



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Nuevos compuestos heterobimetálicos derivados de  
ferrocenos con potencial actividad biológica

**Feriannys Loreleis Rivas Pinto**

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Septiembre 2023



Nuevos compuestos heterobimetálicos derivados de ferrocenos con  
potencial actividad biológica

Tribunal:

Dr. Raúl Chiozzone (Área Química Inorgánica-DEC, Facultad de Química, UdelaR)

Dr. Guzmán Álvarez (Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, UdelaR)

Dra. Isabel Correia (Instituto Superior Técnico, Universidad de Lisboa).

Directora  
Dra. Dinorah Gambino

## Agradecimientos

Por suerte, hay mucho para agradecer.

Agradezco a la vida, a mi familia y al Uruguay por permitirme hacer vida en este país durante todos estos años.

Agradezco a mi tutora, Dinorah, que me dio la oportunidad que necesitaba en aquel momento y me ha enseñado más cosas de las que ella es consciente, me parece. Ha sido un camino largo y duro, pero aquí estamos! Increíble.

Agradezco a mis compañeros de grupo de investigación, a Gonza, Santi y particularmente a Caro y a Rodri. No saben lo que su trabajo me ha aportado, tanto a nivel de investigación como a nivel personal. A Lucía; que a pesar de no estar relacionada con mi tesis directamente, siempre me ha apoyado. Un especial agradecimiento a Esteban, ex integrante del grupo, quien me acogió cuando recién llegué y me enseñó todo lo que sabía y más. Más que un compañero de laboratorio, fue como un hermano. Siempre estaré eternamente agradecida contigo, amigo.

Agradezco al grupo de Biología Redox de Tripanosomátidos del Instituto Pasteur de Montevideo, con el que he trabajado muchos años ya. Particularmente quiero agradecer a Andrea, que ha sido a lo largo de los años como mi otra tutora.

También quiero agradecer a Nacho Machado (medidas muchísimas), Leopoldo Suescun (refinado de estructuras), Hugo Cerecetto (estudio QSAR), Nicole Lecot, a Helena Pardo y a Pablo Miranda (síntesis y caracterización de nanopartículas). De mi pasantía en Brasil, que sin duda ha sido la pasantía más fructífera que tuve, quiero agradecer al Dr. Valtencir Zucolotto por recibirme y particularmente a Natália Noronha Ferreira, quien me enseñó todo lo que necesitaba saber en el

poquito tiempo que tuvimos. Especiales agradecimientos a Isa, sin ella no habría logrado avanzar tanto en esa instancia como lo hice.

Por supuesto, me quedo corta al agradecer a mis amigos. A Vale, Emi, a Isa. Quiero agradecer especialmente a Carlos y a Grys, por la amistad a lo largo de los años y especialmente en estos últimos meses. Gracias a ustedes (en parte) encontré el impulso que me faltaba para cerrar este ciclo.

*And last, but not least... I wanna thank me.*

# Nuevos compuestos heterobimetálicos derivados de ferrocenos con potencial actividad biológica

Feriannys Rivas, Dra.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dra. Dinorah Gambino

(Área Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, UdelaR)

## RESUMEN

El presente Trabajo de Tesis de Doctorado se basa en el desarrollo de nuevos compuestos de coordinación que contengan en una misma entidad dos centros metálicos, ligandos orgánicos bioactivos que presenten actividad biológica frente a microorganismos patógenos, y coligandos que permitan modular las propiedades fisicoquímicas de los compuestos resultantes, con el objetivo de generar nuevos potenciales metalofármacos antitumorales, antituberculosos y/o antiparasitarios. En este marco se desarrollaron 18 compuestos heterobimetálicos Fe(II)-Pd(II), Fe(II)-Pt(II) y Fe(II)-Ru(II), con los ligandos tropolona (trop) e hinokitiol (hino), ligandos análogos de la 1,10-fenantrolina y derivados de la 8-hidroxiquinolina (8HQ), y un coligando derivado del ferroceno: el 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf). Se obtuvieron tres familias de compuestos: **1**) los  $[M(\text{trop})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[M(\text{hino})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ ; **2**) los  $[M(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y **3**) los  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NN})(\text{dppf})](\text{X})$ , en donde  $M = \text{Pd}(\text{II})$  o  $\text{Pt}(\text{II})$ ,  $\text{HL} = \text{HL1} - \text{HL5}$  (derivados de la 8HQ),  $\text{NN} = 2,2'$ -bipiridina (bipy) o 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (tmp) y  $\text{X} = \text{PF}_6^-$  o  $\text{Cl}^-$ . Todos los compuestos presentaron actividad antiparasitaria frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) (agente causante de la Tripanosomiasis Africana) con valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 4,8 – 0,13  $\mu\text{M}$  y valores de índice de selectividad hacia el parásito ( $\text{IS} = \text{IC}_{50} \text{ macrófago murino} / \text{IC}_{50}$

*T. brucei*) entre 102 – 4, resultando en muchos casos más activos que los ligandos libres y que el fármaco de referencia Nifurtimox. y valores de índice de selectividad hacia el parásito (IS = IC<sub>50</sub> macrófago murino/ IC<sub>50</sub> *T. brucei* entre 102 – 4), resultando en muchos casos más activos que los ligandos libres y que el fármaco de referencia Nifurtimox. A su vez, algunas familias presentaron actividad en el rango micromolar frente a distintas formas celulares de *Leishmania infantum*, uno de los agentes causantes de la leishmaniasis visceral, frente a células de cáncer de ovario (A2780, A2780cisR) y/o incluso *Mycobacterium tuberculosis*. A su vez, se estudiaron propiedades fisicoquímicas de importancia biológica, como la lipofilia y la estabilidad en solución. Además, se estudiaron posibles mecanismos de acción de los nuevos compuestos, resultando el ADN una posible diana de los compuestos desarrollados. Posteriormente, tomando en cuenta la similitud estructural de los compuestos de las familias 1) y 2) y la de otros compuestos desarrollados previamente por nuestro grupo de investigación, se realizó un estudio cuantitativo de relación estructura-actividad, cuyos resultados reflejan que las propiedades electrónicas de los ligandos y la naturaleza del centro metálico son determinantes de la actividad biológica observada frente a *T. brucei*. Entre todas las familias se identificaron dos compuestos hit: el [Pt(L4)(dppf)](PF<sub>6</sub>) (IC<sub>50</sub> = 0,13 μM; IS = 48) y el [Ru(L5)(dppf)(bipy)](Cl) (IC<sub>50</sub> = 0,13 μM; IS = 38). El primero fue seleccionado para la realización de un estudio preclínico exploratorio en ratones Balb/CJ, en donde se evidenció que el tratamiento con el compuesto extendió la vida de los animales, más no fue curativo. Ambos compuestos fueron seleccionados para la inclusión en sistemas nanométricos basados en fosfolípidos y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y mostraron actividad *in vitro* comparable frente a *T. brucei* respecto a los compuestos sin encapsular.

# New heterobimetallic compounds with ferrocenyl derivatives with potential biological activity

Feriannys Rivas, Dra.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2023

DIRECTOR: Dra. Dinorah Gambino

(Área Química Inorgánica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, UdelaR)

## ABSTRACT

This PhD Thesis involves the development of new coordination compounds that contain in the same entity two metallic centers, bioactive organic ligands that present biological activity against pathogenic microorganisms, and coligands that allow modulating the physicochemical properties of the resulting compounds, with the aim of generating new potential antitumoral, antituberculosis and/or antiparasitic metallopharmaceuticals. Within this framework, 18 heterobimetallic compounds Fe(II)-Pd(II), Fe(II)-Pt(II) and Fe(II)-Ru(II) were developed, with the ligands tropolone (trop) and hinokitiol (hino), ligands analogous to 1,10-phenanthroline and derivatives of 8-hydroxyquinoline (8HQ), and a ferrocene-derived coligand: 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dppf). Three families of compounds were obtained: 1)  $[M(\text{trop})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  and  $[M(\text{hino})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ ; 2) the  $[M(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  and 3) the  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NN})(\text{dppf})](\text{X})$ , where  $M = \text{Pd}(\text{II})$  or  $\text{Pt}(\text{II})$ ,  $\text{HL} = \text{HL1} - \text{HL5}$  (8HQ derivatives),  $\text{NN} = 2,2'$ -bipyridine (bipy) or 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline (tmp) and  $\text{X} = \text{PF}_6^-$  or  $\text{Cl}^-$ . All compounds presented antiparasitic activity against the infective form of *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) (causative agent of African Trypanosomiasis) with  $\text{IC}_{50}$  values between 4.8 – 0.13  $\mu\text{M}$  and selectivity index values towards the parasite ( $\text{IS} = \text{IC}_{50} \text{ murine macrophage} / \text{IC}_{50} \text{ T. brucei}$ )

between 10<sup>2</sup> – 4, resulting in many cases more active than the free ligands and the reference drug Nifurtimox. In turn, some families presented activity in the micromolar range against different cellular forms of *Leishmania infantum*, one of the causative agents of visceral leishmaniasis, against ovarian cancer cells (A2780, A2780cisR) and/or even *Mycobacterium tuberculosis*. In turn, physicochemical properties of biological importance were studied, such as lipophilicity and stability in solution. In addition, possible mechanisms of action of the new compounds were studied, resulting in DNA being a possible target of the developed compounds. Subsequently, taking into account the structural similarity of the compounds of families 1) and 2) and that of other compounds previously developed by our research group, a quantitative study of the structure-activity relationship was carried out, the results of which reflect that the electronic properties of the ligands and the nature of the metal center are determinants of the biological activity observed against *T. brucei*. Among all families, two hit compounds were identified: [Pt(L4)(dppf)](PF<sub>6</sub>) (IC<sub>50</sub> = 0.13 μM; IS = 48) and [Ru(L5)(dppf)(bipy)](Cl) (IC<sub>50</sub> = 0.13 μM; IS = 38). The first was selected to carry out an exploratory preclinical study in Balb/CJ mice, where it was shown that treatment with the compound extended the life of the animals but was not curative. Both compounds were selected for inclusion in nanometric systems based on phospholipids and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and showed comparable *in vitro* activity against *T. brucei* with respect to the unencapsulated compounds.

# Índice

Índice.....	vii
Índice de tablas .....	xii
Índice de Figuras.....	xviii
Lista de abreviaturas .....	xxvii
Capítulo 1: Introducción, antecedentes y propuesta .....	1
1.1 Química Inorgánica Medicinal (QIM) .....	1
1.2 Enfermedades tropicales desatendidas (ETD).....	2
1.2.1 Tripanosomiasis Africana Humana (HAT) .....	3
1.2.2 Leishmaniasis .....	6
1.3 Diseño racional de metalofármacos .....	9
1.3.1 Selección de metales.....	11
1.3.2 Selección de ligandos .....	15
1.3.3 Selección del co-ligando.....	19
1.4 Sistemas encapsulantes nanoestructurados .....	23
1.5 Propuesta .....	24
1.5.1 Objetivos generales.....	25
1.5.2 Objetivos específicos .....	25
Capítulo 2: Materiales y métodos .....	26
2.1 Síntesis .....	27
2.1.1 Síntesis de precursores.....	27
2.1.2 Síntesis de compuestos .....	31
2.2 Caracterización.....	36
2.2.1 Caracterización en estado sólido .....	36
2.2.2 Caracterización en solución.....	39
2.2.3 Estudios de estabilidad .....	41
2.3 Actividad Biológica.....	42
2.3.1 Ensayos de viabilidad frente a parásitos tripanosomátidos .....	42

2.3.2 Ensayos de citotoxicidad en macrófagos murinos.....	47
2.3.3 Ensayos de viabilidad celular frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>M. tuberculosis</i> ) y células de pulmón humano MRC-5 .....	48
2.3.4 Ensayos de citotoxicidad en células de cáncer de ovario y fibroblastos normales.....	50
2.4 Lipofilia.....	51
2.5 Mecanismo de acción .....	52
2.5.1 Interacción con ADN.....	52
2.5.2 Estado tiol-redox intracelular de <i>T. brucei</i> .....	53
2.5.3 Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	56
2.6 Estudios de eficacia terapéutica del compuesto Pt-dppf-L4 en ratones .....	57
2.7 Estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR) .....	58
2.8 Encapsulación de compuestos hit en sistemas nanoestructurados .....	60
2.8.1 Nanosistemas liposomales .....	61
2.8.2 Nanosistemas poliméricos basados en ácido poli(láctico-glicólico) o PLGA.....	65
Capítulo 3: Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de la tropolona.....	73
3.1 Introducción .....	74
3.2 Síntesis de compuestos M-dppf-L (M = Pd o Pt, HL = tropolona (Htrop) o hinokitiol (Hhino)).....	75
3.3 Caracterización.....	75
3.3.1 Caracterización en estado sólido .....	75
3.3.2 Caracterización en solución.....	84
3.4 Actividad biológica .....	94
3.4.1 Actividad frente a parásitos tripanosomátidos.....	94
3.4.2 Ensayos de viabilidad celular frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>M. tuberculosis</i> ) .....	99
3.5 Lipofilia.....	102
3.6 Mecanismo de acción .....	104
3.6.1 Interacción con ADN.....	104
3.6.2 Estado tiol-redox intracelular de <i>T. brucei</i> .....	108
3.7 Conclusiones parciales .....	109

Capítulo 4: Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de la 8-hidroxiquinolina .....	111
4.1 Introducción .....	112
4.2 Síntesis de compuestos M-dppf-L (M = Pd(II) o Pt(II), HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina).....	113
4.3 Caracterización.....	114
4.3.1 Caracterización en estado sólido .....	114
4.3.2 Caracterización en solución.....	126
4.4 Actividad biológica .....	140
4.4.1 Actividad frente a <i>T. brucei</i> y selectividad hacia el parásito.....	140
4.4.2 Ensayos de citotoxicidad en células de cáncer de ovario y fibroblastos normales.....	142
4.5 Estudio de estabilidad en solución de los compuestos M-dppf-L4, M = Pd(II) y Pt(II)...	145
4.5.1 Estudio por resonancia magnética nuclear de fósforo ( $^{31}\text{P}$ -RMN) y platino ( $^{195}\text{Pt}$ -RMN) .....	145
4.5.2 Estudio de estabilidad en solución por HPLC .....	149
4.6 Lipofilia.....	151
4.7 Mecanismo de acción .....	152
4.7.1 Interacción con ADN.....	152
4.7.2 Niveles intracelulares de EROs en células de cáncer de ovario A2780 .....	156
4.8 Estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).....	157
4.9 Estudios de eficacia terapéutica del compuesto Pt-dppf-L4 en ratones .....	161
4.10 Conclusiones parciales .....	163
Capítulo 5: Nuevos compuestos de Ru(II) con dppf, derivados de la 1,10-fenantrolina y derivados de la 8-hidroxiquinolina .....	166
5.1 Introducción .....	167
5.2 Síntesis .....	168
5.2.1 Síntesis de precursores.....	169
5.2.2 Síntesis de los compuestos finales Ru-NN-L(X) o $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$ .....	170
5.3 Caracterización.....	171
5.3.1 Caracterización de los precursores .....	171

5.3.2 Caracterización de los compuestos finales .....	184
5.4 Actividad biológica .....	202
5.4.1 Actividad frente a <i>Trypanosoma brucei</i> y selectividad hacia el parásito .....	202
5.4.2 Actividad <i>in vitro</i> contra promastigotes de <i>Leishmania infantum</i> .....	204
5.5 Estudio de estabilidad en solución de los compuestos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ) por HPLC .....	205
5.6 Lipofilia.....	207
5.7 Mecanismo de acción .....	209
5.7.1 Interacción con ADN.....	209
5.7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en <i>L. infantum</i> .....	215
5.8 Conclusiones parciales .....	216
Capítulo 6: Sistemas encapsulantes nanoestructurados .....	219
6.1 Introducción .....	220
6.1.1 Sistemas nanoestructurados como <i>drug delivery systems</i> .....	220
6.1.2 Nanosistemas y enfermedades tropicales desatendidas (ETD) .....	223
6.2 Selección de compuestos hit y sistemas encapsulantes.....	224
6.3 Sistemas encapsulantes con el compuesto PtL4.....	226
6.3.1 Liposomas.....	226
6.3.2 Sistemas poliméricos .....	234
6.4 Sistemas con el compuesto RuL5.....	246
6.4.1 Síntesis y caracterización.....	247
6.4.2 Eficiencia de encapsulamiento (EE).....	249
6.4.3 Estabilidad de los nanosistemas .....	250
6.4.4 Perfil de liberación.....	251
6.4.5 Evaluación biológica .....	253
6.5 Conclusiones parciales .....	256
Capítulo 7: Conclusiones y perspectivas .....	258
7.1 Conclusiones generales .....	259
7.2 Perspectivas.....	261
Referencias bibliográficas.....	262



## Índice de tablas

Tabla 3.1: Resultados del análisis elemental de C y H de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino.....	76
Tabla 3.2: Principales bandas vibracionales IR de la tropolona (Htrop) y los complejos M-dppf-trop (cm <sup>-1</sup> ).....	78
Tabla 3.3: Principales bandas vibracionales IR del hinokitiol (Hhino) y los complejos M-dppf-hino (cm <sup>-1</sup> ).....	79
Tabla 3.4: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pd-dppf-trop, Pt-dppf-trop, Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino.....	80
Tabla 3.5: Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del centro metálico en los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino.....	82
Tabla 3.6: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II) o Pt(II)) y los ligandos Htrop, Hhino y dppf obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup> H-RMN. ....	87
Tabla 3.7: Actividad in vitro de ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd o Pt, L = trop o hino, frente a la forma infectiva de T. b. GFP y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito.....	95
Tabla 3.8: Porcentaje de inhibición de la infección a 5 $\mu$ M para precursores, ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = Htrop o Hhino, frente a la forma amastigote de L. infantum.....	97
Tabla 3.9: Porcentaje de macrófagos infectados (% MI) a 5 $\mu$ M para ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = Htrop o Hhino, frente a la forma amastigote de L. infantum y IC50 en macrófagos murinos.....	98
Tabla 3.10: Actividad in vitro de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) contra M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 y, fibroblastos de pulmón humano (línea celular MRC-5).....	100

Tabla 3.11: Actividad in vitro de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) contra cuatro aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> . Se incluyeron varios fármacos anti- <i>M. tuberculosis</i> para comparación.....	101
Tabla 3.12: Valores de Rf y RM de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) y de los ligandos usando la fase móvil MeOH:DMF:H <sub>2</sub> O (65:5:30 v/v/v).....	103
Tabla 3.13: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los sistemas M-dppf-L, con M = Pd(II) o Pt(II) y HL = Htrop o Hhino, para la unión competitiva {ADN-EB} en medio 5 % DMSO/Tris-HCl.....	107
Tabla 4.1: Rendimientos de síntesis de los nuevos compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), y HL = derivados de la 8-hidroxiquinolina. ....	114
Tabla 4.2: Resultados del análisis elemental de C, N y H de los complejos M-dppf-L, M = Pd(II) o Pt(II), y HL = derivados de la 8-hidroxiquinolina. ....	114
Tabla 4.3: Principales bandas de IR de HL = 8-hidroxiquinolina (HL1) o 5,7-dicloro-8-quinolinol (HL3), y los complejos M-dppf-L correspondientes (cm <sup>-1</sup> ). ....	118
Tabla 4.4: Principales bandas de IR de HL = 5-cloro-7-iodo-8-quinolinol (HL4) o 5,7-diiodo-8-quinolinol (HL5), y los complejos M-dppf-L correspondientes (cm <sup>-1</sup> ). ....	118
Tabla 4.5: Principales bandas de absorción de HL = 5-nitro-8-quinolinol (HL2) y los complejos M-dppf-L2 correspondientes (cm <sup>-1</sup> ). ....	119
Tabla 4.6: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pd-dppf-L1, Pd-dppf-L3 y Pd-dppf-L4.....	120
Tabla 4.7: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pt-dppf-L1, Pt-dppf-L2 y Pt-dppf-L3.....	122
Tabla 4.8: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Pt-dppf-L y los ligandos HL = HL1-HL5 y el dppf, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup> H-RMN.....	130
Tabla 4.9: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Pd-dppf-L y los ligandos HL = HL1-HL5 y el dppf, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup> H-NMR.....	135

Tabla 4.10: Actividad in vitro de ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = HL1 – HL5, frente a la forma infectiva de T. brucei y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito. ....	140
Tabla 4.11: Actividad citotóxica de los ligandos libres (HL1-HL5) y los compuestos Pt-dppf-L, HL = HL1 – HL5, frente a células A2780, A2780cisR, V79 (línea celular no cancerosa) a 24 h de incubación, e índice de selectividad IS hacia las células A2780. ....	143
Tabla 4.12: Valores de tiempo de retención para precursores M-dppf-Cl <sub>2</sub> , ligandos HL4 y dppf y compuestos M-dppf-L4, M = Pd(II) o Pt(II) usando DMSO como solvente en t = 0. ....	149
Tabla 4.13: Valores de R <sub>f</sub> y R <sub>M</sub> de los complejos M-dppf-L (M = Pd(II), Pt(II)) y sus respectivos ligandos HL usando la fase móvil MeOH:DMF:H <sub>2</sub> O (65:5:30 v/v/v).....	151
Tabla 4.14: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los sistemas M-dppf-L, M = Pd(II) o Pt(II), HL= HL1-HL5, para la unión competitiva {ADN-EB}, en medio 5 % DMSO/Tris-HCl..	155
Tabla 4.15: Valores de lipofilia (R <sub>M</sub> ), IC <sub>50</sub> contra la forma infectiva de T. brucei y de $\Delta\delta$ de los compuestos [MII(L)(dppf)](PF <sub>6</sub> ) con M = Pd(II) o Pt(II), HL= HL1-HL5, Htrop, Hhino, HTN, HTM, HTE o HTF (figura 4.23) .....	158
Tabla 5.1: Rendimientos de síntesis de los nuevos compuestos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5 y X = PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> o Cl <sup>-</sup> . ....	171
Tabla 5.2: Análisis elemental de PRE1.....	171
Tabla 5.3: Principales bandas vibracionales IR de PRE1 .....	171
Tabla 5.4: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE1.....	172
Tabla 5.5: Análisis elemental de PRE2-phen .....	172
Tabla 5.6: Principales bandas vibracionales IR de PRE2-phen.....	173
Tabla 5.7: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE2-phen.....	173
Tabla 5.8: Análisis elemental de PRE2-bipy .....	174
Tabla 5.9: Principales bandas vibracionales IR de PRE2-bipy.....	174

Tabla 5.10: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE2-bipy.....	174
Tabla 5.11: Análisis elemental de PRE2-tmp.....	175
Tabla 5.12: Asignación de principales bandas vibracionales IR de PRE2-tmp.....	176
Tabla 5.13: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm y asignación de las señales de los protones de PRE2-tmp .....	177
Tabla 5.14: Análisis elemental de PRE3-phen .....	178
Tabla 5.15: Principales bandas vibracionales IR de PRE3-phen.....	178
Tabla 5.16: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE3-phen.....	178
Tabla 5.17: Análisis elemental de PRE3-bipy .....	180
Tabla 5.18: Principales bandas vibracionales IR de PRE3-bipy.....	180
Tabla 5.19: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE3-bipy.....	180
Tabla 5.20: Análisis elemental de PRE3-tmp.....	182
Tabla 5.21: Asignación de principales bandas vibracionales IR de PRE3-tmp.....	182
Tabla 5.22: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm y asignación de las señales de los protones de PRE3-tmp .....	183
Tabla 5.23: Resultados del análisis elemental de C, N y H de los complejos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5 y X = PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> o Cl <sup>-</sup> .....	185
Tabla 5.24: Principales bandas vibracionales IR de HL= HL4 o HL5 y los complejos Ru-NN-L(X) correspondientes (cm <sup>-1</sup> ).....	189
Tabla 5.25: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) y Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ).....	190
Tabla 5.26. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del centro metálico en los complejos Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) y Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ). .....	192

Tabla 5.27: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Ru-tmp-L(PF <sub>6</sub> ), con L = L4 o L5, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup> H-NMR en CDCl <sub>3</sub> (a excepción de los indicados). .....	198
Tabla 5.28: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Ru-bipy-L5(X), con X = PF <sub>6</sub> - o Cl-, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup> H-NMR en CDCl <sub>3</sub> . .....	199
Tabla 5.29: Actividad in vitro de ligandos libres y compuestos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5, frente a la forma infectiva de Trypanosoma brucei y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito. ....	202
Tabla 5.30: Actividad in vitro de ligandos libres y compuestos Ru-NN-L(X) frente a la forma promastigote de Leishmania infantum. ....	204
Tabla 5.31: Valores de tiempo de retención para ligandos libres NN y HL y compuestos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ) usando DMSO como solvente a t = 0. ....	206
Tabla 5.32: Valores de R <sub>f</sub> y R <sub>M</sub> de los complejos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ) y sus respectivos ligandos libres usando la fase móvil MeOH:DMF:H <sub>2</sub> O (65:5:30 v/v/v). ....	207
Tabla 5.33: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los compuestos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ), para la unión competitiva {ADN-BE}, en medio 5% DMSO/Tris/HCl. ....	212
Tabla 6.1: Actividad in vitro de los compuestos hit seleccionados frente a la forma infectiva de T. brucei y macrófagos murinos (J774), valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito y descriptores de lipofilia. ....	225
Tabla 6.2: Caracterización fisicoquímica de liposomas vacíos y cargados con PtL4. ....	228
Tabla 6.3: Caracterización fisicoquímica de los liposomas cargados con PtL4. ....	230
Tabla 6.4: Actividad in vitro del compuesto PtL4, los liposomas vacíos (LV) y cargados (LC-Pt4) frente a dos formas celulares de T. brucei .....	232
Tabla 6.5: Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas vacías y cargadas con PtL4. ....	235
Tabla 6.6: Caracterización fisicoquímica de NPv y cargadas con PtL4. ....	236

Tabla 6.7: Eficiencia de encapsulación del compuesto PtL4 en los sistemas NP-PtL4 .....	238
Tabla 6.8: Solubilidad de PtL4 en PBS con concentraciones de LSS entre 0,25 y 1,00 % m/v.	241
Tabla 6.9: Actividad in vitro de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-PtL4) frente a la forma infectiva de T. brucei (T.b.-LUC) .....	244
Tabla 6.10: Actividad in vitro de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-PtL4) frente a macrófagos murinos (línea celular J774).....	245
Tabla 6.11: Caracterización fisicoquímica de los sistemas antes (crudo) y después de la separación por centrifugación (sistemas vacíos y cargados con RuL5).....	248
Tabla 6.12: Eficiencia de encapsulación del compuesto RuL5 en los sistemas NP-RuL5.....	250
Tabla 6.13: Actividad in vitro de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-RuL5) frente a macrófagos murinos (línea celular J774).....	254
Tabla 6.14: Actividad in vitro de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-RuL5) frente a T. brucei-LUC.....	255

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Distribución geográfica de las infecciones por tripanosomiasis africana humana notificadas en el período 2010-2014 [15].	4
Figura 1.2: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> .	5
Figura 1.3: Fármacos utilizados para el tratamiento de la HAT	6
Figura 1.4: Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	7
Figura 1.5: Distribución mundial de (A) leishmaniasis cutánea (B) leishmaniasis visceral. Datos reportados por la OMS (2018) [23].	9
Figura 1.6: Fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis.	9
Figura 1.7: Esquema de la estrategia seleccionada para el diseño de nuevos compuestos metálicos multifuncionales de amplio espectro.	10
Figura 1.8: Estructura del cisplatino y principal mecanismo de acción: unión al ADN (extraída de [31]).	12
Figura 1.9: Metalofármacos de platino utilizados en terapia antitumoral	13
Figura 1.10: Estructura de los compuestos basados en Ru(II) NAMI-A, KP1019, TLD1433, RAPTA-C y RM175.	15
Figura 1.11: Estructura de algunos troponoides.	16
Figura 1.12: Equilibrio ceto-enol de la tropolona.	16
Figura 1.13: Numeración y estructura de los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina utilizados en este trabajo.	17
Figura 1.14: Estructura del tris-8HQ galio(III) (KP46)	18
Figura 1.15: Estructura de los derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados.	19
Figura 1.16: Estructura del ferroceno.	20
Figura 1.17: Estructura de la cloroquina y su análogo organometálico, la ferroquina.	21
Figura 1.18: Estructura del 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, dppf.	22

Figura 1.19: Modos de coordinación comúnmente observados del ligando dppf .....	22
Figura 1.20: Posibles conformaciones del dppf que surgen de la torsión $Cp(\text{centroide})\text{-Fe-}Cp(\text{centroide})$ . .....	23
Figura 2.1: Esquema de síntesis de los precursores necesarios para la síntesis de los compuestos finales de Ru(II). .....	28
Figura 2.2: Estructura general de los PRE2-NN y de los NN seleccionados: phen, bipy y tmp. .	29
Figura 2.3: Esquema de síntesis de los compuestos M-dppf-trop y M-dppf-hino.....	32
Figura 2.4: Esquema de síntesis de los compuestos M-dppf-L, donde M = Pd o Pt y HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina .....	33
Figura 2.5: Estructura general de los compuestos $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$ o Ru-NN-L(X) y ligandos utilizados .....	34
Figura 2.6: Esquema de una configuración típica de citómetro de flujo .....	43
Figura 2.7: Estructura de la resazurina y de la resofurina.....	46
Figura 2.8: Estructura de la sal de tetrazolio WST-1 (sal sódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2, 4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) y su respectivo formazán.....	48
Figura 2.9: Estructura de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) y su respectivo formazán.....	51
Figura 2.10: a) Estructura molecular de la tripanotona, b) tripanotona en su forma reducida $\text{T}(\text{SH})_2$ y en su forma oxidada $\text{T}(\text{S})_2$ . .....	54
Figura 2.12: Estructura del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) y del 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) .....	57
Figura 2.13: Estructura general de los 22 compuestos $[\text{M}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ seleccionados para el estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR). .....	59
Figura 2.14: Variación de desplazamiento de la señal de Ha en espectros de $^1\text{H}$ -RMN (descriptor electrónico).....	60
Figura 2.15: Estructura de los compuestos "hit", seleccionados para su encapsulación en sistemas nanométricos. ....	61

Figura 2.16: Esquema de síntesis de los liposomas (PC = fosfatidilcolina de soja, Chol = colesterol).....	62
Figura 2.17: Curva de calibración de Pt obtenida por espectrometría de AA. ....	63
Figura 2.18: Muestras por triplicado incubadas en el Orbital shaker incubator ES-20, marca Biosan.....	64
Figura 2.19: Esquema de síntesis de las nanopartículas poliméricas con PtL4.....	65
Figura 2.21: Curva de calibración del compuesto PtL4 en medio PBS pH 7,4 + LSS 0,5% .....	68
Figura 2.22: Esquema de síntesis de los sistemas NP-RuL5 .....	70
Figura 3.1: Estructuras de 1,1'-bis(difenilfosfino) ferroceno (dppf), tropolona (Htrop), hinokitiol (Hhino) y la estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados M-dppf-trop y M-dppf-hino, donde M = Pd(II) o Pt(II).....	74
Figura 3.2: Espectro de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-hino (línea negra) y Pt-dppf-hino (línea roja) en el rango entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	76
Figura 3.3: Espectro de infrarrojo del precursor $[\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dppf})]$ (línea negra) y de los complejos Pt-dppf-trop (línea roja) y Pt-dppf-hino (línea azul) en el rango entre 1800-400 $\text{cm}^{-1}$ . Se señalan las bandas principales del precursor y del contraión $\text{PF}_6^-$ . ....	77
Figura 3.4: Estructura cristalina de los complejos (a) Pd-dppf-trop y (b) Pd-dppf-hino, c) Pt-dppf-trop y d) Pt-dppf-hino. Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%. Las moléculas de disolvente han sido removidas para mayor claridad....	80
Figura 3.6: Espectros de $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pt-dppf-trop y b) Pt-dppf-hino en $\text{DMSO-d}_6$ entre 4 - 8 ppm. ....	85
Figura 3.7: Esquema de movimiento en solución del fragmento ferroceno en el ligando dppf a) “ <i>torsional twist</i> ” o giro y b) “ <i>bridge-reversal</i> ” o inversión de la conformación pseudo-silla (similar al proceso de inversión de anillos tipo ciclohexano). ....	89
Figura 3.8: (a) Conformación eclipsada ( $\theta = 0^\circ$ ) y (b) conformación escalonada ( $\theta = 36^\circ$ ) del fragmento de ferroceno en el ligando dppf. ....	90

Figura 3.10: Espectros $^1\text{H}$ -RMN del ligando hinokitiol y de los compuestos Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino.....	94
Figura 3.11: Disminución de la emisión fluorescente del aducto {ADN-EB} ( $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ ) observada en soluciones de concentración variable con el complejo a) Pd-dppf-trop, b) Pt-dppf-trop, c) Pd-dppf-hino y d) Pt-dppf-hino.....	105
Figura 3.12: Intensidad relativa de fluorescencia (%) a $\lambda_{\text{em}} = 594 \text{ nm}$ aumentando la concentración de complejo para (a) Htrop y sus complejos de Pd(II) y Pt(II), (b) Hhino y sus complejos de Pd(II) y Pt(II). Cuadrados: Ligandos libres (Htrop o Hhino), círculos: complejos de Pd(II), triángulos: complejos de Pt(II).....	106
Figura 3.13: Gráfica $\text{IF}_0/\text{IF}$ en función de la concentración de complejo Pd-dppf-hino incluida como ejemplo.....	108
Figura 4.1: Estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II) y HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina. ....	112
Figura 4.2: Espectros de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-L1 (línea negra) y Pt-dppf-L1 (línea roja) en el rango entre $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ .....	115
Figura 4.3: Espectros de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-L3 (línea negra), Pd-dppf-L4 (línea roja) y Pd-dppf-L5 (línea azul) en el rango entre $1700\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$ . Se muestra el desplazamiento de la banda vibracional del estiramiento del enlace C=N, a modo de ejemplo. ....	116
Figura 4.4: Espectro de infrarrojo del precursor Pd-dppf-Cl <sub>2</sub> (línea negra), del ligando libre HL1 (línea roja) y del complejo Pd-dppf-L1 (línea azul) en el rango entre $2000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ . ....	117
Figura 4.5: Estructura cristalina de los complejos (a) Pd-dppf-L1, (b) Pd-dppf-L3, (c) Pd-dppf-L4, (d) Pt-dppf-L1, (e) Pt-dppf-L2 y (f) Pt-dppf-L3. Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno, moléculas de disolvente y el contraión PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> han sido removidos para mayor claridad. ....	120
Figura 4.6: Representación de la celda unidad de la estructura cristalina del compuesto Pd-dppf-L1 a modo de ejemplo.....	124
Figura 4.7: Espectros $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pt-dppf-L1 b) Pt-dppf-L2, c) Pt-dppf-L3, d) Pt-dppf-L4 y e) Pt-dppf-L5 en DMSO-d <sub>6</sub> . ....	128

Figura 4.8: Espectros $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pd-dppf-L4 (superior) y b) Pt-dppf-L4 (inferior), a modo de ejemplo. ....	128
Figura 4.9: Espectros $^1\text{H}$ -RMN del ligando 8-hidroxiquinolina (HL1) y del compuesto Pt-dppf-L1.....	132
Figura 4.10: Espectro de correlación bidimensional (COSY) del compuesto Pt-dppf-L1 en la zona aromática del espectro de $^1\text{H}$ -RMN; se señalan las señales de los protones asociadas al ligando HL1.....	133
Figura 4.11: Espectros $^1\text{H}$ -RMN del ligando 8-hidroxiquinolina (HL1) y del compuesto Pd-dppf-L1.....	134
Figura 4.12: Espectro de correlación bidimensional (COSY) del compuesto Pd-dppf-L1 en la zona aromática del espectro de $^1\text{H}$ -RMN. Se marcan las señales de los protones asociadas al ligando HL1.....	135
Figura 4.13: Espectros $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pd-dppf-L1 b) Pd-dppf-L2 c) Pd-dppf-L3 d) Pd-dppf-L4 y e) Pd-dppf-L5 en DMSO- $d_6$ .....	138
Figura 4.14: Actividad citotóxica de los compuestos Pt-dppf-L, HL = HL1 – HL5 y del cisplatino, frente a células A2780 luego de 48 h de incubación. ....	145
Figura 4.15: Espectros $^{31}\text{P}$ -RMN del ligando dppf, el precursor Pt-dppf- $\text{Cl}_2$ y el compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$ / buffer HCl-Tris a tiempo 0 y 48 h. ....	146
Figura 4.16: Espectros $^{31}\text{P}$ -RMN del compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$ / uffer HCl-Tris a tiempo 0, 48, 72, 88 y 112 h.....	147
Figura 4.17: Espectros $^{195}\text{Pt}$ -RMN del compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$ / buffer HCl-Tris a tiempo 0, 24, 48, 75 y 122 h. ....	148
Figura 4.18: Cromatogramas de los compuestos a) Pd-dppf-L4 y b) Pt-dppf-L4 en DMSO/buffer tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) a t = 0 y t = 24 h.....	150
Figura 4.19: Disminución de la emisión de fluorescencia del aducto {ADN-BE} ( $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ ) observada en soluciones de concentración variable con el complejo a) Pd-dppf-L1 y b) Pt-dppf-L1.....	152

Figura 4.20: Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a $\lambda_{em} = 594$ nm aumentando la concentración de complejo para los complejos de Pd(II) y los complejos de Pt(II) de fórmula M-dppf-L.....	153
Figura 4.21: Gráfica de Stern-Volmer para el complejo Pd-dppf-L1.....	154
Figura 4.22: Especies reactivas del oxígeno inducidas por los complejos Pt-dppf-L con HL= HL1-HL5 a 10 $\mu$ M y 50 $\mu$ M, usando la sonda fluorescente H <sub>2</sub> DCFDA. ....	157
Figura 4.23: Estructura general de los 22 compuestos [M(L)(dppf)](PF <sub>6</sub> ) seleccionados para el estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR). ....	159
Figura 4.24: Log(IC <sub>50</sub> ) calculado según la ecuación preliminar <b>2</b> en función del Log(IC <sub>50</sub> ) experimental, obtenido de los valores de la tabla 4.15. En rojo, compuestos Pt-dppf-L2 y el Pt-dppf-hino, seleccionados como <i>outliers</i> . ....	160
Figura 4.25: Estudios de eficacia terapéutica en un modelo murino para Tripanosomiasis Africana Humana (HAT). Imágenes <i>in vivo</i> de ratones infectados con <i>T. brucei</i> -LUC. La señal de bioluminiscencia se adquirió con los animales en posición ventral y utilizando un equipo Xtreme II (Bruker).....	162
Figura 5.1: Estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados Ru-NN-L(X).....	168
Figura 5.2: Esquema de síntesis en cuatro etapas de los compuestos finales Ru-NN-L(X) a partir de RuCl <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O .....	168
Figura 5.3: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de PRE2-tmp en CDCl <sub>3</sub> .....	176
Figura 5.4: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de PRE3-tmp en CDCl <sub>3</sub> .....	183
Figura 5.5: Espectros de IR de los cristales naranjas y rojos obtenidos en la síntesis del compuesto Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ), en el rango entre 1700-400 cm <sup>-1</sup> .....	186
Figura 5.6: Espectros de infrarrojo de los complejos Ru-NN-L (X) desarrollados en el rango entre 4000-400 cm <sup>-1</sup> .....	186
Figura 5.7: Espectros de infrarrojo de los complejos Ru-NN-L(X) en el rango entre 1700 – 400 cm <sup>-1</sup> . Se muestra la ausencia de las bandas características del PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> en el espectro de Ru-tmp-L5(Cl)	

(en verde) y el desplazamiento de la banda vibracional $\nu(\text{C}=\text{N})$ para los compuestos con $\text{L} = \text{L4}$ y $\text{L5}$ .....	187
Figura 5.8: Espectro infrarrojo del precursor PRE3-tmp (línea negra), del ligando libre HL5 (línea roja) y del complejo Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ) (línea azul) en el rango entre 1700-400 cm <sup>-1</sup> . .....	188
Figura 5.9: Estructura cristalina de los complejos (a) Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) y (b) Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ). Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno y moléculas de disolvente han sido removidos para mayor claridad.....	190
Figura 5.10: Interacciones intermoleculares en la estructura cristalina del compuesto Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ).....	192
Figura 5.11: Espectros <sup>1</sup> H-RMN de los cuatro nuevos compuestos: Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ), Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ), Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> ) y Ru-bipy-L5(Cl). .....	194
Figura 5.12: Espectros <sup>1</sup> H-RMN de los cristales obtenidos de la síntesis del compuesto Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ) en DMSO-d <sub>6</sub> . Comparación de las señales de los protones en la zona Cp. ....	195
Figura 5.13: Posibles estereoisómeros para Ru-NN-L. ....	196
Figura 5.14: Espectros <sup>1</sup> H-RMN de los cristales obtenidos de la síntesis del compuesto Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ).....	196
Figura 5.15: Espectros <sup>1</sup> H-RMN de los compuestos con distinta contraión: Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> ) y Ru-bipy-L5(Cl) en CDCl <sub>3</sub> .....	197
Figura 5.17: Cromatogramas del compuesto Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) a) en DMSO a t = 0 y b) en DMSO a t = 72 h; c) en DMSO/buffer tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) a t = 0 y d) a t = 72 h .....	207
Figura 5.18: Disminución de la emisión de fluorescencia del aducto {ADN-BE} ( $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ ) observada en soluciones de concentración variable con los complejos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ).....	210
Figura 5.19: Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a $\lambda_{\text{em}} = 614 \text{ nm}$ aumentando la concentración de complejo para los compuestos Ru-NN-L(PF <sub>6</sub> ).....	211
Figura 5.20: Gráfica de Stern-Volmer para el complejo Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> ). .....	212
Figura 5.21: Morfologías del ADN plasmídico .....	213
Figura 5.22: Interacción del ADN plasmídico con a) Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) y b) Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )... ..	214

Figura 5.23: Efecto de (a) Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> ) y (b) Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ) sobre la abundancia relativa (%) de la correspondiente forma de ADN a diferentes proporciones de complejo metálico:ADN (ri).....	215
Figura 5.24: Análisis de la generación de EROs en promastigotes de <i>L. infantum</i> , tras tratamiento con 1× IC <sub>50</sub> de complejos de Ru(II) a distinto tiempo de incubación.....	216
Figura 6.1: Estructura de los compuestos hit, seleccionados para su encapsulación en sistemas nanométricos.....	220
Figura 6.2: Estructura general de un liposoma.....	221
Figura 6.3: Representación gráfica de a) nanoesferas (izquierda) y nanocápsulas (derecha); b) esquema de formación de micelas poliméricas.....	222
Figura 6.5: Distribución de tamaño de partícula de la suspensión de liposomas cargados con el compuesto PtL4 (LC-PtL4) luego de aplicar sonicación por dos métodos diferentes.....	227
Figura 6.6: Distribución de tamaño de partícula de las suspensiones de liposomas vacíos y cargados con el compuesto PtL4.....	229
Figura 6.7: Perfil de liberación del compuesto PtL4 de la formulación LC-PtL4.....	231
Figura 6.8: Distribución de tamaño de partícula de las suspensiones de NPv y NPc-PtL4.....	235
Figura 6.9: Imágenes de SEM de los sistemas cargados con PtL4 (NP-PtL4) y sistemas vacíos (NPv).....	237
Figura 6.10: Variación del tamaño y ZP para sistemas cargados con PtL4 (NP-PtL4) y para sistemas vacíos (NPv).....	239
Figura 6.11: Espectros de absorción UV-Vis del compuesto PtL4 en el medio de liberación seleccionado.....	242
Figura 6.12: Perfil de liberación del compuesto PtL4 del sistema NP-PtL4 (ampliación a la derecha).....	243
Figura 6.13: Estructura del compuesto [Ru <sup>II</sup> (L5)(dppf)(bipy)](Cl) (código <b>RuL5</b> ).....	246
Figura 6.14: Esquema de síntesis de los sistemas NP-RuL5.....	247

Figura 6.15: Distribución de tamaño para a) muestra sin compuesto antes de centrifugar (NPv-crudo) y después de centrifugar (NPv); b) muestra cargada con RuL5 antes de centrifugar (NP-RuL5 crudo) y después de centrifugar (NP-RuL5).....	249
Figura 6.16: a) Distribución de tamaño para la muestra NP-RuL5 a $t = 0$ y a las 3 semanas; (b) valores de D10, D50 y D90 para las mismas muestras.....	251
Figura 6.17: Espectros de absorción UV-Vis de RuL5 en PBS con 0,75 % m/v de LSS.....	252
Figura 6.18: Perfil de liberación del compuesto RuL5 del sistema NP-RuL5 (ampliación a la derecha para los primeros 60 min).....	253

## Lista de abreviaturas

<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
<i>T. b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
HAT	Tripanosomiasis africana humana
ETD	Enfermedades tropicales desatendidas
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
dppf	1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno
<i>Cp</i>	anillo ciclopentadienilo
trop	tropolona
hino	hinokitiol
8HQ	8-hidroxiquinolina
phen	1,10-fenantrolina
bipy	2,2'-bipiridina
tmp	3,4,7,8-tetrametilfenantrolina
NaPF <sub>6</sub>	Hexafluorofosfato de sodio
PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	Anión hexafluorofosfato
NN	Derivados de la 1,10-fenantrolina
DMSO	dimetilsulfóxido
MeOH	metanol
EtOH	Etanol
PPh <sub>2</sub>	difenilfosfino
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>T.b.</i> -LUC	Línea celular de <i>Trypanosoma brucei</i> que expresa una luciferasa
<i>T.b.</i> -GFP	Línea celular de <i>Trypanosoma brucei</i> que expresa una proteína verde fluorescente
EROs	especies reactivas del oxígeno
EB	Bromuro de etidio
NP	nanopartícula

LV	Liposomas vacíos
LC-PtL4	Liposomas cargados con el compuesto PtL4
NPv	Nanopartículas vacías
NP-PtL4	Nanopartículas cargadas con el compuesto PtL4
NP-RuL5	Nanopartículas cargadas con el compuesto RuL5
PLGA	ácido poli(láctico-co-glicólico)

## Capítulo 1: Introducción, antecedentes y propuesta

## 1.1 Química Inorgánica Medicinal (QIM)

El área de la Química en la cual se enmarca el presente Trabajo de Tesis es la Química Inorgánica Medicinal (QIM). Esta área se puede describir como una subárea de la Química Bioinorgánica, la cual estudia la función de los iones metálicos en sistemas biológicos, como el comportamiento de metaloproteínas o fenómenos relacionados con la importancia de los metales en medicina y toxicología. En particular, la QIM está relacionada con el estudio y desarrollo de complejos metálicos con actividad terapéutica o de diagnóstico y abarca un amplio rango de aplicaciones biomédicas como la suplementación de elementos esenciales, la obtención de agentes quelantes para eliminar el exceso de metales esenciales o elementos tóxicos responsables de enfermedades y el desarrollo de radiofármacos para terapia y diagnóstico, de agentes de contraste para técnicas de imagen y de agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas patologías, entre otros [1,2].

La QIM como disciplina existe desde hace casi 60 años, como resultado del descubrimiento accidental de la actividad inhibitoria de la duplicación celular *in vitro* del cisplatino (*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]) sobre cultivos de *Escherichia coli*. La misma ha evolucionado desde el descubrimiento casual de la actividad farmacológica de diferentes complejos metálicos hacia el diseño racional de los mismos, buscando blancos y actividades determinados [3,4]. En este marco, la búsqueda de una respuesta farmacológica para diferentes patologías ha dado lugar a un número importante de fármacos metálicos que se encuentran en uso clínico o en fases clínicas avanzadas, con probada actividad antitumoral, antibacteriana, antirreumática, antiparasitaria e incluso para el tratamiento de trastornos de bipolaridad, radioterapia paliativa y raros desórdenes genéticos [5].

El grupo de investigación donde se desarrolló este Trabajo de Tesis, denominado “Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos”, investiga desde hace años el desarrollo de nuevos potenciales metalofármacos para el tratamiento de enfermedades de alta incidencia regional como el cáncer, la tuberculosis y enfermedades parasitarias, haciendo especial énfasis en un grupo de enfermedades conocidas como Enfermedades Tropicales Desatendidas [6].

