectaron por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos, se lavaron con medio BHI fresco y se transfirieron a un medio BHI nuevo, libre de complejo. El crecimiento relativo se evaluó determinando la relación entre la densidad celular de cultivos incubados con el compuesto y de cultivos de control siguiendo la absorbancia a 595 nm en tiempos incrementales hasta 7 días, y relativizando los datos al tiempo inicial. Los datos fueron colectados en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. El efecto se consideró tripanostático si los parásitos recuperan su crecimiento normal, o tripanocida en los casos que el arresto del crecimiento fue irreversible.

3.5.4 Tipo de muerte celular

La muerte celular puede darse por tres principales mecanismos: apoptosis, necrosis y autofagia ⁹⁴. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular regulado que se produce como parte del desarrollo normal de la célula. Esta se caracteriza por la presencia de cambios morfológicos y bioquímicos característicos, incluyendo la compactación y la fragmentación de la cromatina nuclear, el encogimiento del citoplasma, y la pérdida de la asimetría de la membrana. Cuando la célula activa el mecanismo de apoptosis, la fosfatidilserina citoplasmática (FS), se transloca desde el interior hacia el exterior de la membrana plasmática, por lo que es usada como marcador de este mecanismo de muerte. En *T. cruzi* la apoptosis se da mediante reguladores no canónicos, dado que no se encuentran presente en estos organismos las caspasas, miembros de la familia Bcl-2, ni receptores de la familia TNF ⁹⁵.

Durante la necrosis ocurre el colapso celular, que involucra un incremento del volumen celular (oncosis), que termina en la ruptura de la membrana plasmática y al desmantelamiento desorganizado de los organelos. Aparte de la permeabilización de la membrana, la necrosis no presenta marcadores bioquímicos específicos ⁹⁶.

La autofagia es un mecanismo que involucra el secuestro en vesículas de doble membrana (autofagosomas) de organelos citoplasmáticos y macromoléculas que se encuentran en exceso, superan su tiempo de vida media o son innecesarios en ciertas condiciones celulares. Estos autofagosomas son luego enviados a lisosomas para su degradación, mediante una respuesta no inflamatoria ⁹⁷.

3.5.4.2 Tinción con Anexina V y ioduro de propidio

Se estudió el mecanismo de muerte inducido por los compuestos líderes de las series de oxovanadio (IV) y (V) en la forma epimastigotas de *T. cruzi* mediante el uso de marcadores fluorescentes de apoptosis y necrosis. El ensayo se basa en el marcaje indirecto de los parásitos apoptóticos utilizando el kit de apoptosis Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell (Invitrogen) o Dead cell apoptosis kit (Thermo Fisher Scientific). El experimento fue puesto a punto previamente para epimastigotas de *T. cruzi*^{96, 98-100, 45, 46}. El anticoagulante humano, anexina V, es una proteína de entre 35-36 kDa, Ca^{2+} dependiente, de unión a fosfolípidos y que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (FS). Por tanto, mediante el uso de la anexina V recombinante conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor® 488 (ex/em: 499/520 nm), se pueden identificar células apoptóticas tempranas mediante la unión a PS expuesta al espacio extracelular. El kit incluye una disolución de ioduro de propidio (IP) rojo fluorescente que se une a ácidos nucleicos ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 495/635 nm). El uso de IP permite identificar las células necróticas, penetrando únicamente en las células muertas, lo que permite la discriminación de las células vivas (Figura 3.11).

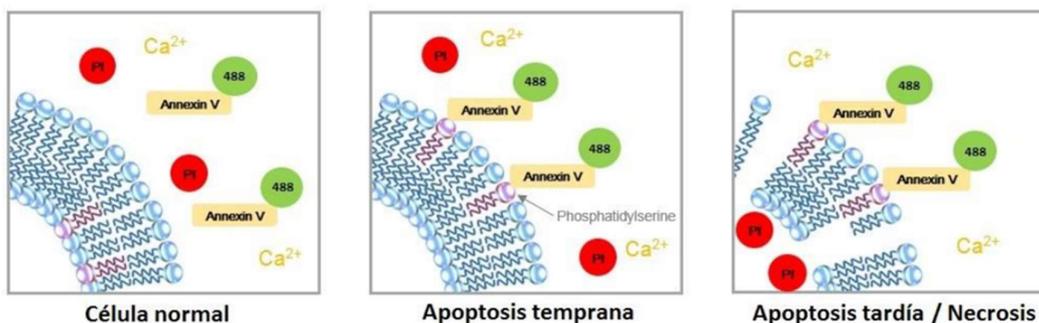


Figura 3.11. Marcadores moleculares empleados para la identificación de los procesos de apoptosis y necrosis.

Se analizó el mecanismo de muerte celular sobre epimastigotas de *T. cruzi* luego de 4 y 24 horas de exposición a los compuestos líderes de cada familia estudiada con concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x su IC₅₀ previamente determinado por 5 días, o 1x, 5x y 10x su EC₅₀ previamente determinado a 24 horas, según el compuesto en estudio. Luego del tiempo de incubación, los parásitos fueron centrifugados, lavados con PBS 1x y el pellet fue resuspendido en Buffer de unión a Anexina. Se agregó AV conjugada a Alexa Fluor 488 e IP y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de este período de incubación se analizaron las células teñidas en citómetro de flujo (BD Accuri C6, BD Biosciences), con un flujo de colección de 100 µL/min. Se midió la emisión de fluorescencia con un filtro 533/30 (FL1) para AV y con un filtro 670 nm Long pass (FL3) para IP, usando una longitud de onda de excitación de 488 nm. Se utilizó una compensación de color de 1,67 % ⁴⁶. Los datos fueron analizados con el programa BD CSampler software (BD Bioscience). Se utilizaron parásitos sin tratar como control negativo y parásitos tratados con H₂O₂ 50 mM y 100 mM durante 2,5 h como controles positivos de apoptosis y necrosis, respectivamente.

3.5.4.3 Expresión de ATG7 y ATG8

La autofagia es un mecanismo de supervivencia que ha demostrado ser crucial para la diferenciación. En condiciones hostiles, el mecanismo se puede activar de forma exacerbada, dando lugar a la muerte celular. Si bien aún se encuentran en estudio, las bases moleculares de la autofagia en *T. cruzi* han sido descritas en los últimos años. La formación de los autofagosomas se da a través del sistema de conjugación ATG(incluyendo 16 tipos de ATG). ATG12, ATG3, ATG5 y ATG7, están involucradas en los primeros pasos de la formación del autofagosoma. Por su parte, la proteína de conjugación ATG8, es un marcador de membrana del autofagosoma. Su unión conduce a la fusión con las vacuolas,

donde es desconjugado por ATG4 y se libera al citosol, donde es reutilizado para marcar otra vesícula ⁹⁷.

Para explorar si los compuestos de coordinación sintetizados inducen la autofagia en los parásitos tratados, se analizó la expresión de los genes que codifican para algunas de las proteínas involucradas en el mecanismo de autofagia en comparación con parásitos control sin tratar. Se diseñaron cebadores para amplificar genes que codifican para ATG7 (involucrados en la formación de los autofagosomas) y genes que codifican para ATG8 (marcador de unión a las vacuolas), y se estudiaron los niveles de expresión de estos por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

3.5.4.3.1 Extracción de ARN

Se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* a una densidad de 1×10^7 parásitos/mL por 24 horas a 28 °C con concentraciones equivalentes al EC₅₀ de cada uno de los compuestos líderes seleccionados. Transcurrido el tiempo de incubación, se aisló el ARN total de parásitos control y parásitos tratados con los compuestos metálicos utilizando TRIzol (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del comerciante. Se centrifugaron los parásitos, se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en 1 mL de TRIzol, provocando la lisis celular. Se agregó CHCl₃ y se separaron las fases por centrifugación. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, por lo que se separó y se precipitó el ARN total con isopropanol. El ARN se lavó con EtOH 75 % y se disolvió finalmente en H₂O libre de nucleasas.

Para eliminar las trazas de ADN del ARN extraído, las muestras fueron tratadas con el kit DNFree (Thermo Fisher Scientific), según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubó el ARN con buffer de DNase I y DNase I y posteriormente se agregó un inactivador de la enzima. Los ácidos nucleicos extraídos se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se

evaluó monitoreando la relación A_{260}/A_{280} utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop Lite.

3.5.4.3.2 *Síntesis de ADN copia*

Para sintetizar el ADN copia usado como molde en la qPCR, se realizó la retrotranscripción del ARN utilizando el kit comercial LunaScript® RT SuperMix Kit (BioLabs). Brevemente, 1 µg de ARN molde fueron incubados con 4 µL del mix LunaScript® RT (conteniendo hexámeros cebadores al azar, dNTPs y la enzima retrotranscriptasa). Como control negativo de retrotranscripción, se realizaron los mismos experimentos utilizando el No-RT control mix en lugar de LunaScript® RT. Luego de preparada la mezcla, se realizó un ciclo de 2 minutos a 25 °C, 10 minutos a 55°C y 1 minuto a 95°C en un termociclador.

3.5.4.3.3 *PCR en tiempo real*

Para amplificar los genes que codifican para ATG7 y ATG8 en las muestras control y tratadas, se utilizó el kit comercial Luna® Universal qPCR Master Mix (BioLabs).

Los cebadores fueron diseñados con la herramienta online de Thermo Fisher Scientific (<https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716>). Como control interno se empleó el gen constitutivo *gadph*.

El kit Luna® Universal qPCR Master Mix contiene la sonda fluorescente SYBR Green I, *hot start* DNA polimerasa, el buffer específico y los dNTPs necesarios para la reacción de amplificación. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10 µL conteniendo los cebadores en una concentración final de 0,4 µM. El primer paso de la reacción fue una incubación a 95° C durante 1 minutos para activar la polimerasa, y luego 40 ciclos a 95° C por 15 segundos para desnaturalizar las hebras y 60° C durante 30 segundos para

la hibridación de los cebadores. Se realizaron curvas de disociación de las muestras para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un DT Prime 4 Real-Time PCR System. Los datos obtenidos fueron procesados en una primera instancia con el software DT Prime 4 Real-Time.

La determinación de los valores relativos de ARN se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ ¹⁰¹. Para ello, el primer valor de ΔCT se obtuvo normalizando los valores contra el gen control de *gapdh*, y en segunda instancia, el $\Delta\Delta CT$ se calculó en relación con las muestras control.

3.5.5 Producción de especies reactivas del oxígeno

Los parásitos tripanosomátidos son particularmente sensibles a las EROS y poseen sistemas de defensa específicos frente al estrés oxidativo¹⁰². Dependiendo de los niveles de EROS producidos, se pueden activar diferentes mecanismos de muerte celular. Por una parte, la respuesta de defensa mitocondrial puede generar una sobrecarga de Ca^{2+} que induzca la activación de la apoptosis^{94, 103}.

Con el objetivo de determinar si los compuestos estudiados causan estrés oxidativo sobre *T. cruzi*, la producción de EROS por parte de los compuestos líderes de cada serie estudiada fue evaluada adaptando un método previamente reportado¹⁰⁴. Se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* (densidad de 1×10^7 parásitos/mL) con 1x, 5x y 10x su IC_{50} previamente determinado por 5 días, o 1x, 5x y 10x su EC_{50} previamente determinado a 24 horas, según el compuesto en estudio, por 4 y 24 horas. Para la detección de EROS, se utilizó la sonda fluorescente diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). Una vez que ingresa la sonda a la célula, el éster acetato es hidrolizado por las esterasas intracelulares y las especies radicalarias oxidan el producto a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF). Luego del período de incubación, se agregaron 2 μL

de una disolución de H₂DCFDA (Thermo Fisher) disuelto en PBS, y se incubaron las muestras por 1 hora a 28 °C. Se utilizó H₂O₂ a una concentración de 50 µM como control positivo de producción de EROS. Los niveles de ROS fueron analizados en un fluorímetro de placas Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode, utilizando una longitud de onda de excitación de 507 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Se realizaron tres experimentos independientes. Para evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos, se realizaron test de análisis de varianza (ANOVA) bidireccional con corrección de Bonferroni.

3.5.6 Potencial de membrana mitocondrial

Para analizar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), se utilizó el marcador lipofílico catiónico yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianina (JC1, Molecular Probes). El marcador se acumula de manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial, agregándose por acumulación en las células saludables (agregados rojos). En células apoptóticas, JC1 se desagrega emitiendo fluorescencia a longitudes de onda menores (monómeros verdes). En consecuencia, la despolarización de la membrana mitocondrial genera la disminución en la tasa de intensidades de fluorescencia rojo/verde (590 nm/530 nm).

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial, se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* (densidad de 1x10⁷ parásitos/mL) con 1x, 5x y 10x su IC₅₀ previamente determinado por 5 días, o 1x, 5x y 10x su EC₅₀ previamente determinado a 24 horas, según el compuesto en estudio, por 4 y 24 horas. Luego del período de incubación, las muestras se incubaron con la sonda JC-1 a una concentración final de 6 µM por 30 minutos. Se midieron las intensidades de fluorescencia (λ_{ex} = 560 nm/ λ_{em} = 590 nm para los agregados rojos; λ_{ex} = 485 nm/

λ_{em} = 530 nm para los monómeros verdes) utilizando un fluorímetro de placas Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode ^{45, 46}.

3.5.7 Efectos sobre la enzima fumarato reductasa NADH dependiente

Tal como se mencionó en el capítulo 2, se ha demostrado que el ligando mpo tiene la capacidad de inhibir la enzima fumarato reductasa NADH dependiente (FRD), enzima esencial para mantener el balance energético en tripanosomátidos que está ausente en el hospedero mamífero ¹⁰⁵. Los compuestos heterolépticos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] fueron diseñados racionalmente con el objetivo de modular las propiedades fisicoquímicas del mpo, que podrían resultar en un aumento de la actividad inhibitoria sobre el blanco de acción estudiado.

3.5.7.1 Actividad enzimática

Para evaluar la actividad de la FRD de los parásitos tratados con los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)], donde L = L0-L4, se preparó un extracto proteico a partir epimastigotas de *T. cruzi* siguiendo un procedimiento previamente reportado ³⁹. Brevemente, se centrifugaron 3×10^7 parásitos a 500 g y se resuspendieron 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. El extracto 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 utilizando una concentración de 250 μ M de NADH en buffer HEPES (30 mM, pH 7,0) con KCl (125 mM) y fumarato (0,5 mM) ^{106, 107}.

3.5.7.2 Viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan FRD

Como método de validación del blanco molecular, se evaluó la viabilidad celular de parásitos sobreexpresando la enzima FRD. Los parásitos utilizados fueron transfectados en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de Facultad de Ciencias en el marco del trabajo de tesis de doctorado de la MSc. Florencia Mosquillo. FRD fue clonado en el vector pTREX-cMyc-nGFP en los sitios de restricción XbaI y HindIII¹⁰⁸. Se transfectaron epimastigotas de *T. cruzi* con 30 µg del plásmido recombinante en buffer de electroporación (HEPES 50 mM, CaCl₂ 0,15 mM, KCl 5 mM, buffer fosfato 90 mM, pH7,2) utilizando un Amaxa Nucleofector 2b (Lonza), disponible en el Instituto Pasteur de Montevideo. Los parásitos transfectantes se seleccionaron con G-418.

Para el ensayo de viabilidad celular sobre parásitos transfectantes, se utilizaron las mismas condiciones de trabajo detalladas 3.3.6.2.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gambino, D.; Fernández, M.; Santos, D.; Etcheverría, G. A.; Piro, O. E.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Tomaz, I.; Marques, F., Searching for gallium bioactive compounds: Gallium(III) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazone derivatives. *Polyhedron* **2011**, *30* (7), 1360-1366.
2. Noblía, P.; Baran, Enrique J.; Otero, L.; Draper, P.; Cerecetto, H.; González, M.; Piro, Oscar E.; Castellano, Eduardo E.; Inohara, T.; Adachi, Y.; Sakurai, H.; Gambino, D., New vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives: Synthesis, characterization, and *in vitro* insulin-mimetic activity— crystal structure of [V(V)O₂(salicylaldehyde semicarbazone)]. *Eur J Inorg Chem* **2004**, *2004* (2), 322-328.
3. Noblia, P.; Vieites, M.; Parajon-Costa, B. S.; Baran, E. J.; Cerecetto, H.; Draper, P.; Gonzalez, M.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Monge-Vega, A.; Gambino, D., Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing *in vitro* anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [V(V)O₂(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. *J Inorg Biochem* **2005**, *99* (2), 443-51.
4. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
5. Scalese, G.; Benitez, J.; Rostan, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Birriel, E.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Pessoa, J. C.; Gambino, D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde

- semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 116-25.
6. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, *23* (8), 1265-1281.
 7. Fernandez, M.; Varela, J.; Correia, I.; Birriel, E.; Castiglioni, J.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gambino, D., A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Trans* **2013**, *42* (33), 11900-11.
 8. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5375.
 9. Kurbah, S. D.; Asthana, M.; Syiemlieh, I.; Lywait, A. A.; Longchar, M.; Lal, R. A., New dioxido-vanadium(V) complexes containing hydrazone ligands: Syntheses, crystal structure and their catalytic application toward C H bond functionalization. *Journal of Organometallic Chemistry* **2018**, *876*, 10-16.
 10. Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Lodyga-Chruscinska, E., Oxovanadium(IV) complexes of quinoline derivatives. *Inorganica Chimica Acta* **2003**, *348*, 97-106.
 11. González-Baró, A. C.; Baran, E. J., Oxovanadium(IV) complexes of halogenated oxines. *Monatsh Chem* **1997**, *128* (4), 323-335.
 12. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Diaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(iv) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New Journal of Chemistry* **2019**, *43* (45), 17756-17773.

13. Correia, I.; Adao, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; Costa Pessoa, J., Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *J Inorg Biochem* **2014**, *141*, 83-93.
14. Gryca, I.; Czerwinska, K.; Machura, B.; Chrobok, A.; Shul'pina, L. S.; Kuznetsov, M. L.; Nesterov, D. S.; Kozlov, Y. N.; Pombeiro, A. J. L.; Varyan, I. A.; Shul'pin, G. B., High Catalytic Activity of Vanadium Complexes in Alkane Oxidations with Hydrogen Peroxide: An Effect of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Noninnocent Ligands. *Inorg Chem* **2018**, *57* (4), 1824-1839.
15. Nakamoto, K., *Infrared Raman Spectra Inorg Coord. Compd.*, John Wiley & Sons, Inc.: 2008.
16. Selbin, J., The chemistry of oxovanadium(IV). *Chem Rev* **1965**, *65* (2), 153.
17. F. A. Cotton, G. W., *Química Inorgánica Avanzada*. 4a. edición ed.; Limusa: D.F. México, 1990; p 774-782.
18. M. Catti, H. M., G. Artioli, D. Viterbo, M. Milanesio, G. Gilli, P. Gilli, G. Zanotti, G. Ferraris, *Fundamentals of crystallography*. Third Edition ed.; 2011.
19. Krause, L.; Herbst-Irmer, R.; Sheldrick, G. M.; Stalke, D., Comparison of silver and molybdenum microfocus X-ray sources for single-crystal structure determination. *J Appl Crystallogr* **2015**, *48* (Pt 1), 3-10.
20. GM, S., *Acta Cryst A* **2008**, *64*, 112-122.
21. Sheldrick, G. M., SHELXT - integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr A Found Adv* **2015**, *71* (Pt 1), 3-8.
22. Dolomanov OV, B. L., Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H *J Appl Cryst.* **2009**, *42*, 339-341.
23. Hubschle, C. B.; Sheldrick, G. M.; Dittrich, B., ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *J Appl Crystallogr* **2011**, *44* (Pt 6), 1281-1284.

24. Clark, R. C.; Reid, J. S., The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Crystallogr A Found Adv* **1995**, *A51*, 887-897.
25. *CrysAlisPro (version 1.171.41.122a)*, Rigaku Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, . 2021.
26. Sheldrick, G. M., Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, *71* (Pt 1), 3-8.
27. Fisher, R.; Peters, D., *Análisis Químico Cuantitativo*. México, 1970; p 612-651.
28. Geary, W. J., The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord Chem Rev* **1971**, *7*, 81-122.
29. Smith, T. S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V. L., Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems. *Coord Chem Rev* **2002**, *228*, 1-18.
30. Wuthrich, K., Elektronenspinresonanz-Untersuchungen von V02+-Komplexverbindungen in wässriger Lösung. *Helv Chim Acta* **1965**, *48*, 1012.
31. Chasteen, N. D., *Biological Magnetic Resonance*. Plenum Press: New York, 1981; Vol. 3, p 53-119.
32. Rockenbauer, A.; Korecz, L., Automatic computer simulations of ESR spectra. *Appl Magn Reson* **1996**, *10*, 29-43.
33. Ebsworth, D., *Spectroscopic properties of inorganic and organometallic compounds*. British Library Cataloguing, 1968.
34. El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A.-N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C. M.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.; Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.;

- Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D.; Hal, N., Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **2005**, *309*, 404-409.
35. Zingales, B.; Pereira, M. E. S.; Oliveira, R. P.; Almeida, K. A.; Umezawa, E. S.; Souto, R. P.; Vargas, N.; Cano, M. I.; Silveira, J. F. d.; Nehme, N. S.; Morel, C. M.; Brener, Z.; Macedo, A., *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Tropica* **1997**, *68*, 159-173.
36. Ammerman, N. C.; Beier-Sexton, M.; Azad, A. F., Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol* **2008**, *Appendix 4*, Appendix 4E.
37. MacLean, L. M.; Thomas, J.; Lewis, M. D.; Cotillo, I.; Gray, D. W.; De Rycker, M., Development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, *12* (7), e0006612.
38. Gupta, S.; Nishi, Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* **2011**, *133*, 27-39.
39. Vieites, M.; Smircich, P.; Parajon-Costa, B.; Rodriguez, J.; Galaz, V.; Oleazar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gomez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2008**, *13* (5), 723-35.
40. Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A.; International Union of Pharmacology Committee on Receptor, N.; Drug, C., International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **2003**, *55* (4), 597-606.
41. Sebaugh, J. L., Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat* **2011**, *10* (2), 128-34.

42. Benitez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D., Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303-12.
43. Benitez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Moreno, V.; Lorenzo, J.; Aviles, F. X.; Garat, B.; Gambino, D., A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agent. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (10), 1386-94.
44. Cipriani, M.; Toloza, J.; Bradford, L.; Putzu, E.; Vieites, M.; Curbelo, E.; Tomaz, A. I.; Garat, B.; Guerrero, J.; Gancheff, J. S.; Maya, J. D.; Olea Azar, C.; Gambino, D.; Otero, L., 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* (27), 4677-4689.
45. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., Effect of a new anti-*T. cruzi* metallic compound based on palladium. *Biometals* **2018**, *31* (6), 961-974.
46. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Tissot, F.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., *Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound. *Chem Biol Drug Des* **2018**, *92* (3), 1657-1669.
47. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Ciganda, M.; Lima, A.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., Comparative high-throughput analysis of the *Trypanosoma cruzi* response to organometallic compounds. *Metallomics* **2020**, *12* (5), 813-828.
48. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Lima, A.; Gehrke, S. A.; Scalese, G.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., High Throughput Approaches to Unravel the Mechanism of Action of a New Vanadium-Based

- Compound against *Trypanosoma cruzi*. *Bioinorg Chem Appl* **2020**, 2020, 1634270.
49. Rivas, F.; Del Marmol, C.; Scalese, G.; Pérez-Díaz, L.; Machado, I.; Blacque, O.; Medeiros, A.; Comini, M.; Gambino, D., New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem* **2022**, 237, 112016.
50. Rodriguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Perez-Diaz, L.; Echeverria, G. A.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Maringolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q.; Pavan, F. R.; Otero, L.; Gambino, D., Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Trans* **2015**, 44 (32), 14453-64.
51. Scalese, G.; Correia, I.; Benitez, J.; Rostan, S.; Marques, F.; Mendes, F.; Matos, A. P.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Evaluation of cellular uptake, cytotoxicity and cellular ultrastructural effects of heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of salicylaldimines and polypyridyl ligands. *J Inorg Biochem* **2017**, 166, 162-172.
52. Scalese, G.; Mosquillo, M. F.; Rostan, S.; Castiglioni, J.; Alho, I.; Perez, L.; Correia, I.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphtylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *J Inorg Biochem* **2017**, 175, 154-166.
53. Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchan, E.; Gomez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2009**, 103 (10), 1300-6.
54. Pavan, F. R.; da S. Maia, P. I.; Leite, S. R.; Deflon, V. M.; Batista, A. A.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Leite, C. Q., Thiosemicarbazones, semicarbazones,

- dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-Myco bacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* **2010**, *45* (5), 1898-905.
55. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 676-82.
56. Bichara, D.; Calcaterra, N. B.; Arranz, S.; Armas, P.; Simonetta, S. H., Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *J Appl Toxicol* **2014**, *34* (2), 214-9.
57. Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. E., Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* **2005**, *86* (1), 6-19.
58. Leon, I. E.; Di Virgilio, A. L.; Barrio, D. A.; Arrambide, G.; Gambino, D.; Etcheverry, S. B., Hydroxylamido-amino acid complexes of oxovanadium(V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model. *Metallomics* **2012**, *4* (12), 1287-96.
59. Dengg, M.; van Meel, J. C., *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2004**, *50* (3), 209-14.
60. Risi, G.; Aguilera, E.; Lados, E.; Suarez, G.; Carrera, I.; Alvarez, G.; Salinas, G., *Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay identified new hits for nematocidal drug development. *Vet Sci* **2019**, *6* (1).
61. Simonetta, S. H.; Golombek, D. A., An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods* **2007**, *161* (2), 273-80.
62. Brenner, S., The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71-94.

63. Keller, S.; Ong, Y. C.; Lin, Y.; Cariou, K.; Gasser, G., A tutorial for the assessment of the stability of organometallic complexes in biological media. *J Organomet Chem* **2020**, *906*, 121059.
64. Rivas, F.; Medeiros, A.; Quiroga, C.; Benitez, D.; Comini, M.; Rodriguez-Arce, E.; Machado, I.; Cerecetto, H.; Gambino, D., New Pd-Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt-Fe analogues. *Dalton Trans* **2021**, *50* (5), 1651-1665.
65. Di, L.; Kerns, E. H., *Chapter 23: Lipophilicity methods*. Second ed.; Academic Press: Boston, 2016.
66. Sanna, D.; Micera, G.; Garribba, E., New developments in the comprehension of the biotransformation and transport of insulin-enhancing vanadium compounds in the blood serum. *Inorg Chem* **2010**, *49* (1), 174-87.
67. Jakusch, T.; Costa Pessoa, J.; Kiss, T., The speciation of vanadium in human serum. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255* (19-20), 2218-2226.
68. Mehtab, S.; Goncalves, G.; Roy, S.; Tomaz, A. I.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F.; Romao, M. J.; Jakusch, T.; Kiss, T.; Pessoa, J. C., Interaction of vanadium(IV) with human serum apo-transferrin. *J Inorg Biochem* **2013**, *121*, 187-95.
69. Sanna, D.; Biro, L.; Buglyo, P.; Micera, G.; Garribba, E., Biotransformation of BMOV in the presence of blood serum proteins. *Metallomics* **2012**, *4* (1), 33-6.
70. Kiss, T.; Jakusch, T.; Hollender, D.; Dörnyei, Á.; Enyedy, É. A.; Pessoa, J. C.; Sakurai, H.; Sanz-Medel, A., Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252* (10-11), 1153-1162.
71. Pessoa, J. C.; Tomaz, I., Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 3701-3738.

72. Justino, G. C.; Garribba, E.; Pessoa, J. C., Binding of V(IV)O(2)(+) to the Fe binding sites of human serum transferrin. A theoretical study. *J Biol Inorg Chem* **2013**, *18* (7), 803-13.
73. Levina, A.; Crans, D. C.; Lay, P. A., Speciation of metal drugs, supplements and toxins in media and bodily fluids controls *in vitro* activities. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *352*, 473-498.
74. Correia, I.; Chorna, I.; Cavaco, I.; Roy, S.; Kuznetsov, M. L.; Ribeiro, N.; Justino, G.; Marques, F.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F. A.; Santos, H. M.; Capelo, J. L.; Douth, J.; Pessoa, J. C., Interaction of [V(IV) O(acac)₂] with Human Serum Transferrin and Albumin. *Chem Asian J* **2017**, *12* (16), 2062-2084.
75. Jakusch, T.; Kiss, T., *In vitro* study of the antidiabetic behavior of vanadium compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *351*, 118-126.
76. Sanna, D.; Ugone, V.; Micera, G.; Buglyo, P.; Biro, L.; Garribba, E., Speciation in human blood of Metvan, a vanadium based potential anti-tumor drug. *Dalton Trans* **2017**, *46* (28), 8950-8967.
77. Sanna, D.; Palomba, J.; Lubinu, G.; Buglyo, P.; Nagy, S.; Perdih, F.; Garribba, E., Role of Ligands in the Uptake and Reduction of V(V) Complexes in Red Blood Cells. *J Med Chem* **2019**, *62* (2), 654-664.
78. Sanna, D.; Serra, M.; Micera, G.; Garribba, E., Interaction of antidiabetic vanadium compounds with hemoglobin and red blood cells and their distribution between plasma and erythrocytes. *Inorg Chem* **2014**, *53* (3), 1449-64.
79. Levina, A.; McLeod, A. I.; Gasparini, S. J.; Nguyen, A.; De Silva, W. G.; Aitken, J. B.; Harris, H. H.; Glover, C.; Johannessen, B.; Lay, P. A., Reactivity and Speciation of Anti-Diabetic Vanadium Complexes in Whole Blood and Its Components: The Important Role of Red Blood Cells. *Inorg Chem* **2015**, *54* (16), 7753-66.

80. Sanna, D.; Micera, G.; Garribba, E., On the transport of vanadium in blood serum. *Inorg Chem* **2009**, *48* (13), 5747-57.
81. Costa Pessoa, J.; Garribba, E.; Santos, M. F. A.; Santos-Silva, T., Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, *301-302*, 49-86.
82. Costa Pessoa, J., Thirty years through vanadium chemistry. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 4-24.
83. Vincent, J. B.; Love, S., The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1820* (3), 362-78.
84. Jakusch, T.; Hollender, D.; Enyedy, E. A.; Gonzalez, C. S.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel, A.; Costa Pessoa, J.; Tomaz, I.; Kiss, T., Biospeciation of various antidiabetic V(IV)O compounds in serum. *Dalton Trans* **2009**, (13), 2428-37.
85. Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D., Vanadium compounds in medicine. *Coord Chem Rev* **2015**, *301*, 24-48.
86. Chasteen, N. D., Human serotransferrin: structure and function. *Coord Chem Rev* **1977**, *22*, 1-36.
87. Chasteen, N. D.; Grady, J. K.; Holloway, C. E., Characterization of the binding, kinetics, and redox stability of vanadium(IV) and vanadium(V) protein complexes in serum. *Inorg Chem* **1986**, *25*, 2754-2760.
88. Jr, T. P., *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic Press: New York, 1986.
89. Dighe, S. U.; Khan, S.; Soni, I.; Jain, P.; Shukla, S.; Yadav, R.; Sen, P.; Meeran, S. M.; Batra, S., Synthesis of #-carboline-based N-heterocyclic carbenes and their antiproliferative and anti-metastatic activities against human breast cancer cells. *J Med Chem* **2015**, *58*, 3485-3499.
90. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed.; New York, 2013.

91. Darabi, F.; Hadadzadeh, H.; Ebrahimi, M.; Khayamian, T.; Rudbari, H. A., The piroxicam complex of cobalt(II): Synthesis in two different ionic liquids, structure, DNA- and BSA interaction and molecular modeling. *Inorg Chim Acta* **2014**, *409*, 379-389.
92. Barton, J. K.; Goldberg, J. M.; Kumar, C. V.; Turro, N. J., Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *J Am Chem Soc* **1986**, *108*, 2081-2088.
93. Kessler, R. L.; Soares, M. J.; Probst, C. M.; Krieger, M. A., *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e55497.
94. Menna-Barreto, R. F. S., Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis* **2019**, *10* (2), 1-11.
95. Smirlis, D.; Soteriadou, K., Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence* **2011**, *2* (3), 253-6.
96. Sandes, J. M.; Fontes, A.; Regis-da-Silva, C. G.; de Castro, M. C.; Lima-Junior, C. G.; Silva, F. P.; Vasconcellos, M. L.; Figueiredo, R. C., *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile. *PLoS One* **2014**, *9* (4), e93936.
97. Alvarez, V. E.; Kosec, G.; Sant'Anna, C.; Turk, V.; Cazzulo, J. J.; Turk, B., Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **2008**, *283* (6), 3454-3464.
98. Deolindo, P.; Teixeira-Ferreira, A. S.; Melo, E. J.; Arnholdt, A. C. V.; Souza, W. d.; Alves, E. W.; DaMatta, R. A., programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by Bothrops jararaca venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2005**, *100* (1), 33-38.
99. Irigoin, F.; Inada, N. M.; Fernandes, M. P.; Piacenza, L.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E.; Radi, R., Mitochondrial calcium overload triggers

- complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **2009**, *418* (3), 595-604.
100. Veiga-Santos, P.; Reignault, L. C.; Huber, K.; Bracher, F.; De Souza, W.; De Carvalho, T. M., Inhibition of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **2014**, *141* (6), 814-25.
101. Livak, K. J.; Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402-8.
102. Kowalski, S.; Wyrzykowski, D.; Inkielewicz-Stepniak, I., Molecular and Cellular Mechanisms of Cytotoxic Activity of Vanadium Compounds against Cancer Cells. *Molecules* **2020**, *25* (7).
103. Docampo, R.; Vercesi, A. E., Mitochondrial Ca²⁺ and reactive oxygen species in trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* **2021**.
104. Zuma, A. A.; da Silva, R. B.; Garden, S. J.; de Souza, W., *In vitro* study of the trypanocidal activity of anilinophenanthrolines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int* **2021**, *83*, 102338.
105. Turrens, J. F.; Newton, C. L.; Zhong, L.; Hernandez, R.; Whitfield, J.; Docampo, R., Mercaptopyridine-N-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol Let* **1999** *175* 217-221.
106. Patrick B. Christmas, J. F. T., Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Let* **2000** *183*, 225-228.
107. Rodríguez Arce, E.; Sarniguet, C.; Moraes, T. S.; Vieites, M.; Tomaz, A. I.; Medeiros, A.; Comini, M. A.; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Marques, F.; García, M. H.; Otero, L.; Gambino, D., A new ruthenium

- cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites. *J Coord Chem* **2015**, 68 (16), 2923-2937.
108. Vazquez, M. P.; Levin, M. J., Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Genetics* **1999**, 239, 217-225.

CAPÍTULO 4

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

CAPÍTULO 4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Contenido

4.1	INTRODUCCIÓN.....	233
4.2	COMPUESTOS HETEROLÉPTICOS DE OXOVANADIO (V).....	234
4.2.1	Compuestos $[V^{VO}(LS-2H)(L0-H)]$ y $[V^{VO}_2(LS-H)]$, LS = LS1-LS4.....	234
4.2.1.1	Síntesis	237
4.2.1.2	Caracterización en estado sólido.....	238
4.2.1.2.1	Análisis elemental	238
4.2.1.2.2	Espectroscopía infrarroja.....	239
4.2.1.2.3	Difracción de Rayos X para $[V^{VO}_2(LS3-H)] \cdot H_2O$	243
4.2.1.3	Caracterización en disolución	247
4.2.1.3.1	Conductimetría.....	247
4.2.1.3.2	Resonancia magnética nuclear	247
4.2.2	Compuestos $[V^{VO}(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]$, L=L0-L4	252
4.2.2.1	Síntesis	254
4.2.2.1.1	Síntesis de los ligandos.....	254
4.2.2.1.2	Síntesis de los compuestos de coordinación	255
4.2.2.2	Caracterización en estado sólido.....	256
4.2.2.2.1	Análisis elemental	256
4.2.2.2.2	Espectroscopía infrarroja.....	258
4.2.2.2.3	Difracción de Rayos X para IN y $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] \cdot 1,5 THF$...	262
4.2.2.2.4	Difracción de Rayos X para $[V^{VO}(BrIS-2H)(L1-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})0,5(CH_2Cl_2)$	268
4.2.2.3	Caracterización en disolución	273
4.2.2.3.1	Conductimetría.....	273
4.2.2.3.2	Resonancia magnética nuclear	274
4.5	COMPUESTOS HETEROLÉPTICOS $[V^{VO}(L-H)(mpo)]$, L=L0-L4.....	280
4.5.1	Síntesis	281
4.5.2	Caracterización al estado sólido.....	282
4.5.2.1	Análisis elemental	282
4.5.2.2	Análisis termogravimétrico	283

4.5.2.3	Espectroscopía infrarroja.....	284
4.5.2.4	Susceptibilidad magnética	286
4.5.3	Caracterización en disolución	287
4.5.3.1	Conductimetría.....	287
4.5.3.2	Resonancia paramagnética electrónica	287
4.6	COMPUESTOS HOMOLÉPTICOS $[V^{IV}O(L-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$, L = L0-L4.....	290
4.6.1	Síntesis	291
4.6.2	Caracterización al estado sólido.....	293
4.6.2.1	Análisis elemental	293
4.6.2.2	Espectroscopía infrarroja.....	294
4.6.3	Caracterización en disolución	294
4.6.3.1	Resonancia magnética nuclear	294
4.6.3.2	Resonancia paramagnética electrónica	296
4.7	CONCLUSIONES PARCIALES.....	299
4.8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	302

4.1 INTRODUCCIÓN

En capítulos anteriores se introdujeron algunos aspectos generales del vanadio, su química en disolución, las ventajas farmacológicas que han posicionado a los compuestos basados en vanadio como promisorios metalofármacos y los antecedentes del grupo en cuanto a la obtención de compuestos de coordinación activos frente a parásitos tripanosomátidos. Además, se abordaron los antecedentes relevantes para la Química Medicinal de los ligandos seleccionados incluidos en esta propuesta.

Desde el punto de vista de la química de coordinación el vanadio es un metal notablemente flexible. El vanadio (V) tiene escasos requisitos estereoquímicos, dando lugar a la formación de compuestos con números de coordinación variables, con geometrías que van desde tetraédrica y octaédrica, hasta bipirámide trigonal o pentagonal. El vanadio (IV) es mucho menos flexible, dando lugar a, principalmente, complejos pentacoordinados de geometría pirámide de base cuadrada y, en el caso de que se ocupe una sexta posición, se forman complejos de geometría octaédrica distorsionada ¹. Dependiendo del entorno de coordinación del vanadio, los complejos de este metal muestran estabilidad termodinámica e inercia cinética muy variable ^{1,2}.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el vanadio es muy sensible a los cambios redox, por lo que es necesario controlar cuidadosamente las condiciones experimentales de síntesis para lograr la obtención de los compuestos con un determinado estado de oxidación evitando mezclas de productos y resultados no reproducibles.

Las bases de Schiff propuestas en este trabajo como ligandos tridentados que permitan estabilizar el compuesto obtenido, poseen los átomos donores ONO, adecuados para coordinar de forma tridentada al vanadio en ambos estados de oxidación (IV y V). De hecho, nuestro grupo ha desarrollado compuestos de coordinación del metal en ambos estados de oxidación con los

ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído utilizados en este trabajo ³⁻⁶.

Los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina y el Hmpo presentan átomos donores adecuados para su coordinación a iones metálicos actuando como ligandos bidentados, formando anillos quelatos de seis y cinco miembros, respectivamente ⁷⁻¹⁶.

En el presente capítulo se discute la síntesis y caracterización de los nuevos compuestos homolépticos y heterolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con ligandos bioactivos en parásitos tripanosomátidos explorados en esta tesis, así como aspectos estructurales al estado sólido y su comportamiento en disolución.

4.2 COMPUESTOS HETEROLÉPTICOS DE OXOVANADIO (V)

4.2.1 Compuestos $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$ y $[V^VO_2(LS-H)]$, LS = LS1-LS4

Se obtuvieron cuatro nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (LS1-LS4) y el ligando bioactivo 8-hidroxiquinolina (L0), de fórmula general $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$ (Figura 4.1), siguiendo los precedimientos que se detallaron en el capítulo 3. En esta serie de compuestos, se planteó la inclusión de 4 ligandos semicarbazonas dejando fijo el ligando bioactivo bidentado (L0) (Figura 4.1A-B), con el fin desarrollar una serie estructuralmente relacionada que permita estudiar el efecto del de la coordinación de los ligandos tridentados conteniendo diferentes sustituyentes sobre el anillo fenólico.

La síntesis de los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído, LS1-LS4, (Figura 4.1A) se realizó siguiendo un procedimiento experimental previamente descrito, haciendo reaccionar cantidades equimolares de semicarbazida con el correspondiente aldehído como se detalló en la *sección*

3.1.2.1 del capítulo 3. Los ligandos LS se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y ^1H RMN según los reportes previos ^{5, 6, 17-21}.

Por su parte, los compuestos $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2(\text{LS1-H})]$, $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2(\text{LS2-H})]$, $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2(\text{LS3-H})]$ y $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}_2(\text{LS4-H})]$ (Figura 4.1C), fueron sintetizados y caracterizados haciendo reaccionar el ligando semicarbazona LS correspondiente con la cantidad estequiométrica del precursor $[\text{V}^{\text{V}}\text{O}(\text{acac})_2]$ siguiendo los procedimientos reportados previamente ¹⁹. En la *sección* 3.1.3.1 del capítulo 3 se detallan las condiciones experimentales para cada uno de los compuestos.

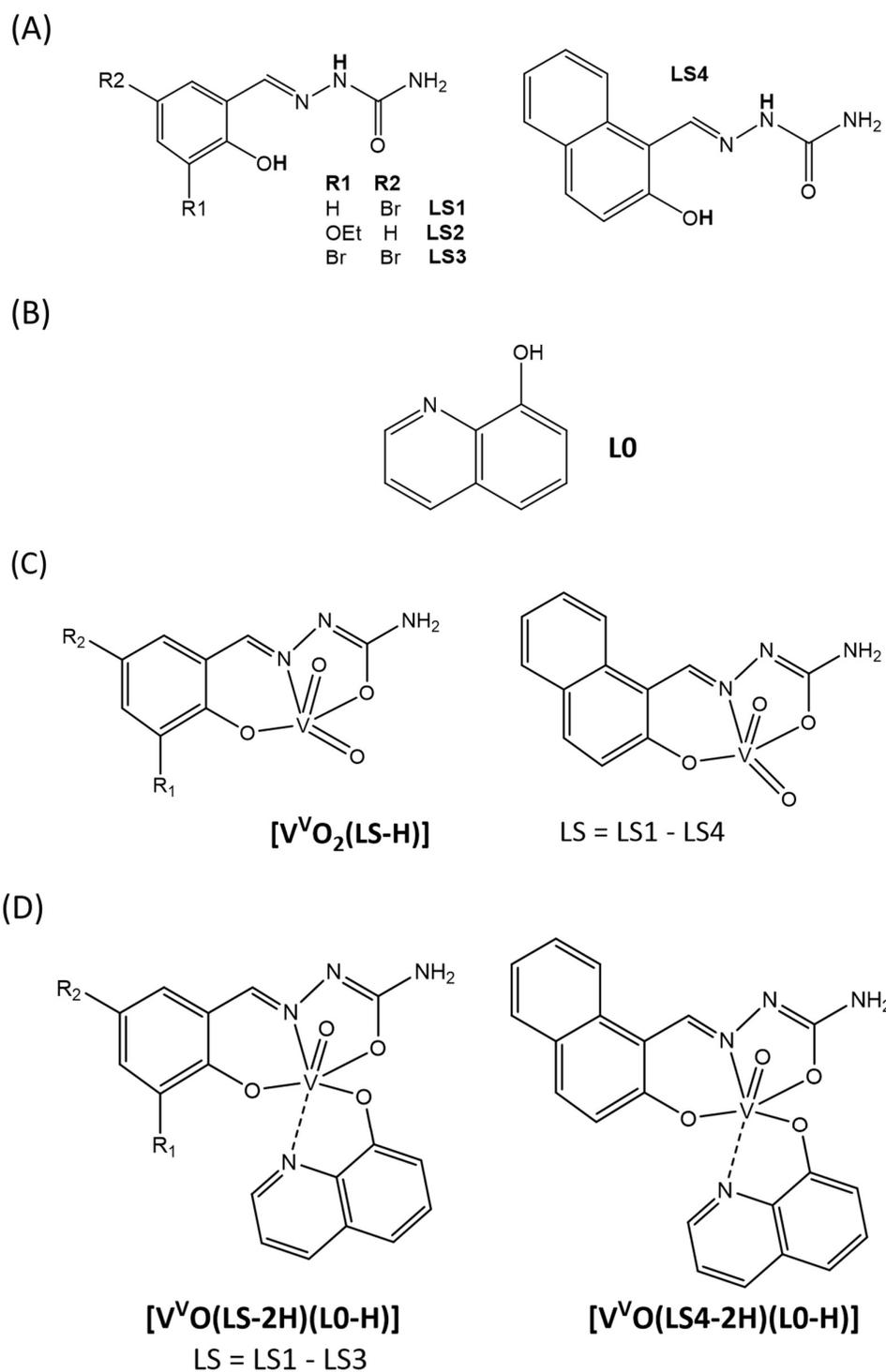


Figura 4.1. (A) Estructura de los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído LS1-LS4; (B) Estructura de la 8-hidroxiquinolina (L0); (C) Estructura molecular de los compuestos $[V^VO_2(LS-H)]$ (D) Estructura molecular de los compuestos $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$.

4.2.1.1 Síntesis

Para la obtención de los compuestos se pusieron a punto las condiciones de síntesis que permitieron obtenerlos con rendimiento y pureza adecuados. Se lograron obtener los cuatro compuestos haciendo reaccionar $[V^{IV}O(acac)_2]$ con el ligando tridentado LS y la 8-hidroxiquinolina, en cantidades equimolares, en THF a reflujo (*Método 1, Sección 3.1.7.1, Capítulo 3*). Todos los compuestos, $[V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)]$, $[V^{VO}(LS2-2H)(L0-H)]$, $[V^{VO}(LS3-2H)(L0-H)]$ y $[V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]$ (Figura 4.1D), se obtuvieron como sólidos azul púrpura. Para los complejos $[V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)]$ y $[V^{VO}(LS2-2H)(L0-H)]$ se obtuvo un rendimiento de 54 % (63 y 58 mg respectivamente), para el complejo $[V^{VO}(LS3-2H)(L0-H)]$ el rendimiento fue de 45 % (62 mg) y para el compuesto $[V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]$ se obtuvo un bajo rendimiento de 18 % (20 mg). Los rendimientos de $[V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)]$, $[V^{VO}(LS2-2H)(L0-H)]$ y $[V^{VO}(LS3-2H)(L0-H)]$ se consideraron aceptables. Sin embargo, dado que el rendimiento de $[V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]$ por el *Método 1* fue demasiado bajo, se exploraron métodos de obtención alternativos para incrementarlo. Partiendo del precursor de vanadio (V) NH_4VO_3 y la cantidad estequiométrica de los ligandos LS y L0, en metanol a reflujo, se obtuvo el complejo $[V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]$ con un 67 % de rendimiento (73 mg) (*Método 2 Sección 3.1.7.2, Capítulo 3*)²⁰.

El nuevo compuesto $[V^{VO}_2(LS3-H)]$, donde LS3 = 3,5-dibromosalicilaldehído semicarbazona, se sintetizó adaptando los procedimientos reportados previamente^{5, 19} y el procedimiento experimental final se detalló en la sección 3.1.3.2 del Capítulo 3. El rendimiento de la obtención fue de un 29 % (47 mg)²⁰.

4.2.1.2 Caracterización en estado sólido

4.2.1.2.1 Análisis elemental

La fórmula química propuesta para cada compuesto heteroléptico $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$ se confirmó mediante análisis elemental de elementos livianos carbono, hidrógeno y nitrógeno. El valor porcentual obtenido de cada uno de estos elementos está de acuerdo con los valores teóricos calculados según la fórmula propuesta (Tabla 4.1). Para el caso del compuesto $[V^VO_2(LS3-H)]$, los valores porcentuales obtenidos se ajustan con la fórmula $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$, donde el complejo, incluye una molécula de agua de cristalización ²⁰.

Tabla 4.1. Resultados de análisis elemental de C, H y N de los complejos $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$ y $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot THF$

Compuesto	%C _{exp} (%C _{teo})	%H _{exp} (%H _{teo})	%N _{exp} (%N _{teo})	Fórmula
$[V^VO(LS1-2H)(L0-H)]$	43,86 (43,71)	2,69 (2,59)	11,74 (11,99)	$C_{17}H_{12}BrN_4O_4V$
$[V^VO(LS2-2H)(L0-H)]$	52,75 (52,79)	3,88 (3,96)	12,82 (12,96)	$C_{19}H_{17}N_4O_5V$
$[V^VO(LS3-2H)(L0-H)]$	37,62 (37,39)	2,19 (2,03)	10,17 (10,26)	$C_{17}H_{11}Br_2N_4O_4V$
$[V^VO(LS4-2H)(L0-H)]$	57,42 (57,54)	3,59 (3,45)	12,63 (12,78)	$C_{21}H_{15}N_4O_4V$
$[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$	22,21 (21,99)	1,83 (1,85)	9,75 (9,62)	$C_8H_8BrN_3O_5V$

4.2.1.2.2 Espectroscopía infrarroja

Se midieron los espectros de infrarrojo (IR) de los 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.

En primer lugar, se asignaron las bandas características de los ligandos semicarbazonas, lo cual resultó fundamental para comprender el modo de coordinación al centro metálico. A efectos comparativos, en la Figura 4.2 se muestra, como ejemplo, el espectro de infrarrojo obtenido para el complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS1-H})(\text{L0-H})]$ y para el ligando LS1 en su forma libre. La Tabla 4.2 resume la asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los cuatro complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$ y los ligandos libres LS1-LS4.

Los cuatro complejos de oxovanadio (V) obtenidos, $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, mostraron un perfil espectral similar. Como consecuencia de la formación del compuesto de coordinación, se observaron corrimientos en los valores de número de onda de las bandas asignadas a grupos funcionales cercanos a los átomos donores. Basándonos en reportes previos del comportamiento vibracional de complejos de vanadio con derivados de las semicarbazonas de salicilaldehído, se identificaron algunas bandas de vibración características de los ligandos en los complejos y se asignaron tentativamente (Tabla 4.2) ^{3-6, 17-19, 21-23}.

Para todos los compuestos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, la ausencia de las bandas $\nu(\text{C}=\text{O})$, presentes en los ligandos alrededor de 1671-1698 cm^{-1} , indica la enolización de la funcionalidad amida por coordinación con el centro $(\text{V}^{\text{VO}})^{3+}$. En su lugar se observan fuertes bandas entre 1618 y 1654 cm^{-1} , que se pueden atribuir a las frecuencias de estiramiento del enlace simple CO, característico de la coordinación de estos ligandos en forma de enolatos ^{18, 19, 22}. La disminución de energía en las frecuencias $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$ y la desaparición de las bandas $\nu(\text{N-}$

H) (en la región de 3160-3177 cm^{-1}) y $\nu(\text{O-H})$ (en la región de 3450-3473 cm^{-1}) está de acuerdo con la coordinación tridentada del ligando LS doble deprotonado a través del oxígeno carbonílico, el nitrógeno azometínico y el oxígeno fenólico. Para los cuatro complejos se identificó la banda intensa a alrededor de 975 cm^{-1} , asignada al estiramiento $\nu(\text{V=O})$, característica del centro $\text{V}^{\text{VO}^{3+}}$ (Figura 4.1) (Tabla 4.2).

La presencia simultánea del ligando LS y la L0 en la esfera de coordinación del vanadio conduce a espectros bastante complejos, específicamente en la región 1650-1500 cm^{-1} , donde aparecen muchas bandas que corresponden a $\nu(\text{C=C})$ y $\nu(\text{C=N})$ en compuestos heterocíclicos. La ausencia de la banda en 3450 cm^{-1} está de acuerdo con la deprotonación del ligando L0 una vez se forma el compuesto de coordinación ²⁴.

Tabla 4.2. Asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$ y los ligandos libres LS1-LS4. La frecuencia de las bandas se expresada en cm^{-1} .

Compuesto	$\nu(\text{VO})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$ ^[a]	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{NH})$
LS1	-	1698 s	1596 s	3470 m	3170 m
$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS1}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$	977 m	1642 s	1596 s	-	-
LS2	-	1676 s	1586 s	3466 m	3160 m
$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS2}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$	976 m	1654 s	1595 s	-	-
LS3	-	1674 s	1600 s	3473 m	3177 m
$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS3}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$	975 m	1649 s	1604 s	-	-
LS4	-	1671 s	1602 s	3450 m	3175 m
$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$	976 m	1618 s	1591 m	-	-

s: intensa; m: intensidad media

^[a] Las bandas asignadas a la frecuencia de estiramiento $\nu(\text{C=N})$ (nitrógeno azometínico) están solapadas con las bandas correspondientes $\nu(\text{C=C})$ del anillo heterocíclico.

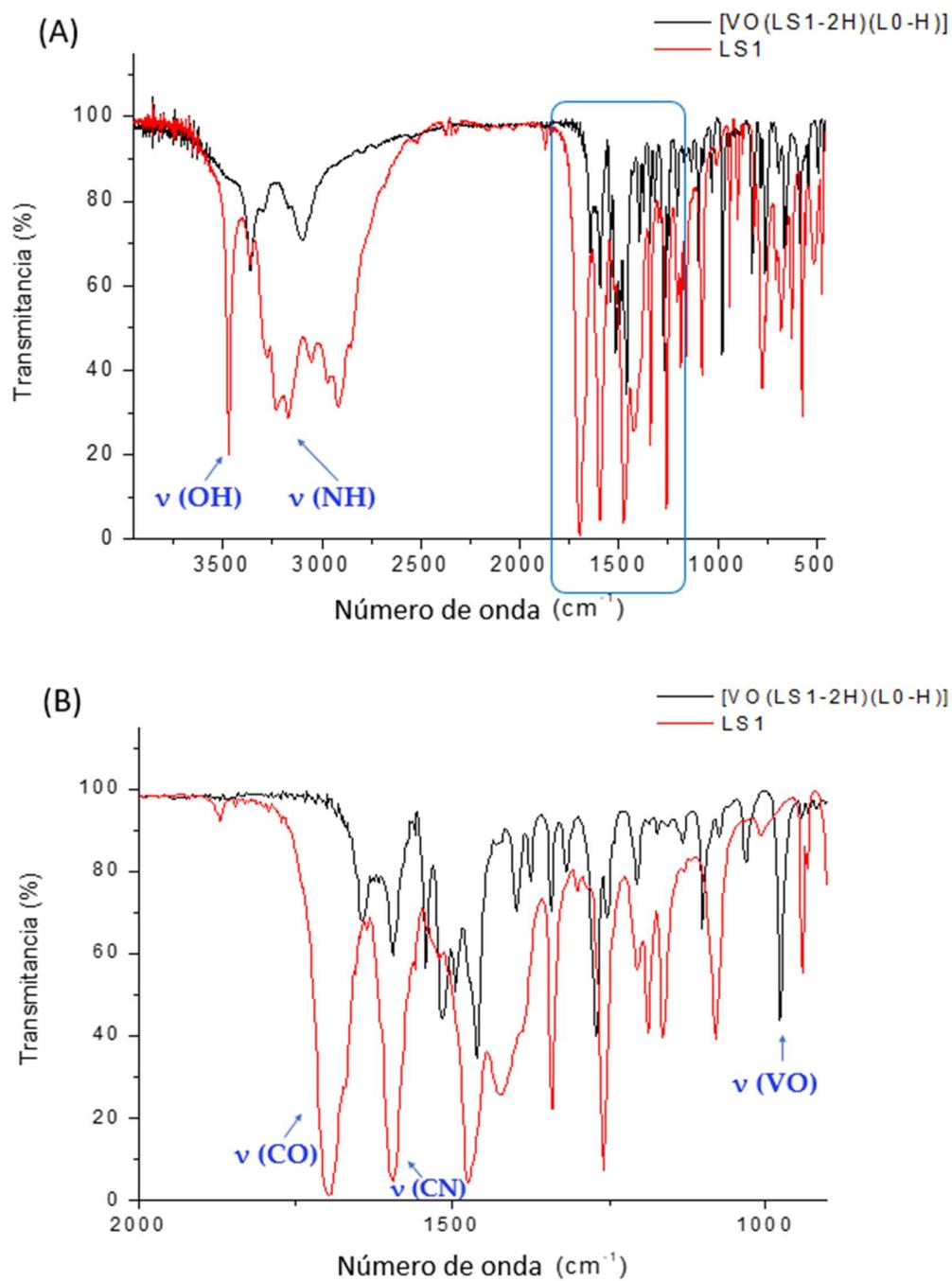


Figura 4.2. Espectros IR del complejo [VO(LS1-2H)(L0-H)] y del ligando libre LS1 (A) Rango entre 4000-400 cm⁻¹; (B) Rango entre 2000-900 cm⁻¹. Se indica la asignación tentativa de algunas bandas, basada en reportes previos.

En el caso del nuevo compuesto homoléptico $[V^VO_2(LS3-H)]$, el patrón encontrado en el espectro IR fue muy similar a los reportados previamente para los complejos $[V^VO_2(LS1-H)]$, $[V^VO_2(LS2-H)]$ y $[V^VO_2(LS4-H)]$ (Tabla 4.3) ^{3, 4, 18, 19}. En este caso, el corrimiento de la frecuencia de estiramiento $\nu(C=O)$ y $\nu(C=N)$ y la desaparición de la banda $\nu(O-H)$, está de acuerdo con la coordinación tridentada a través del oxígeno carbonílico, el nitrógeno azometínico y el oxígeno fenólico, y la deprotonación del ligando semicarbazona en el hidroxilo fenólico. Por su parte, se observaron dos señales en 893 y 862 cm^{-1} que se asignaron a los estiramientos simétrico y asimétrico, que son característicos del centro VO_2^+ .

Tabla 4.3. Asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los complejos $[V^VO_2(LS-H)]$, y los ligandos libres LS1-LS4. Las posiciones de las bandas son expresadas en cm^{-1} .

Compuesto	$\nu_{as}(VO_2^+)$	$\nu_s(VO_2^+)$	$\nu(C=O)$	$\nu(C=N)$	$\nu(O-H)$
LS1	-	-	1698 s	1596 s	3470 m
$[V^VO_2(LS1-H)]^{[a]}$	895 s	883 m	1668 m	1613 s	-
LS2	-	-	1676 s	1586 s	3466 m
$[V^VO_2(LS2-H)]^{[b]}$	942 s	895 m	1662 m	1555 s	-
LS3	-	-	1674 s	1600 s	3473 m
$[V^VO_2(LS3-H)]$	893 s	862 m	1658 m	1604 s	-
LS4	-	-	1671 s	1602 s	3450 m
$[V^VO_2(LS4-H)]^{[a]}$	932 s	902 m	1646 m	1603 s	-

s: intensa; m: intensidad media

^[a] Extraído de la referencia ³

^[b] Extraído de la referencia ⁵

4.2.1.2.3 Difracción de Rayos X para $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$

Se obtuvieron monocristales del compuesto $[V^VO_2(LS3-H)] \cdot H_2O$ adecuados para la redisolución de la estructura por difracción de rayos X por evaporación lenta de una disolución etanólica a temperatura ambiente.

En la Figura 4.3 se representa el compuesto en un diagrama ORTEP (de sus siglas en inglés, Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot). Los datos de los cristales, parámetros de celda, procedimientos de colección de datos, determinación de la estructura cristalina y refinamiento se incluyeron en la Tabla 4.4. Otros datos cristalográficos (CIF y checkCIF) se adjuntan en el Apéndice 1.

El compuesto cristaliza en un sistema monoclinico con grupo espacial $P2_1/c$. Los ángulos y longitudes de enlace en torno al centro de vanadio (V) se resumen en la Tabla 4.5.

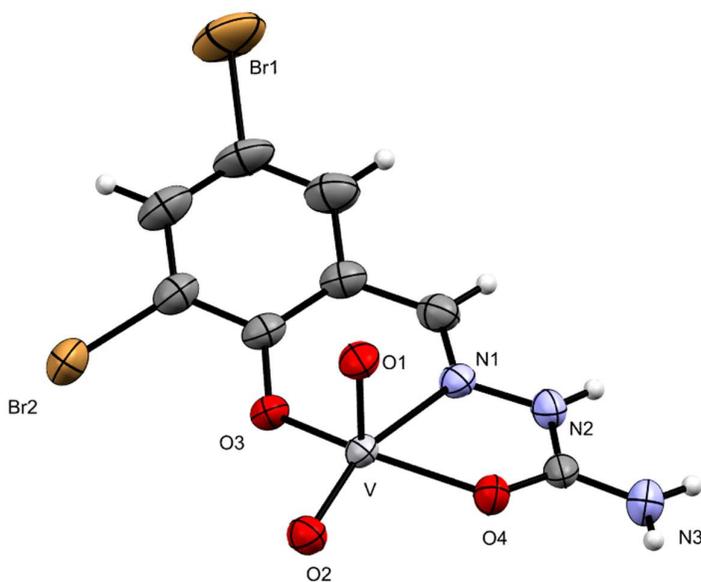


Figura 4.3. Estructura cristalina del compuesto $[V^VO_2(L3-H)] \cdot H_2O$. Las etiquetas de los átomos de H y la molécula de cristalización se omitieron para mejorar la visualización de la imagen. El diagrama ORTEP muestra la representación de elipsoides de desplazamiento al nivel de probabilidad del 50 %.

Tabla 4.4. Datos del cristal y resultados del refinamiento estructural de [VVO₂(LS3-H)]·H₂O

Fórmula empírica	C ₈ H ₈ Br ₂ N ₃ O ₅ V
Peso fórmula	436,93
Temperatura (K)	273(2)
Longitud de onda (Å)	CuKα (λ = 1,54178)
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
Dimensiones de la celda unidad	
a (Å)	14,2630(4)
b (Å)	12,7840(3)
c	7,7492(2)
β (°)	93,0590(10)
Volumen (Å ³)	1410,96(6)
Z; densidad calculada (g cm ⁻³)	4; 2,057
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	12,719
F(000)	840,0
Forma del cristal/color	platos/ amarillos
Tamaño del cristal (mm ³)	0,19 × 0,137 × 0,023
Rango de recolección en θ (°)	3,1 a 74,71
Índices de Miller	-17 ≤ h ≤ 17, -15 ≤ k ≤ 15, -8 ≤ l ≤ 9
Reflexiones colectadas	24171
Reflexiones independientes	2882 [R _{int} = 0,0371, R _{sigma} = 0,0198]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	2577
Compleitud (%)	99,7
Corrección por absorción	multi-scan
Factores de transmisión máx. y mín.	0,7538 and 0,4743
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²

Datos / restricciones / parámetros	2882/0/181
Bondad de ajuste en F ² (GooF)	1,074
Índices R finales ^a [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0360, wR ₂ = 0,1077
Índices R finales (todos los datos)	R ₁ = 0,0405, wR ₂ = 0,1119
Mayor diferencia entre pico y hueco (e/ Å ³)	1,08/-0,89

$$^a R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, wR_2 = \left[\frac{\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2}{\sum w(|F_o|^2)^2} \right]^{1/2}$$

Tabla 4.5. Longitudes [Å] y ángulos de enlace alrededor del centro de vanadio (V) [°] en el compuesto [V^vO₂(L3-H)]·H₂O

Longitudes de enlace	
V-O(1)	1,663(2)
V-O(2)	1,632(2)
V-O(3)	1,912(2)
V-O(4)	2,022(2)
V-N(1)	2,185(2)
Ángulos de enlace	
O(1)-V-O(2)	106,65(12)
O(1)-V-O(3)	99,42(11)
O(2)-V-O(3)	101,46(11)
O(1)-V-O(4)	96,780(11)
O(2)-V-O(4)	95,43(11)
O(3)-V-O(4)	152,09(10)
O(1)-V-N(1)	91,93(11)
O(2)-V-N(1)	159,66(11)

O(3)-V-N(1)	83,11(10)
O(4)-V-N(1)	73,75(10)

El centro dioxovanadio (V), VO_2^+ , muestra una conformación angular con longitudes de enlace V-O de 1,663(2) y 1,632(2) Å y un ángulo O-V-O de 106,654(12)°. La estructura es similar a la reportada previamente para los compuestos análogos $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS1-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS2-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS4-H})]$ ^{5, 18, 19}. Las unidades monoméricas se encuentran empaquetadas en la estructura cristalina como una cadena infinita, con una longitud de enlace entre el átomo V y el O(1b) de la siguiente unidad, de 2,297(2), mayor a las longitud de enlace V-O correspondientes a VO_2^+ (Tabla 4.5) ^{5, 18, 19}.

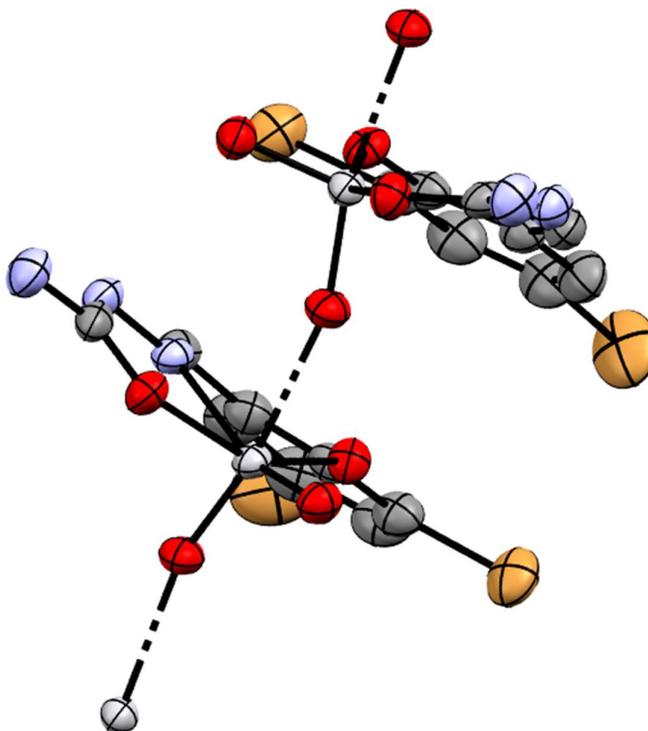


Figura 4.4. Empaquetamiento del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{L3-H})]\cdot\text{H}_2\text{O}$. El diagrama ORTEP muestra la representación de elipsoides de desplazamiento al nivel de probabilidad del 50 %.

Los datos cristalográficos se depositaron en la base de datos de Cambridge (CCDC, Cambridge Crystallographic Data Centre), publicación N° CCDC-1855022. La copia de los datos puede ser adquirida de forma gratuita en CCDC (12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, IL, Tel: +44-1223-336408, FAX:+44-1223-336003, e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Sitio web: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

4.2.1.3 Caracterización en disolución

4.2.1.3.1 Conductimetría

La conductividad molar, medida en soluciones de concentración 1 mM en DMSO para todos los nuevos complejos fue de $\sim 3\text{-}5 \text{ Scm}^2/\text{mol}$. Los valores obtenidos indican que se trata de compuestos neutros, tal como se propone para los complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-H})(\text{L0-H})]$ ²⁵.

4.2.1.3.2 Resonancia magnética nuclear

La caracterización en disolución de los complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{L3-H})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ se realizó mediante experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensional (^1H RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC). Los estudios fueron realizados a temperatura ambiente en soluciones de cada complejo en $\text{DMSO-}d_6$.

Se numeraron los protones de los ligandos semicarbazona (LS) y la 8-hidroxiquinolina (L0) como se muestra en la Figura 4.5. A efectos comparativos, en la Figura 4.6 se muestra, como ejemplo, el espectro de ^1H RMN obtenido para el complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS1-H})(\text{L0-H})]$ y los ligandos LS1 y L0 en su forma libre.

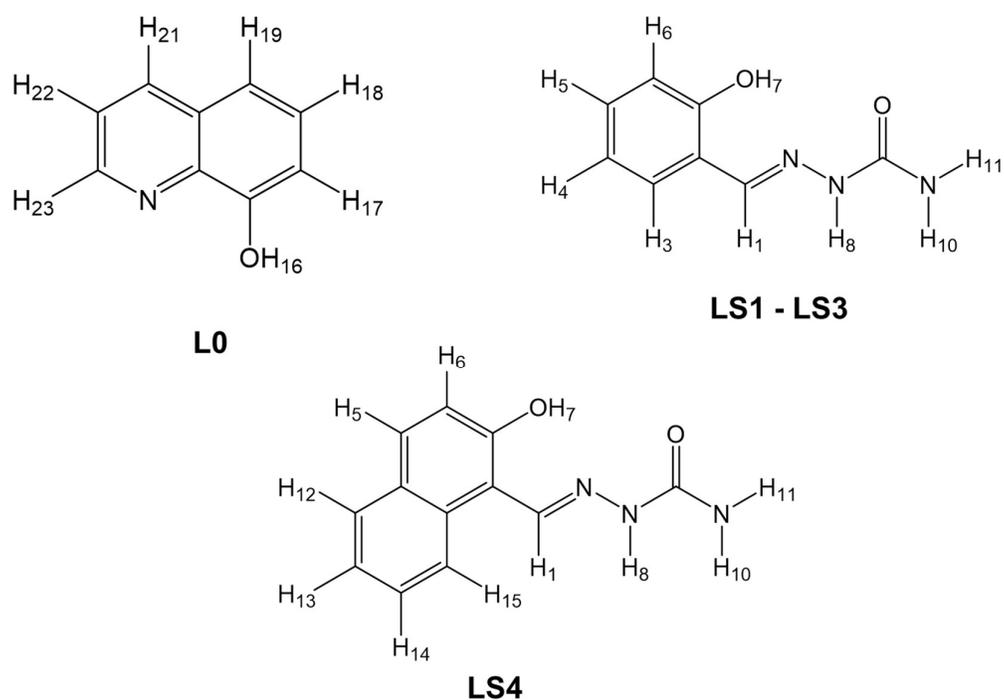


Figura 4.5. Esquema de numeración de los átomos de los ligandos semicarbazona (LS) y la 8-hidroxiquinolina (L0)

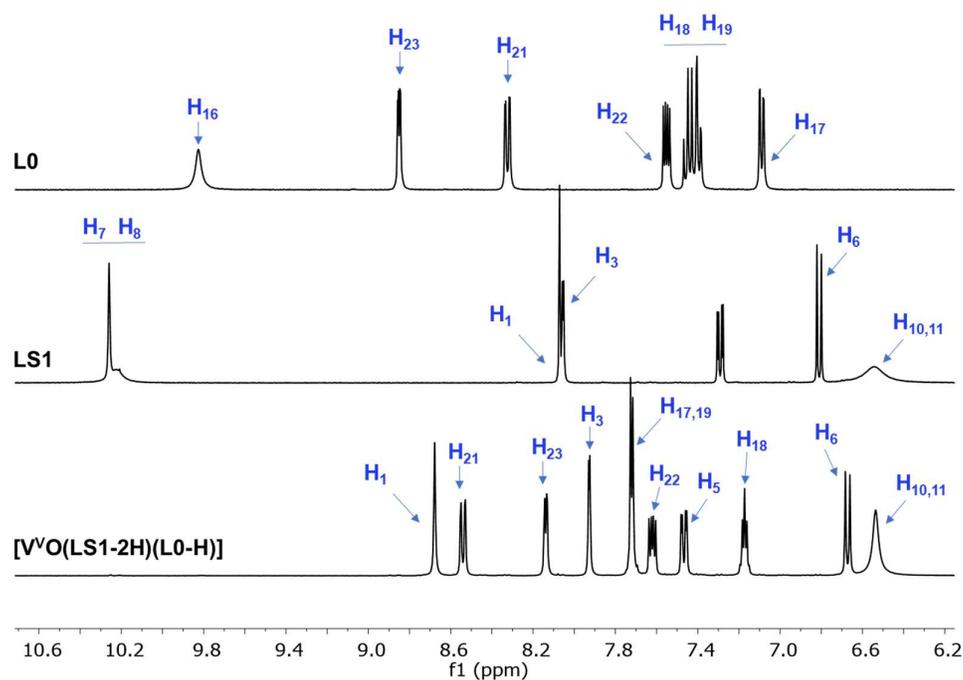


Figura 4.6. Espectros ^1H RMN del complejo $[\text{VO}(\text{LS1-H})(\text{L0-H})]$ y de los ligandos libres LS1 y L0 en $\text{DMSO-}d_6$.

Los datos espectroscópicos muestran señales estrechas, típicas de complejos diamagnéticos y, por tanto, se confirma la presencia de V (V) como átomo central de los complejos de fórmula general $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$ y del complejo $[V^VO_2(LS3-H)]$. Los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC permitieron la asignación de todas las señales 1H para los ligandos libres y los complejos estudiados. Los desplazamientos químicos en los espectros 1H RMN (δ), así como las diferencias en los desplazamientos entre cada complejo y los ligandos correspondientes (expresado como $\Delta\delta$) se detallan en la Tabla 4.6. La multiplicidad de las señales y la integración de estas en 1H -RMN están de acuerdo con las fórmulas moleculares propuestas.

Los cuatro complejos $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$ muestran cambios similares en los desplazamientos químicos de los protones del ligando L0 y en los fragmentos comunes de los ligandos LS (Tabla 4.6). Además, los cuatro nuevos complejos $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$ muestran cambios en los desplazamientos químicos del mismo orden que los observados para los fragmentos en común de los respectivos complejos homolépticos $[V^VO_2(LS-H)]$ (para L1, L2 y L4, previamente publicados)^{5,19}. Los protones 7, 8 y 16 no están presentes en los espectros de los cuatro complejos $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$, lo cual está de acuerdo con la doble deprotonación de la semicarbazona y de la monodeprotonación del ligando L0. Como se ha discutido previamente para los complejos $[V^VO_2(LS-H)]$ ^{5,19}, una vez que los derivados de LS se coordinan al centro metálico, el efecto desapantallante del metal sobre los protones cercanos a los átomos donores causa cambios significativos en los desplazamientos hacia campos menores de las señales en los espectros 1H -RMN, en este caso para los protones 1 y 17. El desplazamiento a campos mayores de la señal del protón 3 podría ser el resultado de una disminución del efecto anisotrópico del grupo azometínico en la forma coordinada del ligando LS. Cuando LS se coordina, este grupo se fija en la distribución espacial opuesta al protón 3, y por tanto, éste se ve menos afectado

por la anisotropía magnética del doble enlace C=N que en el ligando libre. Este efecto también fue observado para los compuestos [V^VO₂(LS-H)] con los ligandos L1, L2 y L4 previamente publicados ^{5,19}. El compuesto [V^VO₂(LS3-H)] presenta un patrón de señales similar a los compuestos análogos reportados. La multiplicidad de las señales y la integración de estas en ¹H-RMN están de acuerdo con la fórmula molecular propuesta.

Tabla 4.6. Valores de desplazamiento químico (δ) de los espectros ¹H-RMN de los complejos [V^VO(LS-H)(L0-H)] en DMSO-*d*₆ a 25°C (δ , ppm). Se incluyen los ligandos libres a modo de comparación.

H	[V ^V O(LS1-H)(L0-H)]			[V ^V O(LS2-H)(L0-H)]			[V ^V O(LS3-H)(L0-H)]			[V ^V O(LS4-H)(L0-H)]		
	δ_{ligando}	δ_{complejo}	$\Delta\delta$									
1	8,07	8,68	0,61	8,17	8,66	0,49	8,07	8,71	0,64	8,87	9,42	0,55
3	8,05	7,93	-0,12	7,34	7,28	-0,06	7,93	7,96	-0,03	-	-	-
4	-	-	-	6,75	6,93	0,18	-	-	-	-	-	-
5	7,29	7,47	0,18	6,92	7,06	0,14	7,71	7,83	0,12	7,84	7,96	0,12
6	6,81	6,67	-0,14	-	-	-	-	-	-	7,19	7,01	-0,18
7	10,23	-	-	9,19	-	-	10,70	-	-	11,25	-	-
8	10,23	-	-	10,21	-	-	10,48	-	-	10,26	-	-
10	6,55	6,54	-0,01	6,41	6,38	-0,03	6,58	6,63	0,05	6,42	6,43	0,01
11												
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,84	7,92	0,08
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,55	7,43	-0,12
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,37	7,64	0,27
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,38	8,44	0,14
CH₂	-	-	-	4,03	3,94	-0,09	-	-	-	-	-	-
CH₃	-	-	-	1,35	1,15	-0,20	-	-	-	-	-	-
16	9,82	-	-	9,82	-	-	9,82	-	-	9,82	-	-
17	7,09	7,71	0,62	7,09	7,71	0,62	7,09	7,75	0,66	7,09	7,73	0,64
18	7,41	7,17	-0,24	7,41	7,17	-0,24	7,41	7,21	-0,20	7,41	7,20	-0,21
19	7,41	7,71	0,30	7,41	7,71	0,30	7,41	7,75	0,34	7,41	7,73	0,32
21	8,32	8,54	0,22	8,32	8,52	0,20	8,32	8,56	0,24	8,32	8,53	0,21
22	7,53	7,62	0,09	7,53	7,60	0,07	7,53	7,64	0,11	7,53	7,59	0,06
23	8,85	8,14	-0,71	8,85	8,12	-0,73	8,85	8,16	-0,69	8,85	8,17	-0,68

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$$

$[V^VO(LS1-2H)(L0-H)]$ 1H RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 8,68 (s, 1H), 8,54 (dd, $J = 8,3$, 1,5 Hz, 1H), 8,14 (dd, $J = 4,5$, 1,4 Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,76 – 7,70 (m, 2H), 7,62 (dd, $J = 8,3$, 4,5 Hz, 1H), 7,47 (dd, $J = 8,8$, 2,6 Hz, 1H), 7,19 – 7,12 (m, 1H), 6,67 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 6,53 (s, 2H).

$[V^VO(LS2-2H)(L0-H)]$ 1H RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 8,65 (s, 1H), 8,53 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,12 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,61 (dd, $J = 8,3$, 4,5 Hz, 1H), 7,28 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,18 (dd, $J = 6,0$, 2,7 Hz, 1H), 7,05 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,91 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,38 (s, 2H), 3,94 (m, 2H), 1,15 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H)

$[V^VO(LS3-2H)(L0-H)]$ 1H RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 8,71 (s, 1H), 8,57 (dd, $J = 8,4$, 1,4 Hz, 1H), 8,16 (dd, $J = 4,6$, 1,4 Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,84 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,79 – 7,69 (m, 2H), 7,64 (dd, $J = 8,3$, 4,6 Hz, 1H), 7,21 (dd, $J = 6,9$, 1,8 Hz, 1H), 6,63 (s, 2H).

$[V^VO(LS4-2H)(L0-H)]$ 1H RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 9,42 (s, 1H), 8,54 (dd, $J = 8,5$, 1,5 Hz, 1H), 8,44 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 8,17 (dd, $J = 4,6$, 1,5 Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,91 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,77 – 7,69 (m, 2H), 7,68 – 7,62 (m, 1H), 7,59 (dd, $J = 8,3$, 4,6 Hz, 1H), 7,46 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (dd, $J = 6,3$, 2,5 Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,43 (s, 2H).

$[V^VO_2(L3-H)] \cdot H_2O$ 1H RMN [DMSO- d_6 , δ/ppm]: 7,75 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 2,5$ Hz, 4H), 7,83 (br. s), 8,44 (s, 1H).

4.2.2 Compuestos $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L-H)]$, L=L0-L4

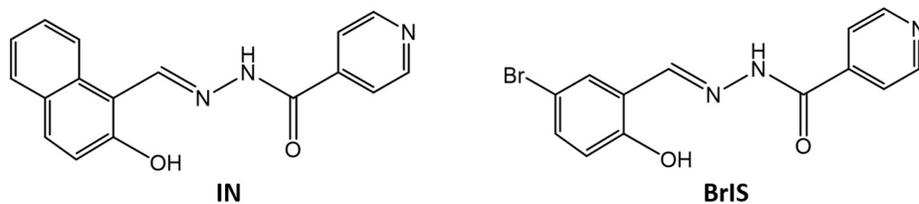
Se sintetizaron y caracterizaron cinco nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con el ligando tridentado N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído (IN) y los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina (L0-L4), de fórmula general $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$, L = L0-L4 (Figura 4.7), siguiendo los procedimientos detallados en el capítulo 3. La familia de compuestos estructuralmente relacionados se extendió sustituyendo el ligando IN por N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 5-bromosalicilaldehído (BrIS). Se obtuvo, por tanto, una segunda serie de cinco nuevos compuestos estructuralmente similares de oxovanadio (V) análogos con el ligando tridentado BrIS y los ligandos bioactivos L0-L4, de fórmula $[V^VO(BrIS-2H)(L-H)]$, L = L0-L4 (Figura 4.7).

Las hidrazonas fueron obtenidas por condensación de isoniazida con dos de los aldehídos utilizados como bloques de construcción para los ligandos semicarbazona incluidos en la serie $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$. Particularmente se seleccionaron los aldehídos 2-hidroxinaftaldehído (ligando IN) y 5-bromosalicilaldehído (ligando BrIS). El primero de ellos se seleccionó por tratarse del salicilaldehído utilizado en la síntesis del compuesto $[V^{IV}O(LS1-2H)(aminophen)]$, el cual resultó ser el más promisorio de la serie de 37 compuestos estructuralmente relacionados original ^{21, 26}. El segundo fue seleccionado por tratarse del aldehído para el cual se espera una mayor lipofilia, y se espera que sus compuestos sean, en general, más activos.

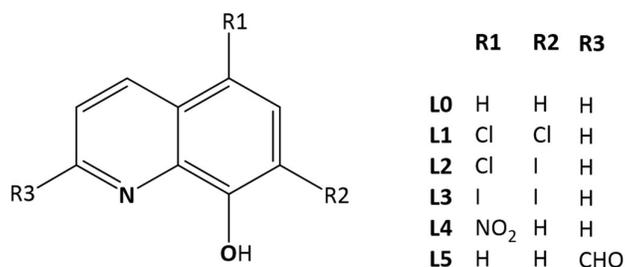
Inicialmente, se planteó la obtención de los compuestos de coordinación que incluyan los seis ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina seleccionados (L0-L5), (Figura 4.7B). Sin embargo, no fue posible obtener con pureza adecuada los compuestos de coordinación heterolépticos incluyendo las hidrazonas tridentadas y el ligando L5. Para este caso, el sólido obtenido pareciera estar

impurificado con el compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L5-H)_2]$ o una especie análoga de oxovanadio (V).

(A)



(B)



(C)

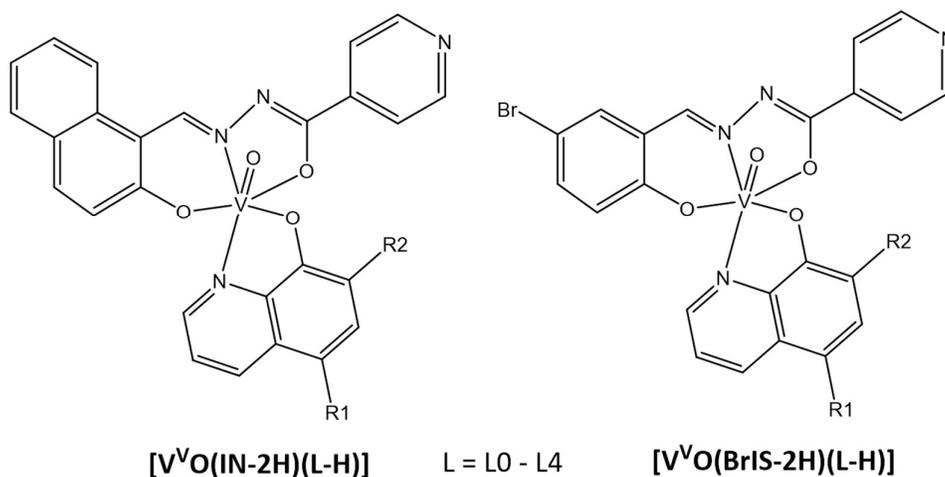


Figura 4.7. (A) Estructura de los ligandos tridentados derivados de la isoniazida, IN y BrIS; (B) Estructura de los derivados de 8-hidroxiquinolina propuestos para ser incluidos en los compuestos heterolépticos (L0-L5); (C) Estructura molecular de los compuestos obtenidos de fórmula general $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$, con L = L0-L4.

4.2.2.1 Síntesis

4.2.2.1.1 Síntesis de los ligandos

Si bien ambos ligandos tridentados ya han sido obtenidos previamente ²⁷, ²⁸, en el marco de este trabajo éstos se sintetizaron por dos métodos alternativos al reportado, según se detalla en la *sección 3.1.2.2* del capítulo 3.

Uno de ellos es un método clásico de síntesis, donde se hace reaccionar la isoniazida con una cantidad en exceso del aldehído correspondiente en MeOH a reflujo por 4 horas. El tiempo de reacción fue puesto a punto siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina (fase móvil hexano-acetato de etilo, 80:20, detección UV). El rendimiento de obtención de IN fue de 74 % (650 mg) ²⁹ mientras que para el ligando BrIS fue de 64 % (623 mg).

El segundo es un método de síntesis no tradicional realizado en un reactor de alto rendimiento de calentamiento convencional Monowave 50 Anton Paar. Este reactor de síntesis permite reducir tiempos de reflujo de varias horas a pocos minutos, debido a que permite que se alcancen temperaturas y presiones mucho mayores a las alcanzadas en condiciones de reflujo a presión atmosférica ³⁰. Los rendimientos obtenidos por este método fueron un poco mayores que los obtenidos por el método clásico, de 77 (715 mg) y 76 % (755 mg) para los ligandos IN y BrIS, respectivamente.

Los sólidos amarillos obtenidos se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y ¹H RMN. Dado que se obtuvieron monocristales de IN adecuados para la difracción de rayos X, también se estudió este ligando por esta técnica.

4.2.2.1.2 Síntesis de los compuestos de coordinación

Para la obtención de los compuestos $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$ (Figura 4.6C), se pusieron a punto las condiciones de síntesis que permitieron obtener los compuestos con pureza adecuada. Se logró obtener los diez compuestos haciendo reaccionar $[V^{IV}O(\text{acac})_2]$ con el ligando tridentado y el ligando derivado de la 8-hidroxiquinolina en THF. La síntesis constó de dos etapas, la primera de reflujo donde los ligandos coordinan al centro metálico, y una segunda etapa de agitación a temperatura ambiente donde se da la oxidación del metal por el oxígeno molecular, tal como ha sido postulado para los compuestos homolépticos de oxovanadio (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina³¹. El procedimiento se detalla en las secciones 3.1.8.1 y 3.1.8.2 del capítulo 3. Todos los compuestos se obtuvieron como sólidos color azul púrpura. Los rendimientos de síntesis expresados en masa y porcentaje se detallan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Rendimientos de síntesis para los compuestos $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$

Compuesto	Rendimiento (mg)	Rendimiento (%)
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L0-H})]$	42	44
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L1-H})]$	27	25
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$	45	31
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L3-H})]$	139	88
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L4-H})]$	51	48
$[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L0-H})]$	35	35
$[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L1-H})]$	31	28
$[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L2-H})]$	55	42
$[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L3-H})]$	86	58

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L4-H})]$	48	44
---	----	----

Se ha reportado previamente la síntesis y caracterización de los compuestos homolépticos de dioxovanadio (V), $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$ ³² y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{BrIS-H})]$ ³³. En este trabajo, se obtuvo el compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{BrIS-H})]$ utilizando el método reportado, sin embargo, para el compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$ se desarrolló un método de síntesis alternativo al reportado (detallado en la sección 3.1.4.1 del capítulo 3) ²⁹. $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$ se obtuvo con un rendimiento de 43 % (36 mg) utilizando un procedimiento similar al descrito para los compuestos heterolépticos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$.

Todos los complejos obtenidos se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y ¹H RMN. Además, se determinó la estructura cristalina de $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L1-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L2-H})]$ por difracción de rayos X.

4.2.2.2 Caracterización en estado sólido

4.2.2.2.1 Análisis elemental

La fórmula química propuesta para todos los compuestos heterolépticos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$ se confirmó mediante análisis elemental de elementos livianos carbono, hidrógeno y nitrógeno. El valor porcentual obtenido de cada uno de estos elementos está de acuerdo con los valores teóricos calculados según la fórmula propuesta (Tabla 4.8). Para el caso de los compuestos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L3-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]\cdot\text{THF}$, se incluyeron moléculas de THF de cristalización para ajustar los valores porcentuales obtenidos.

Tabla 4.8. Resultados de análisis elemental de C, H y N de los complejos de fórmula [V^{VO}(IN-2H)(L0-H)], [V^{VO}(BrIS-2H)(L0-H)] y [V^{VO}₂(IN-H)].

Compuesto	%C_{exp} (%C_{teo})	%H_{exp} (%H_{teo})	%N_{exp} (%N_{teo})	Fórmula
[V ^{VO} (IN-2H)(L0-H)]	62,84 (62,92)	3,90 (3,91)	10,98 (10,87)	C ₂₇ H ₂₀ N ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (IN-2H)(L1-H)]	55,44 (55,50)	3,02 (3,11)	9,33 (9,59)	C ₂₇ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF	50,32 (50,56)	3,80 (3,86)	7,20 (7,15)	C ₃₃ H ₃₀ ClIN ₄ O _{5,5} V
[V ^{VO} (IN-2H)(L3-H)]·THF	44,25 (44,36)	3,27 (3,12)	6,63 (6,68)	C ₃₁ H ₂₆ I ₂ N ₄ O ₅ V
[V ^{VO} (IN-2H)(L4-H)]	57,84 (57,87)	3,42 (3,42)	12,43 (12,50)	C ₂₇ H ₁₉ N ₅ O ₆ V
[V ^{VO} ₂ (IN-H)]·THF	56,97 (56,64)	4,23 (4,53)	9,60 (9,44)	C ₂₁ H ₁₆ N ₃ O ₅ V
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L0-H)]	50,27 (50,76)	3,08 (3,15)	10,40 (10,29)	C ₂₃ H ₁₇ BrN ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L1-H)]·0,25C ₆ H ₁₄	46,42 (46,36)	2,95 (2,94)	8,67 (8,83)	C _{24,5} H _{18,5} BrCl ₂ N ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L2-H)] ·0,25C ₆ H ₁₄ 0,5CH ₂ Cl ₂	38,95 (39,07)	2,43 (2,56)	7,30 (7,29)	C ₂₅ H _{19,5} BrClIN ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L3-H)] ·0,5C ₆ H ₁₄	48,44 (48,31)	3,84 (3,75)	8,21 (8,35)	C ₂₇ H _{12,5} BrI ₂ N ₄ O ₄ V
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L4-H)]	47,23 (46,88)	2,92 (2,74)	12,10 (11,89)	C ₂₃ H ₁₆ BrN ₅ O ₆ V

4.2.2.2.2 Espectroscopía infrarroja

Se determinaron los espectros de infrarrojo (IR) de todos los complejos en pastillas de KBr en un rango entre 400 y 4000 cm^{-1} . Se identificaron las bandas de vibración características de los ligandos IN y BrIS, y se analizaron posibles corrimientos de las bandas asociados a los grupos involucrados en la coordinación.

En primer lugar, se asignaron las bandas características de los ligandos N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona, lo cual resultó fundamental para comprender el modo de coordinación hacia el centro metálico. En la Figura 4.8A se muestra, a efectos comparativos, el espectro de infrarrojo obtenido para el complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ y el ligando IN en su forma libre. Una comparación análoga se muestra en la Figura 4.8B para el complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ y el ligando libre BrIS. La Tabla 4.9 resume la asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los cinco complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}-\text{H})]$, los cinco complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L}-\text{H})]$ y los ligandos N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona en su forma libre.

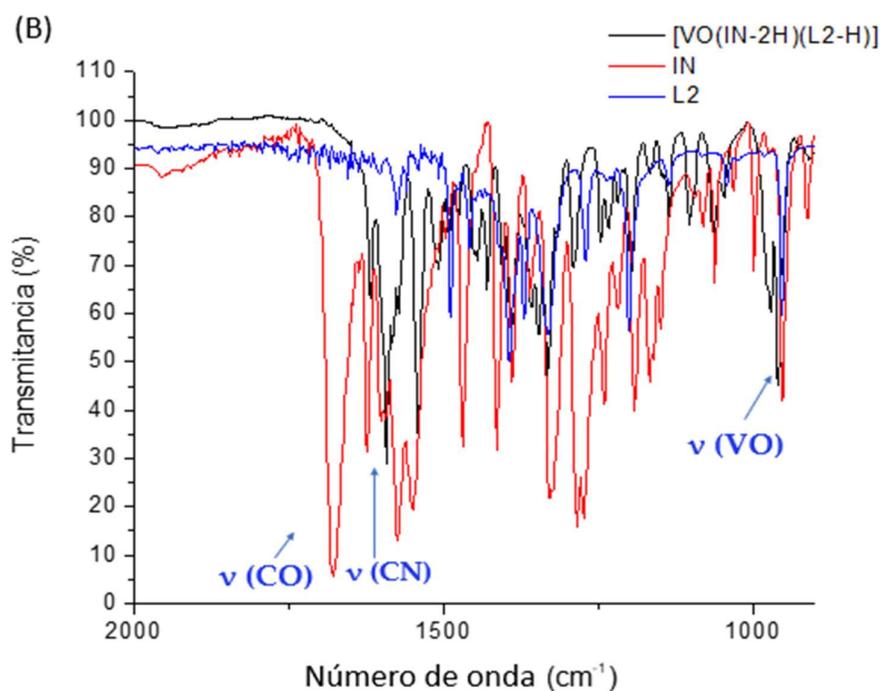
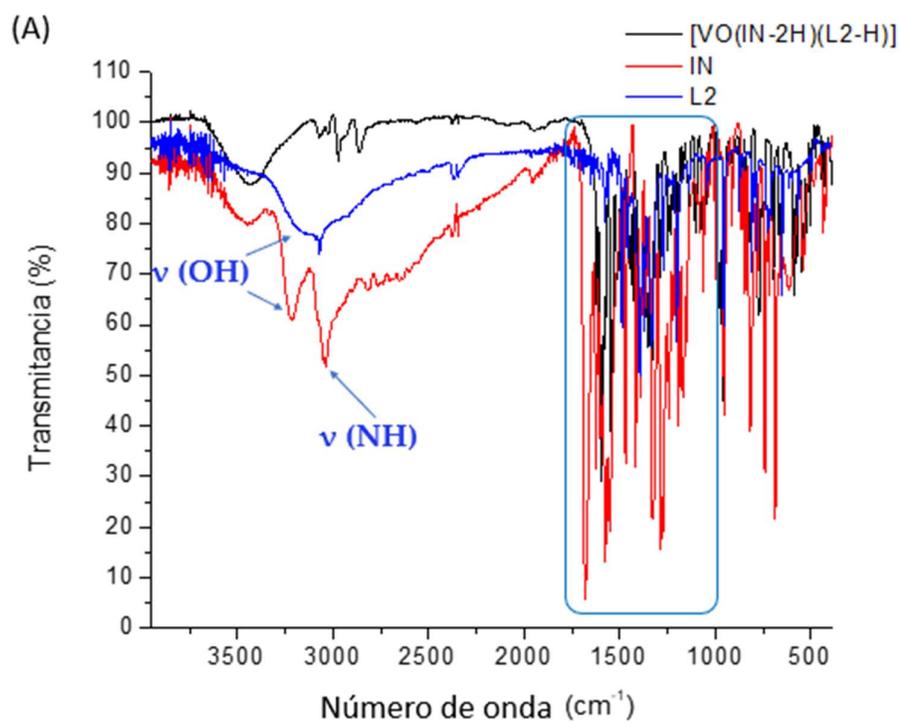


Figura 4.8. Espectros IR del complejo $[\text{VO}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})]$ y los ligandos libres IN y L2 (A) Rango entre $4000-400 \text{ cm}^{-1}$; (B) Rango entre $2000-900 \text{ cm}^{-1}$. Se indica la asignación tentativa de algunas bandas basada en reportes previos.

Tabla 4.9. Asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los complejos [V^{VO}(IN-2H)(L-H)], [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)], [V^{VO}O₂(IN-H)] y los ligandos libres IN y BrIS. Los números de onda de las bandas son expresados en cm⁻¹.

Compuesto	$\nu(\text{VO})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$ ^[a]	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{NH})$
IN	-	1680 s	1575 s	3213 m	3038 m
BrIS	-	1675 s	1556 s	3173 m	3044 w
[V ^{VO} O ₂ (IN-H)]	915 s; 827 m	1633 m	1597 s	-	3074 w
L0 ^[a]	-	-	1624 vw	3159 b	-
[V ^{VO} O(IN-2H)(L0-H)]	974 m	1620 w	1594 s	-	-
[V ^{VO} O(BrIS-2H)(L0-H)]	974 m	1616 w	1594 s	-	-
L1 ^[a]	-	-	1615 w	3132 b	-
[V ^{VO} O(IN-2H)(L1-H)]	978 s	1618 w	1593 s	-	-
[V ^{VO} O(BrIS-2H)(L1-H)]	976 s	1619 w	1595 s	-	-
L2 ^[a]	-	-	1605 w	3132 b	-
[V ^{VO} O(IN-2H)(L2-H)]	972 s	1618 w	1593 s	-	-
[V ^{VO} O(BrIS-2H)(L2-H)]	966 s	1608 m	1593s	-	-
L3 ^[a]	-	-	1576 vw	3026 b	-
[V ^{VO} O(IN-2H)(L3-H)]	966 s	1620 w	1593 s	-	-
[V ^{VO} O(BrIS-2H)(L3-H)]	962 s	1608 m	1593 s		
L4 ^[b]	-	-	1628 vw	3235 b	-
[V ^{VO} O(IN-2H)(L4-H)]	968 s	1618 w	1593 m	-	-
[V ^{VO} O(BrIS-2H)(L4-H)]	968 s	1615 sh	1603 s	-	-

s: intensa; w: débil; vw: muy débil; m: intensidad media; b: ancha

^[a] Las bandas asignadas al estiramiento $\nu(\text{C}=\text{N})$ (nitrógeno azometínico) están solapadas con las bandas correspondientes a $\nu(\text{C}=\text{C})$ del anillo heterocíclico.

Se observó un perfil espectral similar entre los complejos análogos [V^{VO}O(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}O(BrIS-2H)(L-H)]. Como consecuencia de la formación del compuesto de coordinación, se observaron corrimientos en los valores de

número de onda de las bandas asignadas a grupos funcionales cercanos a los átomos donores. Basándonos en reportes previos del comportamiento vibracional de complejos heterolépticos de vanadio con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y de compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina, se identificaron algunas bandas de vibración características de los ligandos en los complejos y se asignaron tentativamente (Tabla 4.9) ^{3-6, 17-21, 29, 31, 34}.

Los ligandos tridentados IN y BrIS presentan bandas intensas a 1680 y 1675 cm^{-1} , respectivamente, correspondientes al estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$, las cuales están ausentes en los compuestos de coordinación, indicando la enolización de la funcionalidad amida por coordinación con el centro $(\text{V}^{\text{VO}})^{3+}$. En su lugar se observan fuertes bandas alrededor de 1620 cm^{-1} , que se pueden atribuir al estiramiento del enlace simple C-O, característico de la coordinación de estos ligandos en forma de enolatos ^{6, 18, 19, 22, 35}.

La presencia simultánea de los ligandos N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona y los derivados de la 8-hidroxiquinolina en la esfera de coordinación del vanadio conduce a espectros bastante complejos, específicamente en la región 1600-1500 cm^{-1} , donde aparecen muchas bandas que corresponden a $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$ en compuestos heterocíclicos. En los complejos, estas bandas se encuentran desplazadas hacia números de onda menores, lo que sugiere la formación de enlaces V-N ^{24, 31, 34}.

El cambio en las frecuencias $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$ y la desaparición de las bandas $\nu(\text{N}-\text{H})$ (3038 cm^{-1} en IN libre y 3044 cm^{-1} en BrIS libre) y $\nu(\text{OH})$ (en la región de 3026-3235 cm^{-1}) está de acuerdo con la coordinación tridentada a través del oxígeno carbonílico, el nitrógeno azometínico, y el oxígeno fenólico, y la doble deprotonación para el ligando tridentado en el grupo fenólico y NH. Adicionalmente, los resultados sugieren que el ligando L se coordina bidentado a través del nitrógeno y el oxígeno fenólico deprotonado. Los diez compuestos

heterolépticos estudiados muestran una banda correspondiente al estiramiento $\nu(\text{V}=\text{O})$ alrededor de $966\text{-}978\text{ cm}^{-1}$, característica del centro $\text{V}^{\text{VO}3+}$ (Figura 4.7) (Tabla 4.9).

Si bien se reportó la estructura cristalina de $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$, el espectro vibracional no había sido reportado. Para este caso, el patrón encontrado en el espectro IR fue muy similar a los reportados previamente para los complejos $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS1-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS2-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS4-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{BrIS-H})]$ y el nuevo $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS3-H})]$ desarrollado en el marco de esta tesis ^{3, 4, 18-20, 29, 33}. Los cambios en el espectro del ligando IN están de acuerdo con la coordinación tridentada a través del oxígeno carbonílico, el nitrógeno azometínico y el oxígeno fenólico, y la deprotonación de la hidrazona en el grupo fenólico. Además, se identificaron las bandas correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico característico del centro VO_2^+ (915 y 827 cm^{-1}).

4.2.2.2.3 Difracción de Rayos X para IN y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]\cdot 1,5\text{ THF}$

Se obtuvieron monocristales adecuados para difracción de rayos X del complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$ por evaporación lenta de una disolución en THF a temperatura ambiente ²⁹. La Figura 4.9 muestra un diagrama ORTEP de ambos compuestos. Los datos de los cristales, parámetros de celda, procedimientos de colección de datos, determinación de la estructura cristalina y refinamiento se incluyeron en la Tabla 4.10. Otros datos cristalográficos (CIF y checkCIF) se adjuntan en el Apéndice 1.

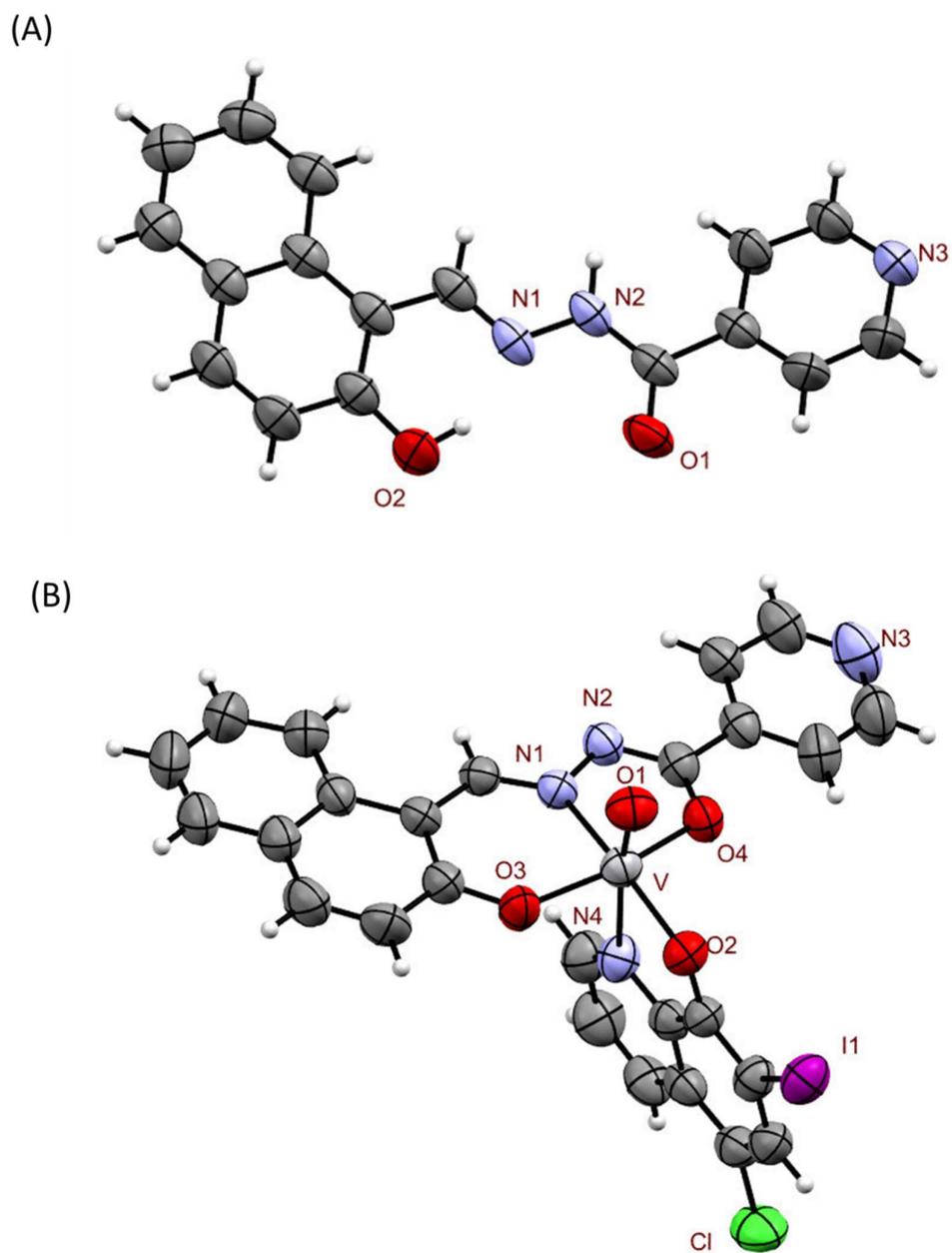


Figura 4.9. Estructura cristalina de (A) ligando IN libre y (B) compuesto $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] \cdot 1,5 THF$. Las etiquetas de los átomos de H y C y la molécula de cristalización se omitieron para mejorar la visualización de la imagen. El diagrama ORTEP muestra la representación de elipsoides de desplazamiento al nivel de probabilidad del 50 %.

Tabla 4.10. Datos del cristal y resultados del refinamiento estructural de IN y [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF

Compuesto	IN	[V ^{VO} (IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF
Fórmula empírica	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₂	C ₃₂ H ₂₇ ClIN ₄ O _{5,5} V
Peso fórmula	291,30	768,86
Temperatura (K)	273(2)	273(2)
Longitud de onda (Å)	CuKα (λ = 1,54178)	CuKα (λ = 1.54178)
Sistema cristalino	Monoclínico	ortorrómbico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	Pccn
Dimensiones de la celda unidad		
a (Å)	8,786(2)	22,3574(11)
b (Å)	10,252(2)	16,3235(8)
c (Å)	15,793(5)	16,9294(8)
β (°)	99,423(10)	
Volumen (Å ³)	1403,5(7)	6178,4(5)
Z; densidad calculada (g cm ⁻³)	4; 1,379	8; 1,653
Coeficiente de absorción (mm ⁻¹)	0,759	11,744
F(000)	608,0	3072,0
Forma del cristal/color	agujas / amarillos	agujas / azul púrpura
Tamaño del cristal (mm ³)	0,326 × 0,233 × 0,155	0,210 × 0,180 × 0,117
Rango de recolección en ϑ (°)	10,2 a 160,4	3,704 a 160,98
Índices de miller	-11 ≤ h ≤ 11, -12 ≤ k ≤ 12, -19 ≤ l ≤ 19	-28 ≤ h ≤ 21, -20 ≤ k ≤ 20, -21 ≤ l ≤ 19
Reflexiones colectadas	22284	60109
Reflexiones independientes	3009[R _{int} = 0,0376, R _{sigma} = 0,0273]	6718[R _{int} = 0,0823, R _{sigma} = 0,0409]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	3009	6718

Complejidad (%)	98,4	99,2
Corrección por absorción	multi-scan	multi-scan
Factores de transmisión máx. y mín.	0,7543 and 0,6386	0,7538 and 0,4239
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²
Datos / restricciones / parámetros	2009/0/208	6718/252/471
Bondad de ajuste en F ² (GooF)	1,033	1,056
Índices R finales ^a [I>2σ(I)]	R ₁ = 0,0470, wR ₂ = 0,1303	R ₁ = 0,0563, wR ₂ = 0,1505
Índices R finales (todos los datos)	R ₁ = 0,0556, wR ₂ = 0,1404	R ₁ = 0,0895, wR ₂ = 0,1782
Mayor diferencia entre pico y hueco (e/ Å ³)	0,21/-0,23	0,85/-1,05

$$^a R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, wR_2 = \left[\frac{\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2}{\sum w(|F_o|^2)^2} \right]^{1/2}$$

El ligando IN cristaliza en un sistema monoclinico con un grupo espacial P2₁/c. Los datos cristalográficos muestran que la configuración *E* del ligando tridentado es la existente. La red de empaquetamiento no es estabilizada por interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno, mostrando solamente una interacción intramolecular de este tipo entre el nitrógeno azometínico y el H fenólico (*d*(N1-H) = 1,739 Å).

Por su parte, el compuesto de coordinación de oxovanadio (V) [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF cristaliza en un sistema ortorrómbico, con un grupo espacial Pccn. Los ángulos y longitudes de enlace en torno al centro de vanadio (V) en el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF se resumen en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Longitudes [Å] y ángulos de enlace alrededor del centro de vanadio (V) [°] en el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]·1,5 THF

Longitudes de enlace	
V-O(1)	1,590(4)
V-O(2)	1,853(4)
V-O(3)	1,845(4)
V-O(4)	1,931(4)
V-N(1)	2,077(4)
V-N(4)	2,390(4)
Ángulos de enlace	
O(1)-V-O(2)	100,28(18)
O(1)-V-O(3)	100,40(2)
O(2)-V-O(3)	100,89(17)
O(1)-V-O(4)	97,78(19)
O(2)-V-O(4)	94,58(16)
O(3)-V-O(4)	153,51(18)
O(1)-V-N(1)	99,07(19)
O(2)-V-N(1)	159,31(16)
O(3)-V-N(1)	82,65(17)
O(4)-V-N(1)	75,57(16)
O(1)-V-N(4)	174,39(19)
O(2)-V-N(4)	75,21(15)

O(3)-V-N(4)	83,86(18)
O(4)-V-N(4)	79,45(16)
N(1)-V-N(4)	85,01(16)

Los resultados muestran que se trata de un complejo octaédrico monomérico conteniendo en la esfera de coordinación el ligando IN doblemente deprotonado, tal como se había postulado anteriormente, y el ligando L2 monodeprotonado.

El ligando tridentado IN ocupa tres posiciones ecuatoriales coordinando a través del oxígeno carbonílico con la funcionalidad amida estabilizada en forma de enolato ($d(V-O4) = 1,931(4) \text{ \AA}$), a través del nitrógeno azometínico ($d(V-N1) = 2,077(4) \text{ \AA}$) y a través del oxígeno fenólico deprotonado ($d(V-O3) = 1,845(4) \text{ \AA}$). Por el otro lado, el ligando L2 se coordina ocupando la cuarta posición ecuatorial a través del oxígeno fenólico ($d(V-O2) = 1,853(4) \text{ \AA}$) y una posición axial a través del nitrógeno ($d(V-N4) = 2,390(4) \text{ \AA}$). El octaedro se completa con el ligando oxo en la segunda posición axial ($d(V-O1) = 1,590(4) \text{ \AA}$)²⁹.

Los datos cristalográficos se depositaron en la base de datos de Cambridge (CCDC, Cambridge Crystallographic Data Centre), publicación N° CCDC-1992304 para el ligando libre IN y N° CCDC-1992805 para el complejo $[V^VO(IN-2H)(L2-H)] \cdot 1,5 \text{ THF}$. La copia de los datos puede ser adquirida de forma gratuita en CCDC (12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, IL, Tel: +44-1223-336408, FAX:+44-1223-336003, e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Sitio web: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>

4.2.2.2.4 Difracción de Rayos X para $[V^VO(BrIS-2H)(L1-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})0,5(CH_2Cl_2)$.

Se obtuvieron monocristales adecuados para difracción de rayos X de los complejos $[V^VO(BrIS-2H)(L1-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$ por difusión líquido-líquido CH_2Cl_2 : hexano (3:2 v/v). Debido a desperfectos en el difractor disponible en Facultad de Química, los datos cristalográficos de estos compuestos fueron adquiridos y las estructuras cristalinas fueron resueltas y refinadas por el Prof. Olivier Blacque, University of Zurich.

La Figura 4.10 muestra un diagrama ORTEP de ambos compuestos. Los datos de los cristales, parámetros de celda, procedimientos de colección de datos, determinación de la estructura cristalina y refinamiento se incluyeron en la Tabla 4.12. Otros datos cristalográficos (CIF y checkCIF) se adjuntan en el Apéndice 1.

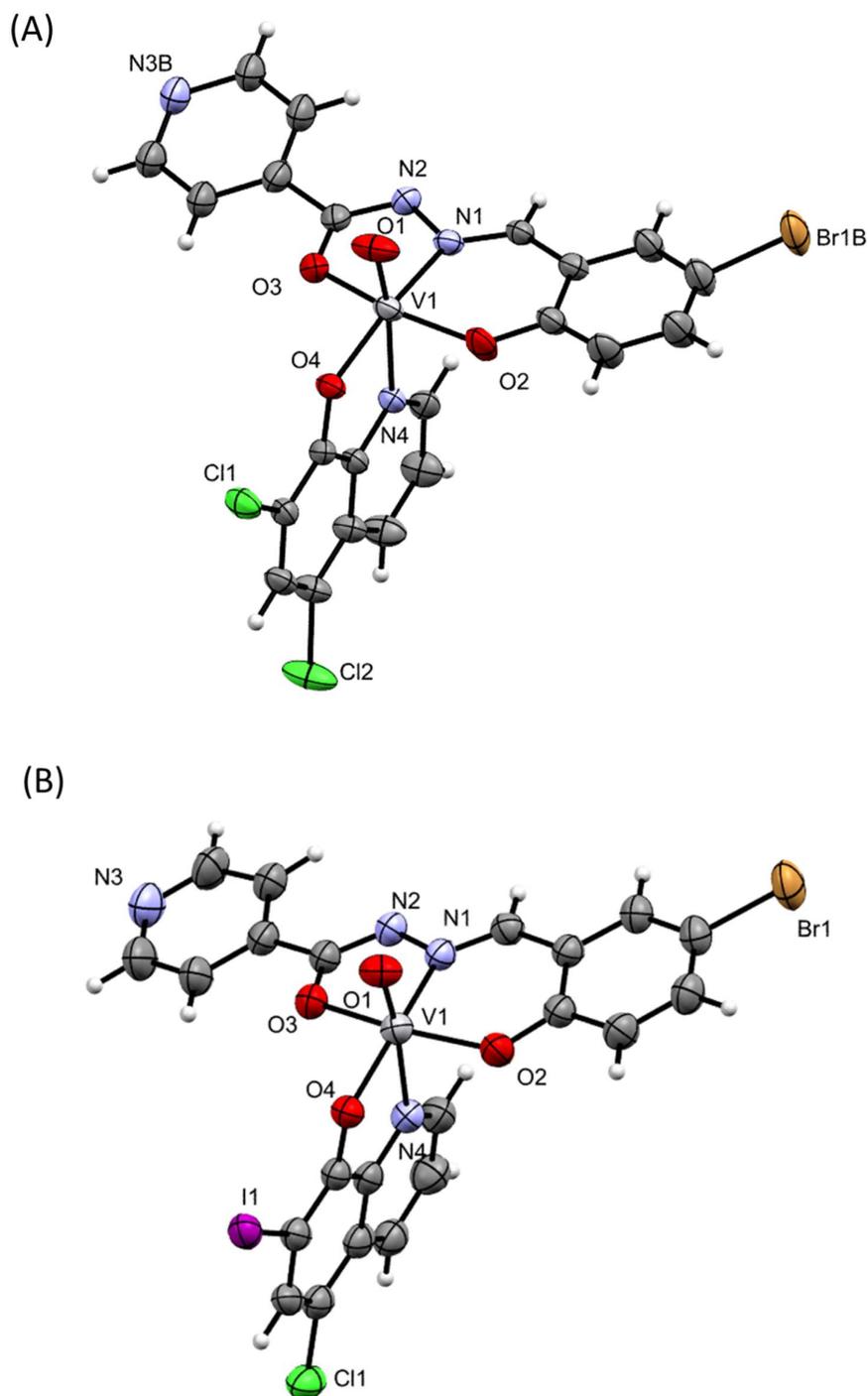


Figura 4.10. Estructura cristalina de (A) complejo $[V^VO(BrIS-2H)(L1-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14})$ y (B) compuesto $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] \cdot 0,25(C_6H_{14}) \cdot 0,5(CH_2Cl_2)$. Las etiquetas de los átomos de H y las moléculas de cristalización se omitieron para mejorar la visualización de la imagen. El diagrama ORTEP muestra la representación de elipsoides de desplazamiento al nivel de probabilidad del 50 %.

Tabla 4.12. Datos del cristal y resultados del refinamiento estructural de $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L1}-\text{H})] \cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})] \cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})0,5(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$.

Compuesto	$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L1}-\text{H})] \cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})$	$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})] \cdot 0,25(\text{C}_6\text{H}_{14})0,5(\text{CH}_2\text{Cl}_2)$
Fórmula empírica	$\text{C}_{23,5}\text{H}_{15,5}\text{BrCl}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{V}$	$\text{C}_{48}\text{H}_{33}\text{Br}_2\text{Cl}_4\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_8\text{V}_2$
Peso fórmula	619,65	1507,12
Temperatura (K)	160(1)	160(1)
Longitud de onda (Å)	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54178$)	$\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54178$)
Sistema cristalino	tetragonal	ortorrómbico
Grupo espacial	$I4_1/a$	Pccn
Dimensiones de la celda unidad		
a (Å)	34,2795(3)	15,5627(3)
b (Å)	34,2795(3)	21,9900(4)
c (Å)	8,0902(2)	16,4056(4)
Volumen (Å ³)	9506,7(3)	5614,4(2)
Z; densidad calculada (g cm ⁻³)	16; 1,732	4; 1,783
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	7,878	15,326
F(000)	4936,0	2924,0
Forma del cristal/color	agujas / azul púrpura	agujas / azul púrpura
Tamaño del cristal (mm ³)	0,15 × 0,08 × 0,06	0,05 × 0,04 × 0,02
Rango de recolección en ϑ (°)	5,156 a 148,98	6,958 a 148,972
Índices de Miller	$-42 \leq h \leq 38, -36 \leq k \leq 40, -10 \leq l \leq 9$	$-19 \leq h \leq 19, -26 \leq k \leq 27, -20 \leq l \leq 19$
Reflexiones colectadas	26395	60299
Reflexiones independientes	4862 [$R_{\text{int}} = 0,0231, R_{\text{sigma}} = 0,0165$]	5749 [$R_{\text{int}} = 0,0874, R_{\text{sigma}} = 0,0361$]

Reflexiones observadas [I>2σ(I)]	26395	60299
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²	Matriz completa de mínimos cuadrados F ²
Datos / restricciones / parámetros	4862/325/352	5749/19/361
Bondad de ajuste en F ² (GooF)	1,087	1,067
Índices R finales ^a [I>2σ(I)]	R1 = 0,0427, wR2 = 0,1032	R1 = 0,0496, wR2 = 0,1396
Índices R finales (todos los datos)	R1 = 0,0441, wR2 = 0,1040	R1 = 0,0558, wR2 = 0,1447
Mayor diferencia entre pico y hueco (e/ Å ³)	0,65/-0,62	1,45/-1,20

$$^a R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, \quad wR_2 = \left[\frac{\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2}{\sum w(|F_o|^2)^2} \right]^{1/2}$$

Ambos compuestos cristalizaron con moléculas de los solventes utilizados para la difusión tal como se indica en la fórmula empírica especificada en la Tabla 4.12. El compuesto [V^{VO}(BrIS-2H)(L1-H)]·0,25(C₆H₁₄) cristalizó en un sistema tetragonal con un grupo espacial I4₁/a, mientras que [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]·0,25(C₆H₁₄)0,5(CH₂Cl₂) cristalizó en un sistema ortorrómbico con un grupo espacial Pccn (al igual que su análogo [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]·1,5THF). Los ángulos y longitudes de enlace en torno al centro de vanadio (V) en ambos compuestos se resumen en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Longitudes [Å] y ángulos de enlace alrededor del centro de vanadio (V) [°] en los compuestos [V^vO(BrIS-2H)(L1-H)] ·0,25(C₆H₁₄) y [V^vO(BrIS-2H)(L2-H)] ·0,25(C₆H₁₄)0,5(CH₂Cl₂).

	[V ^v O(BrIS-2H)(L1-H)] ·0,25(C ₆ H ₁₄)	[V ^v O(BrIS-2H)(L2-H)] ·0,25(C ₆ H ₁₄)0,5(CH ₂ Cl ₂)
Longitudes de enlace		
V-O(1)	1,590(2)	1,594(4)
V-O(2)	1,846(2)	1,866(4)
V-O(3)	1,928(2)	1,969(3)
V-O(4)	1,865(18)	1,851(3)
V-N(1)	2,095(2)	2,094(4)
V-N(4)	2,340(2)	2,335(4)
Ángulos de enlace		
O(1)-V-O(2)	100,55(13)	100,2(2)
O(1)-V-O(3)	95,10(12)	97,41(18))
O(2)-V-O(3)	155,41(10)	154,21(18)
O(1)-V-O(4)	99,26(10)	99,74(18)
O(2)-V-O(4)	98,49(9)	103,38(15)
O(3)-V-O(4)	97,57(9)	91,98(14)
O(1)-V-N(1)	98,91(10)	99,23(18)
O(2)-V-N(1)	83,76(9)	83,61(16)
O(3)-V-N(1)	75,11(8)	75,04(14)
O(4)-V-N(1)	160,94(9)	158,23(16)

O(1)-V-N(4)	173,28(11)	174,19(18)
O(2)-V-N(4)	85,09(10)	84,98(17)
O(3)-V-N(4)	80,82(9)	78,61(15)
O(4)-V-N(4)	76,14(8)	76,31(15)
N(1)-V-N(4)	85,25(8)	83,92(15)

Los datos cristalográficos muestran un modo de coordinación análogo al discutido previamente para el complejo $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$, conteniendo el ligando N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona de 2-hidroxinaftaldehído doblemente deprotonado y el ligando L monodeprotonado.

En ambos complejos, el ligando BrIS ocupa tres posiciones ecuatoriales coordinando a través del oxígeno carbonílico con la funcionalidad amida estabilizada en forma de enolato ($d(V-O3) = 1,928(2)$ y $1,969(3)$ Å), a través del nitrógeno azometínico ($d(V-N1) = 2,095(2)$ y $2,094(4)$ Å) y a través del oxígeno fenólico deprotonado ($d(V-O2) = 1,846(2)$ y $1,866(4)$ Å). De forma análoga a $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$, el ligando L en $[V^VO(BrIS-2H)(L1-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$, se coordina ocupando la cuarta posición ecuatorial a través del oxígeno fenólico ($d(V-O4) = 1,865(18)$ y $1,851(3)$ Å) y ocupando una posición axial a través del nitrógeno ($d(V-N4) = 2,340(2)$ y $2,335(4)$ Å). El octaedro se completa con el ligando oxo en la segunda posición axial ($d(V-O1) = 1,590(2)$ y $1,594(4)$ Å). Estos datos aún no fueron depositados en la base de datos de Cambridge.

4.2.2.3 Caracterización en disolución

4.2.2.3.1 Conductimetría

La conductividad molar, medida en soluciones de concentración 1 mM en DMSO para todos los nuevos complejos fueron de $\sim 3 - 10$ S cm² /mol. Los valores

obtenidos indican que se trata de compuestos neutros, tal como se propone para las fórmulas $[V^{VO}(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]$ ²⁵.

4.2.2.3.2 Resonancia magnética nuclear

Se caracterizaron en disolución de DMSO-*d*₆ todos los complejos $[V^{VO}(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]$. Para ello, se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensional (¹H RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC).

Se numeraron los protones de los ligandos *N*²-(4-piridinilcarbonyl)hidrazona (IN y BrIS) y los derivados de 8-hidroxiquinolina (L) como se muestra en la Figura 4.11. En la Figura 4.12 se muestra una comparación entre los ¹H RMN del compuesto de coordinación $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ y sus respectivos ligandos libres.

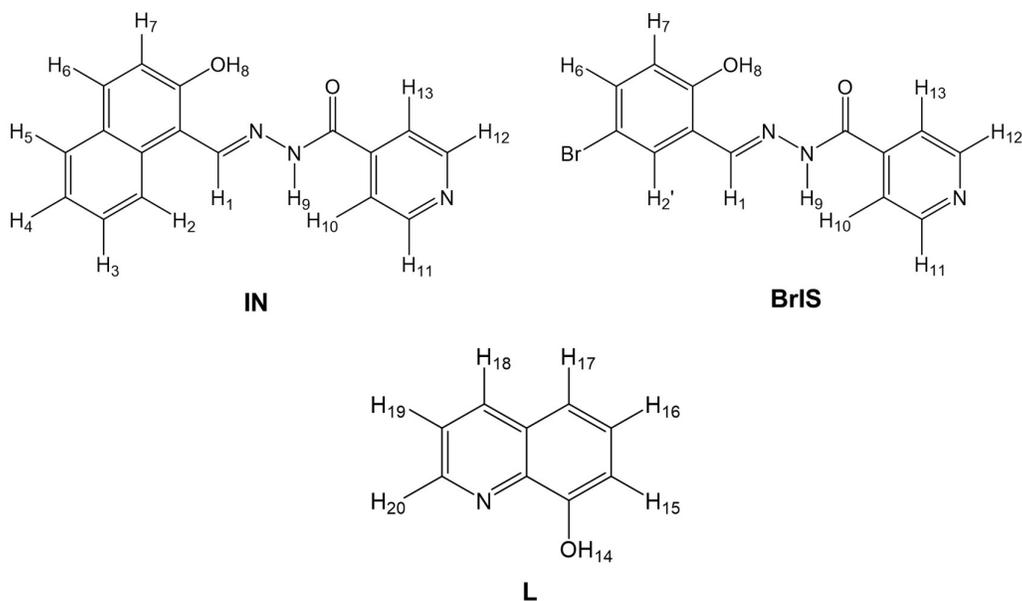


Figura 4.11. Esquema de numeración de los átomos de los ligandos IN y BrIS y los derivados de la 8-hidroxiquinolina (L0-L4)

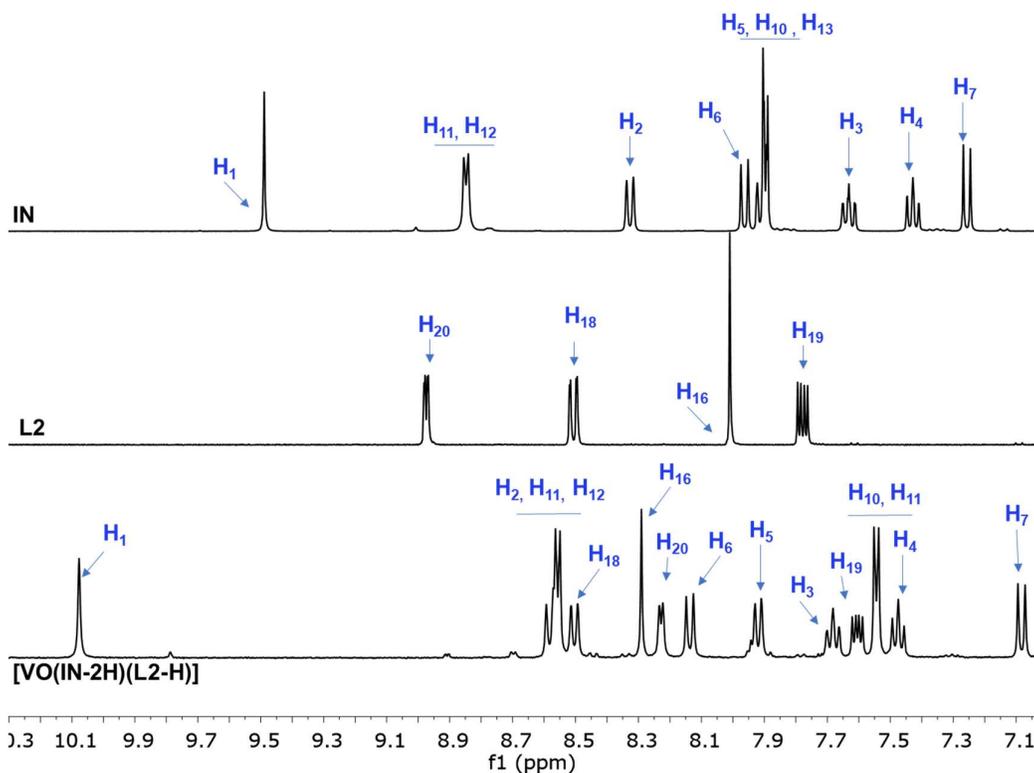


Figura 4.12. Espectros ^1H RMN del complejo $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})]$ y de los ligandos libres IN y L2 en $\text{DMSO}-d_6$.

Los espectros ^1H RMN obtenidos presentan señales estrechas, típica de compuestos diamagnéticos. Por lo tanto, se confirma el estado de oxidación del vanadio (V) como átomo central de los complejos. Los espectros bidimensionales homo y heteronucleares permitieron asignar los desplazamientos de las señales ^1H en los complejos estudiados. Los desplazamientos químicos en los espectros ^1H RMN (δ), así como las diferencias en los desplazamientos entre cada complejo y los ligandos correspondientes (expresado como $\Delta\delta$) se detallan en la Tablas 4.14 y 4.15.

La asignación de los ligandos L0-L4 fue extraída de la literatura disponible ³⁶. La multiplicidad de las señales y la integración de éstas en el ^1H -RMN están de acuerdo con las fórmulas moleculares propuestas. La presencia de las moléculas de cristalización fue confirmada por resonancia magnética nuclear.

Los cinco complejos $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$ y los cinco $[V^VO(BrIS-2H)(L-H)]$ muestran cambios similares en los desplazamientos químicos de los protones del ligando L y en los fragmentos comunes de la hidrazona (Tablas 4.14 y 4.15). Además, muestran cambios en los desplazamientos químicos del mismo orden que los observados para los fragmentos en común de los respectivos complejos homolépticos $[V^VO_2(IN-H)]$ y $[V^VO_2(BrIS-H)]$ ^{29,33} y los complejos $[V^VO(LS-H)(L0-H)]$ y $[V^VO_2(LS-H)]$ discutidos en la *sección 4.2.2.2.2*.

Tal como se esperaba, los protones 8 y 9 no están presentes en los espectros de los complejos, lo cual está de acuerdo con la doble deprotonación de la hidrazona. Además, la pérdida de la señal correspondiente al protón 14 sugiere la deprotonación del ligando L. Del mismo modo que se discutió para el resto de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) desarrollados en esta tesis²⁰, una vez que el ligando tridentado se coordina el centro metálico, el efecto desapantallante del metal sobre los protones cercanos a los átomos donores causa cambios significativos en los desplazamientos hacia campos menores de las señales en los espectros ¹H-RMN, en este caso para los protones 1 y 15. Los casos en los que el desplazamiento se da a campos mayores podrían estar asociados a una disminución del efecto anisotrópico del grupo azometínico en la forma coordinada del ligando N²-(4-piridinilcarbonyl)hidrazona. Este efecto también fue observado para los compuestos de oxovanadio (IV) y (V) con ligandos N²-(4-piridinilcarbonyl)hidrazona y semicarbazona reportados previamente^{5, 18-20, 33}.

Tabla 4.14. Valores de desplazamiento químico (δ) de los espectros ^1H -RMN de los complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$ en $\text{DMSO-}d_6$ a 25°C (δ , ppm). Se incluyen los ligandos libres a modo de comparación.

H	$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L0-H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L1-H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L3-H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L4-H})]$		
	δ_{lig}	δ_{comp}	$\Delta\delta$												
1	9,48	10,12	0,64	9,48	10,15	0,67	9,48	10,14	0,66	9,48	10,14	0,66	9,48	10,18	0,0
2	8,32	8,68	0,36	8,32	8,66	0,34	8,32	8,63	0,31	8,32	8,62	0,30	8,32	8,67	0,35
3	7,62	7,77	0,15	7,62	7,75	0,13	7,62	7,75	0,13	7,62	7,75	0,13	7,62	7,76	0,14
4	7,42	7,58	0,16	7,42	7,54	0,12	7,42	7,54	0,12	7,42	7,54	0,12	7,42	7,56	0,14
5	7,89	7,98	0,09	7,89	7,98	0,09	7,89	7,98	0,09	7,89	7,98	0,09	7,89	8,00	0,11
6	7,95	8,17	0,22	7,95	8,21	0,26	7,95	8,20	0,25	7,95	8,20	0,25	7,95	8,23	0,28
7	7,25	7,10	-0,15	7,25	7,14	-0,11	7,25	7,14	-0,11	7,25	7,12	-0,13	7,25	7,14	-0,11
8	12,53	-	-	12,53	-	-	12,53	-	-	12,53	-	-	12,53	-	-
9	12,40	-	-	12,40	-	-	12,40	-	-	12,40	-	-	12,40	-	-
10	7,89	7,62	-0,19	7,89	7,62	-0,27	7,89	7,61	-0,28	7,89	7,61	-0,28	7,89	7,61	-0,28
11	8,84	8,62	-0,22	8,84	8,61	-0,23	8,84	8,63	-0,21	8,84	8,62	-0,22	8,84	8,62	-0,22
12	8,84	8,62	-0,22	8,84	8,61	-0,23	8,84	8,63	-0,21	8,84	8,62	-0,22	8,84	8,62	-0,22
13	7,89	7,62	-0,19	7,89	7,62	-0,27	7,89	7,61	-0,28	7,89	7,61	-0,28	7,89	7,61	-0,28
14	9,82	-	-	11,00	-	-	11,07	-	-	*	-	-	*	-	-
15	7,09	7,77	0,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,20	7,46	0,26
16	7,41	7,20	-0,21	7,82	8,19	0,37	8,00	8,35	0,35	8,34	8,69	0,35	8,55	8,78	0,23
17	7,41	7,77	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	8,32	8,55	0,22	8,50	8,61	0,11	8,50	8,57	0,07	8,29	8,35	0,06	9,15	9,15	0,00
19	7,53	7,60	-0,07	7,85	7,67	-0,15	7,77	7,67	-0,10	7,73	7,63	-0,10	7,89	7,80	-0,09
20	8,85	8,22	-0,63	9,00	8,34	-0,65	8,97	8,29	-0,68	8,87	8,20	-0,67	9,02	8,36	-0,66

$\Delta\delta = \delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$
 * Las señales son muy anchas

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L0-H})]$ ^1H NMR [400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ/ppm]: 10,12 (s, 1H), 8,68 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 8,62 (dd, $J = 4,5, 1,6$ Hz, 2H), 8,55 (d, $J = 8,9$, 1H), 8,22 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,98 (dd, $J = 8,0, 1,3$ Hz, 1H), 7,70 – 7,85 (m, 5H), 7,63 – 7,59 (m, 4H), 7,20 (s, 1H), 7,10 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L1-H})]$ ^1H NMR [400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ/ppm]: 10,12 (s, 1H), 9,09 (d, $J = 9,0, 1,7$ Hz, 1H), 8,72 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,61 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,58 – 8,54 (m, 3H), 8,29 (s, 1H), 8,17 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,94 (dd, $J = 8,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,76 – 7,65

(m, 2H), 7,57 – 7,53 (m, 2H), 7,49 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,08 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

$[V^VO(IN-2H)(L2-H)] \cdot 1,5 THF$ 1H NMR [400 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm]: 10,14 (s, 1H), 8,66 – 8,60 (m, 3H), 8,57 (dd, $J = 8,5, 1,3$ Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,29 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 8,20 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,98 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,74 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,67 (dd, $J = 8,5, 4,6$ Hz, 1H), 7,63 – 7,59 (m, 2H), 7,54 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

$[V^VO(IN-2H)(L3-H)] \cdot THF$ 1H NMR [400 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm]: 10,14 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,68 – 8,60 (m, 2H), 8,40 – 8,32 (m, 1H), 8,25 – 8,16 (m, 2H), 7,98 (dd, $J = 8,3, 1,3$ Hz, 1H), 7,75 (ddd, $J = 8,5, 7,0, 1,4$ Hz, 1H), 7,67 – 7,59 (m, 3H), 7,59 – 7,47 (m, 1H), 7,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

$[V^VO(IN-2H)(L4-H)]$ 1H NMR [400 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm]: 10,18 (s, 1H), 9,15 (d, $J = 9,1, 1,8$ Hz, 1H), 8,78 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,67 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,62 (dd, $J = 4,5, 1,6$ Hz, 2H), 8,35 (s, 1H), 8,23 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 8,00 (dd, $J = 8,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,82 – 7,71 (m, 2H), 7,63 – 7,59 (m, 2H), 7,55 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

$[V^VO_2(IN-H)] \cdot THF$ 1H NMR [400 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm]: 9,87(s, 1H), 8,76 (d, $J = 5,44$ Hz, 2H), 8,56 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,99 – 7,95 (m, 3H), 7,68 (ddd, $J = 8,4, 6,9, 1,4$ Hz, 1H), 7,50 (ddd, $J = 7,9, 6,9, 0,94$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H).

Tabla 4.15. Valores de desplazamiento químico (δ) de los espectros ^1H -RMN de los complejos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L}-\text{H})]$ en $\text{DMSO}-d_6$ a 25°C (δ , ppm). Se incluyen los ligandos libres a modo de comparación.

H	$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L1}-\text{H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L3}-\text{H})]$			$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L4}-\text{H})]$		
	δ_{lig}	δ_{comp}	$\Delta\delta$												
1	8,65	9,43	0,78	8,65	9,45	0,80	8,65	9,46	0,81	8,65	9,46	0,81	8,65	9,42	0,79
2'	7,84	8,15	0,31	7,84	8,18	0,34	7,84	8,19	0,35	7,84	8,18	0,33	7,84	8,17	0,33
6	7,45	7,67	0,22	7,45	7,68	0,23	7,46	7,70	0,24	7,45	7,66	0,21	7,45	7,68	0,23
7	6,92	6,79	-0,13	6,92	6,83	-0,09	6,92	6,86	-0,06	6,92	6,86	-0,14	6,92	6,78	-0,14
8	12,35	-	-	12,35	-	-	12,35	-	-	12,35	-	-	12,35	-	-
9	12,12	-	-	12,12	-	-	12,12	-	-	12,12	-	-	12,12	-	-
10	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,27	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,25
11	8,80	8,60	-0,20	8,80	8,61	-0,23	8,80	8,61	-0,19	8,80	8,61	-0,19	8,80	8,60	-0,20
12	8,80	8,60	-0,20	8,80	8,61	-0,23	8,80	8,61	-0,19	8,80	8,61	-0,19	8,80	8,60	-0,20
13	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,27	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,25	7,84	7,59	-0,25
14	9,82	-	-	11,00	-	-	11,07	-	-	*	-	-	*	-	-
15	7,09	7,78	0,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,20	7,92	0,72
16	7,41	7,29	-0,12	7,82	8,16	0,34	8,00	8,35	0,35	8,34	8,69	0,35	8,55	8,85	0,30
17	7,41	7,78	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	8,32	8,52	0,20	8,50	8,58	0,08	8,50	8,58	0,08	8,29	8,35	0,06	9,15	9,20	0,05
19	7,53	7,56	0,03	7,85	7,80	-0,05	7,77	7,70	-0,07	7,73	7,71	-0,02	7,89	7,87	-0,02
20	8,85	8,20	-0,65	9,00	8,27	-0,73	8,97	8,26	-0,71	8,87	8,19	-0,68	9,02	8,34	-0,64

$\Delta\delta = \delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$
 * Las señales son muy anchas

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L0}-\text{H})]$ ^1H NMR [400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ/ppm]: 9,43 (s, 1H), 8,63 – 8,59 (m, 2H), 8,52 (dd, $J = 8,3, 1,4$ Hz, 1H), 8,19 (dd, $J = 4,6, 1,4$ Hz, 1H), 8,15 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,81 – 7,75 (m, 2H), 7,67 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1H), 7,62 – 7,58 (m, 2H), 7,56 (dd, $J = 8,3, 4,6$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 6,3, 2,5$ Hz, 1H), 6,79 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H).

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS}-2\text{H})(\text{L1}-\text{H})]$ ^1H NMR [400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ/ppm]: 9,45 (s, 1H), 8,66 – 8,52 (m, 3H), 8,27 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 8,21-8,18 (m, 2H), 7,76 – 7,68 (m, 1H), 7,70 (dd, $J = 8,4, 4,5$ Hz, 1H), 7,61 – 7,55 (m, 2H), 6,83 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H).

$[V^{IV}O(BrIS-2H)(L2-H)]$ 1H NMR [400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm]: 9,46 (s, 1H), 8,66 – 8,52 (m, 3H), 8,35 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 8,26 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 8,19 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,76 – 7,68 (m, 1H), 7,70 (dd, $J = 8,5, 4,6$ Hz, 1H), 7,61 – 7,55 (m, 2H), 6,86 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H).

$[V^{IV}O(BrIS-2H)(L3-H)]$ 1H NMR [400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm]: 9,46 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,64 – 8,59 (m, 2H), 8,36 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 8,19 (d, $J = 2,6$ Hz, 2H), 7,76 – 7,68 (m, 1H), 7,66 (dd, $J = 8,5, 4,6$ Hz, 1H), 7,61 – 7,55 (m, 2H), 6,86 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H).

$[V^{IV}O(BrIS-2H)(L4-H)]$ 1H NMR [400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm]: 9,43 (s, 1H), 9,20 (dd, $J = 8,5, 1,4$ Hz, 1H), 8,85 (dd, $J = 6,5, 2,6$ Hz, 1H), 8,63 – 8,59 (m, 2H), 8,34 (dd, $J = 4,8, 1,3$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,87 (dd, $J = 8,4, 4,6$ Hz, 1H), 7,68 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1H), 7,62 – 7,58 (m, 3H).

4.5 COMPUESTOS HETEROLÉPTICOS $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, $L=L0-L4$

En la búsqueda de nuevos compuestos heterolépticos multifuncionales de oxovanadio (IV), se obtuvieron cinco nuevos compuestos de oxovanadio (IV) con el ligando *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (mpo) y los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina (L0-L4), de fórmula general $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$ (Figura 4.13), según el procedimiento que se detalló en la *sección* 3.1.9 del capítulo 3. Si bien se planteó la obtención de los compuestos de coordinación que incluyan los seis ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina seleccionados (L0-L5), (Figura 4.7B), no fue posible obtener con pureza adecuada el compuesto de coordinación heteroléptico con mpo y el ligando L5. Para este caso, el sólido obtenido pareciera estar impurificado con el compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L5-H)_2]$ o una especie análoga de oxovanadio (V).

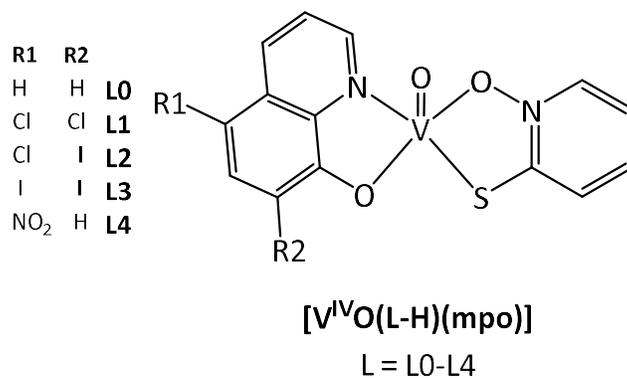


Figura 4.13. Estructura de los compuestos obtenidos de fórmula general [V^{IV}O(L-H)(mpo)]

4.5.1 Síntesis

Se pusieron a punto las condiciones de síntesis que permitieron obtener los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] (Figura 4.13). Los compuestos se obtuvieron haciendo reaccionar V^{IV}OSO₄ con la cantidad estequiométrica de los ligandos en medio básico acuoso. Durante todo el procedimiento, se cuidaron las condiciones de atmósfera inerte para evitar la oxidación del átomo central. La filtración, lavado y secado de los compuestos fue llevado a cabo utilizando una corriente continua de N₂ sobre el sólido y el sólido se secó a vacío. El procedimiento se detalla en la *sección 3.1.9* del capítulo 3. Todos los compuestos se obtuvieron como sólidos color marrón verdoso. Los rendimientos de síntesis expresados en masa y porcentaje se detallan en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Rendimientos de síntesis para los compuestos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$

Compuesto	Rendimiento (mg)	Rendimiento (%)
$[V^{IV}O(L0-H)(mpo)] \cdot 1,5H_2O$	31	17
$[V^{IV}O(L1-H)(mpo)] \cdot H_2O$	80	38
$[V^{IV}O(L2-H)(mpo)] \cdot 3H_2O$	103	37
$[V^{IV}O(L3-H)(mpo)]$	87	30
$[V^{IV}O(L4-H)(mpo)] \cdot H_2O$	70	35

Todos los complejos obtenidos se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y espectroscopía paramagnética electrónica. Además, se midieron las propiedades magnéticas de los compuestos para caracterizar el estado de oxidación del metal al estado sólido. La cantidad de moléculas de hidratación se confirmó por análisis termogravimétrico.

4.5.2 Caracterización al estado sólido

4.5.2.1 Análisis elemental

La fórmula química propuesta se confirmó mediante análisis elemental de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. El valor porcentual obtenido de cada uno de estos elementos está de acuerdo con los valores teóricos calculados según la fórmula propuesta (Tabla 4.17). Para algunos compuestos se incluyeron moléculas de H_2O de cristalización para ajustar los valores porcentuales obtenidos.

Tabla 4.17. Resultados de análisis elemental de C, H, N y S de los complejos de fórmula $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$

Compuesto	%C _{exp}	%H _{exp}	%N _{exp}	%S _{exp}	Fórmula
	(%C _{teo})	(%H _{teo})	(%N _{teo})	(%S _{teo})	
$[V^{IV}O(L0-H)(mpo)] \cdot 1,5H_2O$	45,86 (46,10)	3,45 (3,61)	7,73 (7,75)	9,10 (8,82)	$C_{14}H_{13}N_2O_{4,5}SV$
$[V^{IV}O(L1-H)(mpo)] \cdot H_2O$	39,51 (39,62)	2,24 (2,40)	6,78 (6,61)	8,42 (7,60)	$C_{14}H_{10}Cl_2N_2O_4SV$
$[V^{IV}O(L2-H)(mpo)] \cdot 3H_2O$	30,48 (30,54)	1,76 (2,43)	5,03 (5,12)	6,60 (5,89)	$C_{14}H_{14}ClIN_2O_6SV$
$[V^{IV}O(L3-H)(mpo)]$	29,20 (28,67)	1,64 (1,40)	5,01 (4,83)	6,79 (5,44)	$C_{14}H_8I_2N_2O_5SV$
$[V^{IV}O(L4-H)(mpo)] \cdot H_2O$	42,12 (42,04)	2,31 (2,80)	10,50 (10,52)	7,68 (8,01)	$C_{14}H_{11}N_3O_6SV$

4.5.2.2 Análisis termogravimétrico

Las moléculas de agua de cristalización incluidas en las fórmulas de la Tabla 4.17 fueron confirmadas por análisis termogravimétrico (TGA). Adicionalmente, dado que la muestra se quemó en presencia de oxígeno, mediante el TGA se calculó la cantidad de vanadio total en la muestra, asumiendo que el único producto final se trata del óxido de vanadio V_2O_5 . La Tabla 4.18 resume los resultados obtenidos.

Tabla 4.18. Resultados de análisis termogravimétrico los complejos de fórmula[V^{IV}O(L-H)(mpo)]

Compuesto	% pérdida de masa	Moléculas de H ₂ O por mol en la muestra	Moléculas de H ₂ O por mol esperadas	% V _{exp} (% V _{teo})
[V ^{IV} O(L0-H)(mpo)]·1,5H ₂ O	7,21	1,46	1,5	13,7 (13,98)
[V ^{IV} O(L1-H)(mpo)] · H ₂ O	4,18	0,985	1	11,9 (12,01)
[V ^{IV} O(L2-H)(mpo)] · 3H ₂ O	9,55	2,93	3	9,4 (9,23)
[V ^{IV} O(L3-H)(mpo)]	0	0	0	8,4 (8,65)
[V ^{IV} O(L4-H)(mpo)] · H ₂ O	4,745	1,05	1	12,8 (12,73)

4.5.2.3 Espectroscopía infrarroja

Para los cinco complejos, se midieron los espectros de infrarrojo (IR) en pastillas de KBr en el rango entre 400 y 4000 cm⁻¹. La presencia simultánea de los ligandos mpo y los derivados de la 8-hidroxiqunolina en la esfera de coordinación del vanadio conduce a espectros bastante complejos, específicamente en la región 1600-1500 cm⁻¹, donde aparecen muchas bandas que corresponden a $\nu(\text{C}=\text{C})$ en compuestos heterocíclicos. Estas bandas aparecen desplazadas a menores energías, lo que sugiere la coordinación de los ligandos al centro metálico. Para identificar la presencia del ligando mpo en los complejos, se identificaron las bandas asociadas a las frecuencias $\nu(\text{N}-\text{O})$, $\delta(\text{N}-\text{O})$, y $\nu(\text{C}-\text{S})$ del grupo *N*-óxido y del grupo tiol. La Figura 4.14 muestra un espectro de infrarrojo obtenido para el complejo [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] en comparación con el ligando libre mpo y la Tabla 4.19 resume la asignación tentativa de las bandas

relevantes en el IR para el ligando mpo, presentes en los cinco complejos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})(\text{mpo})]$.

Para todos los compuestos, el perfil espectral fue similar. Por efecto de la coordinación se observó un desplazamiento de las bandas $\nu(\text{N-O})$ y $\nu(\text{C-S})$ del mpo. El corrimiento está de acuerdo con una coordinación bidentada del ligando mpo a través del átomo de azufre y del oxígeno del grupo *N*-óxido³⁷⁻⁴⁰. Para todos los complejos se identificó la banda intensa correspondiente a $\nu(\text{V=O})$ a alrededor de 968 cm^{-1} característica del centro $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+}$.

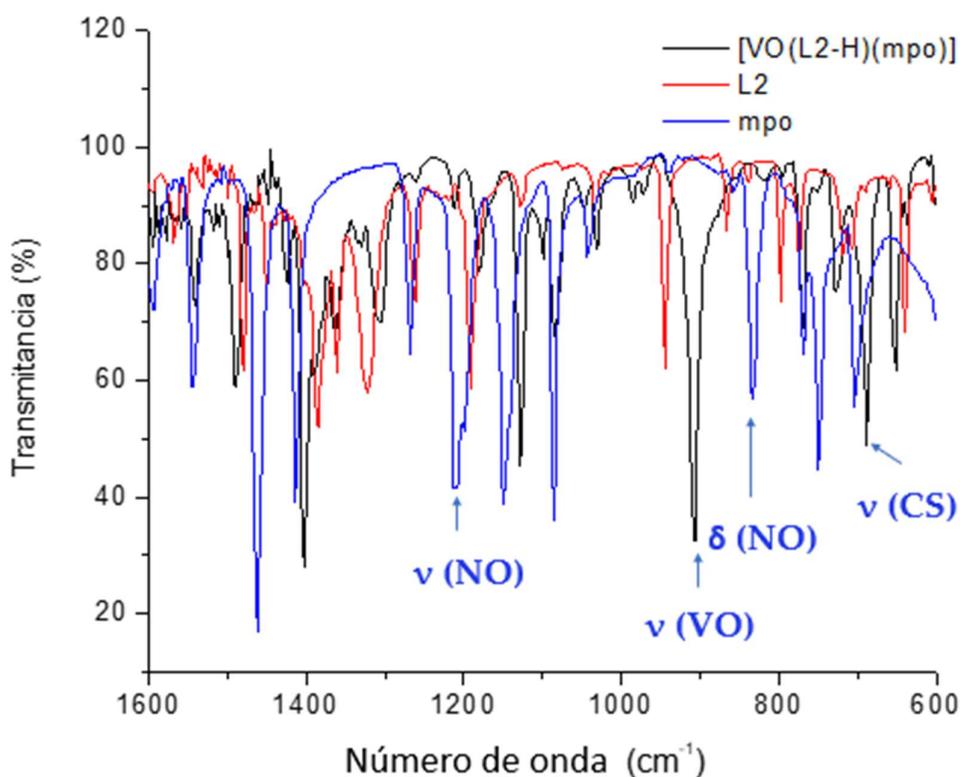


Figura 4.14. Espectros de IR del complejo $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})(\text{mpo})]$ y de los ligandos libres mpo y L2 en el rango entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 4.19. Asignación tentativa de las bandas relevantes en el IR para los complejos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] y el ligando Na mpo. Las posiciones de las bandas son expresadas en cm⁻¹.

Compuesto	v(VO)	v(NO)	δ(NO)	v(CS)
Na mpo	-	1206 s	834 s	702 s
[V ^{IV} O(L0-H)(mpo)]·1,5H ₂ O	968 s	1188 s	830 s	697 sh
[V ^{IV} O(L1-H)(mpo)] · H ₂ O	968 s	1188 s	830 s	697 sh
[V ^{IV} O(L2-H)(mpo)] · 3H ₂ O	968 s	1188 m	829 s	695 sh
[V ^{IV} O(L3-H)(mpo)]	967 s	1188 m	829 s	696 sh
[V ^{IV} O(L4-H)(mpo)] · H ₂ O	966 s	1188 m	830 s	696 sh

s: intensa; m: intensidad media; sh: hombro

4.5.2.4 Susceptibilidad magnética

Dadas las dificultades para la obtención de monocristales adecuados para difracción de Rayos X, se midió la susceptibilidad magnética (χ) de las muestras [V^{IV}O(L-H)(mpo)] al estado sólido con el objetivo de caracterizar el estado de oxidación del átomo central. El ion vanadio (IV) tiene una configuración [Ar]3d¹, mientras que el vanadio (V) presenta una configuración electrónica de capa llena [Ar] sin electrones d fuera de la misma. ⁴¹. Los ensayos fueron realizados en el marco de una estancia de investigación en la Universidad de Santiago de Chile bajo la tutoría del Prof. Diego Venegas. La susceptibilidad magnética para todos los compuestos de oxovanadio (IV) se encontró en el rango de +0,77-0,95, la cual cae dentro del rango esperado para un sistema d¹, confirmando el estado de oxidación del átomo central ⁴².

Las curvas de susceptibilidad magnética contra la temperatura son características de complejos mononucleares que no presentan interacciones ferromagnéticas o antiferromagnéticas con las subunidades adyacentes ⁴³ (Figura 4.15).