## 1.2 Enfermedades tropicales desatendidas (ETD)

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD, o en inglés *Neglected Tropical Diseases* NTDs) son un grupo heterogéneo de 20 enfermedades prevalentes principalmente en áreas tropicales y subtropicales, que afectan a más de mil millones de personas pertenecientes a comunidades empobrecidas. Son causadas por diversos agentes patógenos, entre ellos virus, bacterias, parásitos y hongos. Muchas de estas enfermedades se transmiten por vectores, están asociadas con ciclos biológicos complejos y, en muchos casos, los agentes patógenos que las provocan se hospedan en un reservorio animal. Al estar íntimamente relacionadas con la pobreza, causan importantes cargas locales de enfermedad, pero individualmente no se han considerado prioridades globales. Sin embargo, debido a la globalización provocada por la migración humana, se extienden cada vez más por todo el mundo. Se estimó que las ETD afectarían a cerca de 2000 millones de personas en el cambio de milenio, con una carga colectiva equivalente al VIH/SIDA, la tuberculosis o la malaria [6–8].

Son consideradas “desatendidas” debido a que los fondos que se han destinado históricamente a este tipo de enfermedades han sido insuficientes, pasándose por alto durante mucho tiempo en la agenda mundial de salud. Recién en el 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) concibió una estrategia innovadora para combatir las ETD, basada en una combinación de varias intervenciones de salud pública con objetivos específicos a alcanzarse en 2020. Una segunda propuesta se propuso para el período 2021 – 2030, la cual plantea la coordinación entre organizaciones públicas y partes interesadas para la prevención, el control, la eliminación y la erradicación de estas infecciones [9]. Entre ellas, figura la Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*, DNDi), proyecto sin fines de lucro implicado en la innovación de medicamentos que involucra instituciones de investigación, compañías farmacéuticas, agencias gubernamentales y organizaciones internacionales [10]. A pesar de estos esfuerzos, la falta de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades y la aparición de resistencia a antiguos fármacos dificultan el control adecuado de las mismas.

Dentro del grupo de las ETD existen tres enfermedades parasitarias que son de especial interés para nuestro grupo de investigación: la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (causada por el *Trypanosoma cruzi*), tripanosomiasis africana humana (HAT) o enfermedad del

sueño (causada por el *Trypanosoma brucei*) y la leishmaniasis (causada por más de 20 especies del género *Leishmania*). Estas tres enfermedades comparten características de especial relevancia:

- 1) A menudo son co-endémicas en ciertas regiones del mundo (leishmaniasis y enfermedad de Chagas en América del Sur y leishmaniasis y HAT en África), lo que implica que pueden afectar de forma simultánea a las poblaciones en riesgo.
- 2) Los agentes causantes de estas enfermedades pertenecen al mismo orden taxonómico (Trypanosomatida). De hecho, se ha demostrado que las tres especies presentan un alto porcentaje de genes en común que codifican proteínas; de un total de 8000 genes, comparten alrededor de 6200 [11,12]. Además, estas especies presentan un sistema antioxidante particular basado en tioles de bajo peso molecular que actúan ante la presencia de especies reactivas del oxígeno (EROs), evitando la oxidación irreversible de biomoléculas indispensables para la vida de los parásitos. Dicho sistema es distinto al de los hospederos mamíferos [13,14].

Este último punto en particular constituye una ventaja estratégica para el diseño de potenciales fármacos, ya que permitiría identificar blancos moleculares comunes en los diferentes parásitos que pudieran ser afectados por un mismo compuesto, es decir, permitiría diseñar fármacos de amplio espectro. Esto tendría una ventaja económica muy importante [14].

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en este Trabajo de Tesis se plantea desarrollar compuestos que tengan la potencialidad de ser activos contra más de un tripanosomátido, es decir, se plantea desarrollar potenciales fármacos de amplio espectro. A continuación, se discutirá en más detalle aspectos relevantes de las enfermedades de interés primordial para este Trabajo de Tesis: la tripanosomiasis africana humana y la leishmaniasis.

### 1.2.1 Tripanosomiasis Africana Humana (HAT)

La tripanosomiasis africana humana (HAT) o enfermedad del sueño es una parasitosis causada por la especie *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). Los parásitos se transmiten al ser humano por la picadura de moscas tsetsé que han contraído los parásitos de humanos o animales infectados. Dependiendo de la zona geográfica donde se desarrolle, existen dos subespecies causantes de la enfermedad en humanos: *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) al sur y este de África y *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) al oeste y centro de África. La mayoría

de los casos de infecciones de tipo crónico son causados por *T. b. gambiense* mientras que *T. b. rhodesiense* causa la forma más grave de la enfermedad (figura 1.1) [15].

La incidencia de la HAT ha disminuido gracias a esfuerzos conjuntos de los países afectados. Las estadísticas reportadas por la OMS en los últimos 10 años muestran una clara disminución en la incidencia total de HAT, con un descenso del 97 % (período 2009-2018), siendo la incidencia en 2018 de 977 casos y solo 663 (la forma *T. b. gambiense* representa más del 95 % de estos casos) en 2020. Sin embargo, 55 millones de personas siguen en riesgo de contraer la enfermedad en 36 países del África subsahariana [16].

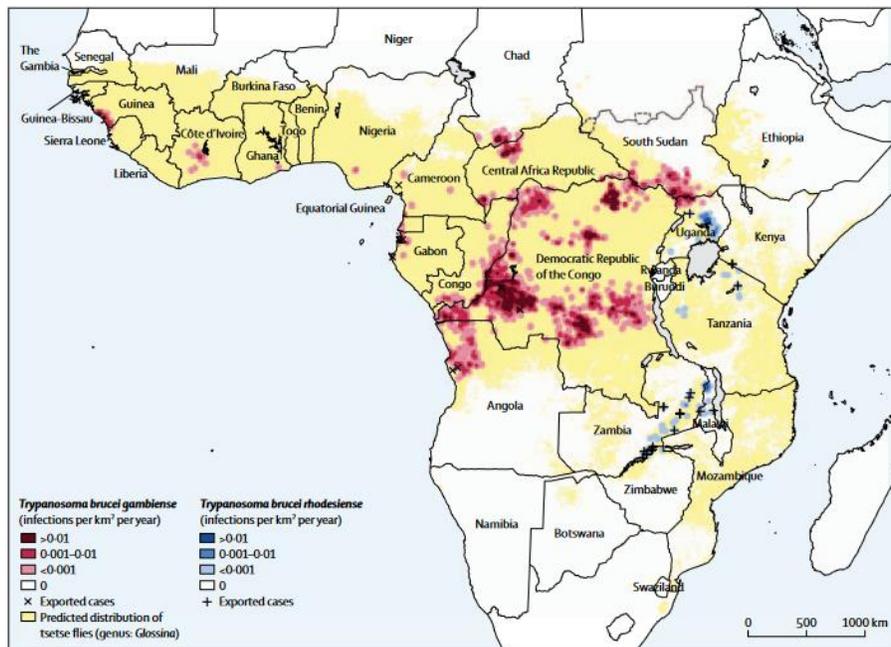


Figura 1.1: Distribución geográfica de las infecciones por tripanosomiasis africana humana notificadas en el período 2010-2014 [15].

La enfermedad progresa en dos etapas: una primera llamada fase hemolinfática, caracterizada por generar episodios de fiebre, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones y picazón, y una segunda más severa en la que los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica e infectan el sistema nervioso central, generando confusión, alteraciones sensoriales, falta de coordinación y alteraciones de la fase del sueño (de ahí su nombre “enfermedad del sueño”). La enfermedad puede pasar desapercibida durante meses o años y, cuando aparecen los síntomas neurológicos, el estadio de la enfermedad está muy avanzado, pudiendo causar la muerte [17].

Durante su ciclo de vida, *T. brucei* alterna etapas en el huésped mamífero y en el vector. Dadas las enormes variaciones entre ambos hospederos, los parásitos sufren importantes cambios morfológicos y metabólicos que le permiten adaptarse rápidamente a los diferentes entornos. A su vez, son capaces también de alternar entre formas proliferativas y no proliferativas dentro de un mismo hospedero. En la figura 1.2 se muestra un esquema que ejemplifica el ciclo de vida del parásito *T. brucei*, donde un estadio de especial importancia es la forma tripomastigota metacíclica, que es la forma que toma el parásito al momento de la infección al hospedero humano, es decir, es la forma infectiva [15].

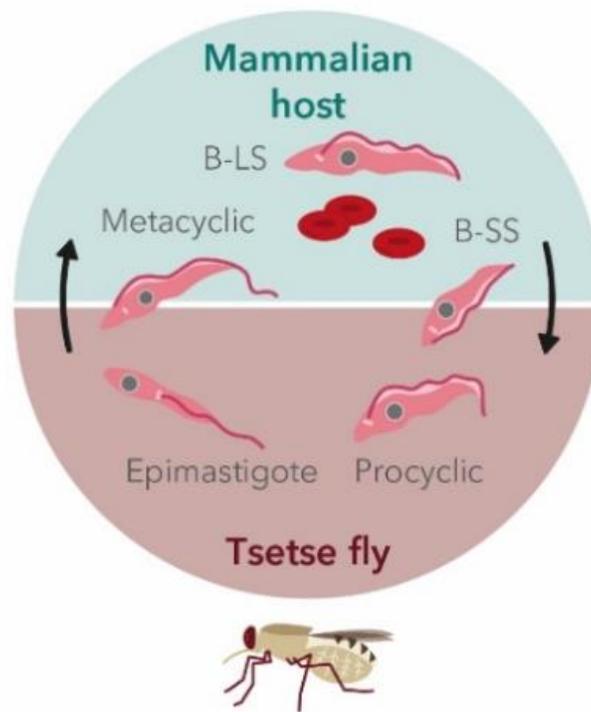


Figura 1.2: Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Las formas clínicamente relevantes son las formas sanguíneas (forma larga (B-LS) y forma corta (B-SS)) [18].

Los fármacos actualmente en uso para el tratamiento de HAT incluyen cinco opciones: pentamidina, suramina, melarsoprol, eflornitina y terapia combinada con nifurtimox-eflornitina (figura 1.3). La pentamidina se considera el tratamiento de primera línea para la HAT en etapa temprana causada por *T.b. gambiense* mientras que *T.b. rhodiense* se trata con suramina. Sin embargo, estos tratamientos no son efectivos para la fase tardía de la enfermedad [14]. Sólo el melarsoprol (derivado arsenical) y la eflornitina son efectivos. Recientemente, un derivado nitroheterocíclico administrado por vía oral, fexinidazol, ha sido introducido en algunos países

africanos después de haber sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*); es la primera terapia de administración totalmente oral para las formas hemolinfática y meningoencefálica de HAT [19]. Sin embargo, la mayoría de estos fármacos presentan problemas de toxicidad y su eficacia es variable. Aunque las tasas de mortalidad por HAT han disminuido sustancialmente en los últimos años, el desarrollo de fármacos mejorados con alta biodisponibilidad y baja toxicidad es crucial para combatir definitivamente la HAT.

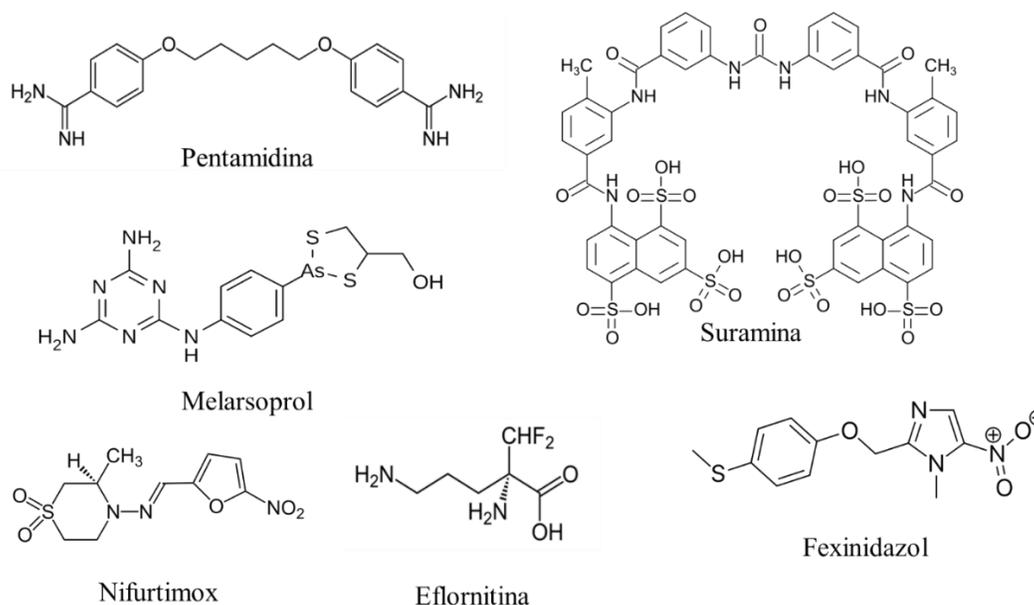


Figura 1.3: Fármacos utilizados para el tratamiento de la HAT

### 1.2.2 Leishmaniasis

La leishmaniasis involucra un grupo de enfermedades zoonóticas y de transmisión vectorial con ciclos de transmisión complejos donde se involucra gran diversidad de parásitos, reservorios y vectores. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* y se transmiten a los animales y humanos a través de la picadura de insectos flebótomos de la familia *Psychodidae*. Su presencia está directamente vinculada a la pobreza, pero otros factores sociales, además de los ambientales y climáticos, influyen directamente en su epidemiología [20].

La enfermedad presenta distintas manifestaciones clínicas, clasificadas en tres formas: cutánea, mucosa/mucocutánea y visceral. La leishmaniasis **visceral**, causada por *L. donovani* y *L. infantum*, se caracteriza por ser sistémica, invadiendo órganos internos, como el timo, el hígado, el bazo y la

médula ósea, y produciendo disfunción renal, pérdida de peso, anemia. Si no es tratada causa la muerte en más del 90 % de los casos. La leishmaniasis **mucosa/mucocutánea** (*L. amazonensis*) si no es tratada de forma temprana puede conducir a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz y la boca causando discapacidad grave, mientras que la leishmaniasis **cutánea** es la forma más frecuente y más leve de esta infección, causada por *L. major*, *L. tropica* y *L. braziliensis*, produciendo en su mayoría lesiones ulcerosas. Aunque no pone en peligro la vida, es desfigurante, produce cicatrices permanentes y es fuente de estigma y exclusión social [16].

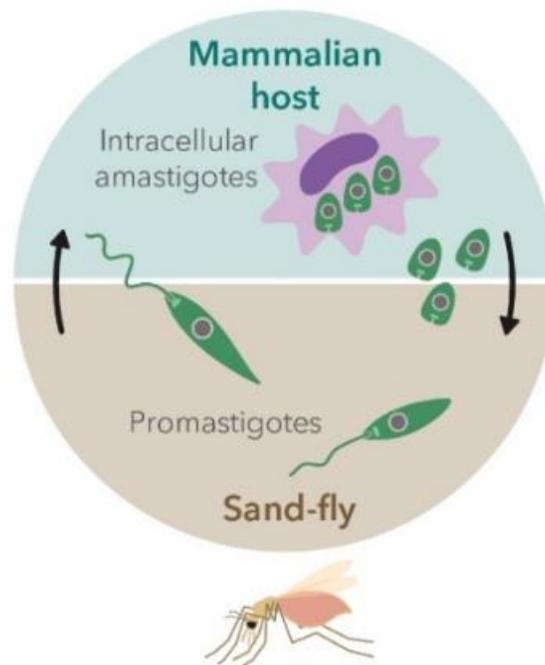


Figura 1.4: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. La forma clínicamente relevantes es la forma amastigote (intracelular) [18].

En la figura 1.4 se muestra el ciclo de vida general de estos parásitos, que presentan dos formas de interés: la forma infectiva no replicativa, promastigotes metacíclicos, y la forma amastigote (replicativa), que surge cuando los promastigotes infectan a los macrófagos, células del sistema inmune del hospedero.

La incidencia actual de leishmaniasis visceral es de 50.000 a 90.000 casos nuevos cada año, con la mayoría de los casos en Brasil, el este de África y la India. Para las diferentes formas de leishmaniasis cutánea, este valor oscila entre 600.000 y 1 millón, con más de 5700 muertes en

2019 según la DNDi [21]. En Uruguay, ante la aparición de casos de leishmaniasis visceral en perros (reservorio), el MSP ha tomado acciones preventivas para evitar el contagio en humanos [22]. A pesar de esto, se registró por primera vez un caso de leishmaniasis visceral en humanos en el Departamento de Salto en diciembre de 2018 y otro más reciente en 2020 en la ciudad argentina limítrofe de Concordia [23].

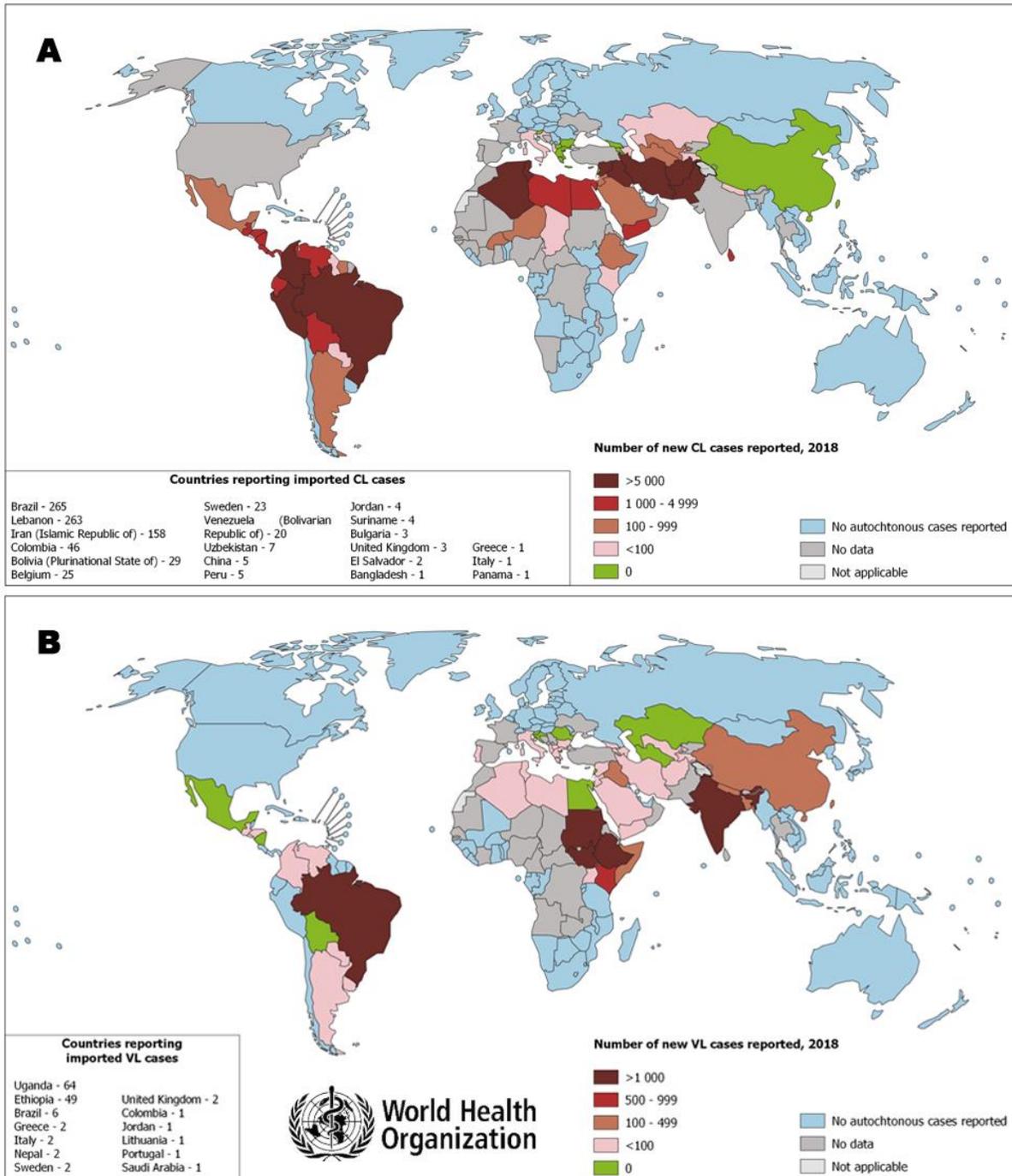


Figura 1.5: Distribución mundial de (A) leishmaniasis cutánea (B) leishmaniasis visceral. Datos reportados por la OMS (2018) [24].

Actualmente se utilizan cuatro principios activos (figura 1.6) en monoterapia o combinados para el manejo de las diferentes formas de leishmaniasis, adaptándose cada fármaco, formulación o pauta de administración a la presentación de la enfermedad y a las características de la zona geográfica donde se desarrolla. Los derivados pentavalentes de antimonio permanecen como fármacos de primera línea utilizados tanto en monoterapia como en combinación con paromomicina en ciertas regiones de África. Todos estos fármacos presentan grandes inconvenientes ya sea por eficacia reducida, desarrollo de resistencia por parte de los parásitos, tratamientos prolongados y efectos tóxicos sobre los pacientes, lo que dificulta el control adecuado de la enfermedad.

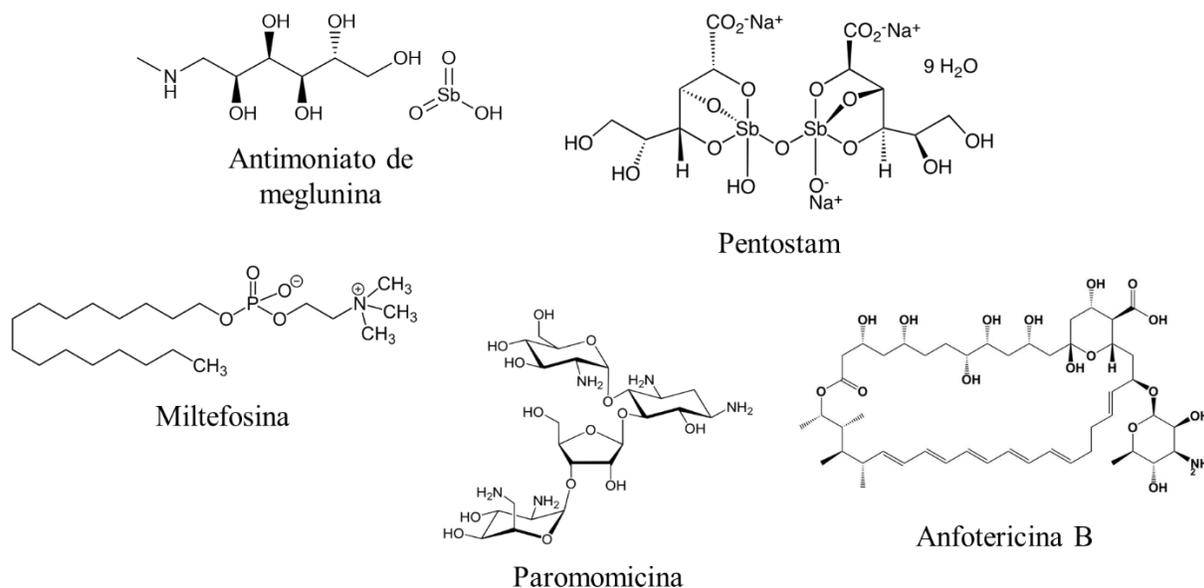


Figura 1.6: Fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis

### 1.3 Diseño racional de metalofármacos

Teniendo en cuenta las limitaciones de los fármacos disponibles para el tratamiento de HAT y Leishmaniasis, se considera necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que permitan superar estas limitaciones. Para lograr esto, en este trabajo de tesis se plantea desarrollar compuestos multifuncionales de amplio espectro a través de un diseño racional.

Anteriormente se mencionaron algunas similitudes entre los parásitos tripanosomátidos de interés, pudiéndose considerar dichas similitudes como ventajas en cuanto al desarrollo de potenciales fármacos de amplio espectro. La estrategia mediante la cual se plantea diseñar estos compuestos es un diseño racional, enfocado hacia el desarrollo de compuestos metálicos multifuncionales. Esta estrategia consiste en unir en una sola molécula diferentes especies o entidades químicas que afectan a distintos blancos parasitarios en las especies mencionadas. Esto podría conducir a compuestos que actúen sobre diferentes blancos parasitarios simultáneamente. En este sentido, se puede incluir en esa única entidad química un ion metálico o centro organometálico bioactivo y uno o más compuestos orgánicos que muestren la actividad biológica deseada, incluidos como ligandos (figura 1.7). De esta forma, se cuenta con gran variedad de opciones al momento de seleccionar centros metálicos, considerando metales de distinta naturaleza y distintos estados de oxidación, lo que afecta también en gran medida el número de posibles ligandos bioactivos que se puedan coordinar. La inclusión de centros metálicos permite aprovechar propiedades que brindan los metales en este contexto, como la capacidad de interactuar con diferentes biomoléculas, incluidas proteínas, enzimas, ácidos nucleicos (potenciales blancos de acción); la capacidad de modular ciertas propiedades en los complejos resultantes, como la cinética de sustitución de ligandos, potenciales de reducción, entre otros. A su vez, la selección de los ligandos bioactivos implica gran versatilidad, pudiendo ser todos iguales o diferentes, afectando a distintos blancos que el centro metálico, por ejemplo. Los posibles co-ligandos seleccionados, que no necesariamente muestran actividad biológica, pueden conferirle propiedades deseables a los compuestos finales, como solubilidad en medio acuoso, potenciales de reducción dentro de rangos manejables a nivel biológico, lipofilia adecuada, entre otros.

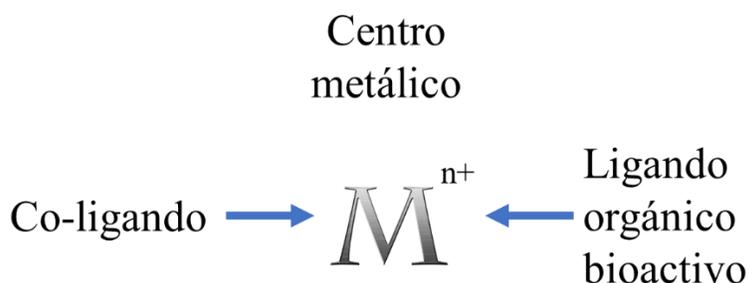


Figura 1.7: Esquema de la estrategia seleccionada para el diseño de nuevos compuestos metálicos multifuncionales de amplio espectro.

Por otro lado, se ha demostrado que la unión de ligandos bioactivos a centros metálicos puede generar en muchos casos compuestos más potentes y/o selectivos que los ligandos libres o que el centro metálico por separado. Además, la toxicidad potencial del metal puede reducirse por la unión al ligando, limitando en algunos casos la capacidad del metal de interactuar con biomoléculas que conducen a la toxicidad. Esta estrategia también puede ser útil para eludir mecanismos de resistencia a los fármacos, ya que el complejo metálico “enmascararía” de alguna forma al fármaco orgánico [6]. De esta forma, al aplicar esta estrategia al diseño de potenciales metalofármacos se podrían obtener agentes multifuncionales que actúen sobre distintos blancos, con propiedades fisicoquímicas moduladas en función de su potencial aplicación [25].

En suma, además de plantear el desarrollo de potenciales fármacos de amplio espectro en este Trabajo de Tesis, se plantea que estos compuestos multifuncionales actúen también como agentes multiblanco. Con esta estrategia en mente, se seleccionaron los metales, ligandos y co-ligandos indicados en las siguientes secciones para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad biológica, particularmente antiparasitaria.

Cabe destacar que si bien la mayoría de los ejemplos más relevantes de compuestos con los metales, ligandos y co-ligandos seleccionados (a mencionar en las próximas secciones) han presentado actividad principalmente anticancerígena o antitumoral, está reportado que los parásitos y las células cancerosas tienen algunas características comunes, como su capacidad para la división celular rápida, algunas estrategias de defensa y evasión inmunitaria, entre otros, lo que valida la selección de los mismos para el desarrollo de potenciales fármacos antiparasitarios [26–29].

### 1.3.1 Selección de metales

#### 1.3.1.1 Platino y paladio

Como se mencionó anteriormente, el descubrimiento de la actividad citostática del cisplatino en los años 60 marcó el inicio de la QIM como disciplina basada en el diseño racional. Desde los años 70 está permitido el uso de este compuesto metálico y actualmente se encuentra en la lista de fármacos esenciales de la OMS, manteniéndose como el agente quimioterapéutico más utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer [30]. Hoy en día son bien conocidos varios de sus mecanismos de acción, siendo el principal la formación de aductos con el ADN. Brevemente, el

mecanismo se muestra de forma esquemática en la figura 1.8: luego de ser administrado vía intravenosa, el cisplatino ingresa a la célula, donde los ligandos cloruro son desplazados por moléculas de agua, generando una especie de carga positiva fuertemente electrófila. Esta especie es capaz de reaccionar con cualquier nucleófilo, incluidos grupos tiol de proteínas o átomos de nitrógeno de los ácidos nucleídos. Particularmente, esta especie se une covalentemente al nitrógeno N7 de un residuo de purina, generando daño en el ADN de las células cancerígenas, bloqueando la transcripción y desencadenando muerte celular por apoptosis [31].

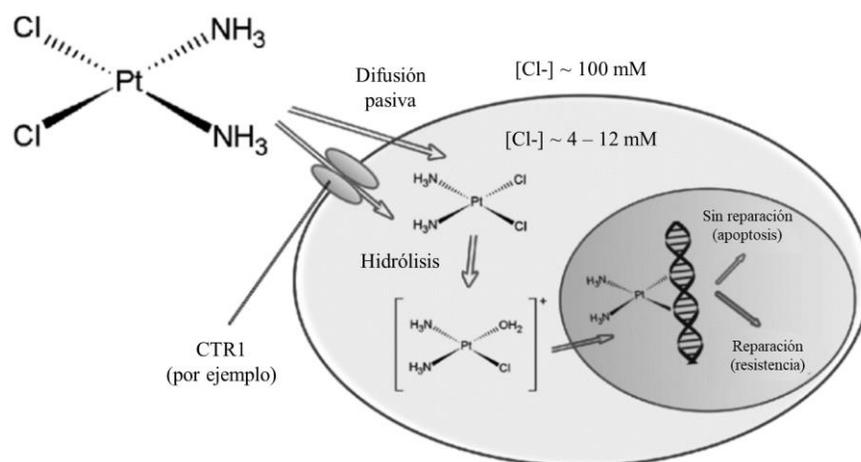


Figura 1.8: Estructura del cisplatino y principal mecanismo de acción: unión al ADN (extraída de [32]).

Sin embargo, el cisplatino presenta baja selectividad, causando toxicidad sistémica además de matar las células tumorales. Con el fin de evitar los efectos tóxicos del cisplatino, se desarrollaron otros complejos basados en platino para su uso en terapia antitumoral, como el carboplatino y el oxaliplatino, aprobados por la FDA, que se encuentran en uso clínico. El lobaplatino, heptaplatino y nedaplatino se utilizan clínicamente solo en China, Corea del Sur y Japón, respectivamente [5] (figura 1.9).

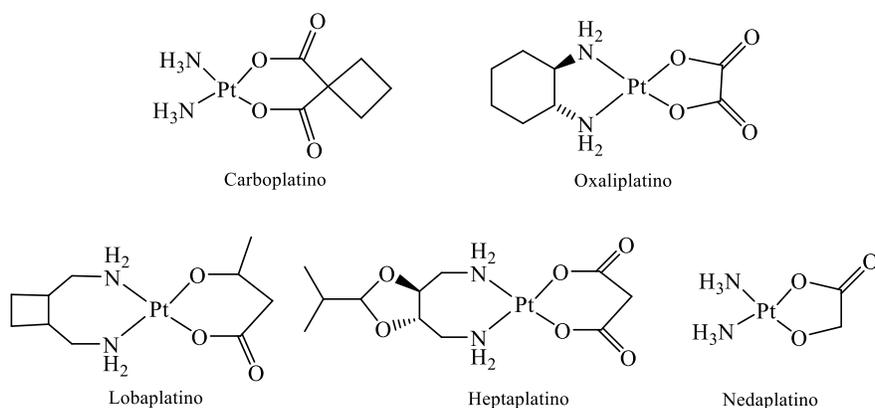


Figura 1.9: Metalofármacos de platino utilizados en terapia antitumoral

Los fármacos antitumorales de Pt(II) han presentado algunas desventajas como efectos secundarios adversos, resistencia de los tumores, baja solubilidad en medio acuoso, entre otras. En este marco, otra de las estrategias utilizadas para diseñar nuevos agentes antitumorales con propiedades farmacológicas mejoradas ha sido la de modificar la naturaleza del centro metálico. Entre las primeras opciones se seleccionó el Pd(II), dada la similitud de sus propiedades fisicoquímicas con el Pt(II). Comúnmente los compuestos de Pd(II) son estructuralmente análogos a los de Pt(II), presentando geometría plano cuadrada. A pesar de sus similitudes, ambos centros metálicos tienen una diferencia importante: su velocidad relativa de sustitución. Se ha encontrado que los complejos de Pd(II) experimentan reacciones de sustitución  $10^5$  veces más rápidas que complejos análogos de Pt(II) [33]. Esto implica que los derivados de Pd(II) son más reactivos, lo que puede llevar a diferente comportamiento biológico y en muchos casos a mayor citotoxicidad. Sin embargo, esta propiedad puede ser modulada con la presencia de ligandos estabilizantes que modifiquen su reactividad. De esta manera, se han sintetizado numerosos complejos de Pd(II) que han mostrado prometedoras características antitumorales, especialmente con ligandos aromáticos nitrogenados, tales como los derivados de piridina, quinolinas, 1,10-fenantrolina, y ligandos derivados [34]. A su vez, se reportan compuestos de Pd(II) y Pt(II) con actividad antitumoral que presentan actividad antiparasitaria, en particular frente a tripanosomátidos [6,26,28].

### 1.3.1.2 Rutenio

En el contexto de la QIM los compuestos de rutenio, particularmente de Ru(II) y Ru(III), se empezaron a estudiar como otra opción para el desarrollo de agentes anticancerígenos “no basados

en platino”. Desde un punto de vista químico, los centros de Ru(II) y Ru(III) presentan una gran afinidad por ligandos nitrogenados y azufrados presentes en los sistemas biológicos como el ADN, enzimas y proteínas. Además, la geometría octaédrica de compuestos con estos centros amplía las posibilidades tanto de unión a posibles dianas terapéuticas como de coordinación de mayor número de ligandos bioactivos, en comparación a la geometría plano cuadrada de los compuestos de Pd(II) y Pt(II). La cinética de sustitución de ligandos en complejos de Ru(II) y Ru(III) es similar a la de los complejos de Pt(II), siendo los complejos de Ru(III) más inertes a la sustitución.

La potencialidad anticancerígena de los complejos de rutenio fue examinada por primera vez por Clarke y col., quienes estudiaron los compuestos de fórmula general  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_{6-x}\text{Cl}_x]^{y+}$ . En particular, los complejos  $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{NH}_3)_5]^+$ , *cis*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_4]^+$  y *fac*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3]$  fueron diseñados en analogía al cisplatino, ya que contienen ligandos cloruro sustituibles para una posible unión al ADN [35,36]. Si bien estos compuestos mostraron buena actividad antitumoral, presentaron baja solubilidad. Esto fue mejorado al reemplazar los ligandos  $\text{NH}_3$  por moléculas de dimetilsulfóxido (dmsó). Posteriormente, se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* con los complejos *cis* y *trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{dmsó})_4]$ , revelando actividad anticancerígena [37]. Entre los compuestos más prometedores desarrollados para finales de los años 90 se encuentran los complejos  $\text{Na}\{ \textit{trans}\text{-}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{dmsó})(\text{Im})] \}$  (NAMI) y su sal de imidazolio  $\text{ImH}\{ \textit{trans}\text{-}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{dmsó})(\text{Im})] \}$  (NAMI-A, Im = imidazol). Este último compuesto mostró interesante actividad antimetastásica en un amplio rango de tumores. Sin embargo, los malos resultados obtenidos en ensayos clínicos de fase I y II detuvieron los estudios para su posible aplicación [38]. Posteriormente se desarrolló el complejo  $\text{IndH}\{ \textit{trans}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2] \}$  (KP1019, Ind = indazol), el cual presenta actividad contra ciertos tipos de tumores que no son tratables exitosamente con cisplatino; superó los ensayos clínicos de fase I como agente antineoplásico [39]. Otro compuesto basado en Ru(II) ingresó más recientemente a ensayos clínicos fase I para el tratamiento con terapia fotodinámica de cáncer de vejiga: TLD1433 (figura 1.10) [40,41]. En cuanto a compuestos organometálicos, complejos rutenio(II)-areno desarrollados por los grupos de Sadler y de Dyson son actualmente muy estudiados como antitumorales, habiendo ingresado ya algunos de ellos en fase clínica. La figura 1.10 muestra los compuestos promisorios RAPTA-C y RM175 [42,43].

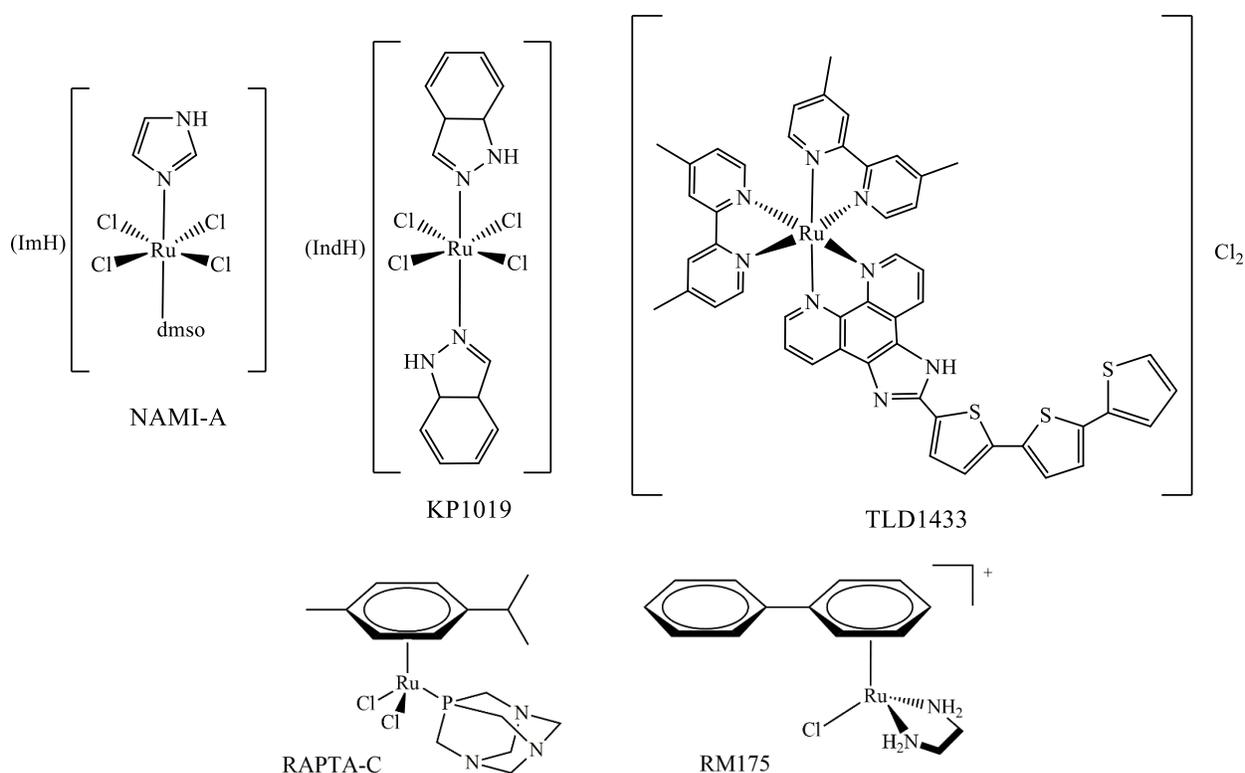


Figura 1.10: Estructura de los compuestos basados en Ru(II) y Ru(III) NAMI-A, KP1019, TLD1433, RAPTA-C y RM175.

### 1.3.2 Selección de ligandos

En cuanto a la selección de los ligandos bioactivos, se seleccionaron tres familias diferentes: la familia de las tropolonas (tropolona e hinokitiol), la familia de las 8-hidroxiquinolinas y la familia de la 1,10-fenantrolina.

#### 1.3.2.1 Tropolona e hinokitiol

La tropolona o 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona y sus derivados (que junto con la tropolona se conocen como troponoides) pertenecen a una familia de productos naturales con un anillo aromático de siete miembros y varios grupos laterales (figura 1.11). Son compuestos sintetizados principalmente por plantas y hongos, y la mayoría de los troponoides desempeñan funciones de defensa antibacteriana en estos organismos [44]. Desde su descubrimiento, los derivados de la tropolona naturales y sintéticos han atraído un interés considerable debido a la estructura y propiedades únicas de su anillo aromático. Entre estos derivados destaca el hinokitiol o β-Thujaplicin (2-hidroxi-4-isopropil-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona), el cual se encuentra en varias

plantas de la familia *Cupressaceae*. Estos compuestos poseen múltiples actividades biológicas: efectos antibacterianos, antivirales, antimicrobianos, antifúngicos, antimalárico, insecticida y citotóxicos en varias líneas de células tumorales humanas [45].

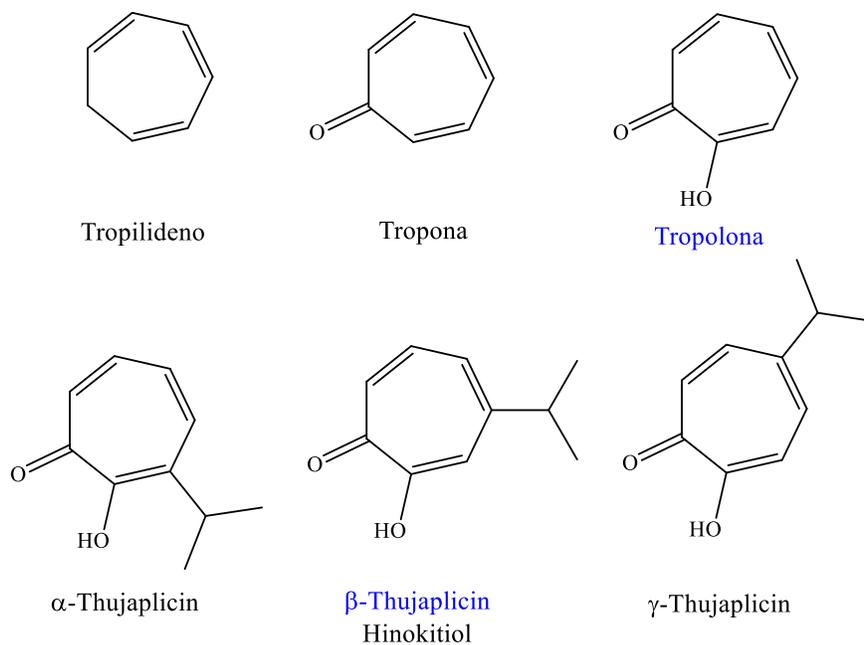


Figura 1.11: Estructura de algunos troponoides.

Desde un punto de vista estructural, el anillo no-bencénico aromático de la tropolona y sus derivados se ve estabilizado por resonancia y tautomerismo, en donde el grupo cetónico queda enmascarado y el comportamiento predominante es el de la forma enólica (figura 1.12). La tropolona es débilmente ácida ( $pK_a = 6,71$ ) y puede actuar como ligando en complejos metálicos, coordinando a iones metálicos duros o medios (ácidos de Pearson) a través de sus átomos de oxígeno [46].

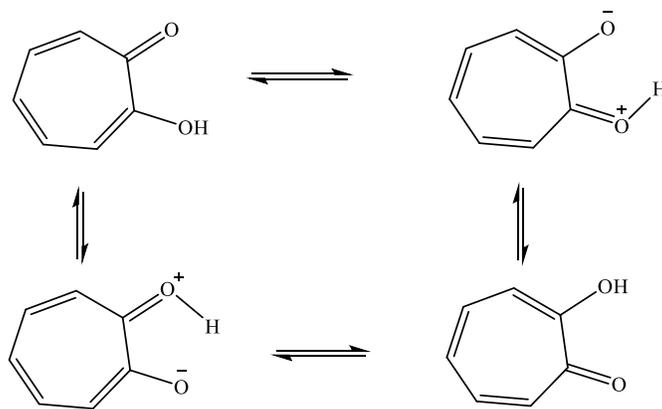


Figura 1.12: Equilibrio ceto-enol de la tropolona.

En cuanto a complejos de tropolona con aplicación biológica, se han reportado compuestos con Tl(I), Pb(II), Bi(III) con actividad antimicrobiana [47,48] y de Cu(II) con actividad anticancerígena e incluso antimetastática [49]. Para el caso del hinokitiol se han reportado compuestos de Mg(II), Ba(II), Mn(II), Ni(II), Mo(VI), W(VI), Sb(III), Bi(III), Fe(III), Al(III), Zr(IV) y Hf(IV) con actividad antimicrobiana [50,51]. A su vez, se han reportado complejos metálicos de Pd(II) o Pt(II) con tropolona e hinokitiol con actividad antimicrobiana [50] y antitumoral[52].

### 1.3.2.2 8-hidroxiquinolina y derivados

Las 8-hidroxiquinolinas (8HQs) son compuestos orgánicos heterocíclicos formados por la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico, con un grupo hidroxilo en el carbono 8 (figura 1.13). Desde un punto de vista ácido-base, poseen dos grupos con diferente pKa: el grupo hidroxilo (pKa ~ 8 - 11) y el nitrógeno del anillo piridínico (pKa ~ 3 - 4). Los valores de pKa de ambos grupos varían considerablemente dependiendo de los sustituyentes de los anillos [53]. Pueden actuar como agentes quelantes monopróticos bidentados, pudiendo coordinar a través del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo y a través del nitrógeno del anillo piridínico. Son ampliamente utilizados en aplicaciones analíticas, específicamente para la determinación cuantitativa de iones metálicos como el cobre y el zinc, dada su afinidad por centros metálicos duros [54,55].

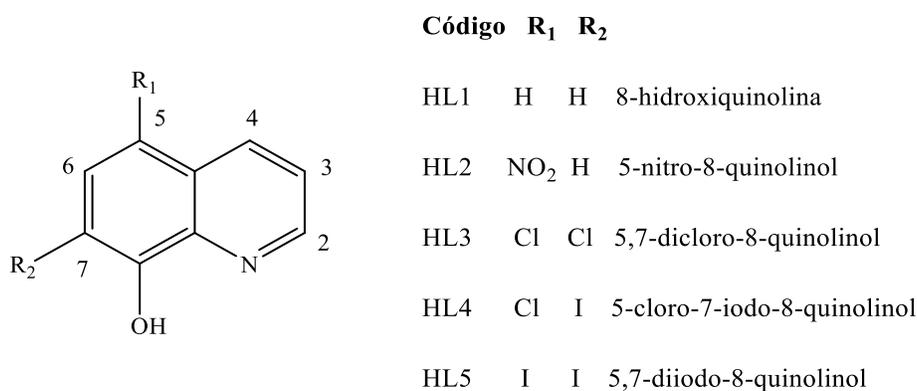


Figura 1.13: Numeración y estructura de los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina utilizados en este trabajo.

El interés por las 8HQs ha crecido exponencialmente desde finales de los años 90, ya que son consideradas estructuras privilegiadas para el diseño de nuevos potenciales fármacos. Ejercen una

variedad de efectos biológicos sobre diversos blancos, como efectos anticancerígeno, anti-VIH, antifúngico, bactericida, antiparasitario y antiviral [53,56]. Inclusive, se ha propuesto el uso de la terapia de combinación con fármacos actuales contra el cáncer como el paclitaxel [57].

Se ha demostrado que la amplia actividad antiproliferativa de las 8HQs está directamente vinculada con la interacción con iones metálicos [58]. Se ha visto, por ejemplo, que la unión con metales como el cobre o el hierro genera un efecto antiproliferativo en células cancerígenas *in vitro* y un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral *in vivo* [59–61]. A su vez, las 8HQs tienden a formar complejos con varios otros iones divalentes de metales de transición: Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Pt(II) y Ru(II) [62,63]. Estos complejos también han sido estudiados ampliamente dado que presentan actividad biológica similar o, en varios casos, mejor que sus ligandos libres. Además, son compuestos muy llamativos debido a que sus procedimientos sintéticos son bastante simples y con gran aplicabilidad en la medicina moderna.

Un compuesto de especial relevancia es el compuesto tris-8HQ galio(III) (KP46) (figura 1.14), el cual ha alcanzado la evaluación clínica en ensayos de fase I y ha mostrado actividad en el tratamiento del carcinoma de células renales. Este complejo fue patentado debido a su eficacia para tratar el cáncer de páncreas [64].

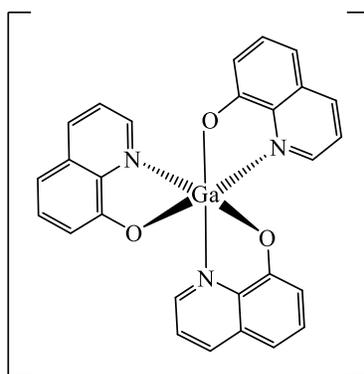


Figura 1.14: Estructura del tris-8HQ galio(III) (KP46)

### 1.3.2.3 Derivados de la 1,10-fenantrolina

La 1,10-fenantrolina (phen) y sus derivados son una familia de ligandos bidentados planos e hidrofóbicos con gran facilidad para coordinar de forma bidentada a centros metálicos a través de sus átomos de N. Tanto los ligandos libres como numerosos compuestos metálicos ejercen efectos citotóxicos en una gran variedad de sistemas biológicos y, en particular, han mostrado actividad

antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anticancerígena e incluso antiparasitaria [65–67]. Se sabe que inhiben el crecimiento de los patógenos fúngicos, por ejemplo, al dañar su función mitocondrial, desacoplar la respiración, provocar la escisión inespecífica del ADN, interrumpir la división celular e inducir graves distorsiones en la morfología de las células fúngicas.

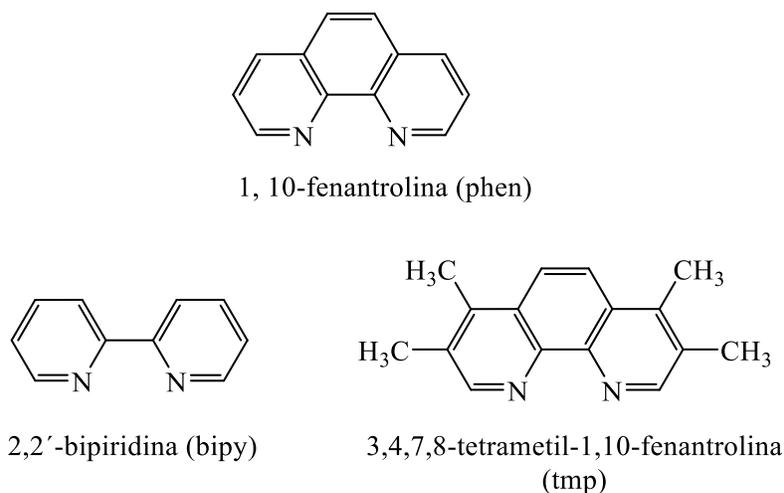


Figura 1.15: Estructura de los derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados.

Aprovechando las características de esta familia de ligandos, sus complejos metálicos se han utilizado, por ejemplo, como agentes intercalantes o de unión a ambos surcos del ADN y ARN [68,69]. Algunos complejos metálicos también son capaces de escindir eficientemente el esqueleto del ADN y, en la actualidad, el complejo  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$  se usa comúnmente en biología molecular como reactivo de escisión del ADN [70]. Numerosos compuestos metálicos con actividad biológica han demostrado presentar interacción con esta biomolécula, siendo considerada esta interacción su mecanismo de acción [68,71–74]. Por lo tanto, la inclusión de esta molécula o sus derivados (figura 1.15) puede favorecer la interacción intercalante de los nuevos compuestos con el ADN, apuntando a esta biomolécula como potencial blanco de acción.

### 1.3.3 Selección del co-ligando

El diseño de potenciales fármacos organometálicos para el tratamiento de diferentes enfermedades constituye una alternativa relativamente nueva e innovadora. Estos compuestos se caracterizan por presentar al menos un enlace metal-carbono y, simultáneamente, tener relevancia en un contexto biológico [75,76]. Estos compuestos ofrecen nuevos modos de acción y en muchos aspectos son superiores a los compuestos de coordinación metálicos clásicos. Además, en los últimos 30 años

la industria farmacéutica ha incorporado el uso cada vez mayor de catalizadores, necesarios para la producción a nivel industrial de este tipo de compuestos. Esto hace que sea cada vez más difundido su uso, siendo más considerados en el desarrollo y descubrimiento de nuevos potenciales fármacos [77].

En la literatura se reportan diferentes compuestos organometálicos con actividad citotóxica relevante, cómo es el caso del dicloruro de titanoceno ( $\text{TiCp}_2\text{Cl}_2$ ), que para principios del 2000 había avanzado hasta fase clínica II, siendo el primer compuesto de coordinación no basado en platino en ingresar a esa etapa [78]. Particularmente, los compuestos organometálicos derivados del ferroceno son de gran interés en QIM. El ferroceno es un fragmento organometálico lipofílico que está formado por dos anillos ciclopentadienilo ( $Cp$ ) y un centro metálico de  $\text{Fe(II)}$ , formando una estructura del tipo *sándwich* (figura 1.16). Presenta alta estabilidad y se ha utilizado como base para la obtención de numerosos derivados, debido a la gran variedad de posibles sustituciones en ambos anillos  $Cp$ . El tipo y número de sustituyentes que posea el ferroceno genera cambios en las propiedades fisicoquímicas del mismo, como su reactividad, su potencial redox y su carácter lipofílico. Esta propiedad tiene gran impacto en la solubilidad, actividad biológica, transporte a través de las membranas celulares, construcción de complejos con receptores, entre otros aspectos [63]. La capacidad de modulación de estas características lo hacen muy atractivo en el diseño de compuestos con aplicaciones biológicas [79].

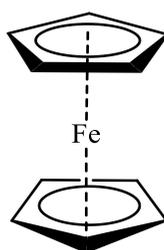


Figura 1.16: Estructura del ferroceno.

Si bien el uso principal de los derivados de ferroceno es como ligandos en aplicaciones catalíticas [80], numerosos compuestos con estos ligandos han presentado actividad antitumoral e incluso antiparasitaria. La inclusión del fragmento ferroceno en el diseño de potenciales fármacos ha resultado una estrategia exitosa [79,81]. En particular, la ferroquina (figura 1.17), ferroceno

análogo estructuralmente a la cloroquina, mostró actividad en cepas de *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria) resistentes a la cloroquina y un importante incremento de actividad respecto a la misma, lo que ameritó su ingreso a fase clínica de desarrollo por Sanofi Aventis para terapia de combinación con fármacos en uso clínico y posteriormente ingresó a fase II como monoterapia y en combinación [82–84].

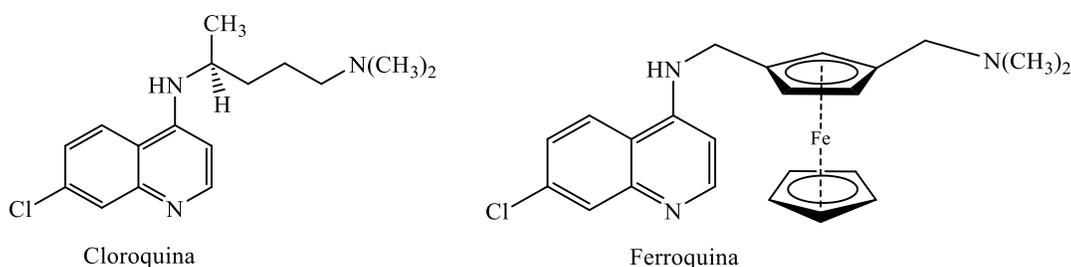


Figura 1.17: Estructura de la cloroquina y su análogo organometálico, la ferroquina.

Uno de los mecanismos de acción conocidos de la ferroquina es la generación de especies reactivas de oxígeno a través de reacciones tipo Fenton [85,86]. Éstas son reacciones redox reversibles donde se generan pequeñas cantidades de radicales hidroxilo a partir de  $H_2O_2$  bajo condiciones biológicas específicas, generando estrés oxidativo actuando en fosfolípidos que forman parte de las membranas celulares [87]. Esto abre la posibilidad de que la inclusión de un coligando derivado del ferroceno no solo brinde al nuevo compuesto generado propiedades fisicoquímicas de interés biológico como la lipofilia mejoradas, sino que también abre la posibilidad de generar un mecanismo de acción adicional basado en la formación de EROs.

La mayoría de los derivados de ferroceno reportados en la bibliografía como potenciales metalofármacos surgen de aplicar una estrategia de generación de análogos, similar a la del diseño de la ferroquina, incluyendo el ferroceno en la estructura de un fármaco orgánico o compuesto orgánico bioactivo. En este trabajo de tesis en cambio, se incluye un derivado del ferroceno como coligando. Entre los derivados de ferroceno más ampliamente estudiados y utilizados en la síntesis de compuestos organometálicos se encuentra el 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno o dppf (figura 1.18), sintetizado por primera vez en 1965 [88]. El dppf cuenta con un fragmento de ferroceno sustituido en ambos anillos *Cp* por grupos difenilfosfino ( $PPh_2$ ) con átomos donores de P.

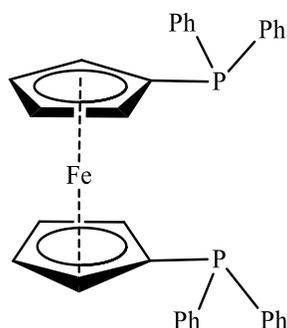


Figura 1.18: Estructura del 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, dppf.

El dppf posee la capacidad de actuar como ligando monodentado, bidentado o puente, generando diferentes arreglos o geometrías alrededor del o los centros metálicos (figura 1.19). Además, al coordinarse puede aliviar la tensión impuesta por la formación del complejo al variar la posición relativa de los anillos *Cp* alrededor del eje *Cp*(centroide)-Fe-*Cp*(centroide) mediante un giro (figura 1.20), la distancia de los anillos al centro de Fe(II) (pueden alejarse o acercarse) y, además, los átomos de fósforo pueden divergir de la coplanaridad con los anillos *Cp* a distintos ángulos. Todas estas diferentes conformaciones del dppf le confieren la capacidad de adaptarse a los requerimientos geométricos y estéricos del ion metálico central, mostrando gran versatilidad como ligando [89].

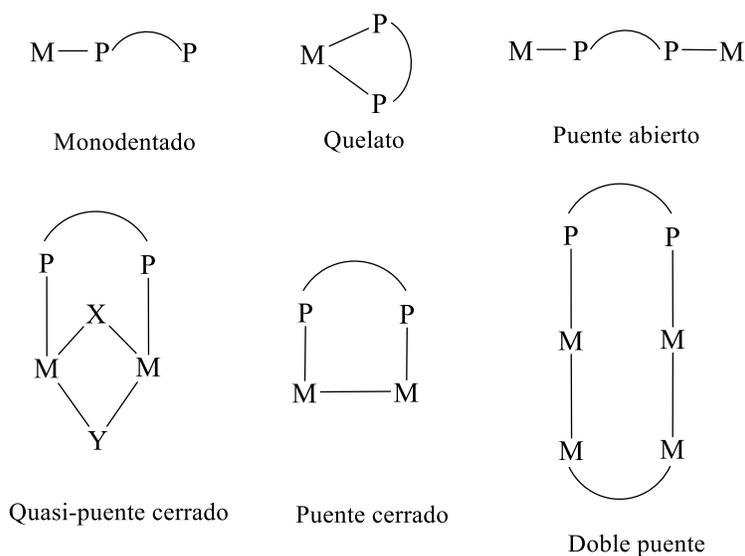


Figura 1.19: Modos de coordinación comúnmente observados del ligando dppf

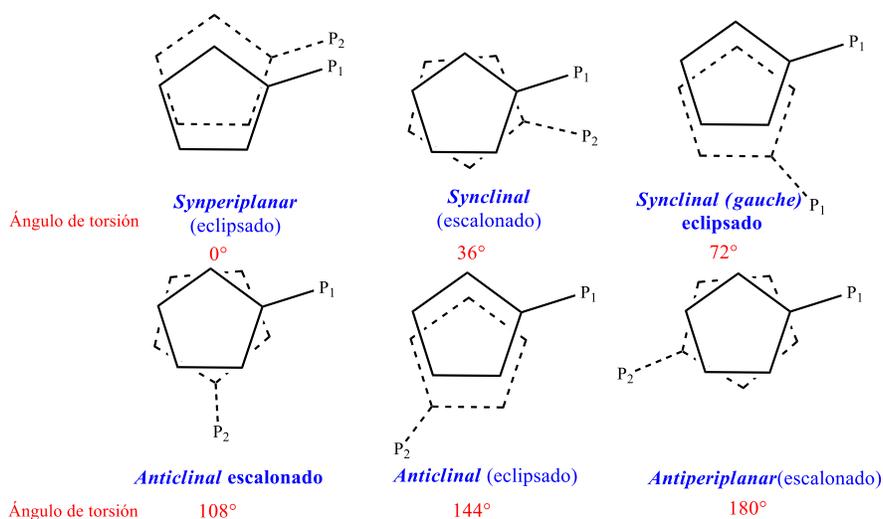


Figura 1.20: Posibles conformaciones del dppf que surgen de la torsión  $Cp(\text{centroide})\text{-Fe-}Cp(\text{centroide})$ .

Todas las características anteriormente mencionadas hacen que el dppf sea un co-ligando con propiedades deseables para los nuevos compuestos que se plantea desarrollar en este Trabajo de Tesis. Además de aportar estabilidad en solución y lipofilia a los compuestos finales, provee otro potencial mecanismo de acción que pudiera afectar a los parásitos de interés.

#### 1.4 Sistemas encapsulantes nanoestructurados

Un recurso muy utilizado actualmente en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades es el uso de nanotecnología. Diversos materiales como liposomas, nanopartículas poliméricas, nanotubos, entre otros, han sido utilizados en la formulación de agentes anticancerígenos, antifúngicos, antimicrobianos e incluso se ha propuesto la inclusión de este tipo de tecnologías en el desarrollo de agentes para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad producida por el virus SARS-CoV-2 [90]. La aplicación de este tipo de tecnologías permite modificar propiedades fisicoquímicas de los potenciales fármacos que afectan el desempeño *in vitro* e *in vivo* por conducir a cambios favorables en la solubilidad, la actividad biológica y/o la toxicidad, la biodistribución y la biodisponibilidad.

Actualmente varias formulaciones liposomales, por ejemplo, son utilizadas a nivel clínico: Doxil®, conteniendo doxorrubicina para cáncer de ovario, Ambisome®, conteniendo anfotericina B para el tratamiento de infecciones por hongos y para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, DepoDur™, formulación analgésica conteniendo morfina, entre otras [91]. También, varios

sistemas nanoliposomales, incluyendo fármacos de platino de uso clínico (cisplatino, oxaliplatino), se encuentran actualmente en fases clínicas avanzadas [32,92]. Sin embargo, poco se ha estudiado el efecto de nanosistemas en el tratamiento de enfermedades parasitarias en comparación con otras enfermedades como el cáncer [93–95].

La baja solubilidad es un problema común que presentan compuestos metálicos desarrollados como potenciales fármacos. Esto disminuye su biodisponibilidad, lo que a su vez afecta su eficacia. Una alternativa que permite prescindir del uso de solventes orgánicos es la nanoencapsulación. La inclusión de fármacos en sistemas nanométricos puede mejorar significativamente la solubilidad de fármacos poco solubles [96]. Además, puede tener efectos en la biodisponibilidad de los compuestos encapsulados. Otra potencial ventaja es la disminución de la toxicidad en células sanas y, por lo tanto, una mejora en el índice terapéutico [97]. Muchas otras potenciales ventajas, como mayor estabilidad, biocompatibilidad, reducción de la dosis administrada y la administración por distintas rutas, son reportadas en esta área [93,98]. Se ampliará esta temática mostrando diferentes ejemplos en el capítulo 6 del presente Trabajo.

### 1.5 Propuesta

En base a todo lo anteriormente expuesto, en este Trabajo de Tesis se propuso desarrollar tres familias de complejos heterobimetálicos, conformadas por:

1. Complejos que incluyen centros de Pd(II) y Pt(II) con ligandos derivados de la tropolona y el co-ligando dppf.
2. Complejos que incluyen centros de Pd(II) y Pt(II) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina y el co-ligando dppf.
3. Complejos que incluyen centros de Ru(II) con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina, derivados de la 1,10-fenantrolina y el co-ligando dppf.

A su vez, se pretendió seleccionar uno a dos compuestos promisorios (en cuanto a su actividad biológica y selectividad hacia el parásito) para su encapsulación en sistemas nanométricos y evaluar sus efectos citotóxicos frente a parásitos de interés, en comparación con el compuesto bioactivo sin encapsular.

### 1.5.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de nuevos compuestos organometálicos heterobimetálicos multifuncionales derivados del ferroceno que incluyan ligandos bioactivos frente a microorganismos, parásitos y/o células tumorales y realizar estudios fisicoquímicos y biológicos que permitan evaluar su potencialidad como fármacos, particularmente antiparasitarios. Se pretende incursionar en la nanotecnología desarrollando estructuras nanométricas encapsulantes para uno (o dos) de los compuestos bioactivos más promisorio(s).

### 1.5.2 Objetivos específicos

- 1) Sintetizar compuestos heterobimetálicos (Fe-Pd, Fe-Pt, Fe-Ru) utilizando ligandos bioactivos seleccionados y el derivado funcionalizado de ferroceno dppf como co-ligando.
- 2) Caracterizar en solución y en estado sólido los compuestos obtenidos desde el punto de vista analítico y estructural.
- 3) Estudiar la estabilidad, solubilidad y lipofilia de los compuestos metálicos obtenidos.
- 4) Estudiar la actividad *in vitro* de los compuestos obtenidos principalmente frente a *Trypanosoma brucei* y en lo posible también en *Leishmania infantum*, *M. tuberculosis* y líneas de células tumorales seleccionadas.
- 5) Estudiar su toxicidad sobre células mamíferas a efectos de determinar la selectividad que muestran los compuestos.
- 6) Estudiar la interacción con ADN, blanco potencial de muchos compuestos metálicos bioactivos.
- 7) Correlacionar la actividad biológica observada para los compuestos con los aspectos estructurales y las propiedades fisicoquímicas de los mismos.
- 8) Explorar las posibilidades de la encapsulación de alguno de los compuestos activos más promisorios en sistemas nanométricos y evaluar el efecto de la encapsulación en la actividad biológica *in vitro*.

Capítulo 2:  
Materiales y métodos

## 2.1 Síntesis

### 2.1.1 Síntesis de precursores

#### 2.1.1.1 Síntesis de precursores $[M^{II}Cl_2(dppf)]$ o $M-dppf-Cl_2$ ( $M = Pd$ o $Pt$ )

Los precursores  $[Pd^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$  ( $Pd-dppf-Cl_2$ ) y  $[Pt^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$  ( $Pt-dppf-Cl_2$ ) se obtuvieron a partir de los complejos  $[Pd^{II}Cl_2(DMSO)_2]$  y  $[Pt^{II}Cl_2(DMSO)_2]$ , respectivamente. Los cuatro complejos fueron obtenidos según técnicas previamente reportadas [99].

- $[Pd^{II}Cl_2(DMSO)_2]$ : Se suspendieron 0,25 g (1,41 mmol) de  $PdCl_2$  en 5 mL de DMSO (70 mmol); la suspensión se agitó en caliente ( $\sim 60^\circ C$ ) hasta obtener una solución. La agitación se mantuvo hasta alcanzar la temperatura ambiente, observándose inmediatamente la precipitación de un sólido amarillo, el cual fue lavado con dos porciones de 5 mL de éter anhidro.
- $[Pt^{II}Cl_2(DMSO)_2]$ : Se disolvieron 0,625 g (1,50 mmol) de  $K_2[PtCl_4]$  en 5 mL de agua destilada; sobre esta solución se añadieron 0,5 mL de DMSO (7 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente hasta observar la precipitación de un sólido amarillo claro. Este sólido se lavó con porciones sucesivas de 5 mL de agua destilada, etanol y éter anhidro.

Posteriormente, se sintetizaron los compuestos  $Pd-dppf-Cl_2$  y  $Pt-dppf-Cl_2$  siguiendo métodos experimentales previamente descritos [100]. Se disolvieron cantidades equimolares del complejo  $[M^{II}Cl_2(DMSO)_2]$  (60 mg; 0,18 mmol de  $[Pd^{II}Cl_2(DMSO)_2]$ , y 188 mg; 0,44 mmol de  $[Pt^{II}Cl_2(DMSO)_2]$ ) y del ligando dppf ( $Pd(II)$ : 100 mg,  $Pt(II)$ : 246 mg) en 15 mL de cloroformo. La mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. Posteriormente, se rotaevaporó el solvente hasta un volumen aproximado de 5 mL, observándose la precipitación de un sólido de color rojo para el complejo de  $Pd(II)$  y de un sólido amarillo para el complejo de  $Pt(II)$ , que fue separado por filtración y lavado con dos porciones de 5 mL de éter anhidro. Los sólidos obtenidos se secaron al aire.

## 2.1.1.2 Síntesis de precursores para complejos de Ru(II)

Para la obtención de los compuestos finales de Ru(II) fue necesaria la síntesis sucesiva de tres precursores, como lo refleja el siguiente esquema:

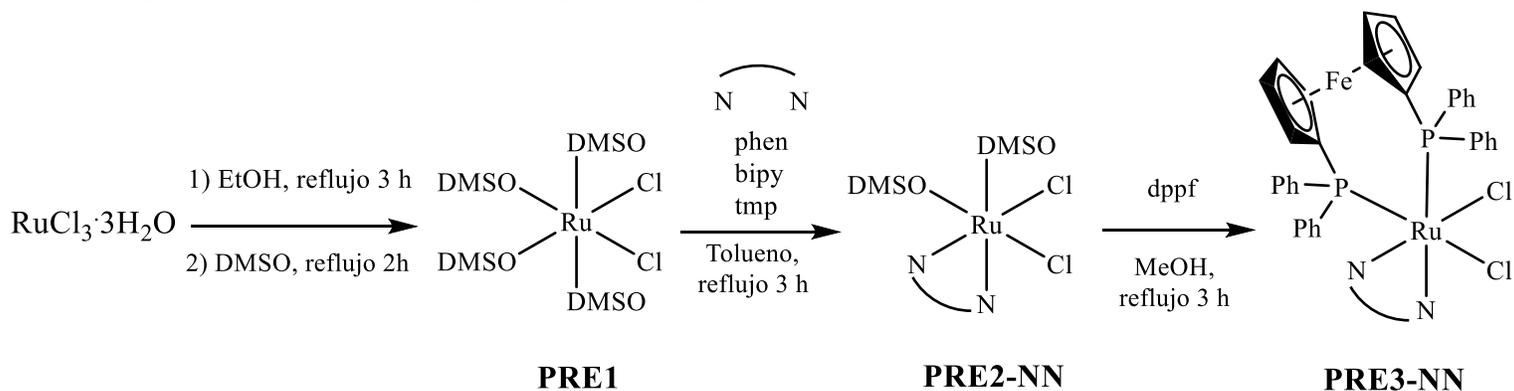


Figura 2.1: Esquema de síntesis de los precursores necesarios para la síntesis de los compuestos finales de Ru(II).

La síntesis del precursor *cis, fac*-[RuCl<sub>2</sub>(*S*-DMSO)<sub>3</sub>(*O*-DMSO)], que de forma resumida se puede identificar como [RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>] (PRE1), se realizó a través de un procedimiento de dos etapas descrito previamente [101]. En una primera etapa, se suspendieron 1,5 g de Ru<sup>III</sup>Cl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O en 45 mL de etanol. La suspensión marrón oscura se calentó a reflujo durante 3 h para obtener una solución verde oscura. Dicha solución se rotaevaporó a un volumen mínimo y, en una segunda etapa, se agregó 8 mL de DMSO seco para luego calentar a reflujo por 2 horas. Se obtuvo una solución anaranjada, de la cual precipitó un sólido amarillo al enfriarse. Se agregó 50 mL de acetona para propiciar la precipitación completa del producto. El sólido obtenido se filtró por gravedad y se lavó sucesivamente con cinco porciones de 5 ml de acetona.

2.1.1.2.1 Síntesis de los PRE2-NN: *cis, cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(DMSO)<sub>2</sub>], donde NN = 1,10-fenantrolina (phen), 2,2'-bipiridina (bipy) o 3,4,7,8-tetrametilfenantrolina (tmp)

Los precursores PRE2-NN se obtuvieron, de forma general, por reacción del PRE1 con el derivado NN correspondiente:

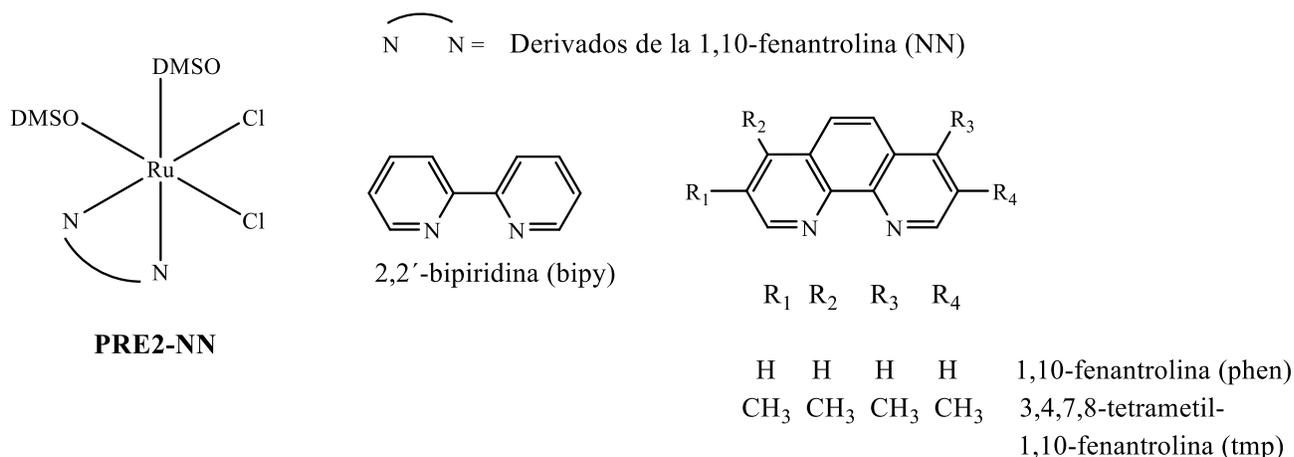


Figura 2.2: Estructura general de los PRE2-NN y de los NN seleccionados: phen, bipy y tmp.

- *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>(phen)] o PRE2-phen

La síntesis de este precursor se basó en trabajos reportados anteriormente [102]. Se suspendió PRE1 (500 mg; 1,032 mmol) y phen (186 mg; 1,032 mmol) en 15 mL de tolueno. La suspensión de color amarillo oscuro se calentó a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se obtuvo un sólido marrón verdoso y se lavó sucesivamente con cinco porciones de 2 mL de tolueno, cinco porciones de 2 mL de acetona y cinco porciones de 2 mL de éter.

- *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>(bipy)] o PRE2-bipy

Este precursor se sintetizó mediante una modificación de un método informado previamente [103]. Se suspendieron 500 mg (1,032 mmol) de PRE1 y 161 mg de 2,2'-bipiridina (bipy) (1,032 mmol) en 15 mL de tolueno. La suspensión amarilla se calentó a reflujo durante 3 h. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, se obtuvo un sólido amarillo que se lavó sucesivamente con tolueno, acetona y éter.

- *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>2</sub>(tmp)] o PRE2-tmp

Hasta donde se conoce, la síntesis de este precursor se reporta por primera vez en el marco de este Trabajo de Tesis. Se sintetizó a través de un procedimiento similar al descrito para el compuesto

análogo con NN = bipy, con 500 mg (1,032 mmol) de PRE1 y 161 mg de tmp (1,032 mmol). El compuesto se aisló como un sólido verde oscuro.

#### 2.1.1.2.2 Síntesis de los PRE3-NN, *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(dppf)], donde dppf = 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno

De forma general, los precursores PRE3-NN se obtuvieron por reacción de los PRE2-NN con dppf en metanol a reflujo. En el caso de los precursores con NN = phen o bipy, ya han sido informados y caracterizados previamente a través de un método sintético diferente, que involucra el uso del precursor *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NN)] y el uso de técnicas de Schlenk [6].

- *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(phen)]

Se suspendieron 300 mg de PRE2-phen (0,590 mmol) y 327 mg de dppf (0,590 mmol) en 30 mL de MeOH. La suspensión marrón se calentó a reflujo durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se obtuvo un sólido naranja y se lavó sucesivamente con cinco porciones de 2 ml de acetona y cinco porciones de 2 ml de éter.

- *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(bipy)]

Se suspendieron 300 mg de PRE2-bipy (0,619 mmol) y 343 mg de dppf (0,619 mmol) en 30 ml de MeOH. La suspensión marrón se calentó a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se obtuvo un sólido naranja que se lavó sucesivamente con cinco porciones de 2 mL de acetona y cinco porciones de 2 mL de éter.

- *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(tmp)]

Hasta donde se conoce, este complejo no ha sido reportado previamente. Se sintetizó mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para los compuestos análogos con NN = phen o bipy, a partir de una suspensión de 300 mg (0,531 mmol) de PRE2-tmp y 295 mg (0,531 mmol) de dppf en 30 ml de MeOH. El compuesto se aisló como un sólido de color naranja brillante.

### 2.1.2 Síntesis de compuestos

#### 2.1.2.1 Síntesis de compuestos $[M^{II}(\text{trop})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ y $[M^{II}(\text{hino})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ , $M = \text{Pd}$ o $\text{Pt}$

Los compuestos  $[M^{II}(\text{trop})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[M^{II}(\text{hino})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  (código M-dppf-trop y M-dppf-hino, respectivamente) se sintetizaron mediante la reacción de los precursores correspondientes con sales sódicas de los ligandos (figura 2.3) Las sales sódicas se sintetizaron aplicando modificaciones al procedimiento reportado en bibliografía [51], donde a una solución acuosa de 4 mL de NaOH se le agregó cantidad equimolar de ligando comercial (240 mg de Hhino; 1,3 mmol y 101,3 mg de Htrop; 0,8 mmol) y se agitó con calentamiento hasta la obtención de una solución. Al enfriarse en baño de hielo, se obtuvo sólidos amarillos en ambos casos, que fueron filtrados, lavados con éter y secados a vacío.

Para la síntesis de los compuestos M-dppf-trop y M-dppf-hino se siguió el siguiente procedimiento [104]: 50 mg del precursor M-dppf-Cl<sub>2</sub> (0,059 mmol de Pd-dppf-Cl<sub>2</sub> o 0,053 mmol de Pt-dppf-Cl<sub>2</sub>) se disolvieron en 10 ml de metanol. A dicha solución se le añadió una cantidad equimolar de Nahino·2H<sub>2</sub>O (13,1 mg para el compuesto de Pd y 11,8 mg para el compuesto de Pt) o Natrop (8,5 mg para el compuesto de Pd y 7,7 mg para el compuesto de Pt) disueltos en 5 mL de metanol. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas para los compuestos con trop y durante 6 horas a reflujo para los compuestos con hino. En todos los casos la solución obtenida se evaporó hasta 5 mL y se centrifugó. Se añadió NaPF<sub>6</sub> disuelto en un volumen mínimo de metanol (14,8 mg; 0,88 mmol para los compuestos de Pd y 13,4 mg; 0,079 mmol, para los compuestos de Pt). La solución se mantuvo a 4 °C durante 24 h. Los compuestos de Pd(II) se aislaron por centrifugación como sólidos de color marrón rojizo y los compuestos de Pt(II) como sólidos de color amarillo anaranjado. Todos los sólidos se lavaron con porciones de 5 mL de metanol. Los cuatro sólidos se recrystalizaron a partir de una solución de diclorometano por difusión con hexano.

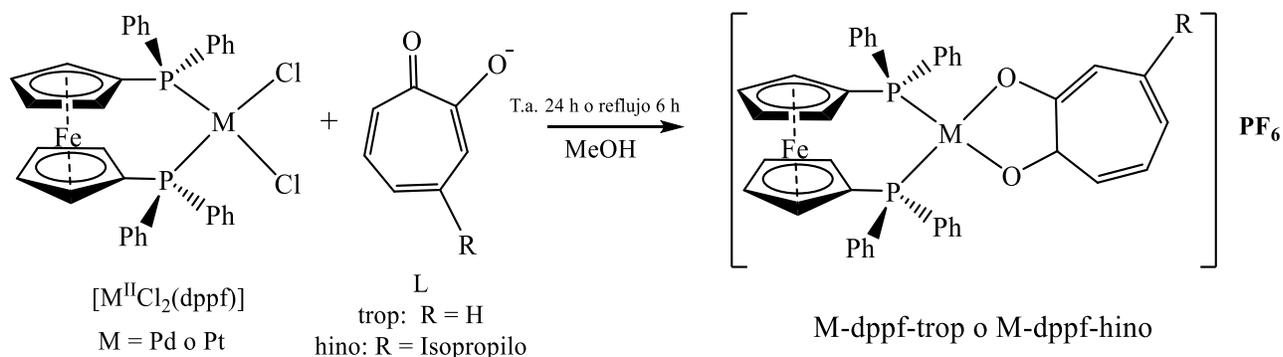


Figura 2.3: Esquema de síntesis de los compuestos M-dppf-trop y M-dppf-hino.

### 2.1.2.2 Síntesis de compuestos $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$ , $M = Pd$ o $Pt$ y $HL = HL1\text{-}HL5$ , derivados de la 8-hidroxiquinolina

Los compuestos  $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$  (código M-dppf-L), con L = derivados de la 8-hidroxiquinolina (figura 2.4), se sintetizaron mediante el siguiente procedimiento general [105]: Para los compuestos de Pt, 50 mg del precursor Pt-dppf-Cl<sub>2</sub> (0,053 mmol) se disolvieron en 10 mL de metanol. Para los compuestos donde HL = HL1-HL3, se añadió una cantidad aproximada a la equimolar de sal sódica del ligando disuelta en 5 ml de metanol y se agitó por 24 h. La sal sódica de estos ligandos se sintetizó de manera análoga a la de los ligandos Htrop y Hhino del apartado anterior. Para los compuestos Pt-dppf-L donde HL = HL4 o HL5, se añadió una solución equimolar de ligando disuelto en metanol con cantidad equimolar de trietilamina y se agitó por 24 h. En el caso del compuesto Pt-dppf-L2, la mezcla de precursor y ligando se mantuvo a reflujo durante 5 h. Las soluciones se evaporaron hasta 5 mL y se separaron por centrifugación de sólidos no deseados. A los sobrenadantes se les añadió NaPF<sub>6</sub> en un exceso del 200% (0,159 mmol) disuelto en un volumen mínimo de metanol. Las soluciones se mantuvieron a 4 °C durante 24 h. Los sólidos se aislaron por centrifugación como sólidos de color amarillo anaranjado, que posteriormente se recrystalizaron por difusión con hexano a partir de una solución de los compuestos en diclorometano.

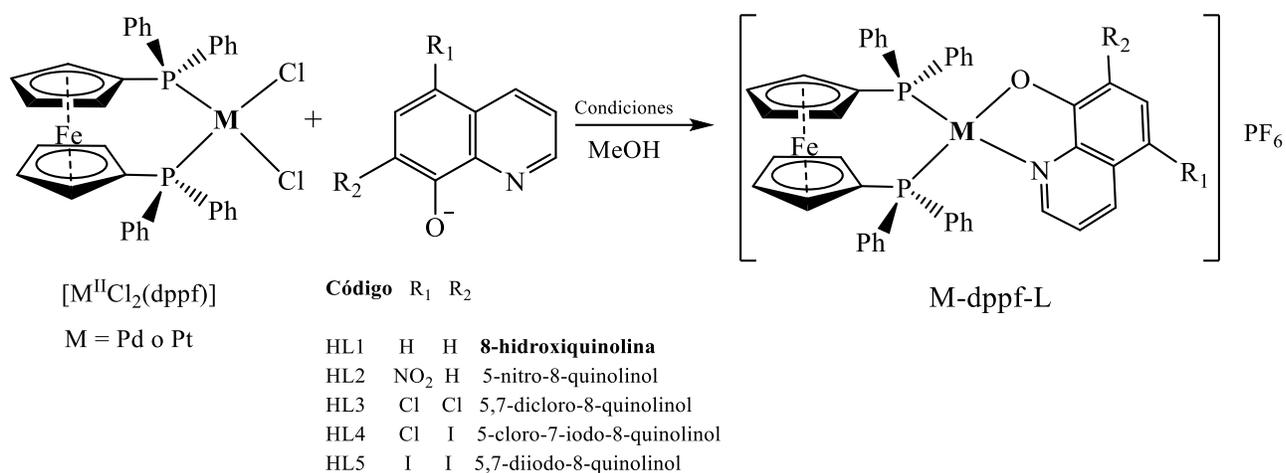


Figura 2.4: Esquema de síntesis de los compuestos M-dppf-L, donde M = Pd o Pt y HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina

Tabla 2.1: Condiciones de síntesis de los compuestos de la serie 8HQ.

Forma del ligando	Cantidad de ligando agregada (mg/mmol)		Condiciones
	Pd-dppf-L	Pt-dppf-L	
Na8HQ·4H <sub>2</sub> O	14,1 (0,069)	12,8 (0,063)	agitación 24 h
NaL2	12,5 (0,062)	11,3 (0,057)	reflujo 5 h
NaL3	13,9 (0,059)	12,6 (0,059)	agitación 24 h
HL4*	19,8 (0,065)	17,8 (0,058)	agitación 3 h Pd(II), 24 h Pt(II)
HL5*	27,8 (0,070)	23,1 (0,058)	agitación 5 h Pd(II), 24 h Pt(II)

\* deprotonado por tratamiento con trietilamina

En el caso de los compuestos de Pd-dppf-L se sintetizaron según el siguiente procedimiento[106]: 50 mg del precursor Pd-dppf-Cl<sub>2</sub> (0,059 mmol) se suspendieron en 5 mL de metanol. Se añadió 5 mL de una solución equimolar de ligando con 20 µL de trietilamina (0,142 mmol). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 4 – 5 h para Pd-dppf-L4, con agitación durante 15 – 24 h para Pd-dppf-L1, Pd-dppf-L3 y Pd-dppf-L5 y bajo reflujo durante 5 h para Pd-dppf-L2. Las soluciones se evaporaron hasta 5 ml y se centrifugaron. Se añadió solución de NaPF<sub>6</sub>

en exceso (30 mg; 0,177 mmol) al sobrenadante y la mezcla se agitó durante 15 min. Los compuestos se aislaron por filtración como sólidos marrón rojizos y se recrystalizaron en una solución de diclorometano por difusión con hexano.

### 2.1.2.3 Síntesis de compuestos $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$ o $\text{Ru-NN-L}(\text{X})$ , donde $\text{X} = \text{PF}_6^-$ o $\text{Cl}^-$

La síntesis de los compuestos  $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{PF}_6)$  (código  $\text{Ru-NN-L}(\text{PF}_6)$ ), donde HL = derivados de la 8-hidroxiquinolina se intentó para cada uno de los HL mencionados anteriormente (ver figura 2.4). Sin embargo, solo fue posible aislar y caracterizar con pureza adecuada tres compuestos de esta familia:  $\text{Ru-tmp-L4}(\text{PF}_6)$ ,  $\text{Ru-tmp-L5}(\text{PF}_6)$  y  $\text{Ru-bipy-L5}(\text{PF}_6)$  (figura 2.5). La síntesis de estos compuestos se realizó bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ .

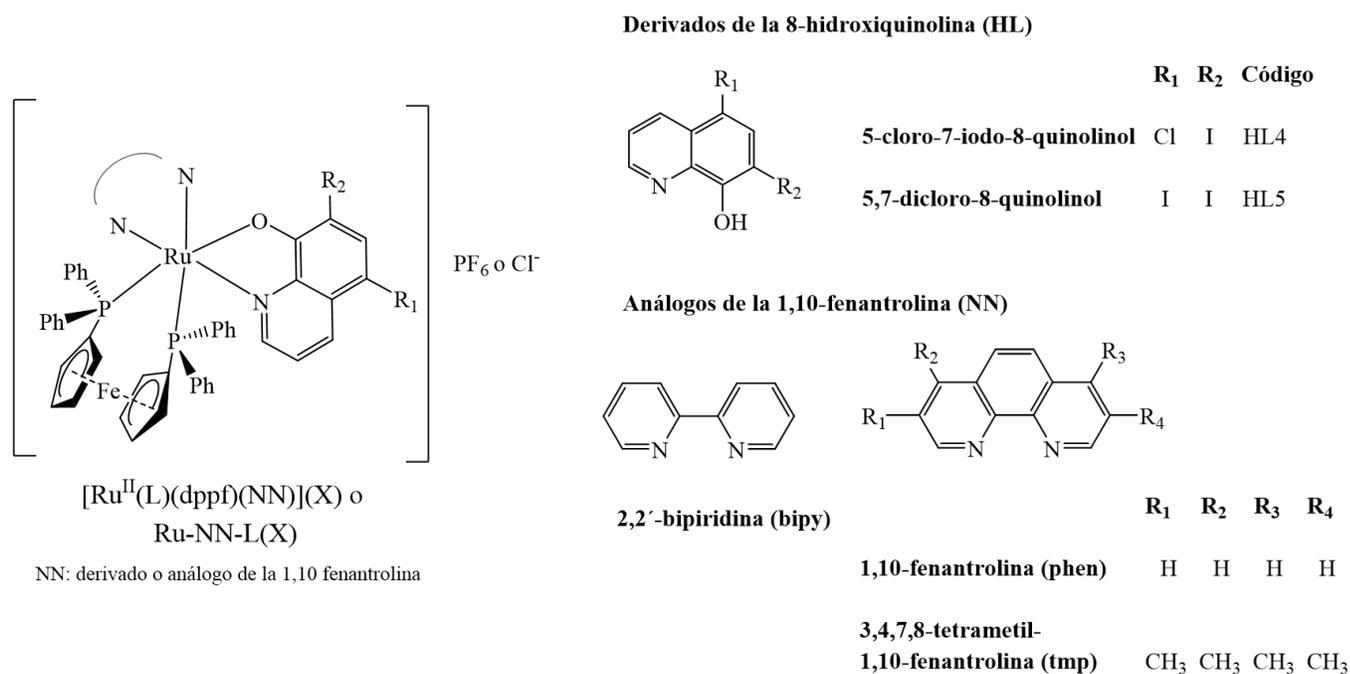


Figura 2.5: Estructura general de los compuestos  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$  o  $\text{Ru-NN-L}(\text{X})$  y ligandos utilizados

- $[\text{Ru}(\text{L4})(\text{dppf})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$  o  $\text{Ru-tmp-L4}(\text{PF}_6)$

Se disolvieron 19,0 mg de HL4 (0,062 mmol) en 4 ml de MeOH conteniendo 8,7  $\mu\text{L}$  de trietilamina (0,062 mmol), obteniéndose una solución amarilla. Se suspendieron 60,0 mg (0,062 mmol) de PRE3-tmp y 6 ml de MeOH. El color de la solución cambió a rojo oscuro. Esta solución se mantuvo a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió  $\text{NaPF}_6$  (20,9 mg; 0,125

mmol) disuelto en 2 ml de MeOH. La solución se evaporó a vacío hasta 6 mL y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se filtró un sólido naranja y se lavó con dos porciones de 2 ml de alcohol isopropílico. Se obtuvieron dos tipos de cristales (naranja y rojo oscuro) por difusión de solventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:hexano, al igual que en los compuestos anteriores) que se separaron manualmente con la ayuda de un microscopio. Los cristales naranjas fueron adecuados para resolver la estructura por difracción de rayos X.

- [Ru(L5)(dppf)(tmp)](PF<sub>6</sub>) o Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>)

Se disolvieron 24,7 mg de HL5 (0,062 mmol) en 30 ml de MeOH conteniendo 18,8 µL de trietilamina (0,136 mmol), obteniéndose una solución amarilla. Se suspendieron 60,0 mg (0,062 mmol) de PRE3-tmp en dicha solución y se agregaron 10 ml de MeOH. El color de la solución cambió a rojo oscuro. Esta solución se mantuvo a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió NaPF<sub>6</sub> (22,8 mg; 0,136 mmol) disuelto en 2 ml de MeOH. La solución se evaporó a vacío hasta 6 mL y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se filtró un sólido marrón rojizo y se lavó con dos porciones de 2 ml de alcohol isopropílico. Se obtuvieron dos tipos de cristales (naranja y rojo oscuro) por difusión CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:hexano y se separaron manualmente con la ayuda de un microscopio. Los cristales de color naranja fueron adecuados para resolver la estructura por difracción de rayos X.

- [Ru(L5)(dppf)(bipy)](PF<sub>6</sub>) o Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>)

Se disolvieron 27,0 mg de HL5 (0,068 mmol) en 30 ml de MeOH conteniendo 18.8 µL de trietilamina (0,136 mmol). Se suspendieron 60,0 mg (0,068 mmol) de PRE3-bipy en dicha solución y se agregaron 10 ml de MeOH. Esta solución se mantuvo a reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió NaPF<sub>6</sub> (22,8 mg; 0,136 mmol) disuelto en 2 ml de MeOH. La solución se evaporó a vacío hasta 6 mL y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se filtró un sólido marrón rojizo y se lavó con dos porciones de 2 ml de alcohol isopropílico.

#### 2.1.2.3.1 Síntesis del compuesto [Ru(L5)(dppf)(bipy)](Cl) o Ru-bipy-L5(Cl)

El contraión hexafluorofosfato del compuesto Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) se intercambió por cloruro según lo descrito por Karges *et al* [107]. Para esto se suspendieron 48,7 mg del compuesto Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) (0,036 mmol) y 181,5 mg de resina de intercambio aniónico IRA402 en forma de cloruro

en 6 ml de MeOH. Esta suspensión se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y se filtró a través de papel. La solución de color rojo oscuro obtenida se evaporó a sequedad.

## 2.2 Caracterización

### 2.2.1 Caracterización en estado sólido

#### 2.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos

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

#### 2.2.1.2 Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica que se basa en la vibración de los enlaces de una molécula a frecuencias específicas, que depende directamente de la energía asociada al entorno del enlace químico [108]. Los espectros de infrarrojo permitieron identificar la presencia de los ligandos en los complejos sintetizados. Para esto se identificaron en los espectros de infrarrojo de cada ligando libre las bandas de vibración características y, posteriormente, se asignaron de forma tentativa en los espectros de los complejos sintetizados. Se analizaron los corrimientos debidos a la coordinación al centro metálico. Los espectros de infrarrojo fueron medidos en un rango entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  en pastillas de KBr utilizando un equipo Shimadzu IRPrestige-21 de Facultad de Química, UdelaR.

#### 2.2.1.3 Difracción de rayos X de monocristal

La cristalografía de rayos X es una técnica que permite obtener una descripción detallada de la disposición espacial de los átomos de una molécula, y se basa en el fenómeno de difracción de rayos X por sólidos cristalinos. Para esto se utiliza un difractómetro de monocristal, en donde se emiten rayos X producidos por la aceleración de electrones desde un cátodo hacia un ánodo metálico por medio de la aplicación de un alto voltaje. Los electrones acelerados chocan con los átomos del metal utilizado como ánodo, removiendo electrones de niveles internos y ocasionando

que electrones de niveles superiores cubran los lugares vacantes, emitiendo así fotones de rayos X. La energía de los rayos X generados depende del tipo de ánodo utilizado en cada medida (cada átomo posee un espectro de rayos X propio y característico), siendo los más usados  $\text{MoK}_\alpha = 0,7107 \text{ \AA}$  y  $\text{CuK}_\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$ . La difracción se produce cuando la radiación generada (por el átomo de Cu o Mo) pasa a través de una estructura periódica, con características que se repiten regular e infinitamente en el espacio (denominados planos de difracción). La distancia con la que se repite esta periodicidad es aproximadamente igual a la longitud de onda de los rayos X emitidos por la fuente. En el interior de un monocristal existe diferentes familias de planos, con distintas direcciones y espaciados, que son característicos para cada muestra, y corresponden a la denominada huella dactilar de las sustancias cristalinas. De esta manera, conociendo las direcciones de estos planos es posible estudiar el sistema cristalino y las dimensiones de la celda unitaria, y sabiendo las intensidades de difracción, relacionadas con la naturaleza y posición de cada átomo en la celda, es posible conocer la estructura tridimensional interna del cristal estudiado [109].