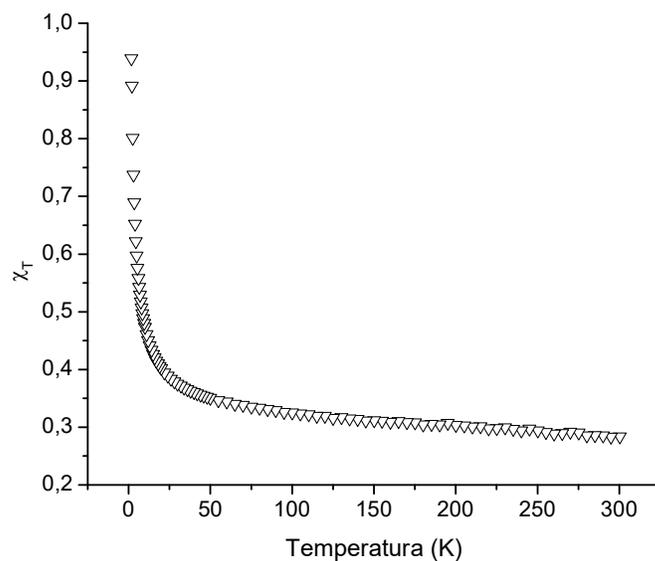


Figura 4.15. Curva de susceptibilidad magnética frente a la temperatura para el complejo $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$.

4.5.3 Caracterización en disolución

4.5.3.1 Conductimetría

La conductividad molar, medida en soluciones de concentración 1 mM en DMSO para todos los nuevos complejos fueron de $\sim 1 - 3 \text{ S cm}^2 / \text{mol}$. Los valores obtenidos indican que se trata de compuestos neutros, tal como se propone para las fórmulas $[V^{IV}O(L0-H)(mpo)]$ ²⁵.

4.5.3.2 Resonancia paramagnética electrónica

Los complejos de la serie $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$ fueron caracterizados en disolución por espectroscopía de EPR. Tal como se detalló en la *sección 3.2.2.3* del capítulo 3, se prepararon soluciones de los complejos a concentraciones de 3 mM,

a temperatura ambiente, en DMSO previamente desgasificado por barboteo de N₂ por 10 minutos. Se midieron inmediatamente los espectros EPR a 100 K (Figura 4.16A) y los parámetros Hamiltonianos de espín fueron obtenidos por simulación con el programa desarrollado por Rockenbauer y Korecz (Tabla 4.20)⁴⁴. A modo de ejemplo, la Figura 4.16B muestra la comparación del espectro EPR medido y simulado para el complejo [V^{IV}O(L2-H)(mpo)]. Debido a la baja intensidad de las señales obtenidas para el espectro de [V^{IV}O(L0-H)(mpo)], este espectro no fue simulado.

Todos los complejos de oxovanadio (IV) estudiados muestran un espectro de EPR con un patrón hiperfino típico de la presencia de compuestos monoméricos de vanadio en estado de oxidación (IV). Los resultados comprueban el mismo modo de coordinación para todos los complejos, involucrando a ambos ligandos en el plano ecuatorial. De hecho, utilizando la regla de la aditividad ($|A_z^{est}| = \sum |A_{zi}|$ (i=1-4), siendo $|A_{zi}|$ la contribución de cada uno de los átomos donores en el plano ecuatorial), resulta $A_z^{est} = 153,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, valor que está de acuerdo con la coordinación a través de dos oxígenos aromáticos, el nitrógeno piridínico y el azufre aromático (2xAr-O, N_{pyr}, Ar-S)⁴⁵⁻⁴⁸.

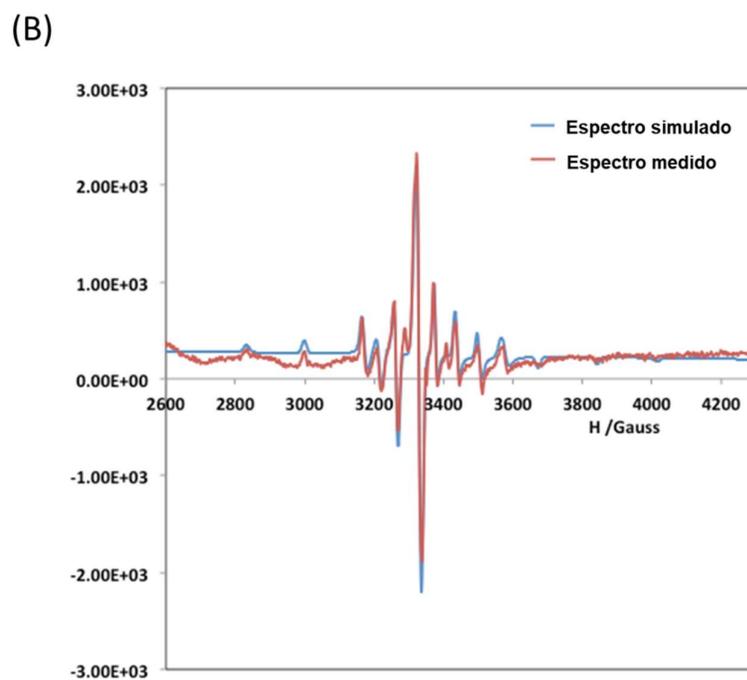
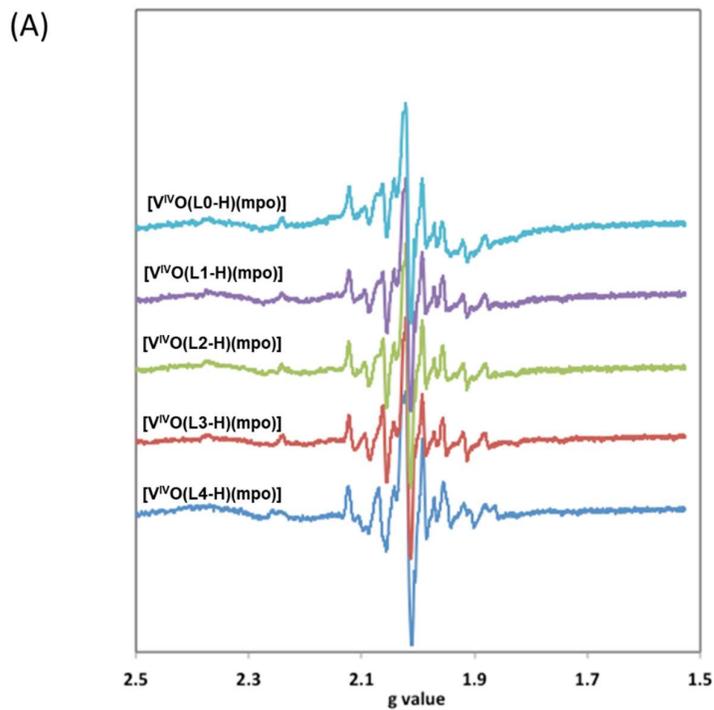


Figura 4.16. (A) Espectros EPR de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] medidos a 100 K en DMSO; (B) Espectro EPR medido y simulado de [V^{IV}O(L2-H)(mpo)]

Tabla 4.20. Parámetros Hamiltonianos de spin obtenidos por simulación de los espectros EPR de los compuestos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$.

Compuesto	$g_{x,y}$	g_z	$A_{x,y} (x10^{-4}cm^{-1})$	$A_z (x10^{-4}cm^{-1})$
$[V^{IV}O(L1-H)(mpo)]$	1,984	1,959	52,3	154,6
$[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$	1,981	1,958	53,0	155,4
$[V^{IV}O(L3-H)(mpo)]$	1,983	1,958	53,3	155,6
$[V^{IV}O(L4-H)(mpo)]$	1,983	1,957	53,3	155,9

4.6 COMPUESTOS HOMOLÉPTICOS $[V^{IV}O(L-H)_2]$ y $[V^VO(OCH_3)(L-H)_2]$, L = L0-L4

Con el objetivo de completar el trabajo comparativo, estudiando la influencia del co-ligando en los efectos biológicos observados, se sintetizaron los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina (L0-L5) (Figura 4.17). Algunos de estos compuestos ya habían sido sintetizados y caracterizados parcialmente en investigaciones anteriores ^{9, 24, 31}, mientras que otros se sintetizaron por primera vez en el marco de este trabajo.

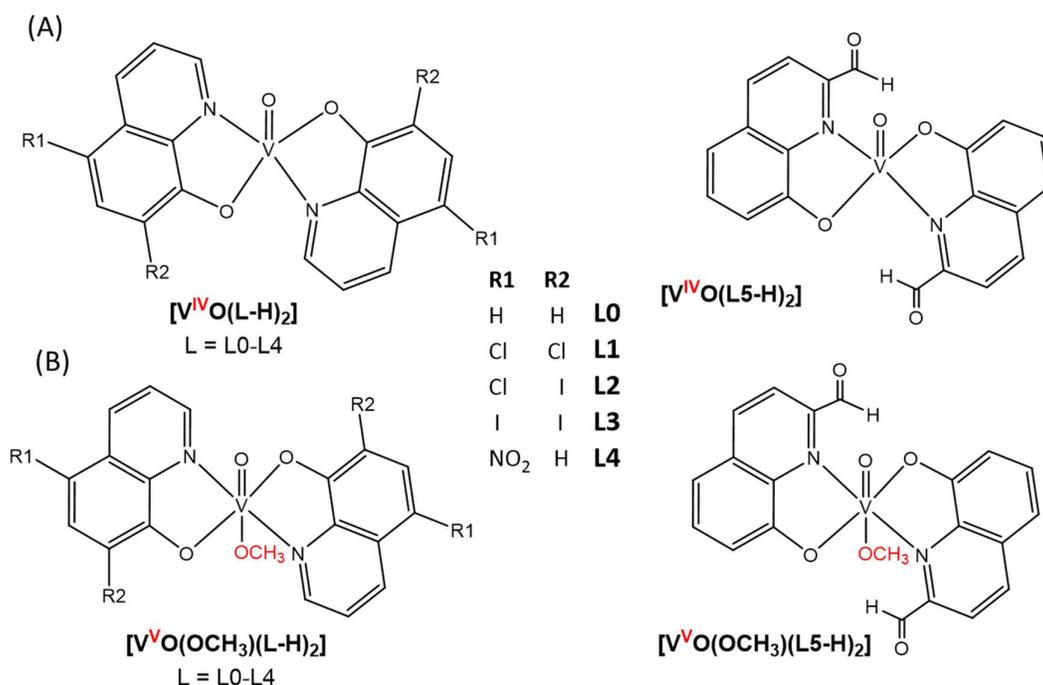


Figura 4.17. (A) Compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina; (B) Compuestos análogos homolépticos de oxovanadio (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina.

4.6.1 Síntesis

En cuanto a los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV), se ha reportado previamente la síntesis y caracterización parcial de los compuestos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, L = L0-L3²⁴. En este trabajo se obtuvieron estos cuatro complejos utilizando los métodos reportados. Además, se desarrolló un método alternativo, como se detalla en la *sección 3.1.7* del capítulo 3. La serie se completó con los compuestos $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L5-H)_2]$, los cuales fueron sintetizados por primera vez en este trabajo. El método alternativo de síntesis, utilizado para obtener los complejos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, L = L1-L5, consistió en hacer reaccionar $[V^{IV}O(acac)_2]$ con dos equivalentes del correspondiente ligando L en atmósfera inerte a temperatura ambiente. $[V^{IV}O(L5-H)_2]$ se sintetizó modificando el procedimiento previamente reportado para $[V^{IV}O(L0-H)_2]$. Todos los complejos

obtenidos se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y de EPR.

Por otra parte, la síntesis de los compuestos ya reportados $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$, $L = L0-L4$, se realizó siguiendo el procedimiento experimental previamente descrito, donde las condiciones de síntesis son similares a las utilizadas para los análogos de oxovanadio (IV). Sin embargo no se utiliza atmósfera inerte y se trabaja a reflujo con tiempos de reacción mucho más largos para promover la oxidación completa del vanadio (entre 5 y 7 días)^{9, 31}. Adicionalmente, en este trabajo se sintetizó y caracterizó por primera vez el compuesto $[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$ utilizando el mismo método. Los seis compuestos obtenidos se caracterizaron por análisis elemental, espectroscopía infrarroja y 1H RMN.

Los rendimientos de síntesis para los nuevos compuestos $[V^{IVO}(L4-H)_2]$, $[V^{IVO}(L5-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$, y los complejos $[V^{IVO}(L-H)_2]$, $L = L0-L3$, sintetizados por el nuevo método se detallan en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21. Rendimientos de síntesis para los compuestos $[V^{IVO}(L-H)_2]$, $L = L1-L5$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$.

Compuesto	Rendimiento (mg)	Rendimiento (%)
$[V^{IVO}(L1-H)_2]$	99	80
$[V^{IVO}(L2-H)_2]$	115	69
$[V^{IVO}(L3-H)_2]$	169	79
$[V^{IVO}(L4-H)_2]$	75	67
$[V^{IVO}(L5-H)_2]$	36	35
$[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$	42	19

4.6.2 Caracterización al estado sólido

4.6.2.1 Análisis elemental

La fórmula química propuesta se confirmó mediante análisis elemental de elementos los livianos carbono, hidrógeno y nitrógeno. El valor porcentual obtenido de cada uno de estos elementos está de acuerdo con los valores teóricos calculados según la fórmula propuesta (Tabla 4.22). La fórmula propuesta está de acuerdo con la postulada en las investigaciones previas ^{9, 49, 50}.

Tabla 4.22. Resultados de análisis elemental de C, H y N de los compuestos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, L = L1-L5 y $[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$.

Compuesto	%C _{exp} (%C _{teo})	%H _{exp} (%H _{teo})	%N _{exp} (%N _{teo})	Fórmula
$[V^{IV}O(L1-H)_2]$	43,79 (43,85)	1,70 (1,64)	5,65 (5,65)	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O _{4,5} SV
$[V^{IV}O(L2-H)_2]$	31,90 (31,98)	1,17 (1,19)	4,10 (4,16)	C ₁₈ H ₈ Cl ₂ L ₂ N ₂ O ₃ V
$[V^{IV}O(L3-H)_2]$	25,20 (25,17)	1,00 (0,94)	3,30 (3,26)	C ₁₈ H ₈ I ₄ N ₂ O ₃ V
$[V^{IV}O(L4-H)_2]$	48,80 (48,56)	2,20 (2,26)	12,55 (12,58)	C ₁₈ H ₁₀ N ₄ O ₇ V
$[V^{IV}O(L5-H)_2]$	58,10 (58,41)	3,00 (2,94)	6,70 (6,81)	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ O ₅ V
$[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$	57,10 (57,03)	3,30 (3,30)	6,35 (6,33)	C ₂₁ H ₁₅ N ₂ O ₅ V

4.6.2.2 Espectroscopía infrarroja

Se midieron los espectros de infrarrojo (IR) en pastillas de KBr en un rango entre 400 y 4000 cm^{-1} . Si bien los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina no tiene grupos funcionales que tengan bandas intensas características, se asignaron tentativamente las principales bandas a partir de los reportes para los complejos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de 8-hidroxiquinolina ^{9, 31, 50}. El conjunto de bandas que aparece en la región entre 1600 y 1500 cm^{-1} , las cuales se asocian con bandas de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{C})$ en compuestos heterocíclicos se vio desplazada en los complejos a menores energías, lo que sugieren una coordinación de los ligandos al centro metálico. Para todos los complejos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$ se identificó la banda intensa correspondiente a $\nu(\text{V}=\text{O})$ alrededor de 835-910 cm^{-1} característica del centro $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+}$ ^{12, 24}. En el caso de $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L5-H})_2]$, el espectro muestra dos bandas en la zona esperada para el estiramiento del enlace VO, una de ellas a 967 cm^{-1} , que se asigna al estiramiento $\nu(\text{V}=\text{O})$, y otra a 750 cm^{-1} que se asigna al estiramiento $\nu(\text{V}-\text{OCH}_3)$ ³⁴.

4.6.3 Caracterización en disolución

4.6.3.1 Resonancia magnética nuclear

El complejo de oxovanadio (V) $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L5-H})_2]$ se caracterizó en disolución por ^1H RMN. El espectro obtenido presenta señales estrechas, típicas de compuestos diamagnéticos. Por lo tanto, se confirma el estado de oxidación del vanadio (V) como átomo central del complejo. La asignación de los ligandos L0-L4 fue extraída de la literatura ³⁶.

El espectro presenta dos conjuntos de señales provenientes de los ligandos L, lo que representa la presencia de dos fragmentos hidroxiquinolina

inequivalentes. El resultado está de acuerdo con lo reportado previamente para los complejos $[V^VO(OCH_3)(L-H)_2]$, donde $L = L0-L4$ ^{9, 31}. La multiplicidad de las señales y la integración de estas en 1H -RMN están de acuerdo con las fórmulas moleculares propuestas. La señal distintiva que corresponde a los protones alquílicos del metóxido se asignó con un desplazamiento de 5,75 ppm. La ausencia de las señales correspondientes a los OH indican que el ligando L se coordina de forma deprotonada.

En la Figura 4.18 se postula un posible modo de coordinación para el compuesto $[V^VO(OCH_3)(L5-H)_2]$, basado en los reportes previos para los complejos relacionados, donde para alguno de ellos está reportada la estructura cristalina ^{9, 31}.

$[V^VO(OCH_3)(L5-H)_2]$ 1H NMR [400 MHz, DMSO- d_6 , δ /ppm]: 9,35 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 8,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,76–7,68 (m, 2H), 7,48–7,38 (m, 2H), 7,34 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,27 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 5,57 (s, 3H).

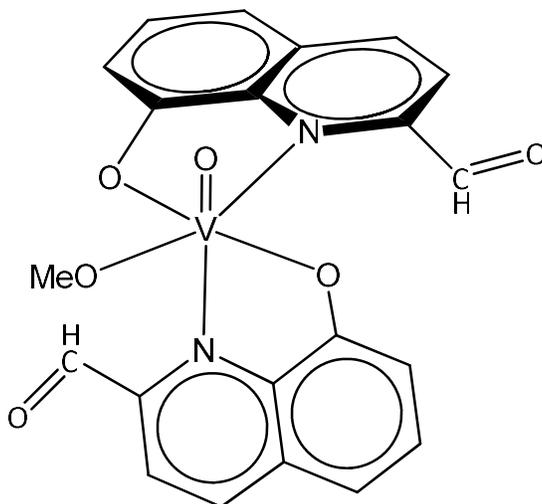


Figura 4.18. Posible modo de coordinación para el compuesto $[V^VO(OCH_3)(L5-H)_2]$, basado en los reportes previos para los complejos relacionados.

4.6.3.2 Resonancia paramagnética electrónica

Los compuestos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, con $L = L1-L4$, sintetizados por el método alternativo previamente descrito, fueron caracterizados en disolución por espectroscopía de EPR. Tal como se detalló en la *sección* 3.2.2.3 del capítulo 3, se prepararon soluciones de los complejos a concentraciones de 3 mM, a temperatura ambiente, en DMF previamente desgasificado por barboteo de N_2 por 10 minutos. Se midieron inmediatamente los espectros EPR a 100 K (Figura 4.19) y los parámetros Hamiltonianos de espín fueron obtenidos por simulación con el programa desarrollado por Rockenbauer y Korecz (Tabla 4.23)⁴⁴. A modo de ejemplo, la Figura 4.19B muestra la comparación del espectro EPR medido y simulado para el complejo $[V^{IV}O(L4-H)_2]$.

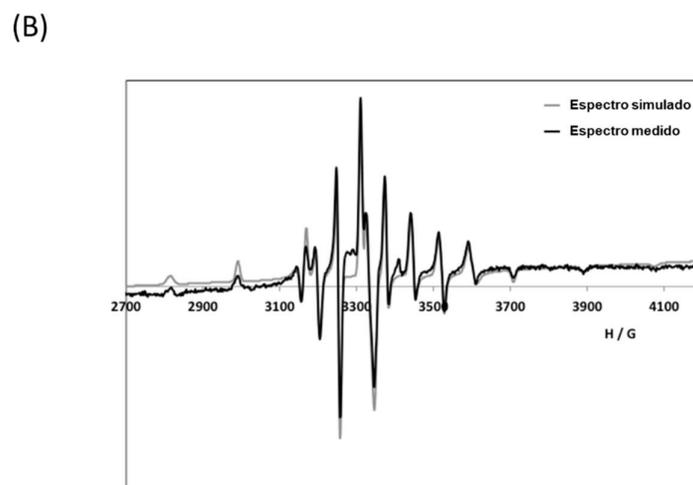
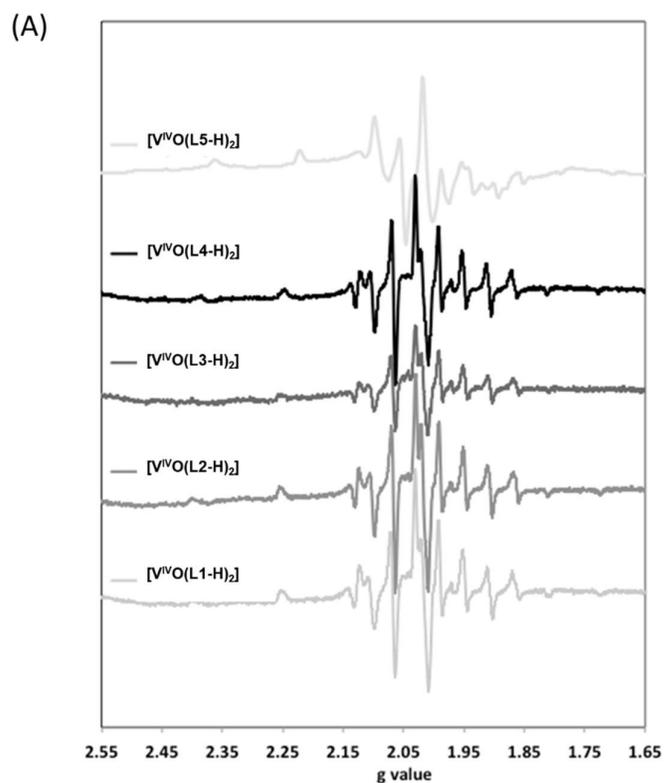


Figura 4.19. (A) Espectros de EPR de los compuestos $[V^{IV}O(L-H)]$ medidos a 100 K en DMF; (B) Espectro EPR medido y simulado de $[V^{IV}O(L4-H)_2]$

Tabla 4.23. Parámetros Hamiltonianos de spin obtenidos por simulación de los espectros EPR de los compuestos $[V^{IV}O(L4-H)_2]$.

Compuesto	$g_{x,y}$	g_z	$A_{x,y} (x10^{-4}cm^{-1})$	$A_z (x10^{-4}cm^{-1})$
$[V^{IV}O(L1-H)_2]$	1,981	1,946	59,3	166,0
$[V^{IV}O(L2-H)_2]$	1,981	1,947	59,3	166,1
$[V^{IV}O(L3-H)_2]$	1,981	1,947	59,5	166,1
$[V^{IV}O(L4-H)_2]$	1,982	1,947	58,4	163,5
$[V^{IV}O(L5-H)_2]$	1,977	1,930	52,1	163,6

Todos los complejos muestran un espectro EPR con un patrón hiperfino típico de la presencia de compuestos monoméricos de vanadio en estado de oxidación (IV) (Figura 4.19A). Los resultados comprueban el mismo modo de coordinación para todos los complejos. El modo de coordinación más probable en disolución de DMF es el que contiene un derivado de 8-hidroxiquinolina coordinado con el oxígeno fenólico en la posición apical. Utilizando la regla de la aditividad ($|A_z^{est}| = \sum |A_{zi}|$ ($i=1-4$), siendo $|A_{zi}|$ la contribución de cada uno de los átomos donores en el plano ecuatorial) y $|A_z|(DMF) = 43,7 \times 10^{-4} cm^{-1}$, $|A_z|(O_{fenolato}) = 38,9 \times 10^{-4} cm^{-1}$, $|A_z|(N_{piridinico||}) = 40,4 \times 10^{-4} cm^{-1}$ y $|A_z|(N_{piridinico\perp}) = 44,1 \times 10^{-4} cm^{-1}$ ⁴⁵⁻⁴⁸, se estimaron los valores de $|A_z^{est}|$ que se muestran en la Figura 4.20. Teniendo en cuenta el error asociado con los cálculos de $|A_z^{est}| (\pm 3 \times 10^{-4} cm^{-1})$ ⁴⁶, no es posible asignar un único modo de unión basado en resultados de EPR. Sin embargo, si se asume un modo de coordinación similar al determinado para el complejo $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ al estado sólido⁴⁹, se podría sugerir el **Modo 2** como el isómero principal (Figura 4.20). Otros reportes han sugerido que los derivados de 8-hidroxiquinolina coordinan en una geometría de pirámide de base cuadrada, pero también puede haber distorsión hacia pirámide trigonal⁵¹. Para el caso particular de $[V^{IV}O(L0-H)_2]$, se ha concluido que si bien el modo de coordinación al estado sólido es el representado en la Figura 4.20 como **Modo 2**, en disolución la geometría del complejo es octaédrica, ocupando la sexta posición

una molécula de solvente en posición *cis* relativa al enlace V=O (**Modo 3 y 4**). Los resultados sugieren que las diferencias de energía entre los isómeros *cis* y *trans*, probablemente no sean muy elevadas.

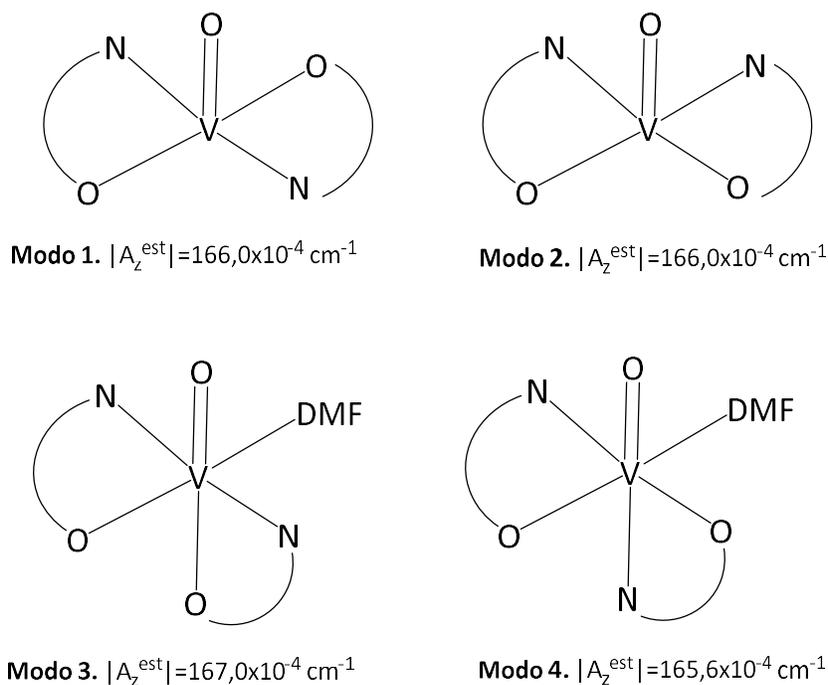


Figura 4.20. Posibles modos de coordinación y parámetros $|A_z^{est}|$ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$) calculados utilizando los valores de $|A_{zi}|$ indicados en el texto. Dado que todos los valores de $|A_z^{est}|$ son muy similares, no fue posible asignar solo un modo de coordinación para los complejos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})_2]$.

4.7 CONCLUSIONES PARCIALES

Se sintetizaron y caracterizaron 19 nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio con ligandos bioactivos y 18 compuestos homolépticos, donde 4 de estos últimos no habían sido reportados previamente.

La primera familia incluye compuestos heterolépticos de fórmula general $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, donde L0 corresponde al ligando bioactivo 8-hidroxiquinolina y LS representa un conjunto de ligandos derivados de la

semicarbazona de salicilaldehído los cuales contienen pequeñas variaciones químicas sobre el anillo fenólico del aldehído.

Por otra parte, se sintetizaron 10 nuevos compuestos heterolépticos de fórmula $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L-H)]$, donde IN y BrIS son ligandos tridentados N^2 -(4-piridinilcarbonil)hidrazona obtenidos por condensación de 2-hidroxinaftaldehído o 5-bromosalicilaldehído e isoniazida, y L representa a cinco ligandos bioactivos, derivados sustituidos de la 8-hidroxiquinolina.

Se sintetizó y caracterizó una familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) donde se incluyeron en la misma esfera de coordinación los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina y *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo), $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, dando lugar a nuevas entidades multifuncionales que contienen dos ligandos bioactivos en tripanosomátidos.

En cuanto a los compuestos homolépticos, se obtuvieron los cuatro $[V^VO_2(LS-H)]$, donde LS = LS1-LS4, y los compuestos $[V^VO_2(IN-H)]$ y $[V^VO_2(BrIS-H)]$. Se destaca, además, que el compuesto $[V^VO_2(LS3-H)]$ se sintetizó y caracterizó por primera vez en esta tesis, incluyendo su estructura cristalina al estado sólido.

Si bien la mayoría de los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, $[V^{IV}O(L-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$ ya habían sido previamente desarrollados hace algunas décadas, en esta oportunidad se amplió la caracterización de los mismos y se completó la serie reportando por primera vez los compuestos $[V^{IV}O(L4-H)_2]$, $[V^{IV}O(L5-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L5-H)_2]$.

Todos los nuevos compuestos se caracterizaron al estado sólido y en disolución por la conjunción de diferentes técnicas adecuadas, tales como análisis elemental, espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X, medidas de

susceptibilidad magnética, medidas de conductividad y espectroscopías de resonancia magnética nuclear y resonancia paramagnética electrónica.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte interesante a la química de coordinación del vanadio con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, coligandos tridentados y *N*-óxidos de aminas aromáticas.

4.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thompson, K. H.; Orvig, C., Coordination chemistry of vanadium in metallopharmaceutical candidate compounds. *Coord Chem Rev* **2001**, *219*, 1033-1053.
2. Thompson, K. H.; Tsukada, Y.; Xu, Z.; Battell, M.; McNeill, J. H.; Orvig, C., Influence of chelation and oxidation state on vanadium bioavailability, and their effects on tissue concentrations of zinc, copper, and iron. *Biol Trace Elem Res* **2002**, *86*, 31-45.
3. Benitez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D., Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303-12.
4. Benitez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Arrambide, G.; Navarro, M.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (4), 609-16.
5. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
6. Scalese, G.; Benitez, J.; Rostan, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Birriel, E.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Pessoa, J. C.; Gambino, D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 116-25.
7. Qin, Q. P.; Chen, Z. F.; Qin, J. L.; He, X. J.; Li, Y. L.; Liu, Y. C.; Huang, K. B.; Liang, H., Studies on antitumor mechanism of two planar platinum(II) complexes with 8-hydroxyquinoline: synthesis, characterization, cytotoxicity, cell cycle and apoptosis. *Eur J Med Chem* **2015**, *92*, 302-13.
8. Thamilarasan, V.; Sengottuvelan, N.; Sudha, A.; Srinivasan, P.; Siva, A., Synthesis, molecular structure, theoretical calculation, DNA/protein interaction and cytotoxic

- activity of manganese(III) complex with 8-hydroxyquinoline. *J Photochem Photobiol B* **2015**, *142*, 220-31.
9. Correia, I.; Adao, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; Costa Pessoa, J., Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *J Inorg Biochem* **2014**, *141*, 83-93.
 10. Barilli, A.; Atzeri, C.; Bassanetti, I.; Ingoglia, F.; Dall'Asta, V.; Bussolati, O.; Maffini, M.; Mucchino, C.; Marchio, L., Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells. *Mol Pharm* **2014**, *11* (4), 1151-63.
 11. Gobec, M.; Kljun, J.; Sosic, I.; Mlinaric-Rascan, I.; Ursic, M.; Gobec, S.; Turel, I., Structural characterization and biological evaluation of a clioquinol-ruthenium complex with copper-independent antileukaemic activity. *Dalton Trans* **2014**, *43* (24), 9045-51.
 12. Chen, Z. F.; Peng, Y.; Gu, Y. Q.; Liu, Y. C.; Liu, M.; Huang, K. B.; Hu, K.; Liang, H., High antitumor activity of 5,7-dihalo-8-quinolinolato tin(IV) complexes. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 51-8.
 13. Liu, Y. C.; Wei, J. H.; Chen, Z. F.; Liu, M.; Gu, Y. Q.; Huang, K. B.; Li, Z. Q.; Liang, H., The antitumor activity of zinc(II) and copper(II) complexes with 5,7-dihalo-substituted-8-quinolinoline. *Eur J Med Chem* **2013**, *69*, 554-63.
 14. Ferraz, K. S. O.; Reis, D. C.; Da Silva, J. G.; Souza-Fagundes, E. M.; Baran, E. J.; Beraldo, H., Investigation on the bioactivities of clioquinol and its bismuth(III) and platinum(II,IV) complexes. *Polyhedron* **2013**, *63*, 28-35.
 15. Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Gallium in cancer treatment. *Curr Top Med Chem* **2004**, *4*, 1575-1583.
 16. Hofheinz, R. D.; Dittrich, C.; Jakupec, M. A.; Drescher, A.; Jaehde, U.; Gneist, M.; Graf von Keyserlingk, N.; Keppler, B. K.; Hochhaus, A., Early results from a phase I study on orally administered tris(8-quinolinolato)gallium(III) (FFC11, KP46) in patients with solid tumors--a CESAR study (Central European Society for Anticancer Drug Research--EWIV). *Int J Clin Pharmacol Ther* **2005**, *43* (12), 590-1.

17. Gambino, D.; Fernández, M.; Santos, D.; Etcheverría, G. A.; Piro, O. E.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Tomaz, I.; Marques, F., Searching for gallium bioactive compounds: Gallium(III) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazone derivatives. *Polyhedron* **2011**, *30* (7), 1360-1366.
18. Noblíá, P.; Baran, Enrique J.; Otero, L.; Draper, P.; Cerecetto, H.; González, M.; Piro, Oscar E.; Castellano, Eduardo E.; Inohara, T.; Adachi, Y.; Sakurai, H.; Gambino, D., New vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives: Synthesis, characterization, and *in vitro* insulin-mimetic activity– crystal structure of [V(V)O₂(salicylaldehyde semicarbazone)]. *Eur J Inorg Chem* **2004**, *2004* (2), 322-328.
19. Noblia, P.; Vieites, M.; Parajon-Costa, B. S.; Baran, E. J.; Cerecetto, H.; Draper, P.; Gonzalez, M.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Monge-Vega, A.; Gambino, D., Vanadium(V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing *in vitro* anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): crystal structure of [V(V)O₂(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. *J Inorg Biochem* **2005**, *99* (2), 443-51.
20. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, *23* (8), 1265-1281.
21. Fernandez, M.; Varela, J.; Correia, I.; Birriel, E.; Castiglioni, J.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gambino, D., A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Trans* **2013**, *42* (33), 11900-11.
22. Nica, S.; Rudolph, M.; Görls, H.; Plass, W., Structural characterization and electrochemical behavior of oxovanadium(V) complexes with N-salicylidene hydrazides. *Inorg Chim Acta* **2007**, *360* (5), 1743-1752.
23. Ghosh, T.; Mondal, B.; Ghosh, T.; Sutradhar, M.; Mukherjee, G.; Drew, M. G., Synthesis, structure, solution chemistry and the electronic effect of para substituents on the vanadium center in a family of mixed-ligand [V^vO (ONO)(ON)] complexes. *Inorg Chim Acta* **2007**, *360* (5), 1753-1761.

24. González-Baró, A. C.; Baran, E. J., Oxovanadium(IV) complexes of halogenated oxines. *Monatsh Chem* **1997**, *128* (4), 323-335.
25. Geary, W. J., The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord Chem Rev* **1971**, *7*, 81-122.
26. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Lima, A.; Gehrke, S. A.; Scalese, G.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., High Throughput Approaches to Unravel the Mechanism of Action of a New Vanadium-Based Compound against *Trypanosoma cruzi*. *Bioinorg Chem Appl* **2020**, *2020*, 1634270.
27. Sah, P. P.; Peoples, S. A., Isonicotinyl hydrazones as antitubercular agents and derivatives for identification of aldehydes and ketones. *J Am Pharm Assoc* **1954**, *43* (9), 513-524.
28. Sravya, S.; Sruthy, S.; Aiswarya, N.; Sithambaresan, M.; Kurup, M. R., Crystal structure of (E)-N'-(5-bromo-2-hydroxy-benzyl-iden)nicotinohydrazide monohydrate. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun* **2015**, *71* (Pt 7), 734-6.
29. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5375.
30. Paar, A. Reactor de Síntesis: Monowave 50. Disponible en <https://www.anton-paar.com/mx-es/productos/detalles/reactor-de-sintesis-monowave-50/> (visitada en diciembre de 2022).
31. Gryca, I.; Czerwinska, K.; Machura, B.; Chrobok, A.; Shul'pina, L. S.; Kuznetsov, M. L.; Nesterov, D. S.; Kozlov, Y. N.; Pombeiro, A. J. L.; Varyan, I. A.; Shul'pin, G. B., High Catalytic Activity of Vanadium Complexes in Alkane Oxidations with Hydrogen Peroxide: An Effect of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Noninnocent Ligands. *Inorg Chem* **2018**, *57* (4), 1824-1839.
32. Li, Y.; Bian, H.; Song, H.; Wang, H., Synthesis and crystal structure of a vanadium (V) complex with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Chin J Struct Chem* **2007**, *26* (1), 37-40.
33. Kurbah, S. D.; Asthana, M.; Syiemlieh, I.; Lywait, A. A.; Longchar, M.; Lal, R. A., New dioxido-vanadium(V) complexes containing hydrazone ligands: Syntheses,

- crystal structure and their catalytic application toward C H bond functionalization. *J Organomet Chem* **2018**, *876*, 10-16.
34. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Díaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem* **2019**, *43* (45), 17756-17773.
35. Scalese, G.; Mosquillo, M. F.; Rostan, S.; Castiglioni, J.; Alho, I.; Perez, L.; Correia, I.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *J Inorg Biochem* **2017**, *175*, 154-166.
36. Rivas, F.; Medeiros, A.; Comini, M.; Suescun, L.; Rodriguez Arce, E.; Martins, M.; Pinheiro, T.; Marques, F.; Gambino, D., Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells. *J Inorg Biochem* **2019**, *199*, 110779.
37. Machado, I.; Marino, L. B.; Demoro, B.; Echeverria, G. A.; Piro, O. E.; Leite, C. Q.; Pavan, F. R.; Gambino, D., 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* **2014**, *87*, 267-73.
38. Rodríguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Pérez-Díaz, L.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitiño, E. L.; Maríngolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q. F.; Pavan, F. R.; Otero, L.; Gambino, D., Aromatic amine *N*-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Trans* **2015**, *44* (32), 14453-14464.
39. Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchan, E.; Gomez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2009**, *103* (10), 1300-6.
40. Vieites, M.; Smircich, P.; Parajon-Costa, B.; Rodriguez, J.; Galaz, V.; Olea-Azar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gomez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2008**, *13* (5), 723-35.
41. Selbin, J., The chemistry of oxovanadium(IV). *Chem Rev* **1965**, *65* (2), 153.
 42. Syamal, A., Spin-spin coupling in oxovanadium (IV) complexes. *Coord Chem Rev* **1975**, *16* (4), 309-339.
 43. Earnshaw, A., *Introduction to magnetochemistry*. Elsevier: 2013.
 44. Rockenbauer, A.; Korecz, L., Automatic computer simulations of ESR spectra. *Appl Magn Reson* **1996**, *10*, 29-43.
 45. Wüthrich, K., Elektronenspinresonanz-Untersuchungen von VO²⁺-Komplexverbindungen in wässriger Lösung II. *Helv Chim Acta* **1965**, *48* (5), 1012-1017.
 46. Chasteen, N., *Biol magnet res*. Plenum Press: New York, 1981; Vol. 3, p 53.
 47. Micera, G.; Pecoraro, V. L.; Garribba, E., Assessing the Dependence of 51V A z Value on the Aromatic Ring Orientation of V^{IV}O²⁺ Pyridine Complexes. *Inorg Chem* **2009**, *48* (13), 5790-5796.
 48. Smith II, T. S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V. L., Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems. *Coord Chem Rev* **2002**, *228* (1), 1-18.
 49. Shiro, M.; Fernando, Q., The crystal and molecular structure of bis-(2-methyl-8-quinolinolato) oxovanadium (IV). *J Am Chem Soc D: Chem Comm* **1971**, (1), 63-64.
 50. Gonzalez Baró, A. C.; Baran, E. J., Oxovanadium(IV) complexes of halogenated oxines. *Monats ftir Chem* **1997**, *128*, 323-335.
 51. Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Lodyga-Chruscinska, E., Oxovanadium(IV) complexes of quinoline derivatives. *Inorg Chim Acta* **2003**, *348*, 97-106.

CAPÍTULO 5

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

CAPÍTULO 5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Contenido

5.1	INTRODUCCIÓN.....	313
5.2	ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> EN EPIMASTIGOTAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> Y CITOTOXICIDAD 314	
5.2.1	Ligandos libres y fármacos de referencia	315
5.2.2	Compuestos heterolépticos [V ^{VO} (LS-2H)(L0-H)]	317
5.2.3	Compuestos heterolépticos [V ^{VO} (IN-2H)(L-H)]	320
5.2.4	Compuestos heterolépticos [V ^{VO} (BrIS-2H)(L-H)].....	322
5.2.5	Compuestos homolépticos [V ^{IV} O(L-H) ₂] y [V ^{VO} (L-H) ₂ (OCH ₃)].....	323
5.2.6	Compuestos heterolépticos [V ^{IV} O(L-H)(mpo)].....	325
5.3	ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> EN EPIMASTIGOTAS Y TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> , LUEGO DE 24 HORAS DE INCUBACIÓN.....	326
5.3.1	Ligandos bioactivos	328
5.3.2	Compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de 8HQ y un ligando tridentado.....	329
5.3.3	Compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina	331
5.3.4	Compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina y mpo	333
5.4	EFFECTOS EN EL PROCESO Y PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN EN <i>T. CRUZI</i>	334
5.4.1	Selección de los compuestos.....	334
5.4.2	Efectos sobre el proceso de infección	336
5.4.3	Efectos sobre la persistencia de la infección.....	341
5.4	CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN <i>T. CRUZI</i>	346
5.5	TOXICIDAD SOBRE MODELOS <i>IN VIVO</i>	347
5.5.1	Toxicidad <i>in vivo</i> en larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	347
5.5.2	Toxicidad <i>in vivo</i> en <i>C. elegans</i>	349
5.7	CONCLUSIONES PARCIALES.....	350
5.8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	353

5.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se exponen los resultados de la evaluación biológica como potenciales agentes antiparasitarios de los compuestos pertenecientes a las cinco familias de compuestos de oxovanadio (IV) y (V) y de los ligandos en su forma libre.

En primer lugar, los compuestos se evaluaron *in vitro* sobre la forma no infectiva epimastigota de *T. cruzi* y la forma promastigota axénica de *L. infantum*, determinando los valores de IC₅₀ luego de 5 días de tratamiento. En paralelo, se estudió la citotoxicidad inespecífica sobre un modelo de células de mamífero para evaluar la selectividad de la actividad observada. Para todos los compuestos y ligandos que mostraron actividad antiparasitaria promisorio, se estudió la actividad *in vitro* luego de 24 horas de tratamiento sobre las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*. Para ello, se puso a punto una técnica de determinación de la viabilidad celular que no se había utilizado antes en parásitos tripanosomátidos. En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron compuestos líderes de cada familia de compuestos de oxovanadio estudiada. Para los representantes seleccionados de cada serie, se evaluaron los efectos sobre el proceso de infección de *T. cruzi* en células VERO y sobre la replicación de amastigotas intracelulares.

Para el compuesto más activo de todos los analizados, se estudiaron los cambios morfológicos que sufren los epimastigotas de *T. cruzi* utilizando microscopía confocal.

Finalmente, se evaluó la toxicidad *in vivo* de dos de los nuevos compuestos desarrollados que presentaron apreciable actividad antiparasitaria sobre los modelos de Zebrafish y *C. elegans*.

5.2 ACTIVIDAD *IN VITRO* EN EPIMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* Y CITOTOXICIDAD

Con el objetivo de evaluar la potencialidad como agentes antiparasitarios de los nuevos compuestos heterolépticos y homolépticos de vanadio desarrollados en esta tesis y los compuestos homolépticos previamente reportados, en primer lugar, se determinó la concentración de compuesto necesaria para inhibir el 50% de la proliferación luego de 5 días de incubación ($IC_{50, 5 \text{ días}}$) en *T. cruzi* (cepa CL Brener). Los compuestos que presentaron actividad en el rango micromolar o submicromolar en *T. cruzi*, se evaluaron en *L. infantum* (cepa MHOM MA67I7MAP263), parásito tripanosomático genómicamente relacionado.

Para determinar dichos valores de IC_{50} , en primera instancia se realizaron ensayos preliminares en los que se analizó un amplio rango de concentraciones (entre 0 y 100 μM), y de ese modo se definió el rango de análisis apropiado para construir curvas dosis-respuesta que permitieron interpolar el valor de $IC_{50, 5 \text{ días}}$ a determinar.

La toxicidad inespecífica se evaluó determinando el valor de $IC_{50, 24\text{h}}$ sobre células VERO (ATCC CCL81), como células de mamífero modelo. A partir de estos valores se calculó el Índice de Selectividad (IS) como $IS = IC_{50, 24\text{h}} \text{ células VERO} / IC_{50, 5 \text{ días}} \text{ parásitos}$.

Si bien los valores de IC_{50} en parásitos y en células VERO fueron determinados con metodologías diferentes, que involucran tiempos de incubación diferentes (24 horas para células VERO y 5 días para parásitos), los valores de IS calculados determinados para todos los compuestos en las mismas condiciones permiten comparar entre sí el comportamiento biológico de los diferentes ligandos y complejos estudiados en el marco de esta tesis.

5.2.1 Ligandos libres y fármacos de referencia

En la Tabla 5.1 se muestran los valores de IC₅₀ en *T. cruzi*, *L. infantum* y células VERO obtenidos a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta de los ligandos bioactivos en sus formas libres seleccionados para el desarrollo de los compuestos de coordinación (derivados de la 8HQ y el Na mpo) y los ligandos tridentados sintetizados. Se incluyó además los fármacos de referencia Nifurtimox y Anfotericina B para *T. cruzi* y *L. infantum*, respectivamente ^{1,2}.

Tabla 5.1 Actividad *in vitro* de los ligandos libres y fármacos de referencia en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener), *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC ₅₀ epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
LS1	63,2 ± 7,2	46,8 ± 14,8	1,3	ND	ND
LS2	35,0 ± 6,4	52,4 ± 2,2	0,7	ND	ND
LS3	19,4 ± 0,9	44,4 ± 3,0	0,4	ND	ND
LS4	17,8 ± 2,6	26,3 ± 1,7	0,7	ND	ND
IN	22,6 ± 3,7	36,1 ± 3,3	0,6	ND	ND
BrIS	27,7 ± 5,9	36,0 ± 1,7	0,8	ND	ND
L0	10,1 ± 3,9	5,5 ± 0,5	1,8	0,73 ± 0,15	13,8
L1	66,5 ± 13,1	0,31 ± 0,01	214	2,65 ± 0,37	25,1
L2	64,7 ± 9,1	1,04 ± 0,09	62,2	3,20 ± 1,40	20,2
L3	75,5 ± 16,3	1,41 ± 0,35	53,5	2,22 ± 0,09	34,0
L4	12,5 ± 4,5	1,77 ± 0,72	7,1	2,36 ± 0,04	5,3
L5	> 100	3,21 ± 0,80	> 31,1	1,81 ± 0,25	>55,2
Na mpo	21,2 ± 2,7	0,48 ± 0,026	44,2	0,93 ± 0,11	22,8
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / IC _{50, 5 días} epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50, 24 h} VERO / IC _{50, 5 días} promastigotas de <i>L. infantum</i> ND: no determinado					

Los ligandos bioactivos L derivados de la 8HQ (L0-L5) muestran actividad inhibitoria frente a ambos parásitos, *T. cruzi* y *L. infantum* con IC_{50, 5 días} en el rango

micromolar y submicromolar. A excepción de ligandos L0 y L5, *T. cruzi* fue más sensible a las hidroxiquinolinas que *L. infantum*.

Frente a *T. cruzi*, todos los ligandos sustituidos en la posición 5 y 7 mostraron valores de $IC_{50, 5 \text{ días}}$ menores que el fármaco de referencia Nifurtimox. Sin embargo, presentan valores $IC_{50, 5 \text{ días}}$ algo mayores que la Anfotericina B en *L. infantum*.

Los valores de $IC_{50, 24h}$ en células VERO, en conjunto con los índices de selectividad se muestran en la Tabla 5.1. Los ligandos L sustituidos (L1-L5) mostraron valores de IS frente a ambos parásitos mayores que la 8-hidroxiquinolina sin substituir (L0). En particular, vale la pena destacar que la inclusión de los halógenos en las posiciones 5 y 7 de la 8-hidroxiquinolina disminuye sustancialmente la toxicidad inespecífica, debido al aumento del IC_{50} en células de mamíferos en conjunto con la disminución del IC_{50} en los parásitos. Esta tendencia se ha reportado previamente para otras líneas celulares de mamíferos, tales como MRC-5³, células tumorales A2780⁴ y macrófagos murinos J774⁵, donde los IC_{50} de los derivados halogenados son mayores que los determinados para la 8HQ. Los derivados de 8HQ han sido evaluados como agentes antimicrobianos en una extensa batería de bacterias, mostrando la misma tendencia que la encontrada en células de mamíferos^{3, 6, 7}. Por otra parte, el incremento en la actividad antiparasitaria por efecto de la inclusión de sustituyentes en la estructura de la 8-hidroxiquinolina, también se ha reportado para *Trypanosoma brucei*⁵ y *Toxoplasma gondii*⁶.

El ligando mpo tiene actividad frente a ambos parásitos en el rango submicromolar, del mismo orden que los fármacos de referencia y un índice de selectividad moderado, tal como se ha reportado previamente en la cepa Dm28c de *T. cruzi*⁸.

De acuerdo con lo esperado, los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (LS1-LS4) muestran actividad insignificante en tripanosomátidos, con valores de $IC_{50, 5 \text{ días}}$ del mismo orden que el $IC_{50, 24h}$ en

células VERO, lo que se traduce en una alta toxicidad inespecífica con valores de IS cercanos a 1, e incluso menores. Para algunos derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (LS1-LS3), este efecto ya había sido reportado previamente en la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*⁹.

Si bien las N²-(4-piridinilcarbonil)hidrazonas, IN y BrIS, fueron sintetizadas a partir del ligando bioactivo isoniazida, no muestran actividad sobre los parásitos tripanosomátidos. Es sabido que la isoniazida actúa como profármaco en *Mycobacterium tuberculosis*, activándose por peroxidación una vez que ingresa al microorganismo¹⁰. La formación de la base de Schiff podría estabilizar la estructura carbonada impidiendo la formación de las especies radicalarias activas.

5.2.2 Compuestos heterolépticos [V^vO(LS-2H)(L0-H)]

La actividad antiparasitaria de los cuatro nuevos compuestos de coordinación [V^vO(LS-2H)(L0-H)], donde LS = LS1-LS4 (Figura 4.1D, capítulo 4), fue evaluada inicialmente en epimastigotas de *T. cruzi*² y *L. infantum*. En la Figura 5.1 se presentan las curvas de dosis respuesta para los cuatro nuevos compuestos a partir de las cuales se interpolaron los valores de IC₅₀.

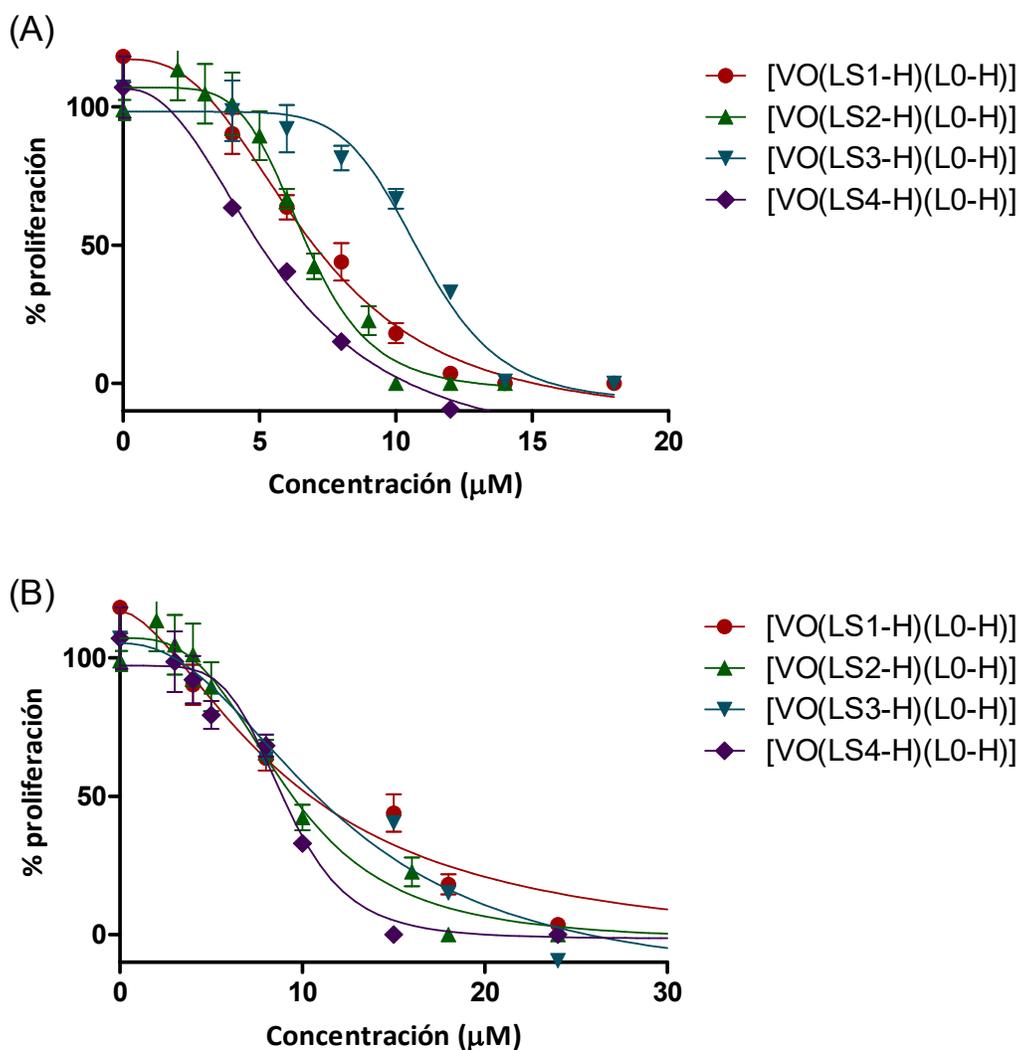


Figura 5.1 Curvas dosis-respuesta para los compuestos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)] frente a los parásitos tripanosomátidos (A) *T. cruzi*; y (B) *L. infantum*. Cada experimento se realizó por sextuplicado. En el gráfico se representa el valor promedio y la desviación estándar (SD) para cada punto.

En la Tabla 5.2 se presentan los valores de IC₅₀ obtenidos para la serie completa. Los resultados fueron comparados contra los fármacos de referencia y los ligandos en su forma libre (Tabla 5.1). A efectos comparativos, además de los compuestos heterolépticos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], se evaluaron los complejos homolépticos [V^{VO}O₂(LS-H)] (Figura 4.1C, capítulo 4) en *T. cruzi* (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Actividad *in vitro* de los compuestos heterolépticos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)] y los homolépticos [V^{VO}₂(LS-H)] en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener), *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC _{50, 5 días} epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
[V ^{VO} (LS1-2H)(L0-H)]	44,1 ± 14,7	7,8 ± 3,6	5,6	9,4 ± 1,1	4,7
[V ^{VO} (LS2-2H)(L0-H)]	54,1 ± 15,1	7,4 ± 1,2	7,3	9,2 ± 0,77	5,9
[V ^{VO} (LS3-2H)(L0-H)]	30,7 ± 11,0	10,5 ± 0,8	3,8	11,88 ± 0,85	2,6
[V ^{VO} (LS4-2H)(L0-H)]	56,6 ± 4,0	6,2 ± 0,4	9,1	8,82 ± 0,90	6,4
[V ^{VO} ₂ (LS1-H)]	69,8 ± 5,7	77,1 ± 2,3	0,9	ND	ND
[V ^{VO} ₂ (LS2-H)]	45,3 ± 8,3	> 100	< 0,5	ND	ND
[V ^{VO} ₂ (LS3-H)]	13,4 ± 1,7	80,4 ± 2,2	0,2	ND	ND
[V ^{VO} ₂ (LS4-H)]	21,6 ± 1,8	87,6 ± 6,0	0,2	ND	ND
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / IC _{50, 5 días} epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50, 24 h} VERO / IC _{50, 5 días} promastigotas de <i>L. infantum</i>					

Los nuevos compuestos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], donde LS = LS1-LS4, mostraron actividad frente a ambos parásitos, con valores de IC_{50, 5 días} en el rango micromolar, en el mismo orden que el fármaco de referencia Nifurtimox y la 8-hidroxiquinolina libre (L0). Los compuestos mostraron un incremento de cuatro a siete veces en la actividad antiparasitaria respecto a los ligandos semicarbazonas LS1-LS4. La sustitución del fragmento fenólico en el ligando tridentado parece tener baja incidencia en la actividad antitripanosoma de los nuevos compuestos.

Los compuestos [V^{VO}₂(LS-H)], donde LS = LS1-LS4, mostraron actividad insignificante en *T. cruzi* (IC_{50, 5 días} > 77 µM), al igual que los ligandos LS en su forma libre. Además, estos compuestos presentan índices de selectividad menores a 1, lo que demuestra una alta toxicidad inespecífica de los mismos.

Por el contrario, los nuevos compuestos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)] mostraron menor toxicidad y mayor selectividad que los ligandos LS, los compuestos

homolépticos [$V^{VO_2}(LS-H)$] y el ligando L0 en su forma libre (IS = 3,8-9,1 para *T. cruzi*; IS = 2,6-6,4 para *L. infantum*).

Según los criterios propuestos por la DNDi para el desarrollo de nuevos compuestos, se considera promisorio un compuesto con IC_{50} menores a 10 μM y selectividad hacia el parásito mayor a 10 (en esta tesis definido como IS) ¹¹. Si bien los valores de selectividad obtenidos para esta serie de complejos no son sobresalientes (menores a 10), la inclusión del ligando L0 en la esfera de coordinación, resultó en una interesante actividad frente a ambos parásitos, en el rango micromolar, en conjunto con una disminución de la toxicidad inespecífica y un aumento de selectividad hacia los parásitos. Al igual que se observó para los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina en su forma libre (Tabla 5.1), *T. cruzi* fue más sensible a los compuestos de la familia [$V^{VO}(LS-2H)(L0-H)$] que *L. infantum*.

5.2.3 Compuestos heterolépticos [$V^{VO}(IN-2H)(L-H)$]

La Tabla 5.3 muestra los resultados de actividad en epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. infantum* y de citotoxicidad para los cinco nuevos compuestos de oxovanadio (V) con ligandos bioactivos L derivados de la 8-hidroxiquinolina y el co-ligando tridentado IN, obtenido por condensación de la isoniazida y el 2-hidroxinaftaldehído (Figura 4.7C, capítulo 4) ¹². Se incluyó el compuesto homoléptico [$V^{VO_2}(IN-H)$] para su comparación. Los resultados fueron comparados contra los fármacos de referencia y los ligandos en su forma libre (Tabla 5.1).

Tabla 5.3 Actividad *in vitro* de los compuestos [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}₂(IN-H)] en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener), *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC _{50, 5 días} epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
[V ^{VO} (IN-2H)(L0-H)]	10,99 ± 2,1	> 20	< 0,5	ND	ND
[V ^{VO} (IN-2H)(L1-H)]	22,03 ± 7,4	2,97 ± 0,19	7,4	0,84 ± 0,32	26,2
[V ^{VO} (IN-2H)(L2-H)]	31,54 ± 3,4	1,71 ± 0,13	18,4	1,07 ± 0,14	29,5
[V ^{VO} (IN-2H)(L3-H)]	54,18 ± 4,0	6,50 ± 0,20	8,2	1,33 ± 0,17	40,7
[V ^{VO} (IN-2H)(L4-H)]	42,09 ± 9,4	4,61 ± 0,18	9,1	1,68 ± 0,16	25,0
[V ^{VO} ₂ (IN-H)]	> 100	> 100	ND	ND	ND
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / IC _{50, 5 días} epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50, 24 h} VERO / IC _{50, 5 días} promastigotas de <i>L. infantum</i> ND: no determinado					

Los compuestos de la familia [V^{VO}(IN-2H)(L-H)], donde L = L1-L4, mostraron valores de IC_{50, 5 días} en epimastigotas de *T. cruzi* en el mismo orden que los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con el ligando L0 y derivados de la 8-hidroxiquinolina, los ligandos L en su forma libre y el fármaco de referencia Nifurtimox. El tratamiento de los parásitos con el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L0-H)] mostró un precipitado negro a partir de 20 micromolar, sin disminución de la proliferación hasta la mayor concentración ensayada. Dado que el método utilizado se basa en la determinación de cambios en la densidad óptica del cultivo, la aparición de sólido interfiere en la medida, por lo que no fue posible calcular un IC₅₀. Por su parte, tal como era de esperar, el complejo homoléptico [V^{VO}(IN-H)₂], no presenta actividad antiparasitaria. De acuerdo con la tendencia encontrada para los ligandos L0-L5, la selectividad hacia el parásito se incrementa con la inclusión de los sustituyentes en las posiciones 5 y 7 del fragmento 8-hidroxiquinolina. Para esta serie de compuestos *L. infantum* fue

levemente más sensible que los epimastigotas de *T. cruzi*, aunque se mantienen en el orden micromolar.

5.2.4 Compuestos heterolépticos [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]

Los compuestos pertenecientes a la familia [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] (Figura 4.7C, capítulo 4), desarrollada con el objetivo de valorar si las variaciones en los sustituyentes del anillo fenólico en el ligando tridentado tienen alguna influencia en el comportamiento a nivel biológico, no mostraron variaciones considerables respecto a los compuestos de la familia [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] detallada en la *sección* anterior. En epimastigotas de *T. cruzi*, la tendencia de las actividades fue la misma que la encontrada para los complejos [V^{VO}(IN-2H)(L-H)], siendo el más activo de la serie el complejo conteniendo el ligando L2 (Tabla 6.4). De hecho, para el caso de los complejos [V^{VO}(BrIS-2H)(L3-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L4-H)], el IC_{50, 5 días} determinado fue prácticamente igual que el determinado para los complejos [V^{VO}(IN-2H)(L3-H)] y [V^{VO}(IN-2H)(L4-H)].

No obstante, pareciera que el sustituyente halogenado en el anillo del ligando tridentado aumenta la toxicidad en células de mamífero, lo que se traduce en índices de selectividad menores que los compuestos de la serie [V^{VO}(IN-2H)(L-H)]. De forma similar a lo descrito para el complejo [V^{VO}(IN-2H)(L0-H)], el nuevo compuesto [V^{VO}(BrIS-2H)(L0-H)] precipita a concentraciones altas. Sin embargo, fue posible determinar un valor de IC₅₀ para este complejo en epimastigotas de *T. cruzi*, pero no en las células de mamífero. Al igual que en la serie anterior, este compuesto no fue evaluado *L. infantum* debido a su baja solubilidad. Los IC₅₀ determinados en *L. infantum* para el resto de los compuestos [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] (L=L1-L4), también fueron muy similares a los obtenidos para la serie análoga ya mencionada, siendo todos alrededor de 1 μM. La tendencia de aumento de selectividad hacia el parásito cuando se sustituye por halógenos las posiciones 5 y 7 es mucho más marcada en esta serie, llegando

a IS cercanos a 50 para el compuesto [V^{VO}(BrIS-2H)(L3-H)], donde L3 es 5,7-diiodo-8-hidroxiquinolina.

Tabla 5.4 Actividad *in vitro* de los compuestos [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] y [V^{VO}₂(BrIS-H)] en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener) y en *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC ₅₀ *epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L0-H)]	> 50	33,83 ± 2,74	> 1,5	ND	ND
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L1-H)]	13,1 ± 1,9	8,30 ± 0,41	1,6	1,14 ± 0,38	11,5
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L2-H)]	40,4 ± 1,2	2,99 ± 0,12	13,5	1,52 ± 0,14	26,6
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L3-H)]	59,6 ± 18,8	6,37 ± 0,28	9,4	1,23 ± 0,17	48,4
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L4-H)]	6,37 ± 1,35	2,07 ± 0,16	3,1	1,63 ± 0,14	3,9
[V ^{VO} ₂ (BrIS -H)]	> 100	> 100	ND	ND	ND

IS^a: IC_{50,24 h} VERO / IC_{50, 5 días} epimastigotas de *T. cruzi*
 IS^b: IC_{50, 24 h} VERO / IC_{50, 5 días} promastigotas de *L. infantum*
 ND: no determinado

5.2.5 Compuestos homolépticos [V^{IV}O(L-H)₂] y [V^{VO}O(L-H)₂(OCH₃)]

En primera instancia, los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y oxovanadio (V) con los derivados de 8-hidroxiquinolinas fueron sintetizados para comparar la actividad antiparasitaria con los compuestos heterolépticos (Figura 4.17, capítulo 4). Como ya se mencionó en la discusión del capítulo 2, algunos de ellos ya habían sido sintetizados previamente y ya habían despertado el interés como potenciales compuestos bioactivos. La actividad biológica frente a células tumorales y *Mycobacterium tuberculosis* del compuesto [V^{IV}O(L0-H)₂] había sido explorada previamente¹³. En paralelo al desarrollo de esta tesis, se ha estudiado la actividad antitumoral de algunos de estos compuestos, particularmente de [V^{IV}O(L2-H)₂]^{14, 15}.

Tal como se muestra en la Tabla 5.5, todos los complejos estudiados presentaron actividad frente a ambos parásitos en el rango micromolar, e incluso en el rango submicromolar, del mismo orden y levemente menores que el fármaco de referencia Nifurtimox.

Tabla 5.5 Actividad *in vitro* de los compuestos homolépticos [V^{VO}O(L-H)₂] y [V^{VO}O(L-H)₂(OCH₃)] en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener) y en *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA6717MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC _{50, 5 días} epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
[V ^{VO} O(L0-H) ₂]	2,31 ± 0,17	2,18 ± 0,58	1,1	1,47 ± 0,51	1,6
[V ^{VO} O(L1-H) ₂]	44,7 ± 9,7	0,21 ± 0,03	213	2,46 ± 0,63	18,2
[V ^{VO} O(L2-H) ₂]	55,1 ± 8,7	0,62 ± 0,02	82,4	2,07 ± 0,65	24,7
[V ^{VO} O(L3-H) ₂]	87,2 ± 16,4	1,16 ± 0,13	75,2	2,94 ± 1,82	13,6
[V ^{VO} O(L4-H) ₂]	19,6 ± 5,4	1,67 ± 0,84	11,7	4,11 ± 0,50	4,8
[V ^{VO} O(L5-H) ₂]	> 100	2,85 ± 0,44	> 31,6	7,10 ± 0,57	>14,1
[V ^{VO} O(L0-H) ₂ (OCH ₃)]	3,21 ± 0,43	3,81 ± 0,25	0,84	2,03 ± 0,34	1,6
[V ^{VO} O(L1-H) ₂ (OCH ₃)]	68,5 ± 10,5	1,01 ± 0,02	67,8	5,40 ± 0,91	12,7
[V ^{VO} O(L2-H) ₂ (OCH ₃)]	60,9 ± 13,0	0,47 ± 0,02	129	2,85 ± 0,90	21,4
[V ^{VO} O(L3-H) ₂ (OCH ₃)]	> 100	1,02 ± 0,08	> 88,2	6,39 ± 0,30	>14,1
[V ^{VO} O(L4-H) ₂ (OCH ₃)]	30,22 ± 5,4	0,89 ± 0,09	34,0	4,16 ± 0,48	7,3
[V ^{VO} O(L5-H) ₂ (OCH ₃)]	> 100	4,70 ± 0,73	> 21,2	8,65 ± 0,86	>11,6
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / IC _{50, 5 días} epimastigotas de <i>T. cruzi</i>					
IS ^b : IC _{50, 24 h} VERO / IC _{50, 5 días} promastigotas de <i>L. infantum</i>					

Al igual que lo que se observó para los ligandos libres, *T. cruzi* fue más sensible que *L. infantum*. A excepción de [V^{VO}O(L1-H)₂(OCH₃)] y [V^{VO}O(L5-H)₂(OCH₃)], todos los complejos muestran un leve aumento en la selectividad hacia los parásitos respecto a la determinada para los ligandos en su forma libre. Por otra parte, pareciera que la formación de los compuestos de coordinación no produce cambios en la actividad sobre *L. infantum*, obteniéndose valores de IC₅₀ muy similares para complejos y ligandos.

En cuanto al estado de oxidación de los compuestos, las especies de $V^{IV}O$ tuvieron actividades un poco mayores que las especies de V^{VO} . Dado que, hasta donde sabemos, no existen reportes previos que comparen la actividad tripanosomicida de compuestos análogos en ambos estados de oxidación, no es sencillo plantear una explicación para estos resultados. En ese sentido, estudiar la actividad antitripanosoma de diferentes familias que contengan compuestos análogos de $VI(IV)$ y $V(V)$ podría ser útil para sacar conclusiones sólidas.

Como se ha discutido para las familias anteriores, la sustitución de los ligandos en la posición 5 y 7, y particularmente la sustitución por halógenos, aumenta la selectividad hacia los parásitos. El efecto para estas series homolépticas es mucho más marcado, consiguiéndose valores de IS de 213 para el compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ y de 129 para el compuesto $[V^{VO}(L2-H)_2(OCH_3)]$.

Es interesante destacar que todos los compuestos homolépticos tienen actividades mayores y toxicidades menores que todos los compuestos heterolépticos con derivados de 8-hidroxiquinolina y un ligando tridentado (Tabla 5.2, 5.3, 5.4).

5.2.6 Compuestos heterolépticos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$

La familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados $L = L0-L4$ y el ligando bioactivo mpo (Figura 4.13, capítulo 4), también mostró actividad en ambos parásitos en el rango micromolar y submicromolar. El compuesto homoléptico $[V^{IV}O(mpo)_2]$, que fue desarrollado previamente como compuesto insulinoimético no presenta alta toxicidad (IC_{50} fibroblastos NCTC/ IC_{50} *T. cruzi* = 61) ¹⁶.

Sin embargo, los compuestos de la nueva familia $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$ resultaron ser tóxicos, dado que su IC_{50} en células de mamífero modelo también se encuentran en el rango micromolar (Tabla 5.6). La toxicidad de estos compuestos podría estar asociada con la inclusión del fragmento 8-hidroxiquinolina en la esfera de coordinación.

Tabla 5.6 Actividad *in vitro* de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] en *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener) y en *L. infantum* (promastigotas de la cepa MHOM MA67I7MAP263), citotoxicidad en células de mamífero modelo (células VERO, ATCC CCL81) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	IC _{50, 24h} VERO ± SD (µM)	IC _{50, 5 días} epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	IC _{50, 5 días} promastigotas <i>L. infantum</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	998,5 ± 90,6	2,76 ± 0,19	361	ND	ND
Anfotericina B	> 100	ND	ND	0,55 ± 0,07	> 182
[V ^{IV} O(L0-H)(mpo)]	4,99 ± 0,65	3,39 ± 0,81	1,5	1,56 ± 0,75	3,2
[V ^{IV} O(L1-H)(mpo)]	9,68 ± 0,95	0,65 ± 0,044	14,9	0,65 ± 0,32	14,9
[V ^{IV} O(L2-H)(mpo)]	14,9 ± 2,1	2,13 ± 0,21	7,0	0,80 ± 0,05	18,6
[V ^{IV} O(L3-H)(mpo)]	2,32 ± 0,32	1,45 ± 0,17	1,6	1,38 ± 0,10	1,7
[V ^{IV} O(L4-H)(mpo)]	1,35 ± 0,30	0,33 ± 0,014	4,1	1,30 ± 0,34	1,0
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / IC _{50, 5 días} epimastigotas de <i>T. cruzi</i>					
IS ^b : IC _{50, 24 h} VERO / IC _{50, 5 días} promastigotas de <i>L. infantum</i>					

Interesantemente, si bien los índices de selectividades son muy bajos, se puede reconocer el mismo patrón en cuanto al aumento de selectividad para los complejos con ligandos sustituidos por halógenos. Parece notable que, del mismo modo que sucede con los complejos [V^{IV}O(L0-H)₂] y [V^{IV}O(L0-H)₂(OCH₃)], el complejo [V^{IV}O(L0-H)(mpo)] presenta igual valor de IC₅₀ frente a *T. cruzi* que frente a células VERO. A pesar de la importante toxicidad encontrada para algunos de estos complejos, en esta serie en particular [V^{IV}O(L1-H)(mpo)] y [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] tienen valores de selectividad aceptable (>10) ¹¹.

5.3 ACTIVIDAD IN VITRO EN EPIMASTIGOTAS Y TRIPOMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*, LUEGO DE 24 HORAS DE INCUBACIÓN

Al diferenciarse, *T. cruzi* experimenta diversos cambios a nivel morfológico, de expresión génica, metabolismo, en la remodelación de la cromatina, reordenamiento del ADN mitocondrial, alteraciones en el kinetoplasto y cuerpos lipídicos, entre otros ¹⁷. Es por esto que la

susceptibilidad a los diferentes compuestos se podría ver afectada en los diferentes estadios.

Si bien la forma epimastigota de *T. cruzi* es un estadio no infectivo que es muy útil como modelo para monitorear a gran escala la potencialidad de los compuestos diseñados como potenciales fármacos, resulta necesario determinar el efecto de los compuestos más prometedores en los estadios infectivos de *T. cruzi*. La infección del hospedero mamífero por *T. cruzi* se da una vez que los parásitos se diferenciaron a la forma tripomastigota (ver capítulo 1, ciclo de vida de *T. cruzi*). La infección del hospedero mamífero comienza cuando tripomastigotas metacíclicos penetran a través de una herida o mucosa e infectan células ingresando a través de la formación de una vacuola parasitófora. Una vez que ingresan, se diferencian en la forma amastigota, se replican intracelularmente y luego se diferencian a tripomastigotas celulares que son liberados al torrente sanguíneo luego de la lisis celular ¹⁷⁻²¹.

Los compuestos que presentaron actividad promisoriosa en la forma epimastigota fueron evaluados sobre tripomastigotas celulares que emergieron de células VERO infectadas. Se determinó la concentración que produce el 50 % del efecto total sobre la viabilidad celular, es decir, la concentración que mata el 50 % de los parásitos enfrentados a los compuestos por 24 h ($EC_{50, 24h}$). Dado que en la evaluación primaria sobre la forma epimastigota, los parámetros determinados fueron valores de $IC_{50, 5 \text{ días}}$, para poder comparar la susceptibilidad de los compuestos seleccionados en ambas formas, se determinó también el $EC_{50, 24h}$ sobre la forma epimastigota, utilizando la misma metodología de trabajo. De forma similar a lo discutido en la *sección* anterior, una vez obtenidos los parámetros, se calculó el índice de selectividad (IS) como la relación entre $IC_{50, 24h}$ células VERO y el $EC_{50, 24h}$ en parásitos. Los IS calculados utilizando ambos parámetros a 24 horas da una idea más realista de la capacidad de los compuestos de matar parásitos sin dañar las células del hospedero.

5.3.1 Ligandos bioactivos

Los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (LS1-LS4) y las hidrazonas derivadas de isoniazida no fueron evaluadas en la forma tripomastigota dado que previamente demostraron actividad insignificante sobre la forma epimastigota (sección 5.2.1).

La Tabla 5.6 resume los valores de $EC_{50, 24 h}$ en ambas formas del parásito obtenidos a partir de las curvas dosis-respuesta y los IS para cada estadio.

Tabla 5.6 Actividad *in vitro* de los ligandos libres y fármacos de referencia en *T. cruzi* (epimastigotas y tripomastigotas de la cepa CL Brener) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	EC_{50} epimastigotas <i>T. cruzi</i> \pm SD (μ M)	IS ^a	EC_{50} tripomastigotas <i>T. cruzi</i> \pm SD (μ M)	IS ^b
Nifurtimox	3,68 \pm 0,71	271	20,10 \pm 2,86	49,6
L0	9,42 \pm 2,23	1,1	0,47 \pm 0,07	21,5
L1	7,17 \pm 1,07	9,3	2,25 \pm 0,95	29,5
L2	2,56 \pm 0,52	23,4	0,40 \pm 0,08	162
L3	2,17 \pm 0,35	34,8	1,10 \pm 0,88	68,6
L4	2,58 \pm 0,56	4,8	1,01 \pm 0,73	12,3
L5	4,49 \pm 0,35	22,3	6,84 \pm 0,75	14,6
Na mpo	1,45 \pm 0,51	15,0	0,26 \pm 0,04	83,8
IS ^a : $IC_{50,24 h}$ VERO / EC_{50} epimastigotas de <i>T. cruzi</i>				
IS ^b : $IC_{50,24 h}$ VERO / EC_{50} tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>				

Tal como era de esperar, los valores de $EC_{50, 24h}$ en la forma epimastigota son mayores que los $IC_{50, 5 días}$ determinados previamente dado que se requiere mayor concentración o dosis para lograr el 50 % del efecto en menos tiempo. A excepción de L1, el parámetro determinado para los ligandos bioactivos y Nifurtimox aumentan entre 1,3 y 3 veces al reducir el tiempo de 5 días a 24 horas. Este aumento se traduce en una disminución de la selectividad concomitante, dado que los IS fueron calculados contra el mismo parámetro de $IC_{50, 24h}$ en células VERO.