Utilizando esta técnica, fue posible resolver la estructura cristalina de 12 complejos (tabla 2.2). Todas las muestras monocristalinas estudiadas se obtuvieron mediante difusión de una solución de los compuestos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a hexano. La resolución de 12 estructuras de complejos de fórmula general  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  (M-dppf-L) fue realizada en la Facultad de Química, UdelaR, con la tutoría del Prof. Leopoldo Suescun y la colaboración del Dr. Esteban Rodríguez Arce. Se efectuó en un difractómetro Bruker D8 Venture. Las intensidades de difracción de rayos X fueron colectadas con el programa APEX 2 v2014.5 (Bruker AXS) [110]. En el caso de la resolución de las estructuras de los complejos de fórmula  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{PF}_6)$  (Ru-NN-L(X)), las medidas fueron realizadas por el Dr. Olivier Blacque (Department of Chemistry, University of Zurich, Suiza) en un difractómetro Rigaku OD Synergy-Pilatus. Estas intensidades fueron escaladas, integradas y corregidas por absorción con el programa *CrysAlisPro* [111]. Todas las estructuras fueron resueltas con SHELXT con diferentes interfases [112]. Los programas utilizados para el refinamiento de la totalidad de las estructuras se señalan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Radiación aplicada y softwares utilizados para el estudio de la estructura de los compuestos por difracción de Rayos X de monocristal.

<b>Compuesto</b>	<b>Radiación</b>	<b>Integración</b>	<b>Escalado y corrección por abs.</b>	<b>Resolución</b>	<b>Refinamiento</b>
Pd-dppf-trop	CuK $\alpha$	APEX 2 v2014.5	SADABS V2014/2	Métodos directos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pt-dppf-trop	CuK $\alpha$	APEX 2 v2014.5	SADABS V2014/2	Métodos directos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pd-dppf-hino	CuK $\alpha$	APEX 2 v2014.5	SADABS V2014/2	Métodos directos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pt-dppf-hino	CuK $\alpha$	APEX 2 v2014.5	SADABS V2014/2	Métodos directos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pt-dppf-L1	MoK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pt-dppf-L2	CuK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	SHELXle (SHELXL-2017)
Pt-dppf-L3	MoK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	SHELXle (SHELXL-2017)
Pd-dppf-L1	MoK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Pd-dppf-L3	CuK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)

Pd-dppf-L4	CuK $\alpha$	APEX 3 v2017.3-0	SADABS V2016/2	Métodos híbridos, SHELXT-2014	Olex2 (SHELXL)
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	MoK $\alpha$	<i>CrysAlisPro</i>	<i>CrysAlisPro</i>	SHELXT	Olex2 (SHELXL)
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	CuK $\alpha$	<i>CrysAlisPro</i>	<i>CrysAlisPro</i>	SHELXT	Olex2 (SHELXL)

Las estructuras cristalinas de Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino contienen vacíos que se llenaron con moléculas de solvente desordenadas. Su contribución a los factores de estructura fue asegurada usando la rutina SQUEEZE de Olex2 [113], resultando en 265.2 electrones/celda unidad para el complejo de Pd(II) y 305.6 electrones/celda unidad para el complejo de Pt(II). La estructura cristalina del complejo Pd-dppf-L1 fue procesada de la misma forma, resultando con 132.3 electrones/celda unidad. Por otro lado, las estructuras cristalinas de dos complejos cocrystalizaron con moléculas de agua: Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>)·0,267 H<sub>2</sub>O y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>)·0,25 H<sub>2</sub>O mientras que una con moléculas de diclorometano: Pt-dppf-L2·2CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

## 2.2.2 Caracterización en solución

### 2.2.2.1 Conductimetría

Los compuestos de coordinación cargados forman sales que tienen la capacidad de disociarse en solución y conducir la corriente eléctrica, comportándose como electrolitos. La magnitud de la conducción depende de la concentración de los iones en solución, la carga y el tamaño de los mismos, la temperatura de medida y la constante dieléctrica del disolvente utilizado. De esta manera, la determinación de la conductividad molar de una solución de complejo permite conocer si éste es neutro o cargado y así determinar la relación estequiométrica de los iones que conforman dicho complejo.

Se han reportado valores de conductividad molar de numerosos complejos en diferentes solventes, y mediante comparación con estos valores se identificó la estequiometría de los iones presentes en solución de cada complejo sintetizado [114]. Las medidas de conductividad fueron realizadas a 25°C en soluciones de concentración 10<sup>-3</sup>M de complejo en DMSO usando un conductímetro

Jenway 4310. Para algunos complejos, se midió la conductividad durante 4 o 7 días luego de la preparación de la solución, de manera de identificar posibles sustituciones de ligandos cargados por moléculas de DMSO, para así estimar la estabilidad de los compuestos en solución de DMSO. Ésta resulta de interés ya que para la evaluación biológica de los compuestos desarrollados se parte de soluciones stock en DMSO que luego se diluyen en el medio de cultivo del parásito o célula mamífera modelo.

### 2.2.2.2 Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica ampliamente utilizada para la determinación estructural de compuestos en solución. La técnica se aplica sobre átomos que poseen un espín nuclear distinto de cero, como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  y  $^{195}\text{Pt}$ , cuyo espín nuclear es igual a  $1/2$ . Cuando se aplica un campo magnético externo ( $B_0$ ) sobre estos átomos, el campo magnético intrínseco de los núcleos tiende a alinearse a favor (estado de espín  $\alpha$ , de menor energía) o en contra de  $B_0$  (estado de espín  $\beta$ , de menor energía). La interacción entre el momento magnético nuclear y  $B_0$  promueve que los dos estados de espín se diferencien en energía, provocando una mayor población de los espines alineados a favor de  $B_0$  en los niveles de menor energía. Al aplicar radiación electromagnética en el rango de las radiofrecuencias, se genera la excitación de los espines de menor energía hacia los niveles de mayor energía, que a su vez vuelven a bajar, hasta alcanzar un estado de equilibrio denominado absorción de resonancia. La absorción de resonancia es la que se detecta en la técnica de RMN. En los espectros de RMN, los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) y de constante de acoplamiento ( $J$ ) entre núcleos activos, brindan información del entorno químico alrededor del átomo en estudio. Esta información es fundamental para lograr elucidar la estructura y estereoquímica de los complejos en solución, y, además, confirmar si la estructura cristalina resuelta por DRX (en aquellos complejos estudiados por esa técnica) se mantiene en solución [115].

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de todos los complejos se midieron en un equipo Bruker DPX-400 o Avance NEO DPX-400 de Facultad de Química, UdelaR, a  $30^\circ\text{C}$ . Se prepararon soluciones de los compuestos de Pd(II) y Pt(II) en  $\text{DMSO-d}_6$  y de los compuestos de Ru(II) en  $\text{CDCl}_3$ . Se utilizó un  $B_0$  de 400 MHz para los espectros de  $^1\text{H}$  y de 161,98 MHz para los espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ . Para todos los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Para el

ajuste de los parámetros para la detección señales de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN se utilizó  $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$  como referencia. La puesta a punto de la medición de espectros de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN fue realizada por el Dr. Gonzalo Hernández. Para describir el efecto de la coordinación de los ligandos al centro metálico sobre el desplazamiento de las señales, se utilizó el parámetro  $\Delta\delta$ , definido como la diferencia de desplazamiento de la señal de un protón específico en el complejo y el desplazamiento de esa misma señal en el ligando libre.

### 2.2.3 Estudios de estabilidad

#### 2.2.3.1 Estudio de estabilidad de los compuestos M-dppf-L4, M = Pd(II) y Pt(II).

Para evaluar la estabilidad de los complejos en el medio de cultivo (pH 7,4) utilizado para la evaluación frente a *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), se midieron los espectros de  $^{31}\text{P}$ -NMR de Pt-dppf-L4 durante 48 h a temperatura ambiente en una mezcla de DMSO-solución tampón tris-HCl 10 mM pH 7,4 (3:1) a 162 MHz en un equipo Bruker DPX-400 o Avance NEO DPX-400 (Facultad de Química).

Adicionalmente se estudió la estabilidad de los compuestos M-dppf-L4, donde M = Pd(II) y Pt(II), utilizando como solventes DMSO y DMSO-solución tampón tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4 : 1) por la técnica HPLC-DAD. El ligando HL4, dppf y precursores se evaluaron en las mismas condiciones. Para ello se utilizó un cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence LC-20AT, acoplado a un detector de matriz de diodos Shimadzu SPD-M20A. Como fase estacionaria se utilizó una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 de  $4,6 \times 100$  mm y  $5 \mu\text{m}$  termostaticada a  $25^\circ\text{C}$ . Se utilizaron como fases móviles una solución tampón de fosfato 40 mM pH 7,4 (A) y MeOH (B) a un flujo constante de 1 mL/min, según el gradiente que se muestra en la tabla 2.3.

Tabla 2.3: Gradientes de fase móvil utilizados para el estudio de la estabilidad de los compuestos M-dppf-L4; (A) solución tampón de fosfato 40 mM pH 7,4 y MeOH (B)

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

Las soluciones de los compuestos M-dppf-L4 y ligandos se prepararon a 1 mg/mL y las soluciones para compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) a 0,5 mg/mL. Se estableció un volumen de inyección por corrida de 50 µL. La longitud de onda de medición fue de 280 nm. Se estudió la estabilidad en un período de una semana para los compuestos M-dppf-L4, midiéndose las soluciones a t = 0, t = 1 día y t = 7 días en las mismas condiciones y en un período de 72 h para los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) [116].

## 2.3 Actividad Biológica

Dado el interés de generar potenciales fármacos de amplio espectro, los compuestos sintetizados en este Trabajo de Tesis fueron evaluados frente a distintos patógenos, incluidos parásitos tripanosomátidos (*Trypanosoma brucei* y *Leishmania infantum*), *Mycobacterium tuberculosis* y células cancerígenas. A su vez, se evaluó la citotoxicidad de todos los compuestos frente a distintos modelos de células mamíferas, con el fin de evaluar la selectividad de los compuestos sintetizados. A continuación, se describen los métodos utilizados para la realización de las evaluaciones biológicas.

### 2.3.1 Ensayos de viabilidad frente a parásitos tripanosomátidos

#### 2.3.1.1 Ensayos de viabilidad frente a *Trypanosoma brucei* (*T.b.* GFP y *T.b.* LUC)

Los estudios de actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Trypanosoma brucei* fueron realizados para todos los compuestos por quien suscribe en el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo, bajo la tutoría de la Dra. Andrea Medeiros.

En el caso de los compuestos M-dppf-L, con M = Pd(II) o Pt(II), L = trop, hino o derivados de 8-hidroxiquinolina, la actividad se evaluó utilizando la cepa monomórfica 427 de *T. b. brucei*, línea celular utilizada 449-hGrxroGFP2 (*T.b.* GFP). Esta línea cuenta con un gen que expresa un

biosensor redox basado en la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP), la cual es sensible a cambios intracelulares en el equilibrio redox tiol-disulfuro, propio de los parásitos tripanosomátidos [117]. Las medidas fueron realizadas a través de medidas de citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular utilizada para el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas e incluso, otras características de interés que puedan ser detectadas a través del uso de biosensores (generalmente proteínas fluorescentes), como la diferenciación entre poblaciones celulares, detección de interacciones proteína-proteína o proteína-moléculas pequeñas, la unión de anticuerpos a sus targets o la detección de cambios en el equilibrio redox intracelular, entre otros [117–119]. Para esto, las células se suspenden en un fluido y se hacen pasar por un tubo transparente sobre el que incide un rayo de luz láser. La luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células llega a un detector y la información se procesa mediante softwares que permiten hacer inferencias en cuanto al tamaño y complejidad de las células (figura 2.6). En el caso de *T. brucei*, los parásitos vivos presentan mayor tamaño que los parásitos muertos [120].

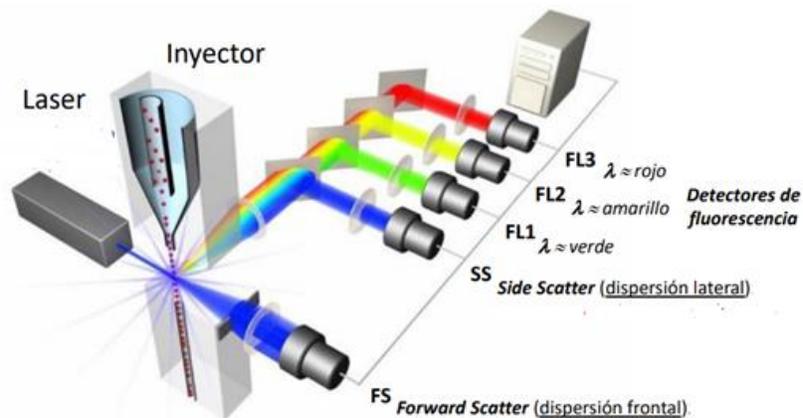


Figura 2.6: Esquema de una configuración típica de citómetro de flujo

Los parásitos se cultivaron aeróbicamente en medio HMI-9 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v), penicilina 10 U/mL, estreptomycin 10  $\mu\text{g/mL}$ , fleomicina 0,2  $\mu\text{g/mL}$  y higromicina 5  $\text{mg/mL}$  dentro de una incubadora humidificada a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se prepararon soluciones madre en DMSO para cada compuesto según su solubilidad. Para evaluar la viabilidad

celular, se sembraron 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de una suspensión celular que contenía  $5 \times 10^5$  parásitos/mL en fase de crecimiento exponencial en una placa de cultivo de 96 pocillos y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de cada compuesto a diferentes concentraciones al 100 % v/v en DMSO. Luego de 24 h de incubación, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo en U que contenía 200  $\mu\text{L}$  de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y glucosa al 1% (m/v) (pH 7,4). Se analizó la viabilidad del parásito a partir de muestras biológicas por triplicado, usando yoduro de propidio (PI, concentración final 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como colorante de exclusión y un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences) o CyAn™ADP (DakoCytomation) [117,120]. La concentración de DMSO en todas las condiciones probadas fue  $\leq 1\%$  (v/v). Se colocó el fármaco de referencia Nifurtimox en su valor  $\text{IC}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ . El control consistió en parásitos cultivados en medio con DMSO al 1 % (v/v). Se obtuvieron los valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentración de compuesto que inhibe el 50% del crecimiento) a partir de curvas de dosis-respuesta, ajustadas a una ecuación sigmoideal de Boltzmann (errores calculados mediante la propagación de errores) o extrapoladas a partir de gráficos de ajuste no lineal.

En el caso de los compuestos Ru-NN-L(X), la evaluación se realizó utilizando un ensayo bioluminiscente, donde se utiliza una línea celular de *T. brucei* (cepa 427) que expresa una luciferasa desplazada hacia el rojo (*T.b.* LUC) [121]. Se cultivaron los parásitos de igual forma que en el caso anteriormente descrito, con la diferencia de que la densidad celular fue  $1 \times 10^5$  parásitos/mL. La placa de cultivo fue precargada con 2,2  $\mu\text{L}$ /pocillo de DMSO al 100 % v/v (control negativo), el fármaco de referencia Nifurtimox (control positivo; concentración final a  $\text{IC}_{50}$ , 6  $\mu\text{M}$ ) y los compuestos a diferentes concentraciones. Después de la incubación a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 24 h, se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de cada pocillo a una placa negra de 96 pocillos que contenía una solución con D-Luciferina (1,5 mg/mL en glucosa PBS al 1 % p/v) y Tritón X-100 (0,05 % v/v). La señal de bioluminiscencia se midió a 37 °C durante 4 ciclos de 8 min en un luminómetro de microplacas LUMIstar OPTIMA. De igual forma, los compuestos y los controles se ensayaron por triplicado. Se determinaron los valores de  $\text{IC}_{50}$  a partir de curvas de concentración-respuesta utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 ajustado a ecuaciones sigmoideas.

2.3.1.2 Ensayos de actividad frente a *Leishmania infantum* (*L. infantum*)2.3.1.2.1 Actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. infantum*

Estos experimentos fueron realizados particularmente para los compuestos Ru-NN-L(X), por el Dr. Gonzalo Scalese en el Laboratorio de Interacciones Moleculares de Facultad de Ciencias, UdelaR, con el objetivo de determinar si esta familia de compuestos presentaba actividad frente a más de un tipo de tripanosomátido. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando *L. infantum* (MHOM MA67I7MAP263, línea celular cedida amablemente por el Dr. H. Castro y el Dr. A. Thomas, IBMC, Universidade do Porto, Portugal). Las formas promastigotes se obtuvieron de cultivos axénicos, se mantuvieron en medio de infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con FBS al 10 % e inactivado por calor, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomicina (100 mg/mL) a 28 °C y se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento.

Los compuestos se disolvieron inicialmente en DMSO a 12,5 mM. Las soluciones recién preparadas se diluyeron en el medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones ensayadas. A lo largo de los procedimientos experimentales, la concentración de DMSO no superó el 1 % [122]. Para determinar el valor de IC<sub>50</sub> se desarrolló una nueva técnica adaptando la reportada previamente para *Trypanosoma cruzi* [123]. Se sembraron 1 x 10<sup>7</sup> parásitos/pocillo en placas negras de 96 pocillos en medio BHI con concentración creciente de compuestos durante 24 h. La viabilidad se probó mediante el método REMA (Resazurin Microtiter Assay) [124]. Este método se basa en la reducción del indicador redox 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido, también conocido como resazurina, a resofurina, de color rosa y altamente fluorescente (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) (figura 2.7). Esta reducción se produce por la respiración aeróbica de células metabólicamente activas, por lo que es indicativa de viabilidad celular. La resofurina tiene un máximo de excitación a 530-570 nm y un máximo de emisión a 580-590 nm.

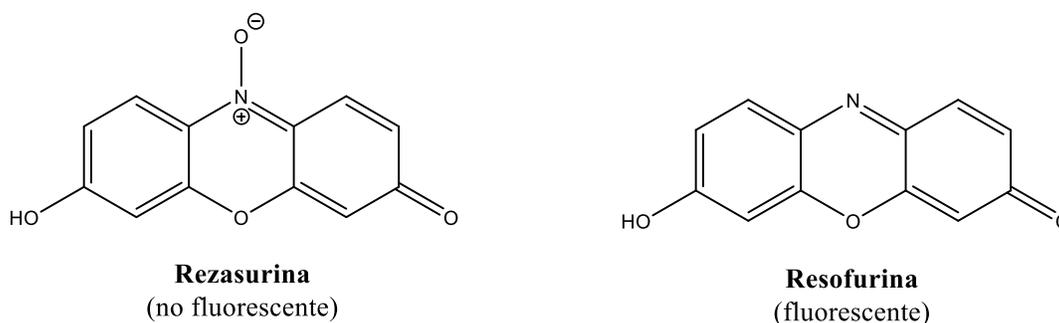


Figura 2.7: Estructura de la resazurina y de la resofurina.

Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de resazurina (10 mg/mL en PBS) a cada pocillo. Como control se incluyó soluciones con medio y solución de los compuestos en DMSO ( $\leq 1\%$  v/v). Se incubaron las placas negras durante 3 h a 28 °C y luego se midió la fluorescencia (excitación 530 nm/emisión 590 nm) en un fluorímetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. Se registraron las curvas de dosis-respuesta y se determinaron los valores de  $\text{IC}_{50}$  usando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows. Los resultados se presentan como promedios  $\pm$  SD (desviación estándar) de tres réplicas biológicas independientes.

#### 2.3.1.2.2 Actividad *in vitro* frente a amastigotes de *L. infantum*

Se cultivaron promastigotes de *L. infantum* (MHOM MA67I7MAP263), línea celular cedida por el Dr. H. Castro y el Dr. A. Thomas, IBMC, Universidade do Porto, Portugal) a 28 °C en RPMI 1640 Glutamax suplementado con 10 % (v/v) FBS, penicilina 10 U/mL, estreptomina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y HEPES-Na 25 mM pH 7,4. Se realizó la infección a macrófagos (línea celular J774) con parásitos que crecieron hasta la fase estacionaria. Brevemente, se sembraron macrófagos (0,5 mL/pocillo de una suspensión con  $1 \times 10^5$  células/mL) en una placa de 24 pocillos que contenía un cubreobjetos de vidrio en el fondo y se cultivaron durante 24 h en una atmósfera humidificada con 5 % de  $\text{CO}_2/95\%$  de aire a 37 °C en medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de FBS, 10 U/mL de penicilina y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina. Se añadieron dos millones de parásitos a los macrófagos (proporción de 40:1) y las placas se volvieron a incubar durante 24 h (2 h a temperatura ambiente y 22 h a 37 °C). Después de retirar el medio, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se añadieron a los pocillos compuestos diluidos en medio DMEM suplementado con FBS al 1 % (v/v), penicilina 10 U/mL y estreptomina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a diferentes concentraciones. Luego, se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h. Los controles positivos y negativos incluyeron células tratadas con fármacos de referencia añadidos en su correspondiente  $\text{IC}_{50}$  (anfotericina B a 0,27  $\mu\text{M}$  o antimonil tartrato de potasio trihidrato 15  $\mu\text{M}$ ) y DMSO al 1 % (v/v), respectivamente. Cada condición se probó al menos por duplicado. A continuación, se lavaron los cubreobjetos tres veces con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0), las células se fijaron con etanol durante 10 min y se montaron en portaobjetos de vidrio con medio fluoroshield™-DAPI para teñir los núcleos. Se determinó el número relativo de macrófagos infectados a partir del análisis de 200 células distribuidas en 4 a 5 campos, utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-

81 (filtro de emisión 420-460 nm). Para un screening inicial a una concentración fija se calculó el porcentaje de inhibición de la infección según:

$$\% \text{ Inhibición infección} = \frac{\% \text{ macrófagos no infectados (tratados con compuesto X)}}{\% \text{ macrófagos infectados (control)}} * 100$$

Posteriormente se expresaron los resultados finales como porcentaje de macrófagos infectados (% MI) por un compuesto X a la concentración Y de la siguiente manera:

$$\% MI = \frac{N \text{ macrófagos infectados tratados (compuesto X)}}{N \text{ macrófagos infectados (control)}} * 100$$

, donde:

N macrófagos infectados tratados (compuesto X) es el número relativo de macrófagos infectados tratados con el compuesto X a una concentración dada y N macrófagos infectados (control) es el número relativo de macrófagos infectados en el grupo control (con DMSO 1%) no tratado  $\times 100$ .

### 2.3.2 Ensayos de citotoxicidad en macrófagos murinos

Se cultivaron macrófagos de ratón de la línea celular J774 (ATCC® TIB-67™) en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>/95 % de aire a 37 °C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % (v/v) FBS, 10 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina. El protocolo experimental para la determinación de los valores de IC<sub>50</sub> fue esencialmente el mismo que para el caso de los ensayos de viabilidad frente a *T. brucei*, excepto que se agregaron 200 µL de una suspensión celular a  $6 \times 10^4$  células/mL por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos [106,125]. La citotoxicidad de los compuestos se evaluó al menos a cinco concentraciones diferentes (0,01–100 µM) por triplicado y utilizando el reactivo WST1 (Roche) (sal sódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2, 4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) (figura 2.8). El protocolo de ensayo WST-1 se basa en la escisión de la sal de tetrazolio WST-1 en formazán mediante deshidrogenasas mitocondriales celulares. Cuanto mayor es el número de células viables, mayor es la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y, a su vez, mayor es la cantidad de colorante formazán formado.

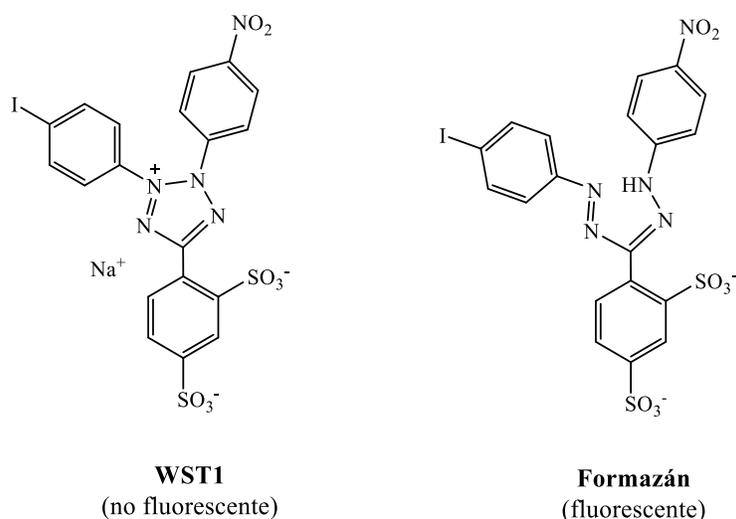


Figura 2.8: Estructura de la sal de tetrazolio WST-1 (sal sódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2, 4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) y su respectivo formazán.

El tratamiento de control incluyó células cultivadas en presencia de DMSO ( $\leq 1$  % v/v). Luego de 24 horas de incubación, se midió la absorbancia a 450 nm, correspondiente al colorante de formazán, con un lector de microplacas EL 800. Se obtuvieron los valores de  $IC_{50}$  a partir de las curvas de concentración-respuesta y los errores asociados se expresan como S.D.

### 2.3.3 Ensayos de viabilidad celular frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y células de pulmón humano MRC-5

#### 2.3.3.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima contra *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Se determinó la actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis* de los compuestos M-dppf-L, M= Pd(II) o Pt(II), HL= Htrop o Hhino en la cepa sensible de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ATCC 27294 mediante el método REMA descrito anteriormente [124]. Las determinaciones fueron realizadas por el Prof. Rogelio Pavan en la Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, Brasil.

Se prepararon soluciones madre en DMSO de los compuestos probados y se diluyeron en caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (enriquecimiento OADC - BBL/Becton-Dickinson), para obtener rangos de concentración final de

fármaco de 0,09 – 25 µg/mL. Se usó los fármacos de referencia isoniazida (INH) y rifampicina (RFP) como controles positivos. La INH se disolvió en agua destilada y la RFP en DMSO. Se cultivó una suspensión de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y Tween® 80 al 0,05 %. Después de dos días, se determinó la UFC/mL (unidad de formación de colonias/mL) de una alícuota. Las concentraciones se ajustaron en  $5 \times 10^5$  UFC/mL y se agregaron 100 µL del inóculo a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos junto con 100 µL de los compuestos. Se incubaron las placas durante 7 días a 37 °C. Se añadió 30 µL de resazurina 0,01% p/v en agua. Se leyó la fluorescencia de los pocillos a 530/590 nm a las 24 h con un equipo Cytation 3 (Biotek®). Los ensayos se realizaron por triplicado. La concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>90</sub>) se calculó a partir de una curva de calibración mediante análisis de regresión y se definió como la concentración más baja que da como resultado una inhibición del 90 % del crecimiento de *M. tuberculosis*.

#### 2.3.3.2 Actividad sobre aislados clínicos de *M. tuberculosis*

La actividad sobre aislados clínicos de *M. tuberculosis* se evaluó utilizando la técnica mencionada anteriormente. Los aislamientos clínicos se recolectaron en el Hospital Clemente Ferreira de la ciudad de São Paulo, Brasil, entre 2007 y 2009. El perfil epidemiológico de estas cepas clínicas, así como la resistencia a INH y RFP, se han descrito previamente [126,127].

#### 2.3.3.3 Citotoxicidad en células de pulmón humano MRC-5

La línea celular utilizada como modelo de células sanas fue la MRC-5 (línea celular de fibroblastos de pulmón humano ATCC, CCL-171). Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos en estas células de acuerdo con un procedimiento publicado [128]: se cultivaron las células en medio completo suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % más anfotericina B (2 mg/L) y gentamicina (50 mg/L) a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Para el ensayo de citotoxicidad, se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células/mL en una placa de cultivo celular de 96 pocillos con un volumen total de 100 µL y se incubaron por durante 24 h en las mismas condiciones. Posteriormente se trataron con compuestos en concentraciones que oscilaban entre 1 y 100 µM. Después de 24 h de incubación, se retiró el medio y se agregaron 50 µL de resazurina (0,01 % p/v) a cada pocillo y se incubaron las placas a 37 °C durante 3 h. Se midió la fluorescencia de los

pocillos en un lector de microplacas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) en el que se utilizaron filtros de excitación (530 nm) y emisión (590 nm). Se calcularon los valores de  $IC_{50}$  a partir de una curva de calibración mediante análisis de regresión. La doxorubicina y las células no tratadas constituyeron los controles positivo y negativo, respectivamente. Se realizaron tres ensayos independientes. Se calculó el índice de selectividad (SI) dividiendo los valores  $IC_{50}$  *M. tuberculosis* /  $MIC_{90}$  [129].

#### 2.3.4 Ensayos de citotoxicidad en células de cáncer de ovario y fibroblastos normales

Las determinaciones fueron realizadas por la Dra. Fernanda Marques del Centro de Ciencias e Tecnologías Nucleares, Instituto Superior Tecnico, Universidade de Lisboa, Portugal.

Se cultivaron las células de ovario A2780 (ECACC, 93112519) y A2780cisR (ECACC, 93112517) (Sigma-Aldrich) y fibroblastos de hámster chino no cancerosos V79 (ATCC CCL-93) en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco) complementado con FBS al 10 % (Gibco), en una atmósfera humidificada con 5 % de  $CO_2$ /95 % de aire a 37 °C. Para los ensayos se eliminó el medio, las células se lavaron con PBS y se recolectaron con tripsina-EDTA (Gibco) y luego se sembraron en placas de 96 pocillos. Se evaluó la citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) (figura 2.9), que se basa en la formación de formazán violeta por acción de la reductasa mitocondrial de células viables. Cuanto mayor sea la concentración de formazán, más intenso será el color, y por lo tanto, mayor será la viabilidad celular [130].

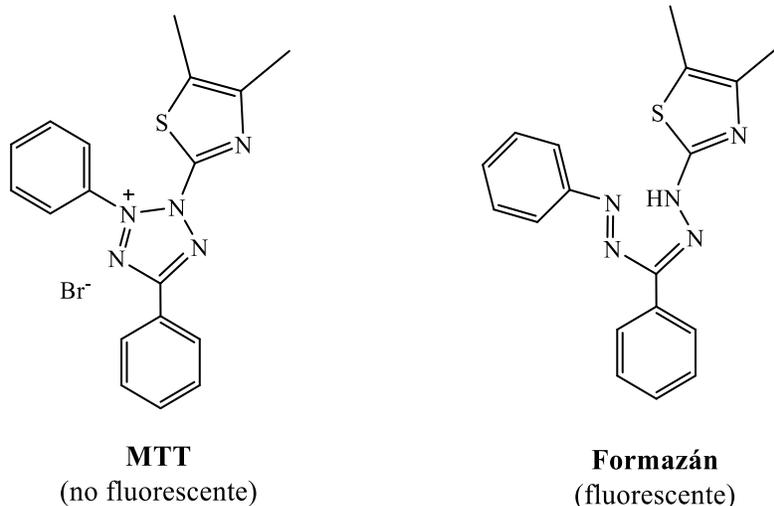


Figura 2.9: Estructura de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) y su respectivo formazán

Se incubaron las células ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) con los compuestos previamente solubilizados en DMSO y luego en medio en diluciones seriadas en el rango de 0,1–100  $\mu\text{M}$  durante 24 h a 37 °C. Al final del período de incubación, se retiraron los compuestos y las células se incubaron con 0,2 mL de solución de MTT (0,5 mg/mL de PBS). Después de 3 horas a 37 °C, se eliminó la solución y los cristales de formazán resultantes se disolvieron en 0,2 ml de DMSO. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia en cada pozo a 570 nm utilizando un espectrofotómetro de placa (Power Wave Xs, Bio-Tek). Cada ensayo se repitió al menos dos veces y cada concentración se probó en al menos seis repeticiones. Se calcularon los valores de  $\text{IC}_{50}$  a partir de curvas de dosis-respuesta usando el software GraphPad Prism (versión 5.0).

## 2.4 Lipofilia

La lipofilia es una propiedad fisicoquímica que afecta en gran medida el comportamiento biológico de un fármaco, particularmente el transporte transmembrana y la interacción con los receptores biológicos. Por lo tanto, la correlación de la lipofilia con la actividad biológica observada de un posible fármaco es un parámetro relevante [131].

Se determinó la lipofilia por experimentos de TLC (*Thin Layer Chromatography*) de fase reversa. Se realizaron en placas de TLC SIL RP-18 W/UV254 pre revestidas, que simulan lípidos de membranas biológicas o receptores. Se ajustó la composición de la fase móvil de modo que permitiera diferenciar complejos y ligandos libres según su lipofilia. Se utilizó la fase móvil MeOH:DMF:H<sub>2</sub>O (65:5:30 v/v/v), que simula el medio acuoso biológico. Se prepararon soluciones madre de los compuestos en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o DMSO antes de su uso. Se revelaron las placas en una cuba cromatográfica cerrada, se secaron y las manchas se detectaron bajo luz ultravioleta. Se reportaron los resultados como  $R_f$  (distancia recorrida por la muestra desde el origen/distancia recorrida por el eluyente desde el origen). Se promediaron de dos a tres determinaciones y se convirtieron a  $R_M$  a través de la relación:  $R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$  [132].

## 2.5 Mecanismo de acción

### 2.5.1 Interacción con ADN

#### 2.5.1.1 Interacción con ADN mediante estudios de fluorescencia

La técnica de estudio de la interacción entre el ADN y los complejos estudiados se basa en el desplazamiento del bromuro de etidio (EB) del aducto que se genera entre éste y el ADN ({ADN-EB}) en solución, y esto se registra mediante medidas de emisión de fluorescencia. Este desplazamiento se manifiesta generalmente como una disminución sucesiva en los valores de intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la concentración de complejo (o *quencher*), si existiese interacción de los complejos con el ADN. Bajo las condiciones de ensayo trabajadas, el EB posee una débil emisión fluorescente intrínseca con un máximo a 601 nm al excitarse a 510 nm. Cuando esta molécula interacciona con el ADN se produce un incremento del rendimiento cuántico de fluorescencia [133], provocando un intenso espectro de emisión del aducto {ADN-EB} con un máximo de emisión a 594 nm [71].

Los experimentos de unión competitiva a ADN (ADN de timo de ternero, ctDNA, SIGMA, Type I, No. D-1501) con Bromuro de Etidio (EB, SIGMA) se llevaron a cabo en buffer tris-HCl 10 mM a pH 7,4. Se utilizó agua Millipore® para la preparación de todas las soluciones acuosas. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en muestras individualmente preparadas. Debido a la baja solubilidad de los compuestos en medio acuoso, se utilizó DMSO para preparar soluciones stock concentradas, de las cuales se realizaron diluciones para obtener soluciones de los compuestos a las diferentes concentraciones deseadas, manteniendo la misma cantidad de DMSO en todas las muestras (5 % v/v). Se preparó la solución stock de ADN hidratando el ctDNA en buffer tris-HCl 10 mM (1 mg/mL,  $\sim 2 \text{ mM} \cdot \text{nuc}^{-1}$ ) mediante suave agitación por 3 días. Esta solución fue almacenada a 4 °C entre mediciones. La concentración de la solución de ADN fue determinada por medidas espectrofotométricas utilizando el coeficiente de absorción molar  $\epsilon$  (260 nm) =  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nuc}^{-1}$ . Se utilizó una solución de EB 5 mM en buffer tris-HCl. El ctDNA fue pre incubado con EB (en relación 2:1) a 4°C por un mínimo de 24 h antes de la ejecución del ensayo. Todas las muestras fueron preparadas con una concentración final de ADN  $20 \mu\text{M} \text{ nuc}^{-1}$  y EB  $10 \mu\text{M}$  y se varió la concentración de los complejos de 0 –  $110 \mu\text{M}$ . Se incubaron las muestras a 37 °C por 30 min. Como blanco se prepararon soluciones de complejo a  $110 \mu\text{M}$  en DMSO y

soluciones con complejo a 110  $\mu\text{M}$  y ADN a la misma concentración final que las muestras. Los espectros de fluorescencia fueron adquiridos desde 520 nm hasta 630 nm, a la longitud de onda de excitación de 510 nm en un espectrofluorímetro de placa Infinite M200 PRO, marca TECAN. Las medidas para la determinación de la concentración de ADN fueron realizadas en un espectrofotómetro UV Shimadzu UV-1603.

#### 2.5.1.2 Interacción con ADN mediante electroforesis en gel

Se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 con plásmido pBSK II. El ADN plasmídico se purificó mediante el método de lisis alcalina de acuerdo con técnicas estándar [134]. La cuantificación espectrofotométrica de ADN se llevó a cabo utilizando un Nanodrop. Se prepararon las soluciones madre de los complejos en DMSO a 10 mM y se diluyeron en tampón tris-HCl 10 mM pH 7,4. No se observó ningún efecto sobre el ADN debido a la adición de DMSO, incluso para concentraciones más altas que las utilizadas con fines de disolución. El plásmido de ADN purificado pBSK II BlueScript se incubó en presencia de los complejos durante 24 h a 37 °C (volumen final: 20  $\mu\text{L}$ ) en tampón TE: tris-HCl 10 mM, EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético) 0,1 mM; pH 7,4. Se ensayaron varias relaciones molares (ri = mol de complejo: mol de par de bases de ADN) y diferentes tiempos de incubación. Después de la incubación, las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (25 % de azul de bromofenol, 50 % de glicerol, EDTA 25 mM pH 8,0). Las muestras se sometieron a electroforesis en agarosa al 1,0% tamponada con TB (Tris-borato 90 mM) a 100 V durante 1 h. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 30 min y se decoloró en agua durante 20 min [135]. Se visualizó la movilidad relativa de las bandas bajo luz ultravioleta en un transiluminador CSLMicrodoc Cleaver y se analizó utilizando el software TotalLab 1D, con el que se determinó la abundancia relativa de las formas del ADN plasmídico.

#### 2.5.2 Estado tiol-redox intracelular de *T. brucei*

Los parásitos tripanosomátidos, al ser organismos aeróbicos al igual que los mamíferos, cuentan con un sistema antioxidante que puede actuar frente a especies reactivas del oxígeno (EROs) producidas por el metabolismo celular propio de los parásitos o por agentes externos del huésped. Las EROs pueden reaccionar con moléculas biológicas, provocando la oxidación irreversible de las mismas con graves consecuencias para sus funciones dentro de las células [136]. En los

parásitos tripanosomátidos, este sistema antioxidante está constituido por proteínas redox activas y tioles de bajo peso molecular, que equilibran perturbaciones del estado redox intracelular. Una especie de especial importancia es el tripanotión  $N^1, N^8$ -bis-(glutathionil)espermidina, un ditiol formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas covalentemente a una molécula de espermidina (figura 2.10). Al oxidarse por la acción de EROs, el tripanotión oxidado ( $T(S)_2$ ) regresa a su forma reducida ( $T(SH)_2$ ) gracias a la enzima tripanotión reductasa (TR), que es esencial para la viabilidad de *T. brucei* y que no está presente en mamíferos [137]. En el caso de los mamíferos, éstos cuentan con el par glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GSSG) y la enzima glutatión reductasa (GR), de la cual los parásitos carecen.

La interferencia de los compuestos con el equilibrio redox intracelular de los tripanosomas africanos como posible mecanismo de acción se investigó utilizando una línea celular de *T. brucei* que permite la expresión de un biosensor redox conocido como hGrx-roGFP2 [117,138].

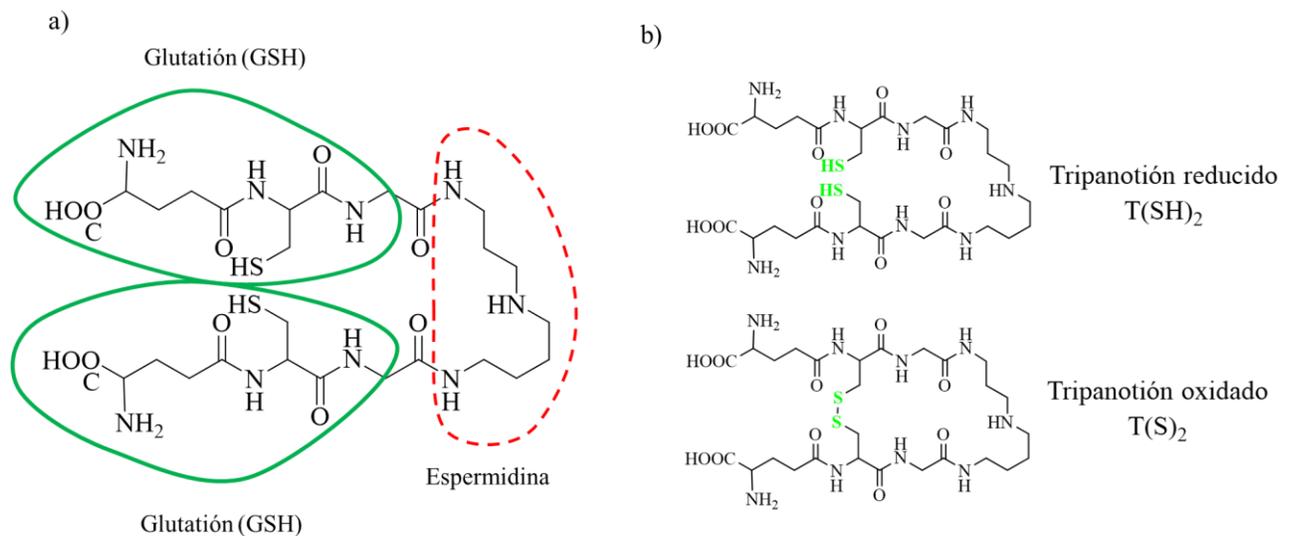


Figura 2.10: a) Estructura molecular del tripanotión b) tripanotión en su forma reducida  $T(SH)_2$  y en su forma oxidada  $T(S)_2$ .

El biosensor hGrx-roGFP2 está constituido por una proteína llamada glutarredoxina humana (hGrx) acoplada a una proteína verde fluorescente (roGFP2), que es sensible a cambios redox en el par redox GSH/GSSG. Estos cambios se ven reflejados en variaciones en la intensidad de fluorescencia del biosensor.

A nivel general, el mecanismo de funcionamiento del biosensor consta de tres etapas (figura 2.11). En la primera etapa, el glutatión disulfuro (GSSG) reacciona con una cisteína nucleofílica del sitio activo de hGrx, generando un disulfuro mixto (S-SG) y un glutatión reducido (GSH), que es liberado ((1), figura 2.11). Luego, el disulfuro mixto de hGrx (S-SG) es atacado por una de las cisteínas redox sensibles del biosensor roGFP2, generando la forma glutationilada del sensor y la forma reducida de hGrx ((2), figura 2.11). Finalmente se forma el disulfuro entre una de las cisteínas de roGFP2 y el glutatión por medio de la formación de un enlace disulfuro intramolecular de roGFP2, liberando así otro GSH ((3), figura 2.11). Este último paso genera un cambio en la relación de la intensidad de fluorescencia en la roGFP2 al ser excitada con una longitud de onda de 405 nm (biosensor oxidado) y 488 nm (biosensor reducido) [139].

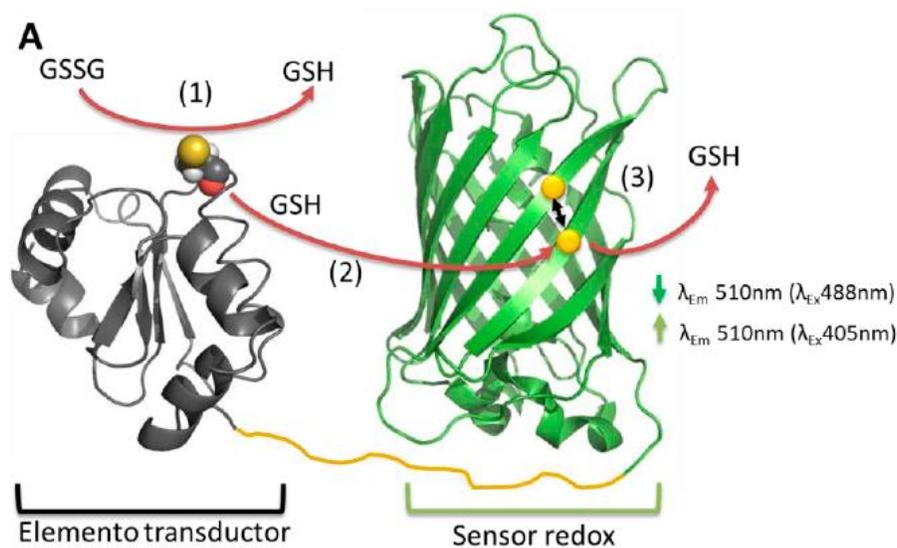


Figura 2.11: Esquema representativo del funcionamiento del biosensor redox hGrx-roGFP2 [139]

En este estudio, se analizó el estado redox del biosensor siguiendo la variación de la relación de intensidad de fluorescencia (IF,  $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ )  $\lambda_{ex} 488 \text{ nm}$ . Un aumento de esta relación sería indicativo de la oxidación del biosensor *in vitro*, causado probablemente por la capacidad oxidante de los complejos. Para esto, se expresó este biosensor redox en los parásitos, que crecieron hasta la fase exponencial en ausencia o presencia de  $1 \mu\text{g/mL}$  de oxitetraciclina. Se resuspendieron en medio fresco a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL y se distribuyeron en una placa de 96 pocillos ( $100 \mu\text{L/pocillo}$ ). Los compuestos se colocaron a concentraciones correspondientes a sus valores  $\text{IC}_{50}$  en presencia de parásitos inducidos con oxitetraciclina. Se agregó a su vez el oxidante

menadiona (125, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) y el vehículo solo (DMSO 1% v/v). Se incluyeron como control pocillos que contenían parásitos no inducidos y no tratados con compuestos o menadiona. Las placas de cultivo se incubaron durante 1 h y 3 h a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ , y luego se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de cada pocillo a una placa de fondo en U de 96 pocillos que contenía 100  $\mu\text{L}$  de PBS estéril con glucosa al 1 % (p/v). Para la menadiona y para los compuestos que redujeran la intensidad media de roGFP2, se incubó una segunda muestra con ditioneitol 1 mM (DTT, un agente reductor de la permeabilidad celular) durante 15 minutos antes del análisis mediante citometría de flujo. A todas las muestras se les añadió yoduro de propidio (PI) (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inmediatamente antes de la adquisición de datos con un citómetro de flujo C6Accuri (BD). La fluorescencia de GFP (filtro  $\lambda_{\text{em}} = 530/40 \text{ nm}$ ) se midió solo para células viables (PI negativo). Los datos fueron procesados y analizados con el software C6Accuri [117].

### 2.5.3 Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)

#### 2.5.3.1 Producción de EROs en *L. infantum*

Se evaluó la producción de EROs en *L. infantum* inducida por los compuestos adaptando un procedimiento previamente reportado para *Trypanosoma cruzi* que utiliza  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) (figura 2.12) [123]. Luego de la pérdida de los grupos acetato por acción de esterasas celulares y oxidación esta sonda no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es altamente fluorescente. Se incubaron promastigotes ( $1 \times 10^7$  parásitos/mL) durante 24 h con concentraciones correspondientes a  $1 \times$ ,  $5 \times$  y  $10 \times$  el valor  $\text{IC}_{50}$  calculado previamente. Después de este período de incubación, los parásitos se incubaron en 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (Thermo Fisher) en PBS durante 1 hora a 28 °C. Se usó  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) como control positivo. Los niveles de EROs se analizaron en un instrumento 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 llevaron a cabo tres experimentos independientes. La comparación de los parásitos tratados frente a los no tratados se realizó mediante la prueba ANOVA unidireccional, seguida de la prueba post hoc de Bonferroni utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows.

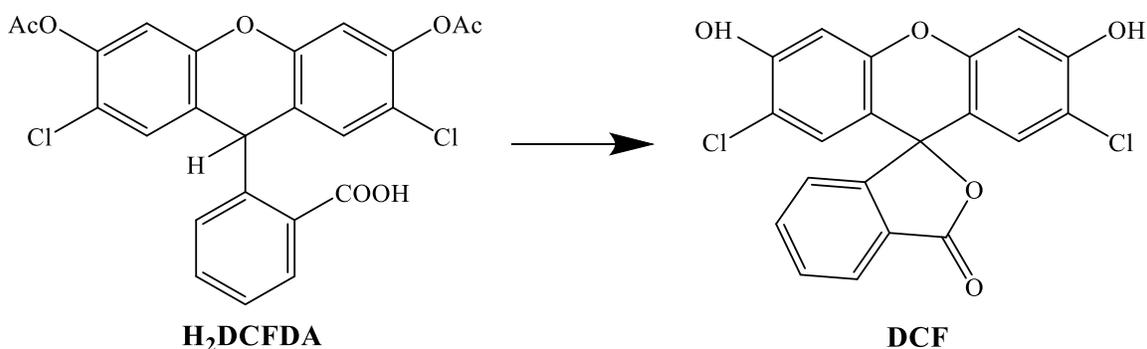


Figura 2.12: Estructura del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) y del 2',7'-diclorofluoresceína (DCF)

### 2.5.3.2 Niveles intracelulares de EROs en células de cáncer de ovario A2780

Los niveles intracelulares de EROs en células de cáncer de ovario A2780 se midieron utilizando la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA (figura 2.12). Se sembraron las células ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer durante la noche. Luego, el medio se reemplazó con una solución de H<sub>2</sub>DCFDA 10  $\mu$ M en medio incoloro Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) y las células se incubaron a 37 °C durante 30 min. Luego se retiró esta solución y las células se incubaron con complejos a 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M durante 1 y 3 h. Se midió la fluorescencia de la DCF generada utilizando un lector de placas Infinite 200 (Tecan) a una excitación de 492 nm y una emisión de 517 nm. Cada experimento se repitió dos veces y cada concentración se probó con al menos tres repeticiones. Los resultados (media  $\pm$  SD) se expresaron como unidades luminiscentes relativas (RLU).