De forma general, la forma tripomastigota fue más sensible a los ligandos bioactivos que la forma epimastigota, aumentando la selectividad hacia *T. cruzi*

hasta 20 veces. El ligando L5 fue el único caso que no tuvo casi variación en la selectividad, de hecho, presenta actividad levemente mayor en epimastigotas que en tripomastigotas. Es interesante notar que la tendencia encontrada para los ligandos bioactivos fue contraria a la determinada para el fármaco de referencia, el cual presenta un $EC_{50,24\text{ h}}$ de 20,10 μM , muy similar al reportado previamente para tripomastigotas de la cepa Dm28c²². Consecuentemente, sobre esta forma los ligandos L2, L3 y mpo presentan selectividades mayores que Nifurtimox.

5.3.2 Compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de 8HQ y un ligando tridentado

Los nuevos compuestos $[V^VO(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, $[V^VO(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[V^VO(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$ se evaluaron sobre tripomastigotas celulares. Los resultados se compararon contra los $EC_{50, 24\text{h}}$ determinados en la forma epimastigota (Tabla 5.7).

De forma similar a lo discutido para los ligandos en su forma libre, los $EC_{50, 24\text{h}}$ de los complejos resultaron entre 1,2 y 4,4 veces mayores que los $IC_{50, 5\text{ días}}$. Para los compuestos $[V^VO(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, donde LS = LS1-LS4, no se determinaron los $EC_{50, 24\text{h}}$ dado que no se alcanzó el 50 % de la viabilidad con las concentraciones utilizadas (hasta 20 μM). Por su parte, los $EC_{50, 24\text{h}}$ para $[V^VO(\text{IN-2H})(\text{L0-H})]$ y $[V^VO(\text{BrIS-2H})(\text{L0-H})]$ no se determinaron por las razones discutidas anteriormente en la *sección 5.2.3*. Interesantemente, ambos complejos presentaron actividad en tripomastigotas en el rango micromolar ($EC_{50, 24\text{h}} = 1,92$ y 7,95 μM , respectivamente).

Tabla 5.7 Actividad *in vitro* de las series de compuestos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] en *T. cruzi* (epimastigotas y tripomastigotas de la cepa CL Brener) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	EC ₅₀ epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	EC ₅₀ tripomastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	3,68 ± 0,71	271	20,10 ± 2,86	49,6
[V ^{VO} (LS1-2H)(L0-H)]	> 20	< 2,2	1,14 ± 0,12	38,7
[V ^{VO} (LS2-2H)(L0-H)]	> 20	< 2,7	4,95 ± 0,62	10,9
[V ^{VO} (LS3-2H)(L0-H)]	> 20	< 2,7	0,95 ± 0,08	32,3
[V ^{VO} (LS4-2H)(L0-H)]	> 20	< 2,7	1,10 ± 0,59	50,9
[V ^{VO} (IN-2H)(L0-H)]	ND	ND	1,92 ± 0,33	5,7
[V ^{VO} (IN-2H)(L1-H)]	3,45 ± 0,48	6,4	1,46 ± 0,05	15,1
[V ^{VO} (IN-2H)(L2-H)]	3,99 ± 1,30	7,9	0,29 ± 0,08	109
[V ^{VO} (IN-2H)(L3-H)]	7,70 ± 0,67	7,0	1,69 ± 0,07	32,1
[V ^{VO} (IN-2H)(L4-H)]	5,55 ± 1,41	7,6	3,02 ± 0,98	14,0
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L0-H)]	ND	ND	7,95 ± 0,40	> 6,3
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L1-H)]	1,89 ± 0,75	6,9	0,96 ± 0,04	13,6
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L2-H)]	2,97 ± 0,19	13,6	0,78 ± 0,08	52,0
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L3-H)]	9,78 ± 0,75	6,1	3,69 ± 0,40	16,1
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L4-H)]	4,79 ± 0,20	1,3	0,73 ± 0,05	8,7
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / EC ₅₀ epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50,24 h} VERO / EC ₅₀ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ND = no determinado				

Los compuestos [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] con L = L1-L4 mostraron EC_{50, 24h} en el rango micromolar en epimastigotas (EC_{50, 24h} = 1,89-9,78 µM), del mismo orden que Nifurtimox y los ligandos L en su forma libre ¹². La forma tripomastigota fue más sensible a todos los compuestos heterolépticos, mostrando valores de EC_{50, 24h} hasta 70 veces menores que el fármaco de referencia (EC_{50, 24h} = 0,29 - 3,02 µM) ¹². La Figura 5.2 muestra una comparación gráfica de la actividad de los compuestos heterolépticos conteniendo los ligandos L = L1-L4 en ambos estadios del parásito respecto a los ligandos en su forma libre. Solo para el caso del ligando L1, la formación del complejo incrementa la actividad anti-*T. cruzi* respecto al ligando libre en ambos estadios. Además, sobre la forma tripomastigota, los complejos [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L4-H)] resultaron ser más activos que sus correspondientes ligandos libres. No obstante, del mismo modo que ya ha sido previamente discutido en este capítulo, la

inclusión de los sustituyentes en el fragmento 8-hidroxiquinolina incrementa la selectividad hacia los parásitos, particularmente para los compuestos conteniendo los ligandos halogenados. Entre ellos se destaca el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] como el más promisorio de la serie, con un EC_{50, 24h} en tripomastigotas de 0,29 μM y un índice de selectividad de 109¹².

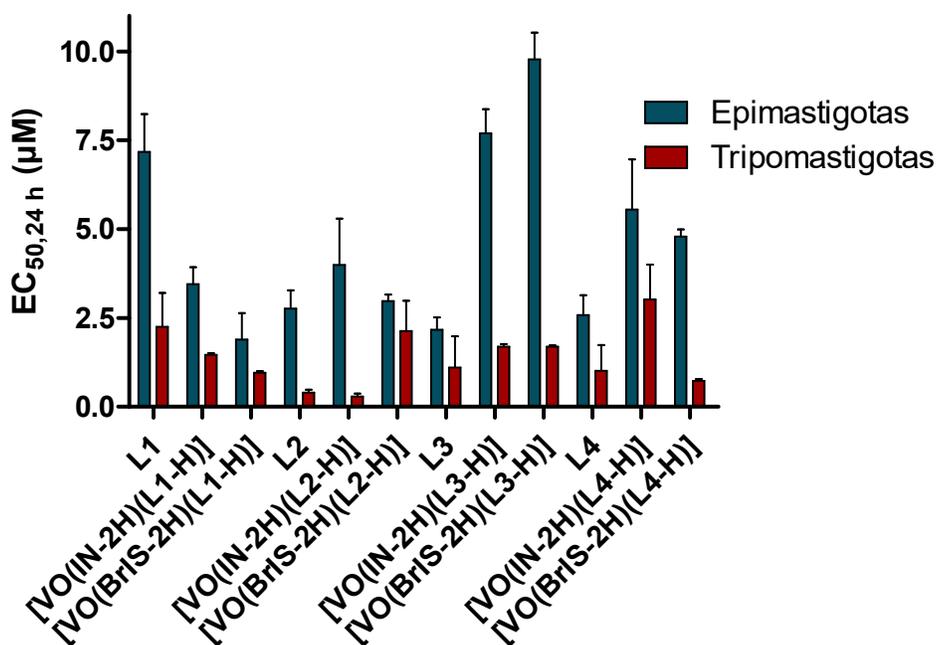


Figura 5.2. Valores de EC_{50, 24h} determinados en epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* de los nuevos compuestos [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] donde L = L1-L4.

5.3.3 Compuestos homoléticos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina

La Tabla 5.8 resume los valores de EC₅₀ determinados a 24 h para la forma epimastigota y tripomastigota. A excepción de los compuestos con el ligando L5, los compuestos presentan actividad frente a ambas formas en el rango micromolar, del mismo orden que el fármaco de referencia. Los compuestos [V^{VO}(L0-H)₂] y [V^{VO}(L0-H)₂(OCH₃)] (Figura 4.17, capítulo 4) resultaron muy tóxicos para el modelo de hospedero mamífero, sin embargo, en esta serie de

compuestos también se observa la tendencia de aumento de selectividad al incluir sustituyentes halogenados en las posiciones 5 y 7 del fragmento 8-hidroxiquinolina.

Tabla 5.8 Actividad *in vitro* de las series de compuestos [V^{VO}(L0-H)₂] y [V^{VO}(L-H)₂(OCH₃)] en *T. cruzi* (epimastigotas y tripomastigotas de la cepa CL Brener) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	EC ₅₀ epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^a	EC ₅₀ tripomastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (µM)	IS ^b
Nifurtimox	3,68 ± 0,71	271	20,10 ± 2,86	49,6
[V ^{VO} (L0-H) ₂]	3,17 ± 0,21	0,7	1,11 ± 0,21	2,1
[V ^{VO} (L1-H) ₂]	3,02 ± 1,40	14,8	2,12 ± 0,90	21,0
[V ^{VO} (L2-H) ₂]	3,96 ± 1,20	13,9	0,79 ± 0,06	69,7
[V ^{VO} (L3-H) ₂]	6,18 ± 1,70	14,1	4,84 ± 0,57	18,0
[V ^{VO} (L4-H) ₂]	3,42 ± 0,80	5,7	0,51 ± 0,04	38,4
[V ^{VO} (L5-H) ₂]	> 20	ND	18,7 ± 0,17	> 5,3
[V ^{VO} (L0-H) ₂ (OCH ₃)]	3,21 ± 0,99	1,0	0,91 ± 0,09	3,5
[V ^{VO} (L1-H) ₂ (OCH ₃)]	7,49 ± 0,80	9,1	5,10 ± 0,49	13,4
[V ^{VO} (L2-H) ₂ (OCH ₃)]	3,11 ± 0,90	19,5	1,24 ± 0,80	49,1
[V ^{VO} (L3-H) ₂ (OCH ₃)]	7,77 ± 2,00	> 12,7	7,39 ± 0,80	13,5
[V ^{VO} (L4-H) ₂ (OCH ₃)]	4,47 ± 1,80	6,8	0,57 ± 0,06	53
[V ^{VO} (L5-H) ₂ (OCH ₃)]	> 20	ND	55,5 ± 9,4	> 1,8
IS ^a : IC _{50,24h} VERO / EC ₅₀ epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50,24h} VERO / EC ₅₀ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> ND: no determinado				

Según lo discutido en la *sección 5.2.5*, los compuestos de V^{VO} tuvieron actividades levemente mayores que los de V^{VO}. Considerando en su conjunto los IC₅₀ determinados a 5 días sobre la forma epimastigota de *T. cruzi* y promastigota de *L. infantum*, y los EC₅₀ determinados a 24 h sobre epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*, se extrae que el efecto del estado de oxidación parece ser más marcado cuando los ligandos son más voluminosos o contienen los sustituyentes electronegativos. Lo cual podría estar relacionado con las diferencias en la estabilidad y especiación de los compuestos a ser discutida en el Capítulo 6.

En la *sección 5.2.5* se había mencionado que los compuestos homolépticos presentaron actividades sobre la forma epimastigota mayores y toxicidades menores que los compuestos heterolépticos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)]. La tendencia se mantiene cuando se mide la viabilidad celular a las 24 horas en el mismo estadio. Sin embargo, para la forma tripomastigota, los valores encontrados fueron del mismo orden que los expresados en la Tabla 5.7 para los compuestos heterolépticos mencionados.

5.3.4 Compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina y mpo

La familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados L = L0-L4 y el ligando bioactivo mpo, también mostró actividad en ambos estadios de *T. cruzi* en el rango micromolar y submicromolar. Los valores de EC_{50, 24 h} encontrados (Tabla 5.9) fueron muy similares a los IC_{50, 5 días} determinados sobre *T. cruzi* y *L. infantum* (Tabla 5.6). Tal como se esperaba y como se ha observado en las series anteriores al cambiar el tiempo de incubación, los EC_{50, 24 h} sobre la forma epimastigota fueron de 1,2 a 2,7 veces mayores que los IC_{50, 5 días} previamente discutidos. La forma tripomastigota resultó ser de 2 a 4 veces más sensible a los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] que la forma epimastigota.

Del mismo modo que se discutió para la forma epimastigota, a pesar de la importante toxicidad encontrada para algunos de estos complejos, en esta serie en particular [V^{IV}O(L1-H)(mpo)] y [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] tienen valores de selectividad aceptable comparando la forma tripomastigota con la citotoxicidad en células VERO (>10)¹¹.

Tabla 5.9 Actividad *in vitro* de las series de compuestos [V^{VO}O(L0-H)(mpo)] en *T. cruzi* (epimastigotas y tripomastigotas de la cepa CL Brener) e índice de selectividad hacia los parásitos (IS).

Compuesto	EC ₅₀ epimastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (μM)	IS ^a	EC ₅₀ tripomastigotas <i>T. cruzi</i> ± SD (μM)	IS ^b
Nifurtimox	3,68 ± 0,71	271	20,10 ± 2,86	49,6
[V ^{VO} O(L0-H)(mpo)]	4,36 ± 1,50	1,1	1,00 ± 0,23	5,0
[V ^{VO} O(L1-H)(mpo)]	3,89 ± 1,94	2,5	0,88 ± 0,13	10,1
[V ^{VO} O(L2-H)(mpo)]	1,74 ± 0,37	8,5	0,67 ± 0,21	22,1
[V ^{VO} O(L3-H)(mpo)]	1,88 ± 0,70	1,2	0,91 ± 0,18	2,5
[V ^{VO} O(L4-H)(mpo)]	0,83 ± 0,06	1,6	0,19 ± 0,03	7,1
IS ^a : IC _{50,24 h} VERO / EC ₅₀ epimastigotas de <i>T. cruzi</i> IS ^b : IC _{50,24 h} VERO / EC ₅₀ tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>				

5.4 EFECTOS EN EL PROCESO Y PERSISTENCIA DE LA INFECCIÓN EN *T. CRUZI*

5.4.1 Selección de los compuestos

Con el objetivo de explorar los efectos de las series desarrolladas en el proceso de infección de *T. cruzi*, se seleccionó un compuesto de cada una de las series estructuralmente relacionadas discutidas en las secciones anteriores, que representan un candidato poderoso, con buena actividad anti-*T. cruzi* tanto en el estadio infectivo como en el no infectivo y buena selectividad hacia el patógeno. Considerando todos los resultados obtenidos, para la familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con ligandos LS, derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y la 8-hidroxiquinolina (L0), se seleccionó el compuesto [V^{VO}O(LS4-2H)(L0-H)]. Si bien este compuesto no presenta actividad destacada sobre epimastigotas de *T. cruzi* (IC_{50, 5 días} = 6,2 μM, EC_{50, 24 h} > 20), representa el valor más bajo de la serie en esta forma y la actividad en tripomastigotas es similar a la encontrada para el resto de la serie (EC_{50, 24 h} = 1,10 μM). Dado que se trata del compuesto con mayor IC_{50, 24 h} en células VERO, el compuesto seleccionado representa el compuesto con menor toxicidad inespecífica (IS_{tripomastigotas} = 50,1).

Por su parte, los compuestos análogos **[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]** y **[V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]** fueron los seleccionados para cada una de las dos series de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con ligandos hidrazona derivados de la isoniazida y ligandos L derivado de la 8-hidroxiquinolina. Ambos compuestos se posicionan de forma similar dentro de su respectiva serie. Si bien la selectividad de los compuestos seleccionados en epimastigotas a 24 horas no es destacable, sobre la forma epimastigota son los compuestos más selectivos de cada serie, llegando incluso el compuesto **[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]** a valores de IS de 109¹². Para la serie de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con mpo y ligandos L, **[V^{IVO}(L-H)(mpo)]**, se utilizó el mismo criterio que para el resto de los compuestos heterolépticos. El compuesto seleccionado fue **[V^{IVO}(L2-H)(mpo)]**, dado que en tripomastigotas es el compuesto más selectivo ($EC_{50,24\text{ h}} = 0,67\ \mu\text{M}$; $IS = 22,1$).

Los efectos sobre la infección para la familia de compuestos homolépticos con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina estudiada fueron los primeros en realizarse en esta tesis¹. Al momento de la selección de los compuestos, aún no se contaba con el desarrollo de la técnica de determinación de $EC_{50, 24\text{ h}}$ por reducción de resazurina. Por lo tanto, al momento de selección de los compuestos solo se contaba con los valores de IC_{50} determinados a 5 días. Considerando los resultados obtenidos al momento de selección (Tabla 5.5), el compuesto seleccionado fue **[V^{IVO}(L1-H)₂]**, el cual presentó un $IC_{50, 5\text{ días}}$ de $0,21\ \mu\text{M}$ y una muy baja toxicidad inespecífica ($IS_{\text{epimastigotas}} = 213$), por lo cual, los ensayos sobre la infección se condujeron con este compuesto y se publicaron previo a la determinación de los $EC_{50,24\text{ h}}$ ¹. Una vez evaluada la serie sobre la forma tripomastigota (Tabla 5.8), es notorio que el compuesto más selectivo en ella es el compuesto homoléptico conteniendo el ligando L2, lo cual está de acuerdo con lo encontrado para el resto de las familias de compuestos heterolépticos estudiadas, tal como se describe anteriormente. De todas formas, los resultados obtenidos para el compuesto **[V^{IVO}(L1-H)₂]** fueron valiosos y se utilizaron para

analizar y comparar los obtenidos para las series de compuestos heterolépticos, dado que se trata de un representante de la serie homoléptica estructuralmente relacionada, que presentó una muy buena actividad y selectividad en la evaluación primaria sobre epimastigotas, y una actividad y selectividad moderada y aceptable sobre la forma tripomastigota ($IS_{\text{tripomastigotas}} = 21$).

5.4.2 Efectos sobre el proceso de infección

Para investigar los efectos de los compuestos de oxovanadio estudiados sobre la capacidad de infección de los parásitos, se trataron tripomastigotas celulares por 30 minutos con los compuestos heterolépticos seleccionados según los criterios establecidos en la *sección 5.4.1*, [$V^VO(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})$], [$V^VO(\text{IN-2H})(\text{L2-H})$], [$V^VO(\text{BrIS-2H})(\text{L2-H})$] y [$V^VO(\text{L2-H})(\text{mpo})$], a concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC_{50} previamente determinado en tripomastigotas celulares (Tablas 5.1-5.9). En el caso del compuesto homoléptico [$V^VO(\text{L1-H})_2$], las concentraciones utilizadas corresponden a 1×, 5× y 10× el $IC_{50,5}$ días determinado en epimastigotas, dado que el ensayo fue realizado previo al desarrollo del método para determinar el EC_{50} sobre la forma tripomastigota ¹. Posterior al tratamiento con los compuestos, los parásitos fueron utilizados para infectar una monocapa de células VERO utilizando una relación de 10 parásitos por célula. Las células infectadas se tiñeron con DAPI y se contó la cantidad de células infectadas luego de 24 y 48 horas. El número de células infectadas se comparó contra una infección establecida con tripomastigotas sin tratar. A modo de ejemplo, en la Figura 5.3 se muestra una infección establecida con parásitos sin tratar con los compuestos en comparación con una infección establecida con parásitos pre tratados con el compuesto [$V^VO(\text{IN-H})(\text{L2-H})$] a concentraciones relativas a su EC_{50} (0,29 μM). En la figura se indican los núcleos de células VERO y los núcleos de amastigotas celulares. Las células que se consideraron infectadas (que contienen amastigotas en el citoplasma de la célula de mamífero), se señalan con círculos blancos.

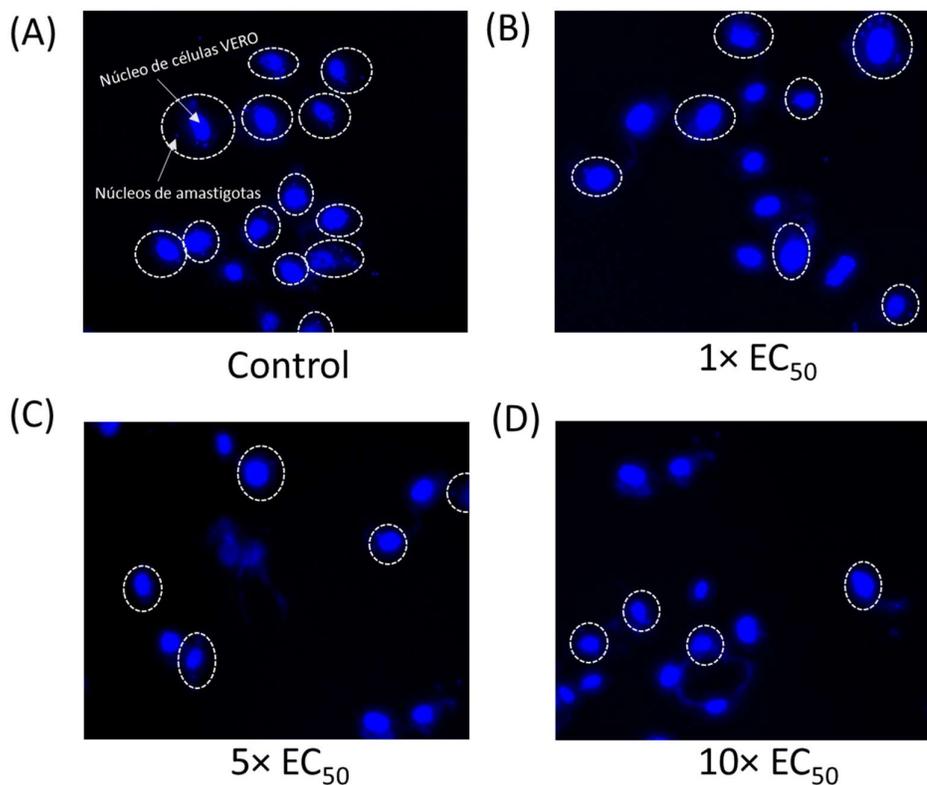


Figura 5.3. Efecto del compuesto [VVO(IN-2H)(L2-H)] en el proceso de infección luego de 24 horas de incubación de las células con los parásitos. Las infecciones fueron establecidas con tripomastigotas celulares (A) sin tratar (parásitos control), (B) pre-tratados con $1 \times EC_{50}$, (C) pre-tratados con $5 \times EC_{50}$ y (D) pre-tratados con $10 \times EC_{50}$. En (A) se señalan los núcleos de células VERO y de amastigotas intracelulares. Los círculos blancos señalan las células infectadas teñidas con DAPI.

Los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) estructuralmente relacionados [VVO(IN-2H)(L2-H)] y [VVO(BrIS-2H)(L2-H)], conteniendo la misma 8-hidroxiquinolina (L2), se comportaron de manera muy similar. Para ambos tiempos estudiados, el porcentaje de células infectadas disminuye significativamente cuando los tripomastigotas son pretratados con los complejos. Luego de 48 horas post infección, el efecto tiende a ser dosis dependiente (Figura 5.4).

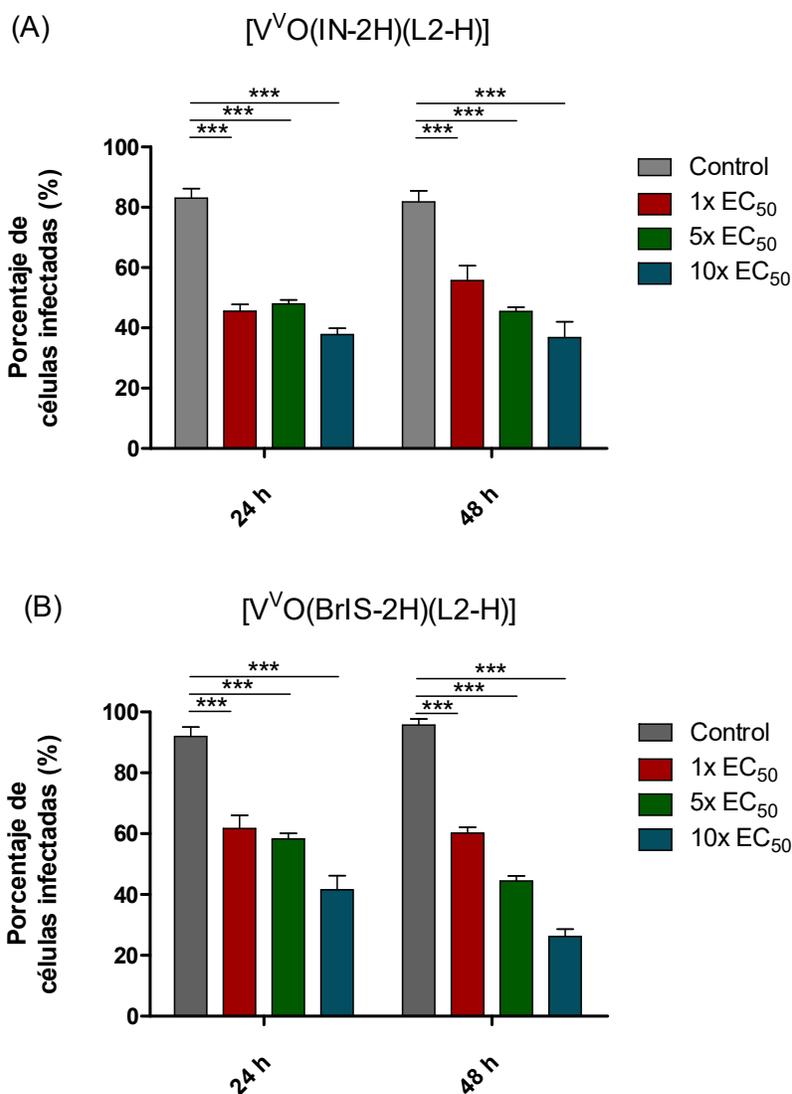


Figura 5.4. Porcentaje de células infectadas utilizando parásitos pre tratados con (A) $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ y (B) $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$. El porcentaje de células infectadas se comparó contra el control de células infectadas con tripomastigotas sin tratar utilizando test de ANOVA bidireccional. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células. Test de ANOVA: *** = $P < 0.001$.

Por otra parte, los parásitos tratados con el compuesto $[V^VO(LS4-H)(L0-H)]$, seleccionado de la serie que contiene un coligando tridentado derivado la semicarbazona de salicilaldehído, no disminuyó significativamente la cantidad

de células infectadas. Si bien se esperaba un efecto similar que el que se ha visto para los complejos $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$ y $[V^{VO}(\text{BrIS-2H})(\text{L2-H})]$, dada su relación estructural, probablemente el tiempo corto de exposición para este compuesto no fue suficiente para promover cambios en los parásitos que disminuyan su capacidad infectiva. Cabe destacar que ambos compuestos que se muestran en la Figura 5.4 contienen el ligando L2, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina, el cual, como se ha discutido antes, les confiere una selectividad mayor hacia los parásitos que los compuestos conteniendo la 8-hidroxiquinolina sin sustituir.

No obstante, el compuesto heteroléptico de oxovanadio (IV), $[V^{IV}O(\text{L2-H})(\text{mpo})]$, se comportó de una forma muy distinta a los resultados discutidos anteriormente. A concentraciones bajas ($1 \times \text{EC}_{50}$), se observa una disminución de menos del 20 % en la capacidad de infección en 24 horas. Sin embargo, en 48 horas de exposición de los parásitos a las células VERO, los parásitos sin tratar alcanzan un 40 % más de células infectadas que los tratados con la misma concentración. A concentraciones mayores ($5 \times$ y $10 \times \text{EC}_{50}$), el porcentaje de células infectadas disminuye por debajo del 20 % para los dos tiempos ensayados (Figura 5.5). Estos resultados sugieren que el efecto se da de forma rápida. Parece interesante relacionar este hecho con la similitud entre los valores de $\text{EC}_{50, 24 \text{ h}}$ e $\text{IC}_{50, 5 \text{ días}}$ determinados sobre la forma epimastigota de *T. cruzi* (1,88 y 2,13 μM , respectivamente), lo cual sugiere también, que el efecto antitripanosoma se da de forma rápida

Los resultados obtenidos para concentraciones equivalentes a $5 \times$ y $10 \times \text{EC}_{50}$ de $[V^{IV}O(\text{L2-H})(\text{mpo})]$ son similares a los reportados para los compuestos $[\text{M}(\text{dppf})(\text{mpo})]$, donde $\text{M} = \text{Pd}$ o Pt , los cuales conducen a una disminución del % de células infectadas de más del 80 %^{23, 24}. Los resultados obtenidos para el resto de los compuestos en conjunto con la relación comentada anteriormente sugieren que la inclusión del ligando mpo en el compuesto de coordinación produce una disminución de la capacidad de infección de los compuestos.

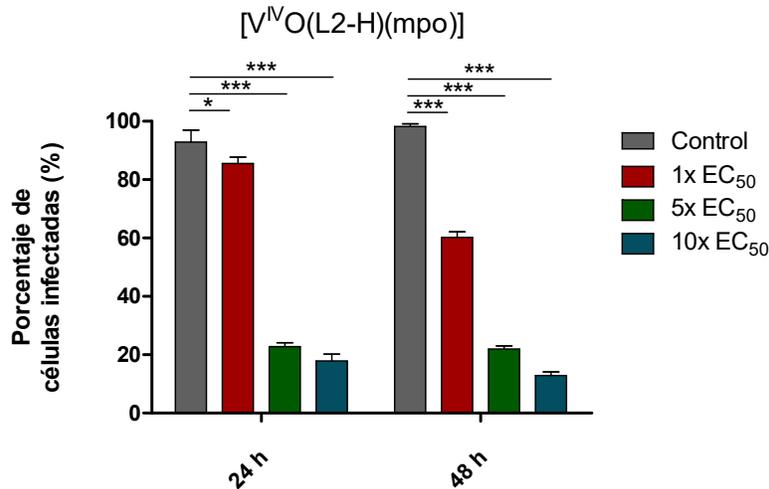


Figura 5.5. Porcentaje de células infectadas utilizando parásitos pre tratados con [V^{IVO}(L2-H)(mpo)]. El porcentaje de células infectadas se comparó contra el control de células infectadas con tripomastigotas sin tratar utilizando test de ANOVA bidireccional. Para condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células. Test de ANOVA: * = $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$.

Por último, en el caso del compuesto homoléptico [V^{IVO}(L1-H)₂], 48 horas luego de establecida la infección se logra ver una tendencia a la disminución de la cantidad de células infectadas de forma dosis dependiente, la cual se hace estadísticamente significativa en el tratamiento correspondiente a 10x IC₅₀ (Figura 5.6). En este caso particular, vale la pena aclarar que las concentraciones utilizadas, relativas al IC_{50,5días}, son pequeñas respecto a las que se hubieran utilizado si se empleara el EC₅₀ en tripomastigotas. De hecho, 10x IC_{50,5días} corresponde a 2,1μM, la cual coincide con el EC_{50,24h} determinado en tripomastigotas. Por tanto, este análisis conduce a relacionar el resultado con el hecho de que el compuesto [V^{IVO}(L1-H)₂] a concentraciones aproximadas al EC_{50,24h} disminuye el porcentaje de células infectadas significativamente solo a las 48 h.

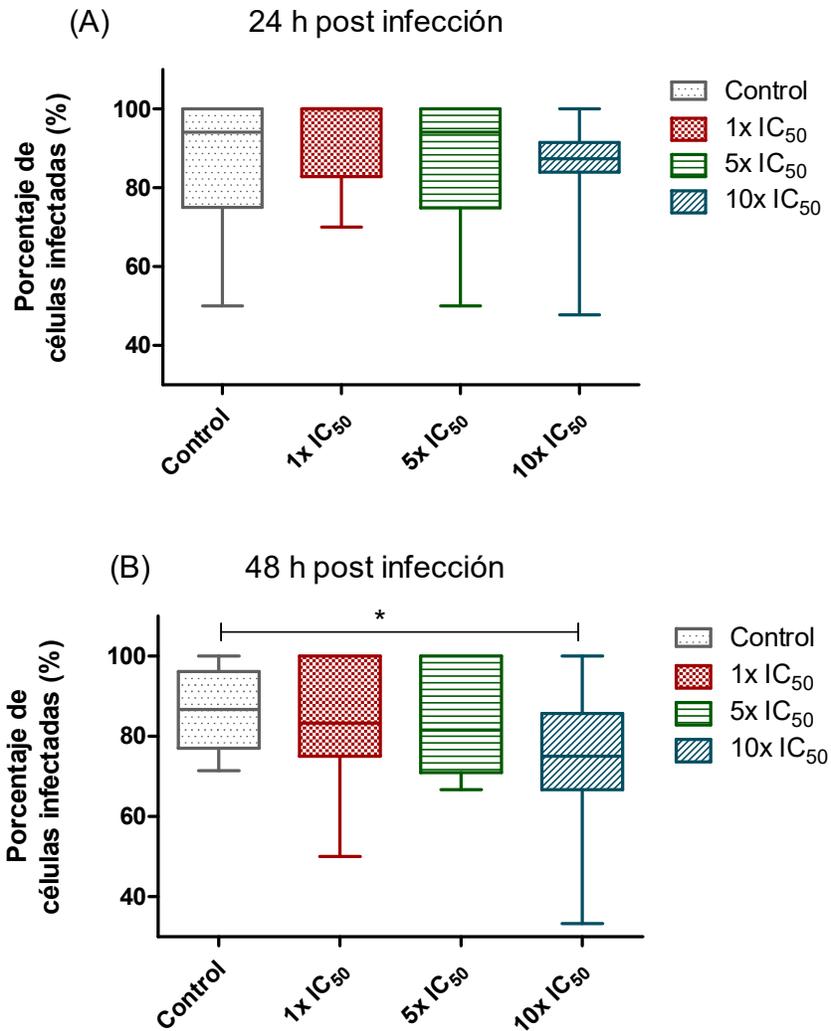


Figura 5.6. Porcentaje de células infectadas utilizando parásitos pre-tratados con [V^{IVO}(L1-H)₂] luego de (A) 24 h y (B) 48 h. El porcentaje de células infectadas se comparó contra el control de células infectadas con tripomastigotas sin tratar utilizando test de ANOVA bidireccional. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células. Test de ANOVA: * = $P < 0.05$.

5.4.3 Efectos sobre la persistencia de la infección

Una vez establecida la infección con tripomastigotas sin tratar, se estudió el efecto de los compuestos seleccionados (*sección 5.4.1*) sobre la proliferación de los amastigotas intracelulares. De la misma forma que el estudio del efecto sobre

la capacidad de infección de los tripomastigotas celulares discutida previamente (*sección 5.4.2*), las infecciones establecidas se trataron con los compuestos [V^VO(LS4-2H)(L0-H)], [V^VO(IN-2H)(L2-H)], [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^{IV}O(L2-H)(mpo)], a concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas celulares (Tablas 5.1-5.9). En el caso del compuesto homoléptico [V^{IV}O(L1-H)₂], las concentraciones utilizadas corresponden a 1×, 5× y 10× IC_{50, 5 días} determinado en epimastigotas, dado que el ensayo fue realizado previo al desarrollo del método para determinar el EC₅₀ sobre la forma tripomastigota¹. Luego de 24 y 48 horas de tratamiento, las células infectadas fueron teñidas con DAPI y se contó la cantidad de amastigotas intracelulares por célula. El número de amastigotas intracelulares en las infecciones tratadas se comparó contra el número de amastigotas celulares en una infección sin tratamiento con los compuestos de oxovanadio. En la Figura 5.7A se compara una infección establecida luego de 72 horas sin tratar contra una tratada con el compuesto [V^VO(IN-2H)(L2-H)] a concentraciones relativas a su EC₅₀ (0,29 μM). Para todos los tratamientos con el compuesto [V^VO(IN-2H)(L2-H)], a ambos tiempos estudiados, no se observa una disminución significativa en el número de amastigotas celulares por célula (Figura 5.7B). El compuesto heteroléptico de oxovanadio (V) análogo [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)], el cual contiene la misma 8-hidroxiquinolina (L2) en su estructura, se comporta de igual manera que [V^VO(IN-2H)(L2-H)]. Estos resultados en conjunto con lo discutido en la *sección 5.4.2*, sugieren que ambos [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^VO(IN-2H)(L2-H)], en las condiciones de trabajo, afectan el proceso de infección de tripomastigotas pero, sin embargo, no tienen actividad antiproliferativa sobre amastigotas intracelulares.

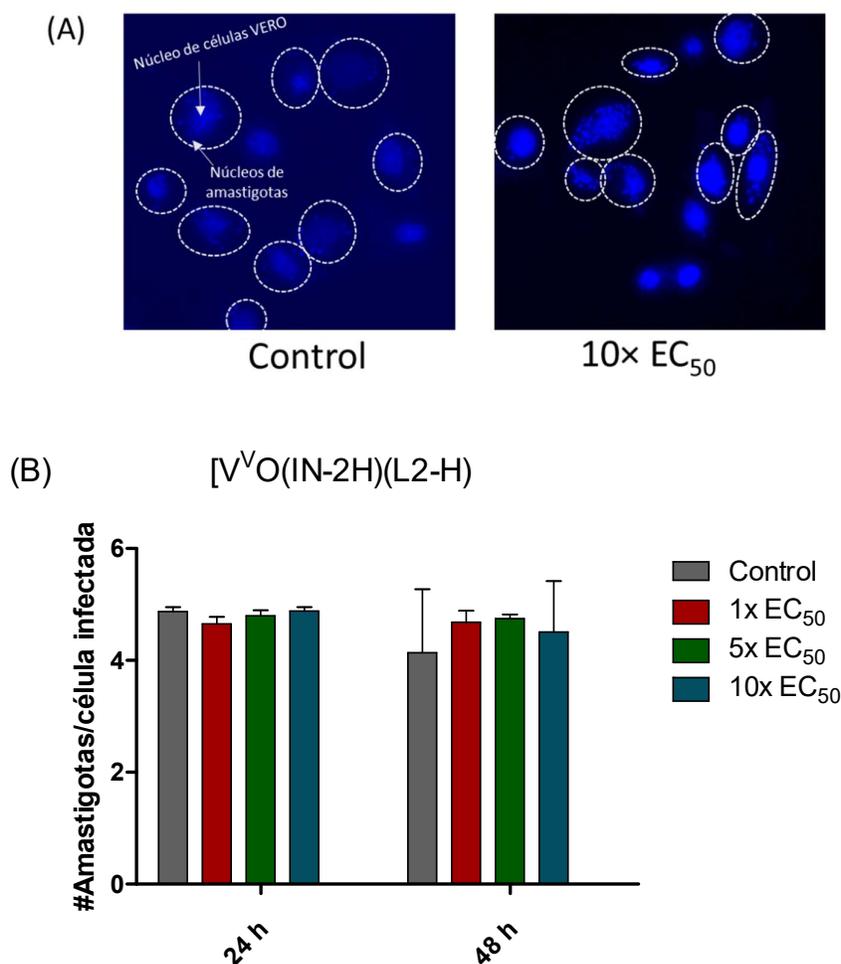


Figura 5.7 Efecto del compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] en la proliferación de amastigotas. (A) Infección control y tratamiento con 10× EC₅₀ por 24 horas. Los círculos blancos señalan las células infectadas teñidas con DAPI. (B) Número de amastigotas por célula luego de 24 y 48 horas de incubación con las concentraciones del compuesto relativas a su EC₅₀ en tripomastigotas. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células.

Para el caso del compuesto [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], seleccionado de la serie que contiene un coligando tridentado derivado la semicarbazona de salicilaldehído, no fue posible determinar el número de amastigotas por células luego del tratamiento. El tratamiento de las infecciones con este compuesto produjo una disminución de las células totales, tanto infectadas como no

infectadas, de forma dosis dependiente. Este efecto puede estar asociado a la toxicidad de los compuestos que contienen 8-hidroxiquinolina (L0). Como ya se ha comentado previamente en la discusión de los resultados de las diferentes series, la inclusión de los sustituyentes en el fragmento de 8-hidroxiquinolina incrementa la selectividad de los compuestos hacia los parásitos.

Del mismo modo que se discutió para el efecto sobre la capacidad de infectar células VERO, el compuesto heteroléptico de vanadio (IV) [$V^{IV}O(L2-H)(mpo)$], se comportó de forma similar a los compuestos [$M(dppf)(mpo)$], donde $M = Pd$ o Pt ^{23, 24}. Particularmente, el número de amastigotas por células disminuye significativamente tras una incubación por 24 h con 10x el valor de EC_{50} previamente determinado en tripomastigotas. En el caso de la incubación por 48 horas, la disminución se vuelve significativa para 5x y 10x EC_{50} (Figura 5.8).

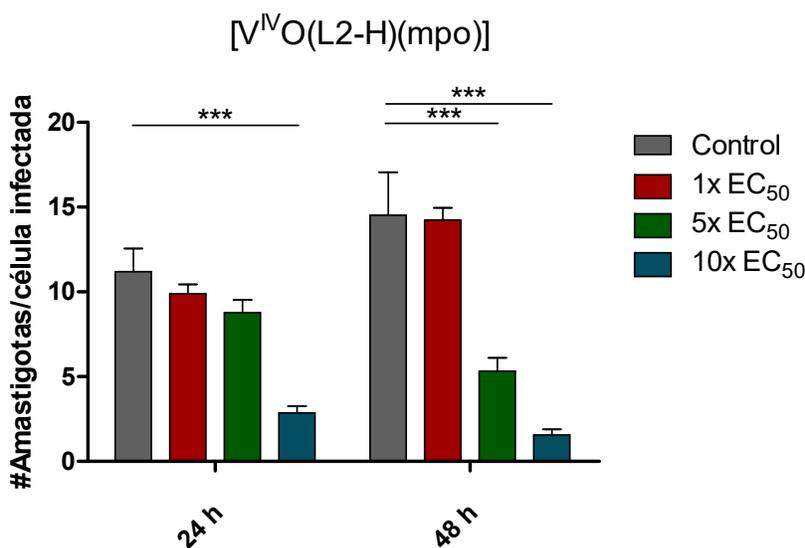


Figura 5.8. Número de amastigotas por célula luego de 24 y 48 horas de incubación con las concentraciones del compuesto relativas al EC_{50} en tripomastigotas del compuesto [$V^{IV}O(L2-H)(mpo)$]. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células. Test de ANOVA: *** = $P < 0.001$.

Además de la disminución de la capacidad de infección de los nuevos compuestos, los hallazgos mencionados en su conjunto sugieren que el ligando mpo, le confiere a la molécula actividad antiproliferativa en amastigotas intracelulares.

Para el compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L1-H)_2]$, se observó una disminución dosis dependiente en el número de amastigotas por célula infectada (Figura 5.9). La disminución se vuelve estadísticamente significativa cuando la concentración de trabajo corresponde a 5x y 10x IC_{50} .

Al igual que para el compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$, el compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ no solo afecta el proceso de infección sino que también disminuye la proliferación de amastigotas intracelulares de forma dosis dependiente.

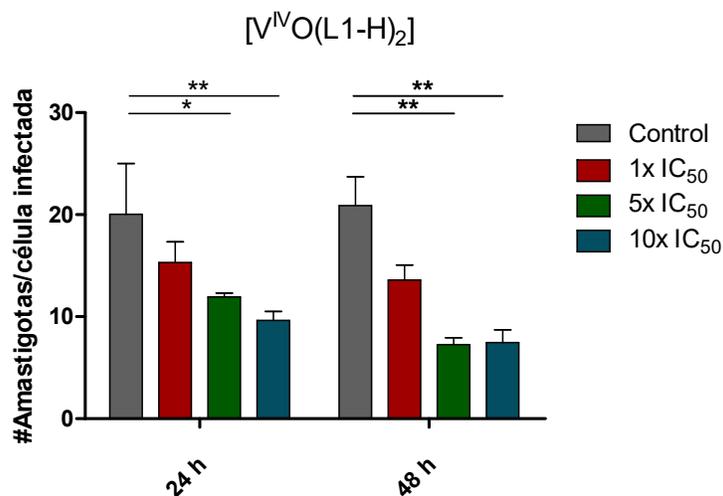


Figura 5.9. Número de amastigotas por célula luego de 24 y 48 horas de incubación con las concentraciones del compuesto relativas al IC_{50} en epimastigotas del compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD). Se realizaron tres experimentos independientes. Para cada experimento se contaron al menos 300 células. Test de ANOVA: * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$.

5.4 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN *T. CRUZI*

Como aproximación a los efectos específicos que los compuestos en estudio causan sobre la morfología de los parásitos, los cultivos de parásitos tratados por 24 h con el compuesto más activo de los estudiados, [V^vO(IN-2H)(L-H)], se visualizaron por microscopía confocal. Los parásitos fueron fijados y teñidos con DAPI y Faloidina 594 para visualizar ácidos nucleicos y filamentos de actina. La Figura 5.10 muestra los parásitos sin tratar (control) y expuestos a 1x EC₅₀ y 10x EC₅₀. Los epimastigotas sin tratar mostraron la morfología típica, un cuerpo celular alargado y un flagelo terminal. Por el contrario, tras el tratamiento con el compuesto por 24 horas, los parásitos muestran una morfología celular alterada. A una concentración de compuesto de 1x EC₅₀, los parásitos comienzan a mostrar una morfología con cuerpo celular hinchado y flagelo alargado, pareciéndose ésta a la de la forma tripomastigota. A esta concentración también se encontraron parásitos redondeados y con pérdida de flagelo. Este fenómeno se hizo más evidente cuando se utilizaron concentraciones mayores. En estos casos, se observaron principalmente parásitos redondeados, con flagelo alargado o sin flagelo. La tinción con DAPI y faloidina además da cuenta de la presencia de ácidos nucleicos en el medio de montaje, deslocalizada de los parásitos, lo que indica la ruptura de las estructuras celulares.

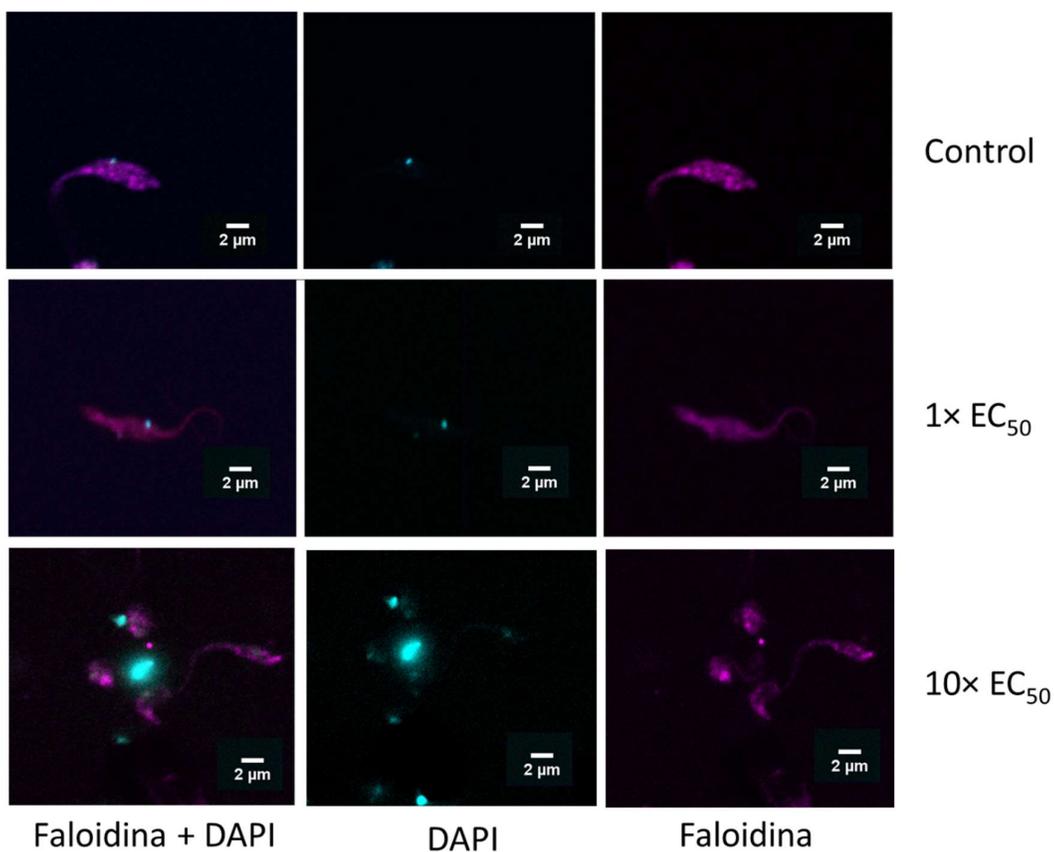


Figura 5.10. Efecto en la morfología de epimastigotas de *T. cruzi* luego de 24 horas de incubación con el compuesto [VVO(IN-2H)(L2-H)] en concentraciones relativas a su EC_{50} .

5.5 TOXICIDAD SOBRE MODELOS *IN VIVO*

5.5.1 Toxicidad *in vivo* en larvas de Zebrafish (*Danio rerio*)

En el capítulo 3 se introdujo el Zebrafish como un modelo *in vivo* que se ha utilizado previamente para estudiar la toxicidad de potenciales fármacos basados en metales ^{25, 26}.

En el marco del trabajo con la familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y 8-hidroxiquinolina como ligandos, se evaluó la toxicidad de uno de los compuestos

desarrollados en el modelo mencionado, a través de la colaboración del Dr. Gustavo Salinas.

Para este ensayo, se seleccionó el compuesto [V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)], uno de los compuestos más potentes de la serie en epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* (IC_{50, 5días} en epimastigotas = 7,8 µM; EC₅₀ en tripomastigotas = 1,1 µM).

Si se comparan los valores con el IC_{50, 24h} determinado en células VERO, la selectividad no es elevada hacia epimastigotas (IS = 5,6), pero se incrementa si la misma es calculada hacia los tripomastigotas (IS = 38,7).

La Tabla 5.10 resume los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad de Zebrafish con el compuesto [V^{VO}(LS1-H)(L0-H)]. Tras 48 horas de incubación con los compuestos, la viabilidad de los embriones fue determinada por microscopía estereoscópica evaluando la presencia de latido cardíaco.

Tabla 5.10. Resultados del ensayo *in vivo* sobre Zebrafish

Concentración (µM)	Viabilidad de los embriones (%)
0	100
1	100
10	100
25	100
50	66
100	0

Para cada concentración, se realizaron dos experimentos independientes, cada uno utilizando seis animales.

La viabilidad de los embriones de zebrafish no se vio afectada hasta una concentración de 25 µM. En ambas réplicas biológicas, cuando los peces se expusieron al compuesto en una concentración de 50 µM, la viabilidad contada fue del 66 %. Sin embargo, cuando los animales se expusieron al [V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)] en concentración 100 µM, luego de 48 horas la viabilidad fue nula.

5.5.2 Toxicidad *in vivo* en *C. elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), introducido en la sección 3.3.10.2 del Capítulo 3 de esta tesis, es un nemátodo que se ha utilizado como modelo *in vivo* para el rápido monitoreo de toxicidad de un potencial fármaco y para estudios exotoxicológicos²⁷⁻³⁰.

El compuesto más activo de todos los explorados en esta tesis, [VVO(IN-2H)(L2-H)] fue seleccionado para evaluar su toxicidad en el modelo mencionado, por el Dr. Gustavo Salinas.

Para evaluar la toxicidad del compuesto, se monitorearon los cambios en la motilidad del gusano utilizando un haz de infrarrojo, como fue descrito en el Capítulo 3, Materiales y Métodos^{28,29}.

Los resultados del estudio dosis-respuesta en *C. elegans* se resumen en la Figura 5.11. El compuesto fue evaluado hasta una concentración de 100 μM , dado que a concentraciones mayores el compuesto precipita. A la concentración máxima utilizada, luego de 18 h de incubación se observó una leve disminución en la motilidad de los gusanos, la cual no fue estadísticamente significativa.

En contraste, el fármaco antihelmíntico ivermectina, utilizado como control positivo en el ensayo mostró una reducción de la motilidad hasta cero a una concentración de 2 μM .

Adicionalmente, los parásitos tratados con el compuesto fueron recuperados en medio fresco, libre de compuesto. La totalidad de los parásitos, incluso aquellos expuestos al compuesto [VVO(IN-2H)(L2-H)] a 100 μM tuvieron un desarrollo normal.

Estos resultados indican que el compuesto en estudio es inocuo para este modelo de invertebrado animal, que permite examinar la toxicidad aguda y la toxicidad reproductiva y del desarrollo.

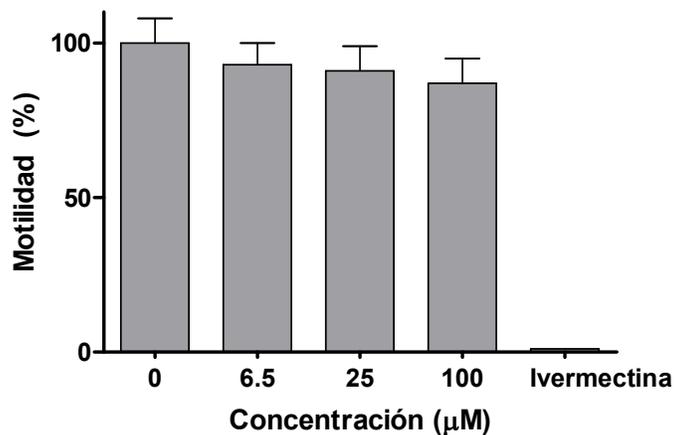


Figura 5.11. Se incubaron setenta gusanos adultos L4 en buffer M9 con el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] a concentraciones de 0 µM (solamente 1 % de DMSO), 6,25 µM, 25 µM y 100 µM. El primero de ellos fue utilizado como referencia de la motilidad normal de los gusanos. Se utilizó el fármaco de referencia ivermectina (2 µM) como control positivo. En cada experimento se realizaron cuatro réplicas técnicas de dos réplicas biológicas. Para cada condición se representa el promedio y la desviación estándar (SD).

5.7 CONCLUSIONES PARCIALES

Se exploró la potencialidad de los compuestos heterolépticos de vanadio desarrollados como agentes antiparasitarios. A excepción de dos de ellos, todos los nuevos compuestos heterolépticos con derivados de la 8-hidroxiquinolina y coligandos tridentados mostraron actividad en epimastigotas *T. cruzi* (cepa CL Brener) y en promastigotas de *L. infantum* en el rango micromolar.

Por su parte, los compuestos homolépticos de fórmula [V^{VO}O₂(L'-H)], siendo L' un ligando tridentado (LS, IN o BrIS), mostraron actividad insignificante e índices de selectividad menores a 1, lo que demuestra una alta toxicidad inespecífica de los mismos.

Los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina presentaron actividad frente a ambos parásitos con valores de IC₅₀ en epimastigotas del mismo orden y levemente menores que el fármaco

de referencia. La formación del compuesto de coordinación aumenta de forma notoria la selectividad de los ligandos bioactivos. No se encontró una clara relación entre las actividades observadas para las especies de $V^{IV}O$ respecto a las observadas para las especies de V^{VO} .

Todos los compuestos homolépticos con ligandos L mostraron actividades mayores y toxicidades inespecíficas menores que los compuestos heterolépticos con derivados de 8-hidroxiquinolina y un ligando tridentado [$V^{VO}(LS-2H)(L0-H)$], [$V^{VO}(IN-2H)(L-H)$] y [$V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)$]. La formación de los compuestos heterolépticos [$V^{IV}O(L-H)(mpo)$], muestra un aumento de actividad en ambos parásitos respecto al ligando libre mpo. No obstante, las actividades son muy similares a las reportadas para los compuestos homolépticos [$V^{IV}O(L-H)_2$], aunque con toxicidades mayores.

De forma global, de los resultados se desprende que *T. cruzi* fue más sensible a los compuestos que *L. infantum*. En cuanto a los diferentes estadios del parásito, al contrario que el comportamiento observado para el fármaco Nifurtimox, todos los compuestos ensayados fueron más activos sobre la forma tripomastigota que sobre la forma no infectiva, dando lugar a valores de EC_{50} en tripomastigotas entre 7 y 70 veces menores que los obtenidos para el fármaco de referencia. La sustitución del fragmento fenólico en el ligando tridentado parece tener baja incidencia en la actividad antitripanosoma de los nuevos compuestos, sin embargo, tanto para los ligandos tridentados derivados de la semicarbazona de salicilaldehído (ligandos LS), como para los ligandos tridentados derivados de la isoniazida (IN y BrIS), se observó que la inclusión del derivado de 2-hidroxinaftaldehído aumenta levemente la actividad antiparasitaria respecto a los ligandos halosustituidos. No obstante, pareciera que el sustituyente halogenado en el anillo del ligando tridentado aumenta la toxicidad en células de mamífero. Por su parte, el efecto de la azida, utilizada en el diseño del ligando, parece ser más notorio, dando valores de EC_{50} en el rango submicromolar para los derivados de isoniazida, frente a valores en el rango micromolar para los

derivados de semicarbazida. En cuanto a los sustituyentes de la 8-hidroxiquinolina, tanto en compuestos homolépticos como heterolépticos se vio un aumento de la selectividad con la inclusión de sustituyentes halogenados, particularmente por un aumento de la actividad antitripanosoma y una disminución concomitante de los efectos tóxicos sobre células de mamíferos.

Basándonos en el set completo de resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* en ambas formas de *T. cruzi* y en *L. infantum* y la toxicidad en células VERO, se seleccionaron los compuestos [V^VO(LS4-2H)(L0-H)], [V^VO(IN-2H)(L2-H)], [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)], [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] y [V^{IV}O(L1-H)₂] para estudiar los efectos sobre la infección de *T. cruzi* en células VERO. Los compuestos [V^VO(IN-2H)(L2-H)] y [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] demostraron afectar el proceso de infección. Sin embargo, para éstos no se vio una disminución estadísticamente significativa de la proliferación de los amastigotas celulares. El compuesto [V^VO(LS4-2H)(L0-H)] afectó la célula infectada en su conjunto, demostrando una alta toxicidad en concordancia con el resto de los ensayos *in vitro*. Por su parte, los compuestos [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] y [V^{IV}O(L1-H)₂] resultaron afectar tanto el proceso de infección como la proliferación de los amastigotas.

En cuanto a los cambios morfológicos estudiados para el compuesto, [V^VO(IN-2H)(L-H)], se observó que luego del tratamiento muestran su cuerpo celular agrandado y su flagelo alargado, cuando son expuestos a concentraciones bajas. A concentraciones superiores, se observaron principalmente parásitos redondeados, con flagelo alargado o sin flagelo.

Finalmente, se estudió la toxicidad de dos compuestos sobre los modelos *in vivo* Zebrafish y *C. elegans*. En primer lugar, el compuesto [V^VO(LS1-2H)(L0-H)] no afectó la viabilidad de los embriones de zebrafish hasta una concentración de 25 µM. En contraste, el compuesto [V^VO(IN-2H)(L-H)] no afectó al modelo invertebrado hasta una dosis de 100 µM. Si bien estos resultados de toxicidad son preliminares, están de acuerdo con la baja toxicidad observada en los ensayos *in vitro*.

5.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Díaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem* **2019**, *43* (45), 17756-17773.
2. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Díaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, *23* (8), 1265-1281.
3. Cherdtrakulkiat, R.; Boonpangrak, S.; Sinthupoom, N.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V., Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochem Biophys Rep* **2016**, *6*, 135-141.
4. Choroba, K.; Raposo, L. R.; Palion-Gazda, J.; Malicka, E.; Erfurt, K.; Machura, B.; Fernandes, A. R., In vitro antiproliferative effect of vanadium complexes bearing 8-hydroxyquinoline-based ligands - the substituent effect. *Dalton Trans* **2020**, *49* (20), 6596-6606.
5. Rivas, F.; Medeiros, A.; Comini, M.; Suescun, L.; Rodriguez Arce, E.; Martins, M.; Pinheiro, T.; Marques, F.; Gambino, D., Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells. *J Inorg Biochem* **2019**, *199*, 110779.
6. Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V., 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther* **2013**, *7*, 1157-78.
7. Scalese, G.; Arhouma, Z.; Kostenkova, K.; Pérez-Díaz, L.; Crick, D. C.; Gambino, D.; Crans, D. C., Do bioactive 8-hydroxyquinolines oxidovanadium(IV) and (V) complexes inhibit the growth of *M. smegmatis*? *J Inorg Biochem* **2022**, *237*, 111984.

8. Rodríguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Pérez-Díaz, L.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitiño, E. L.; Maríngolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q. F.; Pavan, F. R.; Otero, L.; Gambino, D., Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Trans* **2015**, *44* (32), 14453-14464.
9. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
10. Timmins, G. S.; Deretic, V., Mechanisms of action of isoniazid. *Mol Microbiol* **2006**, *62* (5), 1220-7.
11. Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B., Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14* (11), 751-758.
12. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5375.
13. Correia, I.; Adao, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; Costa Pessoa, J., Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *J Inorg Biochem* **2014**, *141*, 83-93.
14. Balsa, L. M.; Quispe, P.; Baran, E. J.; Lavecchia, M. J.; Leon, I. E., In silico and in vitro analysis of FAK/MMP signaling axis inhibition by VO-clioquinol in 2D and 3D human osteosarcoma cancer cells. *Metallomics* **2020**, *12* (12), 1931-1940.

15. Ferretti, V.; León, I., An Overview of Vanadium and Cell Signaling in Potential Cancer Treatments. *Inorganics* **2022**, *10* (4).
16. Gambino, D., Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coord Chem Rev* **2011**, *255* (19-20), 2193-2203.
17. Martín-Escolano, J.; Marín, C.; Rosales, M. J.; Tsaousis, A. D.; Medina-Carmona, E.; Martín-Escolano, R., An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infect Dis* **2022**, *8*, 1107-1115.
18. Bern, C., Chagas' Disease. *N Engl J Med* **2015**, *373* (5), 456-66.
19. De Carvalho, T. U., De Souza, W, Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1986**, *28*, 205-212.
20. De Pablos, L. M.; Osuna, A., Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun* **2012**, *80* (7), 2258-64.
21. Minning, T. A.; Weatherly, D. B.; Atwood, J., 3rd; Orlando, R.; Tarleton, R. L., The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 370.
22. Cipriani, M.; Toloza, J.; Bradford, L.; Putzu, E.; Vieites, M.; Curbelo, E.; Tomaz, A. I.; Garat, B.; Guerrero, J.; Gancheff, J. S.; Maya, J. D.; Olea Azar, C.; Gambino, D.; Otero, L., 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* (27), 4677-4689.
23. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., Effect of a new anti-*T. cruzi* metallic compound based on palladium. *Biometals* **2018**, *31* (6), 961-974.
24. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Tissot, F.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., *Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound. *Chem Biol Drug Des* **2018**, *92* (3), 1657-1669.

25. Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. E., Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* **2005**, *86* (1), 6-19.
26. Leon, I. E.; Di Virgilio, A. L.; Barrio, D. A.; Arrambide, G.; Gambino, D.; Etcheverry, S. B., Hydroxylamido-amino acid complexes of oxovanadium(V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model. *Metallomics* **2012**, *4* (12), 1287-96.
27. Dengg, M.; van Meel, J. C., *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2004**, *50* (3), 209-14.
28. Risi, G.; Aguilera, E.; Lados, E.; Suarez, G.; Carrera, I.; Alvarez, G.; Salinas, G., *Caenorhabditis elegans* infrared-based motility assay identified new hits for nematicide drug development. *Vet Sci* **2019**, *6* (1).
29. Simonetta, S. H.; Golombek, D. A., An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods* **2007**, *161* (2), 273-80.
30. Carretero, M.; Solis, G. M.; Petrascheck, M., *C. elegans* as model for drug discovery. *Curr Top Med Chem* **2017**, *17* (18), 2067-2076.

CAPÍTULO 6

ESTABILIDAD, LIPOFILIA E INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

CAPÍTULO 6. ESTABILIDAD, LIPOFILIA E INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

Contenido

6.1	INTRODUCCIÓN.....	361
6.2	ESTABILIDAD	362
6.2.1	Compuestos heterolépticos [$V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)$]	362
6.2.2	Compuestos heterolépticos [$V^{VO}(IN-2H)(L-H)$] y [$V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)$].....	370
6.2.3	Compuestos homolépticos [$V^{IV}O(L-H)_2$] y [$V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2$].....	380
6.2.4	Compuestos heterolépticos [$V^{IV}O(L-H)(mpo)$].....	388
6.3	INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS.....	389
6.3.1	Interacción con transferrina por dicroísmo circular	391
6.3.2	Interacción con albúmina.....	396
6.3.2.1	Dicroísmo circular	396
6.3.2.2	Medidas de <i>quenching</i> de fluorescencia.....	398
6.3	LIPOFILIA	403
6.5	CONCLUSIONES PARCIALES.....	407
6.6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	410

6.1 INTRODUCCIÓN

La alta reactividad de los compuestos de coordinación de vanadio estudiados en conjunto con la complejidad de los medios biológicos utilizados en los ensayos celulares resulta en que el estudio de la especiación fina de los compuestos de oxovanadio (IV) y (V) sea una tarea difícil que requiere la conjunción de una variedad de métodos analíticos adecuados. La consideración cuidadosa de la estabilidad y la especiación de los compuestos una vez disueltos tanto en disolventes orgánicos que se utilizarán para preparar soluciones stock para los ensayos biológicos, como en los medios de cultivo celular y fluidos biológicos es esencial para acercarse al conocimiento de las posibles especies responsables de los efectos celulares ^{1,2}. Además, el conocimiento de los cambios químicos que sufren los compuestos de vanadio una vez disueltos puede dar lugar a estrategias que permitan incrementar la estabilidad de los compuestos obtenidos, o bien aprovechar su química para mejorar algunas aplicaciones ^{3,4}.

Combinando la información disponible acerca de la química de compuestos estructuralmente similares en conjunto con el estudio experimental del comportamiento en disolución, permite proponer las posibles especies presentes durante el tratamiento de los parásitos con los compuestos, y por lo tanto, aportar a la interpretación de los efectos biológicos observados y las especies activas involucradas.

Los estudios de estabilidad realizados en este trabajo de tesis, presentados en este Capítulo, constituyeron un acercamiento inicial a la estabilidad de los compuestos.

Por otra parte, para intentar comprender el comportamiento de los compuestos en medios biológicos, se estudió la interacción con proteínas séricas como potenciales proteínas transportadoras.

Como parte del estudio de las propiedades fisicoquímicas de interés biológico, en este capítulo se presentan los resultados del estudio de la lipofilia de los compuestos, uno de los principales factores que controla el paso a través de las membranas celulares.

6.2 ESTABILIDAD

Para todas las series, se estudió la estabilidad en soluciones de DMSO o DMF a diferentes tiempos luego de la disolución, utilizando las técnicas espectroscópicas de EPR (detallada en la *sección 3.2.2.2*), ^1H RMN y ^{51}V RMN (detallada en la *sección 3.2.2.4*).

En el marco de la pasantía en el laboratorio de la Prof. Debbie Crans, en Colorado State University, se evaluó la estabilidad de algunas de las muestras en mezclas DMSO:D₂O, resultados que fueron incluidos en este capítulo aunque no se cuente con los experimentos para todas las series exploradas en este trabajo. Durante la pasantía se estudió, además, la estabilidad de algunos compuestos desarrollados en esta tesis en DMSO:medio de cultivo 7H9, medio utilizado para crecer *Mycobacterium smegmatis* (*M. smeg.*). Estos resultados no fueron incluidos en esta tesis pero fueron publicados en conjunto con los demás estudios de estabilidad presentados aquí ⁵.

En este trabajo se incluyeron, además, estudios de estabilidad en mezclas DMSO:medio de cultivo BHI utilizando ^{51}V RMN y HPLC con el objetivo de estimar las especies presentes durante los ensayos biológicos.

6.2.1 Compuestos heterolépticos [$\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})$]

Una vez sintetizados y caracterizados los compuestos, para tener un idea global de los cambios químicos que la serie de compuestos [$\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})$] podría sufrir una vez disueltos, se realizaron experimentos de ^1H RMN y ^{51}V

RMN con los complejos disueltos en DMSO- d_6 y DMSO- d_6 :D₂O, así como en el medio de cultivo utilizado para hacer crecer los parásitos (conteniendo 3 % de DMSO utilizado para disolver los compuestos de estudios y 25 % de D₂O añadido para ajustar la homogeneidad del campo magnético), en diferentes tiempos.

En los espectros de ⁵¹V RMN de las soluciones de DMSO- d_6 se observó inicialmente una especie única para cada complejo con δ_v alrededor de -450 ppm (entre -456,5 y -446,9 ppm) (Figura 6.1). Se midieron a la misma vez los espectros de ¹H RMN para asegurar la presencia única de los compuestos heterolépticos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)].

Para el compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], los experimentos se repitieron cada 24 horas una vez disuelto hasta alcanzar cinco días (tiempo utilizado para determinar el IC₅₀ sobre la forma epimastigota de *T. cruzi* y promastigota de *L. infantum*). Tal como se observa en la Figura 6.2, aparece una señal que corresponde a una segunda especie, resultante de una descomposición parcial de la original, con un desplazamiento químico de -542,1 ppm. Esta señal aumentó con el tiempo hasta las 24 horas, cuando permaneció relativamente sin cambios (Figura 6.2).

Debido a las similitudes en cuanto a desplazamiento químico, la especie responsable de esta nueva señal podría asignarse al complejo homoléptico [V^{VO}₂(LS4-H)] producto de descomposición parcial del compuesto heteroléptico ⁶ (Figura 6.2). El desplazamiento químico del compuesto homoléptico [V^{VO}(OCH₃)(L0-H)₂] en las mismas condiciones experimentales es de -469 ppm ^{7, 8}, por lo que se descarta la posibilidad de formación de este compuesto homoléptico como producto de descomposición.

Estos resultados están de acuerdo con el tipo de descomposición parcial propuesto y discutido previamente para los compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con ligandos tridentados del tipo LS, y ligandos NN derivados de la 1,10-fenantrolina ^{2, 9, 10}.

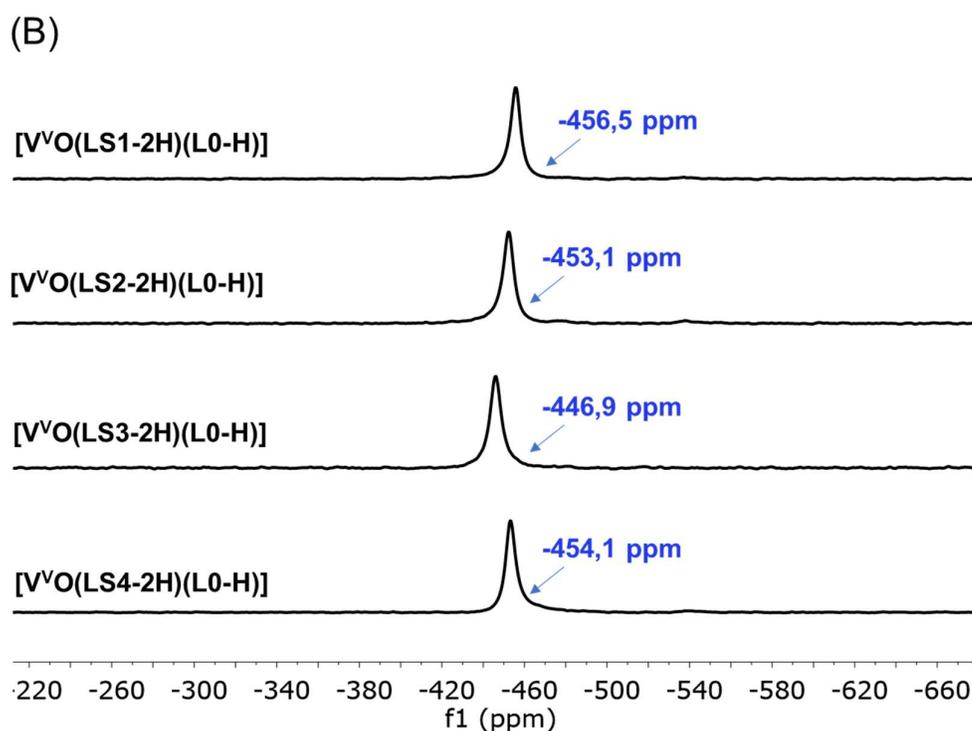
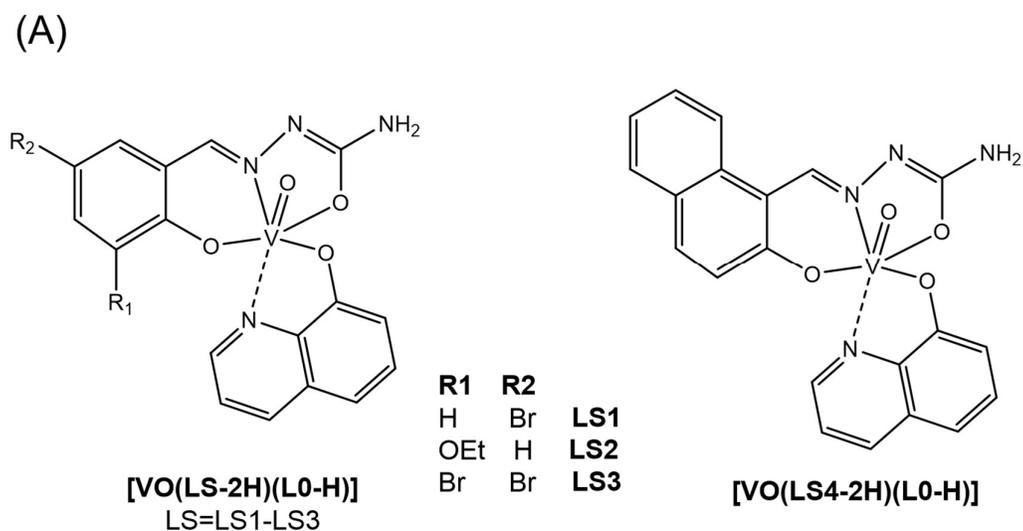


Figura 6.1. (A) Estructura de los compuestos $[V^{VO}(LS-2H)(L0-H)]$ (B) Espectros de ^{51}V RMN de los compuestos $[V^{VO}(LS-2H)(L0-H)]$ en $DMSO-d_6$ (12-35 mM) a tiempo cero. $\delta_v = -456,5$ ppm fue asignado al compuesto $[V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)]$; $\delta_v = -453,1$ ppm fue asignado al compuesto $[V^{VO}(LS2-2H)(L0-H)]$; $\delta_v = -446,9$ ppm fue asignado al compuesto $[V^{VO}(LS3-2H)(L0-H)]$; $\delta_v = -454,1$ ppm fue asignado al compuesto $[V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]$.

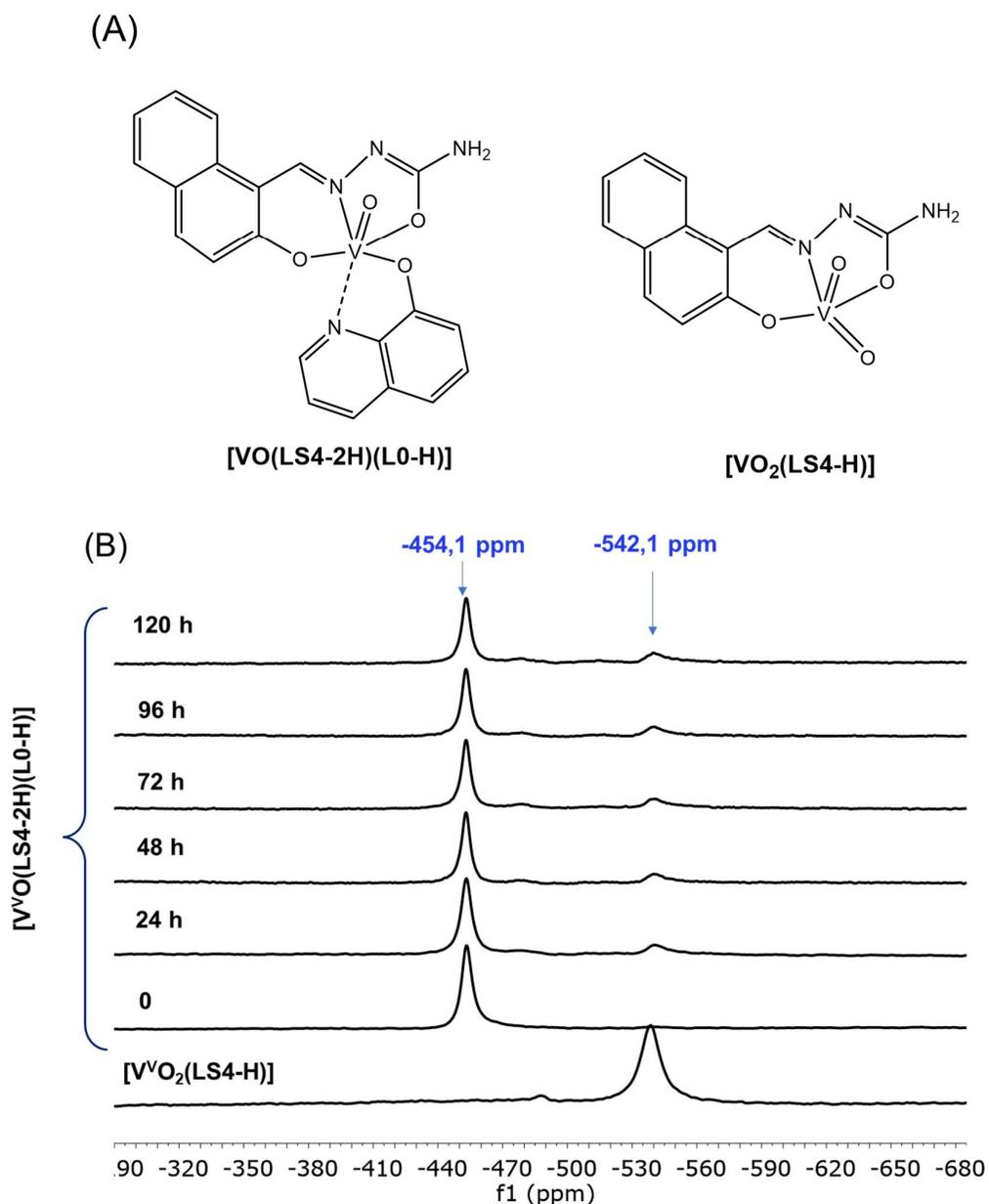


Figura 6.2. (A) Estructura de los compuestos [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] y [V^{VO}O₂(LS4-H)] (B) Espectros de ⁵¹V RMN del compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] a diferentes tiempos a concentraciones de 35 mM en DMSO-*d*₆. Se incluyó el espectro de [V^{VO}O₂(LS4-H)] a efectos comparativos. Δν = -454,1 ppm fue asignado al compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)]; δν = -542,1 ppm fue asignado al compuesto [V^{VO}O₂(LS4-H)].

Un comportamiento similar pero mucho más rápido se observó en los experimentos realizados sobre mezclas de DMSO-*d*₆:D₂O. En la Figura 6.3 se

muestran los espectros de ^{51}V RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$ disuelto en la mezcla $\text{DMSO-}d_6:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) a concentración de 2,0 mM con el correr del tiempo. La intensidad de la señal con desplazamiento químico de -454,1 ppm, asignada para el compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$, disminuye a cero luego de 3 horas de disolución. Al mismo tiempo, se incrementa la señal asignada al producto de descomposición $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS4-H})]$ ($\delta_{\text{v}} = -542,1$ ppm).

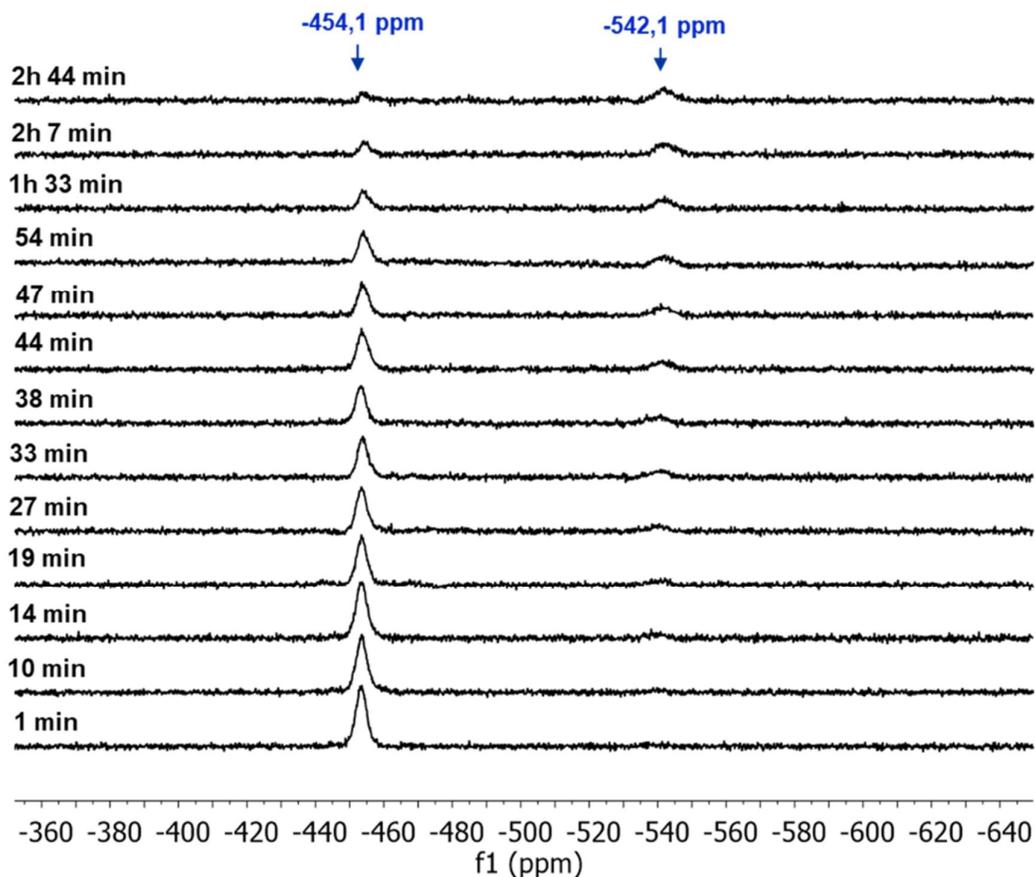


Figura 6.3. Espectros de ^{51}V RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$ en $\text{DMSO-}d_6:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) a diferentes tiempos (concentración 2,0 mM). $\delta_{\text{v}} = -454,1$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$; $\delta_{\text{v}} = -542,1$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{LS4-H})]$.

Cuando se agrega 20 % de D_2O a la disolución, la cantidad del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$ disminuye rápidamente en el espectro de ^{51}V RMN y se observó precipitación en el tubo, evidenciando que el compuesto es poco soluble

en disolución acuosa a concentraciones del orden micromolar. Los resultados muestran que el compuesto heteroléptico estudiado se hidroliza mucho más rápido en la mezcla DMSO-*d*₆:D₂O que en DMSO-*d*₆.

El agregado de medio de cultivo BHI-triptosa, medio utilizado para crecer los parásitos tripanosomátidos en su forma axénica a las soluciones del compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] en DMSO-*d*₆, resulta en espectros RMN mucho más complejos, donde ya no se observan señales únicas ni aisladas. La Figura 6.4 muestra los espectros ⁵¹V RMN de los compuestos [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] y el producto de descomposición [V^{VO}O₂(LS4-H)] en DMSO-*d*₆ en comparación con el espectro resultante del agregado de medio de cultivo (con 4 gotas de D₂O para el ajuste de homogeneidad del campo) a un tiempo de 2 y 24 horas luego de la dilución. Caracterizar las especies presentes a partir del espectro obtenido no es sencillo, dado que se obtienen multipletes que parecen contener diferentes señales a desplazamientos entre -450 y -593 ppm.

La envolvente permite diferenciar tres señales definidas: -505,9, -535,0 y -566,6 ppm. Estos desplazamientos químicos no coinciden con los encontrados para el complejo ni para el producto de hidrólisis propuesto (-454,1 y -542,1, respectivamente). Sin embargo, éstos están inmersos en el multiplete encontrado, por lo que no se descarta la presencia de las entidades en la disolución. Vale la pena considerar la formación de especies oligoméricas de vanadio comúnmente encontradas en disolución acuosa a pH cercano a 7,4, tales como H₂VO₄⁻ (V₁), H₂V₂O₇ (V₂), V₄O₁₂⁴⁻ (V₄) y V₅O₁₅⁵⁻ (V₅) (Figura 1.20 y 1.21, Capítulo 1). Los desplazamientos químicos esperados al pH de trabajo para las especies mencionadas anteriormente también están inmersos en el multiplete del espectro experimental: -560ppm (V₁)^{11, 12}, -570 ppm (V₂)¹³, -575 ppm (V₄)¹⁴, -582 ppm (V₅)¹⁵, por lo que vale la pena considerar la presencia de éstas en la disolución obtenida. No obstante, estas especies simples deberían haberse observado en los ensayos de especiación en soluciones conteniendo D₂O (Figura 6.3). De todas formas, los experimentos realizados no permiten asegurar la presencia ni

ausencia de todas las especies mencionadas. Resulta claro que la especiación en medio de cultivo BHI-triptosa no se resume a la hidrólisis del compuesto, lo que no es sorprendente dada la cantidad de bioligandos que están presentes en el medio de cultivo utilizado que pueden interactuar con el compuesto ^{2, 6, 9, 10, 16, 17}.

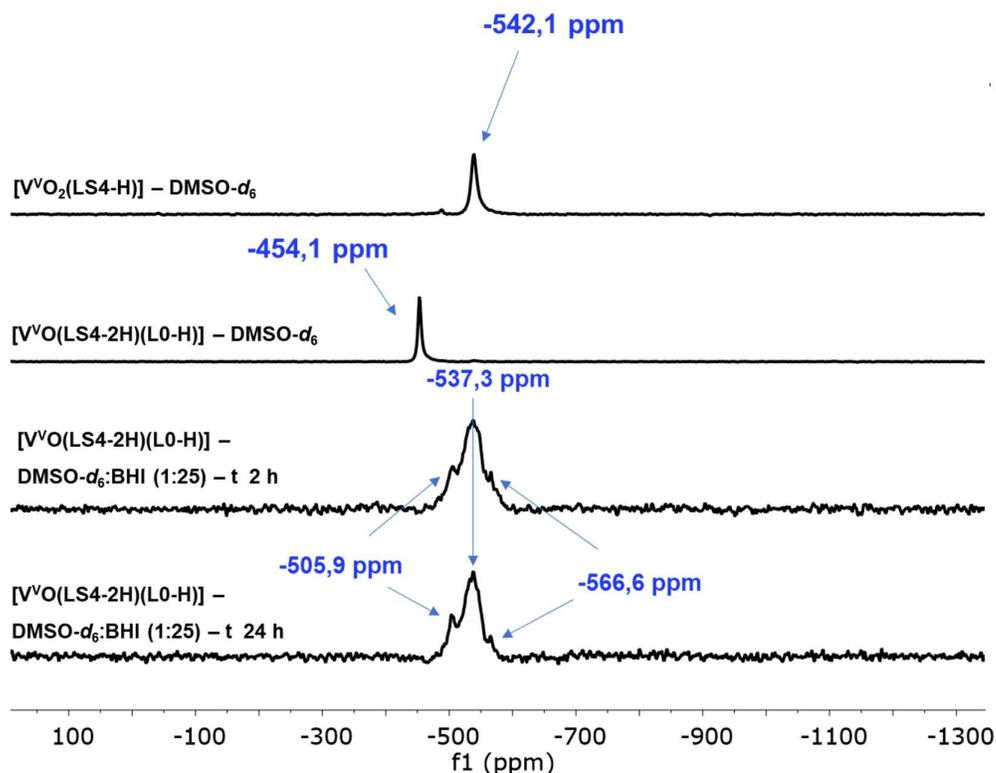


Figura 6.4. Espectros de ^{51}V RMN del compuesto $[\text{VO}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$ y $[\text{VO}(\text{LS4-H})_2]$ en $\text{DMSO-}d_6$ en comparación con el espectro de $[\text{VO}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$ disuelto en DMSO :medio de cultivo BHI (3% de DMSO y 25% de D_2O) a tiempos de 2 y 24 horas (concentración 12,0 mM). $\delta_v = -454,1$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{VO}(\text{LS4-2H})(\text{L0-H})]$; $\delta_v = -542,1$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{VO}(\text{LS4-H})_2]$.

Algunos investigadores han puesto especial atención a la caracterización de la interacción vanadio con proteínas por ^{51}V RMN ¹⁸⁻²³. En el año 1992, el grupo de Pecoraro propuso una escala de desplazamientos químicos de ^{51}V donde describe y agrupa los desplazamientos encontrados según el apantallamiento generado por los tipos de ligandos que constituyen el microambiente del metal

²⁴. En los espectros de ⁵¹V RMN la influencia del apantallamiento es tal que se pueden encontrar desplazamientos químicos entre 500 y -1500 ppm. La escala de Pecoraro consideró desplazamientos asignados para proteínas sustituidas con vanadio tales como RNasa T1 ($\delta_v = -516$ ppm) ²⁵, fosfiglicerato mutasa ($\delta_v = -560$ ppm) ²⁶, transferrina ($\delta_v = -530$ ppm) ¹⁹, entre otras. Los desplazamientos reportados en la literatura para complejos vanadio-proteínas se encuentran en el entorno del multiplete encontrado en el espectro de [V^vO(LS4-2H)(L0-H)], lo que sugiere que la cantidad de señales encontradas puede estar relacionado con la sustitución total o parcial de los ligandos, formando nuevas especies con los bioligandos disponibles.

En suma, los resultados descritos anteriormente sugieren la descomposición parcial de los compuestos [V^vO(LS-2H)(L0-H)] en disolución acuosa, dando lugar al complejo [V^vO(LS-H)₂] y L0 en su forma libre. En medio de cultivo BHI-triptosa, se evidenciaron nuevas especies, posiblemente con la presencia de proteínas en la esfera de coordinación del vanadio, tales como albúmina bovina proveniente del suero fetal bovino utilizado como suplemento del medio de cultivo. Dado que los productos [V^vO₂(LS-H)] se consideraron inactivos en *T. cruzi* y *L. infantum* (Tabla 5.2, capítulo 5) se sugiere que la actividad biológica observada para los compuestos [V^vO(LS-2H)(L0-H)] podría tratarse de una mezcla entre el efecto del compuesto original disuelto, el ligando bioactivo 8-hidroxiquinolina y especies parcialmente hidrolizadas unidas fuertemente a proteínas transportadoras. Los aductos formados por la fuerte unión de compuesto de vanadio con proteínas han sido propuestos previamente como potenciales especies responsables de los mecanismos de acción de compuestos ²⁷⁻
³⁰.

Los experimentos de RMN requieren ser realizados a concentraciones del orden milimolar, mientras que la evaluación biológica se realizó en el rango micromolar. Por lo tanto, resulta relevante comentar que se espera que la cinética

del proceso y el grado de avance sean diferentes en los rangos de concentraciones utilizados en los experimentos biológicos.

6.2.2 Compuestos heterolépticos [V^VO(IN-2H)(L-H)] y [V^VO(BrIS-2H)(L-H)]

La estabilidad química de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina y los ligandos hidrazona fue también analizada por espectroscopía de ¹H y ⁵¹V RMN por 24 horas. Dado que se trata de compuestos muy relacionados desde el punto de vista estructural, se estudió la estabilidad del compuesto [V^VO(IN-2H)(L2-H)] como representante de la serie, el cual fue nombrado previamente como el compuesto más activo de las series estudiadas.

A tiempo cero (entre 30 y 45 minutos luego de disuelto el compuesto), el espectro ¹H RMN del compuesto [V^VO(IN-2H)(L2-H)] en DMSO-*d*₆ muestra cambios mínimos relacionados con la descomposición parcial del compuesto que se incrementan con el tiempo (Figura 6.5). Particularmente, luego de 24 horas el espectro muestra señales claras que corresponden al ligando libre L2, señales muy pequeñas que corresponden al ligando tridentado IN en su forma libre y señales del compuesto homoléptico [V^VO₂(IN-H)], producto de descomposición análogo al propuesto para los compuestos [V^VO(LS-2H)(L0-H)]. A modo de referencia, en la Figura 6.5 se resaltan señales características que evidencian la presencia de la especie en el espectro del complejo [V^VO(LS-2H)(L0-H)]. Particularmente, se marcó la aparición del singulete correspondiente al protón H₁ proveniente de la presencia de [V^VO₂(IN-H)] (asignado en el compuesto homoléptico a un desplazamiento químico de 9,85 ppm y en el compuesto heteroléptico a un desplazamiento de 10,14 ppm); la aparición del doblete de dobletes asignado al protón H₂₀ del ligando L2 (asignado en el ligando en 8,97 ppm mientras que en el compuesto fue asignado a 8,29 ppm); la aparición

concomitante del doblete de dobletes correspondiente a H₁₈ del ligando L2 (asignado en el ligando en 8,50 ppm mientras que en el compuesto fue asignado a 8,57 ppm); y la aparición del singulete H₁₆ de L2 (asignado en el ligando en 8,00 y en el compuesto en 8,35 ppm).

Por su parte, el espectro de ⁵¹V RMN a tiempo 0 mostró una única señal con $\delta_v = -463,0$ ppm, la cual fue asignada al compuesto originalmente disuelto. Luego de 24 horas, apareció una señal que corresponde a una segunda especie con desplazamiento químico de -533,7 ppm que integra un 7 % respecto a la señal original (Figura 6.6). Este resultado en conjunto con lo discutido para el ¹H RMN permite adscribir esta segunda señal al compuesto homoléptico [V^{VO}₂(IN-H)], proponiendo así un comportamiento en cuanto a la descomposición que está de acuerdo con lo discutido en la *sección 6.2.1* para los complejos estructuralmente relacionados [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)] y con lo discutido en la literatura respecto a compuestos estructuralmente similares, donde se propone que el compuesto pierde el ligando bidentado dando lugar al complejo dioxovanadio (V), y en una segunda etapa libera parcialmente el ligando tridentado ^{2, 5, 6, 9, 10, 31}. En paralelo a esta tesis, un comportamiento similar ha sido reportado para otros compuesto metálicos estructuralmente similares ³².

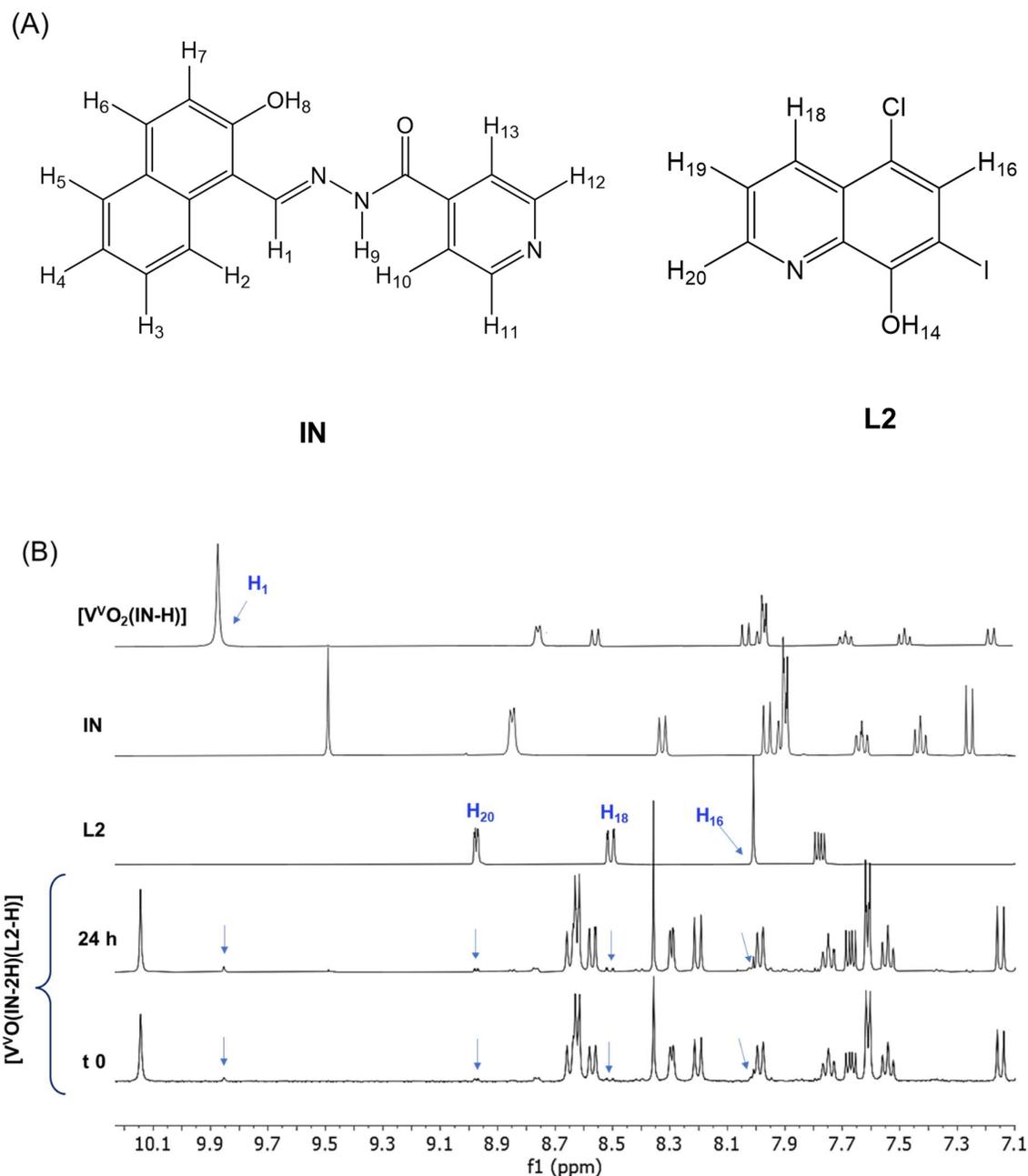


Figura 6.5. (A) Numeración de IN y L2 utilizadas para asignación tanto para los ligandos libres como para los complejos. (B) Espectros ^1H RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L2}-\text{H})]$ a tiempo 0 y 24 horas en comparación con los espectros de $[\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{IN}-\text{H})]$, IN y L2 en $\text{DMSO}-d_6$ (concentración 10,0 mM). Se rotularon señales características del ligando libre y del compuesto homoléptico $[\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{IN}-\text{H})]$ y se señaló la aparición de éstas con una flecha en el espectro del compuesto heteroléptico.

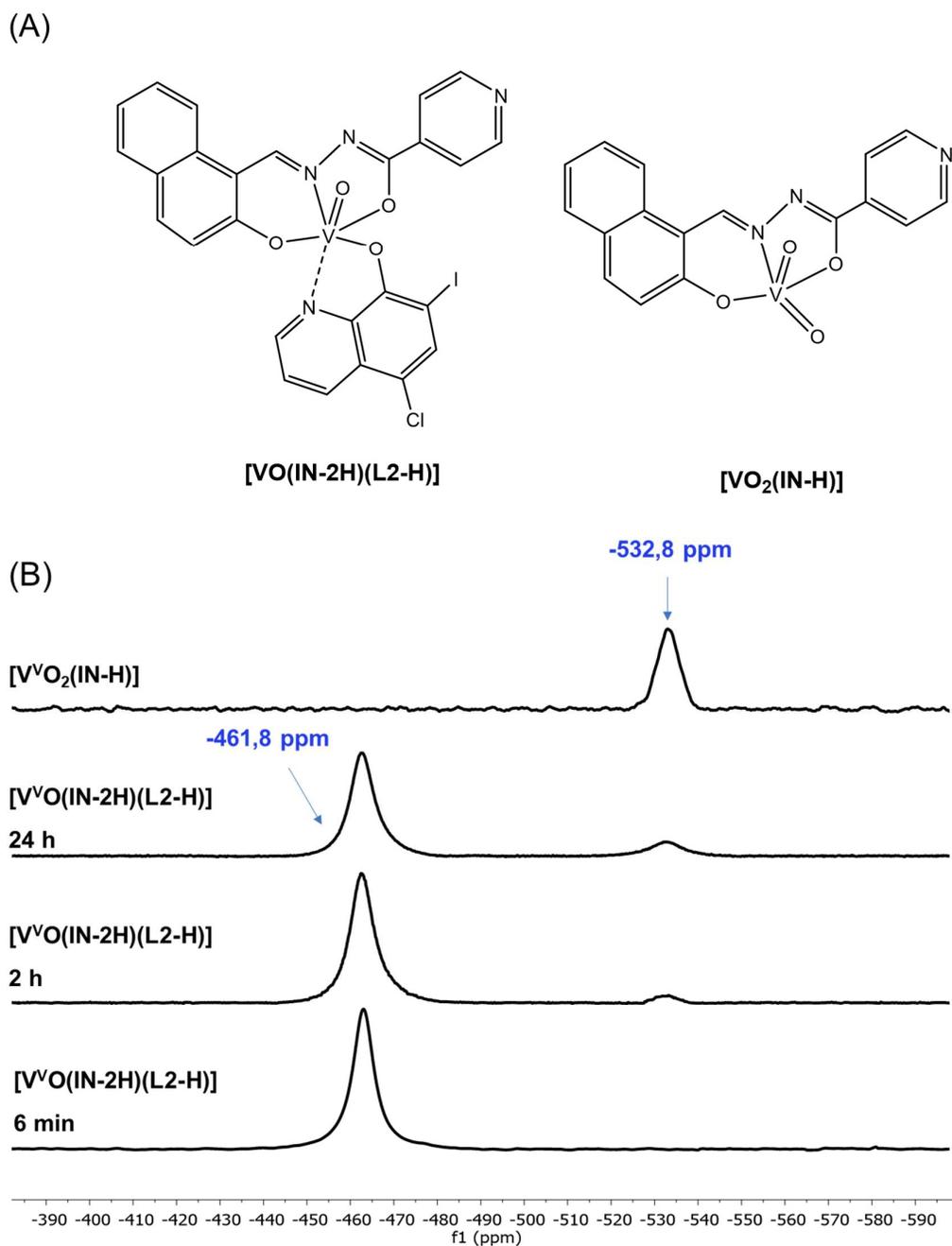


Figura 6.6. (A) Estructura química de los compuestos $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$ (B) Espectros ^{51}V RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$ a tiempo 0, 2 y 24 horas en comparación con el espectro de $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$ en $\text{DMSO-}d_6$ (concentración 10,0 mM). $\delta\nu = -461,8$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$; $\delta\nu = -532,8$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN-H})]$.

En condiciones similares a las estudiadas para el compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], se siguieron los espectros de ¹H y ⁵¹V RMN del compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] en mezclas DMSO-*d*₆:D₂O. Debido a la baja solubilidad del compuesto en disolución acuosa, la relación DMSO-*d*₆:D₂O no pudo ser tan pequeña como se hubiera deseado. La Figura 6.7 muestra los espectros ¹H y ⁵¹V RMN del compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] en DMSO-*d*₆:D₂O (90:10). El agregado de un 10 % de D₂O a la disolución del compuesto en DMSO resulta en la hidrólisis inmediata, dando lugar a una señal con desplazamiento químico en -534,4 ppm (Figura 6.7A). Por su parte, el espectro ¹H RMN mostró señales de ambos complejos y de L2 en su forma libre de forma inmediata al agregado de D₂O. A medida que el tiempo transcurrió, se ven también señales del ligando IN libre. En la Figura 6.7B se resalta el incremento en intensidad de la señal en 9,46 ppm, la cual corresponde al protón H₁ en IN libre (ver numeración en Figura 6.5A).

Desafortunadamente, tras agregar un 20 % de D₂O a la mezcla, el compuesto precipitó en el tubo de RMN, dando lugar a un espectro con señales despreciables (Figura 6.7C).

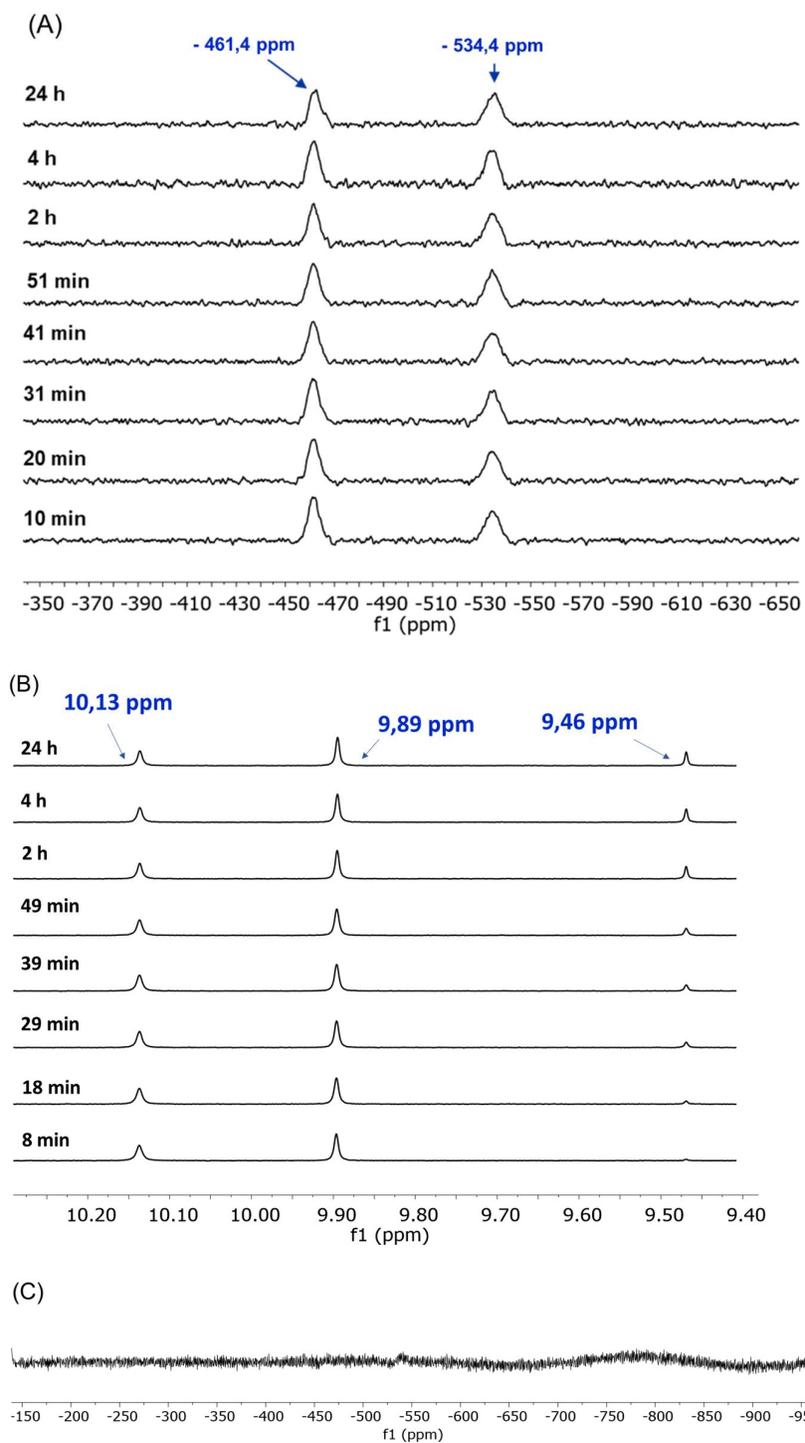


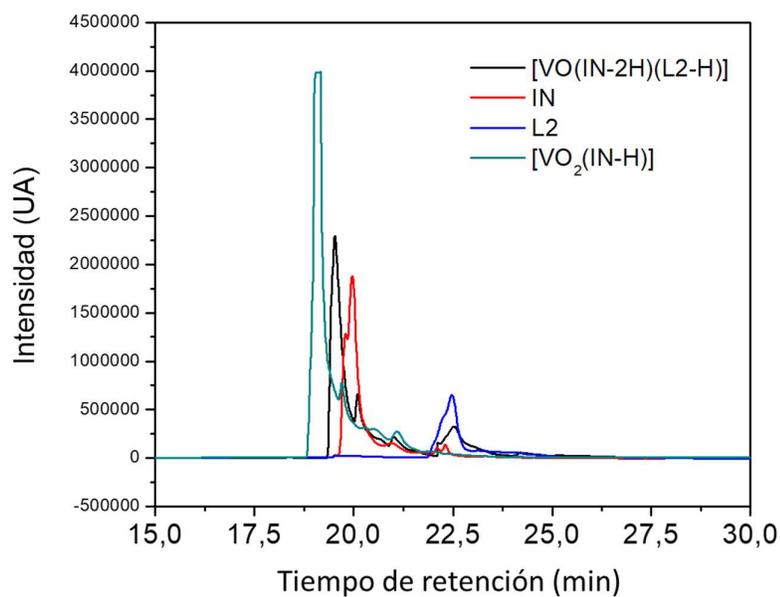
Figura 6.7. Espectros (A) ^{51}V RMN y (B) ^1H RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ en $\text{DMSO}-d_6:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) a diferentes tiempos entre 0 y 24 h (concentración 2,0 mM). $\delta_{\text{v}} = -461,4$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$; $\delta_{\text{v}} = -534,4$ ppm fue asignado al compuesto $[\text{V}^{\text{VO}_2}(\text{IN}-\text{H})]$. (C) ^{51}V RMN del compuesto $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ en $\text{DMSO}-d_6:\text{D}_2\text{O}$ (80:20) (concentración 2,0 mM).

Para el compuesto $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$, la estabilidad en la mezcla DMSO:BHI-Triptosa se analizó por HPLC (Figura 6.8). En la Tabla 6.1 se resumen los tiempos de retención para cada compuesto estudiado y el porcentaje en la composición total de cada condición. En primer lugar, se definieron los tiempos de retención en los que se detectan el complejo de interés y los ligandos libres. El tiempo de retención para el complejo $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$, fue de aproximadamente 19,5 minutos, mientras que para los ligandos IN y L2 en sus formas libres, los tiempos de retención fueron de 20 y 22,5 minutos, respectivamente. En DMSO, el complejo $[V^{VO_2}(\text{IN-H})]$ presentó un tiempo de retención cercano a 18,7 min, menor al del complejo heteroléptico.

Tabla 6.1. Tiempos de retención (min) y % de los picos encontrados en los cromatogramas medidos para soluciones 20 mM en DMSO y medio de cultivo luego de 24 horas de disolución.

	Soluciones en DMSO			
	$t_R = 19,5 \text{ min}$	$t_R = 20 \text{ min}$	$t_R = 22,5 \text{ min}$	$t_R = 24 \text{ min}$
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$	73 %	8 %	12 %	-
L2	-	-	100 %	-
IN	-	100 %	-	-
	Soluciones en BHI (3 % de DMSO)			
	$t_R = 19,5 \text{ min}$	$t_R = 20 \text{ min}$	$t_R = 22,5 \text{ min}$	$t_R = 24 \text{ min}$
$[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$	69 %	hombro	13 %	18 %
L2	-	-	100 %	-
IN	-	100 %	-	-

(A)



(B)

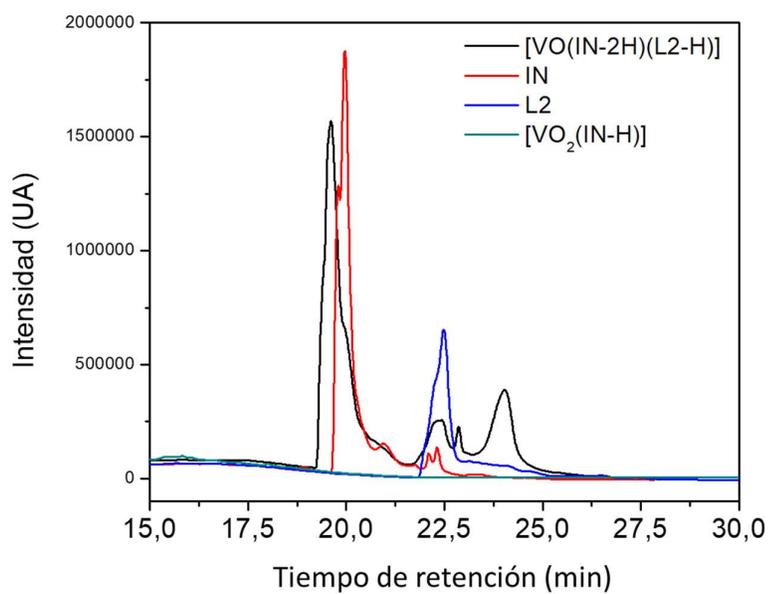


Figura 6.8. Cromatogramas de [VO(IN-2H)(L2-H)], [VO₂(IN-H)] y ligandos libres luego de 24 horas de disolución en (A) DMSO, (B) medio de cultivo BHI-triptosa (3 % DMSO).

Luego de 24 horas de disolución, el pico correspondiente al complejo heteroléptico decrece en un 27 %. De forma simultánea, las señales correspondientes a los ligandos libres IN y L2 aparecen como picos en el cromatograma del compuesto. Sin embargo, no se observa la aparición del compuesto $[V^VO_2(IN-H)]$. La ausencia de este pico no permite descartarlo como producto de degradación, dado que es altamente insoluble y la precipitación no permitiría verlo en el HPLC (Figura 6.8A).

En medio BHI el comportamiento es similar, sin embargo, se observa la precipitación total en la muestra del compuesto $[V^VO(IN-H)_2]$. En el medio de cultivo, la señal del compuesto heteroléptico (incluyendo un hombro que podría deberse a la aparición de IN libre), corresponde casi al 70 % de la composición. Además de la aparición de L2, se detectó una nueva señal alrededor de 24 minutos que no había sido asignada para ninguno de los productos de descomposición (Figura 6.8B).

Resulta claro que la disolución en medio de cultivo BHI-triptosa no se resume a la hidrólisis del compuesto y liberación de ligandos libres, sino que otras especies podrían estar presentes, tal como se discutió previamente para el compuesto $[V^VO(LS-2H)(L0-H)]$.

Dado que el producto $[V^VO_2(IN-H)]$ se consideró inactivo en *T. cruzi* y *L. infantum* (Tabla 5.2, Capítulo 5) se sugiere que la actividad biológica observada para los compuestos $[V^VO(IN-2H)(L-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L-H)]$, en consonancia con lo discutido para la otra serie de compuestos heterolépticos, podría deberse a una mezcla entre el efecto del compuesto original disuelto, el ligando bioactivo y especies parcialmente hidrolizadas unidas fuertemente a proteínas transportadoras²⁷⁻³⁰. De todas formas, los experimentos realizados no permiten asegurar la presencia o ausencia de todas las especies posibles.

Debido a que la caracterización espectroscópica de la estabilidad de estos compuestos requiere concentraciones milimolares, y teniendo en cuenta la baja solubilidad de los compuestos estudiados, la relación DMSO-*d*₆:D₂O en los

experimentos espectroscópicos es mucho mayor que la utilizada en los ensayos biológicos en concentraciones del rango micromolar. Los problemas de solubilidad en disolución acuosa mencionados para estos compuestos coinciden con otros resultados reportados recientemente para compuestos similares de oxovanadio (V) con derivados de 8-hidroxiquinolinas e hidrazonas tridentadas, donde se determinó una solubilidad en disolución acuosa muy limitada en concentraciones milimolares, y los compuestos se agregan formando un precipitado³³. Vale la pena mencionar entonces, que una vez que los compuestos hidrófobos se agregan en un medio biológico acuoso, pueden absorberse por las células con mayor rapidez que las moléculas menos hidrófobas³³⁻³⁵.

De todos modos, como se ha comentado previamente, si bien se espera que la hidrólisis ocurra más rápido en soluciones más diluidas, la presencia de bioligandos juega un rol fundamental en la especiación química de los compuestos cuando se disuelven en medio de cultivo.

Existen diversos ejemplos en la literatura de compuestos metálicos que presentan una baja estabilidad en disolución acuosa, a pH fisiológico, pero sin embargo presentan en medio biológico actividad incrementada en comparación con el ligando libre y la sal de vanadio. Por ejemplo, el complejo *cis*-dipicolinato dioxovanadio (V), el cual presenta alta estabilidad a pH ácido y se encuentra completamente hidrolizado en disolución acuosa a pH neutro, ha demostrado propiedades insulino-miméticas más potentes que la sal de vanadato y el dipicolinato³⁶⁻³⁸. Se ha informado que este compuesto, a pesar de su carga, es muy estable en modelos de membrana celular, independientemente del pH³⁶⁻³⁸.

Otro ejemplo de lo mencionado lo constituye el decavanadato (V₁₀), el cual ha demostrado ser un potente inhibidor del crecimiento en *M. smeg.* y *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) independientemente del grado de hidrólisis^{12, 15}. Por otra parte, se han propuesto situaciones en las que el compuesto incrementa su estabilidad una vez ingresa a la célula³⁹. Entre ellas, se reportó una serie de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con bases de Schiff

tridentadas y ligandos bidentados catecolatos, la cual aumentó de forma drástica la estabilidad cuando se cambió de medio PBS con 1 % de DMSO al caldo de cultivo 7H9, utilizado para cultivar micobacterias ²³. En la disolución inicial, se observó la hidrólisis rápida mientras que en el caldo de cultivo el compuesto permanece intacto por varias horas, incluso utilizando concentraciones mayores ⁴⁰.

6.2.3 Compuestos homolépticos [V^{IV}O(L-H)₂] y [V^{VO}(OCH₃)(L-H)₂]

El comportamiento de algunos de los complejos de las series [V^{IV}O(L-H)₂] y [V^{VO}(OCH₃)(L-H)₂] ha sido estudiado parcialmente por Baran ⁴¹ y Micera ⁴² en disolución acuosa y Costa Pessoa ⁷ en disolventes orgánicos.

Para evaluar la estabilidad de la familia de compuestos homolépticos [V^{IV}O(L-H)₂] no es posible utilizar la técnica convencional de ¹H RMN. Si bien existen numerosos artículos e investigaciones que se basan en la resonancia magnética de compuestos paramagnéticos, es sabido que la vacante electrónica en el orbital d de un metal liviano, como lo es el vanadio, modifica los tiempos de relajación dando lugar a espectros con señales muy anchas y en desplazamientos químicos no esperables ⁴³.

La estabilidad de los complejos [V^{IV}O(L-H)₂] (L = L1-L5) en disolución se analizó utilizando la técnica de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR), que da información acerca del entorno de coordinación del vanadio (IV) en conjunto con espectroscopía de resonancia magnética nuclear de V-51, la cual da información acerca de las especies de vanadio (V) formadas por oxidación con el paso del tiempo ¹⁷.

En primer lugar, los complejos se disolvieron en DMF previamente desgasificado con N₂ por 10 minutos, a temperatura ambiente en concentraciones de 3 mM aproximadamente y se le agregó 5 % de D₂O para ajustar la

homogeneidad del campo magnético en el RMN. Los espectros de EPR y ^{51}V RMN iniciales fueron colectados inmediatamente luego de la disolución. Las muestras se dejaron expuestas al aire por 21 horas y los espectros se volvieron a medir, detectando algunas especies diamagnéticas de vanadio (V).

A tiempo cero (cerca de 30 minutos luego de disueltos los compuestos), los compuestos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$ muestran una señal de intensidad muy baja alrededor de -476 ppm (Figura 6.9A-C). Esta señal puede ser asignada a una especie oxidada del compuesto con ambos ligandos en la esfera de coordinación, $\{\text{V}^{\text{VO}}(\text{L-H})_2\}$, por similitud con el desplazamiento asignado previamente para la especie $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L-H})_2]$ ⁷. La Tabla 6.2 resume las señales encontradas en los espectros de ^{51}V RMN a tiempo cero y luego de 21 horas. El complejo $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L4-H})_2]$ pareció ser el más resistente a la oxidación, dado que luego de 21 horas el espectro EPR no presentó cambios y no se detectaron señales en el ^{51}V RMN. En cuanto a los complejos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$, $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L5-H})_2]$ (Figura 6.9), las señales que aparecen en el entorno de -520 ± 2 ppm pueden ser asignadas tentativamente a productos del tipo de $\{\text{V}^{\text{VO}}_2(\text{L-H})\}$ y las señales cercanas a -490 ppm a productos de solvólisis. Para el compuesto $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L5-H})_2]$, las señales difieren un poco en desplazamiento químico, probablemente por efectos electrónicos de los sustituyentes, sin embargo, se pueden asignar tentativamente los mismos productos de descomposición¹⁷.

Tabla 6.2. Desplazamientos químicos (δ_v / ppm) y porcentaje de las señales encontradas en el ^{51}V RMN para soluciones 3 mM en DMF inmediatamente y luego de 21 h de disuelto.

Compuesto	t = 0 h		t = 21 h	
	δ_v /ppm	Porcentaje (%)	δ_v /ppm	Porcentaje (%)
$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$	-478,2	100	-490,0	50
			-518,4	50
$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$	-476,2	100	-485,0	40
			-518,3	60
$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$	-476,4	100	-520,0	100
$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L4-H})_2]$	-	-	-	-
$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L5-H})_2]$	-	-	-469,5	80
			-496,2	20

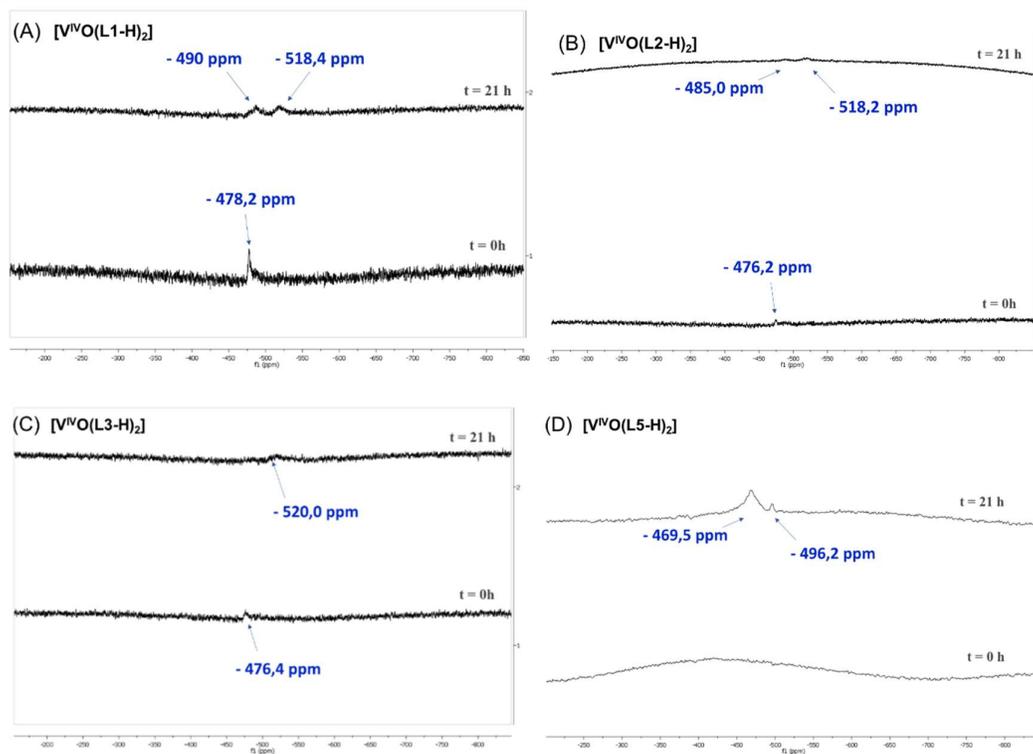


Figura 6.9. Espectros de ^{51}V RMN en DMF inmediatamente y luego de 21 horas de disolución para los complejos (A) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$, (B) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$, (C) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$ y (D) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L5-H})_2]$ (concentración 3 mM).

La estabilidad del complejo $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ se estudió por EPR, ^{51}V RMN y por espectroscopía UV-Vis en DMSO y en mezclas DMSO:H₂O.

Los espectros EPR fueron medidos a una concentración de 5,0 mM en DMSO y en DMSO:H₂O (80:20) (Figura 6.10A-B). Los parámetros calculados a partir del espectro en DMSO (Figura 6.10A): $g(1):1,955$, $g(2): 1,974$, $A(1) = 382$ Hz, $A(2)=94$ Hz; se observan en los espectros obtenidos en DMSO:H₂O (80:20) (Figura 6.10B). Al agregar H₂O a la mezcla un poco de compuesto se hidroliza, pero la mayor parte del complejo parece permanecer intacto. De hecho, las señales obtenidas luego de 1, 4 y 24 horas de disolución coinciden en intensidad con las obtenidas inmediatamente luego del agregado del medio acuoso ⁵.

Al igual que lo discutido para el resto de los compuestos de la serie, se midieron los espectros de ^{51}V RMN de forma concomitante con el objetivo de detectar especies diamagnéticas de vanadio (V). Los espectros obtenidos tanto a tiempo 0 como a 24 horas indican que no existen especies de vanadio (V) presentes (Figura 6.10C) ⁵.

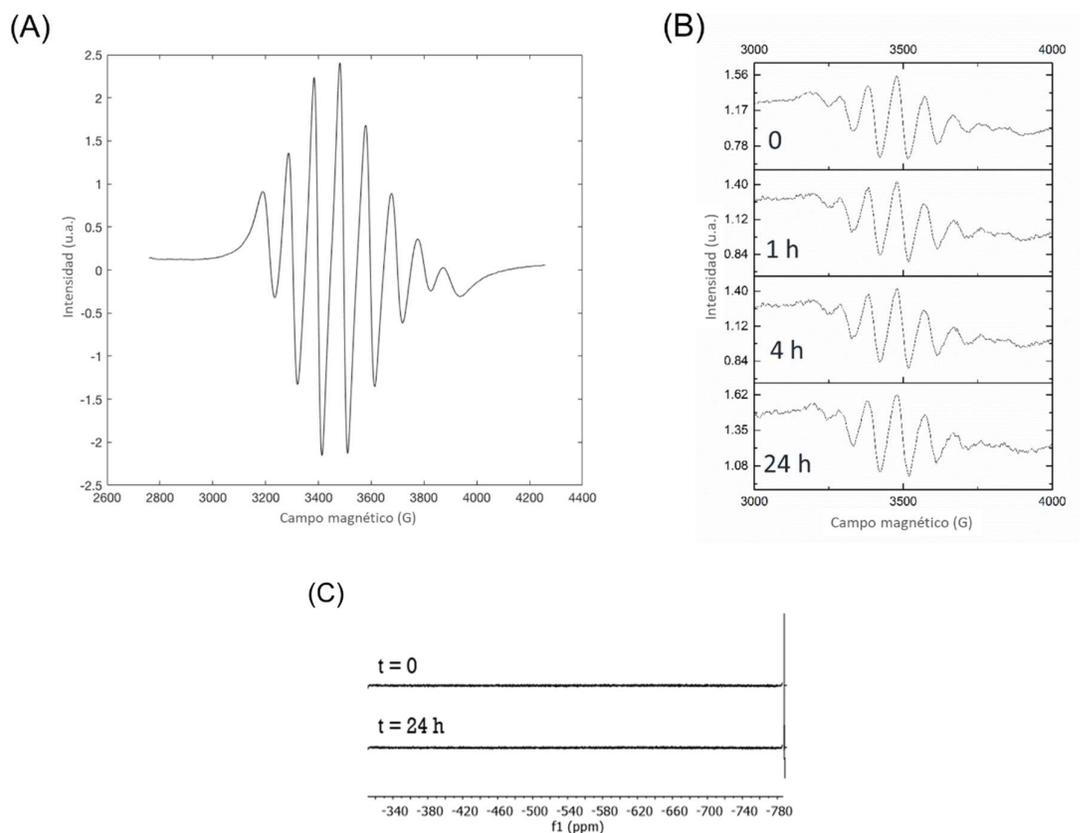


Figura 6.10. Espectros EPR de $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ a concentración de 5,0 mM, medido (A) a tiempo 0 en DMSO y (B) en DMSO:H₂O (80:20) a tiempos 0, 1, 4 y 24 horas. (C) Espectros ^{51}V RMN de $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ a concentración de 5,0 mM, medido en DMSO:H₂O (80:20).

Por otra parte, se midieron espectros electrónicos UV-Vis del complejo $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ en DMSO, DMSO:H₂O (90:10) y DMSO:H₂O (80:20) a distintos tiempos a una concentración de 0,2 mM. En la región UV, el ligando libre L0 presenta una máximo en 370 nm, mientras que el complejo muestra dos máximos, uno a longitud de onda mayor (400 nm) y otra longitud de onda menor (320 nm). La banda de longitud de onda cercana a 400 nm observada en el complejo se asigna a transferencia de carga ⁵. Además, el complejo de oxovanadio (IV) presenta una banda de baja intensidad cercana a 600 nm, la cual se asocia con transiciones d-d. El ligando libre por su parte no presenta bandas en la región del visible.

En DMSO, el compuesto homoléptico $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ muestra cierta descomposición con el paso del tiempo a las concentraciones de trabajo. Esto se evidencia por la disminución de la intensidad de la banda ancha alrededor de 600 nm, la cual podría asociarse con a la pérdida total o parcial del único electrón del vanadio (IV), dando lugar a un producto oxidado. Además, las señales en 400 y 320 nm disminuyen en intensidad, pero, sin embargo, no existen cambios en los máximos que pudieran sugerir la liberación de los ligandos bidentados (Figura 6.11). El agregado de 10 y 20 % de H_2O a la mezcla no incrementa el grado de descomposición observado, sin embargo este parece ser más rápido que en DMSO puro (Figura 6.12). Debido a que la banda en 600 nm es una banda prohibida d-d y su intensidad es muy baja, no es posible asegurar si se da efectivamente oxidación o se rearrregla el compuesto dando lugar a otra especie de vanadio (IV) producto de solvólisis, que contiene los ligandos L0 coordinados.

Los datos en su conjunto sugieren que, en las condiciones experimentales, luego de cierto tiempo, el compuesto $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ se podría oxidar parcialmente al complejo análogo de vanadio (V) manteniendo la 8-hidroxiquinolina en la esfera de coordinación. Se espera que a menor concentración la descomposición de los compuestos de vanadio sea mayor ^{1, 44, 45}, por lo que las diferencias de concentraciones entre los ensayos realizados (5 mM para EPR y 0,2 mM para UV-Vis) podrían explicar las diferencias observadas en cuanto a la posible oxidación.

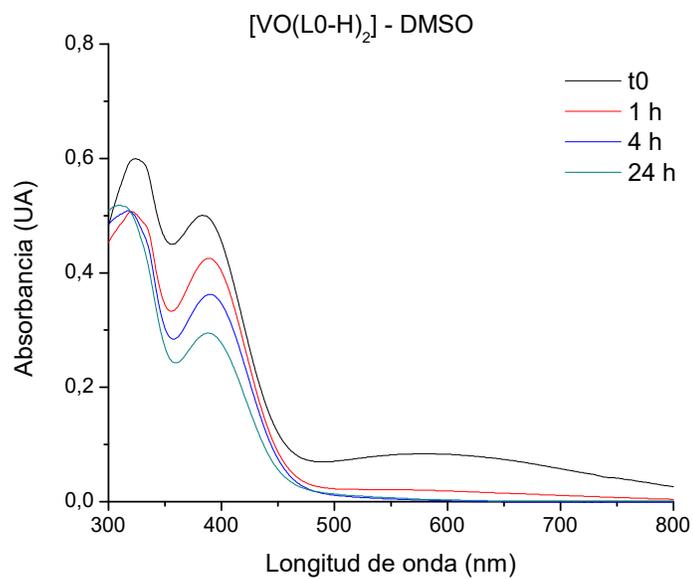


Figura 6.11. Espectros UV-Vis de $[V^{IV}O(L0-H)_2]$ a concentración de 0,2 mM, medido a diferentes tiempos luego de la disolución en DMSO. Se utilizó una celda de camino óptico de 1 cm.

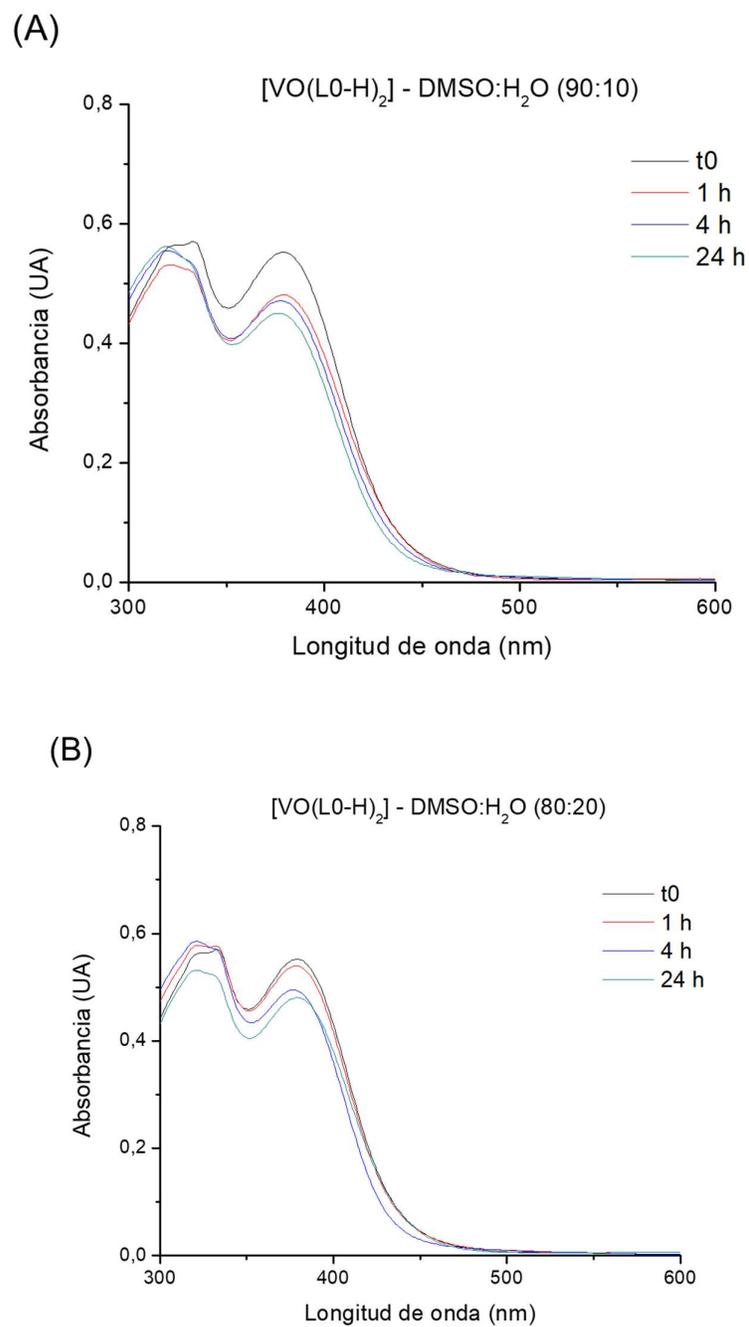


Figura 6.12. Espectros UV-Vis de [V^{IV}O(L0-H)₂] a concentración de 0,2 mM, medido a diferentes tiempos luego de la disolución en (A) DMSO:H₂O (90:10) y (B) DMSO:H₂O (80:20). Se utilizó una celda de camino óptico de 1 cm.

6.2.4 Compuestos heterolépticos [V^{IV}O(L-H)(mpo)]

Al igual que los compuestos homolépticos discutidos en la *sección 6.2.3*, los compuestos heterolépticos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] (L = L0-L4), fueron estudiados en disolución de DMSO (5 % D₂O) por EPR y ⁵¹V RMN.

Los compuestos se disolvieron en DMSO previamente desgasificado con N₂ por 10 minutos en concentraciones cercanas a 3 mM y se le agregó 5 % de D₂O para ajustar la homogeneidad del campo magnético. Los espectros se midieron a tiempo 0 y luego de 24 horas de la disolución. Como ya se había comentado previamente en el Capítulo 4, los espectros EPR medidos inmediatamente luego de la disolución disminuyen en intensidad en relación con aquellos medidos al estado sólido, lo que indica la rápida oxidación de las especies al disolverse. La oxidación queda en evidencia en los espectros ⁵¹V RMN, donde aparecen señales en el entorno de - 450 ppm (Figura 6.13). Estas señales pueden asignarse a una especie oxidada del compuesto con ambos ligandos coordinados, {V^{VO}(L-H)(mpo)}, dado que se espera que la especie homoléptica {V^{VO}(L-H)₂} tenga un desplazamiento cercano a -470 ppm ⁷. Para el caso de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)], luego de 24 horas aparece una segunda señal centrada en -482 ppm, comportamiento similar al encontrado en algunos compuestos homolépticos. La señal puede asignarse a productos de solvólisis donde el disolvente coordina en la sexta posición disponible del centro metálico, o sustituye los ligandos parcialmente.

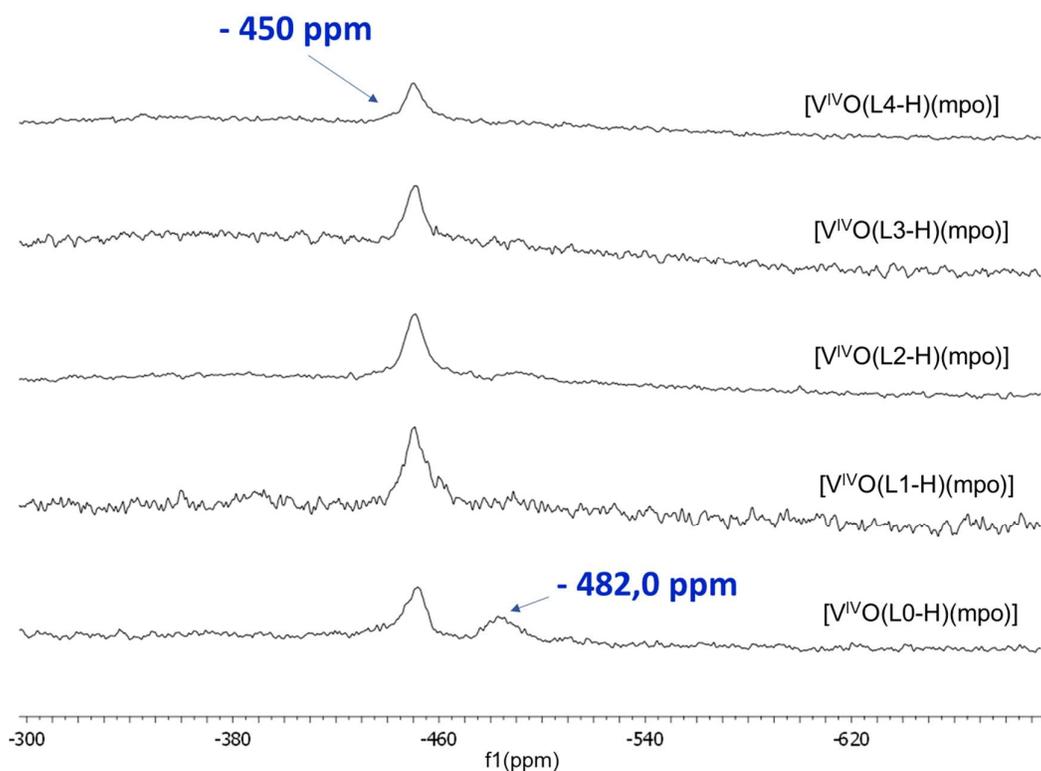


Figura 6.13. Espectros ^{51}V RMN en DMSO luego de 24 horas de disolución para los complejos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})(\text{mpo})]$, $\text{L} = \text{L0-L4}$ (concentración 3 mM).

6.3 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

Muchos estudios coinciden en que el transporte de los compuestos de vanadio en la sangre se da predominantemente por las proteínas séricas, en particular la transferrina sérica humana (HTF, de sus siglas en inglés *human transferrin*)^{1, 45-52}. La albúmina sérica humana (HSA, de sus siglas en inglés *human serum albumin*) es la proteína más abundante en el suero sanguíneo, con una concentración aproximada de 630 μM y constituye uno de los transportadores sanguíneos más relevantes. Por su parte, la HTF tiene una concentración sanguínea menor cercana a 35 μM ^{51, 53}[⁵⁴]. Parece entonces de gran importancia la comprensión de las interacciones que pueden establecerse entre los complejos

de vanadio y estas proteínas plasmáticas, para poder explicar aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos.

Durante las últimas décadas, diversos estudios de interacción con proteínas han sido llevados a cabo en paralelo con el estudio de la citotoxicidad de compuestos de vanadio ^{2, 9, 27-30, 44, 50, 55-61}. La interacción del vanadio con las proteínas séricas tiene gran relevancia en el transporte, ingreso celular y efectos biológicos ^{2, 23, 50, 52, 62, 63}. Si bien muchos investigadores han intentado caracterizar el modo de interacción de los complejos de vanadio con proteínas, muchos aspectos todavía no son bien comprendidos ²⁹. En este marco, se han utilizado diversas técnicas tales como difracción de rayos X, EXAFS, espectroscopía UV-Vis, EPR, RMN, dicroísmo circular, voltametría, DFT, entre otras ^{2, 9, 29, 30, 55, 64}.

HTF es una glicoproteína de cadena sencilla con 679 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 79 kDa ^{65, 66}. Cada lóbulo contiene un sitio de unión hidrofílico específico para el hierro y los aminoácidos que se unen al ion Fe(III) son idénticos para ambos lóbulos. Estos residuos aminoacídicos pueden actuar como ligandos para el ion $V^{IV}O^{2+}$ ^{51, 67}.

La albúmina sérica bovina (BSA, de sus siglas en inglés *bovine serum albumin*) se ha tomado como un modelo fiable para las proteínas globulares solubles como la HSA. De hecho, las estructuras primarias de BSA y HSA son bastante similares, manteniéndose el 75 % de la secuencia de aminoácidos. El contenido de histidina en ambas proteínas (16 residuos de His) es el mismo. Sin embargo, HSA tiene un mayor contenido de valina y un único residuo de triptófano (Trp214), mientras que BSA contiene un segundo residuo (Trp63). La BSA es también uno de los componentes principales del suero fetal bovino, utilizado como suplemento del medio de cultivo en la mayoría de los ensayos de toxicidad *in vitro* ².

Dado que tanto la albúmina como la transferrina desempeñan funciones importantes en la distribución y el transporte de diferentes compuestos

metálicos, deben tenerse en cuenta al evaluar las interacciones y/o la especiación de cualquier metalofármaco en la sangre humana.

Es bien sabido que el ion $V^{IV}O^{2+}$ interactúa con los átomos donores de los residuos del sitio de unión a hierro de apo-HTF, formando complejos de relación molar $V^{IV}O^{2+}$:apo-HTF 1:1 o 2:1. Los espectros de dicroísmo circular (CD) y las constantes de unión de los complejos $(V^{IV}O^{2+})_n$ apo-HTF y $(V^{IV}O^{2+})_2$ apo-HTF han sido reportadas previamente. El perfil de bandas de CD en el rango visible permite diferenciar la estequiometría de los complejos $(V^{IV}O^{2+})_n$ apo-HTF ^{1, 45-52}.

En el marco de la pasantía en el laboratorio del Prof. Joao Costa Pessoa, en la Universidade de Lisboa, se evaluó la interacción con transferrina y seroalbúmina bovina de los compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$, sus análogos $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$ y los ligandos libre L. Los resultados fueron publicados en conjunto con gran parte de los resultados obtenidos para esta serie ¹⁷.

6.3.1 Interacción con transferrina por dicroísmo circular

Se evaluó la interacción de los compuestos homolépticos de vanadio (IV), $[V^{IV}O(L-H)_2]$, sus análogos $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$ y los derivados de 8-hidroxiquinolina libre correspondientes (ligandos L) con apo-HTF por espectroscopía de dicroísmo circular utilizando una concentración fija de la proteína con agregados incrementales de compuesto o ligando en su forma libre. Dada la baja solubilidad de los complejos en el buffer de trabajo, éstos se disolvieron inicialmente en DMSO y luego fueron diluidos de forma apropiada con el buffer de trabajo hasta las concentraciones experimentales.

En la mayoría de los casos, el efecto de los ligandos libres en el espectro de la apo-HTF se da sobre la región de 240-400 nm (Figura 6.14). Por el contrario, los complejos generan cambios mayores en toda la región del espectro de forma

dependiente de la relación molar. La Figura 6.15 ejemplifica los efectos sobre el espectro del ligando L4 y de los complejos $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L4-H)_2]$

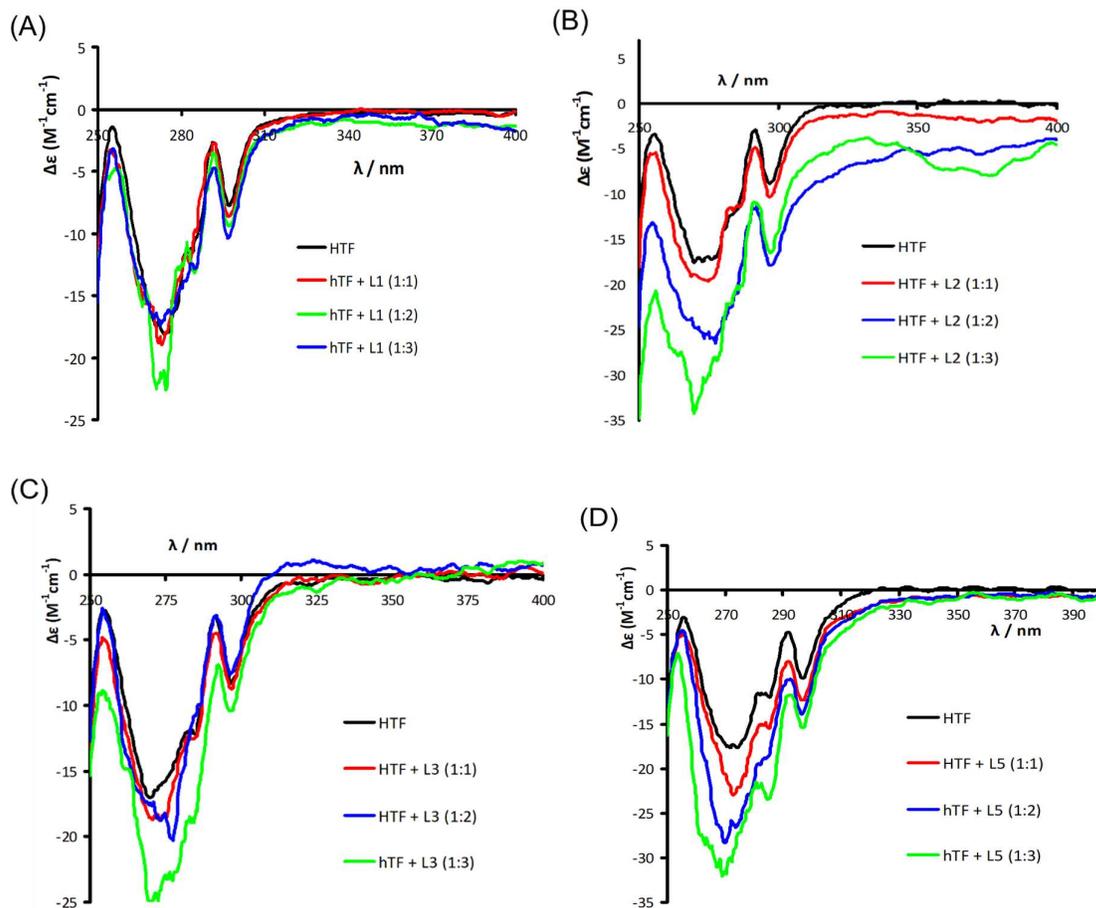


Figura 6.14. Espectros de dicroísmo circular en la región de 250-400 nm de soluciones conteniendo apoHTF ($\sim 150 \mu M$) y (A) L1 libre, (B) L2 libre, (C) L3 libre y (D) L5 libre en las relaciones molares $V^{IV}O$:apoHTF indicadas. Para medir los espectros se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico de 1,0 y 0,5 cm.

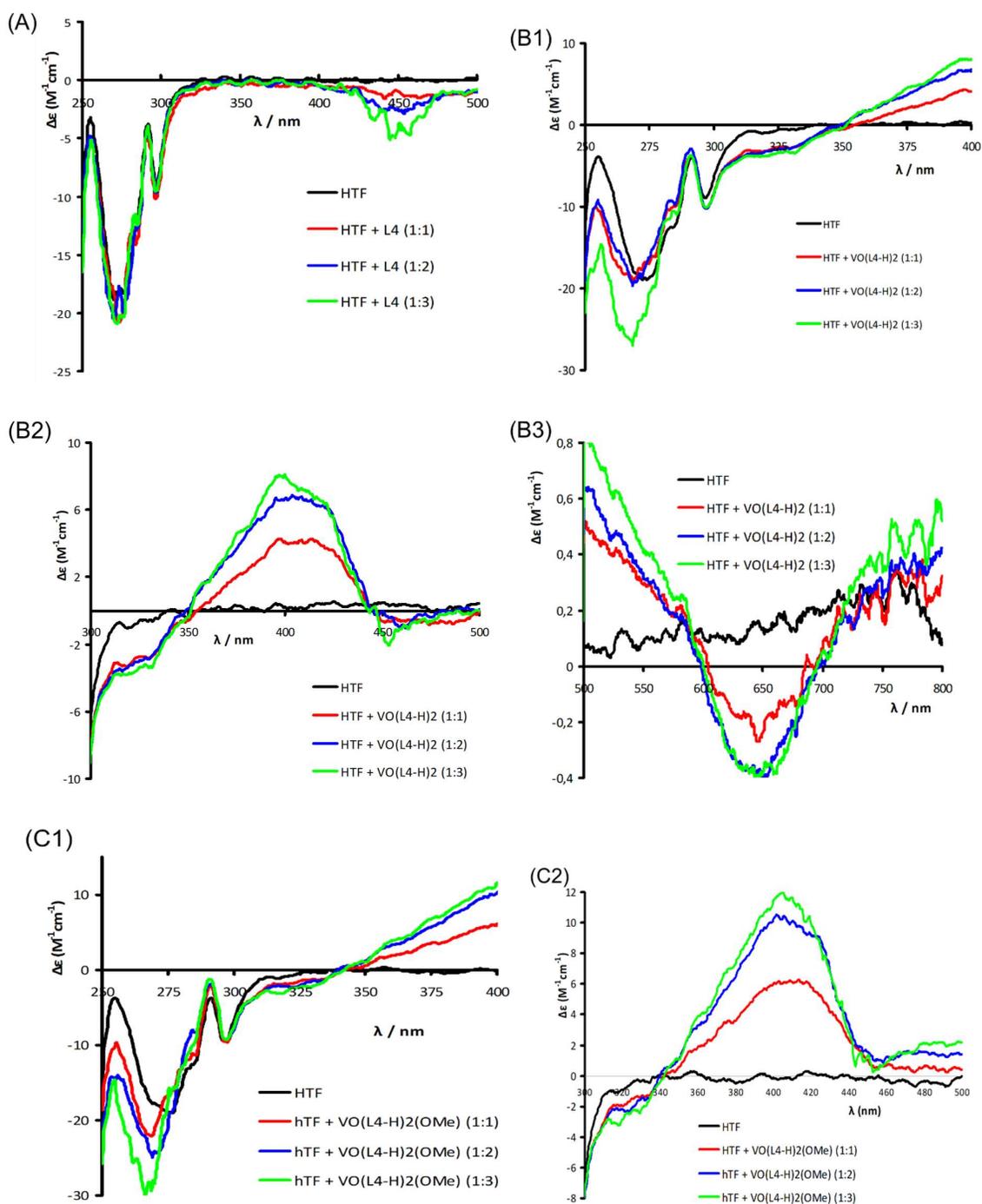


Figura 6.15. Espectros de dicroísmo circular de soluciones conteniendo apoHTF ($\sim 150 \mu\text{M}$) y (A) L4 libre, (B) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L4-H})_2]$ y (C) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OCH}_3)(\text{L4-H})_2]$ en las relaciones molares $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}:\text{apoHTF}$ indicadas. En B1, el espectro verde en el rango 250-280 nm fue medido en condiciones de baja relación señal/ruido, y el $|\Delta\epsilon|$ no corresponde al valor real. Para medir los espectros se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico de 1,0 y 0,5 cm.

Para el caso particular de los compuestos conteniendo L4, los cambios en el espectro de CD tras la adición del ligando libre L4 son relativamente pequeños en la región de 250-400 nm. Una banda de dicroísmo circular inducido aparece en el espectro a longitudes de onda en las que absorbe el compuesto, indicando que el ligando L4 se une a apo-HTF cerca de los grupos quirales, lo que se traduce en las transiciones electrónicas observadas cerca de 450 nm (Figura 6.15A). Los espectros de la apo-HTF con agregados incrementales del complejo $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ (Figura 6.15B) muestran cambios globales en $|\Delta\epsilon|$ con la aparición de bandas en diferentes regiones del espectro, indicando la fuerte e inmediata interacción entre la transferrina y el compuesto. Las diferencias entre los espectros de relación molar 1:2 en comparación con los espectros de relación molar 1:3 son mínimas, lo cual sugiere que la apo-HTF podría estar uniéndose a dos moléculas de complejo por biomolécula. Para el compuesto $[V^{IV}O(OCH_3)(L4-H)_2]$ las observaciones globales son similares (Figura 6.15C).

El patrón encontrado en los espectros CD de la apo-HTF tras el agregado de los compuestos $[V^{IV}O(L1-H)_2]$, $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L5-H)_2]$, en el rango del visible (500- 800 nm), difiere del encontrado para la interacción de apo-HTF con la sal $V^{IV}OSO_4$ ^{51, 52, 68}, lo cual se traduce en que se están formando nuevas especies del tipo $V^{IV}O-(L-H)-HTF$ (Figura 6.16). Por el contrario, para los compuestos $[V^{IV}O(L2-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L3-H)_2]$, los espectros de CD en el rango visible no presentaron señales, lo que indica la oxidación del centro $V^{IV}O$ y, por lo tanto, la ausencia de las especies postuladas $(V^{IV}O)_nHTF$ (Figura 6.16).