## 2.6 Estudios de eficacia terapéutica del compuesto Pt-dppf-L4 en ratones

La línea celular de *T. b. brucei* que expresa una luciferasa desplazada hacia el rojo (*T. b. LUC*) se mantuvo en la fase de crecimiento exponencial y se probó la actividad de luciferasa, antes de ser recolectada para realizar los experimentos con animales, como se describió anteriormente [121]. Los procedimientos experimentales que se describen a continuación fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Institut Pasteur de Montevideo (Protocolo 011-18) y cumplieron con la Ley Nacional de Experimentación con Animales de Laboratorio (Ley no. 18.611) y los lineamientos internacionales FELASA para el uso de animales de laboratorio. El

estudio fue realizado por la Dra. Andrea Medeiros en conjunto con otros integrantes del grupo de investigación del grupo del Dr. Comini.

Se alojaron ratones hembra Balb/cJ (de 6 a 8 semanas de edad) en jaulas ventiladas individuales en un sistema aislado. Para establecer el régimen de dosificación del compuesto candidato Pt-dppf-L4 (también llamado PtL4), se probó previamente su toxicidad aguda en animales no infectados a los que se les administró diferentes concentraciones del compuesto diariamente vía intraperitoneal. Para los estudios de eficacia terapéutica, se infectaron tres ratones por grupo con una única inyección intraperitoneal de  $1 \times 10^3$  parásitos suspendidos en 0,3 mL de medio de cultivo fresco y se inició el tratamiento farmacológico 48 horas después. Se estudiaron los siguientes grupos: (A) tratamiento con PtL4 10,5 mg/kg/día durante 4 días, (B) tratamiento con una dosis única del fármaco diaceturato de diminazeno (DAC) a 40 mg/kg y (C) tratamiento con vehículo solo (DMSO) 2,75 g /kg/día durante 4 días. En diferentes tiempos después de la infección, a los animales se les inyectaron por vía intraperitoneal 200  $\mu$ L de D-luciferina (15 mg/mL en PBS), se anestesiaron con isoflurano al 2,5 % y se tomaron imágenes para bioluminiscencia usando un equipo In vivo Xtreme II (Bruker) y un ciclo de 30 s obturador encendido y 30 s obturador apagado para un total de 10 min. Las imágenes se analizaron con el software libre FIJI [140]. Para todos los ensayos descritos anteriormente, el estado de salud de los ratones se monitoreó diariamente y los animales por debajo del puntaje de corte saludable fueron sacrificados por razones éticas

## 2.7 Estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR)

Para este estudio se tomó en cuenta una serie de 22 compuestos estructuralmente relacionados  $[M^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ , donde M = Pd o Pt y HL = derivados de tropolona, de 8-hidroxiquinolinas o de tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano (figura 2.13), 14 de los cuales fueron sintetizados en el marco de este Trabajo de tesis y los restantes fueron desarrollados por el Dr. Esteban Rodríguez en el marco de su Tesis de Doctorado. Todos los compuestos seleccionados fueron evaluados frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei*, presentando actividad en el rango micromolar o submicromolar [104–106,141].

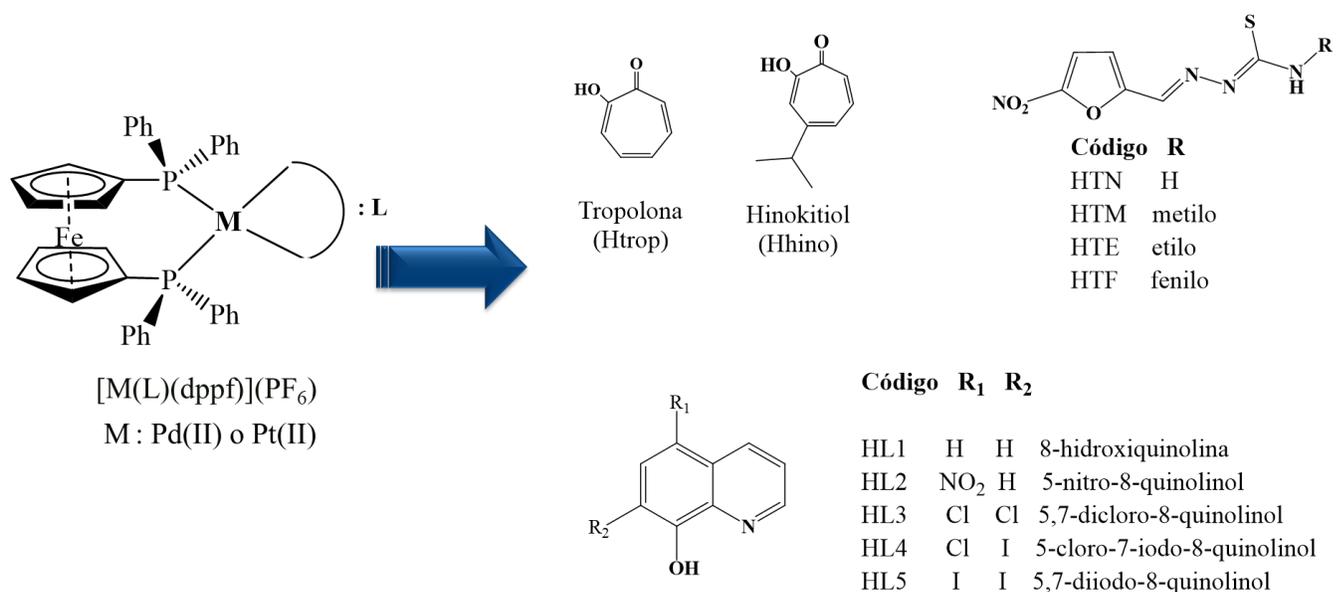


Figura 2.13: Estructura general de los 22 compuestos  $[M(L)(dppf)](PF_6)$  seleccionados para el estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).

En el estudio se tomaron en cuenta factores electrónicos, lipofílicos y la identidad del centro metálico de los compuestos. Debido a la diversidad de ligandos bioactivos utilizados, como único factor electrónico se tomó en cuenta el efecto de la coordinación de los ligandos sobre el desplazamiento de la señal asociada al protón Ha de los anillos ciclopentadienilo del dppf en espectros de  $^1H$ -RMN. Esta señal fue elegida por estar asociada a uno de los elementos estructurales comunes a todos los compuestos y por mostrar un notorio cambio entre los distintos compuestos (figura 2.14). Además, dada la presencia de distintos centros metálicos, se definió una variable indicadora que permitiera diferenciar los mismos, de forma de incluir todos los compuestos de la serie en una misma relación. Se definió como el descriptor categórico que toma valor 1 cuando Pd está presente o valor 0 cuando Pt está presente. La lipofilia de todos los compuestos fue determinada bajo las mismas condiciones por cromatografía de capa fina en fase reversa, como se describió anteriormente en el apartado 4 del presente capítulo.

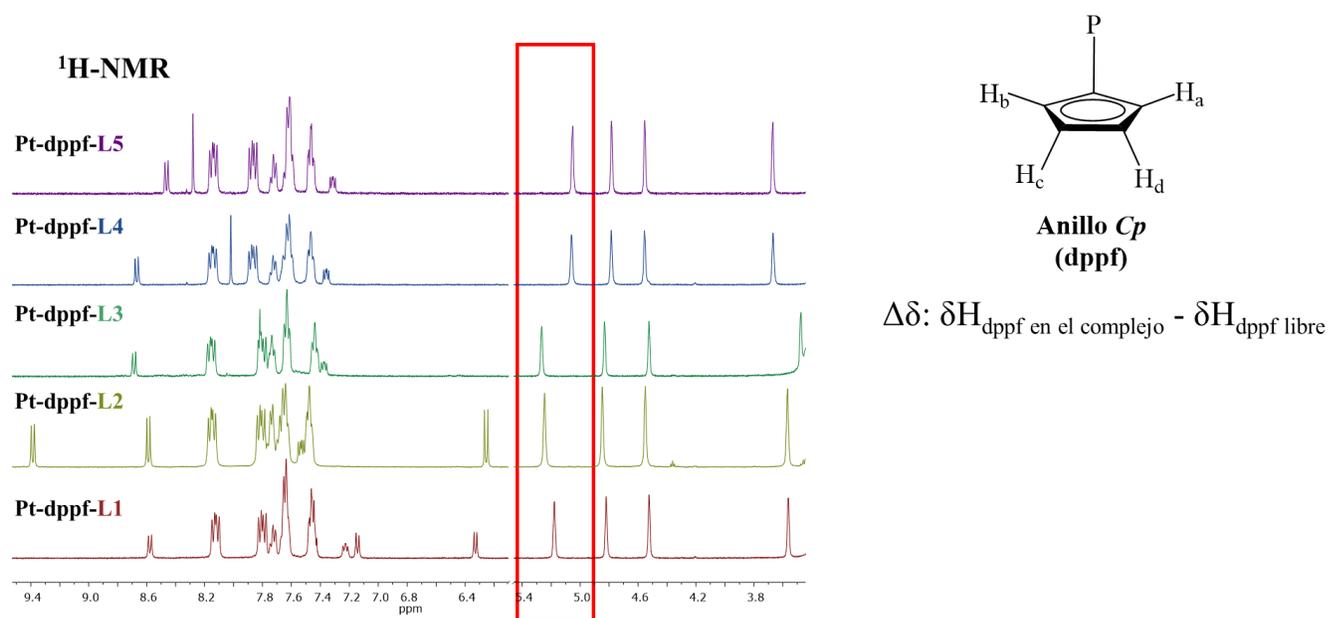


Figura 2.14: Variación de desplazamiento de la señal de Ha en espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (descriptor electrónico).

La variable dependiente fue el  $\log_{10}$  de los valores de  $\text{IC}_{50}$  frente a *T. brucei*,  $\log_{10}(\text{IC}_{50})$ . Las relaciones entre los descriptores seleccionados y las actividades fueron analizadas mediante el uso de regresiones lineales simples y múltiples. En las ecuaciones obtenidas, n representa el número de puntos de datos,  $R^2$  es el coeficiente de correlación ajustado, p es el valor estadístico p ( $p < 0,05$  indica que hay muy poca probabilidad de que no haya relación entre los descriptores y la actividad) y el valor F está relacionado con el análisis estadístico F (prueba de Fischer).

## 2.8 Encapsulación de compuestos hit en sistemas nanoestructurados

Como parte de la propuesta presentada en el capítulo anterior, se propuso el desarrollo de sistemas nanoestructurados encapsulantes con el objetivo de mejorar propiedades fisicoquímicas de importancia biológica de compuestos hit sintetizados, como la solubilidad y la biodisponibilidad, para posteriormente evaluar su efecto sobre la actividad biológica.

Para esto fueron seleccionados los compuestos  $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L4})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L5})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{Cl})$ , (códigos PtL4 y RuL5, respectivamente), cuya síntesis, caracterización y evaluación biológica se describe en los capítulos 4 y 5 del presente trabajo.

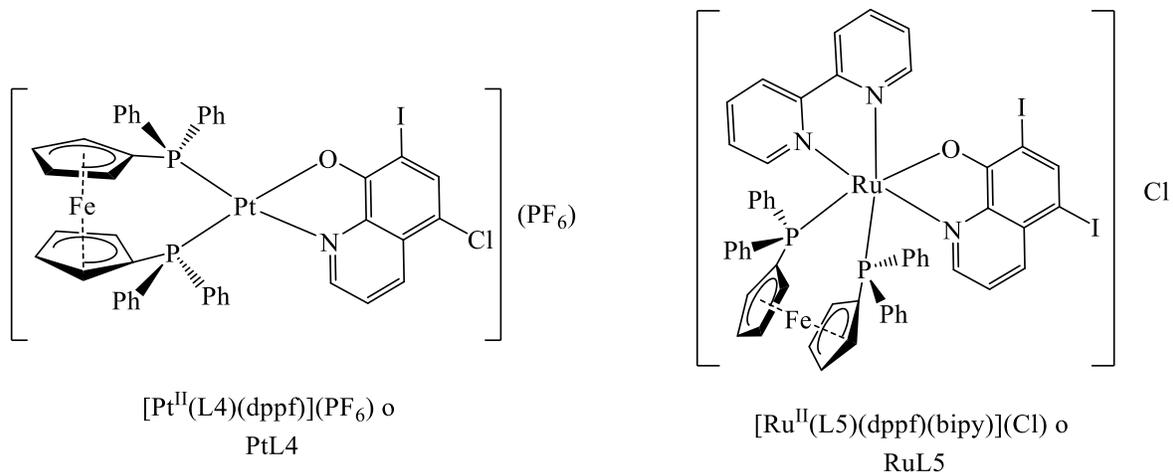


Figura 2.15: Estructura de los compuestos "hit", seleccionados para su encapsulación en sistemas nanométricos.

Se seleccionaron dos tipos de materiales para generar los nanosistemas: fosfolípidos para generar liposomas y el polímero sintético ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA) para generar matrices poliméricas. El desarrollo de los nanoliposomas se llevó a cabo en el Centro NanoMat, Facultad de Química, Instituto Polo Tecnológico de Pando bajo la tutoría de la Dra. Helena Pardo en el marco de una pasantía por créditos incluida como actividad del posgrado. Parte de los sistemas poliméricos se desarrollaron en el marco de una pasantía de 2 meses en el grupo Gnano del Instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo (IFSC-USP), Brasil, bajo de la tutoría del Dr. Valtencir Zucolotto. En función de lo aprendido durante esta instancia para PtL4, se desarrollaron sistemas poliméricos para el compuesto RuL5 en el Área de Química Inorgánica de Facultad de Química, UdelaR.

## 2.8.1 Nanosistemas liposomales

### 2.8.1.1 Síntesis

Para la síntesis de los liposomas se utilizó la técnica de hidratación de film lipídico (*Thin-film hydration*), una de las más utilizadas. En esta técnica los componentes lipídicos con o sin fármaco se disuelven en un disolvente orgánico que luego se evapora a vacío, para luego hidratar la película formada con un medio acuoso. De esta manera se forman espontáneamente vesículas multilamelares de gran tamaño (VMLs), cuyo tamaño puede reducirse por distintas técnicas y así obtener vesículas pequeñas en el orden de los 100 nm [142,143].

Para esto se utilizó como lípidos fosfatidilcolina de soja y colesterol en una relación 4:1 y como surfactante Tween® 80. Se disolvieron los lípidos en 60 mL de una mezcla CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1 agitando por 10 min. La solución formada se dividió en dos partes: a una se le agregaron 16 mg del compuesto (para generar liposomas cargados, LC-PtL4) y a la otra no (para generar liposomas vacíos, LV). Las soluciones se evaporaron a vacío a 40 °C por 1 hora. El film formado se hidrató con 50 mL de buffer PBS pH 7,4 agitando por 1 h (figura 2.16) [143]. Las suspensiones formadas se almacenaron a 4 °C durante la noche y posteriormente se separó el sobrenadante del exceso de lípidos por decantación. Para reducir el tamaño de las vesículas formadas, ambas suspensiones se sonicaron por 15 minutos usando dos técnicas distintas: baño de agua y con puntero de forma intermitente (40 % amplitud, 30 s ON/30 s OFF). Se almacenaron a 4 °C hasta su evaluación.

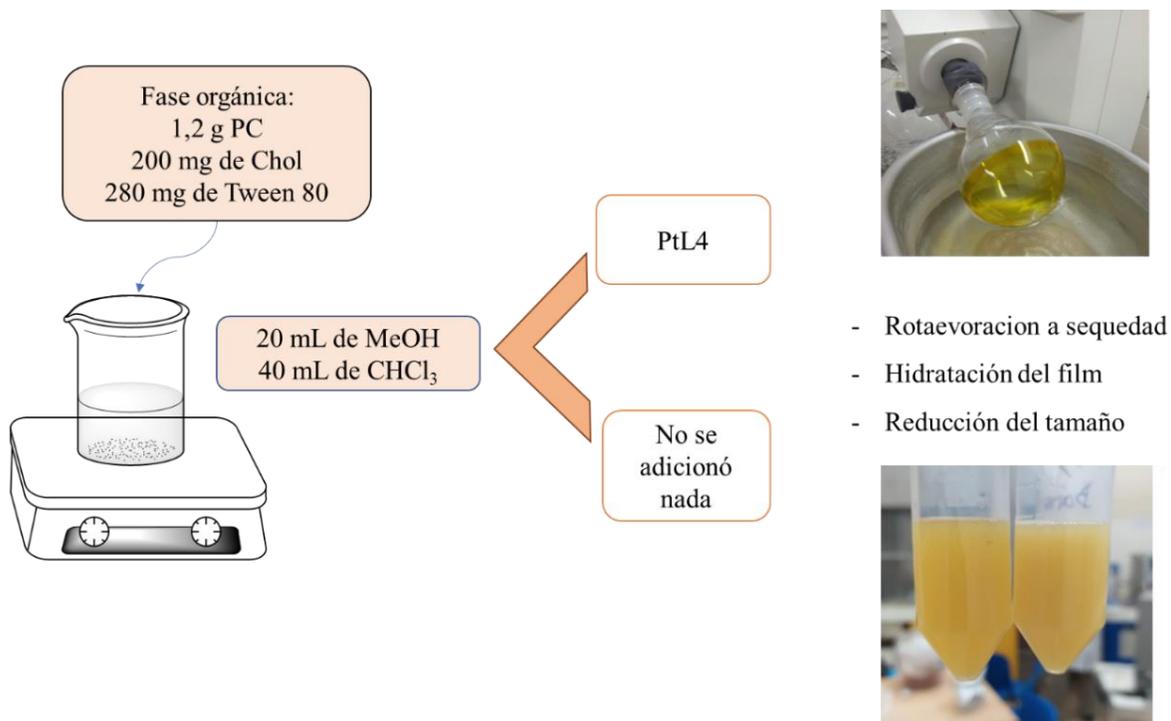


Figura 2.16: Esquema de síntesis de los liposomas (PC = fosfatidilcolina de soja, Chol = colesterol)

### 2.8.1.2 Medición del tamaño de las partículas (Dh), potencial zeta (ZP) e índice de polidispersidad (PDI) por DLS

La técnica conocida como Dispersión Dinámica de Luz o *Dynamic Light Scattering* (DLS) se basa en la dispersión de la luz provocada por el movimiento browniano de las partículas suspendidas en un medio continuo. Las mediciones de DLS fueron realizadas a 25 °C en un equipo Zetasizer

Nano-Zs, a un ángulo de dispersión de  $173^\circ$  y una posición fija de luz láser de 4,65 mm. Se realizaron medidas por triplicado. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (D.S.). Se determinaron diámetro hidrodinámico (Dh), índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z (ZP) tanto para liposomas cargados con compuesto como liposomas vacíos. Estas medidas se realizaron cada 24 horas por 3 días consecutivos.

### 2.8.1.3 Eficiencia de encapsulamiento (EE)

Para la determinación de la eficiencia de encapsulamiento se separaron los liposomas del medio de síntesis por centrifugación usando tubos AMICON 10 kDa, que cuentan con un filtro que solo permite el paso de partículas más pequeñas de 10 kDa (compuesto libre). Se usó 5 mL de la suspensión madre y se centrifugó a 4mil rpm x 10 min. En el sobrenadante se cuantificó Pt por absorción atómica; se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica (AA) Thermo Scientific modelo iCE 3500 con corrector de fondo Zeeman y lámpara de cátodo hueco a  $\lambda = 265,9$  nm. Se hizo una curva de calibración entre 1-250  $\mu\text{g Pt/L}$  utilizando como estándar una solución de  $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$  991,26 mg/L (figura 2.17).

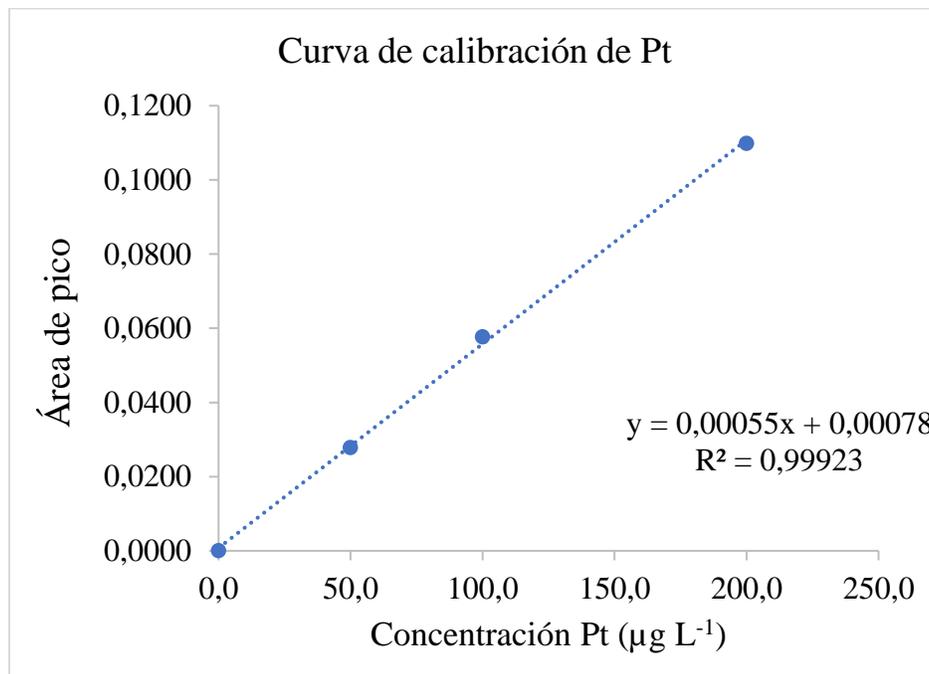


Figura 2.17: Curva de calibración de Pt obtenida por espectrometría de AA.

#### 2.8.1.4 Perfil de liberación

Para la determinación de perfil de liberación se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de suspensión LC-PtL4 en una membrana de diálisis de 2 kD previamente hidratada, que a su vez se sumergió en 80 mL de medio de cultivo HMI-9 (medio utilizado en los ensayos biológicos con *Trypanosoma brucei*). La membrana permite el paso de compuesto libre, pero no de los liposomas. El sistema se incubó a 37 °C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora Orbital shaker incubator ES-20, marca Biosan (figura 2.18). Se tomaron alícuotas de 1 mL/hora por un período de 48 h y luego cada día durante 11 días. El volumen de alícuota extraído se repuso con medio de cultivo fresco. Se determinó la cantidad de compuesto liberado al medio por espectrometría de absorción atómica de Pt utilizando la curva de calibración mencionada en el punto anterior. Este estudio se realizó por triplicado [144].



Figura 2.18: Muestras por triplicado incubadas en el Orbital shaker incubator ES-20, marca Biosan

#### 2.8.1.5 Evaluación biológica

La evaluación biológica de los liposomas frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* se realizó frente a las líneas celulares *T.b.*-GFP y *T.b.*-LUC, según se describió en el punto 2.3.1.1 del presente capítulo. Para esto se tomaron volúmenes de suspensión de liposomas de concentración equivalente al  $\text{IC}_{50}$ ,  $5 \times \text{IC}_{50}$  y  $1/5$  del  $\text{IC}_{50}$  del compuesto libre, se realizaron diluciones necesarias

y se sembraron 2  $\mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos con parásitos, teniendo en cuenta la eficiencia de encapsulación del sistema. Para los LV se colocó el mismo volumen que para los liposomas cargados con compuesto (LC-PtL4). Los controles consistieron en parásitos cultivados en medio con la misma cantidad de agua que la utilizada de las suspensiones de LV y LC-PtL4, para el caso del compuesto libre se usó como control parásitos con DMSO al 1 % (v/v). Los resultados se expresaron como % viabilidad  $\pm$  D.S., tomando como 100 % la viabilidad de los parásitos control.

## 2.8.2 Nanosistemas poliméricos basados en ácido poli(láctico-glicólico) o PLGA

### 2.8.2.1 Nanosistemas para el compuesto PtL4

La síntesis de estos nanosistemas se llevó a cabo usando el método de nanoprecipitación, que consiste en disolver el compuesto bioactivo y el polímero encapsulante en un solvente miscible con agua, para posteriormente añadir mediante goteo a una solución acuosa de tensioactivos. De esta manera se generan espontáneamente nanopartículas [145].

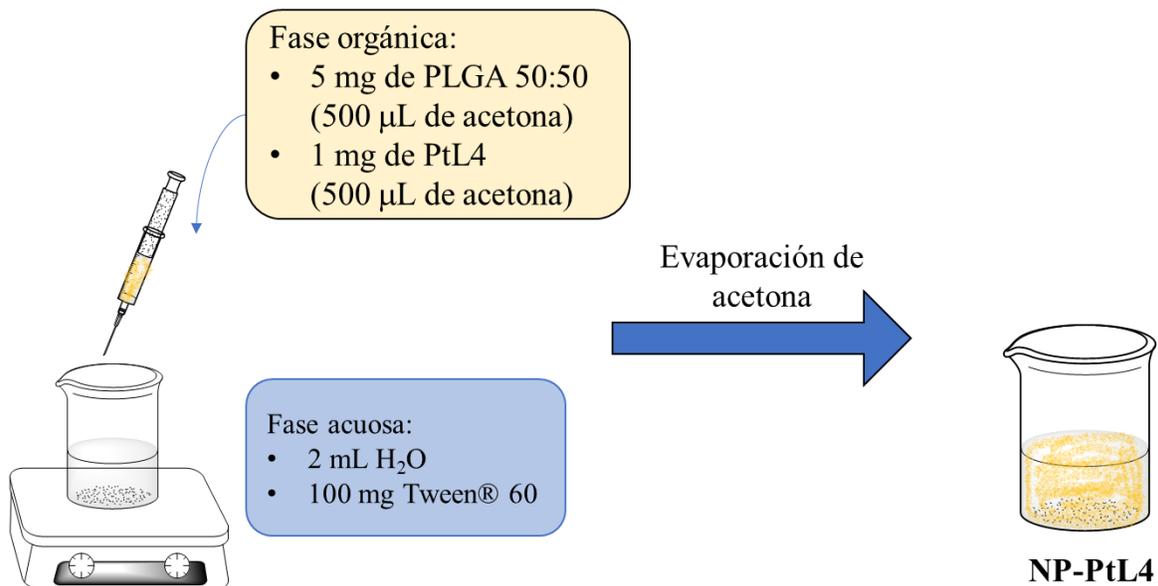


Figura 2.19: Esquema de síntesis de las nanopartículas poliméricas con PtL4

Se disolvieron 5 mg de PLGA 50:50 (Resomer® RG 503H, terminado en ácido, peso molecular 24,000-38,000) y 1 mg de PtL4 en 500  $\mu\text{L}$  de acetona cada uno. La mezcla de ambas soluciones se agregó gota a gota en 2 ml de agua miliQ conteniendo 100 mg de Tween®60 previamente

solubilizado, con agitación moderada a temperatura ambiente. La acetona se removió por evaporación bajo campana. Se obtuvo una suspensión de color amarillo (figura 2.19).

#### 2.8.2.1.1 Medición del tamaño hidrodinámico (Dh), potencial zeta (ZP) e índice de polidispersión (PDI) por DLS

Las mediciones fueron realizadas a 25 °C, en un equipo de dispersión dinámica de luz láser Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, provisto de un láser He-Ne (633 nm). Se realizaron tres experimentos distintos con cada muestra y los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (D.E.). Se determinaron Dh, PDI y ZP para NPs cargadas con PtL4 (NP-PtL4) y vacías (NPv). Adicionalmente, se midieron dichos parámetros periódicamente por un período de 110 días para evaluar la estabilidad de las suspensiones.

#### 2.8.2.1.2 Medición del tamaño de las partículas por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Una técnica complementaria de determinación de tamaño de partícula de mayor precisión es el análisis de seguimiento de nanopartículas o *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Consiste en el seguimiento en tiempo real del movimiento browniano de nanopartículas en suspensión a través de un software capaz de monitorear muchas partículas de forma individual y simultánea, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein para calcular sus diámetros hidrodinámicos. Esta técnica proporciona medidas de alta resolución de tamaño de nanopartículas y determina la concentración de partículas basada en recuento [146]. Las mediciones fueron realizadas a 26,0 °C en un equipo Nanosight NS300 (Malvern Instruments, UK) provisto de un láser verde (633 nm). Se realizaron tres experimentos distintos con cada muestra y los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (D.E.). Se determinaron Dh y concentración de partículas cargadas con PtL4 por mL de solución.

#### 2.8.2.1.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FEG-SEM) en NPv y NP-PtL4 para analizar el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Las muestras se diluyeron (1:100 v/v), se colocaron 5  $\mu$ L en un soporte de silicio (limpiado previamente con un limpiador de plasma Tergeo Plasma Cleaner, marca PIE Scientific), y se dejaron secar a temperatura ambiente en un desecador durante 24 h. Posteriormente se tomaron fotomicrografías con diferentes aumentos (SEM ZEISS Gemini). Las imágenes se analizaron con el software SmartSEM.

#### 2.8.2.1.4 Determinación de la eficiencia de encapsulamiento (EE)

Para el cálculo de la eficiencia de encapsulamiento se determinó la cantidad de compuesto no encapsulado que permaneció en solución luego de separar las nanopartículas por centrifugación. Para la separación se tomó 1 mL de suspensión y se centrifugó a 12,000 rpm x 10 min en una centrífuga marca eppendorf, modelo 5804 R. Se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro UV-Vis marca Hitachi, modelo U-2900. Se preparó una curva de calibración del compuesto PtL4 ( $\lambda_{\text{máx}} = 441 \text{ nm}$ ) en acetona/agua con un rango lineal entre 0,010 – 0,3 mg PtL4/mL (figura 2.20) y mediante la curva de calibración se determinó la cantidad de compuesto no encapsulado según la relación:

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{mg PtL4 iniciales} - \text{mg PtL4 no encapsulados}}{\text{mg PtL4 iniciales}} \times 100$$

Como blanco se utilizó una mezcla acetona/agua en la misma proporción. El estudio se hizo por triplicado.

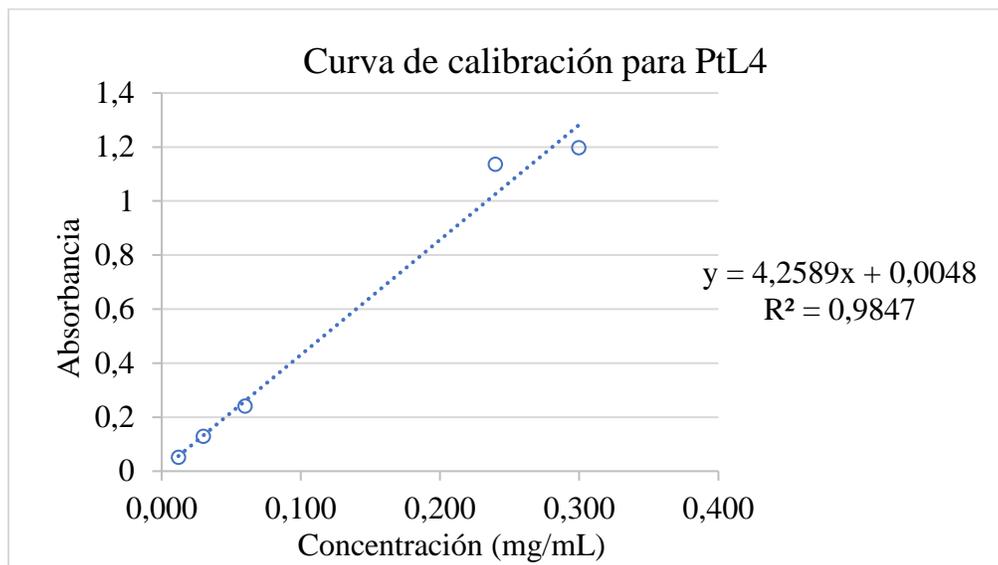


Figura 2.20: Curva de calibración de PtL4 en acetona/agua

#### 2.8.2.1.5 Perfil de liberación

Para la determinación del perfil de liberación se realizaron una serie de estudios previos que incluyen pruebas de solubilidad y el estudio de la estabilidad del compuesto en el medio de liberación seleccionado.

2.8.2.1.5.1 Pruebas de solubilidad en PBS pH 7,4 + LSS 0,1 – 0,5 % m/v

Se seleccionó como medio de liberación buffer PBS pH 7,4, ya que simula condiciones fisiológicas. Posteriormente se realizaron pruebas de solubilidad del compuesto en buffer PBS pH 7,4 (1 mg PtL4/mL) con porcentajes m/v de lauril sulfato de sodio (LSS) comprendidos entre 0,1 – 0,75 % m/v. Las pruebas se realizaron a 37 °C y con agitación constante por un período de 24 horas. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm x 10 min, se midió la absorbancia del sobrenadante y se calculó la cantidad de compuesto disuelto usando la curva de calibración de la figura 2.20.

2.8.2.1.5.2 Determinación de la estabilidad en PBS pH 7,4 + LSS 0,5 % m/v

Se preparó una solución 0,06 mg PtL4/mL de PBS con LSS 0,5 % m/v. Se realizaron barridos entre 300 – 700 nm en un espectrofotómetro marca Hitachi, modelo U-2900. a 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h para evaluar la estabilidad del compuesto PtL4 en el medio.

2.8.2.1.5.3 Curva de calibración del compuesto PtL4 en PBS pH 7,4 + LSS 0,5 % m/v

Se preparó una curva de calibración del compuesto PtL4 ( $\lambda_{\text{máx}} = 441 \text{ nm}$ ) en el medio de liberación seleccionado, con un rango lineal entre 0,01 – 0,24 mg PtL4/mL (figura 2.21).

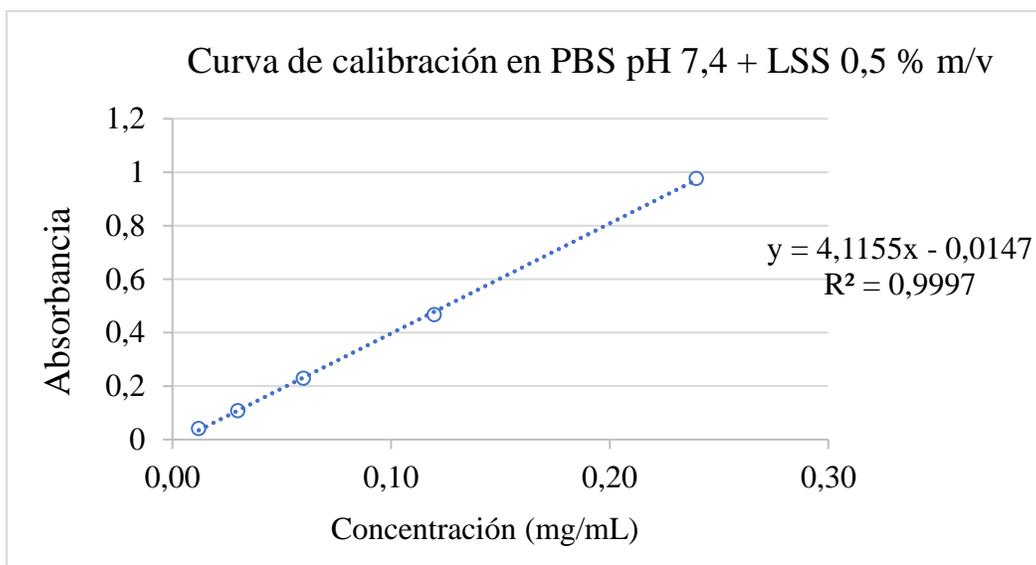


Figura 2.21: Curva de calibración del compuesto PtL4 en medio PBS pH 7,4 + LSS 0,5%

#### 2.8.2.1.5.4 Determinación del perfil de liberación

Se tomaron 50  $\mu$ L de la suspensión NP-PtL4 y se llevaron a 1 mL con el medio de liberación seleccionado. Se prepararon muestras por triplicado para distintos intervalos de tiempo: 5 min, 10 min, 15min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h y se incubaron a 37 °C y con agitación constante. Al finalizar el tiempo, se centrifugaron las nanopartículas (12,000 rpm x 10 min) y se cuantificó la cantidad de compuesto liberada en el sobrenadante. Se determinó la cantidad de compuesto liberado a través de la curva de calibración mostrada en la figura 2.21. De igual forma se colocó 50  $\mu$ L de una solución de PtL5 en acetona en una cantidad equivalente a la de la suspensión NP-PtL4. Como blanco se utilizó la suspensión de nanopartículas vacías en cantidad equivalente.

#### 2.8.2.1.6 Evaluación biológica

Las suspensiones de NPv y NP-PtL4 se evaluaron frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei*-LUC y frente a macrófagos murinos, como se describió en los apartados 2.3.1.1 y 2.3.2 del presente capítulo. Los resultados se expresaron como % viabilidad  $\pm$  D.S., tomando como 100 % la viabilidad de los parásitos con control.

### 2.8.2.2 Nanosistemas para el compuesto RuL5

#### 2.8.2.2.1 Síntesis

Para la síntesis de estos nanosistemas se utilizó el método de nanoprecipitación [145]; se prepararon soluciones de 1 mg de RuL5 y 5 mg de polímero PLGA 75:25 (Resomer® RG 752H, terminado en ácido, peso molecular 4,000-15,000) en 500  $\mu$ L de acetona y se mezclaron. Se disolvieron 100 mg de Tween 80® en 2 mL de agua miliQ y sobre esta solución se agregó gota a gota, con agitación constante, la solución del complejo y PLGA. La acetona se removió por evaporación bajo campana (30-40 minutos), obteniéndose una suspensión anaranjada (RuL5-NP-crudo). Posteriormente las nanopartículas se separaron del medio de síntesis y del compuesto no encapsulado por centrifugación con tubos AMICON 100,000 MWCO a 4000-5000 rpm durante 30 minutos. Las nanopartículas se resuspendieron en un volumen total de 2 mL de agua miliQ (figura 2.22). Se sintetizaron nanopartículas blanco de forma análoga, sin el agregado de RuL5 (PLGA-NP). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

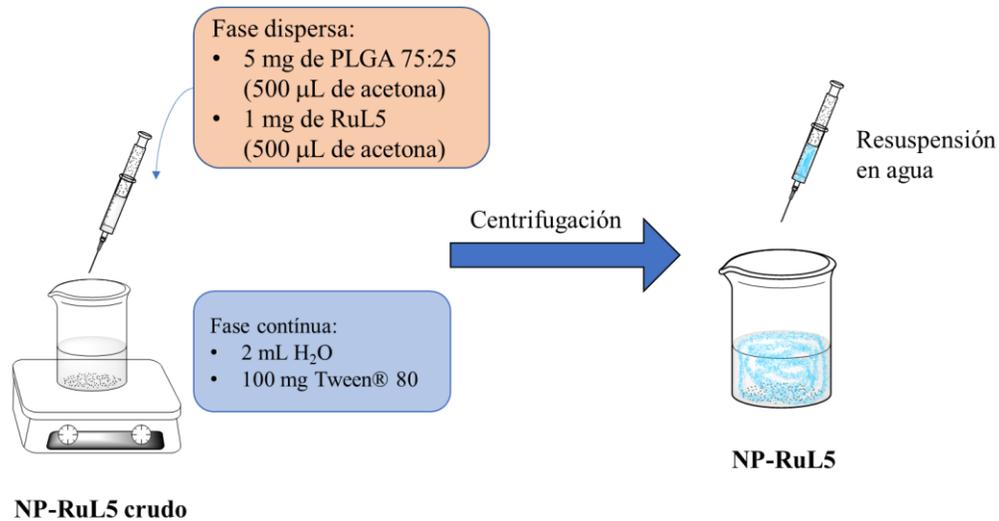


Figura 2.22: Esquema de síntesis de los sistemas NP-RuL5

#### 2.8.2.2.2 Tamaño de partícula y estabilidad

El tamaño de partícula se determinó por DLS utilizando un equipo Nanoptics 90 - Particle Size Analyzer, marca Bettersize, provisto de un láser (635 nm) a un ángulo de dispersión de 90 °. Las mediciones fueron realizadas a 30 °C. Se realizaron experimentos por triplicado y los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (D.S.). Se determinaron Dh y PDI para nanopartículas cargadas con RuL5 antes de separar del medio de síntesis (NP-RuL5 crudo), nanopartículas cargadas con RuL5 después de separar del medio (NP-RuL5) y nanopartículas vacías (NPv). Adicionalmente, se midieron dichos parámetros periódicamente por un período de 3 semanas para evaluar la estabilidad de las suspensiones en función del tiempo.

#### 2.8.2.2.3 Eficiencia de encapsulamiento (EE)

La EE se determinó por cuantificación del compuesto no encapsulado a través de espectrofotometría UV-Vis. Para la separación de las nanopartículas de la solución de compuesto no encapsulado, se centrifugó la suspensión RuL5-NP-crudo obtenida en tubo AMICON 100,000 MWCO a 4000-5000 rpm durante 30 minutos. Se midió la absorbancia de la solución a 470 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  RuL5). La eficiencia del encapsulamiento se determinó mediante la fórmula:

$$EE(\%) = \frac{m_{RuL5} - Conc. * V}{m_{RuL5}} \times 100$$

Donde  $m_{RuL5}$  es la masa de RuL5 pesada, Conc. es la concentración medida por UV, V el volumen al que se llevó el filtrado.

#### 2.8.2.2.4 Perfil de liberación

##### 2.8.2.2.4.1 Solubilidad de RuL5 en PBS

Previó a los estudios de liberación de RuL5 se determinó la solubilidad del compuesto libre en medio PBS (medio de liberación) con concentraciones entre 0,25 – 1,00 % LSS (m/v). Se prepararon soluciones de 1 mL y se suspendió 1 mg de RuL5 en cada una. Se colocaron en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante durante 24 hs. Se centrifugaron 5 minutos a 12500 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante. Se prepararon blancos de igual forma sin la presencia de compuesto.

##### 2.8.2.2.4.2 Estabilidad en PBS + LSS 0,75 % m/v

Se disolvieron 1,865 mg de RuL5 en 25,00 mL de PBS con 0,75 % LSS m/v (~0,075 mg/mL). Se colocó en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante durante tiempos de hasta 72 h. Se realizaron medidas de absorbancias a varios tiempos. Se prepararon muestras por triplicado y blancos de igual forma sin la presencia de compuesto.

##### 2.8.2.2.4.3 Determinación del perfil de liberación

Se prepararon diez tubos con 200  $\mu$ L de PLGA-RuL5-NP y se agregaron 800  $\mu$ L de solución PBS con LSS 0,75 %v m/v, los cuales se colocaron en un baño termostatzado a 37°C con agitación constante durante tiempos de hasta 72 h. Se centrifugaron las muestras en un filtro 100,000 MWCO a 4000-5000 rpm durante 2 minutos, se determinó la absorbancia a 470 nm del filtrado a todos los tiempos. El material retenido en el filtro a tiempos de 1 h y 72 h, fue suspendido en 2 mL de agua miliQ y se midió el tamaño de partícula por DLS. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

#### 2.8.2.2.5 Evaluación biológica

Las suspensiones de NPv y NP-RuL5 se evaluaron inicialmente frente a macrófagos murinos y luego frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei*-LUC, como se describió en los apartados 2.3.1.1 y 2.3.2 del presente capítulo.

Capítulo 3:  
Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados  
de la tropolona

### 3.1 Introducción

Este capítulo trata sobre el desarrollo de un grupo de cuatro nuevos compuestos heterobimetálicos de Pd(II)-Fe y Pt(II)-Fe que contienen el derivado de ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf) y los ligandos bioactivos (HL) tropolona (Htrop) e hinokitiol (Hhino), cuya fórmula general es  $[M^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y que de forma resumida se identificarán de aquí en adelante como M-dppf-trop o M-dppf-hino, según corresponda (figura 3.1). En este apartado se expone la síntesis y caracterización en estado sólido y en solución de estos compuestos, así como la evaluación de propiedades fisicoquímicas de interés biológico (lipofilia y estabilidad en solución), la evaluación *in vitro* sobre la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), sobre la forma amastigote de *Leishmania infantum*, sobre cepas sensibles y resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y sobre macrófagos murinos y células de pulmón humano MRC-5 como modelos de células de mamífero, según correspondiera. Adicionalmente, se expone el estudio de la interacción de los compuestos sintetizados con ADN y la potencial interferencia con el equilibrio redox intracelular de *T. brucei* como posibles mecanismos de acción.

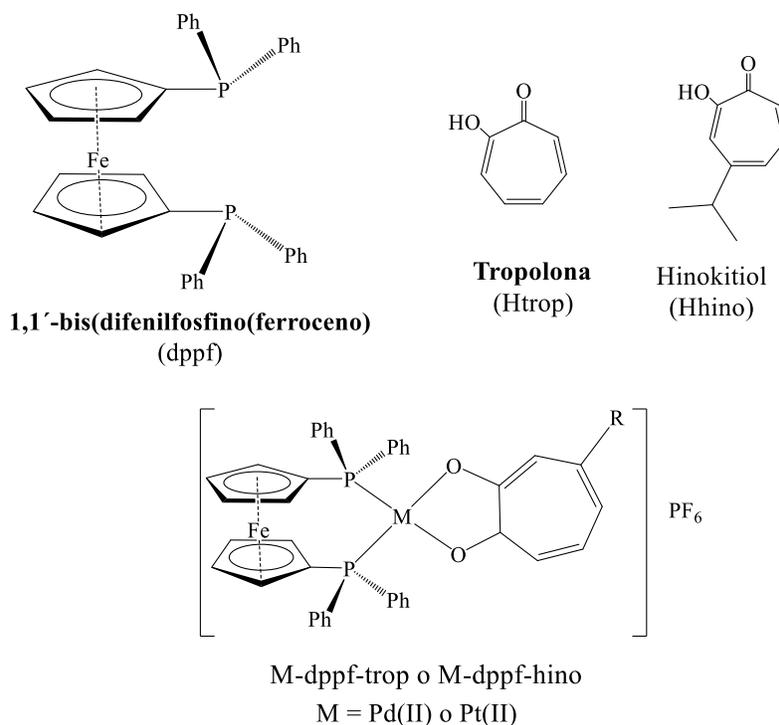


Figura 3.1: Estructuras de 1,1'-bis(difenilfosfino) ferroceno (dppf), tropolona (Htrop), hinokitiol (Hhino) y la estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados M-dppf-trop y M-dppf-hino, donde M = Pd(II) o Pt(II).

## 3.2 Síntesis de compuestos M-dppf-L (M = Pd o Pt, HL = tropolona (Htrop) o hinokitiol (Hhino)).

Los complejos de Pd(II) y Pt(II) con los ligandos tropolona (Htrop) e hinokitiol (Hhino) fueron sintetizados según lo indicado en el capítulo 2. El método de síntesis está basado en la reacción del respectivo precursor  $[M^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$  (M = Pd o Pt) y la sal sódica de los ligandos (Natrop o Nahino), en los que los átomos de oxígeno están disponibles para la coordinación al centro metálico. En esta síntesis ocurre la sustitución de los ligandos cloruro del precursor, que es un buen grupo saliente, por los ligandos bidentados correspondientes. Los sólidos obtenidos en la síntesis fueron recristalizados mediante difusión lenta líquido-líquido  $CH_2Cl_2$ /hexano, obteniéndose cristales de color rojo para los compuestos de Pd(II) (Pd-dppf-trop, rendimiento = 49 % (27 mg); Pd-dppf-hino, rendimiento = 44 % (25 mg)) y cristales de color amarillo para los compuestos de Pt(II) (Pt-dppf-trop, rendimiento = 41 % (22 mg); Pt-dppf-hino, rendimiento = 35 % (25 mg)).