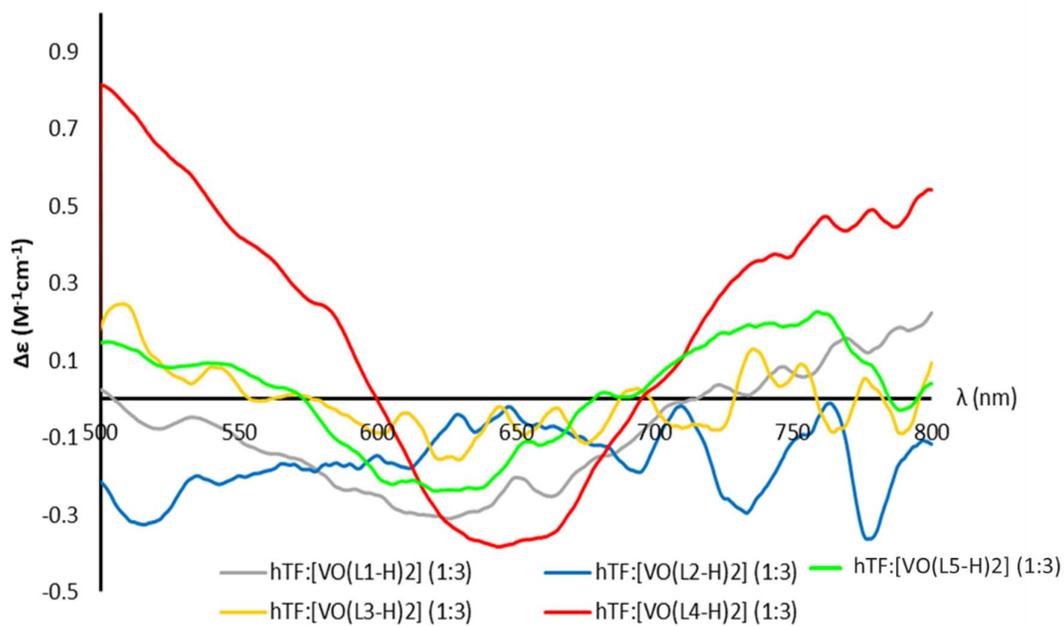


Figura 6.16. Espectros de dicroísmo circular en el rango visible (500-800 nm) de soluciones conteniendo apoHTF (~150 μM) y los compuestos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})_2]$ (L=L1-L5) en relación molar 1:3. Para medir los espectros se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico de 1,0 y 0,5 cm.

En el rango de 350-500 nm, los valores de $\Delta\epsilon$ medidos están asociados principalmente a transferencias de carga. Particularmente, en el espectro de los complejos conteniendo el ligando L4, 5-nitro-8 hidroxiquinolina, aparece una banda positiva intensa que no está presente cuando se incubó el ligando libre con apo-HTF (Figura 6.17).

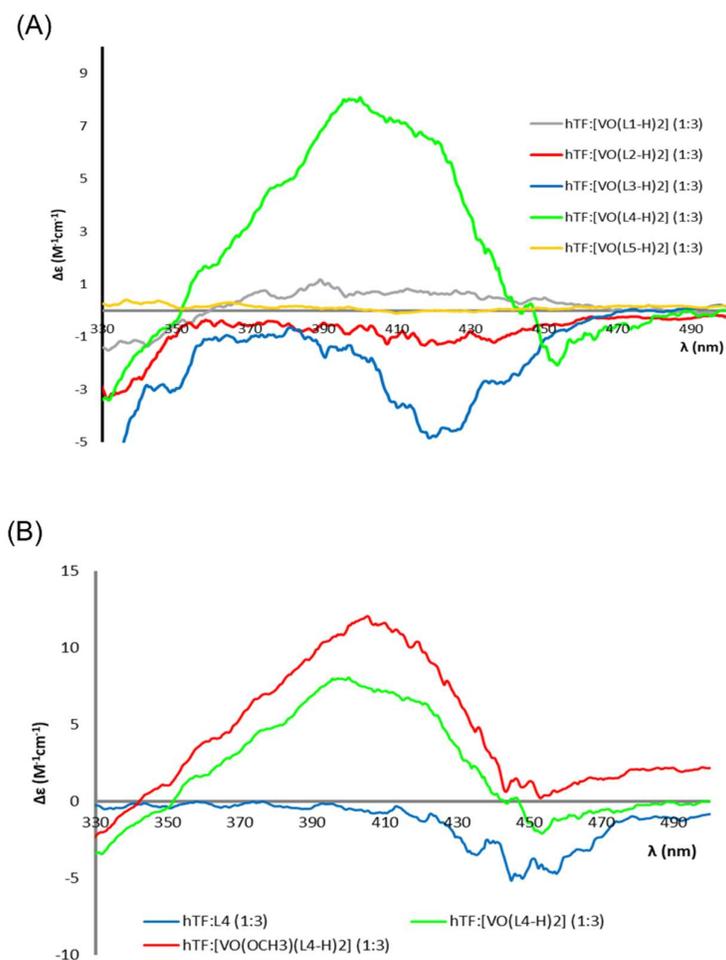


Figura 6.17. Espectros de dicroísmo circular en la región de 350-500 nm de soluciones conteniendo apoHTF ($\sim 150 \mu M$) y (A) los compuestos $[V^{IV}O(L-H)_2]$ en relación molar 1:3 y (B) $[V^{IV}O(L4-H)_2]$, $[V^{VO}O(OCH_3)(L4-H)_2]$ y L4 libre en relación molar 1:3. Para medir los espectros se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico de 1,0 y 0,5 cm.

6.3.2 Interacción con albúmina

6.3.2.1 Dicroísmo circular

Los experimentos de interacción con BSA fueron llevados a cabo utilizando una concentración fija de BSA (aproximadamente $300 \mu M$), agregando gradualmente equivalentes de los compuestos homolépticos de vanadio (IV), $[V^{IV}O(L-H)_2]$, sus análogos $[V^{VO}O(OCH_3)(L-H)_2]$ y los derivados de 8-

hidroxiquinolina libre correspondientes (ligandos L). Dada la baja solubilidad de los complejos en el buffer de trabajo, éstos se disolvieron inicialmente en THF y luego fueron diluidos de forma apropiada con el buffer de trabajo hasta las concentraciones experimentales.

En la región del espectro del visible, donde se esperan ver bandas de transición d-d, no hubo cambios en los espectros de CD tras la adición de los compuestos de vanadio (IV) a la disolución de BSA. Este resultado sugiere una probable oxidación en disolución dando lugar a especies de vanadio (V), incluso cuando se trabaja en atmósfera inerte. Cuando se adicionan los compuestos $[V^{IV}O(L1-H)_2]$, $[V^{IV}O(L2-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L3-H)_2]$, aparecen dos o tres nuevas bandas negativas en el espectro entre 300 y 450 nm las cuales crecen en intensidad al aumentar la concentración del complejo (Figura 6.18A-C). Para los ligandos libres, solo se encuentran en regiones cercanas a 320 nm, con valores de $|\Delta\epsilon|$ mucho menores que los encontrados para los complejos. Por su parte, el complejo $[V^{IV}O(L5-H)_2]$, no presentó cambios en el espectro lo que sugiere una muy baja interacción con BSA (Figura 6.18D). Para el caso de $[V^{IV}O(L4-H)_2]$, la adición del primer equivalente de compuesto da lugar a una banda cerca de los 450 nm con intensidad muy elevada, la cual llega a la saturación el espectro, incluso utilizando celdas de paso óptico menor a 0,5 cm. En cuanto a los complejos $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$, el comportamiento encontrado fue similar al encontrado para sus análogos de vanadio (IV).

Los datos en su conjunto indican que, en las condiciones de trabajo, a excepción de L5 y sus complejos, tanto los complejos como los ligandos libres se unen a los grupos quirales de la BSA. Posiblemente se dé un grado de oxidación significativo del centro metálico, dando lugar a especies de vanadio (V), dando lugar a nuevas bandas de transferencias de cargas en el espectro de CD.

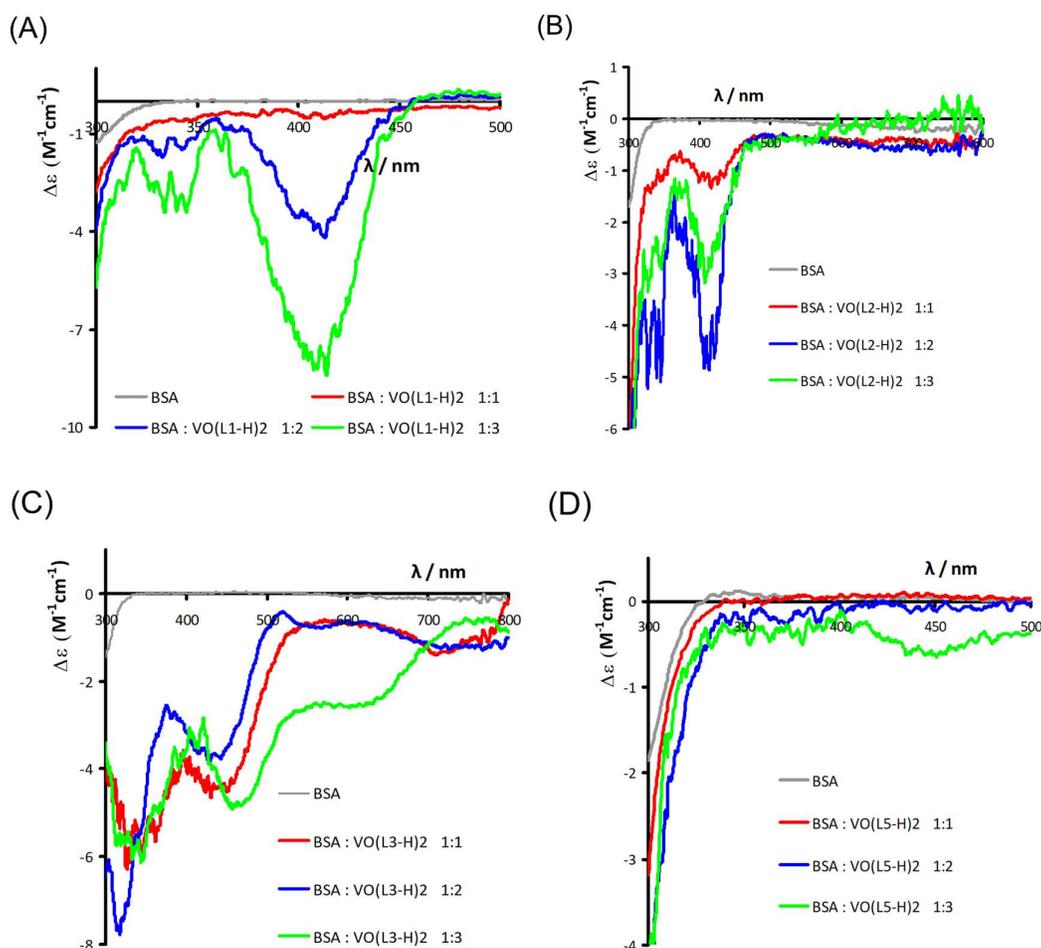


Figura 6.18. Espectros de dicroísmo circular de soluciones conteniendo BSA ($\sim 300 \mu\text{M}$) y (A) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$ en la región 300-500 nm, (B) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L2-H})_2]$ en la región 300-800 nm, (C) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L3-H})_2]$ en la región 300-800 nm, (D) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L5-H})_2]$ en la región 300-500 nm. Las relaciones molares están indicadas en las etiquetas de cada figura. Para medir los espectros se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico de 1,0 y 0,5 cm.

6.3.2.2 Medidas de quenching de fluorescencia

La interacción con BSA se estudió también por medidas de *quenching* de fluorescencia utilizando una concentración fija de BSA (aproximadamente $1 \mu\text{M}$), agregando gradualmente equivalentes de los compuestos homolépticos de vanadio (IV), $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})_2]$ y los derivados de 8-hidroxiquinolina libre correspondientes (ligandos L). Las soluciones stock de los compuestos a estudiar

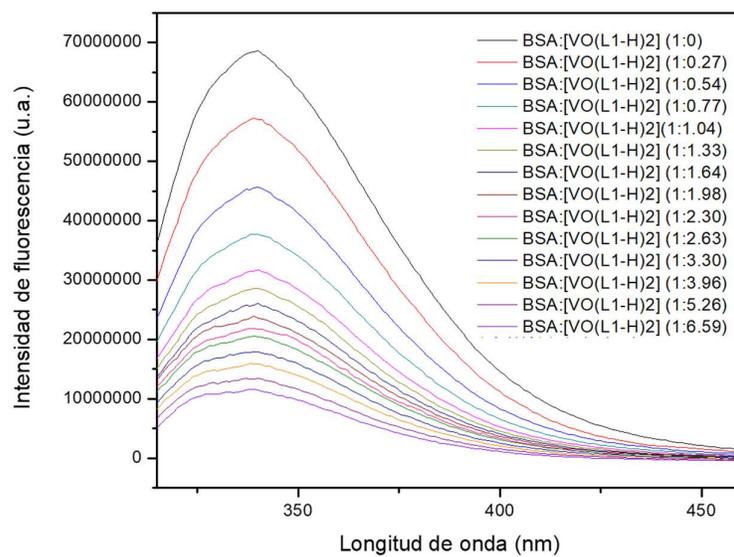
fueron preparadas en EtOH en atmósfera de nitrógeno y se diluyeron de forma tal que el contenido del solvente orgánico no supere el 5 % en la muestra final.

En las condiciones experimentales, la BSA emite fluorescencia intrínseca con un máximo de emisión en $\lambda_{em} = 339$ nm ($\lambda_{ex} = 295$ nm). La fluorescencia emitida se debe principalmente al residuo Trp213.

Para todos los compuestos estudiados se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la BSA a medida que se aumenta la concentración del compuesto. A modo de ejemplo, en la Figura 6.19A se muestran los espectros de emisión obtenidos a medida que aumenta la concentración del complejo $[V^{IV}O(L1-H)_2]$. Con el fin de comparar de forma cuantitativa la afinidad de los complejos o ligandos por la BSA, se determinaron las constantes de *quenching* de Stern Volmer (K_{sv}) como se indicó en la *sección* 3.4.3.2 del Capítulo 3. El gráfico de Stern-Volmer se ejemplifica para el compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ en la Figura 6.19B y las constantes para todos los compuestos estudiados se resumen en la Tabla 6.3.

La Tabla 6.3 además, compara la disminución del rendimiento cuántico producido por los compuestos y ligandos libres, expresando los resultados como porcentajes de *quenching* de la fluorescencia luego del agregado de 5 equivalentes de compuesto.

(A)



(B)

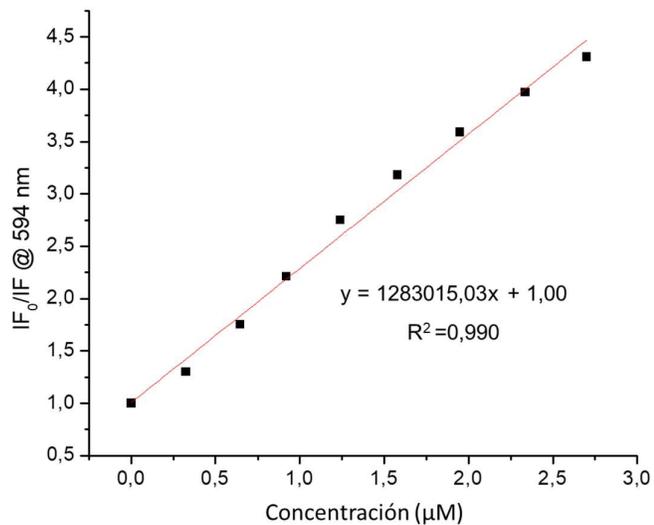


Figura 6.19. (A) Espectros de emisión de BSA (1,20 μM) con agregados incrementales del compuesto $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$. (B) Ajuste de Stern-Volmer para el compuesto $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L1-H})_2]$.

Tabla 6.3. Constantes de Stern-Volmer, valores de R^2 obtenidos en el ajuste y % de *quenching* tras una adición de 5 moles de compuesto para la interacción de los sistemas $[V^{IV}O(L-H)_2]$ con BSA

Compuesto	$\log K_{sv}$	R^2	% <i>quenching</i>
L1	6,14	0,997	78
$[V^{IV}O(L1-H)_2]$	6,11	0,997	89
L2	6,09	0,997	83
$[V^{IV}O(L2-H)_2]$	5,91	0,997	75
L3	6,13	0,981	69
$[V^{IV}O(L3-H)_2]$	5,18	0,986	45
L4	5,97	0,999	78
$[V^{IV}O(L4-H)_2]$	5,33	0,999	54
L5	4,91	0,994	32
$[V^{IV}O(L5-H)_2]$	4,70	0,994	25

Para el complejo $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ se observó un porcentaje de *quenching* mayor que el determinado para el ligando L1 (89 y 79 % respectivamente). Sin embargo, para el resto de los compuestos el *quenching* es mayor para los ligandos en su forma libre que para los compuestos de coordinación. Con estos resultados, se considera muy probable que el efecto de extinción esté relacionado con el efecto del átomo pesado, en el que los elementos pesados atenúan la fluorescencia al aumentar fuertemente la tasa de entrecruzamiento de los sistemas ⁶⁹. Los compuestos con ligandos L1, L2, L3 y L4 contienen sustituyentes pesados en las posiciones 5 y 7 del esqueleto de la 8-hidroxiquinolina, y por tanto este efecto podría explicar las altísimas constantes obtenidas (cerca de $10^6 M^{-1}$) ⁶⁹. Por lo expuesto anteriormente, no fue posible evaluar si el mecanismo de *quenching* de fluorescencia es estático (formación de un complejo de estado fundamental) o dinámico solamente con las medidas de fluorescencia realizadas.

Cuando las moléculas pequeñas se unen de forma independiente a un conjunto de sitios equivalentes en una macromolécula, el equilibrio entre las

moléculas libres y las unidas se puede describir de forma aproximada mediante la ecuación 6.1, que resulta de la linealización de la ecuación de Hill, donde IF y IF_0 tienen el mismo significado que en la ecuación de Stern-Volmer. K_B es la constante de unión y n es el número de sitios de unión a la macromolécula ⁷⁰:

$$\log \frac{(IF_0 - IF)}{IF} = \log K_B + n \log[Q] \quad \text{Ec. 6.1}$$

Para la mayoría de las moléculas estudiadas, se encontró un único sitio de unión a BSA (Tabla 6.4). Las constantes de unión (K_B) obtenidas fueron del mismo orden que las reportadas para otros complejos metálicos que interactúan de manera reversible con esta proteína ⁷¹⁻⁷³.

Tabla 6.4. Constantes y números de sitios de unión a BSA para la familia de compuestos $[V^{IV}O(L-H)_2]$ y sus respectivos ligandos libres

Compuesto	K_B (M^{-1})	n (número de sitios de unión)
L1	$2,1 \times 10^6$	2
$[V^{IV}O(L1-H)_2]$	$1,2 \times 10^6$	1
L2	$1,1 \times 10^6$	1
$[V^{IV}O(L2-H)_2]$	$6,1 \times 10^5$	1
L3	$1,1 \times 10^6$	1
$[V^{IV}O(L3-H)_2]$	$7,0 \times 10^4$	1
L4	$9,7 \times 10^5$	1
$[V^{IV}O(L4-H)_2]$	$1,6 \times 10^5$	2
L5	$4,4 \times 10^4$	1
$[V^{IV}O(L5-H)_2]$	$5,9 \times 10^4$	1

6.3 LIPOFILIA

Como parte del estudio de las propiedades fisicoquímicas de interés biológico, se estudió la lipofilia de los compuestos. La lipofilia es uno de los principales factores que controlan el paso a través de la membrana celular, lo que le confiere una gran importancia para el estudio de los efectos biológicos de potenciales fármacos ⁷⁴. En este trabajo se utilizó como una propiedad fisicoquímica útil para predecir la potencialidad de los compuestos para el pasaje a través de la membrana celular y para analizar si ésta se relaciona con la actividad antiparasitaria discutida en el Capítulo 5.

La lipofilia se determinó experimentalmente utilizando experimentos de cromatografía en capa fina (TLC) de fase reversa en placas de TLC pre-recubiertas SIL RP-18W/UV₂₅₄, simulando los lípidos hidrófobicos de las membranas celulares y receptores biológicos, y eluyendo con una mezcla MeOH: DMF: Buffer Tris-HCl (10mM), pH 7,4 (85:5:10, v/v/v) que simula el medio hidrofílico.

La Tabla 6.5 resume los valores de R_f medidos y los R_M calculados para todos los complejos y ligandos libres estudiados en esta tesis, medidos en las mismas condiciones experimentales.

Tabla 6.5. Valores de R_f y R_M para ligandos y complejos utilizando como fase móvil una mezcla MeOH : DMF: Buffer Tris-HCl (10mM), pH 7,4 (85:5:10, v/v/v)

Compuesto	R _f	R _M
L0	0,85	-0,77
L1	0,81	-0,63
L2	0,79	-0,58
L3	0,53	-0,044
L4	0,89	-0,91
L5	0,86	-0,79

LS1	0,90	-0,98
LS2	0,88	-0,86
LS3	0,87	-0,82
LS4	0,90	-0,98
[V ^{VO} (LS1-2H)(L0-H)]	0,54	-0,070
[V ^{VO} (LS2-2H)(L0-H)]	0,46	0,061
[V ^{VO} (LS3-2H)(L0-H)]	0,62	-0,21
[V ^{VO} (LS4-2H)(L0-H)]	0,51	-0,017
[V ^{VO} ₂ (LS1-2H)]	0,88	-0,86
[V ^{VO} ₂ (LS2-2H)]	0,87	-0,82
[V ^{VO} ₂ (LS3-2H)]	0,85	-0,75
[V ^{VO} ₂ (LS4-2H)]	0,88	-0,86
IN	0,82	-0,66
[V ^{VO} (IN-2H)(L0-H)]	ND	ND
[V ^{VO} (IN-2H)(L1-H)]	0,65	-0,27
[V ^{VO} (IN-2H)(L2-H)]	0,57	-0,12
[V ^{VO} (IN-2H)(L3-H)]	0,52	-0,035
[V ^{VO} (IN-2H)(L4-H)]	0,69	-0,35
[V ^{VO} ₂ (IN-2H)]	ND	ND
BrIS	0,80	-0,63
[V ^{VO} (BrIS-2H)(L0-H)]	ND	ND
[V ^{VO} (BrIS -2H)(L1-H)]	0,64	-0,25
[V ^{VO} (BrIS -2H)(L2-H)]	0,48	0,034
[V ^{VO} (BrIS -2H)(L3-H)]	0,41	0,15
[V ^{VO} (BrIS -2H)(L4-H)]	0,65	-0,27
[V ^{VO} ₂ (BrIS -2H)]	ND	ND
[V ^{IV} O(L0-H) ₂]	0,78	-0,55
[V ^{VO} (OCH ₃)(L0-H) ₂]	0,77	-0,52
[V ^{IV} O(L1-H) ₂]	0,72	-0,41
[V ^{VO} (OCH ₃)(L1-H) ₂]	0,72	-0,41

[V ^{IV} O(L2-H) ₂]	0,69	-0,35
[V ^{VO} (OCH ₃)(L2-H) ₂]	0,72	-0,41
[V ^{IV} O(L3-H) ₂]	0,70	-0,37
[V ^{VO} (OCH ₃)(L3-H) ₂]	0,74	-0,45
[V ^{IV} O(L4-H) ₂]	0,79	-0,57
[V ^{VO} (OCH ₃)(L4-H) ₂]	0,81	-0,63
[V ^{IV} O(L5-H) ₂]	0,81	-0,63
[V ^{VO} (OCH ₃)(L5-H) ₂]	0,80	-0,60
Na mpo	ND	ND
[V ^{IV} O(L0-H)(mpo)]	0,76	-0,50
[V ^{IV} O(L1-H)(mpo)]	0,75	-0,48
[V ^{IV} O(L2-H)(mpo)]	0,73	-0,43
[V ^{IV} O(L3-H)(mpo)]	0,72	-0,41
[V ^{IV} O(L4-H)(mpo)]	0,76	-0,50
$R_M = \log_{10} [(1/R_i) - 1]$ ^{6, 75-77} ND = No determinado		

Los resultados obtenidos muestran que la lipofilia de los ligandos LS libres es muy similar que la determinada para los compuestos homolépticos [VO₂(LS-H)]. Por otra parte, se encontraron valores de lipofilia levemente mayores para los compuestos homolépticos [V^{IV}O(L-H)₂], [V^{VO}(OCH₃)(L-H)₂] y [V^{IV}O(L0-H)(mpo)] respecto a los ligandos derivados de la hidroxiquinolina en su forma libre. No obstante, las familias de compuestos que contienen ligandos tridentados [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] presentan mayor lipofilia que el resto de los complejos mencionados y los ligandos libres.

A su vez, entre la series estructuralmente relacionadas [V^{VO}(IN-2H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-2H)(L-H)] se observa la misma tendencia, donde la lipofilia aumenta a medida que se agregan sustituyentes más voluminosos en la 8-hidroxiquinolina.

Con el fin de establecer una correlación entre la lipofilia y la actividad biológica, se graficó la actividad antiparasitaria en tripomastigotas de *T. cruzi* ($EC_{50, 24 h}$) contra el parámetro de lipofilia R_M (Figura 6.20).

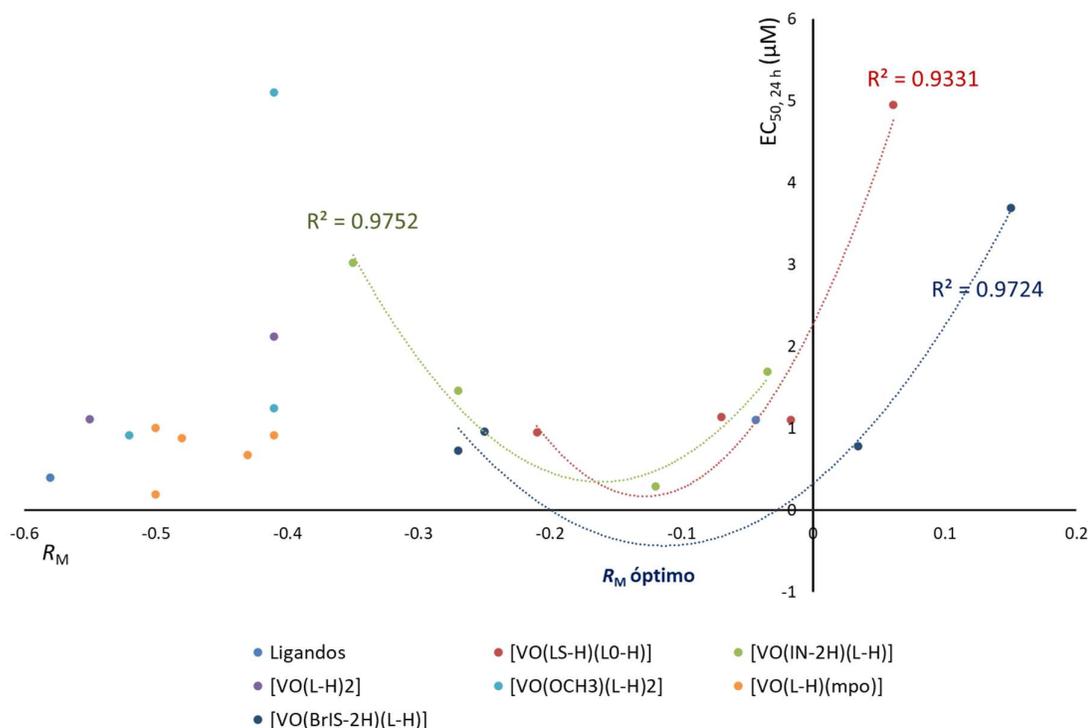


Figura 6.20. Correlación de actividad biológica versus lipofilia. Se grafica $EC_{50,24 h}$ determinado en la forma tripomastigota de *T. cruzi* en el eje de las ordenadas y el parámetro de lipofilia R_M en el eje de abscisas.

Si bien cada una de las familias tienen pocos miembros, las tres familias de compuestos heterolépticos con ligandos tridentados presentaron una tendencia a un ajuste parabólico con buen ajuste ($R^2 > 0,9$). Si se consideran todos los valores en su conjunto, se consigue un ajuste parabólico pero el R^2 obtenido disminuye a 0,6. Probablemente la inclusión de más compuestos a esta serie puede dar lugar a un mejor ajuste entre la actividad observada y la lipofilia. Es interesante destacar que el compuesto [VO(IN-2H)(L2-H)], siendo el más activo de todos los explorados en esa tesis presenta un R_M cercano al mínimo de la parábola donde se espera que el R_M sea óptimo.

El comportamiento es similar al observado previamente para los compuestos similares $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$, donde NN representa un conjunto de ligandos bioactivos derivados de la 1-10-fenantrolina ⁷⁶. Cabe destacar que todos los compuestos analizados son mucho menos lipofílicos que la serie estudiada previamente $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$, lo cual podría tener una relación con las diferencias en el comportamiento subcelular observado en los ensayos de metalómica que serán descritos en detalle en el Capítulo 7, donde se encontró una asociación preferencial por las proteínas solubles para todos los compuestos estudiados, mientras que para los compuestos más lipofílicos $[V^{IV}O(LS-2H)(NN)]$ se ha reportado una asociación preferencial por la fracción insoluble, la cual contiene proteínas y lípidos de membrana, entre otras moléculas insolubles ⁷⁸.

6.5 CONCLUSIONES PARCIALES

Con el objetivo de acercarnos a la comprensión de los cambios que sufren los compuestos una vez disueltos en los medios biológicos, se realizaron diversos estudios de estabilidad en distintos medios.

Para todas las series, se estudió la estabilidad en soluciones de DMSO o DMF, solventes orgánicos que se utilizan para preparar soluciones stock de los compuestos para ser evaluados.

Para los complejos $[VO(LS4-2H)(L0-H)]$ y $[VO(IN-2H)(L2-H)]$ se estudió la estabilidad con el agregado de agua y medio de cultivo BHI-Triptosa, medio utilizado para crecer los parásitos tripanosomátidos en su forma axénica.

Ambos complejos resultaron bastante estables en DMSO, con un bajo grado de descomposición luego de 24 horas, donde se propone que el compuesto pierde el ligando bidentado dando lugar al correspondiente complejo dioxovanadio (V), y en una segunda etapa libera parcialmente el ligando tridentado. Por su parte, el grado de hidrólisis fue mucho mayor cuando se agrega agua a la disolución de DMSO. La especiación en medio de cultivo BHI-

Triptosa para estos compuestos resultó en una variedad de especies de vanadio presentes que dan lugar a espectros y cromatogramas difíciles de caracterizar sin experimentos adicionales. Sin embargo, los resultados en su conjunto permiten sugerir que la actividad biológica observada para los compuestos heterolépticos de fórmula global $[\text{VO}(\text{LS-2H})(\text{L0-H})]$, $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN-2H})(\text{L-H})]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{BrIS-2H})(\text{L-H})]$ podría deberse a una mezcla entre el efecto del compuesto original disuelto, el ligando bioactivo y especies parcialmente hidrolizadas unidas fuertemente a proteínas transportadoras.

Por otra parte, la estabilidad del compuesto homoléptico $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L0-H})_2]$ fue también estudiada en mezclas DMSO:H₂O por EPR y espectroscopía UV-Vis. Los resultados en conjunto sugieren que el compuesto $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L0-H})_2]$ se podría oxidar parcialmente al complejo análogo de vanadio (V) manteniendo la 8-hidroxiquinolina en la esfera de coordinación.

Se estudió la interacción de los compuestos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L-H})_2]$ con apo-HTF y BSA, como potenciales proteínas transportadoras, por dicroísmo circular y medidas de fluorescencia. Los resultados indicaron que, tanto los complejos de oxovanadio (IV) y oxovanadio (V) como los ligandos en su forma libre interactúan con ambas proteínas. Para el caso de apo-HTF, se determinó que se da la unión de dos moléculas de complejo por cada mol de proteína. Además, se evidenció la presencia del metal en su estado de oxidación (IV), sugiriendo la presencia de especies del tipo $(\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{H-L}))_2\text{-apoHTF}$. En cuanto a la unión con la albúmina, los resultados mostraron constantes de unión de ordenes similares a los reportados previamente para otros compuestos de vanadio y dos sitios de unión. A partir de los resultados se sugirió que los compuestos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L-H})_2]$ se unen fuertemente a BSA en relación molar 1:1 para la mayoría de los complejos, aunque pareciera haber dos sitios de interacción disponibles.

Como parte del estudio de las propiedades fisicoquímicas de interés biológico, se estudió la lipofilia de todos los compuestos explorados y se

relacionó con los EC₅₀ determinados sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi*. Si bien parece que el número de compuestos desarrollados es bajo para obtener una correlación clara, se determinó una relación parabólica de la actividad de los compuestos [VO(LS-2H)(L0-H)], [V^vO(IN-2H)(L-H)] y [V^vO(BrIS-2H)(L-H)] con su lipofilia. Los resultados son valiosos para planificar futuras modificaciones racionales en la estructura química generando nuevos potenciales metalofármacos con actividad biológica incrementada.

6.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jakusch, T.; Costa Pessoa, J.; Kiss, T., The speciation of vanadium in human serum. *Coord Chem Rev* **2011**, 255 (19-20), 2218-2226.
2. Levina, A.; Crans, D. C.; Lay, P. A., Speciation of metal drugs, supplements and toxins in media and bodily fluids controls *in vitro* activities. *Coord Chem Rev* **2017**, 352, 473-498.
3. Feng, B.; Dong, Y.; Shang, B.; Zhang, B.; Crans, D. C.; Yang, X., Convergent Protein Phosphatase Inhibitor Design for PTP1B and TCPTP: Exchangeable Vanadium Coordination Complexes on Graphene Quantum Dots. *Ad Funct Mat* **2021**, 2021, 1-14
4. Levina, A.; Crans, D. C.; Lay, P. A., Advantageous Reactivity of Unstable Metal Complexes: Potential Applications of Metal-Based Anticancer Drugs for Intratumoral Injections. *Pharmaceutics* **2022**, 14 (4).
5. Scalese, G.; Arhouma, Z.; Kostenkova, K.; Pérez-Díaz, L.; Crick, D. C.; Gambino, D.; Crans, D. C., Do bioactive 8-hydroxyquinolines oxidovanadium(IV) and (V) complexes inhibit the growth of *M. smegmatis*? *J Inorg Biochem* **2022**, 237, 111984.
6. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, 23 (8), 1265-1281.
7. Correia, I.; Adao, P.; Roy, S.; Wahba, M.; Matos, C.; Maurya, M. R.; Marques, F.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q. F.; Avecilla, F.; Costa Pessoa, J., Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *J Inorg Biochem* **2014**, 141, 83-93.
8. Gryca, I.; Czerwinska, K.; Machura, B.; Chrobok, A.; Shul'pina, L. S.; Kuznetsov, M. L.; Nesterov, D. S.; Kozlov, Y. N.; Pombeiro, A. J. L.;

- Varyan, I. A.; Shul'pin, G. B., High Catalytic Activity of Vanadium Complexes in Alkane Oxidations with Hydrogen Peroxide: An Effect of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Noninnocent Ligands. *Inorg Chem* **2018**, *57* (4), 1824-1839.
9. Levina, A.; Lay, P. A., Stabilities and Biological Activities of Vanadium Drugs: What is the Nature of the Active Species? *Chem Asian J* **2017**, *12* (14), 1692-1699.
 10. Scalese, G.; Mosquillo, M. F.; Rostan, S.; Castiglioni, J.; Alho, I.; Perez, L.; Correia, I.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *J Inorg Biochem* **2017**, *175*, 154-166.
 11. Andersson, I.; Gorzsas, A.; Kerezsi, C.; Toth, I.; Pettersson, L., Speciation in the aqueous $H^+/H_2VO_4^-/H_2O_2$ /phosphate system. *Dalton Trans* **2005**, (22), 3658-66.
 12. Kostenkova, K.; Arhouma, Z.; Postal, K.; Rajan, A.; Kortz, U.; Nunes, G. G.; Crick, D. C.; Crans, D. C., Pt(IV)- or Mo(VI)-substituted decavanadates inhibit the growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J Inorg Biochem* **2021**, *217*, 111356.
 13. Crans, D. C.; Baruah, B.; Gaidamauskas, E.; Lemons, B. G.; Lorenz, B. B.; Johnson, M. D., Impairment of ascorbic acid's anti-oxidant properties in confined media: Inter and intramolecular reactions with air and vanadate at acidic pH. *J Inorg Biochem* **2008**, *102* (5-6), 1334-1347.
 14. Howarth, O. W.; Pettersson, L.; Andersson, I., Monomolybdonovanadate and cis- and trans-dimolybdo-octavanadate. *J Chem Soc, Dalton Trans* **1989**, (1915-1923).
 15. Samart, N.; Arhouma, Z.; Kumar, S.; Murakami, H. A.; Crick, D. C.; Crans, D. C., Decavanadate Inhibits Mycobacterial Growth More Potently Than Other Oxovanadates. *Front Chem* **2018**, *6*, 519.

16. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, *26* (17).
17. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Diaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem* **2019**, *43* (45), 17756-17773.
18. Chasteen, N., *Biological magnetic resonance*. Plenum Press: New York, 1981; Vol. 3, p 53.
19. Butler, A.; Eckert, H., Vanadium-51 NMR as a probe of vanadium (V) coordination to human apotransferrin. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (8), 2802-2809.
20. Banerjee, A.; Dash, S. P.; Mohanty, M.; Sahu, G.; Sciortino, G.; Garribba, E.; Carvalho, M. F. N.; Marques, F.; Costa Pessoa, J. o.; Kaminsky, W. J. I. C., New VIV, VIVO, VVO, and VVO₂ systems: exploring their interconversion in solution, protein interactions, and cytotoxicity. **2020**, *59* (19), 14042-14057.
21. Sciortino, G.; Ugone, V.; Sanna, D.; Lubinu, G.; Ruggiu, S.; Maréchal, J.-D.; Garribba, E. J. F. i. c., Biospeciation of potential vanadium drugs of acetylacetonate in the presence of proteins. **2020**, *8*, 345.
22. Ugone, V.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Crans, D. C.; Garribba, E. J. I. c., ESI-MS study of the interaction of potential oxidovanadium (IV) drugs and amavadin with model proteins. **2020**, *59* (14), 9739-9755.
23. Levina, A.; Pires Vieira, A.; Wijetunga, A.; Kaur, R.; Koehn, J. T.; Crans, D. C.; Lay, P. A., A Short-Lived but Highly Cytotoxic Vanadium(V) Complex as a Potential Drug Lead for Brain Cancer Treatment by Intratumoral Injections. *Angew Chem Int Ed Engl* **2020**, *59* (37), 15834-15838.
24. Cornman, C. R.; Colpas, G. J.; Hoeschele, J. D.; Kampf, J.; Pecoraro, V. L., Implications for the spectroscopic assignment of vanadium biomolecules: structural and spectroscopic characterization of monooxovanadium (V)

- complexes containing catecholate and hydroximate based noninnocent ligands. *J Am Chem Soc* **1992**, 114 (25), 9925-9933.
25. Rehder, D.; Holst, H.; Quaas, R.; Hinrichs, W.; Hahn, U.; Saenger, W., Binding of vanadate (V) to ribonuclease-T1 and inosine, investigated by 15V NMR spectroscopy. *J Inorg Biochem* **1989**, 37 (2), 141-150.
 26. Stankiewicz, P. J.; Gresser, M. J.; Tracey, A. S.; Hass, L. F., 2, 3-Diphosphoglycerate phosphatase activity of phosphoglycerate mutase: stimulation by vanadate and phosphate. *J Biochemistry* **1987**, 26 (5), 1264-1269.
 27. Sciortino, G.; Maréchal, J.-D.; Garribba, E., Integrated experimental/computational approaches to characterize the systems formed by vanadium with proteins and enzymes. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2021**, 8 (8), 1951-1974.
 28. Ugone, V.; Sanna, D.; Ruggiu, S.; Sciortino, G.; Garribba, E., Covalent and non-covalent binding in vanadium–protein adducts. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2021**, 8 (5), 1189-1196.
 29. Pessoa, J. C.; Santos, M. F. A.; Correia, I.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Garribba, E., Binding of vanadium ions and complexes to proteins and enzymes in aqueous solution. *Coord Chem Rev* **2021**, 449.
 30. Santos, M. F. A.; Sciortino, G.; Correia, I.; Fernandes, A. C. P.; Santos-Silva, T.; Pisanu, F.; Garribba, E.; Pessoa, J. C., Binding of $V^{IV}O^{2+}$, $V^{IV}OL$, $V^{IV}OL_2$ and $V^{IV}O_2L$ Moieties to Proteins: X-ray/Theoretical Characterization and Biological Implications. *Chem Eur J* **2022**, e202200105
 31. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) complexes with activity against infective and non-infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, 26 (17), 5375.
 32. Lima, L. M. A.; Belian, M. F.; Silva, W. E.; Postal, K.; Kostenkova, K.; Crans, D. C.; Rossiter, A.; da Silva Junior, V. A., Vanadium(IV)-diamine

- complex with hypoglycemic activity and a reduction in testicular atrophy. *J Inorg Biochem* **2021**, *216*, 111312.
33. Choroba, K.; Raposo, L. R.; Palion-Gazda, J.; Malicka, E.; Erfurt, K.; Machura, B.; Fernandes, A. R., *In vitro* antiproliferative effect of vanadium complexes bearing 8-hydroxyquinoline-based ligands - the substituent effect. *Dalton Trans* **2020**, *49* (20), 6596-6606.
34. Crans, D. C.; Koehn, J. T.; Petry, S. M.; Glover, C. M.; Wijetunga, A.; Kaur, R.; Levina, A.; Lay, P. A., Hydrophobicity may enhance membrane affinity and anti-cancer effects of Schiff base vanadium(v) catecholate complexes. *Dalton Trans* **2019**, *48* (19), 6383-6395.
35. Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V., 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther* **2013**, *7*, 1157-78.
36. McLauchlan, C. C.; Peters, B. J.; Willsky, G. R.; Crans, D. C., Vanadium-phosphatase complexes: Phosphatase inhibitors favor the trigonal bipyramidal transition state geometries. *Coord Chem Rev* **2015**, *301-302*, 163-199.
37. Willsky, G. R.; Chi, L. H.; Godzala, M., 3rd; Kostyniak, P. J.; Smee, J. J.; Trujillo, A. M.; Alfano, J. A.; Ding, W.; Hu, Z.; Crans, D. C., Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Coord Chem Rev* **2011**, *255* (19-20), 2258-2269.
38. Crans, D. C.; Rithner, C. D.; Baruah, B.; Gourley, B. L.; Levinger, N. E., Molecular probe location in reverse micelles determined by NMR dipolar interactions. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (4437-4445).
39. Althumairy, D.; Murakami, H. A.; Zhang, D.; Barisas, B. G.; Roess, D. A.; Crans, D. C., Effects of vanadium(IV) compounds on plasma membrane lipids lead to G protein-coupled receptor signal transduction. *J Inorg Biochem* **2020**, *203*, 110873.

40. Arhouma, Z.; Murakami, H. A.; Koehn, J. T.; Li, X.; Roess, D. A.; Crick, D. C.; Crans, D. C., Exploring Growth of *Mycobacterium smegmatis* Treated with Anticarcinogenic Vanadium Compounds. *Inorganics* **2022**, *10* (4).
41. Gonzalez Baró, A. C.; Baran, E. J., Oxovanadium(IV) complexes of halogenated oxines. *Monats ftir Chem* **1997**, *128*, 323-335.
42. Garribba, E.; Micera, G.; Sanna, D.; Lodyga-Chruscinska, E., Oxovanadium(IV) complexes of quinoline derivatives. *Inorg Chim Acta* **2003**, *348*, 97-106.
43. Mar, G. N. L.; Horrocks, W. D.; Holm, R. H., *NMR of paramagnetic molecules: Principles and applications*. Academic Press, Inc: New York, 1973.
44. Banerjee, A.; Dash, S. P.; Mohanty, M.; Sahu, G.; Sciortino, G.; Garribba, E.; Carvalho, M.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Kaminsky, W.; Brzezinski, K.; Dinda, R., New V(IV), V(IV)O, V(V)O, and V(V)O₂ Systems: Exploring their Interconversion in Solution, Protein Interactions, and Cytotoxicity. *Inorg Chem* **2020**, *59* (19), 14042-14057.
45. Jakusch, T.; Hollender, D.; Enyedy, E. A.; Gonzalez, C. S.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel, A.; Costa Pessoa, J.; Tomaz, I.; Kiss, T., Biospeciation of various antidiabetic V(IV)O compounds in serum. *Dalton Trans* **2009**, (13), 2428-37.
46. Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D., Vanadium compounds in medicine. *Coord Chem Rev* **2015**, *301*, 24-48.
47. Costa Pessoa, J., Thirty years through vanadium chemistry. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 4-24.
48. Mehtab, S.; Goncalves, G.; Roy, S.; Tomaz, A. I.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F.; Romao, M. J.; Jakusch, T.; Kiss, T.; Pessoa, J. C., Interaction of vanadium(IV) with human serum apo-transferrin. *J Inorg Biochem* **2013**, *121*, 187-95.

49. Sanna, D.; Biro, L.; Buglyo, P.; Micera, G.; Garribba, E., Biotransformation of BMOV in the presence of blood serum proteins. *Metallomics* **2012**, *4* (1), 33-6.
50. Sanna, D.; Micera, G.; Garribba, E., New developments in the comprehension of the biotransformation and transport of insulin-enhancing vanadium compounds in the blood serum. *Inorg Chem* **2010**, *49* (1), 174-87.
51. Pessoa, J. C.; Tomaz, I., Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 3701-3738.
52. Kiss, T.; Jakusch, T.; Hollender, D.; Dörnyei, Á.; Enyedy, É. A.; Pessoa, J. C.; Sakurai, H.; Sanz-Medel, A., Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes. *Coord Chem Rev* **2008**, *252* (10-11), 1153-1162.
53. Sun, H.; Cox, M. C.; Li, H.; Sadler, P., Rationalisation of metal binding to transferrin: prediction of metal-protein stability constants. *J Metal Sites In Proteins Models* **1997**, 71-102.
54. Sun, H.; Li, H.; Sadler, P. J., Transferrin as a metal ion mediator. *J Chemical reviews* **1999**, *99* (9), 2817-2842.
55. Costa Pessoa, J.; Garribba, E.; Santos, M. F. A.; Santos-Silva, T., Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. *Coord Chem Rev* **2015**, *301-302*, 49-86.
56. Sciortino, G.; Garribba, E.; Marechal, J. D., Validation and Applications of Protein-Ligand Docking Approaches Improved for Metalloligands with Multiple Vacant Sites. *Inorg Chem* **2019**, *58* (1), 294-306.
57. Sciortino, G.; Sanna, D.; Ugone, V.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Garribba, E., Decoding Surface Interaction of V(IV)O Metallodrug Candidates with Lysozyme. *Inorg Chem* **2018**, *57* (8), 4456-4469.
58. Sciortino, G.; Sanna, D.; Ugone, V.; Maréchal, J.-D.; Garribba, E., Integrated ESI-MS/EPR/computational characterization of the binding of metal species

- to proteins: vanadium drug–myoglobin application. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2019**, *6* (6), 1561-1578.
59. Sciortino, G.; Sanna, D.; Ugone, V.; Micera, G.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Garribba, E., Elucidation of Binding Site and Chiral Specificity of Oxidovanadium Drugs with Lysozyme through Theoretical Calculations. *Inorg Chem* **2017**, *56* (21), 12938-12951.
60. Ugone, V.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Crans, D. C.; Garribba, E., ESI-MS Study of the Interaction of Potential Oxidovanadium(IV) Drugs and Amavadin with Model Proteins. *Inorg Chem* **2020**, *59* (14), 9739-9755.
61. Ugone, V.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Marechal, J. D.; Garribba, E., Interaction of Vanadium(IV) Species with Ubiquitin: A Combined Instrumental and Computational Approach. *Inorg Chem* **2019**, *58* (12), 8064-8078.
62. Levina, A.; McLeod, A. I.; Gasparini, S. J.; Nguyen, A.; De Silva, W. G.; Aitken, J. B.; Harris, H. H.; Glover, C.; Johannessen, B.; Lay, P. A., Reactivity and Speciation of Anti-Diabetic Vanadium Complexes in Whole Blood and Its Components: The Important Role of Red Blood Cells. *Inorg Chem* **2015**, *54* (16), 7753-66.
63. Kiss, T.; Kiss, E.; Garribba, E.; Sakurai, H., Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J Inorg Biochem* **2000**, *80*, 65-73.
64. Levina, A.; McLeod, A. I.; Pulte, A.; Aitken, J. B.; Lay, P. A., Biotransformations of Antidiabetic Vanadium Prodrugs in Mammalian Cells and Cell Culture Media: A XANES Spectroscopic Study. *Inorg Chem* **2015**, *54* (14), 6707-18.
65. Gomme, P. T.; McCann, K. B.; Bertolini, J., Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *J Drug discovery today* **2005**, *10* (4), 267-273.
66. MacGillivray, R. T.; Mendez, E.; Sinha, S. K.; Sutton, M. R.; Lineback-Zins, J.; Brew, K., The complete amino acid sequence of human serum transferrin. *J Proceedings of the National Academy of Sciences* **1982**, *79* (8), 2504-2508.

67. Justino, G. C.; Garribba, E.; Pessoa, J. C., Binding of V(IV)O(2)(+) to the Fe binding sites of human serum transferrin. A theoretical study. *J Biol Inorg Chem* **2013**, *18* (7), 803-13.
68. Correia, I.; Chorna, I.; Cavaco, I.; Roy, S.; Kuznetsov, M. L.; Ribeiro, N.; Justino, G.; Marques, F.; Santos-Silva, T.; Santos, M. F. A.; Santos, H. M.; Capelo, J. L.; Douth, J.; Pessoa, J. C., Interaction of [V(IV) O(acac)₂] with Human Serum Transferrin and Albumin. *Chem Asian J* **2017**, *12* (16), 2062-2084.
69. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons: 2012.
70. Coval, M. L., Analysis of Hill interaction coefficients and the invalidity of the Kwon and Brown equation. *J Biol Chem* **1970**, *245* (23), 6335-6336.
71. Ćočić, D.; Jovanović, S.; Radisavljević, S.; Korzekwa, J.; Scheurer, A.; Puchta, R.; Baskić, D.; Todorović, D.; Popović, S.; Matić, S., New monofunctional platinum (II) and palladium (II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem* **2018**, *189*, 91-102.
72. Bangde, P. S.; Prajapati, D. S.; Dandekar, P. P.; Kapdi, A. R., New Water-Soluble N-Heterocyclic Carbene-Palladium Complexes as Promising Anti-Tumor Agents: Investigating DNA and Protein Interactions. *J ChemistrySelect* **2018**, *3* (21), 5709-5716.
73. Psomas, G.; Kessissoglou, D. P., Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper (II), nickel (II), cobalt (II) and zinc (II): structural features, biological evaluation and perspectives. *Dalton Trans* **2013**, *42* (18), 6252-6276.
74. Di, L.; Kerns, E. H., *Chapter 23: Lipophilicity methods*. Second ed.; Academic Press: Boston, 2016.
75. Benitez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D.,

- Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303-12.
76. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
77. Scalese, G.; Benitez, J.; Rostan, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Birriel, E.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Pessoa, J. C.; Gambino, D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 116-25.
78. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Lima, A.; Gehrke, S. A.; Scalese, G.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., High throughput approaches to unravel the mechanism of action of a new vanadium-based compound against *Trypanosoma cruzi*. *Bioinorg Chem Appl* **2020**, *2020*, 1634270.

CAPÍTULO 7

METALÓMICA, BLANCOS DE ACCIÓN Y MUERTE CELULAR

CAPÍTULO 7. METALÓMICA, BLANCOS DE ACCIÓN Y MUERTE CELULAR

Contenido

7.1	INTRODUCCIÓN.....	425
7.2	INTERACCIÓN CON ADN	426
7.2.1	Compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L-H)_2]$	427
7.2.2	Compuesto heteroléptico $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$	432
7.3	METALÓMICA.....	436
7.3.1	Ingreso a <i>T. cruzi</i>	437
7.3.1.1	Compuesto $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$	438
7.3.1.2	Compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$	443
7.3.1.3	Compuesto $[V^{VO}(IN-H)(L2-H)]$	445
7.3.1.4	Compuesto $[V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]$	446
7.3.1.5	Compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$	448
7.3.2	Asociación con macromoléculas	449
7.3.2.1	Compuestos $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$ y $[V^{IV}O(L1-H)_2]$	450
7.3.2.2	Compuestos $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]$	452
7.3.2.3	Compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$	455
7.3.2.4	Análisis global.....	456
7.4	RECUPERACIÓN DE LOS PARÁSITOS	457
7.4.1	Compuestos heterolépticos $[V^{VO}(LS-H)(L0-H)]$, $[V^{VO}(IN-H)(L-H)]$ y $[V^{VO}(BrIS-H)(L-H)]$	458
7.4.2	Compuestos heterolépticos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$	461
7.4.3	Compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$	462
7.5	TIPO DE MUERTE CELULAR	464
7.5.1	Apoptosis y necrosis.....	464
7.5.1.1	Compuestos heterolépticos $[V^{VO}(LS-2H)(L0-H)]$	466
7.5.1.2	Compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$	468
7.5.1.3	Compuesto heteroléptico $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$	470
		423

7.5.1.4	Compuesto heteroléptico [V ^v O(BrIS-2H)(L2-H)]	471
7.5.1.5	Compuesto heteroléptico [V ^v O(L2-H)(mpo)]	473
7.5.2	Autofagia.....	476
7.6	ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	479
7.7	POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	483
7.8	INHIBICIÓN DE LA FUMARATO REDUCTASA NADH DEPENDIENTE 486	
7.8.1	Actividad enzimática.....	487
7.8.2	Viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan FRD.....	488
7.9	CONCLUSIONES PARCIALES.....	490
7.10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	494

7.1 INTRODUCCIÓN

Una vez evaluados los compuestos desarrollados como potenciales agentes antiparasitarios, se seleccionaron los compuestos más promisorios como líderes de cada serie para incursionar en el estudio de su mecanismo de acción en *T. cruzi*.

En este contexto, se realizaron estudios biológicos que permiten detectar algunos potenciales blancos de acción, comprender parcialmente el comportamiento de los compuestos en estudio dentro del patógeno y los efectos causados por estos compuestos como agentes antitripanosoma.

Los métodos clásicos de estudio de blancos moleculares en Química Medicinal involucran el estudio de la interacción con biomoléculas tales como el ADN y enzimas postuladas como potenciales blancos. Debido a los antecedentes detallados en el capítulo 2 para los compuestos desarrollados, se estudió la interacción con ADN como potencial blanco de acción.

Además, se han desarrollado numerosos enfoques para el desarrollo y estudio de los efectos celulares provocados por compuestos candidatos a fármacos. Entre ellos, las aproximaciones ómicas constituyen un área de análisis que ha tomado protagonismo en los últimos años. En particular, la metalómica es un área emergente, que ha sido relevante para la química inorgánica biológica, involucrando el estudio de interacciones y localización de metales en sistemas biológicos. En este capítulo se presentan resultados de análisis metalómico que involucran el conocimiento de la cantidad de compuesto que ingresa a los parásitos tripanosomátidos y su distribución subcelular.

Por otro lado, con el objetivo de caracterizar si los compuestos ejercen un efecto tripanocida o tripanostático sobre *T. cruzi*, se realizaron experimentos exponiendo los parásitos a los compuestos por un cierto tiempo y recuperando posteriormente los mismos, evaluando su capacidad de retomar el crecimiento una vez que están libres de compuestos. Por otra parte, se intentó caracterizar los

mecanismos de muerte celular involucrados mediante el uso de sondas fluorescentes apropiadas para la detección de células necróticas y apoptóticas utilizando citometría de flujo, y el análisis de expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el proceso de autofagia por qRT-PCR.

Para complementar el análisis de muerte celular, se analizó el estrés oxidativo y la integridad del potencial de membrana mitocondrial en los parásitos tratados con los compuestos líderes de cada serie.

Finalmente, para los compuestos de coordinación que involucran el ligando mpo en su esfera de coordinación, se estudió la inhibición de la enzima fumarato reductasa NADH-dependiente (FRD) como potencial blanco de acción a través de ensayos de actividad enzimática y de la determinación de la viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan FRD.

7.2 INTERACCIÓN CON ADN

Si bien los compuestos desarrollados y explorados en esta tesis no fueron diseñados con la inclusión de ligandos que tengan como blanco específico la interacción con ADN (capítulo 2), la estructura de los derivados de 8-hidroxiquinolina, compuesta por dos anillos aromáticos en el mismo plano, les confiere características estructurales adecuadas para intercalarse entre los pares de bases nitrogenadas de la biomolécula.

A efectos de determinar si el ADN puede ser un blanco de acción para los compuestos de oxovanadio con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina explorado, y si la formación del compuesto de coordinación incrementa esta propiedad interactiva, se estudió la posible interacción de compuestos seleccionados con esta biomolécula a través de experimentos de desplazamiento de bromuro de etidio (BE) del aducto {ADN-BE}.

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, 1 % v/v de DMSO) el espectro de fluorescencia de esta molécula posee un máximo de emisión a 602 nm ($\lambda_{exc} = 510$ nm). Cuando esta molécula interacciona con el ADN, específicamente mediante intercalación entre los pares de bases nitrogenadas (Figura 7.1), 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} ¹⁻⁴.

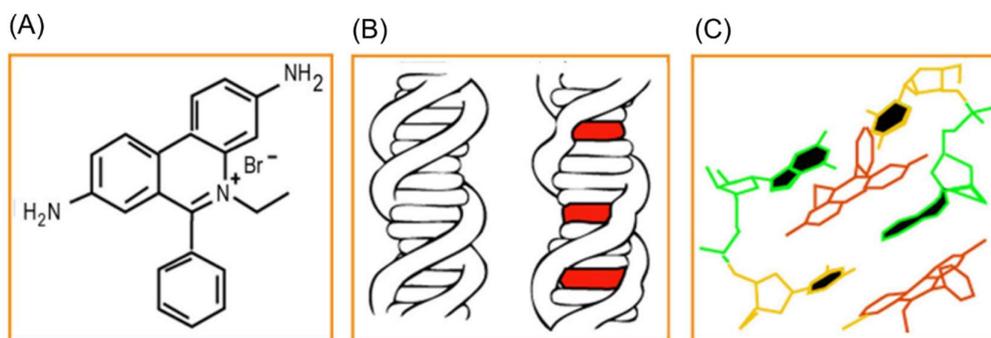


Figura 7.1. (A) Estructura del bromuro de etidio (BE, Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil fenantridinio). (B) El BE (rojo) se intercala entre las bases de la doble cadena de ADN. (C) Representación de las bases nitrogenadas en negro interaccionando con el BE (anaranjado). Las desoxirribosas de cada nucleótido se representan en anaranjado y verde. Imagen extraída de la referencia ⁵.

El aducto {ADN-BE} ($C_{ADN} = 1,5 \mu\text{M}$ (por nucleótido), $C_{BE} = 0,75 \mu\text{M}$) fue titulado con concentraciones incrementales de cada compuesto estudiado entre 0 y 15 μM (hasta una relación 1:10 respecto a la concentración de ADN). Los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 510$ nm) se midieron en el rango 540-670 nm.

7.2.1 Compuestos homolépticos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L}-\text{H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L}-\text{H})_2]$

Los primeros estudios de interacción con ADN se realizaron en el marco de la pasantía en el laboratorio del Prof. João Costa Pessoa, Centro de Química

Estrutural, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. En ese momento, se exploró la interacción con ADN del compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ (Figura 7.2), siendo este el más activo en epimastigotas de *T. cruzi* de la serie de compuestos homoléticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$ (Tabla 5.5, capítulo 5). A efectos comparativos, se estudió en paralelo la interacción del ligando libre L1 y del compuesto de oxovanadio (V) análogo $[V^VO(OCH_3)(L1-H)_2]$. Por otra parte, para poder comparar el efecto de los sustituyentes en la estructura del ligando L con la capacidad de desplazar el BE del aducto {ADN-BE}, se incluyeron los complejos $[V^{IV}O(L4-H)_2]$, su análogo $[V^VO(OCH_3)(L4-H)_2]$ y el ligando libre L4, dado que éste es el único derivado que no contiene sustituyentes halogenados (Figura 7.2).

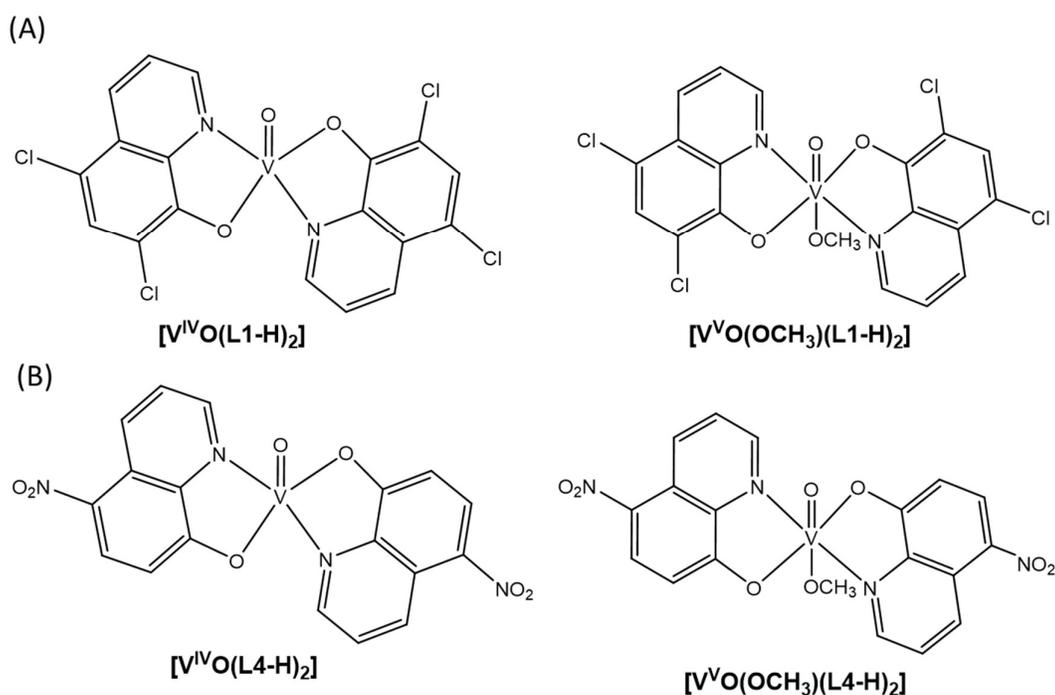


Figura 7.2. (A) Compuestos homoléticos de oxovanadio con el ligando L1, $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ y $[V^VO(OCH_3)(L1-H)_2]$ (B) Compuestos homoléticos de oxovanadio con el ligando L4, $[V^{IV}O(L4-H)_2]$ y $[V^VO(OCH_3)(L4-H)_2]$.

A la longitud de onda de excitación de trabajo, no se detectó emisión de fluorescencia correspondiente a la interacción directa de ADN con los

compuestos y ligandos seleccionados, ni fluorescencia intrínseca de los compuestos explorados. Tal como se discutió en el capítulo 3, si bien el espectro de emisión es despreciable, éste fue sustraído en la corrección de los datos obtenidos de la interacción compuesto con el aducto {ADN-BE}.

La Figura 7.3 muestra los espectros de emisión de fluorescencia corregidos (según lo descrito en el capítulo 3 de esta tesis) del aducto {ADN-BE}, a las concentraciones especificadas, con el agregado de cantidades incrementales de $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ y $[V^{IV}O(L4-H)_2]$. El aumento de la concentración de ambos compuestos expuestas al aducto produce una disminución en el rendimiento cuántico del aducto {ADN-BE}, efecto que es conocido como *quenching* de la fluorescencia.

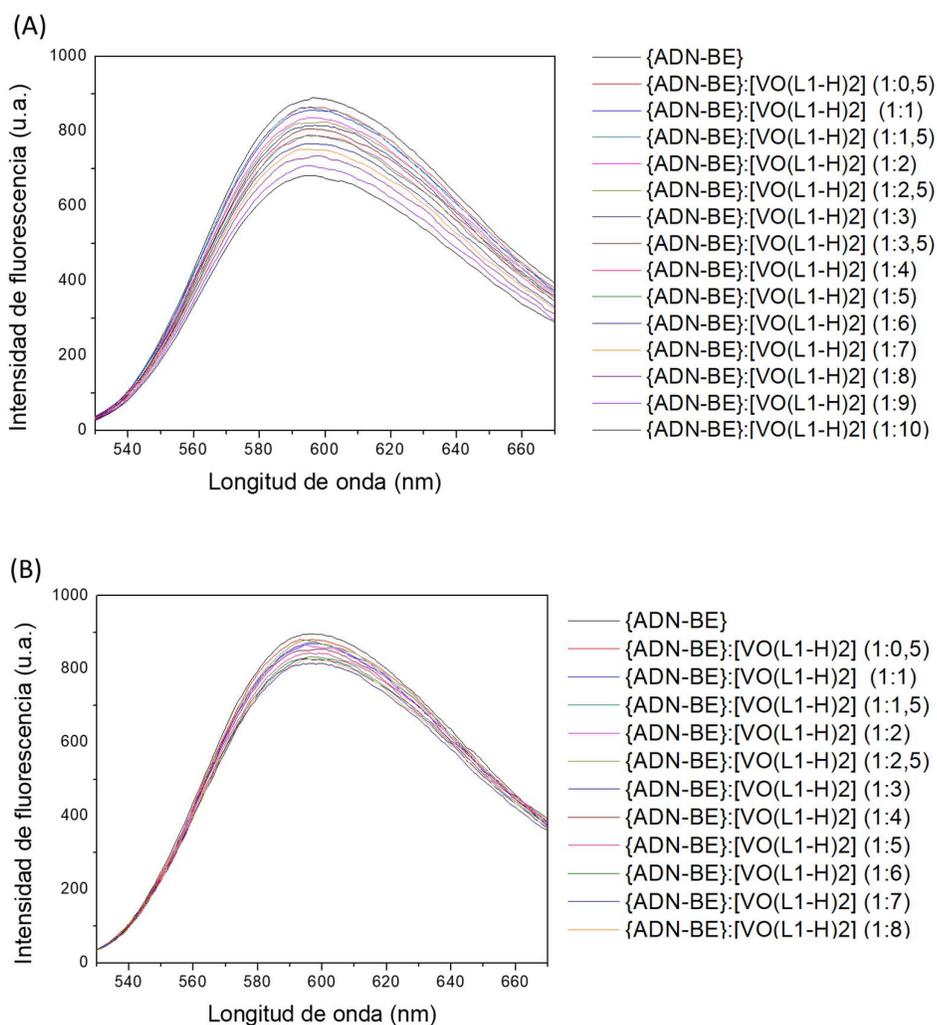


Figura 7.3. *Quenching* de la emisión fluorescente del aducto {ADN-BE} ($\lambda_{exc}= 510$ nm) observado por la interacción de los complejos: (A) $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ y (B) $[V^{IV}O(L4-H)_2]$. $C_{ADN}=1,5$ μ M, $C_{BE}=0,7$ μ M. Las muestras fueron preparadas en DMSO/Buffer Tris-HCl.

Los incrementos graduales de ambos complejos mostrados en la Figura 7.3, los análogos $[V^{VO}(OCH_3)(L1-H)_2]$ y $[V^{VO}(OCH_3)(L4-H)_2]$ y los ligandos libres L1 y L4, resultan en una leve disminución de la intensidad de fluorescencia, siendo esta mayor para los compuestos de coordinación en estudio que para los ligandos L1 y L4 en su forma libre (Figura 7.4).

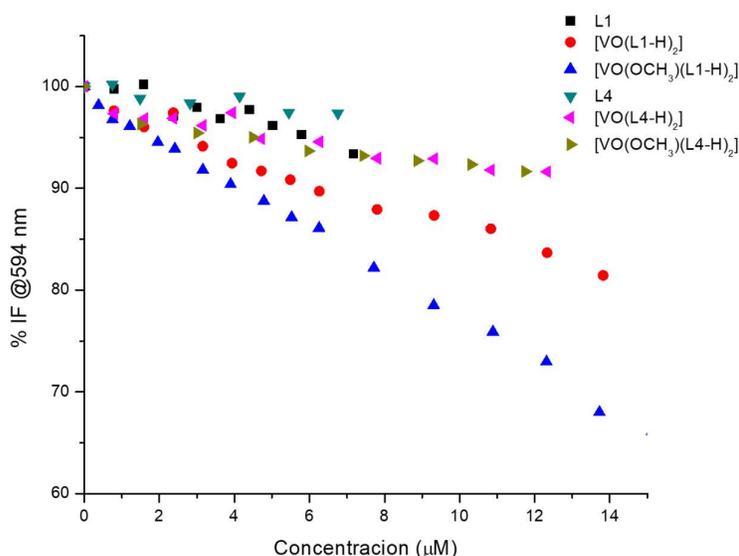


Figura 7.4. Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a $\lambda_{em} = 594$ nm al incrementar la concentración de los compuestos. $C_{ADN}=1,5$ μ M, $C_{BE}=0,7$ μ M. Las muestras fueron preparadas en DMSO/Buffer Tris-HCl.

La disminución relativa de fluorescencia (% IF) para los compuestos en estudio no supera el 20 % tras el agregado de 5 moles de compuesto por cada mol de {ADN-BE}, siendo muy similar para los cuatro complejos estudiados (Tabla 7.1)

Tabla 7.1. % de *quenching* tras una adición de 5 moles de compuesto por cada mol del aducto {AND-BE}

Compuesto	% <i>quenching</i>
L1	7 %
[V ^{IV} O(L1-H) ₂] ₈	12 %
[V ^{VO} (OCH ₃)(L1-H) ₂]	18 %
L4	3 %
[V ^{IV} O(L4-H) ₂]	7 %
[V ^{VO} (OCH ₃)(L4-H) ₂]	7 %

Se evaluaron los mecanismos implicados en el *quenching* de la fluorescencia del aducto {ADN-BE} mediante el análisis de Stern-Volmer ². El ajuste mostró ser lineal a las concentraciones de trabajo. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 7.5 el ajuste de Stern Volmer para los complejos [V^{IV}O(L1-H)₂] y [V^{IV}O(L4-H)₂]. El set de resultados completo para los ajustes de Stern-Volmer se resumen en la Tabla 7.2.

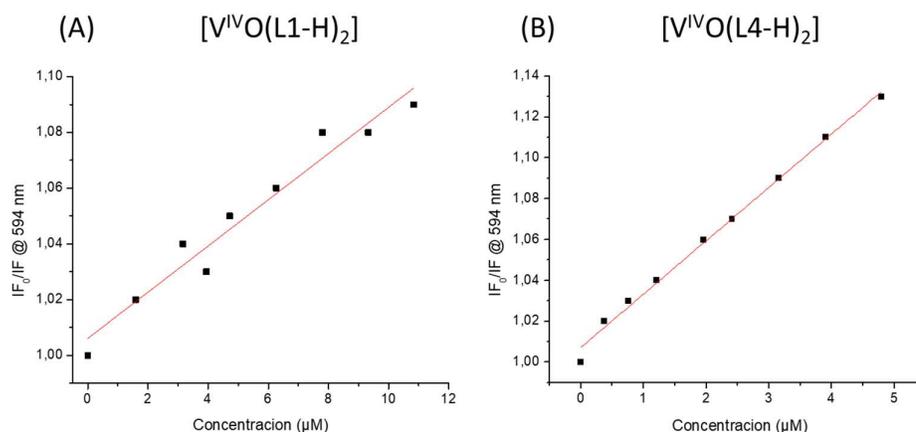


Figura 7.5. Ajuste de Stern Volmer para la titulación del aducto {ADN-BE} con concentraciones crecientes del complejo (A) [V^{IV}O(L1-H)₂] y (B) [V^{IV}O(L4-H)₂].

Tabla 7.2. Constantes de Stern-Volmer y valor de R² obtenidos en el ajuste para los sistemas [V^{IV}O(L-H)₂] en la unión competitiva del aducto {ADN-BE}

Compuesto	K _{sv} (M ⁻¹)	log K _{sv}	R ²
L1	9579	4,0	0,994
[V ^{IV} O(L1-H) ₂]	17242	4,2	0,987
[V ^{VO} (OCH ₃)(L1-H) ₂]	25173	4,4	0,991
L4	4105	3,6	0,992
[V ^{IV} O(L4-H) ₂]	7149	3,9	0,988
[V ^{VO} (OCH ₃)(L4-H) ₂]	6604	3,8	0,991

Como se describió previamente en el capítulo 3, la constante de Stern Volmer (K_{sv}) representa una medida directa de la eficiencia del proceso de *quenching* e indirecta de la afinidad de las moléculas exploradas por el ADN. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que los compuestos en estudio tienen una baja afinidad por la biomolécula. Los compuestos [V^{IV}O(L1-H)₂] y [V^{VO}(OCH₃)(L1-H)₂], los cuales mostraron un valor de logK_{sv} de 4,4, muestran una afinidad mayor que los análogos complejos con el ligando L4. No obstante, en la literatura se han reportado algunos compuestos con actividad antiparasitaria con valores de K_{sv} para la interacción competitiva con el aducto {ADN-BE} del mismo orden que los obtenidos en este trabajo ⁶⁻⁸.

7.2.2 Compuesto heteroléptico [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]

Utilizando las mismas condiciones experimentales, se estudió la posible interacción con ADN para el compuesto que resultó ser más activo de todos los explorados, [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]. Si bien los resultados discutidos anteriormente para la interacción de los compuestos homolépticos no resultaron muy alentadores, el objetivo principal del estudio de interacción del compuesto heteroléptico [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] con CT-ADN (CT del inglés *calf thymus*) podría dar idea del efecto del ligando tridentado en la interacción con la

biomolécula. A efectos comparativos, se incluyeron en el ensayo los ligandos libres L2 e IN.

A la longitud de onda de excitación de trabajo, no se encontró emisión de fluorescencia de la interacción directa de ADN con el compuesto $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ ni los ligandos libres IN y L2. El espectro fue sustraído en la corrección de los datos, según lo descrito en el Capítulo 3.

Tanto el complejo como los ligandos en su forma libre, disminuyen el rendimiento cuántico del aducto {ADN-BE}. En la Figura 7.6 se muestran los espectros de emisión corregidos para el experimento de titulación con el complejo $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ y el ajuste de Stern Volmer correspondiente.

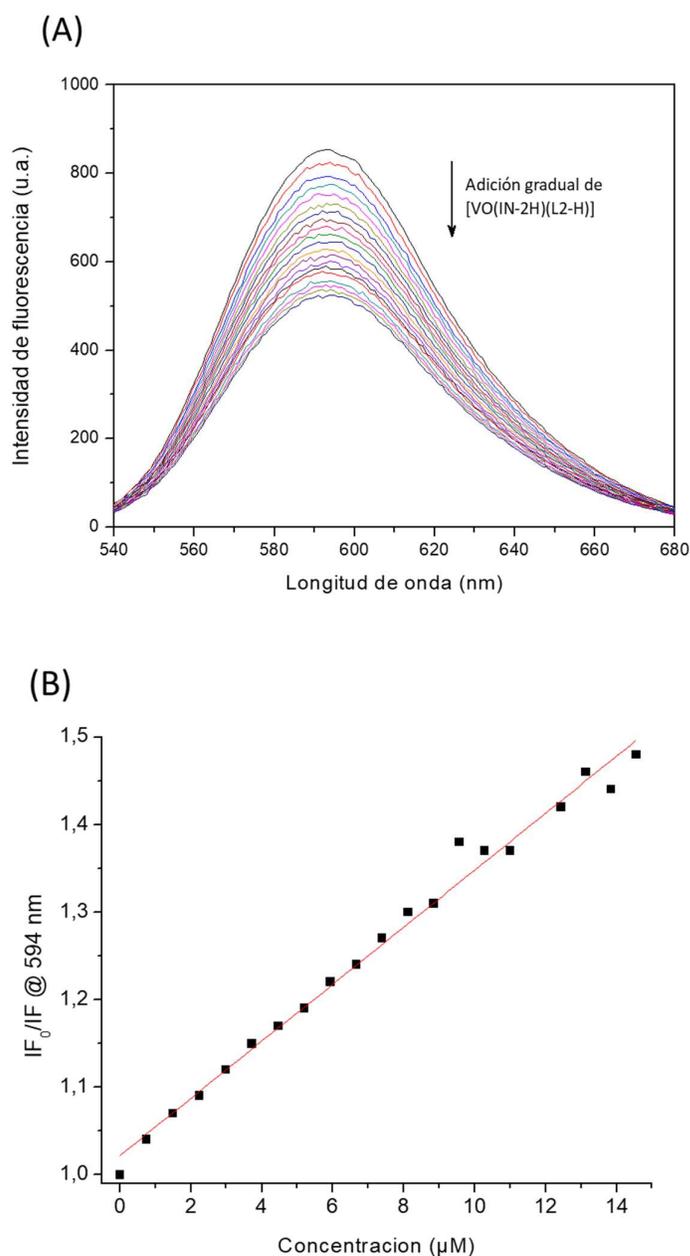


Figura 7.6. (A) *Quenching* de la emisión fluorescente del aducto {ADN-BE} ($\lambda_{exc}=510$ nm) observado por la interacción del complejo $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$. $C_{ADN}=1,5$ μM , $C_{BE}=0,7$ μM . Las muestras fueron preparadas en DMSO/Buffer Tris-HCl. (B) Ajuste de Stern Volmer para la titulación del aducto {ADN-BE} con concentraciones crecientes del complejo $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$.

El porcentaje de *quenching* tras los incrementos graduales tanto para el complejo $[V^{VO}(\text{IN-2H})(\text{L2-H})]$ como para los ligandos libres es muy similar. La

Figura 7.7 muestra un análisis de la intensidad de fluorescencia en el máximo del espectro de emisión (594 nm) cuando se aumenta la concentración de los compuestos en estudio.

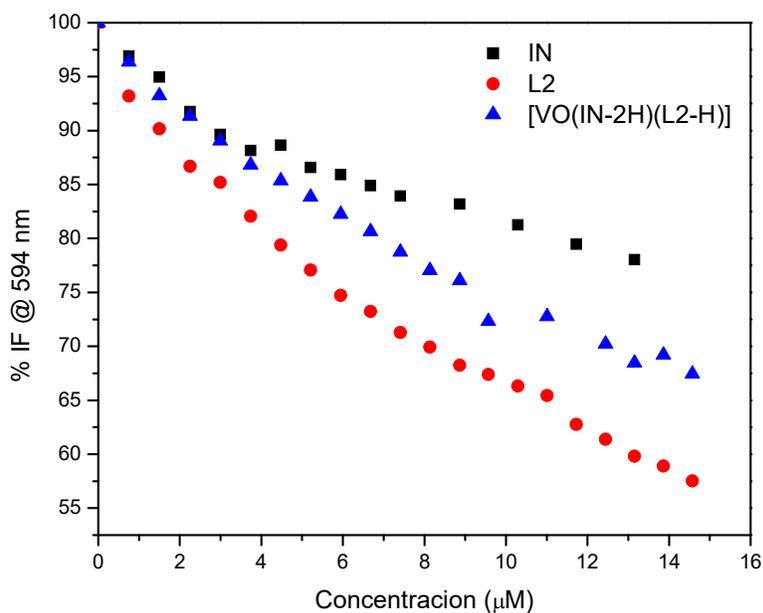


Figura 7.7. Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a $\lambda_{em} = 594$ nm al incrementar la concentración de los compuestos. $C_{ADN}=1,5 \mu\text{M}$, $C_{BE}=0,7 \mu\text{M}$. Las muestras fueron preparadas en DMSO/Buffer Tris-HCl.

Los valores de K_{sv} obtenidos (Tabla 7.3) tienen un orden similar a los reportados para los compuestos $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{L}-\text{H})_2]$ y $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{OCH}_3)(\text{L}-\text{H})_2]$ (Tabla 7.2).

Tabla 7.3. Constantes de Stern-Volmer y valor de R^2 obtenidos en el ajuste para los sistemas $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$ y ligandos libres en la unión competitiva del aducto {ADN-BE}

Compuesto	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$\log K_{sv}$	R^2
IN	19536	4,3	0,989
L2	47761	4,7	0,996
$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{IN}-2\text{H})(\text{L}2-\text{H})]$	32737	4,5	0,998

Si se analizan los resultados en su conjunto, estos se resumen en una baja afinidad por las moléculas en estudio hacia el CT-ADN. Por otra parte, no se evidenció un aumento drástico de la afinidad hacia la biomolécula por efecto de la coordinación de los ligandos derivados de 8-hidroxiquinolina al centro de oxovanadio (IV) o (V). La inclusión del ligando tridentado IN a la esfera de coordinación de este mismo centro, no parece aumentar la afinidad hacia la biomolécula, y de hecho parece afectarla de forma negativa.

Debido a los resultados presentados y discutidos anteriormente, no se continuó con el estudio de la interacción del resto de los compuestos explorados en esta tesis, ni de los posibles mecanismos de interacción con ADN involucrados, utilizando otras técnicas. Algunas de ellas, como el dicroísmo circular, electroforesis en gel o voltametría cíclica, podrían resultar útiles para determinar el tipo de interacción asociada ^{9,10}.

7.3 METALÓMICA

En el área del descubrimiento de nuevos potenciales fármacos, se han desarrollado numerosas estrategias para el desarrollo y estudio de los efectos celulares involucrados ¹¹⁻¹³. Entre ellos, las aproximaciones “ómicas” refieren al análisis integral con enfoques analíticos e informáticos de alto rendimiento, que permiten estudiar los roles, relaciones y acciones de moléculas en sistemas biológicos. Clásicamente, los estudios ómicos constituyen análisis cuantitativos y cualitativos como la genómica, transcriptómica, proteómica, y metabolómica ¹⁴.

La metalómica es un área emergente, particularmente relevante para la química inorgánica biológica, que involucra el estudio de las interacciones y asociaciones funcionales de metales en biomoléculas ¹⁴⁻¹⁹. Se enfoca, además, en determinar la identidad, cantidad y localización de especies metálicas en una célula u organismo celular. Para ello, se han empleado diversas técnicas analíticas que permiten obtener información de los metales en los sistemas biológicos, tales

como espectroscopía de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), espectroscopía de masas por ionización de electrospray (ESI-MS) y espectroscopía de absorción atómica (AAS). Las técnicas anteriormente mencionadas son capaces de proporcionar información cuantitativa de captación celular y cantidad de metal asociado con las biomoléculas ^{18, 20, 21}.

7.3.1 Ingreso a *T. cruzi*

Con el fin de estimar la cantidad de compuesto que ingresa a los parásitos, se cuantificó la cantidad total de vanadio capturada por los parásitos y/o fuertemente unida por los parásitos (no removible por lavado), así como la cantidad de vanadio que permanece en el medio de cultivo.

Los parásitos se incubaron con los compuestos seleccionados según los criterios establecidos en la *sección 5.4.1* del capítulo 5 (Figura 7.8), [V^{VO}(IN-H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)] y [V^{IVO}(L1-H)(mpo)], a concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas celulares (Tablas 5.1-5.9). En el caso de los compuestos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y [V^{IVO}(L1-H)₂], las concentraciones utilizadas corresponden a 1×, 5× y 10× el IC_{50, 5 días} determinado en epimastigotas, dado que el ensayo fue realizado previo al desarrollo del método para determinar el EC₅₀ a las 24 horas ^{22, 23}.

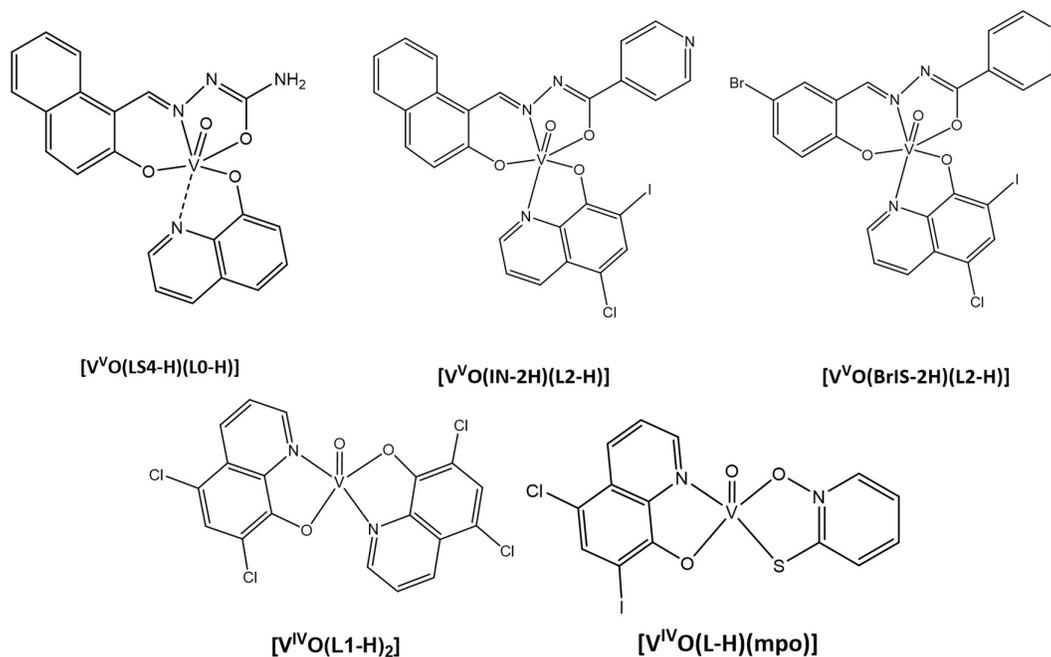


Figura 7.8. Compuestos de oxovanadio seleccionados para los estudios metalómicos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)], [V^{IVO}(L1-H)₂] y [V^{IVO}(L1-H)(mpo)].

Luego del tiempo de incubación, los parásitos fueron separados del sobrenadante por centrifugación y lavados con PBS 1X, como se describió previamente en el capítulo 3. La cantidad de vanadio se determinó en ambas fracciones por espectrometría de absorción atómica electroterámica.

7.3.1.1 Compuesto [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]

Para el compuesto [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], representante de la familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio con 8-hidroxiquinolina y ligandos derivados la semicarbazona de salicilaldehído, se midió la captura de vanadio total sobre la forma epimastigota luego de 24, 72 y 120 h (5 días) a concentraciones correspondientes a 6,2 μM, 30,9 μM y 61,9 μM.

En la Figura 7.9 se representa la cantidad de vanadio (expresada en nanogramos) respecto al incremento en el tiempo de incubación para las tres concentraciones de trabajo.

Para las incubaciones correspondientes a $1 \times IC_{50}$ del compuesto en estudio, la incorporación del metal crece de forma lineal en el período de tiempo analizado con un coeficiente de ingreso de 3,1 pg/h (Figura 7.9A). Por su parte, cuando se analizan los resultados obtenidos para las incubaciones del mismo compuesto a concentraciones correspondientes a $5 \times IC_{50}$, el ingreso aumenta de forma lineal hasta las 72 h, con un coeficiente de ingreso de 34 pg/h, donde se alcanza un valor constante (Figura 7.9B). Finalmente, el análisis para las incubaciones con las concentraciones mayores, $10 \times IC_{50}$, el porcentaje de captura llega al valor máximo a las 24 horas de incubación y los valores para las incubaciones a tiempos mayores se pueden considerar constantes.

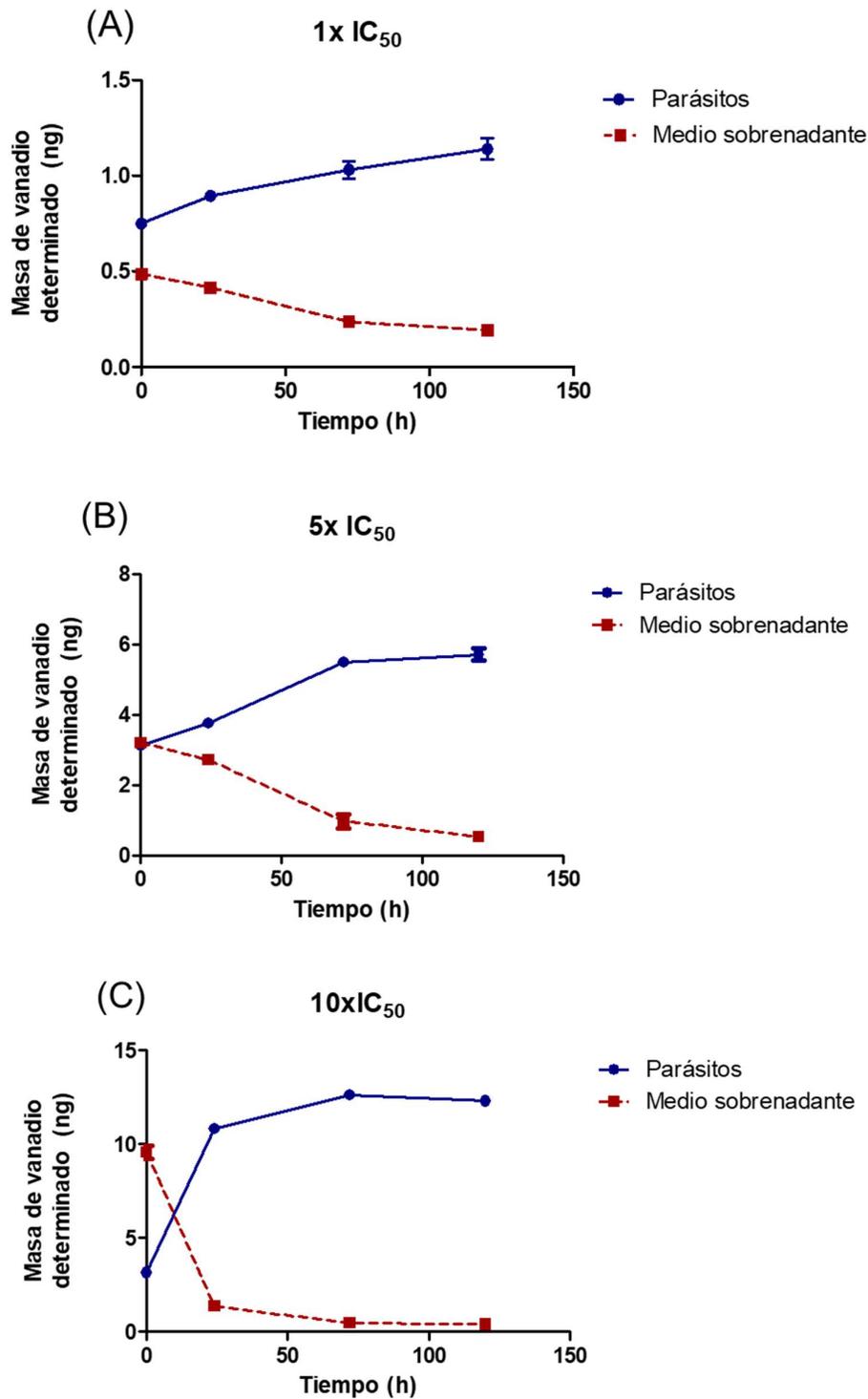


Figura 7.9. Determinación de vanadio en epimastigotas y en el medio de cultivo sobrenadante luego de la incubación con [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]. Los parásitos se incubaron con 1x, 5x y 10x el IC₅₀ del compuesto en *T. cruzi* previamente determinado.

Se presenta el valor promedio de las determinaciones para tres experimentos independientes y su desviación estándar.

Este análisis evidencia que las incubaciones a concentraciones mayores llegan a un valor de saturación de forma mucho más rápida.

La captura por parte de los parásitos expresada en porcentajes promedio de tres experimentos independientes se detallan en la Tabla 7.4. Los porcentajes de ingreso (% ingreso) corresponden al % de vanadio determinado en los parásitos (pellet de la extracción) relativo al vanadio total determinado luego de la incubación (pellet y sobrenadante).

Tabla 7.4. Vanadio capturado por epimastigotas de *T. cruzi* para las incubaciones con el compuesto [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)].

Concentración de incubación (μM) ^c	Tiempo de incubación (h)	% ingreso	SD
1x IC ₅₀ 6,2 μ M	0 ^a	60,7	1,5
	24	68,3	1,7
	72	81,4	6,2
	120	85,6	7,2
5x IC ₅₀ 30,9 μ M	0 ^a	49,3	0,5
	24	58,1	0,7
	72	84,9	1,8
	120	91,3	2,7
10x IC ₅₀ 61,9 μ M	0 ^a	24,7	0,2
	24	88,9	0,2

	72	96,5	1,3
	120	96,9	0,9

^a medido inmediatamente luego de la adición del compuesto

^b % ingreso: % de vanadio capturado por los parásitos (en el pellet) relativo al vanadio total determinado (pellet y sobrenadante).

^c Los valores de IC₅₀ en *T. cruzi* fueron discutidos en el Capítulo 5.

Evaluando en su conjunto los porcentajes de captura a las 24 horas de tratamiento, para todas las concentraciones se encontró un alto porcentaje de captura total, siendo esta de 68,3 % (1x IC₅₀), 58,5 % (5x IC₅₀) y 88,9 % (10x IC₅₀). Estos porcentajes obtenidos son bastante altos si se comparan con los resultados reportados para compuestos heterolépticos de vanadio similares en células tumorales ²⁴.

Estos resultados constituyen los primeros en ser publicados en la literatura científica acerca del ingreso de compuestos de vanadio en *T. cruzi* ²³. Posteriormente a la publicación de estos resultados, nuestro grupo realizó determinaciones similares para el compuesto [V^{IV}O(LS1-H)(5-amino-1,10-fenantrolina)] ²⁵, líder de la serie de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y ligandos intercalantes del ADN derivados de la 1,10-fenantrolina descritos en la sección Antecedentes del Capítulo 2 ^{9, 26-29}. Los valores de captura para este complejo fueron alrededor del 4 %.

Tal como se ha discutido en el Capítulo 6, caracterizar las especies responsables de la actividad biológica en este caso sería muy complejo, sin embargo, de la comparación de estos resultados, donde los valores obtenidos para el complejo [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] son significativamente mayores a los obtenidos para el estudio del complejo [V^{IV}O(LS1-H)(5-amino-1,10-

fenantrolina)], se desprende que las especies presentes en el experimento tienen otra naturaleza.

7.3.1.2 Compuesto [$V^{IV}O(L1-H)_2$]

Para el caso del compuesto [$V^{IV}O(L1-H)_2$], representante de la familia de compuestos homoléticos de oxovanadio con 8-hidroxiquinolina, las condiciones de incubación fueron las mismas que las descritas para [$V^{VO}(LS4-H)(L0-H)$]. En este caso, las concentraciones de trabajo utilizadas relativas al IC_{50} fueron 0,21 μM , 1,05 μM y 2,10 μM .

Como se observa en la Tabla 7.5, la incorporación del metal parece ser muy rápida, existiendo solo un pequeño aumento en la cantidad incorporada cuando se aumenta la dosis y el tiempo de exposición. Si se analizan los porcentajes luego de 24 horas de incubación, 17,6% ($1 \times IC_{50}$), 20,7 % ($5 \times IC_{50}$) y 19,7 % ($10 \times IC_{50}$), estos son menores que los encontrados para el complejo [$V^{VO}(LS4-H)(L0-H)$]²³ y mayores que los obtenidos para el compuesto complejo [$V^{IV}O(LS1-H)(5\text{-amino-1,10-fenantrolina})$], líder de la serie de compuestos heteroléticos de oxovanadio (IV) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y ligandos intercalantes del ADN derivados de la 1,10-fenantrolina²⁵.

Tabla 7.5. Vanadio capturado por epimastigotas de *T. cruzi* para las incubaciones con el compuesto [V^{IV}O(L1-H)₂].

Concentración de incubación (μM) ^c	Tiempo de incubación (h)	% ingreso	SD
1x IC ₅₀ 0,21 μM	0 ^a	16,1	0,56
	24	17,6	0,70
	72	18,6	0,12
	120	18,7	0,74
5xIC ₅₀ 1,05 μM	0 ^a	17,3	0,09
	24	20,7	1,70
	72	21,5	0,12
	120	22,5	0,09
10xIC ₅₀ 2,10 μM	0 ^a	17,5	0,39
	24	19,7	0,94
	72	21,4	0,11
	120	24,0	0,27

^a medido inmediatamente luego de la adición del compuesto

^b % ingreso: % de vanadio capturado por los parásitos (en el pellet) relativo al vanadio total determinado (pellet y sobrenadante).

^c Los valores de IC₅₀ en *T. cruzi* fueron discutidos en el capítulo 5.

No es sorprendente que existan diferencias entre el porcentaje de captura del compuesto homoléptico [V^{IV}O(L1-H)₂] y el [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], conteniendo el ligando tridentado LS4. Las mismas podrían relacionarse tanto con las

diferencias en la naturaleza química de los compuestos como con las diferencias en la especiación en el medio de cultivo BHI-Triptosa. Dado que ambos son complejos neutros, las diferencias en las propiedades fisicoquímicas como la lipofilia podría ser una determinante del comportamiento observado.

7.3.1.3 Compuesto [V^{VO}(IN-H)(L2-H)]

Para la serie de compuestos de oxovanadio (V) con derivados de 8-hidroxiquinolina y el ligando tridentado IN derivado de la isoniazida, el compuesto seleccionado según los criterios mencionados en la *sección 5.4.1* es el [V^{VO}(IN-H)(L2-H)].

Dado que se trata del compuesto más activo de todos los explorados en la tesis, para este compuesto además de estudiar el ingreso en la forma epimastigotas de *T. cruzi*, el estudio se extendió al estadio infectivo tripomastigota. Para poder comparar los resultados obtenidos en ambas formas del parásito, si bien el valor de EC₅₀ depende del estadio, el ensayo se realizó empleando las mismas condiciones de incubación para ambas. Las concentraciones seleccionadas correspondieron a 1x, 5x y 10x el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas celulares (0,29 μM, 1,45 μM y 2,90 μM, respectivamente). Dado que las concentraciones utilizadas fueron determinadas a 24 horas, en este caso las incubaciones se llevaron a cabo solamente a los tiempos 4 h, para ver la incorporación temprana, y 24 h.

La Tabla 7.6 compara el porcentaje del metal a las tres condiciones de trabajo, a ambos tiempos (4 y 24 h), en las dos formas de *T. cruzi*. Dado que no existen diferencias significativas entre los porcentajes adquiridos a los tiempos estudiados a las tres dosis de tratamiento, se sugiere que la incorporación es rápida, llegando a valores de saturación antes de las 4 horas de tratamiento.

En epimastigotas, los porcentajes obtenidos a las 24 horas, 4,4 % (1× EC₅₀), 3,6 % (5× EC₅₀) y 3,6 % (10× EC₅₀), son menores que los encontrados para los

complejos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]²³ y [V^{IVO}(L1-H)₂]²², y del mismo orden que los obtenidos para el compuesto [V^{IVO}(LS1-H)(5-amino-1,10-fenantrolina)]²⁵.

Tabla 7.6. % de vanadio capturado por epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* para las incubaciones con el compuesto [V^{VO}(IN-H)(L2-H)].

Concentración de incubación (μM) ^b	% ingreso ^a ± SD			
	Epimastigotas		Tripomastigotas	
	4h	24 h	4h	24 h
1x EC ₅₀ - 0,29 μM	4,5 ± 0,4	4,4 ± 0,7	7,1 ± 0,4	8,6 ± 0,4
5x EC ₅₀ - 1,45 μM	2,4 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1	4,3 ± 0,1
10x EC ₅₀ - 2,90 μM	2,0 ± 0,4	3,6 ± 0,05	3,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1

^a % ingreso: % de vanadio capturado por los parásitos (en el pellet) relativo al vanadio total determinado (pellet y sobrenadante).

^b Los valores de EC₅₀ en *T. cruzi* fueron discutidos en el capítulo 5.

Comparando los porcentajes de vanadio capturado para ambas formas, los valores obtenidos para la forma tripomastigota son mayores que para la obtenida en epimastigotas. De hecho, cuando se incuban los parásitos con 1x EC₅₀, el porcentaje casi se duplica (8,6 % en tripomastigotas y 4,4 % en epimastigotas). Estos resultados podrían explicar parcialmente las diferencias observadas en los EC₅₀ determinados en ambas formas, donde en tripomastigotas, para este complejo, el valor obtenido es más de diez veces menor que el determinado en la forma epimastigota. Estos resultados, fueron los primeros resultados reportados de captura de compuestos metálicos reportados en la forma tripomastigota de *T. cruzi*³⁰.

7.3.1.4 Compuesto [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]

El compuesto [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)], líder de la familia de compuestos de oxovanadio (V) con derivados de 8-hidroxiquinolina y el ligando tridentado BrIS derivado de la isoniazida tiene estructura muy similar al complejo [V^{VO}(IN-H)(L2-H)] descrito anteriormente. Con el objetivo de saber si la modificación en la estructura del ligando tridentado tiene un efecto en el ingreso de este, y este puede ser relacionado con las diferencias observadas a nivel de su comportamiento biológico, se estudió el ingreso en la forma epimastigota de *T. cruzi* a las 4 y 24 h de incubación, utilizando concentraciones correspondientes a 1×, 5× y 10× el EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas celulares (0,78 μM, 3,90 μM y 7,80 μM, respectivamente).

Tal como se presenta en la Tabla 7.7, el comportamiento es similar al del compuesto [V^{VO}(IN-H)(L2-H)]. Los porcentajes de incorporación obtenidos están en el mismo orden, siendo estos 8,5 % (1× EC₅₀), 5,3 % (5× EC₅₀) y 3,4 % (10× EC₅₀), luego de 24 horas de incubación.

Tabla 7.7. % de vanadio capturado por epimastigotas de *T. cruzi* para las incubaciones con el compuesto [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]

Concentración de incubación (μM) ^b	% ingreso ^a ± SD	
	4h	24 h
1x EC ₅₀ - 0,78 μM	5,3 ± 0,5	8,5 ± 0,6
5x EC ₅₀ - 3,90 μM	1,3 ± 0,4	5,3 ± 0,2
10x EC ₅₀ - 7,80 μM	1,1 ± 0,1	3,4 ± 0,1

^a % ingreso: % de vanadio capturado por los parásitos (en el pellet) relativo al vanadio total determinado (pellet y sobrenadante).

^b Los valores de EC₅₀ en *T. cruzi* fueron discutidos en el capítulo 5.

7.3.1.5 Compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$

Como representante de la familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) con derivados de la 8-hidroxiquinolina y el ligando mpo, se seleccionó el compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$ según los criterios discutidos anteriormente.

La incorporación del metal se estudió sobre la forma epimastigota, utilizando las mismas condiciones de incubación que las descritas para los demás complejos que contienen el ligando L2, $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ (sección 7.3.1.3) y $[V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]$ (sección 7.3.1.4). En este caso, las concentraciones de trabajo utilizadas relativas al EC_{50} previamente determinado en la forma epimastigota fueron 1,74 μM , 8,70 μM y 17,4 μM .

Los resultados se muestran en la Tabla 7.8. Al igual que lo discutido para los compuestos anteriores, la incorporación pareciera ser rápida, llegando a valores máximos en la determinación correspondiente a las 4 horas de incubación. Luego de 24 horas de incubación, los valores de incorporación obtenidos, 2,2 % ($1 \times EC_{50}$), 1,4 % ($5 \times EC_{50}$) y 1,1 % ($10 \times EC_{50}$) son menores que los encontrados para los complejos $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$ ²³ y $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ ²², $[V^{IV}O(LS1-H)(5\text{-amino-1,10-fenantrolina})]$ ²⁵, $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ ³⁰ y $[V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]$.

Tabla 7.8. % de vanadio capturado por epimastigotas de *T. cruzi* para las incubaciones con el compuesto [V^{IV}O(L2-H)(mpo)]

Concentración de incubación (μM) ^b	% ingreso ^a ± SD	
	4h	24 h
1x EC ₅₀ – 0,67 μM	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1
5x EC ₅₀ – 3,35 μM	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2
10x EC ₅₀ – 6,70 μM	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1

^a % ingreso: % de vanadio capturado por los parásitos (en el pellet) relativo al vanadio total determinado (pellet y sobrenadante).

^b Los valores de IC₅₀ en *T. cruzi* fueron discutidos en el capítulo 5.

7.3.2 Asociación con macromoléculas

Una vez determinada la cantidad total de compuesto que ingresa a los parásitos, se analizó la distribución subcelular de los compuestos metálicos en *T. cruzi* evaluando la asociación de los compuestos seleccionados con macromoléculas de diferente naturaleza.

Los parásitos se incubaron con los mismos compuestos seleccionados a las mismas concentraciones de trabajo especificadas para la determinación de la captura total (sección 7.3.1).

Para todos los casos, el tiempo de incubación previo a la separación de las macromoléculas fue de 24 horas. Luego de cada tratamiento, se obtuvo el ADN y el ARN de los parásitos mediante protocolos estándar especificados en el Capítulo 3 (sección 3.5.2.2) y se cuantificaron en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop). La concentración de ADN y ARN obtenidas para todas las extracciones resultó de 150-200 ng/μL y 450-500 ng/μL, respectivamente. Por otra parte, se separó una fracción de proteínas solubles y una fracción insoluble conteniendo proteínas insolubles y lípidos de membrana, entre otras moléculas insolubles. La concentración de vanadio se determinó en

todas las fracciones por espectrometría de absorción atómica electrotrémica ^{22, 23,}

^{30,}

7.3.2.1 Compuestos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y [V^{IVO}(L1-H)₂]

Luego de 24 horas de tratamiento con los compuestos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y [V^{IVO}(L1-H)₂] a las concentraciones especificadas (6,2 μM, 30,9 μM y 61,9 μM para [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]; 0,21 μM, 1,05 μM y 2,10 μM para [V^{IVO}(L1-H)₂]), el patrón encontrado de distribución de vanadio asociado a las macromoléculas analizadas fue similar para las tres condiciones para ambos compuestos (Figura 7.10).

Sin prejuicio de las variaciones en los porcentajes de incorporación totales discutidos en la secciones 7.3.1.1 y 7.3.1.2, no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes determinados para las tres concentraciones utilizadas (análisis ANOVA con corrección de Bonferroni *post hoc* para comparaciones múltiples), a excepción del porcentaje de vanadio asociado a ADN en las condiciones de incubación correspondientes a 1x y 5x IC₅₀ para el compuesto [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], donde se determinó un porcentaje mayor para las incubaciones correspondientes a 1x IC₅₀.

Para ambos compuestos, se determinó una asociación preferencial por la fracción de proteínas solubles, con un porcentaje promedio de 60 % y 49 % del vanadio total asociado para [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y [V^{IVO}(L1-H)₂] respectivamente. El porcentaje de vanadio encontrado en la fracción insoluble no superó el 8 % para los tratamientos con [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)] y 11 % para las incubaciones con [V^{IVO}(L1-H)₂]. En cuanto a las fracciones de ADN y ARN, el porcentaje de vanadio asociado fue de 23 y 11 %, respectivamente, para las incubaciones con [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]. Para el caso de [V^{IVO}(L1-H)₂], los valores fueron del mismo orden, siendo estos valores alrededor de 27 y 12 %.

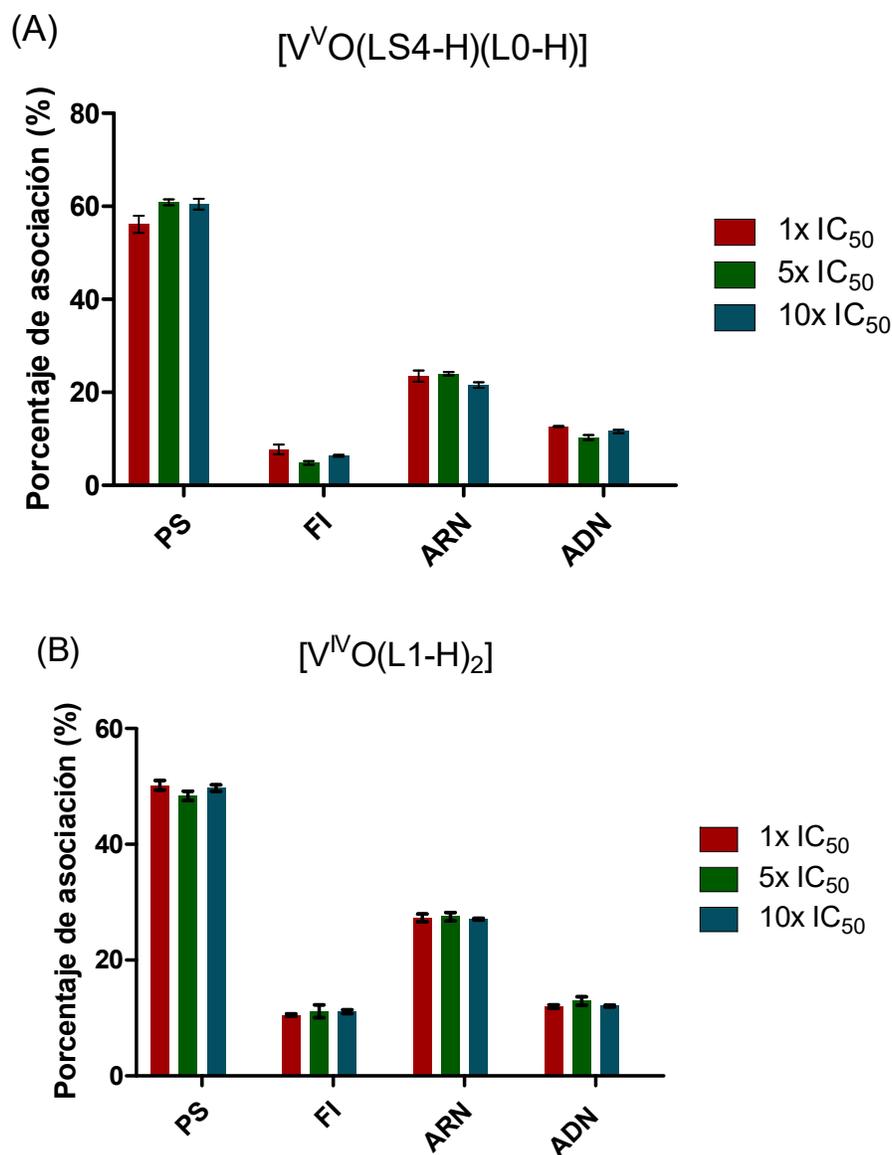


Figura 7.10. Porcentaje de vanadio asociado a las distintas macromoléculas aisladas luego de 24 horas de incubación con 1x, 5x y 10x IC₅₀ previamente determinado para el compuesto (A) $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$ y (B) $[V^{VO}(L1-H)_2]$. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes de asociación con ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y fracción insoluble (FI).

Si bien el patrón obtenido para ambos complejos tiene una similitud, los porcentajes son algo diferentes. Dado que se trata de compuestos de vanadio con diferentes ligandos, es de esperar que ambos tengan diferencias en cuanto a la

especiación química en el medio de cultivo y en el medio intracelular. En estos experimentos, se está determinando la cantidad de vanadio asociado, por lo que, si el compuesto se hidrolizara formando anión vanadato, éste podría ingresar por canales iónicos (tales como canales de fosfatos), mientras que los complejos tienden a cruzar las membranas por difusión pasiva^{31, 32}. Por lo tanto, la naturaleza química de los compuestos y los cambios en la especiación química podrían estar directamente relacionados con los porcentajes de ingreso y distribución.

El hecho de que la captura total sea diferente en ambos sistemas y que los porcentajes de asociación, aunque tengan relación en su patrón, no coincidan, sugiere que la naturaleza de los ligandos tiene efectos significativos en el análisis metalómico, revelando que, para ambos sistemas, las especies presentes en el medio biológico son diferentes.

7.3.2.2 Compuestos $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$

La distribución subcelular de los compuestos estructuralmente relacionados $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$ fue analizada luego del tratamiento por 24 horas con los compuestos a las concentraciones correspondientes a 1x, 5x y 10x EC_{50} previamente determinado en la forma tripomastigota. Para el primero de ellos, las concentraciones de trabajo fueron 0,29 μM , 1,45 μM , y 2,90 μM , mientras que para el segundo las concentraciones de incubación fueron 0,78 μM , 3,90 μM y 7,80 μM .

La Figura 7.11 detalla el patrón de distribución de vanadio asociado a las macromoléculas analizadas en epimastigotas de *T. cruzi*. Para ambos complejos estructuralmente relacionados, al igual que se discutió en la sección 7.3.1.3 acerca de la captura total, se encontró un patrón similar.

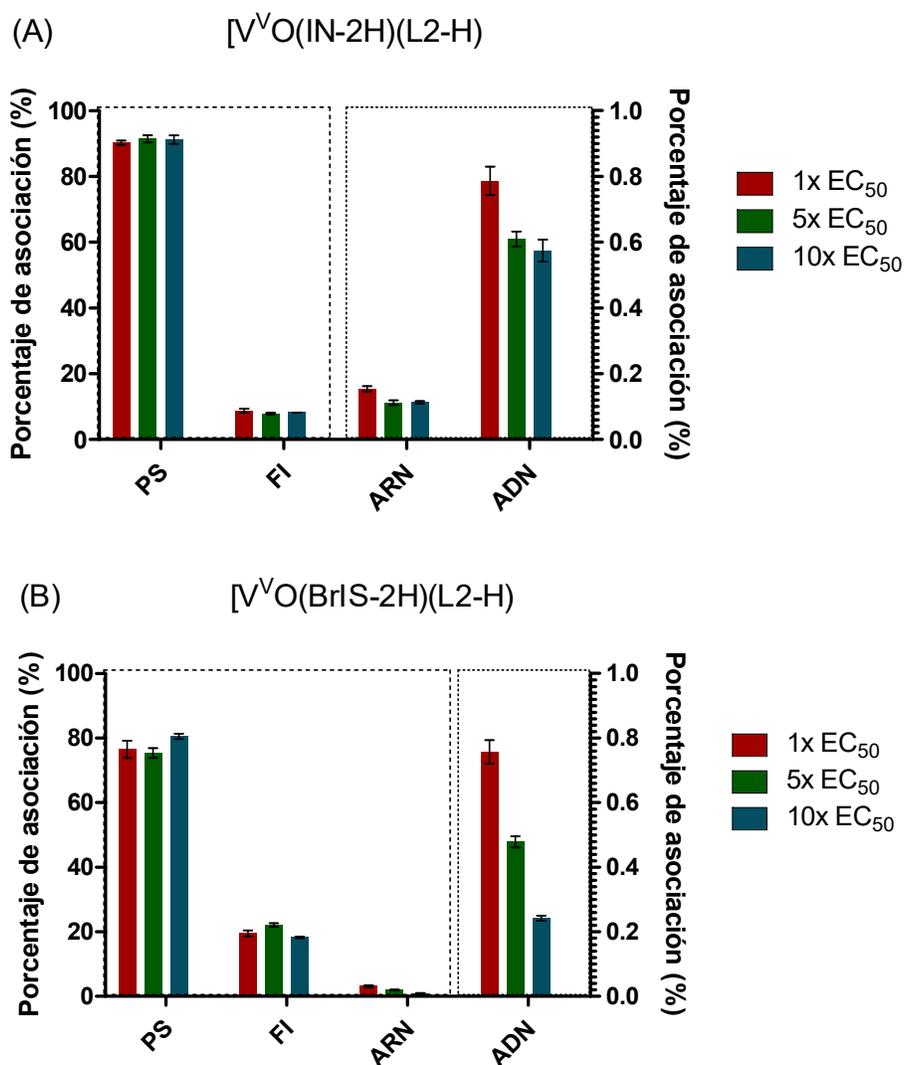


Figura 7.11. Porcentaje de vanadio asociado a las distintas macromoléculas aisladas de epimastigotas de *T. cruzi* luego de 24 horas de incubación con 1x, 5x y 10x EC₅₀ previamente determinado para el compuesto (A) $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ y (B) $[V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]$. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes de asociación con ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y fracción insoluble (FI).

Al igual que lo discutido para los complejos $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$ y $[V^{IVO}(L1-H)_2]$, se determinó una asociación preferencial por la fracción de

proteínas solubles, con un porcentaje promedio de 91 % y 77 % del vanadio total asociado para $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$, respectivamente.

El porcentaje de vanadio encontrado en las fracciones correspondientes a los ácidos nucleicos no superó el 4 %, lo que indica que la llegada al ADN y ARN de los compuestos heteroléptico estudiados es mínima. La asociación insignificante con ADN, en conjunto con la baja afinidad por esta biomolécula, analizada y discutida previamente en la *sección 7.2.2*, sugieren que el ADN no es uno de los principales blancos de acción de este tipo de compuestos.

La asociación preferencial de estos dos compuestos coincide con la de los compuestos discutidos anteriormente (fracción de proteínas solubles). La diferencia en los porcentajes podría estar relacionada con las diferencias en la especiación química de los diferentes compuestos. En el Capítulo 4 se discutió las similitudes estructurales de estos compuestos al estado sólido y en disolución. Por esta razón, no es sorprendente que los porcentajes obtenidos entre $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ y $[V^VO(BrIS-2H)(L2-H)]$ tengan patrones muy similares. Si bien se espera que, una vez que los compuestos estén disueltos y expuestos al cultivo, éstos tengan cambios químicos, el hecho de que ambos compuestos contienen el mismo ligando derivado de la 8-hidroxiquinolina y un ligando tridentado derivado de un aldehído y la isoniazida coordinados a un centro de oxovanadio (V) en geometría octaédrica, hace esperable que la especiación a nivel biológico tenga relación, y por lo tanto su comportamiento ante las células.

A efectos de comparar si la distribución subcelular depende del estadio celular, el análisis metalómico de asociación con macromoléculas para el compuesto $[V^VO(IN-2H)(L2-H)]$ (compuesto más activo de todos los explorados) se realizó sobre la forma tripomastigota en las mismas condiciones de trabajo que las utilizadas para la forma no infectiva epimastigota.

Si bien en la forma infectiva se había encontrado una cantidad aumentada de captura total de vanadio, la asociación a macromoléculas resultó coincidir con la reportada para la forma epimastigota (Figura 7.12). De hecho, no existen

diferencias significativas entre los valores de ambas formas, a las tres concentraciones analizadas.

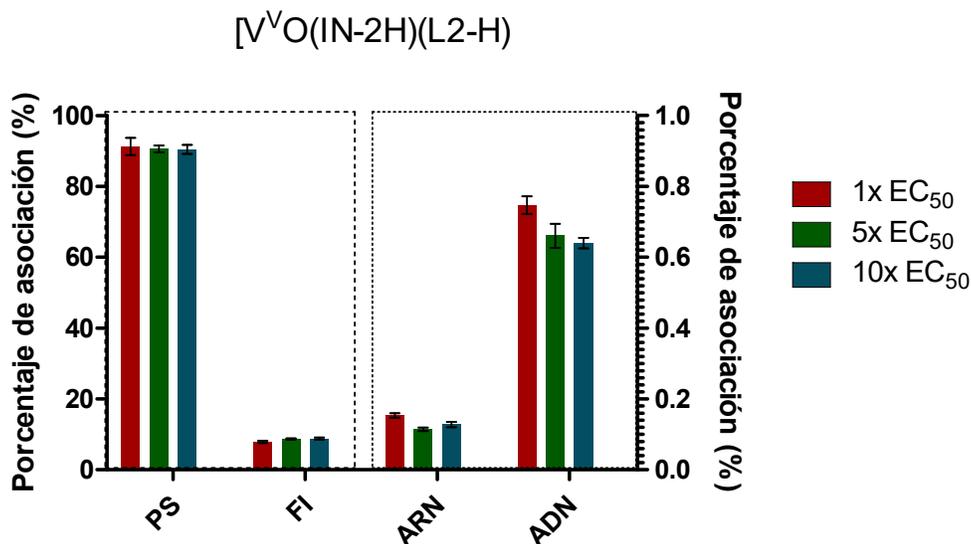


Figura 7.12. Porcentaje de vanadio asociado a las distintas macromoléculas aisladas de tripomastigotas de *T. cruzi* luego de 24 horas de incubación con 1x, 5x y 10x EC₅₀ previamente determinado para el compuesto $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes de asociación con ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y fracción insoluble (FI).

7.3.2.3 Compuesto $[V^{VO}(L2-H)(mpo)]$

El análisis de distribución tras 24 horas de incubación con el compuesto líder $[V^{VO}(L2-H)(mpo)]$ a las concentraciones de trabajo (0,67 μ M, 3,35 μ M y 6,70 μ M), muestra una asociación preferencial que coincide con la discutida anteriormente para el resto de los complejos metálicos estudiados y el porcentaje de asociación determinado fue del mismo orden. Particularmente, se encontró una asociación cercana a 87 % a proteínas solubles, independientemente de la concentración de incubación inicial (Figura 7.13)

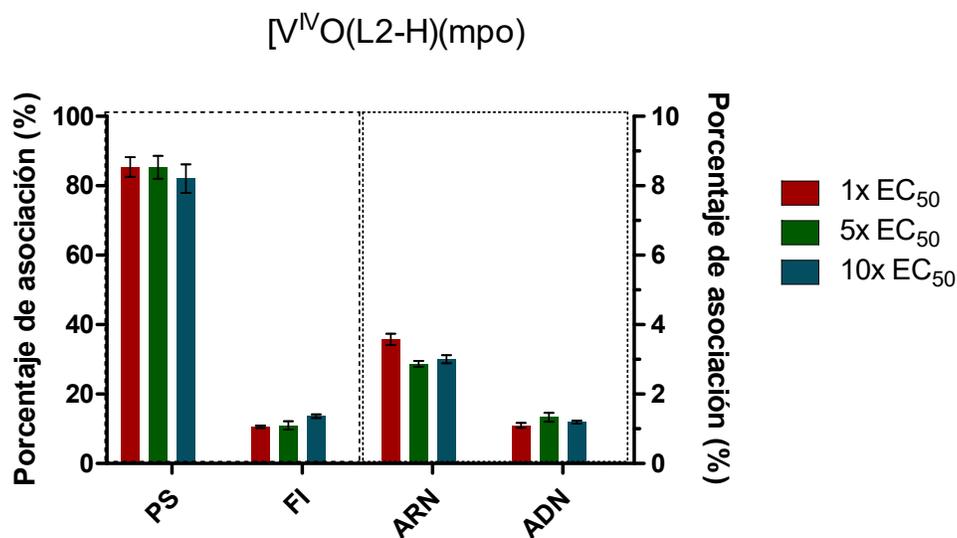


Figura 7.13. Porcentaje de vanadio asociado a las distintas macromoléculas aisladas de epimastigotas de *T. cruzi* luego de 24 horas de incubación con 1x, 5x y 10x EC₅₀ previamente determinado para el compuesto $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres experimentos independientes de asociación con ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y fracción insoluble (FI).

Similar a lo discutido previamente, la cantidad de vanadio determinada en la fracción de proteínas insolubles es menor a la determinada en la fracción soluble, en este caso cercano al 13 %. En cuanto a la asociación con ácidos nucleicos, el porcentaje de vanadio se acerca al 4 %, sugiriendo también en este caso, que la asociación con ADN y al ARN, es pequeña.

7.3.2.4 Análisis global

Analizando los resultados de forma integral, la distribución de los 5 compuestos estudiados, $[V^{VO}(LS4-H)(L0-H)]$ ²³ y $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ ²², $[V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]$ ³⁰, $[V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]$ y $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$, muestra una tendencia clara. La asociación a los ácidos nucleicos es muy baja y la asociación a proteínas solubles corresponde al mayor de los porcentajes determinados. El

patrón de distribución respecto a los ácidos nucleicos se asemeja al discutido para el compuesto [V^{IV}O(LS1-H)(5-amino-1,10-fenantrolina)]²⁵, pero sin embargo, la asociación preferencial en ese caso fue hacia las proteínas insolubles. Como ya se ha comentado al comparar los compuestos que contienen ligandos tridentados y el compuesto homoléptico de oxovanadio (IV) estudiado, las diferencias en la distribución están directamente relacionado con la especiación, e indirectamente, con las diferencias en cuanto a su comportamiento biológico.

7.4 RECUPERACIÓN DE LOS PARÁSITOS

El efecto de un compuesto, tanto sobre los parásitos como sobre las células de mamífero, se puede dar por inhibición de la proliferación o por inducción de muerte celular. Tal como se presentó en el Capítulo 1 de esta tesis (Introducción), se mencionó en el Capítulo 3 (Materiales y Métodos) tras las definiciones de los parámetros utilizados para comparar la potencialidad de los compuestos, y se discutió en el Capítulo 5 (Actividad Biológica) al discutir los valores de IC₅₀ y EC₅₀ obtenidos, la forma tripomastigota de *T. cruzi* es un estadio no replicativo, por lo que la reducción de la viabilidad celular que se observa cuando se inocula esta forma con concentraciones crecientes de los compuestos de estudio, refiere a la muerte de las células inoculadas. Este efecto es considerado como *efecto tripanocida*.

Por otra parte, dado que la forma epimastigota de *T. cruzi* es replicativa, los efectos de los compuestos pueden ser relacionados a un *efecto tripanocida* o a un *efecto tripanostático*.

Sobre este estadio, se considera que el efecto es *tripanocida* cuando la incubación con el compuesto conduce a un arresto irreversible del crecimiento celular. Por su parte, el efecto *tripanostático* es aquel que inhibe la proliferación, pero de manera reversible si se elimina el compuesto del medio. Para determinar la naturaleza del efecto de los compuestos estudiados, usualmente se realizan

“experimentos de lavado”, en los cuales los cultivos son expuestos por un período de tiempo a los compuestos, luego los compuestos son removidos y el crecimiento celular es monitoreado por un período posterior ³³.

7.4.1 Compuestos heterolépticos [V^{VO}(LS-H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-H)(L-H)] y [V^{VO}(BrIS-H)(L-H)]

Para evaluar si los compuestos de vanadio desarrollados en esta tesis ejercen un efecto tripanostático o tripanocida, en primer lugar, se analizaron los efectos ejercidos por los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con derivados de la semicarbazona de salicilaldehído y L0, utilizando concentraciones relativas a su IC_{50, 5 días}. Para los cuatro compuestos estructuralmente relacionados de esta familia, [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], donde LS = LS1-LS4, se realizaron experimentos de recuperación incubando epimastigotas de *T. cruzi* a concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x su IC_{50,5 días} previamente determinado por 5 días en epimastigotas. Transcurrido el tiempo de incubación, el compuesto se eliminó del medio por lavado de los parásitos y se evaluó el crecimiento a lo largo de los días en un medio fresco, libre de compuesto, midiendo la densidad óptica a 595 nm a lo largo del tiempo. El efecto se consideró tripanostático si los parásitos recuperan su crecimiento normal, o tripanocida en los casos en que el arresto del crecimiento fue irreversible.

Los cuatro compuestos muestran el mismo perfil de recuperación para todas las dosis utilizadas (Figura 7.14). A concentraciones bajas, 1x IC_{50, 5 días}, los parásitos recuperan el crecimiento de forma similar al control sin tratar. A concentraciones mayores, el crecimiento no se retoma. Estos resultados, sugieren que estos compuestos ejercen comportamiento dual, siendo este un efecto tripanostático a concentraciones bajas y tripanocida a concentraciones elevadas ²³. Este efecto dual, también ha sido descrito en paralelo a esta tesis para el compuesto de vanadio [V^{VO}(LS2-2H)(5-amino-1,10-fenantrolina)] ²⁵.

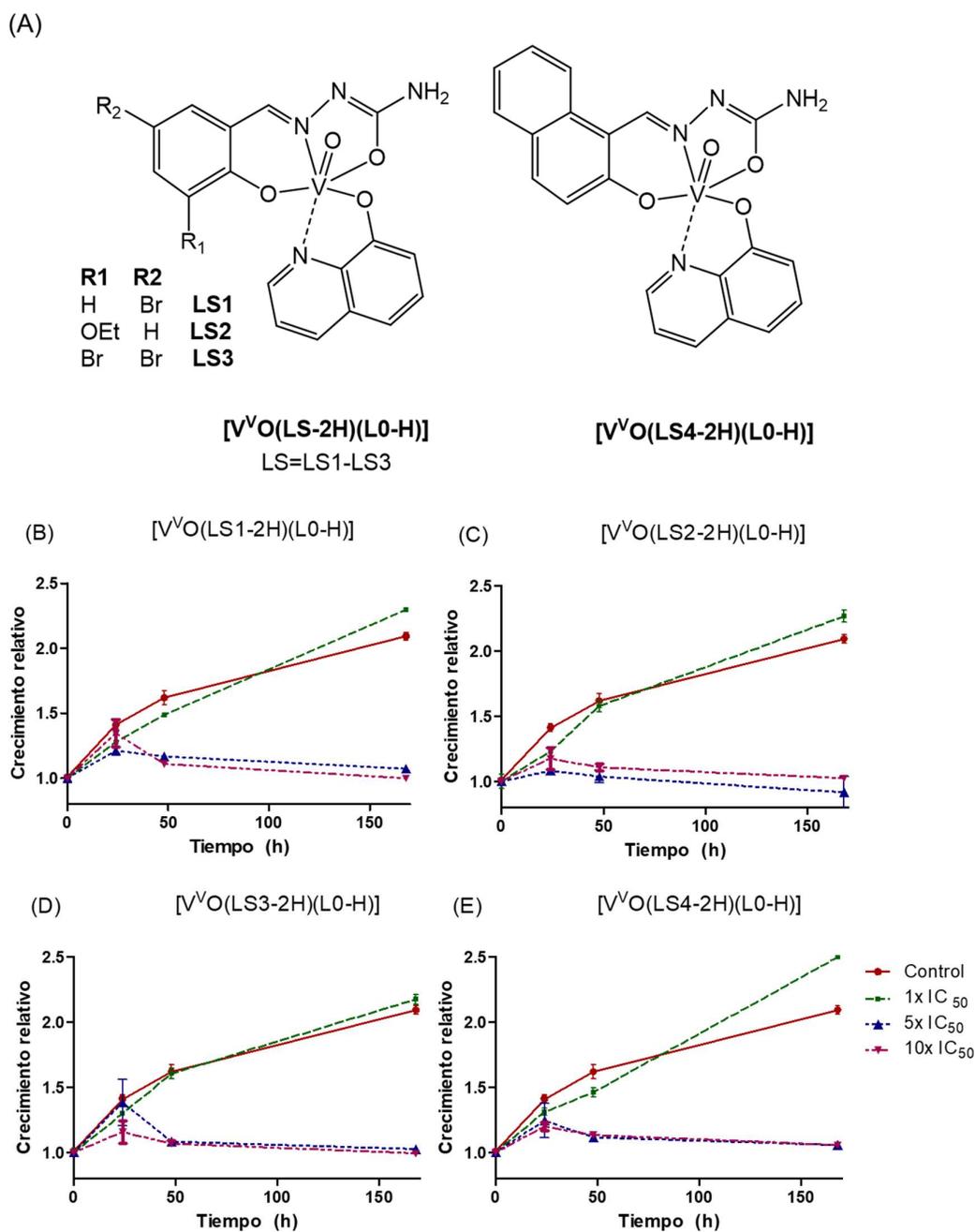


Figura 7.14. A) Estructura de los compuestos [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], donde LS = LS1-LS4. Ensayos de recuperación en medio de cultivo BHI-Tryptosa luego de la incubación con los complejos (B) [V^{VO}(LS1-2H)(L0-H)], (C) [V^{VO}(LS2-2H)(L0-H)], (D) [V^{VO}(LS3-2H)(L0-H)] y (E) [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] por 5 días. Cada experimento se realizó por triplicado. Cada punto representa el valor promedio y su desviación estándar.

Considerando que todos los compuestos de esta familia se comportan del mismo modo, para evaluar los efectos de los compuestos luego de 24 horas de incubación, se seleccionó el compuesto más activo de las series [V^vO(LS-H)(L0-H)], [V^vO(IN-H)(L-H)] y [V^vO(BrIS-H)(L-H)] (Figura 7.8), utilizando los criterios establecidos en la *sección 5.3.1* del Capítulo 5.

Los experimentos de recuperación para los representantes de las tres series conteniendo derivados de 8-hidroxiquinolina y ligandos tridentados O-N-O, se realizaron incubando epimastigotas de *T. cruzi* a concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x su EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas de *T. cruzi* por 24 horas.

Para los compuestos heterolépticos [V^vO(LS4-H)(L0-H)], [V^vO(IN-H)(L2-H)] y [V^vO(BrIS-H)(L2-H)], el perfil de recuperación de los parásitos mostró resultados similares (Figura 7.15). De forma similar que lo discutido para la incubación por 5 días, los compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) muestran un efecto dual, dependiente de la concentración analizada.

Con la dosis más baja utilizada, correspondiente a 1x EC₅₀, los parásitos recuperan su crecimiento de forma similar al control de los parásitos sin tratar. A la dosis más alta utilizada, los parásitos no recuperan el crecimiento, incluso luego de 96 y 120 horas en medio fresco libre del compuesto (Figura 7.15). A dosis correspondientes a 5x EC₅₀, la recuperación es parcial, siendo esta cercana al 40 % para los compuestos [V^vO(LS4-H)(L0-H)] y [V^vO(IN-H)(L2-H)] (Figura 7.15A-B). Vale la pena mencionar que la concentración correspondiente a 5x IC_{50, 5 días} para [V^vO(LS4-H)(L0-H)] (32 μM), es incluso mayor que la utilizada para 10x EC₅₀ (11 μM), por lo que el efecto observado tiene relación con el comentado previamente.

Para el caso del compuesto [V^vO(BrIS-H)(L2-H)], si se evalúa el perfil de crecimiento luego de 48 horas en medio BHI fresco, el porcentaje coincide con el encontrado para los compuestos estructuralmente relacionados. Sin embargo, a

los 5 días la curva decrece a cero, demostrando la incapacidad de los parásitos de retomar el crecimiento normal (Figura 7.15C).

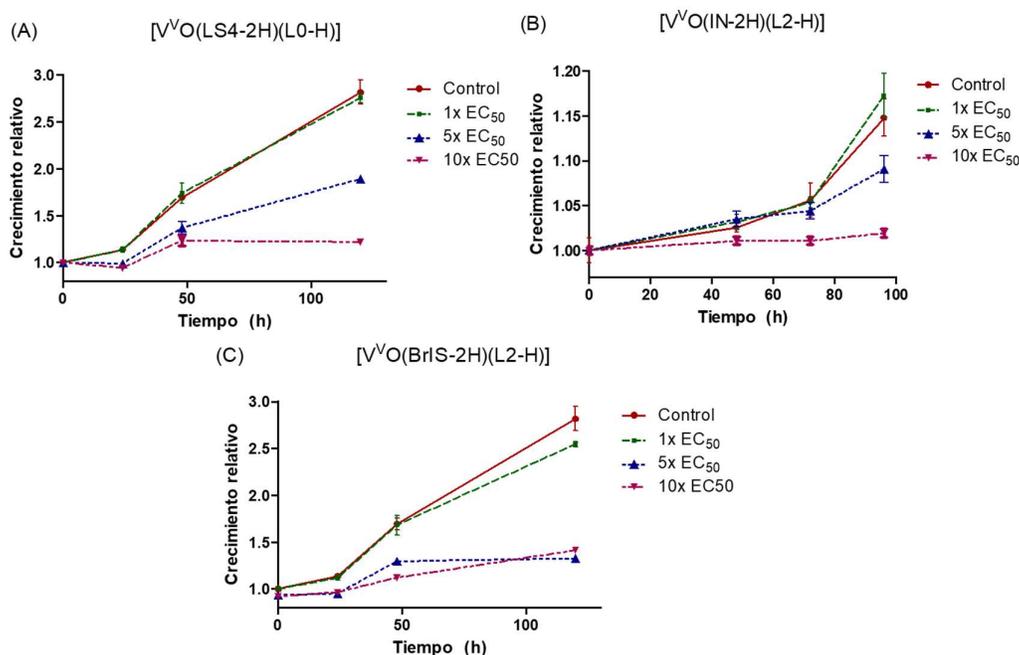


Figura 7.15. Ensayos de recuperación en medio de cultivo BHI-Tryptosa luego de la incubación con los complejos (A) [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], (B) [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] y (C) [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] por 24 horas. Cada experimento se realizó por triplicado. Cada punto representa el valor promedio y su desviación estándar.

7.4.2 Compuestos heterolépticos [V^{IV}O(L-H)(mpo)]

En el caso de los compuestos heterolépticos de oxovanadio (IV) [V^{IV}O(L-H)(mpo)], donde L = L0-L4, los experimentos de lavado se llevaron a cabo con el compuesto más activo de la serie, [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] (Figura 7.8). Se incubaron epimastigotas de *T. cruzi* a concentraciones equivalentes a 1x, 5x y 10x su EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas de *T. cruzi* por 24 horas.

El comportamiento de este compuesto es diferente al discutido para el resto de los compuestos heterolépticos. Como se muestra en la Figura 7.16, a todas las concentraciones de trabajo, los parásitos no son capaces de recuperar el crecimiento normal luego de ser transferidos a un medio fresco, libre de compuesto. Luego de 48

horas, los parásitos empiezan a morir. Estos resultados sugieren una acción tripanocida por parte del compuesto seleccionado, en las condiciones analizadas.

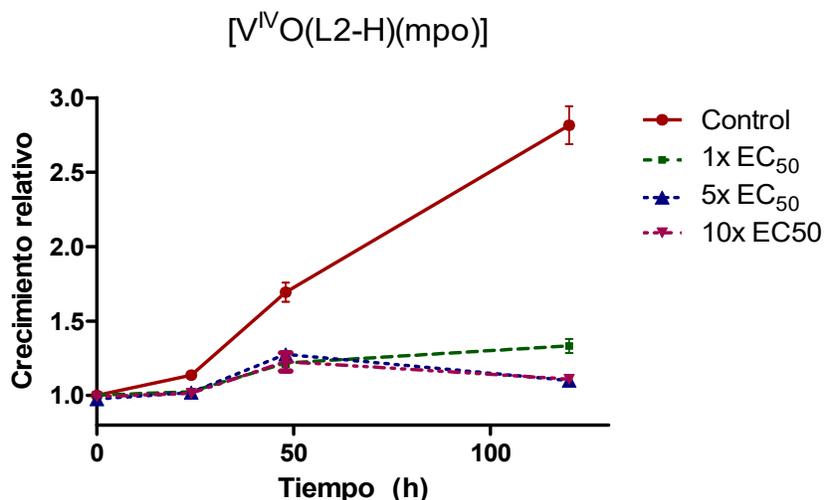


Figura 7.16. Ensayos de recuperación en medio de cultivo BHI-Tryptosa luego de la incubación con el complejo $[V^{IV}O(L2-H)(mpo)]$ por 24 horas. Cada experimento se realizó por triplicado. Cada punto representa el valor promedio y su desviación estándar.

7.4.3 Compuestos homolépticos $[V^{IV}O(L-H)_2]$

Utilizando los mismos criterios ya mencionados, se seleccionó el compuesto $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ (Figura 7.8) en la serie de compuestos homolépticos con los ligandos bioactivos L. Por un lado, el ensayo se llevó a cabo con las concentraciones relativas al $IC_{50,5 \text{ días}}$ determinado sobre la forma epimastigota, dado que, para los ensayos de efectos, persistencia de la infección, índice de captura, distribución subcelular y ensayos de tipo de muerte celular se llevaron a cabo con tales concentraciones ²². Además, para permitirnos comparar los efectos contra las demás familias, el estudio también se realizó utilizando las concentraciones relativas al EC_{50} determinado en la forma tripomastigota. De hecho, $10x IC_{50}$ coincide con $1x EC_{50}$, por lo que, dado que se trabajaron en iguales

condiciones, se podrían exponer estos resultados como los ensayos de recuperación a 5 concentraciones de incubación (0,21 μM , 1,05 μM , 2,1 μM , 10,5 μM y 21,0 μM). En su conjunto, los resultados indican que el compuesto tiene un comportamiento dual, del mismo modo que fue discutido para [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-H)(L2-H)] y [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)]. A bajas concentraciones, 1x y 5x IC₅₀, el perfil de crecimiento en medio fresco es muy similar a los parásitos control, sugiriendo que el efecto es tripanostático a tales concentraciones (Figura 7.17A). A concentraciones equivalentes a 10x IC₅₀ = 1x EC₅₀, la recuperación de los parásitos es parcial (aproximadamente un 60 %). A concentraciones mayores, 5x y 10x EC₅₀ el efecto es tripanocida, arrojando permanentemente el crecimiento de los parásitos (Figura 7.17B).

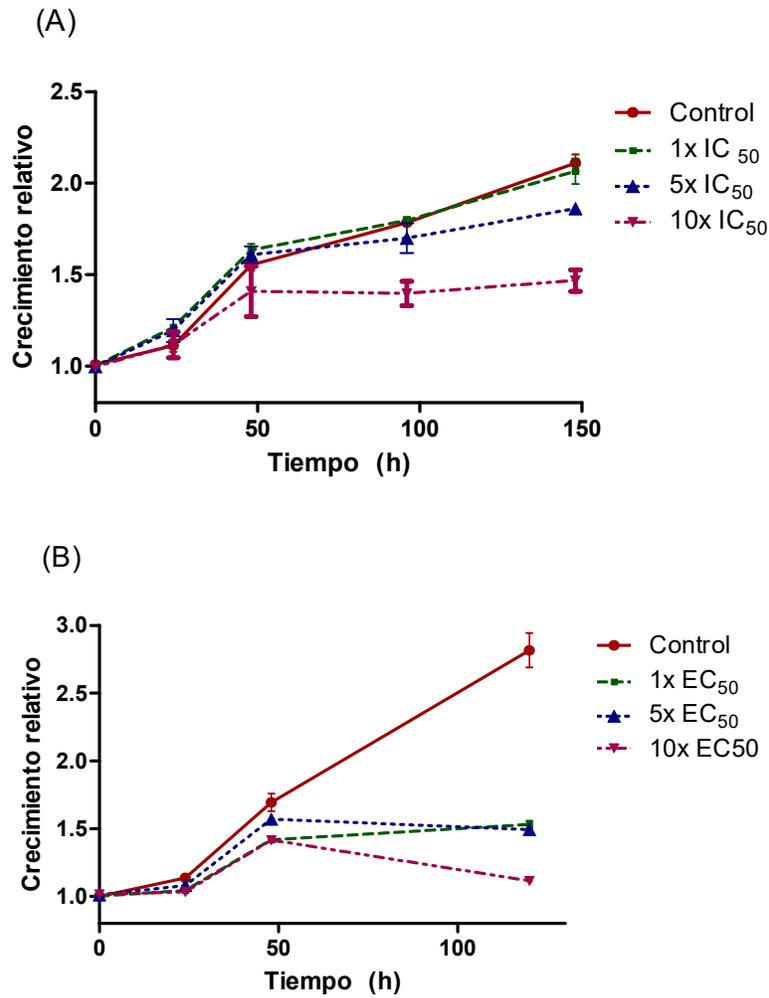


Figura 7.17. Ensayos de recuperación en medio de cultivo BHI-Tryptosa luego de la incubación con el complejo $[V^{IV}O(L1-H)_2]$ por 24 horas. (A) Se utilizaron concentraciones relativas a IC_{50} , 5 días (B) Se utilizaron concentraciones relativas a EC_{50} . Cada experimento se realizó por triplicado. Cada punto representa el valor promedio y su desviación estándar.

7.5 TIPO DE MUERTE CELULAR

7.5.1 Apoptosis y necrosis

Los ensayos de recuperación de parásitos o experimentos de lavado discutidos en la sección anterior revelan un comportamiento dual de los compuestos, siendo el efecto tripanostático a concentraciones bajas y tripanocida

a concentraciones mayores. A efectos de caracterizar el posible mecanismo de muerte celular inducido por los compuestos de oxovanadio explorados a las concentraciones en las cuales se reportó un efecto tripanocida, se analizaron los cultivos tratados con marcadores fluorescentes de apoptosis y necrosis.

Cuando se activa la vía apoptótica, la fosfatidilserina (FS) de la cara interna de la membrana plasmática es translocada hacia la parte externa, quedando expuesta hacia el microambiente extracelular ³⁴. Este proceso se da en las primeras 24 horas de exposición. Por lo tanto, para identificar las células que han activado la vía apoptótica, se utilizó la sonda fluorescente Anexina V-AlexaFluor 488 (AV). La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos Ca^{2+} -dependiente que tiene una alta afinidad por la FS. La proteína es conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 488 ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$), permitiendo identificar las células marcadas como parásitos de apoptosis temprana ³⁵⁻⁴⁰.

Uno de los cambios celulares principales cuando se induce la necrosis es la ruptura de las membranas. Para identificar las células necróticas, se utilizó yoduro de propidio (IP) como marcador fluorescente en la región $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$), el cual ingresa a través de la membrana dañada y se une a los ácidos nucleicos ³⁹. El yoduro de propidio no puede ingresar a las células saludables o en apoptosis temprana.

Dado que ambos marcadores tienen alta fluorescencia en regiones diferentes del espectro de emisión, se incubaron las sondas en conjunto y los cultivos fueron a analizados por citometría de flujo. Se consideraron células en apoptosis temprana las marcadas con AV+/IP- y células en apoptosis tardía o en necrosis las marcadas con AV+/IP+. Las células que permanecen sin marcarse pueden estar asociadas con células saludables, células que hayan activado otro mecanismo de muerte celular, como la autofagia, o células senescentes. El método ya ha sido utilizado previo al inicio de esta tesis ^{39, 41-43} y en paralelo a la misma ^{37,38} para evaluar el mecanismo de muerte en epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

7.5.1.1 Compuestos heterolépticos [V^VO(LS-2H)(L0-H)]

En la *sección 5.4.1* se discutió que los cuatro nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio (V) con 8-hidroxiquinolina como ligando bidentado y derivados la semicarbazona de salicilaldehído como co-ligando tridentado, producen un efecto tripanostático a concentraciones correspondientes a 1x IC₅₀ (6-10 μM), sin embargo, cuando las concentraciones de tratamiento son mayores, el efecto es tripanocida. El hecho de que tenga un efecto dual no asegura que, a concentraciones bajas, no exista muerte celular además del efecto tripanostático. Se seleccionó el compuesto más activo de esta serie, [V^VO(LS4-2H)(L0-H)], y se evaluó el posible mecanismo de muerte celular tratando parásitos con 1x, 5x y 10x IC₅₀ (6,2, 31 y 62 μM) por 24 horas.

En la muestra de parásitos control (sin tratar), se detectó un porcentaje mayor a 99 % sin marcar con AV ni IP, lo cual es esperable para células que no han activado mecanismos de apoptosis ni están muriendo por necrosis.

Cuando los parásitos se trataron con concentraciones correspondientes a 1x IC₅₀ por 24 horas, se detectó un 12,7 % del total de la población marcado con AV+/IP-, lo que indica que la inducción de apoptosis temprana. Sin embargo, a concentraciones mayores, correspondientes a 5x y 10x IC₅₀, las células en apoptosis disminuyen al 5 % del total de la población (Figura 7.18). En su lugar, no se observó fenotipo necrótico. Este hecho en conjunto con lo explorado en los ensayos de recuperación sugiere que la disminución de la apoptosis y ausencia de necrosis podría estar asociado con la activación de otro mecanismo de muerte celular a las 24 horas, tal como la autofagia²³. Vale destacar que solo se estudió la viabilidad en epimastigotas hasta 20 μM, donde la disminución de células viables observada era tan solo el 20 %.

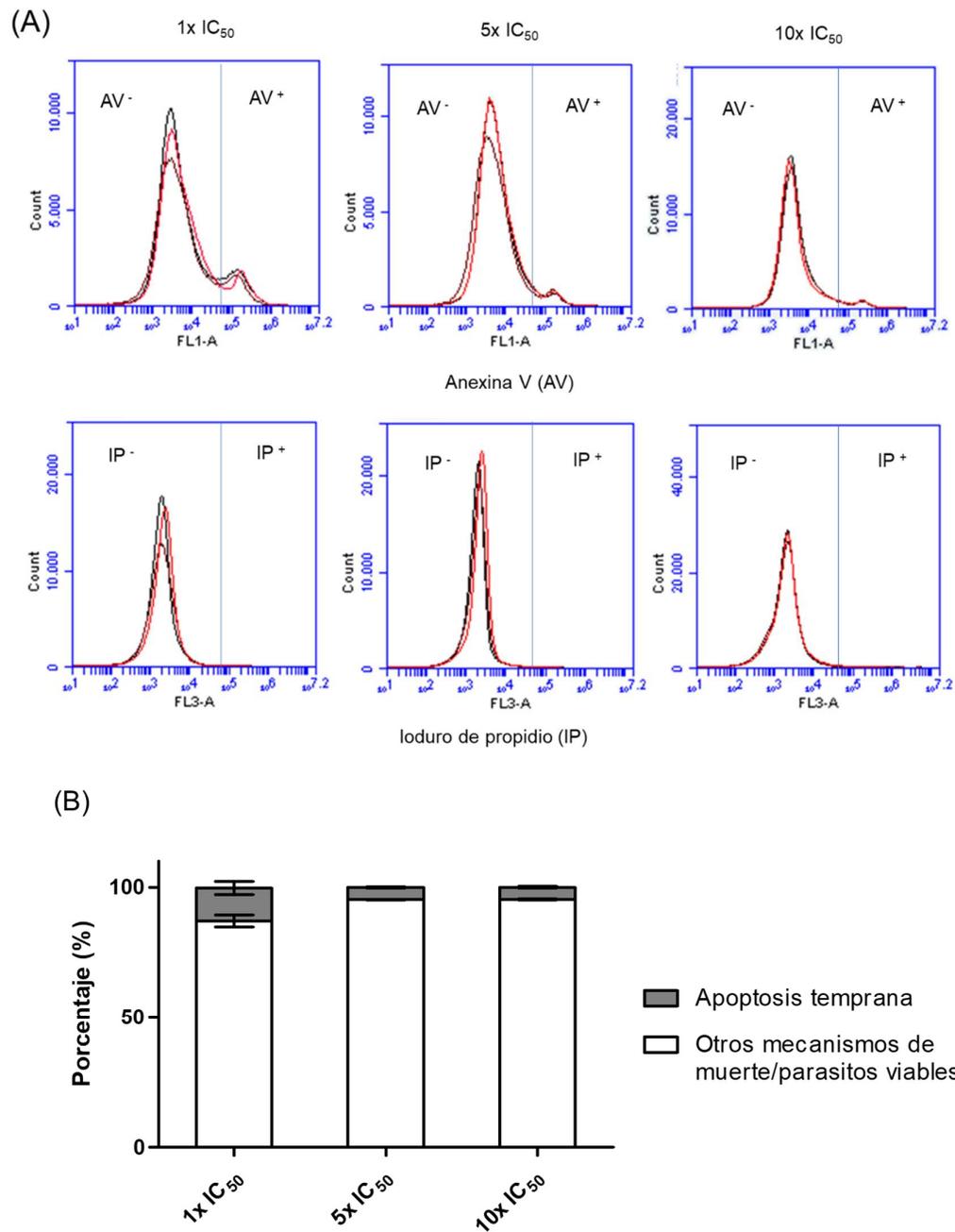


Figura 7.18. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] en epimastigotas de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron por 24 horas con concentraciones correspondientes a 1x, 5x y 10x IC₅₀, 5 días, y se marcaron con las sondas fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP). Se utilizaron parásitos sin tratar como control. Los parásitos fueron analizados en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). (A) Células marcadas y sin marcar con AV (arriba) e IP (abajo) para cada

concentración utilizada. Se representan las tres réplicas superpuestas para cada condición. (B) Porcentajes de células marcadas obtenidos para tres experimentos independientes.

7.5.1.2 Compuestos homolépticos [$V^{IV}O(L-H)_2$]

Al igual que los compuestos [$V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)$], se encontró un comportamiento dual para los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina sustituidos en las posiciones 5 y 7. De acuerdo con lo detallado en la *sección 7.4.3*, el efecto tripanocida fue observado a concentraciones mayores o iguales a 2,10 μ M del compuesto seleccionado [$V^{IV}O(L1-H)_2$], que corresponde al valor de 10x $IC_{50,5}$ días y 1x $EC_{50, 24h}$. A concentraciones menores, los experimentos de lavado revelaron que los parásitos pudieron retomar su crecimiento normal y se caracterizó el efecto como tripanostático. Sin embargo, los ensayos realizados a 2,10 μ M, sugieren que a esa concentración los efectos observados son ambos, recuperando el crecimiento solo en un 60 %. Los experimentos se realizaron a las 4 y 24 horas de tratamiento con el compuesto a efectos de comparar si los mecanismos de muerte involucrados se activan de forma temprana ²².

Luego de 4 horas de tratamiento, no se encontraron parásitos marcados. Sin embargo, a las 24 horas, el 40 % están marcadas con AV+/IP+, lo que indica apoptosis tardía o necrosis (Figura 7.19).

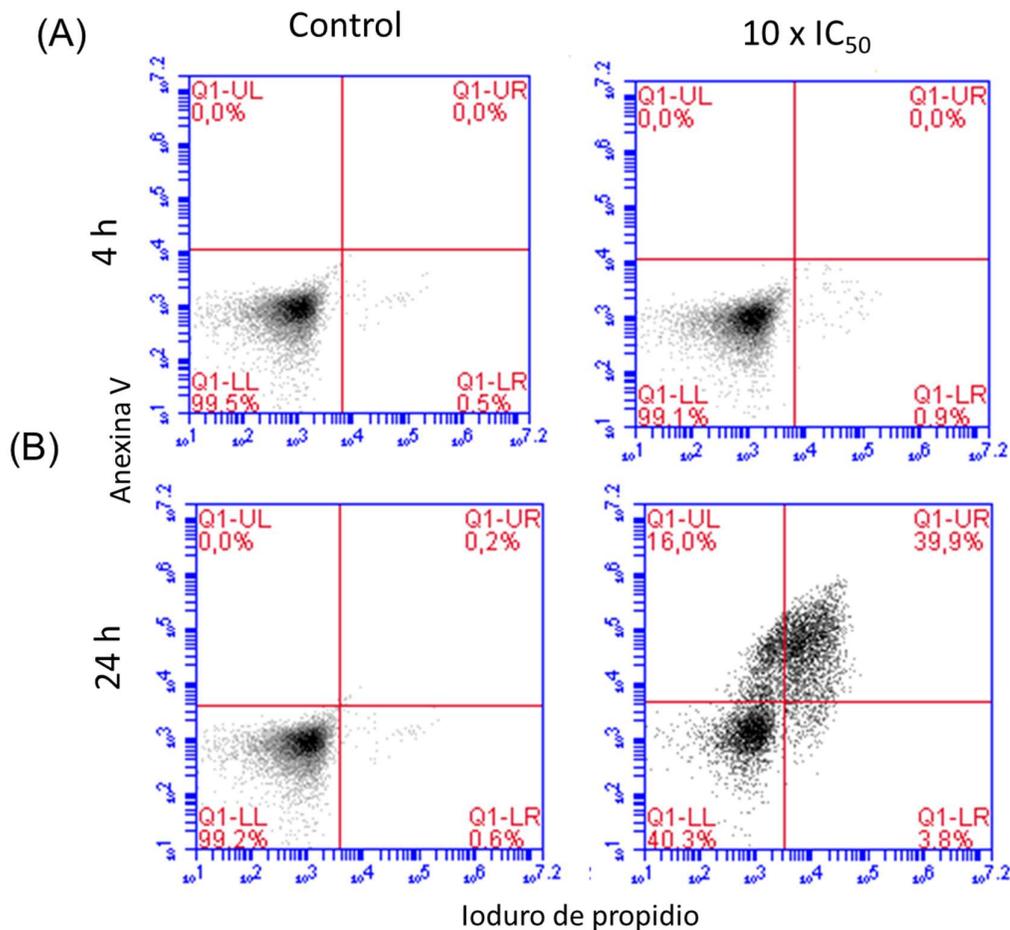


Figura 7.19. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el compuesto [V^{IV}O(L0-H)₂] en epimastigotas de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron por 4 y 24 horas con concentraciones correspondientes a 10x IC₅₀, 5 días, y se marcaron con las sondas fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP). Se utilizaron parásitos sin tratar como control. Los parásitos fueron analizados en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). Se presenta el gráfico de puntos de uno de los tres experimentos. Eje x: regiones marcadas con IP. Eje y: regiones marcadas con AV. La zona de doble marcado se muestra en el ángulo superior derecho. Los parásitos sin marcar se ubican en la zona delimitada en el ángulo inferior izquierdo.