## 3.3 Caracterización

### 3.3.1 Caracterización en estado sólido

#### 3.3.1.1 Análisis elemental

Mediante análisis elemental de elementos livianos se obtuvo la composición porcentual experimental de C, N, S y H de las muestras recristalizadas, y se comparó con los valores calculados para cada complejo a partir de la fórmula propuesta. Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla 3.1 confirmaron la fórmula propuesta para cada complejo, asegurando a su vez la ausencia de S en las muestras, que podría provenir de sus respectivos precursores  $[MCl_2(DMSO)_2]$ .

Tabla 3.1: Resultados del análisis elemental de C y H de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino.

Complejo	%C <sub>exp</sub> (%C <sub>teórico</sub> )	%H <sub>exp</sub> (%H <sub>teórico</sub> )
Pd-dppf-trop	52,93 (53,13)	3,57 (3,59)
Pt-dppf-trop	48,51 (48,49)	3,19 (3,28)
Pd-dppf-hino	54,26 (54,56)	3,98 (4,03)
Pt-dppf-hino	49,86 (49,98)	3,74 (3,69)

Los valores de % S fueron 0,00 en todos los casos

### 3.3.1.2 Espectroscopía infrarroja

Tal como se indicó en el capítulo 2, la espectroscopía infrarroja fue utilizada para identificar algunas de las bandas de vibración características de grupos funcionales de los ligandos y para asignar de forma tentativa dichas bandas en los espectros de los complejos obtenidos. En la figura 3.2 se muestran de forma ilustrativa los espectros de infrarrojo obtenidos para los compuestos M-dppf-hino, donde se evidencia un perfil espectral similar para los compuestos con el mismo ligando. Se obtuvo también perfiles espectrales similares para los compuestos M-dppf-trop.

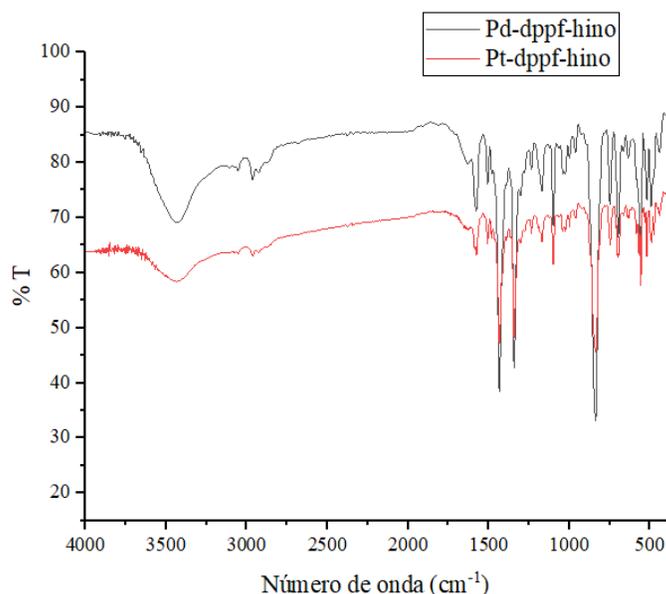


Figura 3.2: Espectro de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-hino (línea negra) y Pt-dppf-hino (línea roja) en el rango entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

Los precursores  $[MCl_2(dppf)]$  utilizados para la síntesis de estos compuestos poseen cinco bandas características correspondientes al ligando dppf: 1480 y 1434 ( $\nu(C=C)$ ), 1098 ( $\nu(C-P)$ ), 690 ( $\delta_{oop}(C-H)$ ) y 490  $cm^{-1}$  ( $\nu(Cp-Fe)$ ) [147]. En los espectros de todos los compuestos se identificaron estas cinco bandas de vibración (figura 3.3). Sin embargo, no se observaron grandes variaciones en los valores de frecuencia de éstas, ya que los enlaces de los anillos fosfínicos ( $PPh_2$ ) no se ven apreciablemente afectados por la coordinación debido a su lejanía al sitio de enlace. Todos los compuestos cuentan con el anión hexafluorofosfato ( $PF_6^-$ ) como contraión, el cual presenta vibraciones características alrededor de 835  $cm^{-1}$  ( $\nu_{as}(P-F)$ ) y 559  $cm^{-1}$  ( $\delta(F-P-F)$ ) [148], cuyas bandas fueron observadas en todos los espectros.

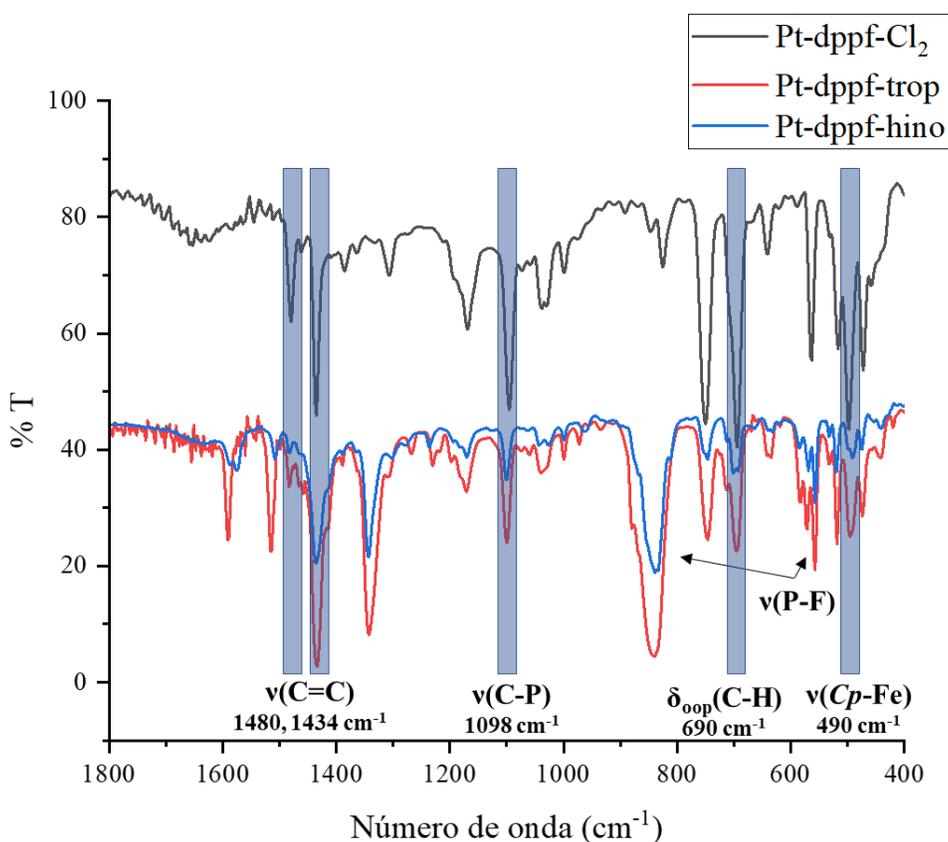


Figura 3.3: Espectro de infrarrojo del precursor  $[Pt^{II}Cl_2(dppf)]$  (línea negra) y de los complejos Pt-dppf-trop (línea roja) y Pt-dppf-hino (línea azul) en el rango entre 1800-400  $cm^{-1}$ . Se señalan las bandas principales del precursor y del contraión  $PF_6^-$ .

Al identificar las señales características del ligando tropolona [149] en los espectros de los compuestos M-dppf-trop sintetizados, se observó que las señales asociadas a los estiramientos de

los enlaces (C=O) y (C-O) se desplazaron hacia valores de frecuencia menores (ver tabla 3.2), como ha sucedido anteriormente en complejos con diferentes centros metálicos (Co, Cu, Zn, V) en donde el ligando tropolona actúa en forma bidentada [150]. Este comportamiento se observó en mayor medida para los compuestos de Pd(II) que para los compuestos de Pt(II). En el espectro del ligando libre se observó alrededor de los  $3200\text{ cm}^{-1}$  la banda asociada al estiramiento del enlace (O-H) y a  $1311\text{ cm}^{-1}$  la banda asociada a la flexión del mismo, las cuales no se observan en los espectros de los compuestos, ya que para la coordinación es necesaria la deprotonación.

Tabla 3.2: Principales bandas vibracionales IR de la tropolona (Htrop) y los complejos M-dppf-trop ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Compuesto	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{H})$	$\nu(\text{O}-\text{H}) / \delta(\text{O}-\text{H})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$
<b>Htrop</b>	1612 (s)	1547(s)	1478 (vs)	3200 (s)/ 1311 (m)	1267 (vs) /1240 (vs)
<b>Natrop</b>	1605 (s)	1535 (s)	1464 (s)	-	1242 (vs) /1226 (s)
<b>Pd-dppf-trop</b>	1587 (m)	1506 (m)	1429 (vs)	-	1237 (vw) /1196 (sh)
<b>Pt-dppf-trop</b>	1590 (m)	1515 (m)	1433 (vs)	-	1231 (vw) /1199 (sh)

Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro

De igual manera, las bandas características del ligando hinokitiol [51], como las del grupo isopropilo ( $2958, 2923, 2868\text{ cm}^{-1}$ ) y los estiramientos de los enlaces (C=O), (C=C) y (C-O) se identificaron en los complejos M-dppf-hino. En el caso de las bandas asociadas al grupo isopropilo, no se observó mayor corrimiento de estas debido a su lejanía al sitio de coordinación. Respecto los estiramientos de los enlaces (C=O), (C=C) y (C-O), se observaron cambios significativos en los desplazamientos hacia menores frecuencia de los enlaces (C=O) y (C-O), involucrados directamente en la coordinación (ver tabla 3.3), como sucedió en casos similares de complejos de coordinación con hinokitiol como ligando bidentado [51,151]. La banda de estiramiento del enlace (O-H), observada a  $3206\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del ligando libre, no se observa en los espectros de los compuestos, de forma similar a los compuestos M-dppf-trop. De esta forma,

se confirma la coordinación de los ligandos bioactivos a los fragmentos {M-dppf} para todos los compuestos sintetizados.

Tabla 3.3: Principales bandas vibracionales IR del hinokitiol (Hhino) y los complejos M-dppf-hino ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Compuesto	Grupo Isopropil	$\nu$ (O-H)	$\nu$ (C=O)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C-O)
<b>Hhino</b>	2958(m)/2923(w)/ 2868(vw)	3206 (s)	1609 (vs)	1543(s)	1269(s) /1220(vw)
<b>Nahino·2H<sub>2</sub>O</b>	2954(m)/2925(w)/ 2866(vw)	-	1595 (s)	1521(s)	1236 (s)/1186(vw)
<b>Pd-dppf-hino</b>	2953(vw)/2925(vw) /2869(vw)	-	1590(m)	1508(m)	1236(w) /1194 (w)
<b>Pt-dppf-hino</b>	2965(vw)/2928(vw) /2871(sh)	-	1586(w)	1508(w)	1230(w) /1199 (w)
Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro					

### 3.3.1.3 Difracción de rayos X en monocristal

Se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X de monocristal de los cuatro compuestos en estudio. Éstos se obtuvieron mediante recristalización por difusión lenta líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexano). En la figura 3.4 se muestra la estructura cristalina resuelta de los complejos Pd-dppf-trop, Pd-dppf-hino, Pt-dppf-trop y Pt-dppf-hino. En la tabla 3.4 se resumen los datos cristalográficos relevantes para la resolución de las estructuras, los parámetros de celda, y los procedimientos de la recolección de datos y resultados de refinación de todos los complejos.

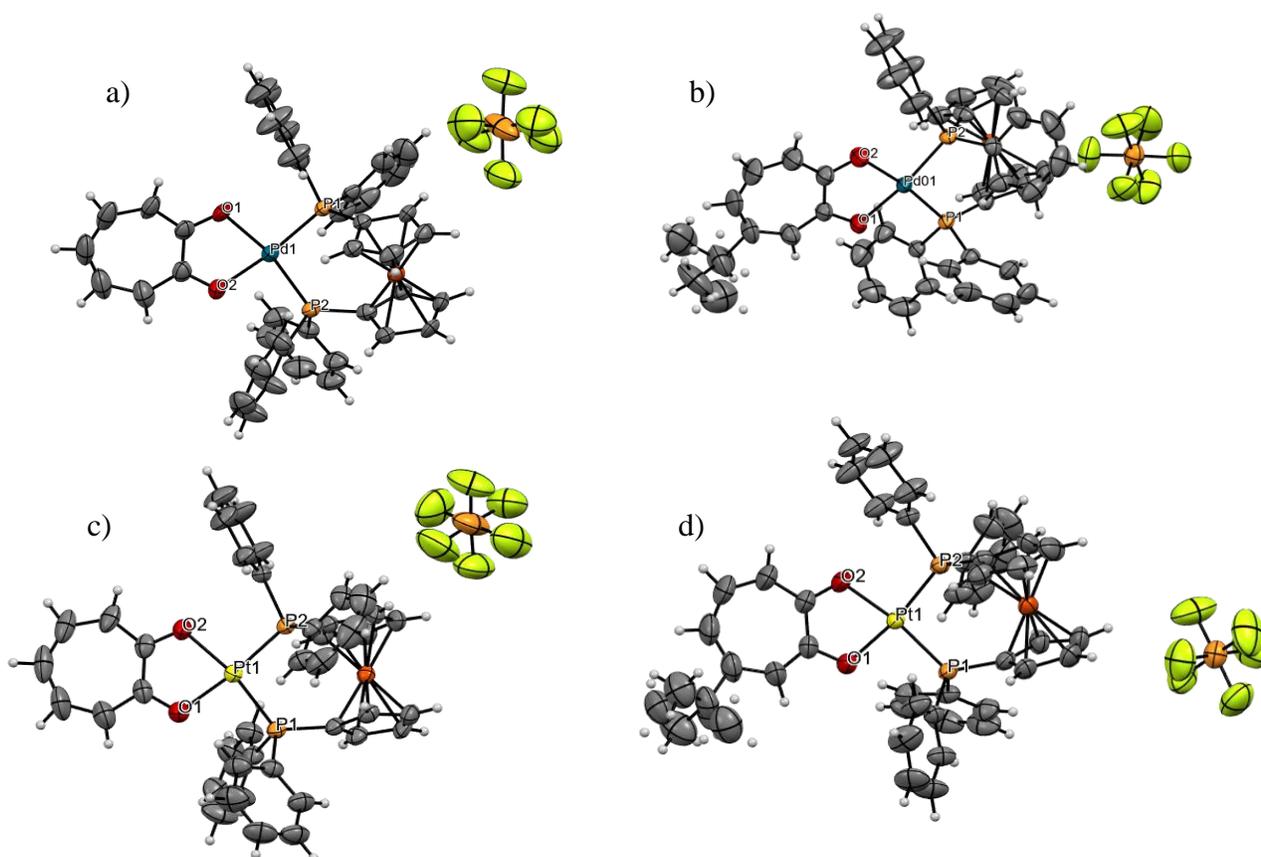


Figura 3.4: Estructura cristalina de los complejos (a) Pd-dppf-trop y (b) Pd-dppf-hino, c) Pt-dppf-trop y d) Pt-dppf-hino. Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%.

Las moléculas de disolvente han sido removidas para mayor claridad

Tabla 3.4: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pd-dppf-trop, Pt-dppf-trop, Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino.

	Pd-dppf-trop	Pt-dppf-trop	Pd-dppf-hino	Pt-dppf-hino
Fórmula empírica	$C_{41}H_{33}F_6FeO_2P_3Pd$ [+ solvent]	$C_{41}H_{33}F_6FeO_2P_3Pt$ [+ solvent]	$C_{44}H_{39}F_6FeO_2P_3Pd$	$C_{44}H_{39}F_6FeO_2P_3Pt$
Peso fórmula	926,83	1015,52	968,91	1057,60
Temperatura (K)	273(2)	273(2)	298(2)	273(2)
Longitud de onda (Å)	CuK $\alpha$ ( $\lambda = 1,54178$ )			
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$P2_1/c$
Dimensiones de celda Unitaria				

Capítulo 3 – Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de trop

a (Å)	10,7256 (3)	10,7542 (4)	10,0534 (6)	10,0987 (2)
b (Å)	27,1890 (9)	27,1988 (9)	30,9093 (17)	30,9325 (6)
c (Å)	16,0724 (5)	16,0624 (5)	13,7850 (8)	13,7258 (3)
$\beta$ (°)	99,262 (2)	99,979 (2)	105,679 (3)	105,556 (10)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4625,9 (2)	4634,1 (3)	4124,2(4)	4130,58(15)
Z; densidad (calculada, mg m <sup>-3</sup> )	4; 1,331	4; 1,456	4; 1,560	4; 1,701
Coefficiente de absorción (mm <sup>-1</sup> )	7,103	9,524	7,993	10,712
F(000)	1864,0	1992,0	1960,0	2088,0
Forma / color del cristal	Prisma rectangular/ marrón	Prisma/ amarillo	Prisma rectangular/ marrón	Prisma rectangular/ amarillo
Tamaño (mm <sup>3</sup> )	0,279 × 0,103 × 0,064	0,332 × 0,119 × 0,084	0,550 × 0,150 × 0,110	0,072 x 0,141 x 0,225
Rango de $\theta$ (°) para recolección de datos	2,80 a 68,45	2,79 a 70,24	2,86 a 79,34	2,86 a 72,55°
Rangos de indexado	-11 ≤ h ≤ 12, -32 ≤ k ≤ 32, -19 ≤ l ≤ 19	-11 ≤ h ≤ 13, -33 ≤ k ≤ 33, -19 ≤ l ≤ 19	-12 ≤ h ≤ 11, 0 ≤ k ≤ 38, 0 ≤ l ≤ 17	-12 ≤ h ≤ 11, - 38 ≤ k ≤ 38, - 16 ≤ l ≤ 16
Reflexiones colectadas	70615	83965	8635	74511
Reflexiones independientes	8432	8780	8635	8163
Reflexiones observadas [I>2σ(I)]	7281	7513	7002	7679
Compleitud (%)	99,4	99,4	96,4	99,6
Corrección de absorción	multi-scan	multi-scan	multi-scan	multi-scan
Max. y min. de transmisión	0,7531 y 0,4430	0,7533 y 0,3554	0,4730 y 0,2880	0,5130 y 0,1970
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos F <sup>2</sup>	Matriz completa de mínimos F <sup>2</sup>	Matriz completa de mínimos F <sup>2</sup>	Matriz completa de mínimos F <sup>2</sup>
Datos / restricciones / parámetros	8432/42/487	8780/42/487	8635/39/538	8163 / 0 / 524
Calidad del ajuste F <sup>2</sup>	1,077	1,039	1,087	0,986

Índice R final <sup>a</sup> [I>2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0,0606; wR <sub>2</sub> = 0,1402	R <sub>1</sub> = 0,0313; wR <sub>2</sub> = 0,0725	R <sub>1</sub> = 0,0459; wR <sub>2</sub> = 0,0990	R <sub>1</sub> = 0,0271; wR <sub>2</sub> = 0,1071
Índices R (todos los datos)	R <sub>1</sub> = 0,0691; wR <sub>2</sub> = 0,1446	R <sub>1</sub> = 0,0383; wR <sub>2</sub> = 0,0752	R <sub>1</sub> = 0,0651; wR <sub>2</sub> = 0,1104	R <sub>1</sub> = 0,0293; wR <sub>2</sub> = 0,1103
Mayor diferencia de pico (e.Å <sup>-3</sup> )	1,11 y -0,67	0,97 y -0,67	0,46 y -0,50	0,721 y -1,333
<sup>a</sup> R <sub>1</sub> = Σ  F <sub>o</sub>   -  F <sub>c</sub>    / Σ F <sub>o</sub>  , wR <sub>2</sub> = [Σw( F <sub>o</sub>   <sup>2</sup> -  F <sub>c</sub>   <sup>2</sup> ) <sup>2</sup> / Σw( F <sub>o</sub>   <sup>2</sup> ) <sup>2</sup> ] <sup>1/2</sup>				

El estudio de difracción de rayos X de monocristal mostró que los complejos con el mismo ligando (trop o hino) son isomorfos, ya que presentan el mismo sistema cristalino (monoclínico), dimensiones de celda similares, el mismo grupo espacial (P2<sub>1</sub>/c) y la posición y naturaleza de los átomos es muy similar, excepto por la naturaleza del centro metálico [152,153]. En todos los casos, los iones metálicos centrales se encuentran en un entorno casi plano, con una molécula de tropolona o hinokitol coordinada en *cis* actuando como ligando bidentado a través de sus dos átomos de oxígeno, y con el coligando 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno actuando como ligando bidentado a través de sus átomos de fósforo.

En la estructura de los M-dppf-trop, la distancia entre el centro metálico y los átomos de oxígeno (Pd-O1: 2,064(4) Å, Pd-O2: 2,047(4) Å y Pt-O1: 2,072(3) Å, Pt -O2: 2,081(3) Å) está en el mismo rango observado en otros complejos con este ligando [151,154]. El mismo comportamiento se observó en los complejos de hinokitol donde las distancias M-O también se encuentran en los rangos normales de valores (Pd-O1: 2,033(3) Å, Pd-O2: 2,047(3) Å y Pt-O1: 2,072(3) Å, Pt-O2: 2,081(3) Å) [50,51,151].

Tabla 3.5. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del centro metálico en los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino

	<b>Pd-dppf-trop</b>	<b>Pt-dppf-trop</b>	<b>Pd-dppf-hino</b>	<b>Pt-dppf-hino</b>
<b>Distancias de enlace (Å)</b>				
M-O1	2,064 (4)	2,072 (3)	2,033 (3)	2,047 (10)
M-O2	2,047 (4)	2,081 (3)	2,047 (3)	2,048 (11)
M-P1	2,244 (1)	2,2383 (9)	2,256 (1)	2,246 (3)
M-P2	2,255 (1)	2,2301 (9)	2,2656 (9)	2,233 (4)

<b>Ángulos de enlace (°)</b>				
O2-M-P1	173,38 (12)	173,06 (8)	171,39 (8)	169,8 (4)
O2-M-P2	88,20 (11)	87,87 (8)	91,66 (9)	92,4 (4)
O2-M-O1	79,55 (16)	79,56 (11)	79,73 (12)	78,6 (4)
P1-M-P2	98,37 (5)	99,04 (3)	97,09 (4)	97,65 (13)
O1-M-P1	94,01 (12)	93,63 (8)	91,52 (8)	91,3 (3)
O1-M-P2	166,25 (12)	166,20 (8)	170,93 (10)	171,0 (3)
<b>Ángulos de torsión (°)</b>				
P1-centroide $Cp_1$ - centroide $Cp_2$ -P2	33,32	33,23	30,67	29,12

En los cuatro complejos, el ligando dppf mostró la conformación antiprisma pentagonal para la coordinación alrededor del átomo de hierro en el fragmento de ferroceno, con los anillos  $Cp$  escalonados entre sí. Las distancias Fe-C están en el rango de 2.012-2.081 Å en los complejos de tropolona y 2.002-2.064 Å en los compuestos de hinokitiol. Las distancias M-P también están en los rangos observados en otros complejos con el ligando bidentado dppf (ver tabla 3.5)[141], y no se encontraron grandes variaciones en estas distancias de enlace en comparación al precursor utilizado M-dppf-Cl<sub>2</sub> (para Pd-dppf-Cl<sub>2</sub> se ha reportado Pd-P1 = 2,283 Å y Pd-P2 = 2,301 Å [155] y para Pt-dppf-Cl<sub>2</sub> Pt-P1 = 2,252 Å y Pt-P2 = 2,260 Å [156]). El ángulo de torsión del fragmento de ferroceno (ángulo comprendido entre P1-centroide de  $Cp_1$ -centroide de  $Cp_2$ -P2) fue cercano a los 36° en todos los compuestos, determinando así una conformación del tipo escalonada de los anillos ciclopentadienilo, como se muestra en la figura 3.5. Los precursores M-dppf-Cl<sub>2</sub> también mostraron este tipo de conformación [157], lo que indica que en estado sólido este parámetro permaneció invariable al modificar el entorno químico de este fragmento organometálico.

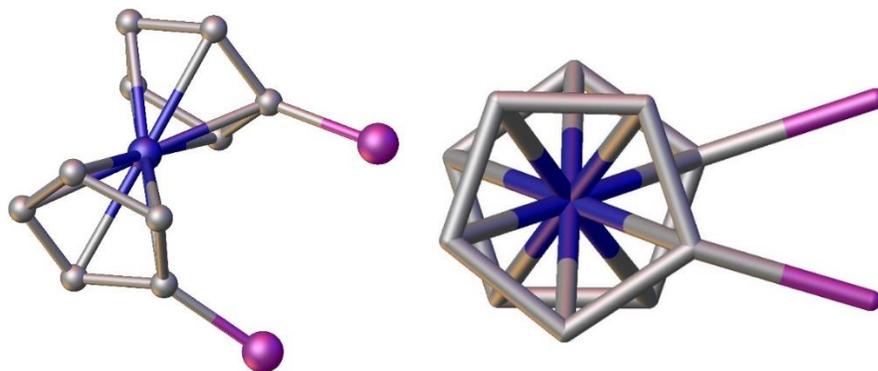


Figura 3.5: Conformación escalonada del ligando dppf en la estructura cristalina de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino.

### 3.3.2 Caracterización en solución

#### 3.3.2.1 Conductimetría

La conductividad fue medida en soluciones de concentración 1 mM de complejo en DMSO. Se obtuvo valores de conductividad molar del orden de  $20 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . Estos se encuentran algo por debajo del rango reportado para electrolitos 1:1 en solución de DMSO (rango entre 23 a  $42 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ ) [114], probablemente debido a su gran tamaño en comparación con los electrolitos estudiados por Sears y col. [158]. La conductividad fue medida durante cinco días luego de la preparación de las soluciones, no observándose cambios en estos valores. Esto da cuenta de la estabilidad que estos complejos poseen en solución de DMSO en relación a la posible generación de especies con diferente carga por sustitución de los ligandos trop o hino por DMSO durante el tiempo de estudio.

#### 3.3.2.2 Resonancia magnética nuclear

Parte de la caracterización en solución de los cuatro complejos se realizó mediante resonancia magnética nuclear unidimensional ( $^1\text{H}$ -RMN) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC) a temperatura ambiente y en solución de DMSO- $d_6$ . La figura 3.6 muestra, como ejemplo, los espectros  $^1\text{H}$ -RMN obtenidos para los compuestos Pt-trop-dppf y Pt-hino-dppf. En ellos se

observan las señales correspondientes a los protones del ligando dppf y a los ligandos bioactivos tropolona e hinokitiol, respectivamente. Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los complejos de Pd(II) presentaron el mismo patrón de señales que sus análogos de Pt(II).

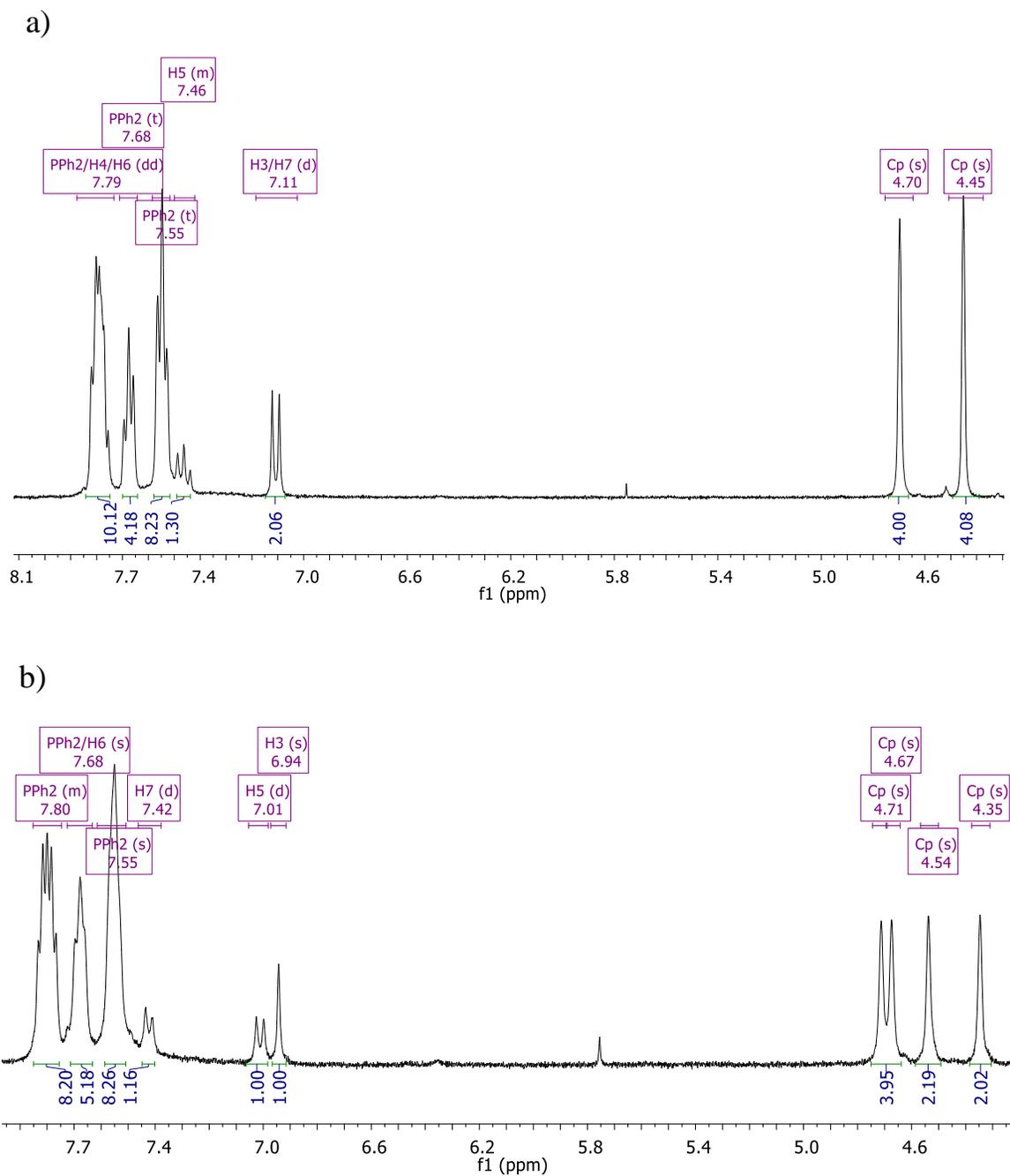
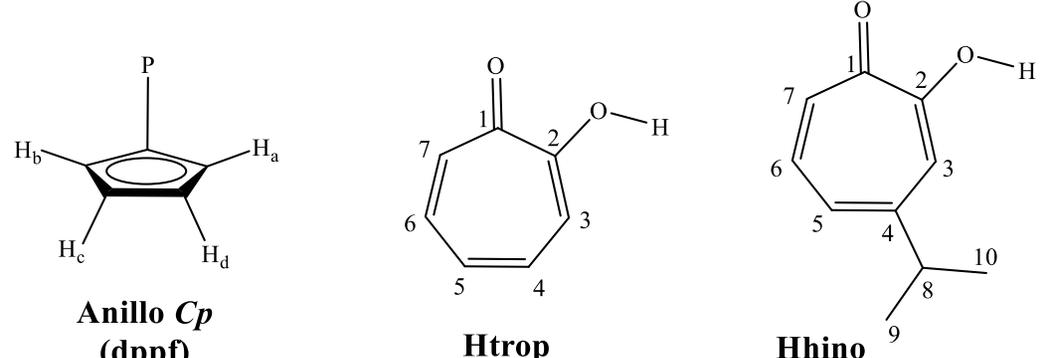


Figura 3.6: Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pt-dppf-trop y b) Pt-dppf-hino en  $\text{DMSO-d}_6$  entre 4 - 8 ppm.

En la tabla 3.6 se resumen los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de los cuatro compuestos y sus respectivos ligandos en la forma libre.

Tabla 3.6: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II) o Pt(II)) y los ligandos Htrop, Hhino y dppf obtenidos a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

										
H	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidad)(integración)									
	Htrop	Pd-trop-dppf	$\Delta\delta^a$	Pt-trop-dppf	$\Delta\delta^a$	Hhino	Pd-hino-dppf	$\Delta\delta^a$	Pt- hino-dppf	$\Delta\delta^a$
3	7,22 (d) (2)	6,90 (d) (2)	-0,32	7,10 (d) (2)	-0,12	7,18 (d) (1)	6,76 (s) (1)	-0,42	6,94 (s) (1)	-0,24
4	7,42 (t) (2)	7,57 (br) (2) <sup>b</sup>	0,15	7,79 (m) (2) <sup>b</sup>	0,37	-	-	-	-	-
5	7,05 (t) (1)	7,25 (br) (1)	0,20	7,46 (m) (1)	0,41	7,00 (d) (1)	6,81 (d) (1)	-0,19	7,01 (d) (1)	0,01
6	7,42 (t) (2)	7,57 (br) (2) <sup>b</sup>	0,15	7,79 (m) (2) <sup>b</sup>	0,37	7,34 (t) (1)	7,57 (m) (1) <sup>b</sup>	0,23	7,68 (m) (1) <sup>b</sup>	0,34
7	7,22 (d) (2)	6,90 (d) (2)	-0,32	7,10 (d) (2)	-0,12	7,10 (d) (1)	7,20 (d) (1)	0,10	7,42 (d) (1)	0,32
8	-	-	-	-	-	2,89 (sp) (1)	2,83 (br) (1)	-0,06	2,91 (m) (1)	0,02
9	-	-	-	-	-	1,20 (d) (6)	1,10 (d) (6)	-0,10	1,12 (d) (6)	-0,08
10	-	--	-	-	-					
H <sub>a</sub>	3,98 (s) (4)	4,54 (s) (4)	0,56	4,45 (s) (4)	0,47	3,98 (s) (4)	4,74 (s) (3) 4,56 (m) (4) 4,28 (s) (1)	-	4,67 (s) (2)	0,69
H <sub>b</sub>									4,71 (s) (2)	0,73
H <sub>c</sub>	4,27 (s) (4)	4,74 (s) (4)	0,47	4,69 (s) (4)	0,42	4,27 (s) (4)			4,54 (s) (2)	0,27
H <sub>d</sub>									4,35 (s) (2)	0,08

Capítulo 3 – Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de trop

dppf (PPh <sub>2</sub> )	7,28 (s) (20)	7,85 (br) (10) 7,70 (br) (4) 7,57 (br) (12)	-	7,79 (m) (8) 7,67 (m) (4) 7,54 (m) (8)	-	7,28 (s) (20)	7,86 (m) (10) 7,70 (m) (4) 7,57 (m) (13)	-	7,80 (m) (8) 7,68 (m) (4) 7,55 (m) (8)	-
<sup>a</sup> : $\Delta\delta$ : $\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$ <sup>b</sup> : superpuesto con las señales de los protones PPh <sub>2</sub> Multiplicidad: s: singulete, d: doblete, t: triplete, sp: septuplete, m: multiplete, br: señal ancha										

En el rango de desplazamiento químico entre 4 y 5 ppm (zona  $Cp$ ), se observaron en todos los espectros las señales correspondientes a los protones del fragmento de ferroceno del ligando dppf. El ligando dppf en su forma libre presenta dos señales de multiplicidad singulete [159] a 3,93 ppm y 4,26 ppm, correspondientes a los protones  $H_a-H_b$  (protones  $\alpha$  respecto al átomo de P) y  $H_c-H_d$  (protones  $\beta$  respecto al átomo de P) de ambos anillos  $Cp$  (ver figura en tabla 3.6). Esta asignación fue atribuida a que en solución y a temperatura ambiente, la molécula gira libremente en torno al eje centroide-Fe-centroide de los anillos  $Cp$ , de forma que el singulete observado a mayor campo magnético corresponde al promedio entre las señales de  $H_a-H_b$  y el singulete restante al promedio entre las señales de  $H_c-H_d$ .

Cuando el dppf actúa como ligando bidentado en compuestos de coordinación, se producen en solución dos tipos de movimientos que generan conformaciones características que se mantienen en equilibrio (fluxionalidad). Uno de estos movimientos corresponde al giro de los anillos  $Cp$  en torno al eje centroide-Fe-centroide (*torsional twist*), y el otro alude a la inversión de la conformación pseudo-silla formada entre los anillos  $Cp$  y el centro metálico (*bridge-reversal*) (figura 3.7). Ambos procesos deben superar una barrera energética para que ocurran, la cual es dependiente de la temperatura [160]. Esta barrera de energía es mayor para el *bridge-reversal* que para el *torsional twist* [161], y puede ser modificada por sustituciones en los anillos  $Cp$  o en el resto de las posiciones de coordinación del centro metálico.

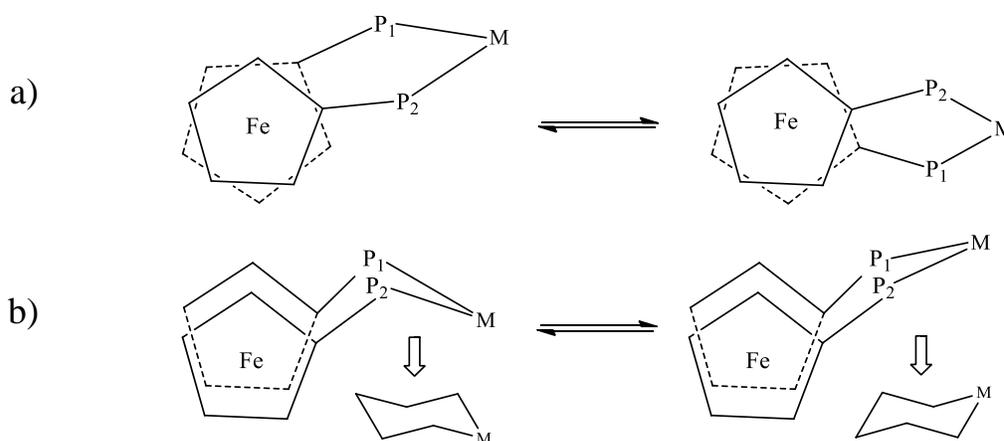


Figura 3.7: Esquema de movimiento en solución del fragmento ferroceno en el ligando dppf a) “*torsional twist*” o giro y b) “*bridge-reversal*” o inversión de la conformación pseudo-silla (similar al proceso de inversión de anillos tipo ciclohexano).

Ambos procesos pueden ser distinguidos a través del análisis de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. En particular, en la zona correspondiente a las señales de los protones de los anillos *Cp* se observan dos señales cuando se produce el movimiento *bridge-reversal*, debido a que se observa un promedio entre las señales de los protones  $\text{H}_\alpha$  y  $\text{H}_\beta$  de ambos anillos (conformación eclipsada). Por otro lado, cuando se produce el movimiento *torsional twist* se observan cuatro señales en el espectro, correspondiente a los protones  $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$ ,  $\text{H}_c$  y  $\text{H}_d$  de ambos anillos (conformación escalonada) (figura 3.8).

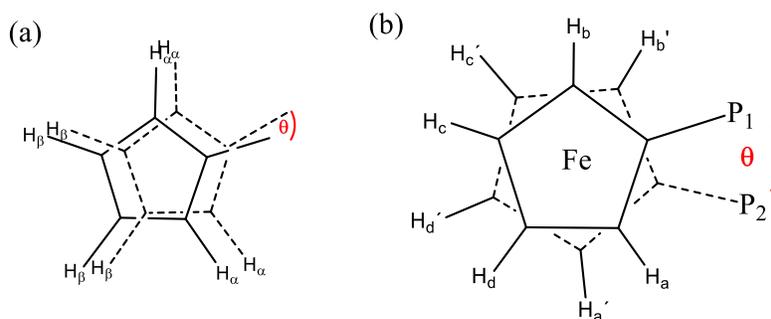


Figura 3.8: (a) Conformación eclipsada ( $\theta = 0^\circ$ ) y (b) conformación escalonada ( $\theta = 36^\circ$ ) del fragmento de ferroceno en el ligando dppf.

Con respecto a los precursores, en la zona *Cp* de los espectros se observaron dos singuletes (Pd-dppf- $\text{Cl}_2$ : 4,23 ppm y 4,54 ppm, Pt-dppf- $\text{Cl}_2$ : 4,20 ppm y 4,52 ppm), indicando que en las condiciones de medida (temperatura ambiente) predomina el movimiento *bridge-reversal*. En relación a los compuestos M-dppf-trop, se observaron en ambos espectros el mismo patrón de dos señales. Esto indica que la sustitución de los ligandos  $\text{Cl}^-$  por tropolona no afecta de forma apreciable la barrera energética, observándose solamente el movimiento *bridge-reversal* en ambos casos. Este comportamiento ha sido también observado en otros sistemas que incluyen el fragmento  $\{\text{M}(\text{dppf})\}$  ( $\text{M} = \text{Pd}(\text{II})$  o  $\text{Pt}(\text{II})$ ) y ligandos bidentados rígidos [162]. Además, en los espectros de ambos compuestos M-dppf-trop se observó un desplazamiento de ambas señales hacia mayores ppm en comparación a sus respectivos precursores, dando cuenta de la coordinación del ligando tropolona.

Por otro lado, los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos M-dppf-hino mostraron un patrón de cuatro señales (de forma más definida en el compuesto de Pt(II) que en el de Pd(II)), lo que estaría indicando que, a diferencia de los compuestos con tropolona, la sustitución de los ligandos  $\text{Cl}^-$  por hinokitiol genera que el movimiento *torsional twist* predomine. Este comportamiento ha sido

también observado en otros complejos que incluyen el fragmento  $\{M(dppf)\}$ ,  $M = Pd(II)$  o  $Pt(II)$ , donde la coordinación de ligandos bidentados generó el mismo efecto [73]. El ligando hinokitiol se diferencia de la tropolona por la presencia de un grupo isopropilo, por lo que la presencia de esta cadena alifática sería la responsable de aumentar la barrera energética que determina el tipo de movimiento observado.

En el rango entre 6 y 8 ppm, se observaron en todos los espectros las señales que involucran tanto a los protones de los anillos fosfínicos del ligando dppf ( $PPh_2$ ) como a los protones de los ligandos bioactivos. El ligando dppf en su forma libre presenta un singulete que integra para los 20 protones de los anillos  $PPh_2$ . En el caso de los precursores  $M-dppf-Cl_2$  se observaron tres multipletes que integran para 8:4:8 protones, correspondientes a los protones *o-H*, *p-H* y *m-H* de los anillos  $PPh_2$ , respectivamente. Estas señales se encuentran desplazadas hacia mayor campo magnético respecto al dppf libre. En relación a los compuestos sintetizados, se observó en todos los espectros un corrimiento general de estas señales hacia alto campo magnético debido a la coordinación de los ligandos bioactivos. Si bien existe una superposición de estas señales con señales propias de los ligandos bioactivos, se logró identificar inequívocamente los protones de los anillos  $PPh_2$  en todos los casos.

Con respecto a las señales de los ligandos bioactivos, se observó en todas ellas un corrimiento en los valores de desplazamiento químico posterior a la coordinación al centro metálico (ver tabla 3.6). Debido a la superposición de señales en los espectros de estos compuestos, se pudo identificar inequívocamente los protones H3 y H7 para compuestos con tropolona, y H3 para los compuestos con hinokitiol. La asignación de estos protones, en conjunto con la técnica de acoplamiento homonuclear COSY, permitió identificar las señales de los protones restantes.

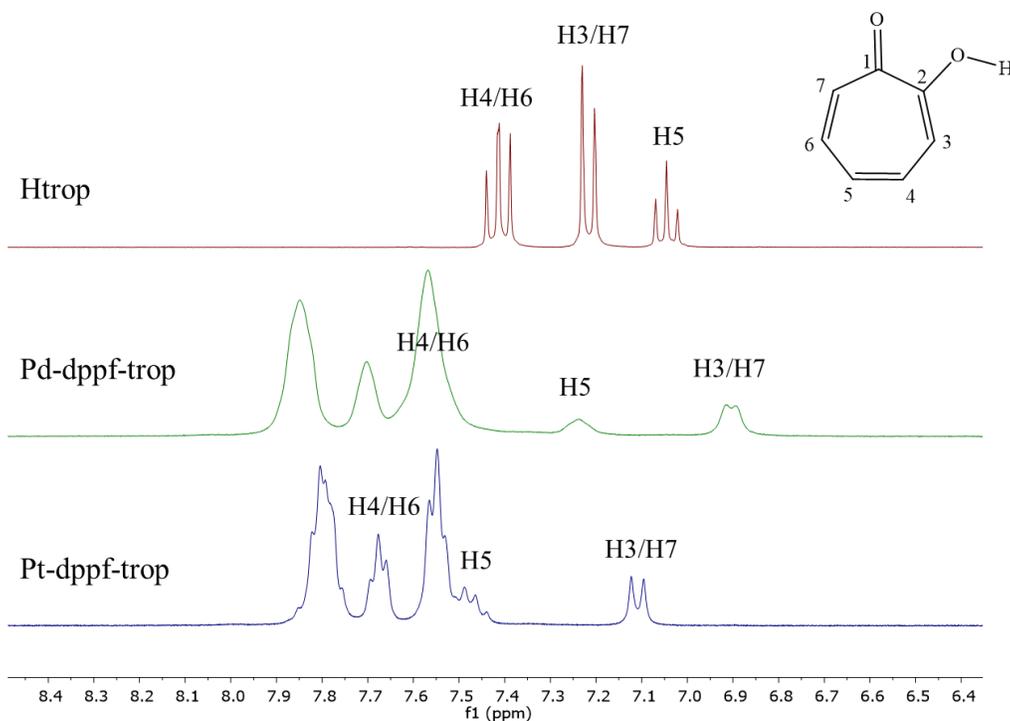


Figura 3.9: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del ligando tropolona y de los compuestos Pd-dppf-trop y Pt-dppf-trop.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ligando tropolona en su forma libre presenta un doblete a 7,22 ppm correspondiente a los protones H3 y H7 [163] (tabla 3.6 y figura 3.9). En los espectros de ambos compuestos, este doblete se desplazó hacia valores de mayor campo magnético, siendo mayor este efecto de apantallamiento en el compuesto de Pd(II). Esta tendencia en el corrimiento de esta señal ha sido también observada en otros compuestos de coordinación donde la tropolona actúa como ligando bidentado [164]. Los protones H4 y H6 del ligando Htrop se presentan en el espectro como un triplete a 7,42 ppm, equivalente para dos protones. En el caso de los complejos, esta señal se desplazó hacia mayores ppm, observándose un corrimiento mayor para el compuesto de Pt(II). En ambos casos se observaron cambios en la multiplicidad de esta señal, debido al solapamiento con las señales de los protones de los anillos  $\text{PPh}_2$ . Finalmente, la señal correspondiente al protón H5 en el ligando libre se observa en el espectro a 7,05 ppm, siendo ésta la señal más apantallada. En los espectros de ambos compuestos esta señal se desplazó hacia mayores ppm, siendo más pronunciado este corrimiento en el compuesto de Pt(II). Este corrimiento ha sido también observado en otros compuestos de coordinación, en donde la tropolona actúa como ligando bidentado [47]. Este efecto podría atribuirse a que este protón se encuentra ubicado en posición

*para* al sitio de coordinación, donde la unión de los ligandos generaría un desapantallamiento por efecto de resonancia en la molécula.

En el caso del ligando hinokitiol en su forma libre, el protón H3 se presenta en el espectro como un doblete a 7,18 ppm (tabla 3.6 y figura 3.10) [165]. En los espectros de ambos compuestos metálicos, dicha señal mostró un corrimiento hacia menores valores de desplazamiento químico, en mayor medida para el compuesto de Pd(II) que para el de Pt(II), similar al efecto observado en los compuestos con el ligando tropolona. Este comportamiento ha sido observado también en otros compuestos de coordinación con hinokitiol actuando como ligando bidentado [151]. En el espectro del ligando libre, la señal correspondiente al protón H7 se presenta como un doblete a 7,10 ppm. En los espectros de los compuestos metálicos esta señal presentó corrimiento hacia mayores ppm, en mayor medida para el complejo de Pt(II) que para el complejo de Pd(II). Con respecto al protón H5, en los espectros de ambos compuestos la señal mantuvo la multiplicidad de doblete del espectro del ligando libre, sin embargo, se observó un corrimiento hacia mayor campo magnético posterior a la coordinación solo en el compuesto de Pd(II). Finalmente, la señal correspondiente al protón H6 en el espectro del ligando libre se muestra como un triplete a 7,34 ppm. Se observó que en los espectros de ambos compuestos dicha señal se desplaza hacia mayores ppm, en mayor medida para el compuesto de Pt(II), solapándose con la señal de los *p-H* de los anillos PPh<sub>2</sub>.

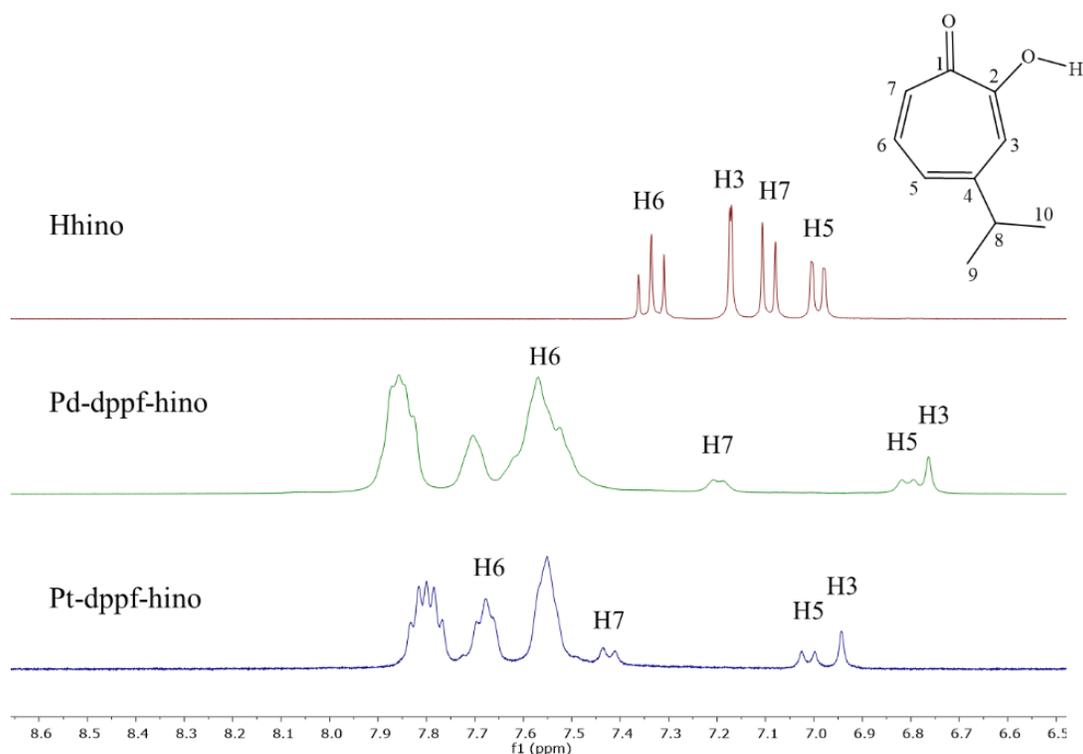


Figura 3.10: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del ligando hinokitiol y de los compuestos Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino.

En suma, estos resultados dan cuenta de la coordinación de los ligandos a los fragmentos de  $\{\text{M-dppf-}\}$ ,  $\text{M} = \text{Pd(II)}$  y  $\text{Pt(II)}$  y demuestran que en solución (durante el tiempo de estudio), los nuevos compuestos se mantienen como una entidad; es decir; no se liberan ligandos ni ocurren reacciones de sustitución de los mismos por el solvente (DMSO).

## 3.4 Actividad biológica

### 3.4.1 Actividad frente a parásitos tripanosomátidos

#### 3.4.1.1 Actividad frente a *T. brucei* y selectividad hacia el parásito

Se evaluó la actividad de los cuatro compuestos estudiados y sus correspondientes ligandos libres (dppf, Hhino y Htrop) frente a la forma infectiva de *T. brucei* (cepa 427, línea celular 449-hGrxroGFP2, o de forma abreviada *T.b.* GFP) a través de medidas de citometría de flujo, como se detalló en el capítulo 2. Los resultados se presentan como valores de concentración que inhiben el 50 % del crecimiento celular ( $\text{IC}_{50}$ ) en la tabla 3.7.

Tabla 3.7: Actividad *in vitro* de ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd o Pt, L = trop o hino, frente a la forma infectiva de *T. b. GFP* y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)		IS
	<i>T.b. GFP</i> (427)	Macrófagos (J774)	
dppf	>10	45 ± 6	< 4
Htrop	> 60	67 ± 13	~1
Hhino	27 ± 2	> 100	>4
Pd-dppf-trop	1,3 ± 0,1	10 ± 1	8
Pt-dppf-trop	2,1 ± 0,1	38,7 ± 0,1	18
Pd-dppf-hino	1,2 ± 0,1	3,2 ± 0,5	3
Pt-dppf-hino	4,5 ± 0,1	> 100	>22
Nifurtimox	15 ± 3 <sup>a</sup>	150 ± 5 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
IS: IC <sub>50 J774</sub> / IC <sub>50 T. b. GFP</sub>			
<sup>a</sup> : Valores extraídos de [166].			

Los ligandos libres dppf y Htrop carecieron de actividad antiparasitaria cuando se probaron a 10 μM y a 60 μM, respectivamente. En el caso del dppf, no fue posible probar concentraciones más altas debido a la baja solubilidad del compuesto en el medio de cultivo del parásito. Por el contrario, el IC<sub>50</sub> de Hhino (27 μM) fue mayor que el del fármaco de referencia Nifurtimox (IC<sub>50</sub> = 15 μM) [166]. En el caso de los compuestos de Pd y Pt, se observa que la unión de estos ligandos con el fragmento {M-dppf} aumentó significativamente la actividad antitripanosoma, lo que produjo valores de IC<sub>50</sub> por debajo de 5 μM en todos los casos. La mayor diferencia correspondió al ligando trop, cuya actividad aumentó entre 28 y 46 veces al coordinarse a los fragmentos {Pt-dppf} y {Pd-dppf}, respectivamente. De manera similar, la coordinación del ligando hino con {M-dppf} resultó en un aumento de la actividad de 6 y 22 veces, respectivamente. Esta comparación también destaca que los complejos de Pd(II) son ligeramente más citotóxicos para los parásitos que los basados en Pt(II). Además, todos los complejos de Pd(II) demostraron ser unas 10 veces más potentes que Nifurtimox.

Con el fin de conocer la selectividad hacia el parásito de los cuatro compuestos estudiados, se probó su citotoxicidad frente a macrófagos murinos (línea celular murina J774), que son células del sistema inmune que se encuentran en tejidos y se activan al ocurrir una infección por parásitos en el huésped. Juegan un papel importante en el control de la tripanosomiasis y son muy sensibles a los factores ambientales [70]. Entre los ligandos libres, dppf ( $IC_{50}$  45  $\mu$ M) y Htrop ( $IC_{50}$  67  $\mu$ M) presentan una toxicidad bastante similar contra los macrófagos, mientras que Hhino carece de efecto tóxico incluso a 100  $\mu$ M. En el caso de los complejos de Pd(II), la complejación de los ligandos al fragmento {Pd-dppf} aumentó la citotoxicidad de los derivados con respecto a los ligandos libres, siendo Pd-dppf-hino 30 veces más citotóxico que Hhino y Pd-dppf-trop 6,7 veces más citotóxico que Htrop. Por el contrario, la coordinación a Pt tuvo efectos más variados sobre la citotoxicidad hacia los macrófagos: mientras que Pt-dppf-trop fue 1,7 veces más citotóxico que el ligando libre, la coordinación de hino con {Pt-dppf} no modificó el efecto biológico. La estimación del índice de selectividad ( $IS = IC_{50 \text{ J774}} / IC_{50 \text{ T.b. GFP}}$ ) para cada compuesto mostró que los ligandos libres carecen de especificidad para matar parásitos ya que su IS (1 a > 4) es bajo y se encontró por debajo del de Nifurtimox ( $IS = 10$ ). Como era de esperar a partir de la citotoxicidad observada frente a los macrófagos, los complejos de Pd arrojaron valores bajos de IS. En cambio, los compuestos de Pt(II) presentaron índices de selectividad mayores que los análogos de Pd(II) y que el Nifurtimox.

Según el Programa Especial de Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR), que lidera la investigación de descubrimiento contra enfermedades desatendidas, se considera un fármaco hit para Tripanosomiasis Africana Humana (HAT) aquel compuesto que presente un  $IC_{50}$  de  $\leq 0,2 \mu\text{g/mL}$  (para los compuestos desarrollados el  $IC_{50}$  se encuentra entre 1,2 - 4,5  $\mu\text{g/mL}$ ) contra *T. brucei* y un índice de selectividad  $> 100$  [72]. Aunque estos nuevos compuestos no cumplieron con ambos criterios, los compuestos de Pt(II) mostraron valores bajos de  $IC_{50}$  y valores de IS adecuados y pueden considerarse compuestos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos.

#### 3.4.1.2 Actividad sobre amastigotes de *Leishmania infantum* (*L. infantum*)

Para obtener una idea de la potencialidad de los compuestos estudiados como fármacos de amplio espectro contra distintos parásitos tripanosomátidos, éstos se evaluaron contra la forma intracelular

(amastigote) del tripanosomátido *L. infantum*), que coloniza de forma natural los macrófagos cuando infecta a los mamíferos. Inicialmente se realizó un screening a 5  $\mu$ M para todos los compuestos; los resultados se muestran en la tabla 3.8.

Tabla 3.8: Porcentaje de inhibición de la infección a 5  $\mu$ M para precursores, ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = Htrop o Hhino, frente a la forma amastigote de *L. infantum*.

Compuesto	<i>L. infantum</i>
	% inhibición de la infección a 5 $\mu$ M
Pd-dppf-Cl <sub>2</sub>	12 $\pm$ 5
Pt-dppf-Cl <sub>2</sub>	44 $\pm$ 17
dppf	13 $\pm$ 19
Htrop	50 $\pm$ 7
Hhino	34 $\pm$ 4
Pd-dppf-trop	49 $\pm$ 2
Pt-dppf-trop	45 $\pm$ 3
Pd-dppf-hino	49 $\pm$ 19
Pt-dppf-hino	49 $\pm$ 18

De estos resultados se observa que tanto el precursor de Pd(II) como el co-ligando dppf tienen aparentemente menor poder de inhibición de la infección que todos los compuestos nuevos. En cuanto a los compuestos metálicos, se observa que los M-dppf-trop, independientemente del centro metálico, tienen un poder de inhibición similar al ligando libre. Por otro lado, los compuestos con hinokitiol aparentemente aumentaron su poder de inhibición de la infección respecto al ligando libre. Se estimó que los valores de EC<sub>50</sub> (concentración efectiva que inhibe la infección en un 50 %) de todos los compuestos se encontraban alrededor de la concentración testada, ya que se obtuvo porcentajes de inhibición de la infección entre 45 – 49 % para los M-dppf-trop y M-dppf-hino. Sin embargo, es importante resaltar que, en el caso de los compuestos con hinokitiol e incluso para el dppf y el precursor de Pt(II), el error asociado al valor reportado en la tabla 3.8 es significativamente grande, por lo que la confiabilidad de los valores es limitada.

Posteriormente se testearon concentraciones de los compuestos entre 0,5 – 20  $\mu\text{M}$ , con el fin de obtener curvas de dosis – respuesta que permitieran calcular valores de  $\text{EC}_{50}$ . Sin embargo, no fue posible obtenerlas debido a que no se observó un cambio en los porcentajes de inhibición de la infección correlativo al aumento de la concentración de los compuestos. En muchos casos, se encontró una actividad plato cercana al 35 % de inhibición de la infección entre concentraciones de 5 – 20  $\mu\text{M}$  con errores asociados muy grandes. Esto puede deberse a dos razones:

- 1) Tal como se reporta en el capítulo 2, la técnica de conteo es manual y depende de un número determinado de macrófagos (mínimo 200) que se adhieren a un portaobjetos. Si los compuestos evaluados son altamente tóxicos para los macrófagos en sí, las células tienden a despegarse del portaobjetos, por lo que el conteo de células vendrá asociado a un alto porcentaje de error. Esto sucedió para todos los compuestos testeados.
- 2) El haber obtenido una actividad plato a determinadas concentraciones para todos los compuestos e incluso para Hhino podría ser indicativo de haber alcanzado un máximo de solubilidad de los compuestos en el medio de cultivo en el que se realizaron los ensayos. De esta forma, la actividad podría verse limitada por la solubilidad de estos.

Por lo tanto, no se logró determinar valores de  $\text{EC}_{50}$  para esta familia de compuestos, sino que se determinó el porcentaje relativo de macrófagos infectados a determinada concentración (5  $\mu\text{M}$ ) [104], tomando en cuenta el grupo control de células infectadas no tratadas con el compuesto (tabla 3.9).

Tabla 3.9: Porcentaje de macrófagos infectados (% MI) a 5  $\mu\text{M}$  para ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = Htrop o Hhino, frente a la forma amastigote de *L. infantum* y  $\text{IC}_{50}$  en macrófagos murinos.

Compuesto	<i>L. infantum</i> % MI a 5 $\mu\text{M}$	$\text{IC}_{50}$ Macrófagos ( $\mu\text{M}$ )*
dppf	82 $\pm$ 14	45 $\pm$ 6
Htrop	65 $\pm$ 5	67 $\pm$ 13
Hhino	75 $\pm$ 7	> 100
Pd-dppf-trop	50 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1
Pt-dppf-trop	55 $\pm$ 4	38,7 $\pm$ 0,1

Pd-dppf-hino	$69 \pm 8$	$3,2 \pm 0,5$
Pt-dppf-hino	$68 \pm 3$	$> 100$
EC <sub>50</sub> Anfotericina B: 0,27 $\mu$ M *extraído de tabla 3.7		

A 5  $\mu$ M todos los ligandos libres mostraron una baja capacidad para inhibir la infección en macrófagos, ya que más del 60 % de las células permanecieron infectadas después del tratamiento con Htrop (65 % MI) y con Hhino (75 % MI). Aunque los datos obtenidos para dppf muestran un alto grado de dispersión, este ligando claramente no es más activo que Htrop. En discrepancia con la mejora significativa observada en la actividad frente a *T. brucei* (tabla 3.7), la incorporación del ligando trop al fragmento {M-dppf} tuvo un impacto leve en la actividad antileishmania (aumentó 1,2 - 1,3 veces). La misma tendencia se observó para Hhino respecto a sus respectivos complejos de Pd(II) y Pt(II) (aumentó 1,1 veces en ambos casos). En este caso, en contraste con la marcada diferencia en la actividad de los compuestos de Pd(II) respecto a los compuestos de Pt(II) para la actividad anti - *T. brucei*, no se observó la misma tendencia respecto a la actividad antileishmania. Además, todos los compuestos son al menos un orden de magnitud menos activos que el fármaco de referencia anfotericina B, asumiendo que el EC<sub>50</sub> de todos los compuestos se encuentra alrededor de 5  $\mu$ M. Teniendo en cuenta esto, se puede estimar un aparente IS (IC<sub>50</sub> macrófagos/ “EC<sub>50</sub> *L. infantum*” 5  $\mu$ M) de 2 y 8 para Pd-dppf-trop y Pt-dppf-trop, respectivamente. Los valores de EC<sub>50</sub> para Pd-dppf-hino y Pt-dppf-hino probablemente estén cerca de 20  $\mu$ M, lo que produce valores aparentes de IS de 0,15 y  $> 5$ , respectivamente. En general, estas estimaciones corroboran la escasa selectividad de estos compuestos contra *L. infantum* y destacan que en general, son más efectivos contra *T. brucei* que contra *L. infantum*.

#### 3.4.2 Ensayos de viabilidad celular frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la cual afecta principalmente a los pulmones. Aunque tiene cura y se puede prevenir, esta enfermedad sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad del mundo; es la decimotercera causa de muerte a nivel mundial y es la enfermedad infecciosa más mortífera por detrás de la COVID-19 (siendo el primer lugar el VIH y el Sida). Se estima que en 2021 enfermaron 10,6 millones de personas en todo el mundo y murieron un total de 1,6 millones

(entre ellas 187 000 personas con VIH) [167]. Sólo unos pocos fármacos son activos contra los bacilos de *M. tuberculosis*. Además, la aparición de cepas multirresistentes (resistentes a isoniazida y rifampicina) y fuertemente resistentes (resistentes a isoniazida, rifampicina y también a fluoroquinolonas y fármacos de segunda línea) es cada vez mayor, lo que hace que sea un desafío el control de la enfermedad. Una de las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) planteada en 2018, fue acabar con la epidemia de tuberculosis para el año 2030. Sin embargo, al ritmo de la disminución actual de la tasa de incidencia y del número de muertes causada por esta enfermedad, se estima que la región de las Américas no alcanzará las metas propuestas [168]. Esto evidencia la necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos que actúen frente a estas cepas.

### 3.4.2.1 Actividad sobre *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, sobre aislamientos clínicos de y selectividad hacia *M. tuberculosis*

Como se mencionó en el capítulo 1, se han identificado similitudes metabólicas entre parásitos protozoarios y bacterias, por lo que los compuestos en estudio también fueron evaluados frente a una cepa sensible de *M. tuberculosis*, bacteria causante de la tuberculosis. Los resultados se muestran en la tabla 3.10.

Tabla 3.10: Actividad *in vitro* de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) contra *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 y, fibroblastos de pulmón humano (línea celular MRC-5).

Compuesto	MIC <sub>90</sub> (μM) <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	IC <sub>50</sub> MRC-5 (μM)	SI
dppf	> 45,2	> 100	~2
Htrop	29,0 ± 1,1	> 100	> 3
Hhino	35,4 ± 1,5	> 100	> 3
Pd-dppf-trop	9,0 ± 2,5	11,4 ± 1,6	1
Pt-dppf-trop	17,6 ± 4,1	18,4 ± 0,6	1
Pd-dppf-hino	13,1 ± 7,6	9,3 ± 0,3	0,7
Pt-dppf-hino	14,7 ± 4,4	13,5 ± 1,3	0,9

De los resultados presentados en la tabla 3.10 se puede observar que todos los compuestos son más activos que sus respectivos ligandos libres y que el coligando dppf, mostrando valores de MIC<sub>90</sub> en el rango de 9,0 - 14,7 μM. Si bien se observa una aparente mayor actividad de los compuestos de Pd(II) frente a los compuestos de Pt(II), la desviación de los valores reportados sugiere que presentan actividad relativamente similar.

Se determinó también la citotoxicidad de los compuestos y ligandos libres en fibroblastos de pulmón humano (línea celular MRC-5), ya que son el tipo de células que ataca *M. tuberculosis* al infectar humanos y se considera la línea celular adecuada para testear citotoxicidad inespecífica en estudios antituberculosos. Tanto los ligandos libres como el coligando dppf mostraron ser poco citotóxicos para las células sanas. Sin embargo, al coordinarse a los fragmentos {M-dppf}, se observó un marcado aumento de la citotoxicidad, que fue similar para todos los compuestos.

Con respecto a su selectividad hacia *M. tuberculosis*, aunque los nuevos compuestos mostraron valores de MIC<sub>90</sub> aceptables según las guías internacionales, mostraron una baja especificidad. De hecho, los valores de IS calculados frente a los fibroblastos de pulmón humano MRC-5 fueron ≤1. Por lo general, un compuesto se considera prometedor para realizar más pruebas contra *M. tuberculosis* si se encuentra un valor IS cercano o superior a 10 [169]. Ninguno de los nuevos compuestos cumplió este criterio. De todos modos, los compuestos se probaron en aislados clínicos resistentes a diferentes fármacos antimicrobianos utilizados para tratar la enfermedad (tabla 3.11).

Tabla 3.11: Actividad *in vitro* de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) contra cuatro aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Se incluyeron varios fármacos anti- *M. tuberculosis* para comparación.

Compuesto	CF93 MIC <sub>90</sub> (μM)	CF100 MIC <sub>90</sub> (μM)	CF112 MIC <sub>90</sub> (μM)	CF169 MIC <sub>90</sub> (μM)
dppf	> 45,1	> 45,1	> 45,1	> 45,1
Htrop	40,6	18,3	99,4	> 204,7
Hhino	> 152,2	87,8	> 152,2	> 152,2

Pd-dppf-trop	25,6	9,0	> 27,0	> 27,0
Pt-dppf-trop	> 24,6	> 24,6	> 24,6	> 24,6
Pd-dppf-hino	25,3	> 25,8	> 25,8	> 25,8
Pt-dppf-hino	> 23,6	> 23,6	> 23,6	> 23,6
Rifampicina	> 30,4	0,4	7,9	> 30,4
Isoniazida	> 182,3	> 182,3	> 182,3	> 182,3
Estreptomina	1,1	> 43,0	3,2	29,0

CF93 es una cepa de *M. tuberculosis* denominada TB-MDR (tuberculosis (TB) resistente a múltiples fármacos) que no responde a la isoniazida y la rifampicina, los dos fármacos antituberculosos de primera línea más potentes. El aislado CF100 es resistente a la isoniazida, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas y es la única cepa sensible a la rifampicina de las cuatro cepas analizadas. CF112 y CF169 corresponden a cepas XDR-TB (TB extremadamente resistente a los medicamentos); ambas son resistentes a al menos cuatro de los principales medicamentos antituberculosos. En general, la actividad de los compuestos frente a las cepas clínicas fue menor que frente a la cepa sensible H37Rv (tabla 3.10). Entre todos los compuestos probados, Htrop y Pd-dppf-trop resultaron los compuestos más activos contra la cepa CF100 de TB triplemente resistente, lo que resulta de interés para el desarrollo de fármacos activos contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos de primera línea.

### 3.5 Lipofilia

La lipofilia es una propiedad fisicoquímica que afecta significativamente el comportamiento biológico de un fármaco. Por lo tanto, es importante determinar si existe una correlación entre la lipofilia y la actividad biológica de un potencial fármaco. Para cuantificar este parámetro se han desarrollado distintos métodos a lo largo del tiempo. Hansch *et al.* [170] definieron parámetros de contribución de átomos o grupos de átomos a lo que se conoce como coeficiente de partición (P), que es el cociente entre las concentraciones de una sustancia en dos fases de una mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio. El parámetro Log(P) es ampliamente utilizado para estimar la distribución de fármacos dentro del cuerpo; los fármacos hidrofóbicos con altos coeficientes de partición octanol/agua se distribuyen principalmente en áreas hidrofóbicas, como las bicapas lipídicas de las células. Por el contrario, los fármacos hidrofílicos (bajos coeficientes

de partición octanol/agua) se distribuyen principalmente en regiones acuosas, como el suero sanguíneo [171].

El sistema utilizado por Hansch *et al.* fue 1-octanol/agua. Sin embargo, la determinación del coeficiente de partición por este método es un trabajo tedioso y existen muchos compuestos que no son solubles en los solventes utilizados. Por tal razón, en este estudio se utilizó el método propuesto por Boyce y Milborrow basado en cromatografía de capa fina (*Thin layer chromatography*, TLC), donde se propone la expresión del carácter lipofílico de compuestos a través del valor  $R_M$ , dependiente del valor  $R_f$  según  $R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$ . Los experimentos de TLC se realizaron según lo descrito en el capítulo 2 y los resultados se presentan en la tabla 3.12.

Tabla 3.12: Valores de  $R_f$  y  $R_M$  de los complejos M-dppf-trop y M-dppf-hino (M = Pd(II), Pt(II)) y de los ligandos usando la fase móvil MeOH:DMF:H<sub>2</sub>O (65:5:30 v/v/v).

Compuesto	$R_f$	$R_M$
Htrop	0,87	-0,81
Hhino	0,72	-0,44
Pd-dppf-trop	0,11	0,93
Pt-dppf-trop	0,15	0,76
Pd-dppf-hino	0,09	1,02
Pt-dppf-hino	0,10	0,95
$R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$		

De la definición del valor  $R_f$  (distancia recorrida por la muestra desde el origen/distancia recorrida por el eluyente desde el origen) y la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil utilizadas para este estudio, se espera que aquellos compuestos que sean más lipofílicos tengan un valor de  $R_f$  más cercano a 0. En el caso de los valores de  $R_M$ , mientras más negativo, más hidrofílico el compuesto.

Se puede observar en la tabla 3.12 que todos los compuestos presentan valores de  $R_f$  mucho menores que los ligandos libres, lo que indica que son más lipofílicos que estos últimos. Este comportamiento se corresponde a lo esperado ya que el fragmento {M-dppf} es altamente lipofílico. A su vez, tanto el ligando Hhino como sus complejos son más lipofílicos que Htrop y sus respectivos complejos, dado la presencia del grupo isopropilo. No se pudo observar una correlación directa entre la lipofilia y la actividad sobre *T. brucei*. La lipofilia es solo uno de los factores que podrían influir en la actividad biológica de los compuestos. Para esta familia de compuestos, la lipofilia no parece ser un factor determinante de la actividad antiparasitaria.

### 3.6 Mecanismo de acción

#### 3.6.1 Interacción con ADN

El ADN se utiliza comúnmente como blanco terapéutico en el tratamiento de patologías altamente proliferativas, como es el caso del cáncer. De hecho, se postula que existen similitudes metabólicas entre células cancerígenas y parásitos, relacionadas a su alta proliferación celular [172,173]. Anteriormente distintos estudios han demostrado que complejos metálicos de Pd y Pt son usualmente capaces de interactuar con el ADN [72,73,174], convirtiendo a esta biomolécula en un posible blanco de acción de los compuestos sintetizados.

El método de estudio de la interacción entre el ADN y los complejos estudiados utilizado en este trabajo se basa en el desplazamiento del bromuro de etidio (EB) del aducto {ADN-EB} que se forma en solución, debido a la interacción de los compuestos con el ADN. Este desplazamiento se registra mediante medidas de emisión de fluorescencia del aducto (ver capítulo 2). En la figura 3.11 se muestra la variación de los espectros de emisión fluorescente del aducto {ADN-EB} al variar la concentración de cada compuesto. En todos los casos se observó una disminución de la emisión de fluorescencia del aducto al aumentar la concentración de complejo hasta concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  para los compuestos de Pd(II) y hasta aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  para los compuestos de Pt(II). Por encima de estas concentraciones, los compuestos tienden a precipitar en el medio utilizado, siendo dificultoso el análisis.

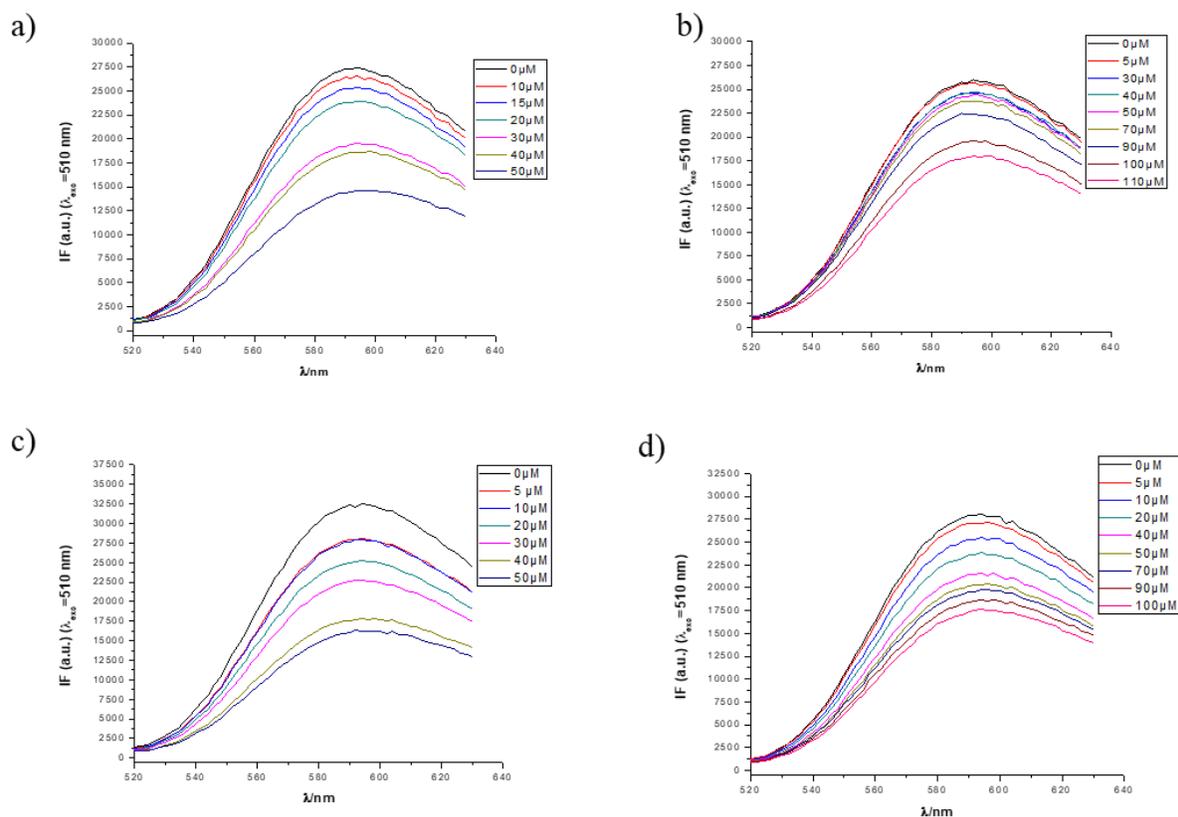


Figura 3.11: Disminución de la emisión fluorescente del aducto {ADN-EB} ( $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ ) observada en soluciones de concentración variable con el complejo a) Pd-dppf-trop, b) Pt-dppf-trop, c) Pd-dppf-hino y d) Pt-dppf-hino.

En las gráficas de la figura 3.12 se muestra la variación de la intensidad relativa de fluorescencia (% IF) en el máximo de emisión (594 nm) al aumentar la concentración de complejo o ligando libre. Se observa que ninguno de los ligandos libres (Htrop o Hhino) presenta interacción apreciable con el ADN. Por otra parte, todos los complejos presentaron interacción con ADN, con afinidades variables. Se observó un porcentaje de quenching de fluorescencia mayor por parte de los compuestos de Pd(II) que por parte de los compuestos de Pt(II), al igual que en complejos estudiados anteriormente con los mismos centros metálicos [72]. Además, se aprecia que los complejos con hinokitiol atenúan la fluorescencia de forma levemente superior que los complejos con tropolona.

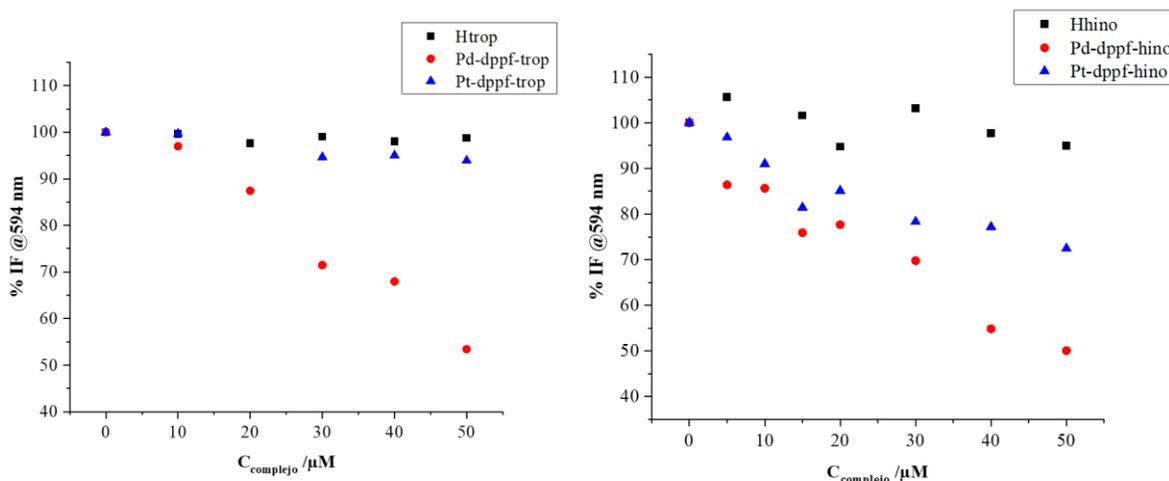


Figura 3.12: Intensidad relativa de fluorescencia (%) a  $\lambda_{em} = 594$  nm aumentando la concentración de complejo para (a) Htrop y sus complejos de Pd(II) y Pt(II), (b) Hhino y sus complejos de Pd(II) y Pt(II).

Cuadrados: Ligandos libres (Htrop o Hhino), círculos: complejos de Pd(II), triángulos: complejos de Pt(II).

Estos resultados son consistentes con un desplazamiento del EB del aducto {ADN-EB}, ya sea provocado por la unión de los complejos al ADN de manera intercalante o por otro tipo de interacción con ADN, induciendo cambios conformacionales que causen la ruptura de la unión del EB al ADN.

Los mecanismos implicados en la disminución de la fluorescencia efectuada por los complejos pueden evaluarse mediante el análisis de la ecuación de Stern-Volmer (1).

$$\frac{IF_0}{IF} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

En esta ecuación,  $IF_0$  e  $IF$  corresponden a la intensidad de emisión fluorescente del aducto en ausencia y presencia de complejo, respectivamente;  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer; y  $[Q]$  corresponde a la concentración de complejo (quencher) [175]. A concentraciones bajas de complejo la gráfica  $IF_0/IF$  es lineal (figura 3.13), lo que permite calcular la constante de  $K_{SV}$  para cada sistema (tabla 3.13).

Tabla 3.13: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los sistemas M-dppf-L, con M = Pd(II) o Pt(II) y HL = Htrop o Hhino, para la unión competitiva {ADN-EB} en medio 5 % DMSO/Tris-HCl.

Complejo	K <sub>sv</sub> (M <sup>-1</sup> )	Log(K <sub>sv</sub> )	R <sup>2</sup>
Pd-dppf-trop	12091	4,1	0,91477
Pt-dppf-trop	1345	3,1	0,98243
Pd-dppf-hino	19876	4,3	0,99304
Pt-dppf-hino	7421	3,9	0,98985

Los resultados del ajuste señalan, que tal como se mencionó anteriormente, todos los compuestos interaccionan con ADN; en mayor medida los compuestos con Pd(II) que los compuestos con Pt(II). Los valores de K<sub>SV</sub> obtenidos se encuentran dentro del mismo orden que lo observado en otros complejos similares previamente estudiados pero son francamente menores que los presentados por compuestos típicamente intercalantes [71,72].

Por tanto, los resultados sugieren que el ADN podría ser una diana molecular de estos complejos. Aunque el número de complejos es bajo para permitir establecer correlaciones, las actividades biológicas ligeramente superiores de los complejos de Pd desarrollados con respecto a las observadas para los análogos de Pt parecen correlacionarse bien con las mayores afinidades de los complejos de Pd por el ADN. Esta correlación está de acuerdo con los resultados informados anteriormente para algunas series de análogos de Pd y Pt que muestran actividades antitumorales o antitripanosoma [176,177].

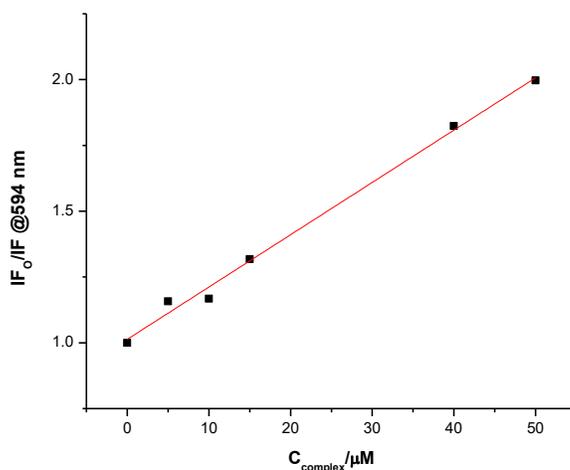


Figura 3.13: Gráfica  $IF_0/IF$  en función de la concentración de complejo Pd-dppf-hino incluida como ejemplo.

### 3.6.2 Estado tiol-redox intracelular de *T. brucei*

Los ferrocenos son compuestos conocidos por generar especies reactivas del oxígeno (EROs) a través de reacciones tipo Fenton, lo que puede conducir a oxidación de macromoléculas, siendo importantes los grupos tiol de proteínas y fosfolípidos de membranas celulares [42–44]. Por lo tanto, se investigó la posible interferencia de los compuestos con el equilibrio tiol-redox intracelular de *T. brucei*, utilizando parásitos que expresan un biosensor redox basado en una proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP). El biosensor utilizado (hGrx-roGFP2) es capaz de traducir los cambios en la relación glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GSSG) del medio, en cambios en su intensidad de fluorescencia, como se mencionó en el capítulo 2. Se ha demostrado que el biosensor redox es muy sensible para detectar pequeños aumentos (incluso a escala nM a  $\mu\text{M}$ ) en la concentración de glutatión oxidado que se origina por estrés oxidativo, biosíntesis alterada o reducción de glutatión [45]. Los parásitos se incubaron durante tiempos cortos (1 o 3 h) con compuestos añadidos en concentración igual a su  $IC_{50}$ , y se estimó la viabilidad celular y la fluorescencia de GFP. En estas condiciones la mayoría de los compuestos ejercieron un efecto citotóxico  $\leq 27\%$  pero ninguno de ellos produjo una oxidación marcada y sostenida del biosensor ( $> 20\%$  en ambos puntos de tiempo). Como era de esperar, la menadiona, agregada a 125 o 250  $\mu\text{M}$ , produjo una disminución significativa en la intensidad de la fluorescencia ( $> 80\%$ )

que se asoció con la pérdida de viabilidad del parásito (> 40%) [46]. En resumen, esto sugiere que el efecto antiparasitario de los derivados heterobimetálicos derivados de ferroceno y/o los correspondientes ligandos (dppf, Hhino y Htrop) no puede atribuirse a una interferencia de los compuestos con la homeostasis tiol-redox del patógeno.

### 3.7 Conclusiones parciales

Se desarrolló una familia de cuatro nuevos compuestos heterobimetálicos de Pd(II)-Fe y Pt(II)-Fe que contienen el derivado de ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf) y los ligandos bioactivos (HL) tropolona (Htrop) e hinokitiol (Hhino), cuya fórmula general es  $[M^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ , con rendimientos de síntesis cercanos al 50%.

Estos fueron completamente caracterizados en estado sólido y en solución. Al estado sólido, se verificó la presencia del fragmento {M-dppf-} y los ligandos coordinados y se asignaron de forma tentativa bandas de vibración IR para los nuevos compuestos. Se obtuvo la estructura cristalina de los 4 nuevos compuestos y se verificó la coordinación de los ligandos a los centros de Pd(II) y Pt(II), según se postuló en el estudio FTIR, explicando a su vez la similitud de los espectros a causa de sus estructuras cristalinas isomorfas. En solución se verificó que los compuestos obtenidos son electrolitos 1:1 y por resonancia magnética nuclear se asignaron señales de los protones de los fragmentos {M-dppf-} y de los ligandos derivados de la tropolona en todos los casos, dando cuenta de que en solución los nuevos compuestos se mantienen como una entidad. Además, fue posible describir fenómenos de fluxionalidad en solución.

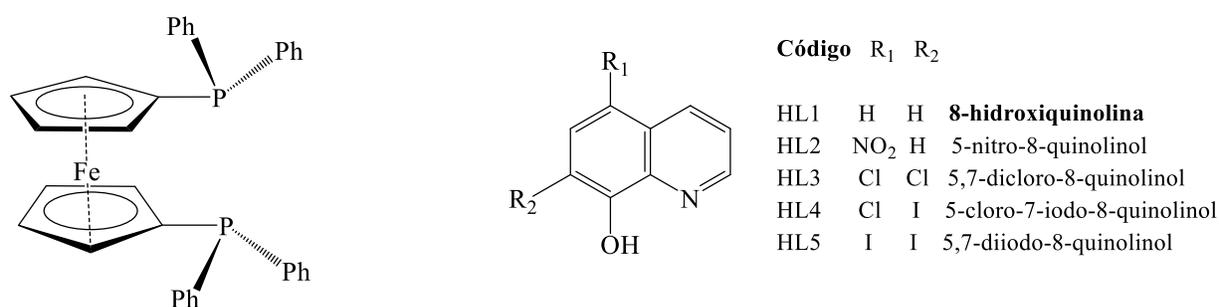
Los compuestos se evaluaron frente a distintos microorganismos: sobre la forma infectiva de *T. brucei*, sobre la forma amastigote de *L. infantum*, sobre cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis* y sobre macrófagos murinos y células de pulmón humano MRC-5 como modelo de células de mamífero, para evaluar su potencialidad como fármacos de amplio espectro. En general, mostraron una mejora en la actividad contra *T. brucei* y selectividad hacia el parásito con respecto a los ligandos libres. Los compuestos de Pd(II) fueron más activos que los análogos de Pt(II) pero los compuestos de Pt(II) fueron menos tóxicos que los de Pd(II). Además, estos compuestos fueron más activos que los ligandos libres contra *L. infantum* pero poco selectivos hacia el parásito. Los nuevos compuestos también fueron activos en la cepa H37Rv sensible de *M. tuberculosis*, pero mostraron una menor actividad en aislados clínicos resistentes y una baja selectividad hacia *M. tuberculosis*, a excepción del compuesto Pd-dppf-trop, que resultó más activo en el aislado

triplemente resistente CF100 que casi todos los fármacos testeados. Respecto a los posibles mecanismos de acción, el efecto antiparasitario no se pudo atribuir a una posible interferencia de los compuestos con la homeostasis tiol-redox del patógeno, pero el ADN podría ser un potencial blanco de acción. Los resultados globales apuntan a que los compuestos de Pt(II) de esta familia son los más prometedores como base para el desarrollo de nuevos potenciales fármacos anti-*T. brucei*.

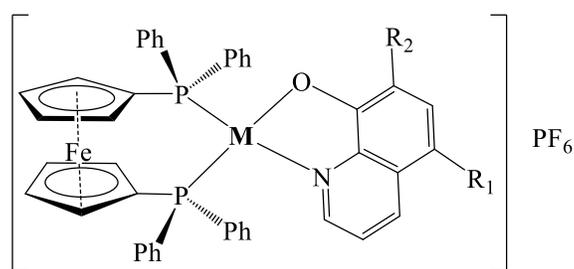
Capítulo 4:  
Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados  
de la 8-hidroxiquinolina

## 4.1 Introducción

Este capítulo trata sobre el desarrollo de un grupo de diez nuevos compuestos heterobimetálicos de Pd(II)-Fe y Pt(II)-Fe que contienen el derivado de ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf) como coligando y a ligandos bioactivos (HL) derivados de la 8-hidroxiquinolina (8HQ), cuya fórmula general es  $[M^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ . De forma resumida se identificarán de ahora en adelante como M-dppf-L (figura 4.1). En este apartado se expone la síntesis y caracterización en estado sólido y en solución de estos compuestos, así como la evaluación de propiedades fisicoquímicas de interés biológico (lipofilia y estabilidad en solución), la evaluación *in vitro* sobre la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), frente a células de cáncer de ovario A2780 y sobre células de macrófagos murinos como modelo de células sanas y, adicionalmente, posibles mecanismos de acción.



**1,1'-bis(difenilfosfino(ferroceno))**  
(dppf)



**M-dppf-L**

M = Pd(II) o Pt(II)

Figura 4.1: Estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II) y HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina.

También se expondrá el desarrollo de un estudio cuantitativo de relación estructura-actividad que involucra a los 10 compuestos detallados en este capítulo, los 4 compuestos anteriormente estudiados en el capítulo 2 ( $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$ , M = Pd o Pt, HL = tropolona (Htrop) o hinokitiol (Hhino)), y a una serie de compuestos estructuralmente relacionados de fórmula general  $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$ , M = Pd o Pt, HL = derivados de tiosemicarbazonas, desarrollados por nuestro grupo en la tesis de Doctorado del Dr. Esteban Rodríguez Arce finalizada en 2018.

#### 4.2 Síntesis de compuestos M-dppf-L (M = Pd(II) o Pt(II), HL = HL1-HL5, derivados de la 8-hidroxiquinolina)

Los complejos de Pd(II) y Pt(II) con los ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina fueron sintetizados según lo indicado en el capítulo 2. El método de síntesis está basado en la reacción de sustitución de los ligandos cloruro del respectivo precursor  $[M^{II}Cl_2(dppf)] \cdot CHCl_3$  (o M-dppf-Cl<sub>2</sub>, donde M = Pd o Pt) por los ligandos bidentados, ya sea que se trabajaran éstos en forma de sal sódica o previamente desprotonados por acción de la trietilamina. La síntesis de los compuestos de Pd(II) y de Pt(II) con ligandos análogos presenta diferencias. En líneas generales, para el caso de los compuestos de Pt(II) y aquellos derivados de 8HQ con sustituyentes más polares (HL1-HL3) se trabajó con las sales sódicas de los ligandos o con ligandos desprotonados y tiempos de agitación relativamente cortos. Para el caso de los derivados con sustituyentes más pesados y, por lo tanto, con menor solubilidad en metanol (HL4 y HL5), se trabajó exclusivamente con ligandos desprotonados con trietilamina y tiempos de agitación mayores. Todas las mezclas fueron agitadas a temperatura ambiente durante tiempos variables, excepto para el complejo con HL2, que requirió reflujo por 5 h.

En el caso de los compuestos de Pd(II), si bien las síntesis se realizaron todas con ligandos desprotonados con trietilamina, los tiempos de agitación no siguieron la misma secuencia que el caso de los compuestos de Pt(II). En ambos casos, todos los sólidos obtenidos de las síntesis fueron recristalizados mediante difusión lenta líquido-líquido CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano, obteniéndose cristales de color rojo para los compuestos de Pd(II) y cristales de color amarillo para los compuestos de Pt(II). En la tabla 4.1 se presenta los rendimientos obtenidos en la síntesis de cada nuevo complejo.

Tabla 4.1: Rendimientos de síntesis de los nuevos compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), y HL = derivados de la 8-hidroxiquinolina.

Ligando	% Rendimiento	
	Pd-dppf-L	Pt-dppf-L
L1	35	46
L2	41	32
L3	37	52
L4	30	60
L5	26	63

### 4.3 Caracterización

#### 4.3.1 Caracterización en estado sólido

##### 4.3.1.1 Análisis elemental

Mediante análisis elemental de elementos livianos se obtuvo la composición porcentual experimental de C, N, S y H de las muestras recristalizadas, y se comparó con los valores calculados para cada complejo a partir de la fórmula propuesta. Los resultados obtenidos, resumidos en la tabla 4.2 confirmaron la fórmula propuesta para cada complejo, asegurando a su vez la ausencia de S en las muestras.

Tabla 4.2: Resultados del análisis elemental de C, N y H de los complejos M-dppf-L, M = Pd(II) o Pt(II), y HL = derivados de la 8-hidroxiquinolina.

Complejo	%C <sub>exp</sub> (%C <sub>teórico</sub> )	%H <sub>exp</sub> (%H <sub>teórico</sub> )	%N <sub>exp</sub> (%N <sub>teórico</sub> )
Pd-dppf-L1	54,71 (54,37)	3,91 (3,61)	1,55 (1,47)
Pd-dppf-L2	51,33 (51,91)	3,50 (3,34)	2,61 (2,82)
Pd-dppf-L3	50,42 (50,69)	3,23 (3,17)	1,36 (1,37)
Pd-dppf-L4	46,30 (46,52)	2,94 (2,91)	1,24 (1,26)
Pd-dppf-L5	43,04 (42,98)	2,77 (2,68)	1,20 (1,17)

Pt-dppf-L1	50,07 (49,73)	3,29 (3,30)	1,37 (1,35)
Pt-dppf-L2	47,27 (47,66)	3,36 (3,07)	2,49 (2,59)
Pt-dppf-L3	46,39 (46,63)	2,68 (2,91)	1,20 (1,26)
Pt-dppf-L4	42,87 (43,09)	2,73 (2,67)	1,21 (1,17)
Pt-dppf-L5	39,65 (40,02)	2,65 (2,50)	1,06 (1,09)
Los valores de %S fueron 0,00 en todos los casos			

#### 4.3.1.2 Espectroscopía infrarroja

Tal como se indicó en el capítulo 2, la espectroscopía infrarroja fue utilizada para identificar algunas de las bandas de vibración características de grupos funcionales de los ligandos y para asignar, de forma tentativa, dichas bandas en los espectros de los complejos obtenidos. En la figura 4.2 se muestran, de forma ilustrativa, los espectros de infrarrojo obtenidos para los compuestos M-dppf-L1, de forma comparativa, donde se evidencia un perfil espectral similar para compuestos con el mismo ligando. Esta tendencia se cumplió en todos los casos.