7.5.1.3 Compuesto heteroléptico [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]

Los ensayos de muerte celular para el compuesto heteroléptico [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], se realizaron luego de 24 horas de incubación con el compuesto a concentraciones relativas al EC₅₀ (0,29 μM, 1,45 μM, 2,90 μM).

En la Figura 7.20 se muestra el análisis del tipo de muerte por citometría de flujo, esquematizando las poblaciones marcadas y sin marcar con AV (izquierda) e IP (derecha) para cada concentración utilizada.

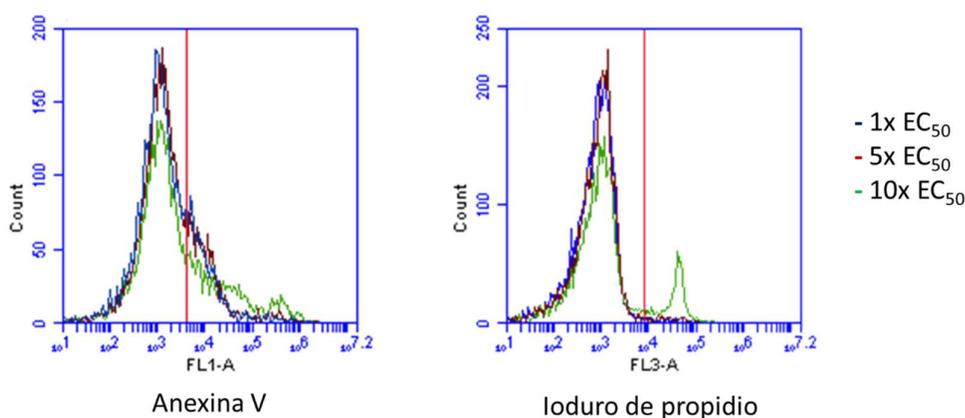


Figura 7.20. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] en epimastigotas de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron por 24 horas con concentraciones correspondientes a 1x, 5x y 10x EC₅₀, y se marcaron con las sondas fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP). Se utilizaron parásitos sin tratar como control. Los parásitos fueron analizados en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). Se muestran las poblaciones de células marcadas y sin marcar con AV (izquierda) e IP (derecha) para cada concentración utilizada.

Cuando los parásitos se trataron con concentraciones correspondientes a 1x EC₅₀ y 5x EC₅₀, la población marcada con AV+/IP- ronda en un 24 % de los eventos analizados, lo que indica la inducción de apoptosis temprana. A la concentración más alta estudiada, 2,90 μM, el porcentaje de células apoptóticas aumenta a 42 % (Tabla 7.9). A esta concentración, también se encontró un

porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio de 27 %, casi 7 veces mayor que el encontrado para las concentraciones más bajas (4 %).

Los resultados, en conjunto con lo explorado en los ensayos de recuperación, indican que los mecanismos principales de muerte asociados al tratamiento con [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] son apoptosis y necrosis. Sin embargo, estos resultados no descartan que existan otros mecanismos de forma concomitante.

Tabla 7.9. % de epimastigotas de *T. cruzi* marcados con AV e IP para las incubaciones con el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] por 24 h.

Concentración de incubación (μM)	% células marcadas	
	Anexina V	Ioduro de propidio
1x EC ₅₀ – 0,29 μM	23,9	4,3
5x EC ₅₀ – 1,45 μM	24,8	4,1
10x EC ₅₀ – 2,90 μM	42,3	27,4

7.5.1.4 Compuesto heteroléptico [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]

El compuesto [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)], isoestructural con el analizado anteriormente, fue incubado en las mismas condiciones que las detalladas para el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)]. Los porcentajes de apoptosis y necrosis fueron medidos luego de 4 y 24 horas de incubación.

La Figura 7.21 esquematiza el análisis del tipo de muerte inducido por el compuesto seleccionado a ambos tiempos de análisis. Se incluyeron en la figura los controles negativos (parásitos sin tratar) y positivos (tratamiento con H₂O₂ 50 y 100 μM para apoptosis y necrosis, respectivamente).

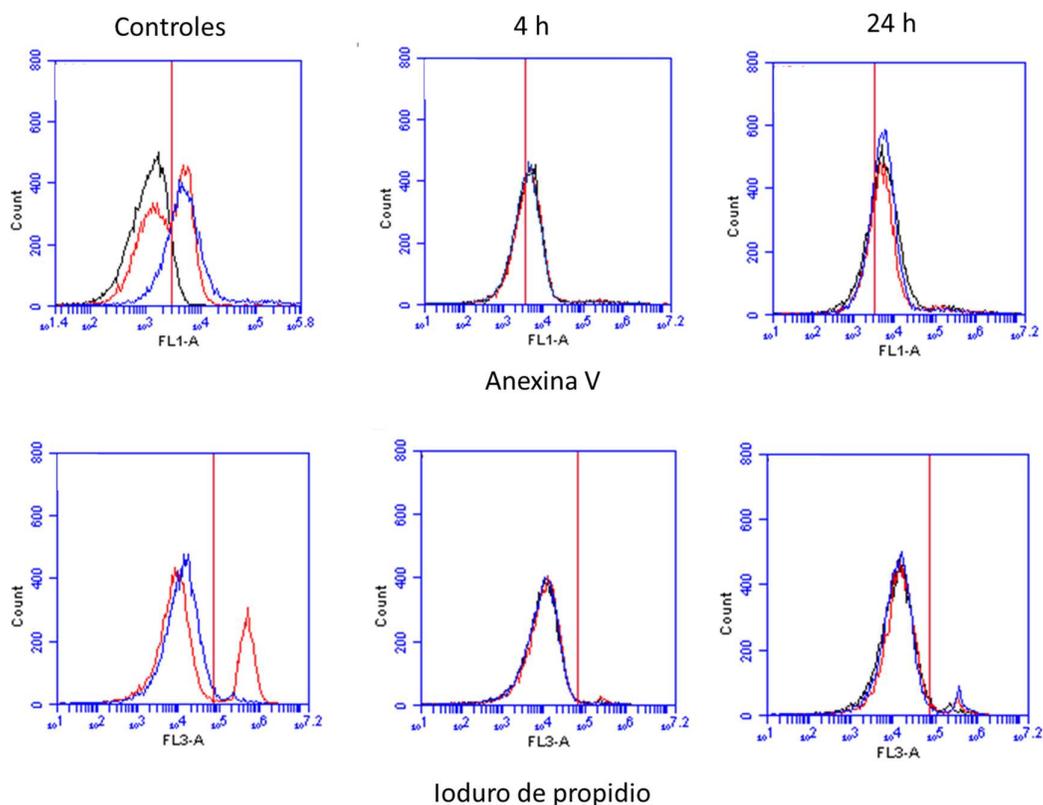


Figura 7.21. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el compuesto [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)], en epimastigotas de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron por 4 y 24 horas con concentraciones correspondientes a 1x, 5x y 10x EC₅₀, y se marcaron con las sondas fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP). Se utilizaron parásitos sin tratar como control. Se trataron parásitos con H₂O₂ 50 y 100 μM como controles positivos de apoptosis y necrosis. Los parásitos fueron analizados en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). Se muestran la cantidad de células marcadas y sin marcar con AV (arriba) e IP (abajo) para cada concentración utilizada. Se representan las tres réplicas superpuestas para cada condición.

La Tabla 7.10 resume los porcentajes de células marcadas en cada uno de los casos. Luego de 24 horas de incubación a la concentración más baja utilizada, la población marcada con AV+/IP- ronda en un 43 % de los eventos analizados, lo que indica que la inducción de apoptosis temprana. Cuando los parásitos se trataron con concentraciones correspondientes a 5x EC₅₀ y 10x EC₅₀, el porcentaje

de células en apoptosis temprana aumenta al 70 %. El porcentaje de células con fenotipo necrótico no superó el 6 %. Si bien se esperaba una respuesta celular similar a la observada para el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], la apoptosis es el mecanismo principal asociado a la muerte por tratamiento con [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)]. Como se ha comentado en análisis anteriores, no se descarta la presencia de otros mecanismos de muerte asociados al tratamiento con este compuesto.

Tabla 7.10. % de epimastigotas de *T. cruzi* marcados con AV e IP para las incubaciones con el compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] por 24 h.

Concentración de incubación (μM)	% células marcadas	
	Anexina V	Ioduro de propidio
1x EC ₅₀ – 0,78 μM	41,9	6,0
5x EC ₅₀ – 3,90 μM	67,4	3,9
10x EC ₅₀ – 7,8 μM	70,0	2,2

7.5.1.5 Compuesto heteroléptico [V^{VO}(L2-H)(mpo)]

En la Figura 7.22 se muestran los resultados del marcado de parásitos con AV e IP, incubados con diferentes concentraciones del compuesto [V^{VO}(L2-H)(mpo)] durante 4 y 24 horas, con el que se determinó el tipo de muerte celular inducido.

En las primeras 4 horas de tratamiento, se observa la inducción de la cascada apoptótica, siendo esta considerablemente mayor a concentraciones más altas, llegando a un valor de 40 % (Figura 7.22). Luego de 24 horas de incubación, el porcentaje de células apoptóticas no supera el 44 %, sin embargo, aumenta la doble marcación con AV e IP, llegando a valores de 16 % de la población total.

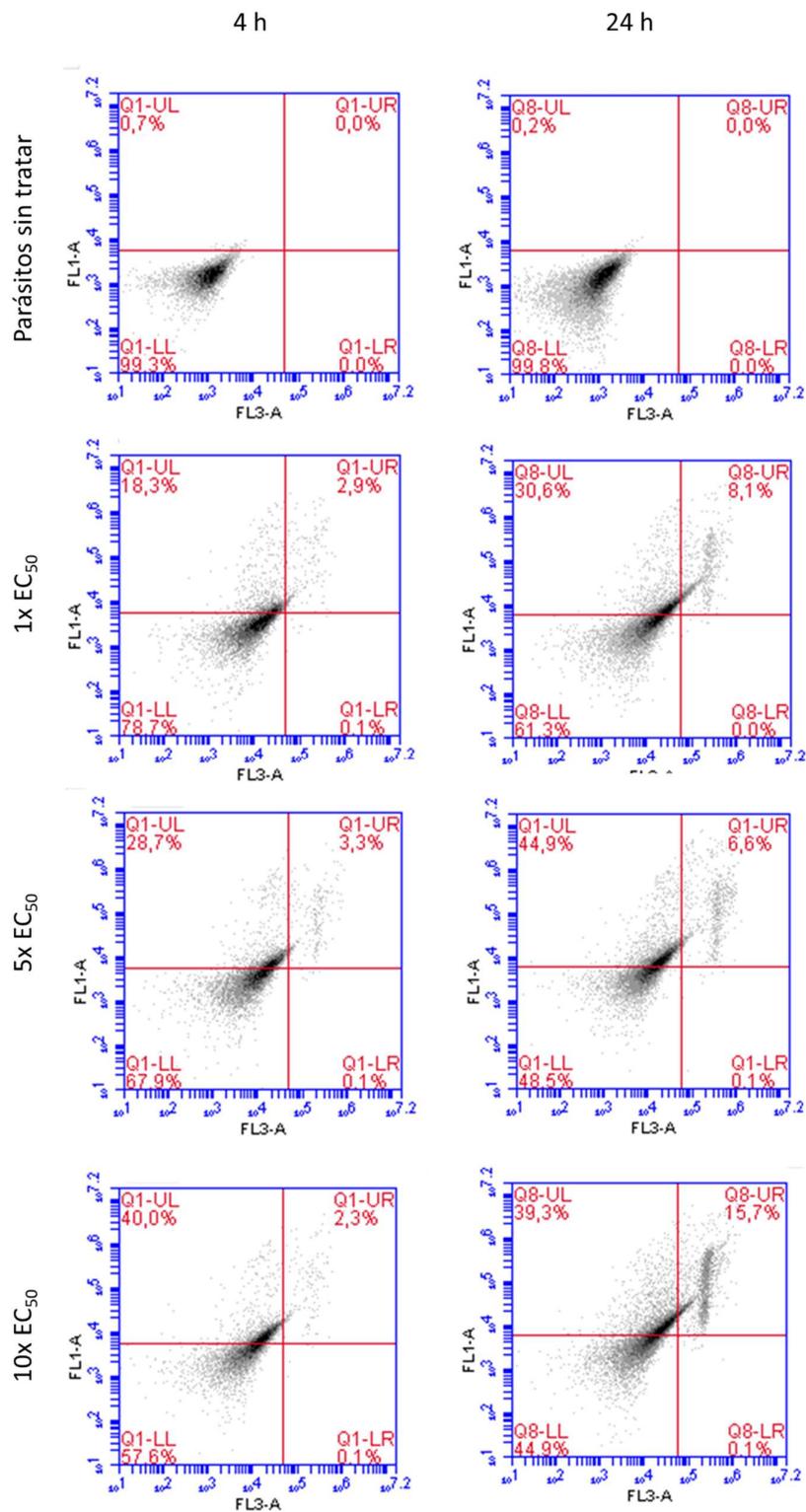


Figura 7.22. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el compuesto [V^{IVO}(L2-H)(mpo)] en epimastigotas de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron por 4 y 24 horas con concentraciones correspondientes a 1x, 5x y 10x EC₅₀, y se marcaron con las sondas

fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP). Se utilizaron parásitos sin tratar como control. Los parásitos fueron analizados en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Bioscience). Se presenta el gráfico de puntos de uno de los tres experimentos. Eje x: regiones marcadas con IP. Eje y: regiones marcadas con AV. La zona de doble marcado se muestra en el ángulo superior derecho. Los parásitos sin marcar se ubican en la zona delimitada en el ángulo inferior izquierdo.

Para el caso del compuesto en estudio, no es posible definir la naturaleza de la doble marcación. Dado que se observan parásitos AV+/IP- en tiempos cortos de incubación, los eventos contenidos en la doble marcación pueden estar asociados tanto a células de fenotipo necrótico como de apoptosis tardía.

La Figura 7.23 muestra de forma gráfica la respuesta concentración dependiente encontrada luego de 24 horas de incubación, donde se observa aumento de ambos mecanismos de muerte a concentraciones de tratamiento mayores. Si se analizan los porcentajes de células apoptóticas y necróticas luego del tratamiento con EC_{50} , éstos promedian el 39 % de la población, lo que indica que no se debe descartar la activación de otro mecanismo de muerte.

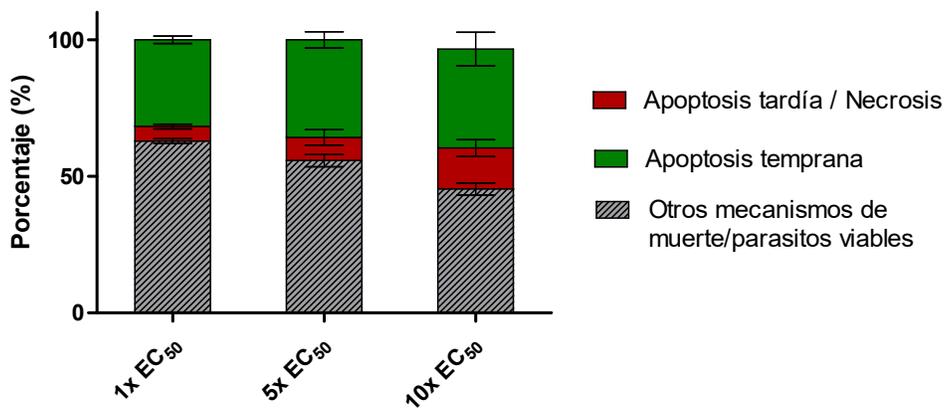


Figura 7.23. Porcentajes de células marcadas con las sondas fluorescentes de apoptosis y necrosis (AV e IP) luego de 24 horas de tratamiento con 1x, 5x y 10x EC_{50} . Se presenta la media y la desviación estándar para tres experimentos independientes.

7.5.2 Autofagia

Los análisis del tipo de muerte celular inducido por los compuestos detallado en la *sección 7.5.1*, revelaron inducción de apoptosis o de necrosis para porcentajes variables de parásitos tratados con cada uno de los líderes seleccionados. Los compuestos [V^VO(LS4-2H)(L0-H)], [V^VO(IN-2H)(L2-H)], [V^VO(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^VO(L2-H)(mpo)] inducen la apoptosis como principal mecanismo de muerte celular. Además, a excepción del compuesto [V^VO(LS4-2H)(L0-H)], se detectó la muerte por necrosis de un porcentaje más pequeño de la población. Por su parte, el compuesto homoléptico [V^{IV}O(L1-H)₂] muestra principalmente fenotipo necrótico.

Para todos los compuestos, la suma de los porcentajes de células marcadas con las sondas AV e IP no suman el 50 %, considerando que este es el porcentaje que se espera al incubar los parásitos con concentraciones correspondientes al EC₅₀. Este resultado sugiere, como ya se ha comentado, que otro mecanismo de muerte celular puede estar activado en paralelo.

Es por esta razón, que en esta tesis se exploró si los compuestos seleccionados, en las mismas condiciones de trabajo, inducen la activación de la autofagia como posible mecanismo de muerte adicional. Se ha demostrado que, en condiciones hostiles, este mecanismo puede activarse para dar lugar a la muerte celular, involucrando el secuestro en vesículas de doble membrana (autofagosomas) de organelos citoplasmáticos y macromoléculas que se encuentran en exceso. Estos autofagosomas son luego enviados a lisosomas para su degradación, mediante una respuesta no inflamatoria ⁴⁴.

Para cumplir con el objetivo, se analizó la inducción de la expresión de los genes que codifican para la proteína ATG7 (involucrada en los primeros pasos de formación de autofagosomas) y la proteína ATG8 (marcador de membrana del autofagosoma formado) en parásitos tratados con 1x el valor de EC₅₀ de los cinco compuestos líderes seleccionados (Figura 7.8), por PCR en tiempo real (RT-

qPCR). La expresión de estos genes se comparó contra los niveles de expresión de los parásitos control sin tratar.

La Figura 7.24 muestra la expresión de ATG7 (Figura 7.24A) y ATG8 (Figura 7.24B), relativa al gen constitutivo de *T. cruzi* *gapdh*, en los epimastigotas de *T. cruzi* tratados por 24 horas con los compuestos seleccionados con concentraciones correspondientes al valor de EC₅₀ previamente determinado.

Los resultados indican que el compuesto [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)] es el único que induce la sobreexpresión estadísticamente significativa de ambos genes, ATG7 y ATG8. Según lo discutido en la *sección 7.5.1.1*, la citometría de flujo con sondas fluorescentes reveló un bajo nivel de apoptosis y una cantidad insignificante de células necróticas. Por lo tanto, los altos niveles encontrados para los genes estudiados sugieren que la autofagia podría ser un mecanismo de muerte involucrado en las poblaciones que no fueron marcadas con AV/IP, pero que se determinaron como células no viables.

En cuanto al complejo [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], se detectó sobreexpresión estadísticamente significativa solamente para ATG8, sugiriendo también, que la autofagia podría ser uno de los mecanismo complementarios de muerte celular.

Para el caso de [V^{VO}(L2-H)(mpo)], si bien el porcentaje de células marcadas encontrado por citometría suma un número cercano al 50 % luego de 24 horas del tratamiento, se vio una sobreexpresión de ATG7, lo que indica que la célula podría estar preparando la maquinaria de autofagia para ser activada.

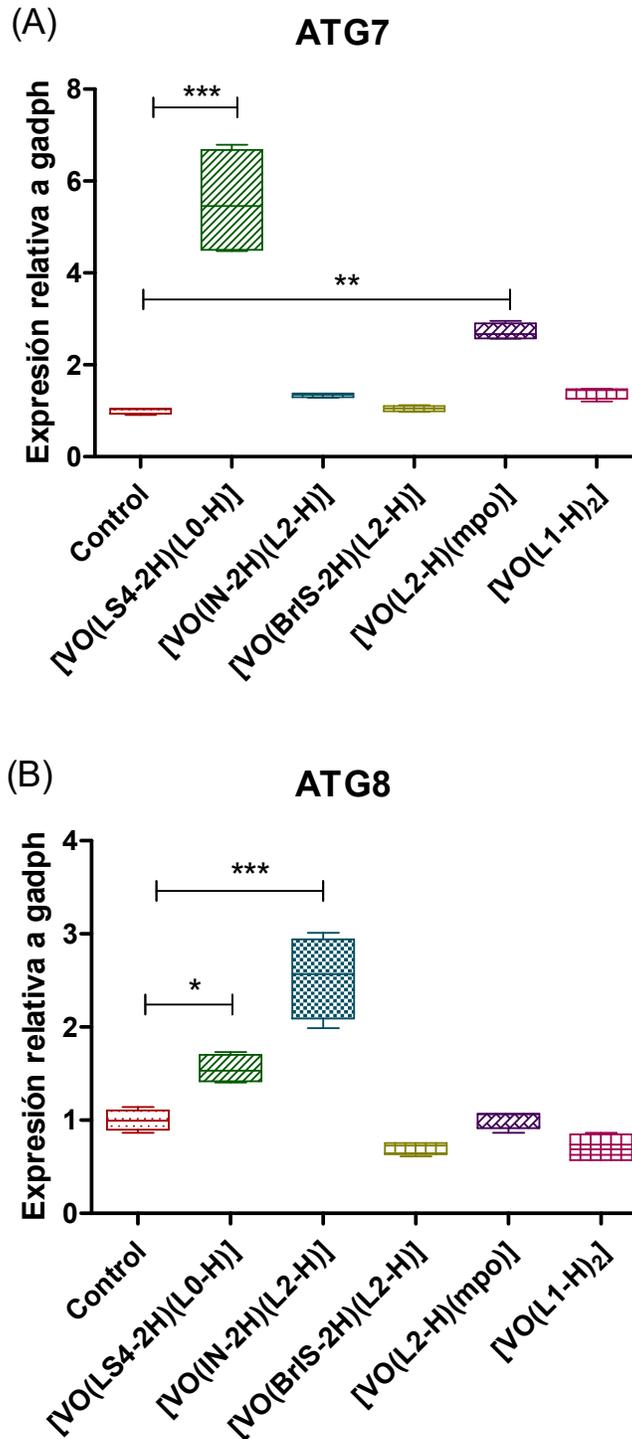


Figura 7.24. Expresión relativa al gen constitutivo gapdh de los 5 compuestos de oxovanadio líderes de cada serie tras 24 horas de tratamiento con el valor de EC_{50} previamente determinado. Se muestra la media y la desviación estándar para cada

complejo. Se realizaron dos replicas técnicas de dos replicas biológicas. Análisis de ANOVA respecto a la muestra control: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.005$, *** = $P < 0.001$.

Para los compuestos [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^{IV}O(L1-H)₂], no se observó sobreexpresión de ninguno de los dos genes. Como se discutió previamente, el primero de ellos suma un número cercano a 50 % de la población entre células marcadas con AV e IP, por lo que era poco probable la existencia de un mecanismo de muerte adicional activado. Para el compuesto [V^{IV}O(L1-H)₂], se había detectado la mayor parte de la población necrótica y los resultados discutidos en esta sección revelan que la autofagia no representaría un mecanismo de muerte posible para los parásitos tratados con este compuesto.

Los resultados obtenidos constituyen un acercamiento a la posible activación de la autofagia como mecanismo de muerte complementarios. Solo algunos reportes previos habían evaluado la sobreexpresión de proteínas asociadas a la formación de los autofagosomas por RT-PCR por inducción de un compuesto candidato a fármaco ⁴⁵. En el campo del desarrollo de compuestos metálicos como potenciales agentes antitripanosoma, éste constituye el primer reporte que analiza la expresión de estas proteínas por RT-PCR en parásitos tratados. Parecería interesante analizar, en un proyecto posterior, tanto la expresión de otras proteínas asociadas al complejo de formación de autofagosoma, como proteínas asociadas a la activación de la cascada apoptótica.

7.6 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

El estrés oxidativo se conoce como un desbalance entre las especies oxidantes y anti-oxidantes que conducen a una disrupción del sistema de señalización redox y del control del daño molecular, dado que el exceso de especies oxidantes causa daño a las biomoléculas, y los niveles fisiológicos son esenciales para la correcta señalización ⁴⁶.

Los parásitos tripanosomátidos son particularmente sensibles a las EROS y poseen sistemas de defensa específicos frente al estrés oxidativo. Dependiendo de los niveles de EROS producidos, se pueden activar diferentes mecanismos de muerte celular. Por una parte, la respuesta de defensa mitocondrial puede generar una sobrecarga de Ca^{2+} que induzca la activación de la apoptosis ^{47, 48}. Uno de los reguladores de la muerte celular dependiente de EROS es el poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Cuando los parásitos se incuban con peróxido de hidrógeno, se da una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y peroxidación de los lípidos, induciendo la necrosis ^{48, 49}. Por otra parte, se han encontrado niveles elevados de EROS en parásitos en los cuales se ha estado estudiando el efecto de la integridad de la membrana mitocondrial en la formación de autofagosomas ⁵⁰.

La generación de EROS inducida por compuestos de vanadio como mecanismo de activación de la muerte celular ha sido explorado previamente, principalmente en células tumorales ⁴⁶. Los niveles más altos de EROS han sido detectados para complejos que contienen vanadio en estado de oxidación IV como centro metálico. Para complejos de vanadio (V) también se ha detectado niveles de EROS aumentado en células con mecanismos de muerte activados, pero siendo estos menores e independiente de las concentraciones iniciales ⁵¹.

Con el objetivo de explorar si los compuestos estudiados en esta tesis inducen la generación de EROS, y este hecho puede ser relacionado con la activación de los diferentes mecanismos de muerte celular discutidos, se trataron epimastigotas de *T. cruzi* con los cinco compuestos seleccionados con concentraciones relativas al EC_{50} por 4 y 24 horas. Para la detección de EROS, se utilizó la sonda fluorescente diacetato de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). Una vez que ingresa la sonda a la célula, el éster acetato es hidrolizado por las esterasas intracelulares y las especies radicalarias oxidan el producto a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF).

Los resultados obtenidos para los cinco compuestos seleccionados se resumen en la Figura 7.25. Luego de 4 horas de tratamiento, existe una tendencia al incremento en los niveles de EROS a medida que se aumenta la concentración de incubación que no llega a ser estadísticamente significativa. Sin embargo, para todos ellos, independientemente de la concentración inicial de inoculación, los niveles de EROS se incrementan significativamente luego de 24 horas en comparación con el grupo control. Los niveles de EROS detectados para los compuestos heterolépticos de vanadio (V) con ligandos tridentados [$V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)$], [$V^{VO}(IN-2H)(L2-H)$], [$V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)$] y el compuesto heteroléptico de vanadio (IV) [$V^{IVO}(L2-H)(mpo)$], se encuentran en el mismo orden, lo que sugiere que la generación de EROS a nivel citosólico es similar para todos ellos. Por su parte, el compuesto homoléptico [$V^{IVO}(L1-H)_2$] mostró niveles significativamente superiores, lo cual podría estar asociado a las diferencias encontradas y discutidas previamente en cuanto a los mecanismos de muerte celular activados.

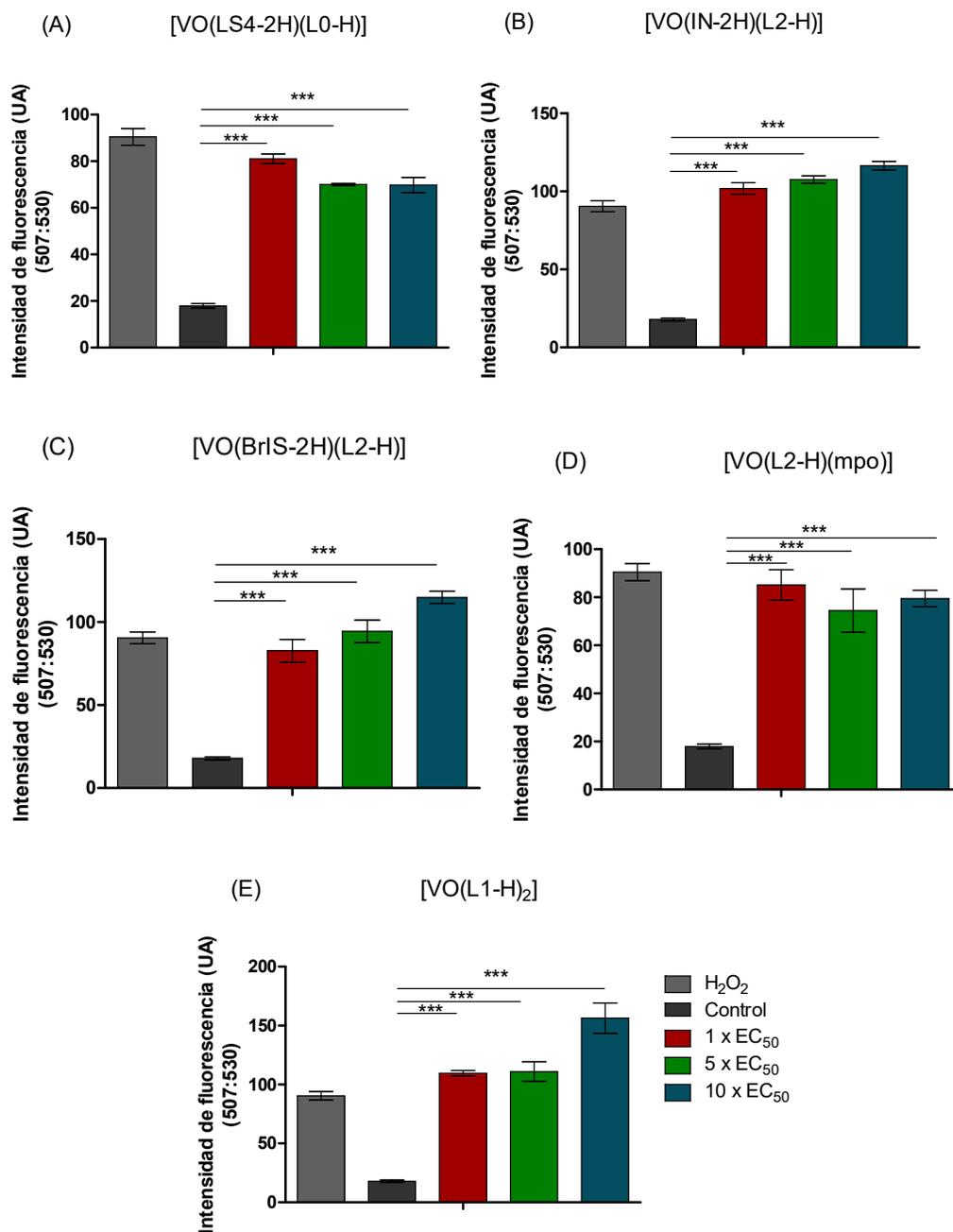


Figura 7.25. Análisis de EROS producidos en *T. cruzi* luego de 24 h tratamiento con 1x, 5x y 10x el valor de EC₅₀ previamente determinado en tripomastigotas de *T. cruzi* de los compuestos (A) [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], (B) [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], (C) [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)], (D) [V^{VO}(L2-H)(mpo)] y (E) [V^{VO}(L1-H)₂]. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar para cada condición. Se realizaron tres experimentos de forma independiente. Análisis de ANOVA: *** = $P < 0.001$.

7.7 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) puede ser utilizado como indicador de la integridad de la membrana mitocondrial, y por lo tanto de la viabilidad celular. Para analizar el efecto de los compuestos sobre $\Delta\psi_m$, se utilizó el marcador lipofílico catiónico JC1. Esta sonda lipofílica puede entrar selectivamente en las mitocondrias emitiendo fluorescencia verde en su forma monomérica ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm} / \lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) o roja en su forma agregada ($\lambda_{ex} = 560 \text{ nm} / \lambda_{em} = 590 \text{ nm}$). En células saludables, los J-agregados rojos se producen por acumulación dependiente del potencial normal de la mitocondria, mientras que, en células no saludables, JC1 no se acumula quedando como monómeros verdes (Figura 7.26). Por tanto, una fluorescencia roja indica mitocondrias sanas y fluorescencia verde indica que la función mitocondrial está afectada. En consecuencia, la despolarización de la membrana mitocondrial genera la disminución en la tasa de intensidades de fluorescencia rojo/verde (590 nm/530 nm).

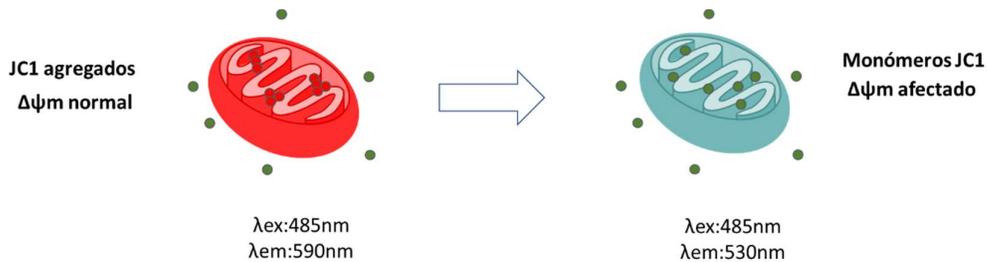


Figura 7.26. Esquema de acumulación de JC-1 en mitocondrias con potencial de membrana polarizado (agregados en rojo) y mitocondrias con potencial de membrana despolarizado (monómeros en verde).

Con el fin de evaluar la disminución de la tasa de fluorescencia roja/verde que ocurre como consecuencia de la despolarización mitocondrial, se calculó la relación de fluorescencia emitida a 590 nm frente a la intensidad emitida a 530

nm en parásitos tratados por 4 y 24 horas con los compuestos líderes de cada serie (Figura 7.8), con concentraciones relativas al valor de EC₅₀ previamente determinado en la forma tripomastigota.

Los epimastigotas cultivados en presencia del compuesto, luego de 4 y 24 horas exhiben una tendencia en la disminución de la tasa de intensidad de fluorescencias roja/verde, indicando despolarización de la membrana de manera dependiente de la concentración. Esta despolarización se hace estadísticamente significativa solamente en los tratamientos por 24 horas, para las concentraciones más altas ensayadas (Figura 7.27).

Para todos los compuestos, luego de 24 horas de exposición con concentraciones correspondientes a 10x EC₅₀, la tasa de fluorescencia disminuye en 18-26 %, lo que resulta en valores que difieren de forma significativa con el control de parásitos sin tratar. Además, se observó una disminución de la tasa de fluorescencia estadísticamente significativa para los compuestos de vanadio (V) [VVO(LS4-2H)(L0-H)], [VVO(IN-2H)(L2-H)] y [VVO(BrIS-2H)(L2-H)] a concentraciones equivalentes a 5x EC₅₀. Estos resultados indican que el $\Delta\psi_m$ mitocondrial está comprometido en los parásitos tratados.

Los cambios observados en el $\Delta\psi_m$ mitocondrial, y por lo tanto el grado de defunción de la mitocondria, puede vincularse con la presencia de especies radicalarias que inducen estrés oxidativo, afectando el funcionamiento de la mitocondria⁵². Si se analizan en conjunto los resultados de despolarización con la generación de EROS (discutida en la *sección 7.6*), es evidente que el comportamiento tanto frente a la formación de especies radicalarias, como en la despolarización de la membrana mitocondrial es similar en todos los compuestos estudiados (Figuras 7.26 y 7.27).

El balance del potencial de membrana mitocondrial es crucial para la producción de ATP por la ATP sintasa y para el transporte de proteínas dentro de la mitocondria, por lo que las variaciones en este potencial pueden ser usadas como marcador de muerte celular programada en mamíferos y protozoarios⁵³.

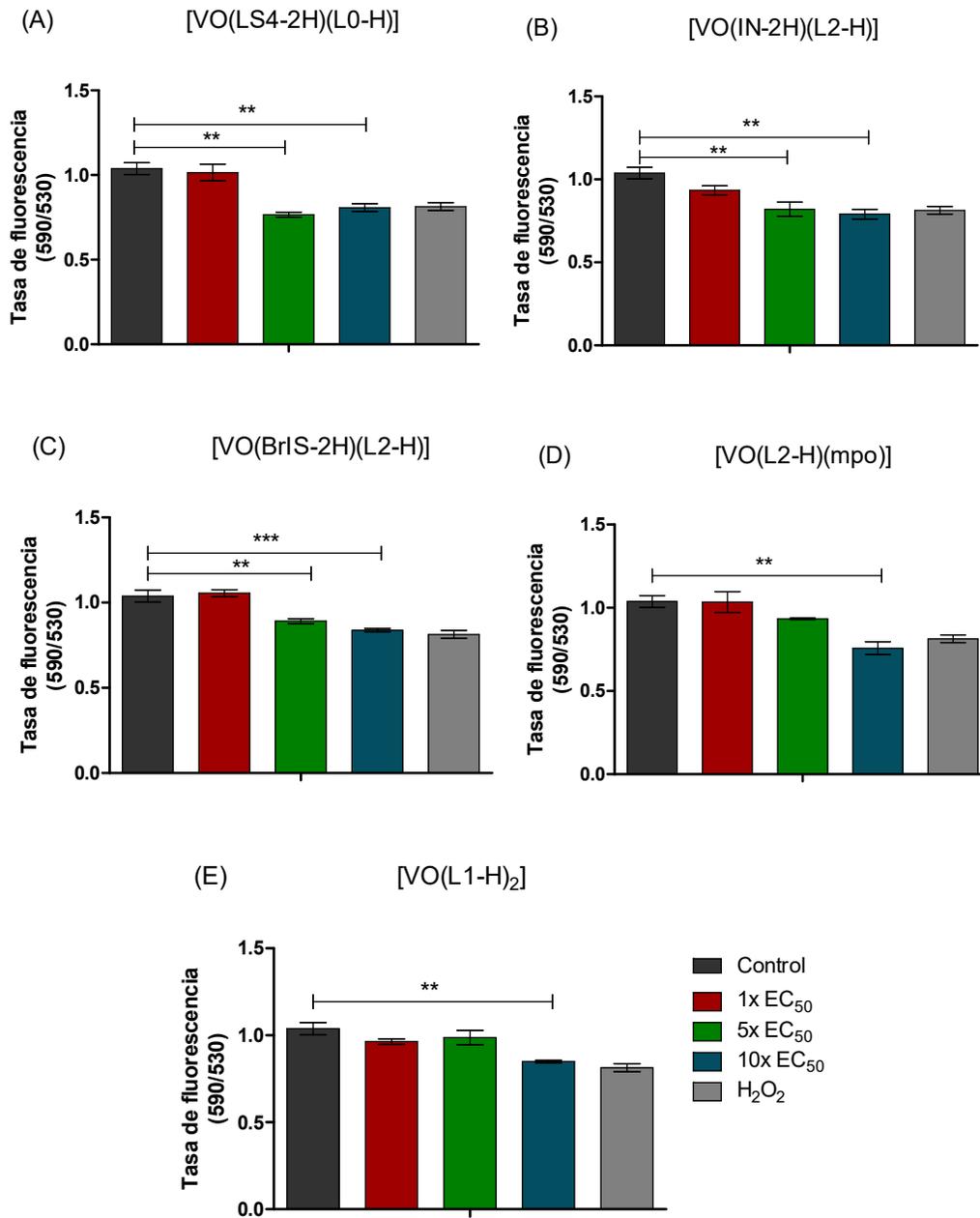


Figura 7.27. Tasa de intensidad de fluorescencia roja/verde (590/530 nm) luego del tratamiento por 24 horas con 1x, 5x y 10x EC₅₀ de los cinco compuestos líderes. Se utilizaron parásitos sin tratamiento como control. Las intensidades de fluorescencia a 590 y 530 nm fueron medidas en un fluóímetro de placas Varioskan Flash Spectral Scanning. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con dos réplicas técnicas (n = 6). Análisis ANOVA: ** = P<0,01, *** = P<0,001.

Se ha sugerido también, que el mecanismo de muerte celular depende del grado de disfunción mitocondrial. En los casos en que se observa una disfunción mitocondrial masiva que compromete el suministro de ATP, el resultado de la muerte celular es necrosis, mientras que una forma más leve de desregulación mitocondrial da lugar al mecanismo de apoptosis ^{54, 55}.

En este caso, las evidencias indican que, para todos los compuestos, el efecto sobre la membrana mitocondrial evidencia una desregulación moderada, lo que indicaría la inducción de apoptosis de forma dependiente de la mitocondria. En concordancia, todos los compuestos analizados mostraron un cierto porcentaje de células apoptóticas, siendo para algunos el mecanismo de muerte principal.

No obstante, la despolarización no es el único mecanismo de señalización que induce la activación de los mecanismos de muerte ^{54, 55}, por lo que se postula que la porción de parásitos necróticos encontrados no han activado esta vía de muerte por disfunción mitocondrial.

7.8 INHIBICIÓN DE LA FUMARATO REDUCTASA NADH DEPENDIENTE

En el capítulo 2 se introdujo el ligando Hmpo y sus efectos como inhibidor de la actividad de la enzima fumarato reductasa NADH dependiente (FRD) de *T. cruzi* ⁵⁶. Los antecedentes del ligando libre en conjunto con los trabajos previamente realizados por nuestro grupo con compuestos de coordinación clásicos y organometálicos con mpo como ligando ⁵⁷⁻⁵⁹, motivaron el estudio de la inhibición de FRD como potencial blanco de acción de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)].

7.8.1 Actividad enzimática

Se estudió el efecto de los cinco nuevos compuestos [$V^{IV}O(L-H)(mpo)$], L = L0-L4, sobre la actividad de la NADH-fumarato reductasa utilizando una dosis fija de 28 μM , concentración que fue seleccionada para poder comparar los resultados con los reportados previamente para los compuestos de coordinación con ligando mpo previamente estudiados por el grupo ⁵⁷⁻⁵⁹.

Se trataron extractos proteicos crudos de epimastigotas de *T. cruzi* con el ligando Na mpo y con los complejos [$V^{IV}O(L-H)(mpo)$], se observó un incremento estadísticamente significativo del efecto inhibitorio de la actividad enzimática de FRD en los complejos respecto al ligando en su forma libre (Figura 7.28).

El efecto fue similar para todos los compuestos a excepción de [$V^{IV}O(L4-H)(mpo)$], el cual muestra actividad inhibitoria mayor. Este resultado está de acuerdo con lo observado para la actividad *in vitro* frente a epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi* (Tabla 5.9, capítulo 5), donde el compuesto [$V^{IV}O(L4-H)(mpo)$] muestra el EC_{50} menor de la serie de compuestos [$V^{IV}O(L-H)(mpo)$] (EC_{50} epimastigotas: 0,83 μM ; EC_{50} tripomastigotas: 0,19 μM). Si bien la tendencia no es clara para el resto de la serie, dado que los valores de inhibición relativa fueron similares y los EC_{50} mostrados en la Tabla 5.9 no tienen grandes diferencias, este hallazgo sugiere que la enzima FRD podría ser un blanco de acción para esta serie de compuestos.

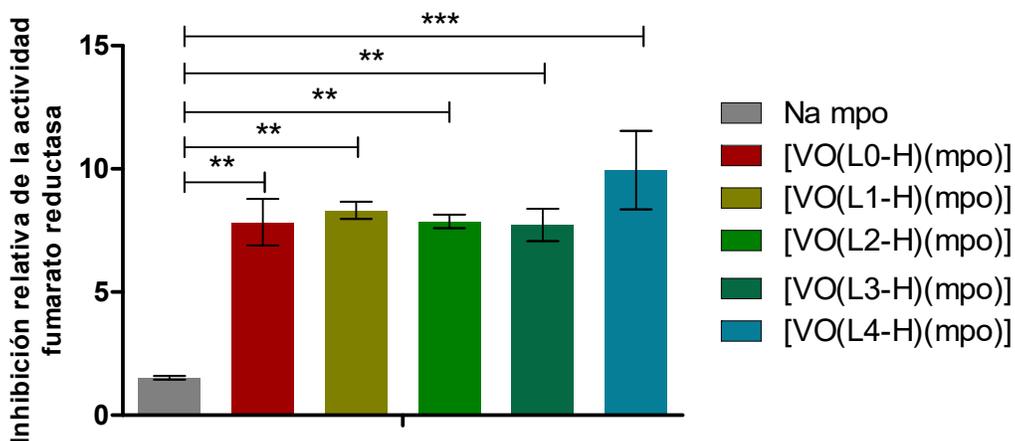


Figura 7.28. Efecto de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)], L = L0-L4 y el ligando libre mpo sobre la actividad de la enzima FRD de *T. cruzi*. Los extractos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* fueron incubados en ausencia (control) y presencia de una dosis de 28 μ M de cada uno de los compuestos. La inhibición enzimática total producida por Na mpo fue tomada como 1 y utilizada para calcular la variación relativa de la inhibición producida por cada complejo. Las desviaciones estándar (DS) para cada compuesto corresponden a dos estudios independientes. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con dos réplicas técnicas (n = 6). Análisis ANOVA respecto a la inhibición causada por el ligando libre Na mpo: ** = P<0,01, *** = P<0,001.

7.8.2 Viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan FRD

Con el propósito de validar la enzima FRD como blanco de acción de los compuestos [V^{IV}O(L-H)(mpo)] en *T. cruzi*, se evaluó la viabilidad celular en parásitos que sobreexpresan la enzima FRD. Estos parásitos fueron obtenidos en paralelo a esta tesis por Florencia Mosquillo durante su tesis de doctorado en el Laboratorio de Interacciones Moleculares (actual Sección Genómica Funcional) de la Facultad de Ciencias. Los detalles de clonado y transfección que permitieron obtener los sobreexpresantes fueron detallados en la *sección 3.5.7.2* del Capítulo 3. El ensayo de viabilidad celular sobre parásitos transfectantes se realizó bajo las

mismas condiciones experimentales que las utilizadas para la determinación de los EC₅₀ presentados en la Tabla 5.9 del Capítulo 5.

Se plantea la hipótesis de que, si la enzima es un blanco molecular de los compuestos en estudio, y que su inhibición podría desencadenar mecanismos de muerte, la sobreexpresión de esta enzima resultará en un efecto protector para los parásitos, dando lugar a un aumento de la viabilidad celular y en consecuencia una disminución de la actividad *in vitro* de los compuestos.

La Figura 7.29 muestra la curva dosis respuesta obtenida para el mismo compuesto, [V^{IV}O(L2-H)(mpo)], con epimastigotas salvajes y con epimastigotas que sobreexpresan FRD.

Ambas curvas tienen la misma tendencia de disminución de la viabilidad cuando se aumenta la concentración del compuesto. Sin embargo, en los parásitos transfectantes se observó una pendiente de disminución de viabilidad menor y una asíntota horizontal cercana al 45 % de la viabilidad celular.

En consecuencia, el EC₅₀ obtenido a partir de las curvas dosis respuesta presentadas en la Figura 7.29 para los parásitos sobreexpresantes en relación con los epimastigotas salvajes prácticamente se duplica (EC_{50, salvajes} = 1,71 ± 0,42; EC_{50, FRD} = 3,13 ± 0,87).

Si bien el tratamiento con los compuestos afecta múltiples procesos celulares, estos resultados evidencian que la enzima fumarato reductasa NADH dependiente es un blanco molecular de los compuestos de oxovanadio conteniendo el ligando mpo.

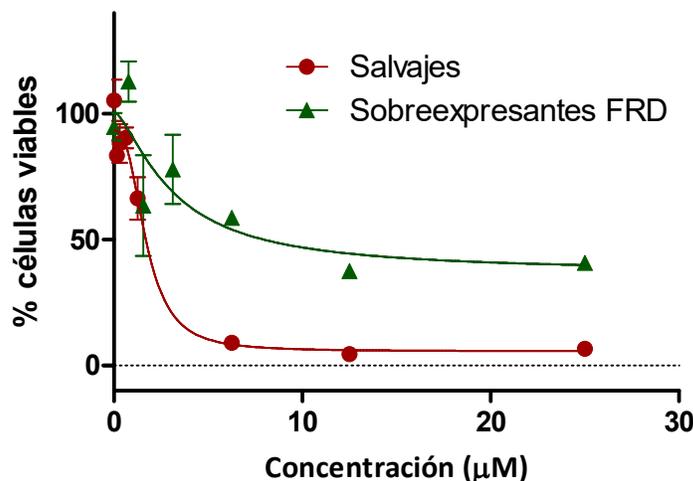


Figura 7.29 Curvas dosis-respuesta para el compuesto [V^{IV}O(L2-H)(mpo)] frente a los parásitos epimastigotas salvajes (curva roja) y sobreexpresantes FRD (curva verde). Cada experimento se realizó por triplicado. En el gráfico se representa el valor promedio y la desviación estándar (SD) para cada punto. $EC_{50, \text{salvajes}} = 1,71 \pm 0,42$; $EC_{50, \text{FRD}} = 3,13 \pm 0,87$.

Los estudios realizados reafirman la hipótesis de que la coordinación del ligando mpo al vanadio modula las propiedades del compuesto lo que no solo resulta en un aumento de la actividad antiparasitaria, sino también de su capacidad de inhibición de la enzima FRD, dando lugar a prometedores líderes para el diseño de nuevos inhibidores de la FRD selectivos contra *T. cruzi*.

7.9 CONCLUSIONES PARCIALES

Se realizaron una serie de ensayos biológicos con el objetivo de explorar potenciales blancos de acción y caracterizar el efecto de los compuestos sobre los parásitos, incluyendo el tipo de muerte celular asociado.

Los resultados de interacción con ADN indican que los compuestos tienen una baja afinidad por la biomolécula y que el efecto de la coordinación incrementa levemente la afinidad hacia la biomolécula. Por los motivos

anteriores, no se puso el foco en el estudio de la interacción del resto de los compuestos y no se postuló a esta molécula como un blanco molecular.

Los porcentajes de incorporación total obtenidos varían desde valores pequeños (menores a 2 %) hasta valores significativamente mayores (cerca de 68 %). Estos resultados refuerzan lo discutido en el Capítulo 6 en cuanto a las diferencias en la especiación química de cada familia una vez que los compuestos se encuentran expuestos al sistema biológico, sugiriendo que las diferencias observadas en la actividad antiparasitaria podrían estar asociadas a los cambios en la captura, distribución y especiación de los compuestos en el sistema biológico. En general, los análisis de captura total revelaron que los compuestos son incorporados de forma relativamente rápida por los parásitos llegando a un valor constante, probablemente por la saturación de los canales de transporte hacia el interior celular. Para el caso del compuesto [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], los porcentajes de vanadio obtenidos para la forma tripomastigota son mayores que para la obtenida en epimastigotas, lo que podrían explicar parcialmente las diferencias observadas en los EC₅₀ determinados en ambas formas.

En cuanto al análisis de distribución subcelular, el patrón encontrado para los 5 compuestos estudiados, [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], [V^{IV}O(L1-H)₂], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)] y [V^{IV}O(L2-H)(mpo)], tienen una tendencia clara, donde la distribución hacia el ADN y ARN es muy baja (llegando a valores menores a 1 %) y la asociación a proteínas solubles corresponde el mayor de los porcentajes determinados, llegando a porcentajes de 90 %. Estos resultados pueden ser relacionados con la baja interacción encontrada para algunos de los compuestos en estudio con ADN y con la alta afinidad que los compuestos explorados presentaron hacia proteínas séricas como albúmina y apo-transferrina (sección 6.3, capítulo 6). Aunque la naturaleza de estas proteínas es obviamente diferente, la interacción de los compuestos de vanadio con las proteínas ha sido ampliamente estudiada y, por lo tanto, los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado. Se necesitarían estudios adicionales de proteómica

para identificar las proteínas del parásito y las vías metabólicas afectadas por los compuestos. Los análisis metalómicos descritos en esta tesis, constituyen los primeros resultados publicados de captura total y distribución de vanadio en la forma epimastigota de *T. cruzi*, y de compuestos metálicos en general en la forma tripomastigota del parásito.

Los compuestos [V^{VO}(LS4-H)(L0-H)], [V^{IVO}(L1-H)₂], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] y [V^{VO}(BrIS-H)(L2-H)] mostraron un efecto dual, donde actúan como tripanostáticos a bajas concentraciones y como tripanocidas a concentraciones superiores. Por su parte, el compuesto [V^{IVO}(L2-H)(mpo)] reveló un efecto tripanocida para todas las concentraciones estudiadas.

Se analizó además el posible mecanismo de muerte celular involucrado. Si bien todos los compuestos analizados revelaron un comportamiento diferente frente a los marcadores fluorescentes de necrosis y apoptosis, analizando los resultados de forma integral se concluye que los compuestos [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^{IVO}(L2-H)(mpo)] inducen la apoptosis como principal mecanismo de muerte celular. Por su parte, [V^{IVO}(L1-H)₂] induce principalmente la necrosis. En cuanto al análisis de la expresión de las proteínas involucradas en la activación de la autofagia, los compuestos [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)] y [V^{VO}(L2-H)(mpo)] mostraron sobreexpresión de ATG7 y/o ATG8, lo que postula a la autofagia como mecanismo de muerte complementario en las células tratadas con estos tres compuestos. Resultaría interesante contar con experimentos complementarios a estos resultados que indiquen niveles de expresión de proteínas relacionadas con apoptosis y necrosis en parásitos tratados con estos compuestos.

Los niveles de EROS detectados a nivel citosólico resultaron muy similares para los complejos [V^{VO}(LS4-2H)(L0-H)], [V^{VO}(IN-2H)(L2-H)], [V^{VO}(BrIS-2H)(L2-H)] y [V^{IVO}(L2-H)(mpo)], mientras que [V^{IVO}(L1-H)₂] mostró niveles significativamente superiores, lo que podría estar asociado a las diferencias encontradas en cuanto a los mecanismos de muerte. Por su parte, los efectos sobre

la membrana mitocondrial sugieren que se da una desregulación moderada, lo que se relaciona directamente con la inducción de apoptosis, mecanismo encontrado para todos los compuestos estudiados.

Finalmente, se validó la enzima fumarato reductasa NADH dependiente como blanco de acción de los compuestos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, L = L0-L4, a través de estudios de inhibición de la actividad enzimática y ensayos de viabilidad sobre parásitos transfectantes que sobreexpresan la enzima. Además, se comprobó que la coordinación del mpo al metal incrementa la inhibición de esta, dando lugar a una estrategia prometedora para el diseño de nuevos compuestos selectivos para tripanosomátidos.

El conjunto de los resultados exploratorios que se presentaron en este capítulo, en cuanto a la respuesta de los parásitos tras la exposición a los potenciales metalofármacos desarrollados, constituye un insumo valioso para el área de investigación en el que se enmarca la tesis y, particularmente, para el diseño de nuevos compuestos de coordinación de vanadio como candidatos a fármacos para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

7.10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lepecq, J. B.; Paoletti, C., A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical - chemical characterization. *J Mol Biol* **1967**, *27*, 87-106.
2. Waring, M. J., Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **1965**, *13*, 269-282.
3. Willsky, G. R.; Chi, L. H.; Godzala, M., 3rd; Kostyniak, P. J.; Smee, J. J.; Trujillo, A. M.; Alfano, J. A.; Ding, W.; Hu, Z.; Crans, D. C., Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Coord Chem Rev* **2011**, *255* (19-20), 2258-2269.
4. Tan, C.; Liu, J.; Chen, L.; Shi, S.; Ji, L., Synthesis, structural characteristics, DNA binding properties and cytotoxicity studies of a series of Ru(III) complexes. *J Inorg Biochem* **2008**, *102* (8), 1644-53.
5. Matzumura, P. G. D.; Núñez, L. G.; Yáñez, A. L.; Rivera, N. Y. E., *Técnicas básicas de Biología Molecular*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa: México, 2013.
6. Cipriani, M.; Toloza, J.; Bradford, L.; Putzu, E.; Vieites, M.; Curbelo, E.; Tomaz, A. I.; Garat, B.; Guerrero, J.; Gancheff, J. S.; Maya, J. D.; Olea Azar, C.; Gambino, D.; Otero, L., 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* (27), 4677-4689.
7. Rivas, F.; Medeiros, A.; Rodríguez Arce, E.; Comini, M.; Ribeiro, C. M.; Pavan, F. R.; Gambino, D., New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: Evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inorg Biochem* **2018**, *187*, 73-84.
8. Rodríguez Arce, E.; Sarniguet, C.; Moraes, T. S.; Vieites, M.; Tomaz, A. I.; Medeiros, A.; Comini, M. A.; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Marques, F.; García, M. H.; Otero, L.; Gambino, D., A new ruthenium

- cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites. *J Coord Chem* **2015**, *68* (16), 2923-2937.
9. Benitez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D., Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements. *J Inorg Biochem* **2011**, *105* (2), 303-12.
 10. Mohamadi, M.; Ebrahimipour, S. Y.; Castro, J.; Torkzadeh-Mahani, M., Synthesis, characterization, crystal structure, DNA and BSA binding, molecular docking and *in vitro* anticancer activities of a mononuclear dioxido-uranium(VI) complex derived from a tridentate ONO aroylhydrazone. *J Photochem Photobiol B* **2016**, *158*, 219-27.
 11. Cirri, D.; Bartoli, F.; Pratesi, A.; Baglini, E.; Barresi, E.; Marzo, T., Strategies for the Improvement of Metal-Based Chemotherapeutic Treatments. *Biomedicines* **2021**, *9* (5).
 12. Englinger, B.; Pirker, C.; Heffeter, P.; Terenzi, A.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K.; Berger, W., Metal Drugs and the Anticancer Immune Response. *Chem Rev* **2019**, *119* (2), 1519-1624.
 13. Scalese, G.; Kostenkova, K.; Crans, D. C.; Gambino, D., Metallomics and other omics approaches in antiparasitic metal-based drug research. *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *67*, 102127.
 14. Singh, V.; Verma, K., Metals from cell to environment: Connecting Metallomics with other omics. *Open J Plant Sci* **2018**, *3*, 1-14.
 15. López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J. L., Environmental proteomics and metallomics. *J Proteomics* **2006**, *6* (S1), S51-S62.
 16. Gouveia, D.; Almunia, C.; Cogne, Y.; Pible, O.; Degli-Esposti, D.; Salvador, A.; Cristobal, S.; Sheehan, D.; Chaumot, A.; Geffard, O., Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *J Proteomics* **2019**, *198*, 66-77.

17. Callejón-Leblic, B.; Arias-Borrego, A.; Pereira-Vega, A.; Gómez-Ariza, J. L.; García-Barrera, T., The metallome of lung cancer and its potential use as biomarker. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (3), 778.
18. Montes-Bayón, M.; Sharar, M.; Corte-Rodriguez, M., Trends on (elemental and molecular) mass spectrometry based strategies for speciation and metallomics. *J TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *104*, 4-10.
19. Olivier, M.; Asmis, R.; Hawkins, G. A.; Howard, T. D.; Cox, L. A., The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine, *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (19), 4781.
20. Holtkamp, H. U.; Hartinger, C. G., Advanced metallomics methods in anticancer metallodrug mode of action studies. *J TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *104*, 110-117.
21. Ugone, V.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Crans, D. C.; Garribba, E., ESI-MS Study of the interaction of potential oxidovanadium(IV) drugs and amavadin with model proteins. *Inorg Chem* **2020**, *59* (14), 9739-9755.
22. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Díaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem* **2019**, *43* (45), 17756-17773.
23. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Díaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, *23* (8), 1265-1281.
24. Scalese, G.; Mosquillo, M. F.; Rostan, S.; Castiglioni, J.; Alho, I.; Perez, L.; Correia, I.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D., Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *J Inorg Biochem* **2017**, *175*, 154-166.

25. Mosquillo, M. F.; Smircich, P.; Lima, A.; Gehrke, S. A.; Scalese, G.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., High Throughput Approaches to Unravel the Mechanism of Action of a New Vanadium-Based Compound against *Trypanosoma cruzi*. *Bioinorg Chem Appl* **2020**, *2020*, 1634270.
26. Benitez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Arrambide, G.; Navarro, M.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (4), 609-16.
27. Fernandez, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benitez, J.; Piro, O. E.; Echeverria, G. A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M. L.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Pessoa, J. C.; Garat, B.; Gambino, D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. *J Inorg Biochem* **2013**, *127*, 150-60.
28. Fernandez, M.; Varela, J.; Correia, I.; Birriel, E.; Castiglioni, J.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gambino, D., A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Trans* **2013**, *42* (33), 11900-11.
29. Scalese, G.; Benitez, J.; Rostan, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Birriel, E.; Varela, J.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Pessoa, J. C.; Gambino, D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J Inorg Biochem* **2015**, *147*, 116-25.
30. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5375.

31. Xie, M. J.; Niu, Y. F.; Yang, X. D.; Liu, W. P.; Li, L.; Gao, L. H.; Yan, S. P.; Meng, Z. H., Effect of the chloro-substitution on lowering diabetic hyperglycemia of vanadium complexes with their permeability and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* **2010**, *45* (12), 6077-84.
32. Xie, M. J.; Yang, X. D.; Liu, W. P.; Yan, S. P.; Meng, Z. H., Insulin-enhancing activity of a dinuclear vanadium complex: 5-chloro-salicylaldehyde ethylenediamine oxovanadium(V) and its permeability and cytotoxicity. *J Inorg Biochem* **2010**, *104* (8), 851-7.
33. Kessler, R. L.; Soares, M. J.; Probst, C. M.; Krieger, M. A., *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e55497.
34. Smirlis, D.; Soteriadou, K., Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence* **2011**, *2* (3), 253-6.
35. Deolindo, P.; Teixeira-Ferreira, A. S.; Melo, E. J.; Arnholdt, A. C. V.; Souza, W. d.; Alves, E. W.; DaMatta, R. A., programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by Bothrops jararaca venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2005**, *100* (1), 33-38.
36. Irigoin, F.; Inada, N. M.; Fernandes, M. P.; Piacenza, L.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E.; Radi, R., Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **2009**, *418* (3), 595-604.
37. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Machado, I.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., Effect of a new anti-T. cruzi metallic compound based on palladium. *Biometals* **2018**, *31* (6), 961-974.
38. Mosquillo, M. F.; Bilbao, L.; Hernandez, F.; Tissot, F.; Gambino, D.; Garat, B.; Perez-Diaz, L., *Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound. *Chem Biol Drug Des* **2018**, *92* (3), 1657-1669.

39. Sandes, J. M.; Fontes, A.; Regis-da-Silva, C. G.; de Castro, M. C.; Lima-Junior, C. G.; Silva, F. P.; Vasconcellos, M. L.; Figueiredo, R. C., *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). *PLoS One* **2014**, *9* (4), e93936.
40. Veiga-Santos, P.; Reignault, L. C.; Huber, K.; Bracher, F.; De Souza, W.; De Carvalho, T. M., Inhibition of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **2014**, *141* (6), 814-25.
41. Jimenez, V.; Paredes, R.; Sosa, M. A.; Galanti, N., Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *J Cell Biochem* **2008**, *105* (3), 688-98.
42. Martin, S. J.; Reutelingsperger, C. E. M.; McGahon, A. J.; Rader, J. A.; Schie, R. C. A. A. v.; LaFace, D. M.; Green, D. t., Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **1995**, *192*, 1545-1556.
43. Sulsen, V. P.; Puente, V.; Papademetrio, D.; Batlle, A.; Martino, V. S.; Frank, F. M.; Lombardo, M. E., Mode of Action of the Sesquiterpene Lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* **2016**, *11* (3), e0150526.
44. Alvarez, V. E.; Kosec, G.; Sant'Anna, C.; Turk, V.; Cazzulo, J. J.; Turk, B., Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **2008**, *283* (6), 3454-3464.
45. Menna-Barreto, R. F.; Correa, J. R.; Cascabulho, C. M.; Fernandes, M. C.; Pinto, A. V.; Soares, M. J.; De Castro, S. L., Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **2009**, *136* (5), 499-510.

46. Kowalski, S.; Wyrzykowski, D.; Inkielewicz-Stepniak, I., Molecular and Cellular Mechanisms of Cytotoxic Activity of Vanadium Compounds against Cancer Cells. *Molecules* **2020**, *25* (7).
47. Docampo, R.; Vercesi, A. E., Mitochondrial Ca²⁺ and reactive oxygen species in trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* **2021**.
48. Menna-Barreto, R. F. S., Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis* **2019**, *10* (2), 1-11.
49. Bustos, P. L.; Volta, B. J.; Perrone, A. E.; Mildubegger, N.; Bua, J., A homolog of cyclophilin D is expressed in *Trypanosoma cruzi* and is involved in the oxidative stress-damage response. *Cell Death Discov* **2017**, *3*, 16092.
50. Williams, R. A.; Smith, T. K.; Cull, B.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H., ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. *PLoS Pathog* **2012**, *8* (5), e1002695.
51. Wu, J. X.; Hong, Y. H.; Yang, X. G., Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium(IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *J Biol Inorg Chem* **2016**, *21* (8), 919-929.
52. Docampo, R., Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact* **1990**, *73*, 1-27.
53. Genes, C.; Baquero, E.; Echeverri, F.; Maya, J. D.; Triana, O., Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *J Parasites vectors* **2011**, *4* (1), 1-8.
54. Kroemer, G., Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *J Cell Death Differentiation* **1997**, *4* (6), 443-456.
55. Zamzami, N.; Hirsch, T.; Dallaporta, B.; Petit, P. X.; Kroemer, G. J. J. o. b.; biomembranes, Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **1997**, *29* (2), 185-193.

56. Turrens, J. F.; Newton, C. L.; Zhong, L.; Hernandez, R.; Whitfield, J.; Docampo, R., Mercaptopyridine-*N*-oxide, an NADH-fumarate reductase inhibitor, blocks *Trypanosoma cruzi* growth in culture and in infected myoblasts. *FEMS Microbiol Let* **1999**, *175* 217-221.
57. Vieites, M.; Smircich, P.; Guggeri, L.; Marchan, E.; Gomez-Barrio, A.; Navarro, M.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2009**, *103* (10), 1300-6.
58. Vieites, M.; Smircich, P.; Parajon-Costa, B.; Rodriguez, J.; Galaz, V.; Oleazar, C.; Otero, L.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Gomez-Barrio, A.; Garat, B.; Gambino, D., 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* **2008**, *13* (5), 723-35.
59. Rodriguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Perez-Diaz, L.; Echeverria, G. A.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitino, E. L.; Maringolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q.; Pavan, F. R.; Otero, L.; Gambino, D., Aromatic amine *N*-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Trans* **2015**, *44* (32), 14453-64.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Contenido

8.1	CONCLUSIONES GENERALES.....	507
8.2	PERSPECTIVAS DE TRABAJO.....	511
8.3	CONSIDERACIONES FINALES.....	513

8.1 CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un gran aporte a dos aspectos de la Química Inorgánica. Por un lado, los resultados de síntesis y caracterización estructural de los nuevos compuestos heterolépticos y homolépticos de oxovanadio desarrollados aportan a la Química Inorgánica sintética, y por otro lado, los resultados obtenidos de evaluación biológica y efectos celulares de los compuestos estudiados sobre los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi* y *L. infantum*, y el estudio de las propiedades fisicoquímicas de interés biológico aportan a la Química Inorgánica Medicinal enfocada al desarrollo de potenciales fármacos antiparasitarios.

Desde el punto de vista Inorgánico, se desarrollaron 19 nuevos compuestos heterolépticos de oxovanadio con ligandos bioactivos que pueden ser clasificados en cuatro familias y se sintetizaron 18 compuestos homolépticos, donde 4 de ellos no habían sido reportados previamente.

Tres de estas familias de compuestos heterolépticos guardan estrecha relación, dado que se trata de compuestos de oxovanadio (V) estructuralmente relacionados con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina y coligandos tridentados semicarbazonas o N²-(4-piridinilcarbonyl)hidrazonas. La primera de ellas, de fórmula general [V^{VO}(LS-2H)(L0-H)], contiene cuatro compuestos octaédricos de oxovanadio (V) donde L0 corresponde al ligando bioactivo 8-hidroxiquinolina y LS representa un conjunto de ligandos derivados de la semicarbazona de salicilaldehído, los cuales contienen variaciones químicas sobre el anillo fenólico del aldehído. La segunda familia, de fórmula [V^{VO}(IN-2H)(L-H)], está formada por cinco compuestos de oxovanadio (V), donde IN es un ligando tridentado obtenido por condensación de 2-hidroxinaftaldehído e isoniazida, y L representa a cinco ligandos bioactivos, derivados sustituidos de la 8-hidroxiquinolina. Los cinco complejos correspondientes a la última familia de compuestos heterolépticos de oxovanadio (V), de fórmula general [V^{VO}(BrIS-

2H)(L-H)], guardan íntima relación con los compuestos de la familia anterior, dado que contienen los mismos ligandos bioactivos, pero se realizó una modificación de los sustituyentes del anillo fenólico del fragmento aldehído que forma parte de la *N*²-(4-piridinilcarbonil)hidrazona tridentada.

La cuarta familia de compuestos heterolépticos desarrollada implica un paso adelante en el diseño racional de compuestos bioactivos de vanadio. Se trata de una serie de cinco compuestos de oxovanadio (IV), [V^{IV}O(L-H)(mpo)], en los que se incluyeron en la misma esfera de coordinación los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina y el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (Hmpo), dando lugar a compuestos multifuncionales que contienen en una misma molécula dos ligandos bioactivos contra tripanosomátidos.

Además de los compuestos heterolépticos objetivo de este trabajo, se obtuvieron los cuatro compuestos homolépticos de dioxovanadio [V^VO₂(LS-H)], y los compuestos [V^VO₂(IN-H)] y [V^VO₂(BrIS-H)], con el fin de evaluar la influencia de la inclusión de los ligandos bioactivos en la respuesta biológica. Se destaca, además, que el compuesto [V^VO₂(LS3-H)] se sintetizó y caracterizó por primera vez en esta tesis.

Si bien la mayoría de los compuestos homolépticos de oxovanadio (IV) y (V) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, [V^{IV}O(L-H)₂] y [V^VO(OCH₃)(L-H)₂] ya habían sido previamente desarrollados hace algunas décadas, en esta oportunidad se amplió la caracterización de los mismos y se completó la serie reportando por primera vez los compuestos [V^{IV}O(L4-H)₂], [V^{IV}O(L5-H)₂] y [V^VO(OCH₃)(L5-H)₂].

Todos los nuevos compuestos 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 la potencialidad de unión a proteínas plasmáticas.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte interesante a la química de coordinación del vanadio con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, coligandos tridentados y *N*-óxidos de aminas aromáticas.

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 *L. infantum*, y se estudió la citotoxicidad sobre células mamíferas modelo.

La mayoría de los nuevos compuestos heterolépticos con derivados de la 8-hidroxiquinolina y coligandos tridentados mostraron actividad antitripanosoma con valores de EC₅₀ del mismo orden o menores que los fármacos de referencia y los ligandos bioactivos en su forma libre. Los compuestos homolépticos con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina mostraron actividades mayores y toxicidades menores que los compuestos heterolépticos desarrollados.

En cuanto a los dos modelos de parásitos utilizados, *T. cruzi* resultó ser más sensible a los compuestos que *L. infantum*. Todos los compuestos ensayados fueron más activos sobre la forma infectiva tripomastigota que sobre la forma epimastigota de *T. cruzi*. Se seleccionaron 5 compuestos líderes para estudiar los efectos sobre la infección de *T. cruzi* en células VERO. Adicionalmente, se utilizaron dos modelos *in vivo*, Zebrafish y *C. elegans*, para evaluar la toxicidad de algunos de los compuestos desarrollados.

Para los compuestos líderes seleccionados, se estudió la metalómica de los compuestos en *T. cruzi*. Estos ensayos brindaron información asociada a la captura de los compuestos por el parásito y la asociación preferencial con diferentes biomacromoléculas del mismo, siendo los primeros reportes de captura y distribución de vanadio en *Trypanosoma cruzi*.

Se realizaron además diversos ensayos biológicos con el fin de caracterizar el tipo de muerte celular asociado en este parásito tal como la activación de la apoptosis, necrosis y autofagia. De forma global, se definió que los compuestos heterolépticos desarrollados inducen la apoptosis como principal mecanismo de

muerte celular, sin embargo, se postuló la necrosis y la autofagia como mecanismos de muerte alternativos activados en paralelo. Además, se estudió la generación de especies reactivas del oxígeno y la disfunción del potencial de membrana mitocondrial, como potenciales mecanismos de activación de las vías de muerte celular.

Finalmente, se estudió la inhibición de la fumarato reductasa NADH dependiente para los compuestos pertenecientes a la familia $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, postulando la enzima como un blanco de acción de estos compuestos.

Los resultados adquiridos y analizados en su conjunto para los sistemas estudiados servirán como punto de partida para diseñar nuevos compuestos potencialmente activos. Algunas modificaciones químicas que se plantea realizar según nuestra estrategia de diseño racional se detallan en la *sección 8.2*.

A su vez, los resultados de la variedad de experimentos biológicos puestos a punto y realizados para estudiar los efectos que producen los compuestos de vanadio en *T. cruzi* motivan a complementar el trabajo analizando otros posibles blancos moleculares, vías metabólicas y mecanismos de señalización afectados.

La experiencia y la independencia adquirida durante el trabajo de tesis de doctorado, tanto en temas relacionados con Química Inorgánica como con el manejo de cultivos celulares y estudios de los efectos a nivel biológico de potenciales fármacos, constituyen un pilar que resultó fundamental para mi formación profesional, como docente de Química Inorgánica y para mi consolidación como investigador en un área interdisciplinaria como lo es la Química Inorgánica Medicinal.

Parte de los resultados informados en esta tesis se plasmó en las siguientes publicaciones, que se adjuntan en el Apéndice 2:

1. Scalese, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* **2018**, 23 (8), 1265-1281
2. Scalese, G.; Machado, I.; Correia, I.; Pessoa, J. C.; Bilbao, L.; Pérez-Diaz, L.; Gambino, D., Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New J Chem* **2019**, 43 (45), 17756-17773
3. Scalese, G.; Machado, I.; Salinas, G.; Perez-Diaz, L.; Gambino, D., Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* **2021**, 26 (17), 5375
4. Scalese, G.; Arhouma, Z.; Kostenkova, K.; Pérez-Díaz, L.; Crick, D. C.; Gambino, D.; Crans, D. C., Do bioactive 8-hydroxyquinolines oxidovanadium(IV) and (V) complexes inhibit the growth of *M. smegmatis*? *J Inorg Biochem* **2022**, 237, 111984

8.2 PERSPECTIVAS DE TRABAJO

A partir de los resultados obtenidos, surgen alternativas en cuanto a las perspectivas de estudio de los efectos celulares causados por los compuestos de vanadio en parásitos tripanosomátidos. Por otra parte, las conclusiones de estas tesis son un insumo valioso para el diseño racional de nuevos compuestos de

coordinación de vanadio con ligandos bioactivos que tengan la posibilidad de actuar por un mecanismo de acción múltiple.

En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las características químicas y biológicas de los compuestos desarrollados, se plantean las siguientes perspectivas:

- Completar el análisis de muerte celular por genómica funcional incluyendo el estudio de genes que codifiquen para proteínas involucradas en los diferentes mecanismos de muerte.
- Continuar estudiando los efectos de los compuestos de vanadio en diferentes procesos metabólicos de los parásitos tripanosomátidos mediante el análisis integral por aproximaciones ómicas tales como transcriptómica, proteómica y metabolómica.
- Completar los estudios de especiación química en medios de cultivos, intentando identificar la naturaleza de las especies activas.
- Para los compuestos $[V^{IV}O(L-H)(mpo)]$, se pretende realizar estudios computacionales complementarios que permitan describir los mecanismos de inhibición enzimática involucrados en el efecto sobre la enzima fumarato reductasa dependiente de NADH.
- Realizar un acercamiento hacia la estrategia de encapsulamiento de fármacos, de manera de modular la estabilidad, la biodisponibilidad y actividad biológica.
- Realizar un análisis QSAR con el objetivo de relacionar cuantitativamente parámetros estructurales con la actividad biológica.
- Expandir la serie de compuestos de oxovanadio(V) con derivados de la 8-hidroxiquinolina y ligandos tridentados obteniendo los compuestos análogos de oxovanadio (IV).
- Diseñar nuevos compuestos de coordinación de oxovanadio (IV) y (V) que incluyan los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina y

ligandos tridentados que le confieran mayor estabilidad en disolución acuosa y disminuyan la toxicidad inespecífica.

- Diseñar nuevos compuestos de oxovanadio (IV) con el ligando mpo y un coligando con baja toxicidad en las células de mamífero, obteniendo compuestos con alta selectividad por los parásitos tripanosomátidos.

8.3 CONSIDERACIONES FINALES

A partir de las propuestas presentadas anteriormente se pretende avanzar hacia el desarrollo de nuevos potenciales metalofármacos activos frente a parásitos tripanosomátidos genómicamente relacionados, que ameriten la realización de estudios *in vivo*.

Se espera que las investigaciones posteriores conduzcan a compuestos metálicos promisorios que puedan ser introducidos en fases clínicas.

Los resultados obtenidos en esta tesis incentivarán a la comunidad científica del área Química Inorgánica Medicinal a diseñar nuevos compuestos de vanadio y otros metales que tengan los efectos deseados sobre parásitos tripanosomátidos.