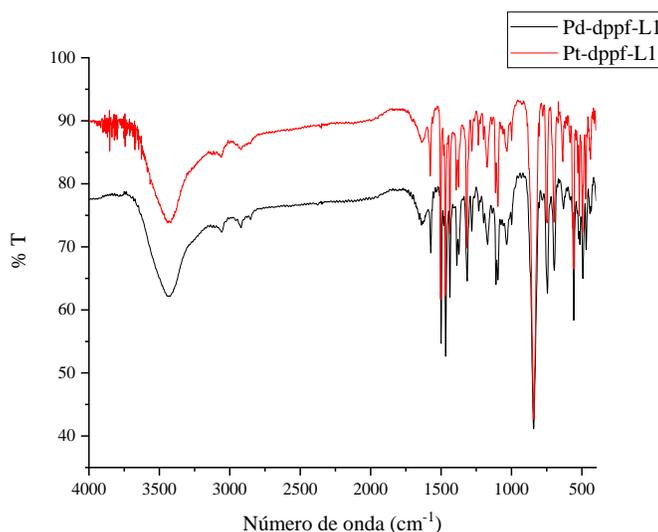


Figura 4.2: Espectros de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-L1 (línea negra) y Pt-dppf-L1 (línea roja) en el rango entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Al comparar los espectros de compuestos con el mismo centro metálico y diferente ligando se observa un corrimiento de los perfiles espectrales hacia números de onda más pequeños (menor energía) a medida que los sustituyentes del ligando 8HQ son más pesados (figura 4.3). Está

observación concuerda con el hecho de que al tener átomos más pesados los enlaces vibran a menor energía (asumiendo que los enlaces entre los átomos son similares a un resorte, como postula la ley de Hooke).

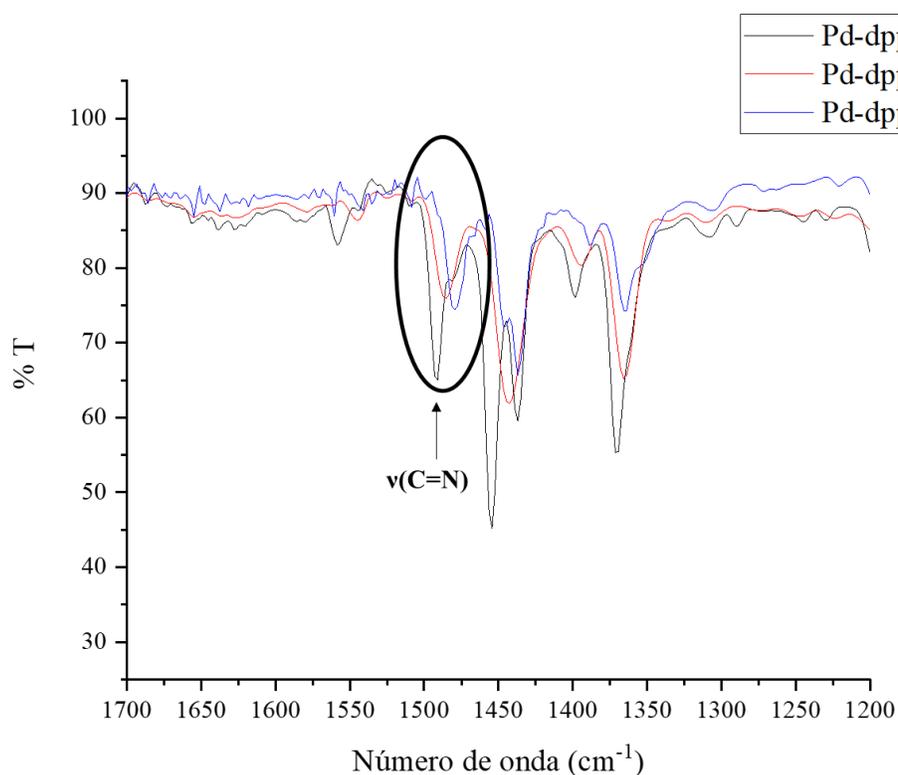


Figura 4.3: Espectros de infrarrojo de los complejos Pd-dppf-L3 (línea negra), Pd-dppf-L4 (línea roja) y Pd-dppf-L5 (línea azul) en el rango entre 1700-1200  $\text{cm}^{-1}$ . Se muestra el desplazamiento de la banda vibracional del estiramiento del enlace C=N, a modo de ejemplo.

En todos los espectros se observaron bandas de absorción características tanto de los precursores  $[\text{MCl}_2(\text{dppf})]$  como de los diferentes ligandos bioactivos: 8-hidroxiquinolina (HL1); 5-nitro-8-quinolinol (HL2); 5,7-dicloro-8-quinolinol (HL3); 5-cloro-7-iodo-8-quinolinol (HL4) o 5,7-diiodo-8-quinolinol (HL5). En general, se observó el desplazamiento y/o cambio en la intensidad de las bandas vibracionales de los enlaces cercanos al sitio de coordinación con respecto a los ligandos en su forma libre, como se observa en las tablas 4.3, 4.5 y 4.5y en la figura 4.4, dando cuenta de la coordinación de los ligandos bioactivos al centro metálico. Según literatura, ambos precursores  $[\text{MCl}_2(\text{dppf})]$  poseen cinco bandas características correspondientes al ligando dppf: 1480 y 1434 ( $\nu \text{C}=\text{C}$ ), 1098 ( $\nu \text{C}-\text{P}$ ), 690 ( $\delta_{\text{oop}} \text{C}-\text{H}$ ) y 490  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu \text{Cp}-\text{Fe}$ )<sup>[147]</sup>. En los espectros

de todos los compuestos se identificaron estas cinco bandas de vibración. No se observaron grandes variaciones en los valores de estas frecuencias, debido a que el fragmento  $\{M(dppf)\}$ ,  $M=Pd(II)$  o  $Pt(II)$ , no se ve afectado en gran medida por la coordinación de los ligandos 8HQ. Todos los compuestos cuentan con el anión  $PF_6^-$  como contraión, el cual presenta bandas características alrededor de  $835\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}(P-F)$ ) y  $559\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta(F-P-F)$ ) [148], observadas en todos los espectros de los compuestos.

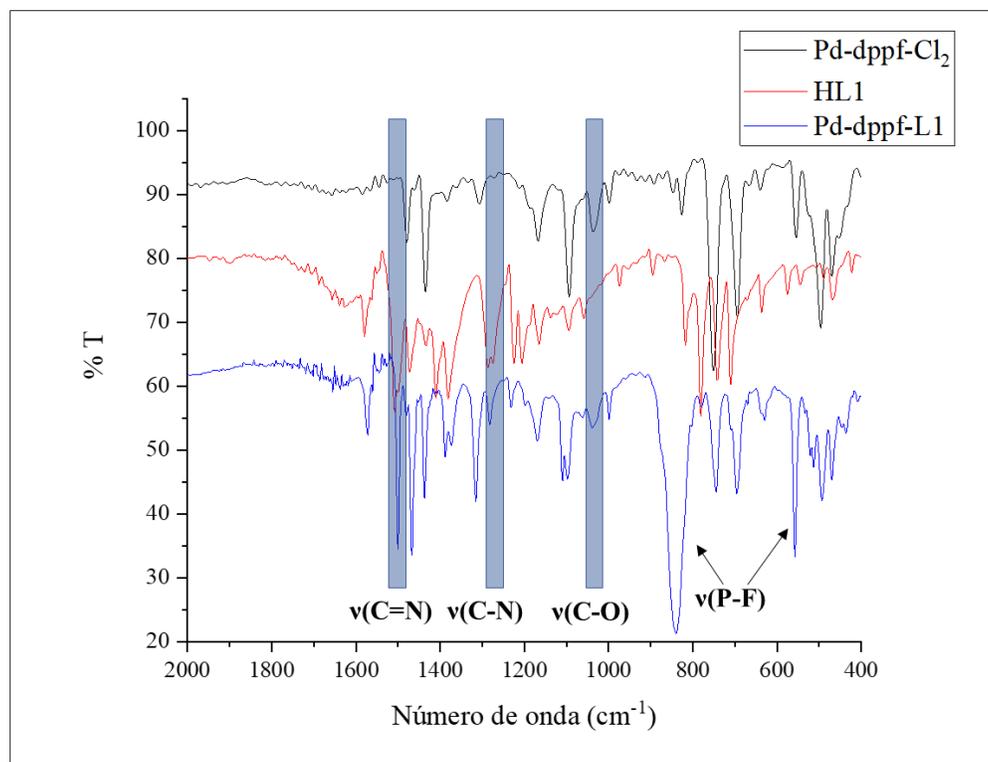


Figura 4.4: Espectro de infrarrojo del precursor Pd-dppf-Cl<sub>2</sub> (línea negra), del ligando libre HL1 (línea roja) y del complejo Pd-dppf-L1 (línea azul) en el rango entre 2000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

En los espectros de los ligandos libres, en la región entre 3450-3100  $\text{cm}^{-1}$ , se encuentra la banda asociada al estiramiento del enlace O-H. Esta banda no es observada en los espectros de los complejos, indicando que este grupo está desprotonado y por lo tanto, disponible para participar en el enlace con el centro metálico [180–182]. Adicionalmente, los espectros presentan tres bandas de vibración de interés:  $\nu(C=N)$ ,  $\nu(C-N)$  y  $\nu(C-O)$ . La identificación de estas bandas en los espectros de los compuestos se realizó de forma tentativa, basada en asignaciones realizadas previamente en compuestos conteniendo estos ligandos de forma bidentada [180–190]. Debido a la similitud estructural de los ligandos bioactivos, la asignación tentativa de las bandas es similar.

Tabla 4.3: Principales bandas de IR de HL = 8-hidroxiquinolina (HL1) o 5,7-dicloro-8-quinolinol (HL3), y los complejos M-dppf-L correspondientes ( $\text{cm}^{-1}$ ).

	<b>HL1</b>	<b>Pd-dppf-L1</b>	<b>Pt-dppf-L1</b>	<b>HL3</b>	<b>Pd-dppf-L3</b>	<b>Pt-dppf-L3<sub>2</sub></b>
<b>v(O-H)</b>	3204 (m)	-	-	3164 (m)	-	-
<b>v(C=N)</b>	1508 (vs)	1501 (vs)	1503 (vs)	1498 (s)	1492 (s)	1495 (s)
<b>v(C-N)</b>	1286 (s)	1316 (m)	1318 (m)	1275 (m)	1286 (vw)	1292 (vw)
<b>v(C-O)</b>	1059 (s)	1110 (m)	1113 (m)	1051 (w)	1116 (w)	1118 (w)
Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro						

 Tabla 4.4: Principales bandas de IR de HL = 5-cloro-7-iodo-8-quinolinol (HL4) o 5,7-diiodo-8-quinolinol (HL5), y los complejos M-dppf-L correspondientes ( $\text{cm}^{-1}$ ).

	<b>HL4</b>	<b>Pd-dppf-L4</b>	<b>Pt-dppf-L4</b>	<b>HL5</b>	<b>Pd-dppf-L5</b>	<b>Pt-dppf-L5</b>
<b>v(O-H)</b>	3172 (m)	-	-	3428 (m)	-	-
<b>v(C=N)</b>	1490 (s)	1486 (m)	1489 (m)	1483 (s)	1476 (m)	1483 (m)
<b>v(C-N)</b>	1273 (m)	1311 (vw)	1311 (vw)	1269 (m)	1305 (vw)	1306 (vw)
<b>v(C-O)</b>	1043 (w)	1113 (vw)	1110 (vw)	1043 (w)	1110 (sh)	1113 (w)
Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro						

En los espectros de los compuestos la banda asociada al estiramiento del enlace C-O se desplazó hacia valores de frecuencia mayores en todos los casos (tablas 4.3, 4.5 y 4.5). Este comportamiento ha sido anteriormente observado en espectros de complejos con diferentes centros metálicos (Ce, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pt, Ag, Hg) con HL1 [183], HL3[184] y HL4 [180,182,185–187] coordinando de forma bidentada. Este desplazamiento indica que el ligando se encuentra unido al centro metálico a través del átomo de oxígeno fenólico. La banda asociada al estiramiento del enlace C=N (1480-1510  $\text{cm}^{-1}$  en los ligandos libres) se ve desplazada hacia frecuencias menores en todos los casos, al igual que en compuestos relacionados [182,188]. En el caso de la banda de

vibración del enlace C-N, el desplazamiento ocurre hacia mayores frecuencias, de forma similar a compuestos conteniendo HL1 [183] y HL3 [184] como ligandos bidentados. Estas variaciones en los corrimientos de estas bandas indicarían que el ligando coordina también a través del átomo de nitrógeno quinolínico.

Tabla 4.5: Principales bandas de absorción de HL = 5-nitro-8-quinolinol (HL2) y los complejos M-dppf-L2 correspondientes ( $\text{cm}^{-1}$ ).

	<b>HL2</b>	<b>Pd-dppf-L2</b>	<b>Pt-dppf-L2</b>
<b><math>\nu(\text{O-H})</math></b>	3172 (m)	-	-
<b><math>\nu(\text{N-O})_{\text{as/s}}</math></b>	1511 (vs) /1289 (s)	1508(s) /1291 (vs)	1508(s)/1298 (vs)
<b><math>\nu(\text{C-N})</math></b>	1273 (m)	1311 (vw)	1311 (vw)
<b><math>\nu(\text{C-O})</math></b>	1043 (w)	1113 (vw)	1110 (vw)
Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro			

Por otra parte, en el espectro del derivado 5-nitro-8-quinolinol se identificaron adicionalmente las bandas del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-O del grupo nitro. Estas bandas han sido reportadas en compuestos relacionados [189], con desplazamientos muy similares a los observados en la tabla 5.

De esta forma, los resultados generales confirman la coordinación de los ligandos bioactivos derivados de la 8HQ en forma bidentada a los fragmentos {M-dppf} para todos los compuestos sintetizados.

#### 4.3.1.3 Difracción de rayos X en monocristal (DRX)

Se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X de monocristal de seis de los diez nuevos compuestos sintetizados. Éstos se obtuvieron mediante recristalización por difusión lenta líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexano). En la figura 4.5 se muestra la estructura cristalina

resuelta de los complejos Pd-dppf-L1, Pd-dppf-L3, Pd-dppf-L4, Pt-dppf-L1, Pt-dppf-L2 y Pt-dppf-L3

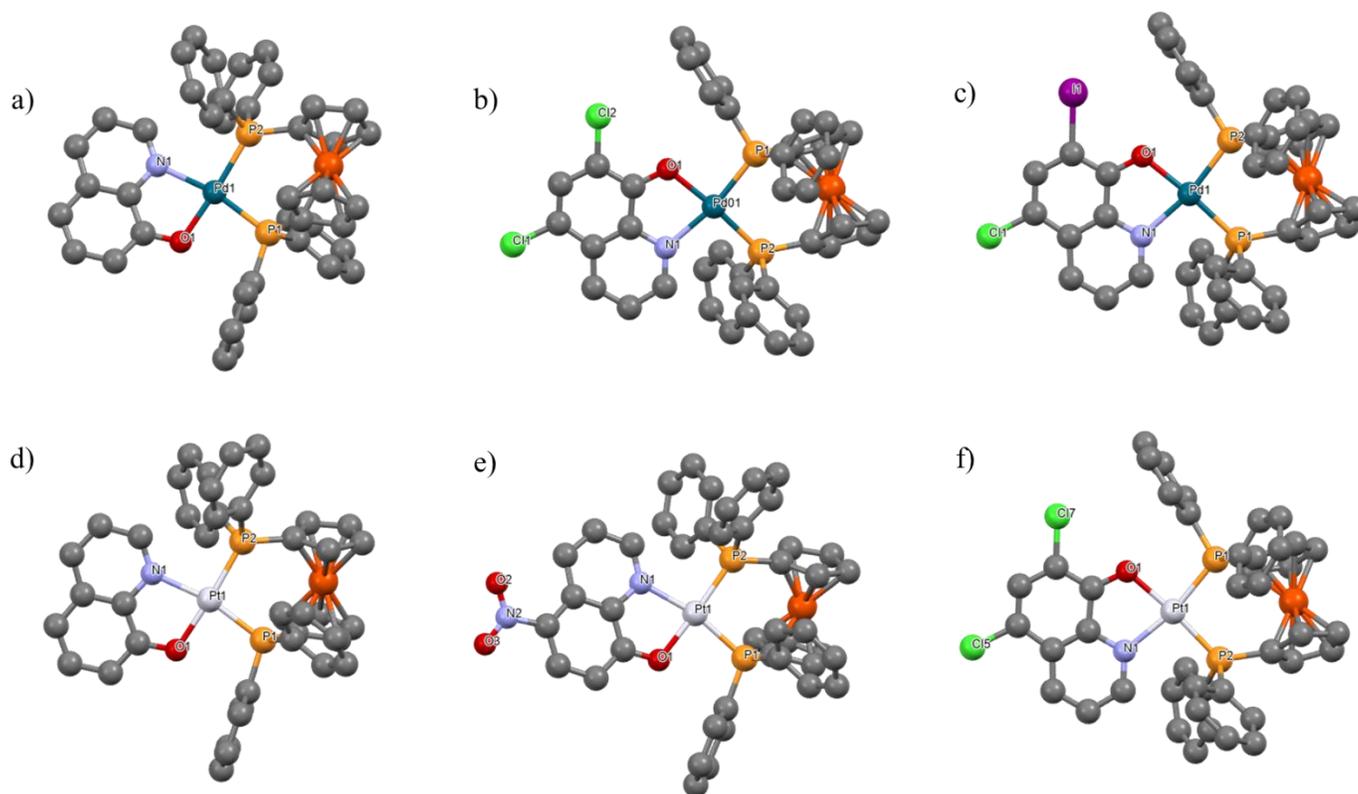


Figura 4.5: Estructura cristalina de los complejos (a) Pd-dppf-L1, (b) Pd-dppf-L3, (c) Pd-dppf-L4, (d) Pt-dppf-L1, (e) Pt-dppf-L2 y (f) Pt-dppf-L3. Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno, moléculas de disolvente y el contraión  $\text{PF}_6^-$  han sido removidos para mayor claridad.

En las tablas 4.6 y 4.7 se resumen los datos cristalográficos relevantes para la resolución de las estructuras, los parámetros de celda, y los procedimientos de la recolección de datos y resultados de refinación de todos los complejos.

Tabla 4.6: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pd-dppf-L1, Pd-dppf-L3 y Pd-dppf-L4.

## Capítulo 4 – Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de 8HQ

	Pd-dppf-L1	Pd-dppf-L3	Pd-dppf-L4
	$C_{43}H_{34}F_6FeNOP_3Pd$	$C_{43}H_{32}Cl_2F_6FeNOP_3Pd$	$C_{43}H_{32}ClF_6FeINOP_3Pd$
Peso fórmula	949,93	1018,75	1109,20
Temperatura (K)	298(2)	298(2)	298(2)
Longitud de onda (Å)	MoK $\alpha$ ( $\lambda = 0,71073$ )	CuK $\alpha$ ( $\lambda = 1,54178$ )	CuK $\alpha$ ( $\lambda = 1,54178$ )
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> /c
Dimensiones de celda unidad			
a (Å)	10,6523 (4)	11,9767 (5)	12,1289 (2)
b (Å)	27,2163 (9)	36,810 (2)	36,9940 (7)
c (Å)	16,1957 (6)	9,6399 (4)	9,7312 (2)
$\beta$ (°)	101,297 (1)	110,311 (2)	110,721 (1)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4604,4 (3)	3985,6 (3)	4083,9 (1)
Z; (calculada, mg m <sup>-3</sup> )	4; 1,3702	4; 1,698	4; 1,804
Coeficiente absorción (mm <sup>-1</sup> )	0,865	9,501	14,607
F (000)	1912,0	2040,0	2180,0
Forma/color del cristal	Prisma rectangular / marrón	Prisma rectangular /marrón	Prisma / marrón
Tamaño (mm <sup>3</sup> )	0,383 × 0,222 × 0,185	0,223 × 0,095 × 0,026	0,175 x 0,062 x 0,052
Rango de $\theta$ (°) para recolección de datos	2,9 a 25,41	3,94 a 68,40	4,78 a 68,35
Rangos de indexado	-12 ≤ h ≤ 12, -32 ≤ k ≤ 32, -19 ≤ l ≤ 19	-14 ≤ h ≤ 14, -44 ≤ k ≤ 44, -11 ≤ l ≤ 8	-13 ≤ h ≤ 14, -44 ≤ k ≤ 44, -11 ≤ l ≤ 9
Reflexiones colectadas	71524	42643	30208
Reflexiones independientes	8442	7286	7446
Reflexiones observadas [I > 2 $\sigma$ (I)]	7530	6753	6800
Completado (%)	99,5	99,4	99,3
Corrección de absorción	multi-scan	multi-scan	multi-scan
Transmisión máx. y min.	0,7457 y 0,6856	0,4785 y 0,7531	0,4319 y 0,7531
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>
Datos / restricciones / parámetros	8442/402/564	7286/225/582	7446 / 281 / 581

Calidad del ajuste de $F^2$	1,093	1,020	1,094
Índices R finales <sup>a</sup> [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0376$ ; $wR_2 = 0,0880$	$R_1 = 0,0255$ ; $wR_2 = 0,0616$	$R_1 = 0,0312$ ; $wR_2 = 0,0744$
Índices R (todos los datos)	$R_1 = 0,0440$ ; $wR_2 = 0,0929$	$R_1 = 0,0284$ ; $wR_2 = 0,0632$	$R_1 = 0,0351$ ; $wR_2 = 0,0763$
Mayor diferencia de pico ( $e.\text{\AA}^{-3}$ )	0,58 y -0,52	0,37 y -0,35	0,59 y -0,66

Tabla 4.7: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Pt-dppf-L1, Pt-dppf-L2 y Pt-dppf-L3

	Pt-dppf-L1	Pt-dppf-L2	Pt-dppf-L3
	$C_{43}H_{34}F_6FeNOP_3Pt$	$C_{45}H_{37}Cl_4F_6FeN_2O_3P_3Pt$	$C_{43}H_{32}Cl_2F_6FeNOP_3Pt$
Peso fórmula	1038,59	1253,41	1107,44
Temperatura (K)	298(2)	296	273
Longitud de onda ( $\text{\AA}$ )	MoK $\alpha$ ( $\lambda = 0,71073$ )	CuK $\alpha$ ( $\lambda = 1,54178$ )	MoK $\alpha$ ( $\lambda = 0,71073$ )
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$	P-1	$P2_1/c$
Dimensiones celda unidad			
a ( $\text{\AA}$ )	10,6410 (4)	10,379 (1)	12,013 (2)
b ( $\text{\AA}$ )	27,265 (1)	12,998 (1)	36,915 (7)
c ( $\text{\AA}$ )	16,1928 (7)	18,123 (2)	9,755 (2)
$\beta$ ( $^\circ$ ) / $\alpha, \beta, \gamma$	101,470 (2)	102,163 (8); 92,428 (8); 94,452 (8)	111,00(3)
Volumen ( $\text{\AA}^3$ )	4604,1 (3)	2377,9 (5)	4038,7 (2)
Z; (calculada, $g\text{ cm}^{-3}$ )	4; 1,4982	2; 1,751	4; 1,821
Coeficiente absorción ( $mm^{-1}$ )	3,509	11,465	4,135
F (000)	2037,2	1232,0	2168,0
Forma/color del cristal	Prisma/ amarillo	Prisma/ naranja	Prisma/ naranja
Tamaño ( $mm^3$ )	$0,264 \times 0,13 \times 0,11$	$0,284 \times 0,172 \times 1,115$	$0,405 \times 0,128 \times 0,124$
Rango de $\vartheta$ ( $^\circ$ ) para recolección de datos	5,8 a 52,3	3,5 a 67,7	2,8 a 30,1

Rangos de indexado	$-13 \leq h \leq 13,$ $-33 \leq k \leq 33,$ $-20 \leq l \leq 20$	$-12 \leq h \leq 12,$ $-15 \leq k \leq 15,$ $-21 \leq l \leq 21$	$0 \leq h \leq 16,$ $-51 \leq k \leq 0,$ $-12 \leq l \leq 11$
Reflexiones colectadas	124124	30829	9322
Reflexiones independientes	9154	8556	9322
Reflexiones observadas [I>2σ(I)]	7825	6040	6942
Completitud (%)	99,7	99,3	78,5
Corrección de absorción	multi-scan	multi-scan	multi-scan
Transmisión máx. y min.	0,7453 y 0,5791	0,3840 y 0,2169	0,4721 y 0,7460
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>	Mínimos cuadrados de matriz completa en F <sup>2</sup>
Datos / restricciones / parámetros	9154/36/504	8556/189/586	9322/324/558
Calidad del ajuste de F <sup>2</sup>	1,064	1,046	1,049
Índices R finales <sup>a</sup> [I>2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0,0296; wR <sub>2</sub> = 0,0648	R <sub>1</sub> = 0,0541; wR <sub>2</sub> = 0,1333	R <sub>1</sub> = 0,0568; wR <sub>2</sub> = 0,1478
Índices R (todos los datos)	R <sub>1</sub> = 0,0387; wR <sub>2</sub> = 0,0696	R <sub>1</sub> = 0,0878; wR <sub>2</sub> = 0,1579	R <sub>1</sub> = 0,0814; wR <sub>2</sub> = 0,1606
Mayor diferencia de pico (e.Å <sup>-3</sup> )	1,32 y -0,83	0,65 y -0,99	0,92 y -1,58
<sup>a</sup> R <sub>1</sub> =Σ  F <sub>o</sub>  - F <sub>c</sub>   /Σ F <sub>o</sub>  , wR <sub>2</sub> =[Σw( F <sub>o</sub>   <sup>2</sup> - F <sub>c</sub>   <sup>2</sup> ) <sup>2</sup> /Σw( F <sub>o</sub>   <sup>2</sup> ) <sup>2</sup> ] <sup>1/2</sup>			

El estudio de difracción de rayos X de monocristal mostró que todas las estructuras obtenidas son isoestructurales entre sí, es decir, comparten una estructura general pero las dimensiones de la celda unidad no son necesariamente iguales ni la naturaleza de los átomos es la misma. A su vez, al igual que las estructuras obtenidas para los compuestos M-dppf-trop o M-dppf-hino (descritos en el capítulo anterior), donde se mantienen los ligandos pero cambia el centro metálico, las estructuras cristalinas de compuestos con el mismo ligando 8HQ o con ligandos similares (como L3 y L4) se pueden llamar isomorfos, ya que además de compartir el sistema cristalino y el grupo espacial (monoclínico y P2<sub>1</sub>/c, respectivamente), tienen incluso dimensiones de celda similares. Por su parte, el compuesto Pt-dppf-L2 cristalizó en un sistema triclinico con grupo espacial P-1[152,153]. En todos los casos, los iones metálicos centrales se encuentran en un entorno casi

plano, con el derivado de 8HQ coordinado como ligando bidentado a través de su átomo de oxígeno fenólico y a través del átomo de nitrógeno del anillo piridínico, y con el coligando 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno actuando como ligando bidentado a través de sus átomos de fósforo, en concordancia con lo propuesto en el análisis por espectroscopía infrarroja. Todos los compuestos, excepto Pt-dppf-L2, presentan cuatro moléculas por celda unidad con sus respectivos contraiones (figura 4.6).

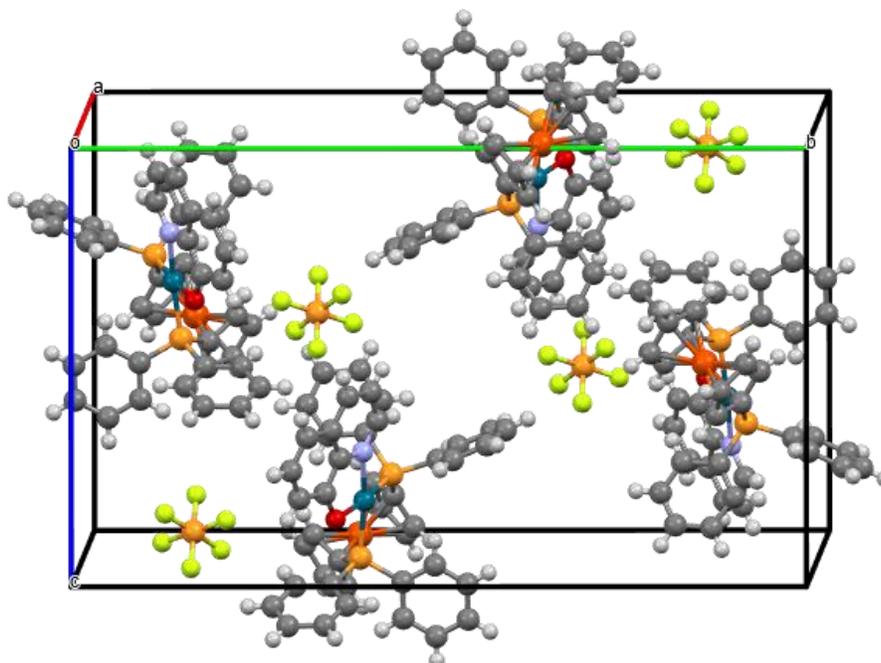


Figura 4.6: Representación de la celda unidad de la estructura cristalina del compuesto Pd-dppf-L1 a modo de ejemplo.

En el caso de las estructuras de los compuestos de Pd(II), las distancias entre el centro metálico y el átomo de oxígeno se encuentran en el rango de 2,030 – 2,046 Å y las distancias Pd(II)-N son ligeramente más grandes, encontrándose en el rango de 2,135 – 2,142 Å (tabla 4.8), al igual que para otros complejos previamente reportados con estos ligandos. El mismo comportamiento se observó en los complejos de Pt(II), donde las distancias Pt-O y Pt-N también se encuentran en los rangos observados para otros compuestos similares [184,189,191,192].

Tabla 4.8. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del centro metálico en los complejos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL derivados de 8-hidroxiquinolina.

	Pd-dppf-L1	Pd-dppf-L3	Pd-dppf-L4	Pt-dppf-L1	Pt-dppf-L2	Pt-dppf-L3
<b>Distancias de enlace (Å)</b>						
M-O1	2,030 (3)	2,046 (2)	2,038 (4)	2,033 (3)	2,036 (4)	2,062 (5)
M-N1	2,136 (3)	2,135 (3)	2,142 (5)	2,122 (3)	2,127 (6)	2,109 (8)
M-P1	2,277 (1)	2,272 (5)	2,277 (4)	2,2580 (9)	2,260 (1)	2,261 (3)
M-P2	2,282 (1)	2,273 (7)	2,275 (7)	2,2572 (9)	2,263 (1)	2,266 (2)
<b>Ángulos de enlace (°)</b>						
O1-M-P1	86,39 (9)	88,58 (6)	88,42 (9)	86,48 (8)	87,2 (2)	88,0 (2)
P2-M-P1	96,98 (3)	96,16 (3)	96,13 (5)	97,48 (3)	95,91 (6)	97,0 (8)
P2-M-O1	173,5 (1)	175,04 (7)	175,31 (9)	173,11 (9)	176,9 (1)	174,9 (2)
N1-M-P1	167,79 (9)	169,01 (7)	168,81 (9)	167,3 (1)	166,7 (1)	168,4 (2)
N1-M-O1	81,47 (9)	80,47 (9)	80,51 (9)	80,8 (1)	79,6 (2)	80,4 (3)
N1-M-P2	95,28 (9)	94,76 (7)	95,08 (9)	95,2 (1)	97,3 (2)	94,6 (2)
<b>Ángulo de torsion (°)</b>						
P1- centroide <i>Cp</i> <sub>1</sub> - centroide <i>Cp</i> <sub>2</sub> -P2	33,93	31,16	31,08	34,22	33,86	31,61

Las distancias M-P también se encuentran dentro de los rangos observados en otros complejos con el ligando bidentado dppf (tabla 4.8) [141], y no se encontraron grandes variaciones en estas distancias de enlace en comparación al precursor utilizado M-dppf-Cl<sub>2</sub>. En particular, en el complejo precursor Pd-dppf-Cl<sub>2</sub> se obtuvo Pd-P1 = 2,283 Å y Pd-P2 = 2,301 Å [155], y en Pt-dppf-Cl<sub>2</sub> fueron Pt-P1 = 2,252 Å y Pt-P2 = 2,260 Å [156].

En todas las estructuras el ligando dppf mostró la conformación antiprisma pentagonal alrededor del átomo de hierro en el fragmento de ferroceno, con los anillos *Cp* escalonados entre sí. Las distancias Fe-C están en el rango de 2,007 – 2,086 Å en complejos de Pt(II) y 1,995 – 2,758 Å en compuestos de Pd(II). El ángulo de torsión del fragmento de ferroceno (ángulo comprendido entre

P1-centroide de  $Cp_1$ -centroide de  $Cp_2$ -P2) fue cercano a los  $36^\circ$  ( $31^\circ - 34^\circ$ ) en todos los compuestos, determinando así una conformación del tipo escalonada de los anillos ciclopentadienilo. Los precursores  $[M^{II}Cl_2(dppf)]$  también mostraron este tipo de conformación (Pd-dppf- $Cl_2$ :  $39,5^\circ$ ) [157], lo que indica que en estado sólido este parámetro varía poco al modificar el entorno químico de este fragmento organometálico.

Las estructuras cristalinas de dos de los compuestos presentaron características interesantes. En el caso del compuesto Pt-dppf-L2, cocrystalizó con dos moléculas de diclorometano, solvente utilizado en el sistema de cristalización descrito en el capítulo 2, por lo que por celda unidad solo se encontraron dos moléculas de compuesto, a diferencia de las cuatro moléculas encontradas para el resto de los casos. Por otro lado, los cristales obtenidos del compuesto Pt-dppf-L3 presentaron características propias de un cristal twin, que se define como un material policristalino, formado por dos o más porciones homogéneas de la misma especie cristalina en yuxtaposición, y orientadas entre sí de acuerdo con leyes bien definidas [193]. El cristal medido del compuesto Pt-dppf-L3 presentó tres distintos dominios (o porciones homogéneas) con distinta orientación. Al tomar en cuenta solo la región mayoritaria, el porcentaje de completitud (referido a la fracción de reflexiones únicas medidas necesarias para la resolución de la estructura) es solo 78,5 %, a diferencia de las otras estructuras estudiadas (ver tabla 4.7, % completitud). Sin embargo, fue posible obtener datos suficientes para definir parámetros como el sistema cristalino, grupo espacial, celda unidad, dimensiones de celda, entre otros. A su vez, el contraión  $PF_6^-$  presentó desorden posicional; se identificaron dos posiciones en el espacio con una relación 7:3. Este desorden posicional fue refinado utilizando comandos que restringen ángulos y distancias de enlace (SADI, SAME), considerando la geometría octaédrica del anión, y restricciones de parámetros de desplazamiento anisotrópico (SIMU, RIGU) implementando el programa SHELXL [112].

#### 4.3.2 Caracterización en solución

##### 4.3.2.1 Conductimetría

Se midió la conductividad en soluciones de concentración 1 mM de complejo en DMSO. Se obtuvieron valores de conductividad molar cercanos a  $25 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . Por ejemplo, para el complejo Pt-dppf-L1 se obtuvo un valor de conductividad molar de  $22,1 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . Estos valores

se encuentran ligeramente por debajo del rango reportado para electrolitos 1:1 en solución de DMSO (rango de 23 - 42  $\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ ) [114], probablemente debido al gran tamaño de los iones en comparación con los de los electrolitos estudiados por Sears *et al.* [158]. La conductividad fue medida durante cinco días luego de la preparación de las soluciones, no observándose cambios en estos valores. Esto da cuenta de la estabilidad que estos complejos poseen en solución de DMSO en relación a la posible generación de especies con diferente carga por sustitución de los ligandos 8HQs por DMSO durante el tiempo de estudio.

#### 4.3.2.2 Resonancia magnética nuclear

Parte de la caracterización en solución de los diez nuevos complejos se realizó mediante resonancia magnética nuclear unidimensional ( $^1\text{H}$ -RMN) y bidimensional (COSY) a temperatura ambiente y en solución de DMSO- $d_6$ . En todos los espectros se observaron las señales correspondientes a los protones del ligando dppf y a los protones de los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina (L1-L5). En general, las integraciones, multiplicidades y desplazamientos de las señales concuerdan con la estequiometría propuesta para los complejos.

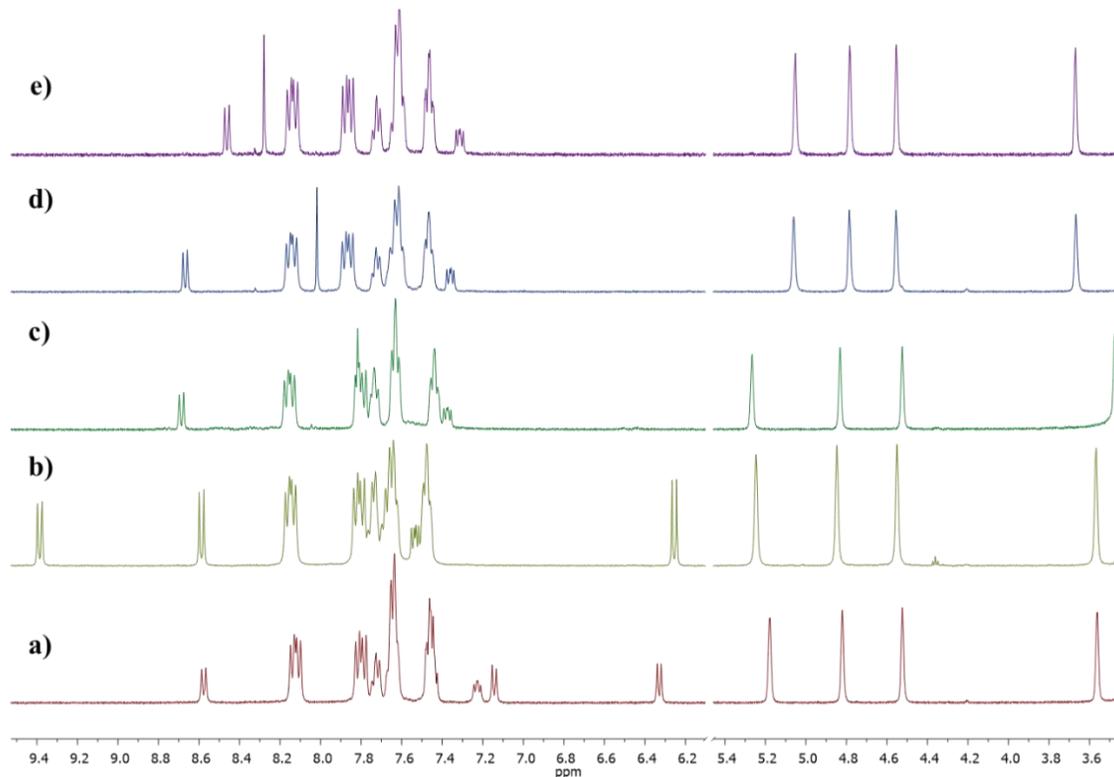


Figura 4.7: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pt-dppf-L1 b) Pt-dppf-L2, c) Pt-dppf-L3, d) Pt-dppf-L4 y e) Pt-dppf-L5 en  $\text{DMSO-d}_6$ .

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de complejos con el mismo centro metálico y los distintos ligandos derivados de 8HQ presentaron un perfil de señales similar, como se evidencia en la figura 4.7 donde, a modo de ejemplo, se muestran los espectros de los compuestos Pt-dppf-L, siendo HL = HL1-HL5. Por otro lado, los espectros de compuestos con el mismo ligando y con distinto centro metálico presentan diferencias más evidentes en cuanto al perfil general y a la multiplicidad de las señales (figura 4.8). Más adelante se discutirán estas observaciones.

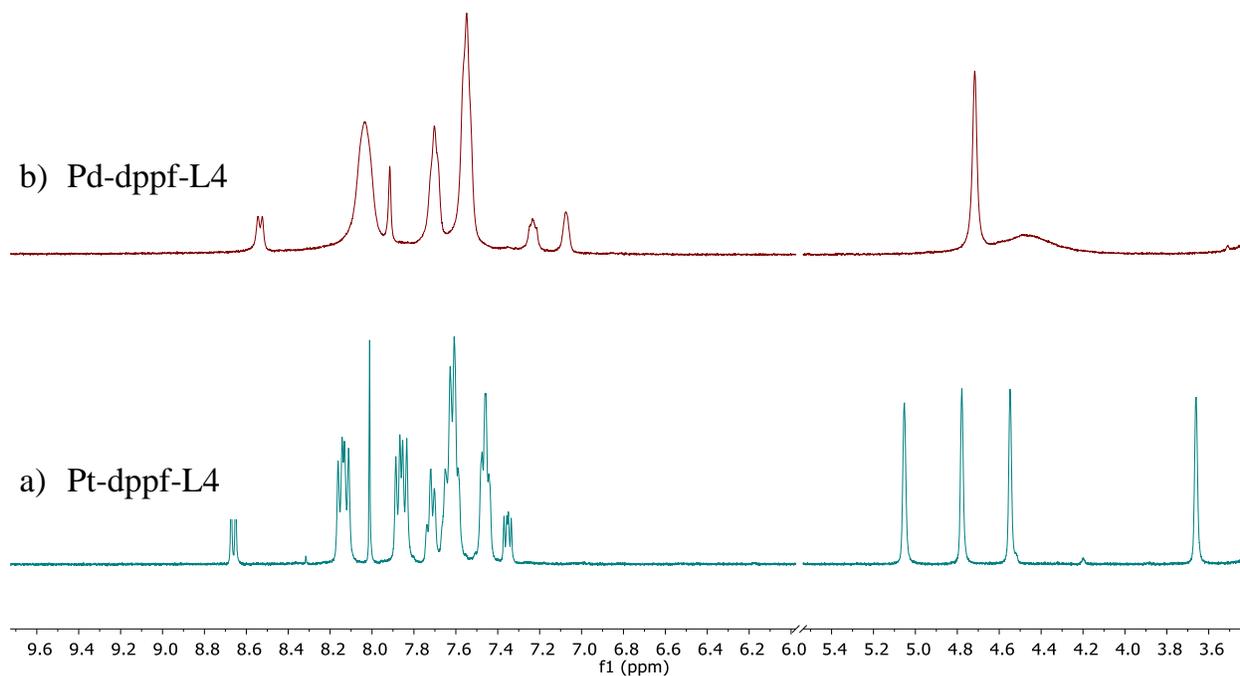


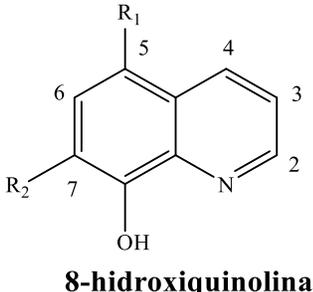
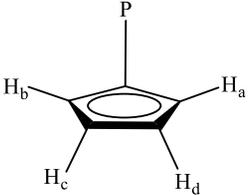
Figura 4.8: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pd-dppf-L4 (superior) y b) Pt-dppf-L4 (inferior), a modo de ejemplo.

En general, los espectros  $^1\text{H}$ -NMR pueden dividirse en dos partes bien definidas: la zona *Cp*, delimitada entre 3,5 – 5,5 ppm, donde se observan las señales de los protones de los anillos *Cp* del ligando dppf, y la zona aromática, que se ubica entre los 6,0 – 9,5 ppm, que involucra señales de los protones de los ligandos derivados de la 8HQ y señales de los protones de los anillos fosfina del ligando dppf ( $\text{PPh}_2$ ).

A continuación, se discutirá la asignación y corrimiento de las señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN por grupo de compuestos: los compuestos de Pt(II) y los compuestos de Pd(II), ya que cada grupo

tiene características propias e interesantes. En la tabla 4.8 se resumen los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de los cinco compuestos de Pt(II) y sus respectivos ligandos en la forma libre. Las señales de los protones de todos los ligandos libres fueron asignadas y corroboradas teniendo en cuenta la asignación reportada por Sigouin *et al* [194].

Tabla 4.8: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Pt-dppf-L y los ligandos HL = HL1- HL5 y el dppf, obtenidos a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>a)</b></p>  <p><b>8-hidroxiquinolina</b></p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>b)</b></p>  <p><b>Anillo Cp (dppf)</b></p> </div> </div>																																																																																																															
<table border="0" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 10%;">Código</td> <td style="width: 10%;">R<sub>1</sub></td> <td style="width: 10%;">R<sub>2</sub></td> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td></td> <td>HL1</td> <td>H</td> <td>H</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>HL2</td> <td>NO<sub>2</sub></td> <td>H</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>HL3</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>HL4</td> <td>Cl</td> <td>I</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>HL5</td> <td>I</td> <td>I</td> <td></td> </tr> </table>																	Código	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>														HL1	H	H														HL2	NO <sub>2</sub>	H														HL3	Cl	Cl														HL4	Cl	I														HL5	I	I												
	Código	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>																																																																																																												
	HL1	H	H																																																																																																												
	HL2	NO <sub>2</sub>	H																																																																																																												
	HL3	Cl	Cl																																																																																																												
	HL4	Cl	I																																																																																																												
	HL5	I	I																																																																																																												
H	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidad)(integración)																																																																																																														
	HL1	Pt-dppf-L1	$\Delta\delta^a$	HL2	Pt-dppf-L2	$\Delta\delta^a$	HL3	Pt-dppf-L3	$\Delta\delta^a$	HL4	Pt-dppf-L4	$\Delta\delta^a$	HL5	Pt-dppf-L5	$\Delta\delta^a$																																																																																																
2	8,84 (dd)(1)	8,57 (d)(1)	- 0,27	9,02 (dd)(1)	9,38 (d)(1)	0,36	9,00 (d)(1)	8,68 (d)(1)	- 0,32	8,97 (dd)(1)	8,66 (d)(1)	- 0,31	8,87 (dd)(1)	8,45 (d)(1)	-0,42																																																																																																
3	7,54 (dd)(1)	7,22 (m)(1)	- 0,32	7,89 (dd)(1)	7,53 (dd)(1) )	-0,36	7,75 (dd)(1)	7,37 (dd)(1)	- 0,38	7,77 (dd)(1)	7,35 (dd)(1)	- 0,42	7,73 (dd)(1)	7,31 (dd)(1)	-0,42																																																																																																

Capítulo 4 – Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de 8HQ

4	8,31 (dd)(1)	7,14 (d)(1)	- 1,17	9,15 (dd)(1)	7,69 (m)(1)	-1,46	8,50 (d)(1)	7,77 (s)(1)	- 0,73	8,50 (dd)(1)	7,62 (m)(1) b	- 0,88	8,29 (dd)(1)	7,61 (m)(1) <sup>b</sup>	-0,68
5	7,38 (dd)(1)	7,64 (m)(1) <sup>b</sup>	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	7,44 (m)(1)	7,45 (m)(1) <sup>b</sup>	0,01	8,55 (d)(1)	8,59 (d)(1)	0,04	7,82 (s)(1)	7,81 (m)(1) <sup>b</sup>	- 0,01	8,00 (s)(1)	8,01 (s)(1)	0,01	8,34 (s)(1)	8,27 (s)(1)	-0,07
7	7,09 (dd)(1)	6,32 (d)(1)	- 0,77	7,20 (d)(1)	6,25 (d)(1)	-0,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>α</sub>	-	5,17 (s)(2)	1,24		5,24 (s)(2)	1,31	-	5,26 (s)(2)	1,33	-	5,05 (s)(2)	1,12	-	5,05 (s)(2)	1,12
		3,55 (s)(2)	- 0,38	-	3,57 (s)(2)	-0,36		3,47 (s)(2)	- 0,46		3,66 (s)(2)	- 0,27		3,66 (s)(2)	-0,27
H <sub>β</sub>	-	4,81 (s)(2)	0,55	-	4,84 (s)(2)	0,58	-	4,82 (s)(2)	0,56	-	4,78 (s)(2)	0,52	-	4,78 (s)(2)	0,52
		4,52 (s)(2)	0,26		4,55 (s)(2)	0,29		4,52 (s)(2)	0,26		4,55 (s)(2)	0,29		4,55 (s)(2)	0,29

<sup>a</sup>:  $\Delta\delta$ :  $\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$

<sup>b</sup>: superpuesta con señales de los protones PPh<sub>2</sub>

Multiplicidad: s: singulete, d:doblete, dd: doblete de dobletes, m: multiplete.

En la zona aromática de los espectros de los compuestos se identificaron las señales de los ligandos bioactivos derivados de la 8HQ, enumeradas según la figura a) de la tabla 4.8. En general se observó en todas ellas un corrimiento en los valores de desplazamiento químico luego de la coordinación al centro metálico. No se observó la señal correspondiente al protón del grupo -OH en ninguno de los espectros de los compuestos, confirmando la deprotonación del átomo de oxígeno de los ligandos para su coordinación al centro metálico, al igual que en los espectros de FTIR en estado sólido y las estructuras obtenidas por DRX.

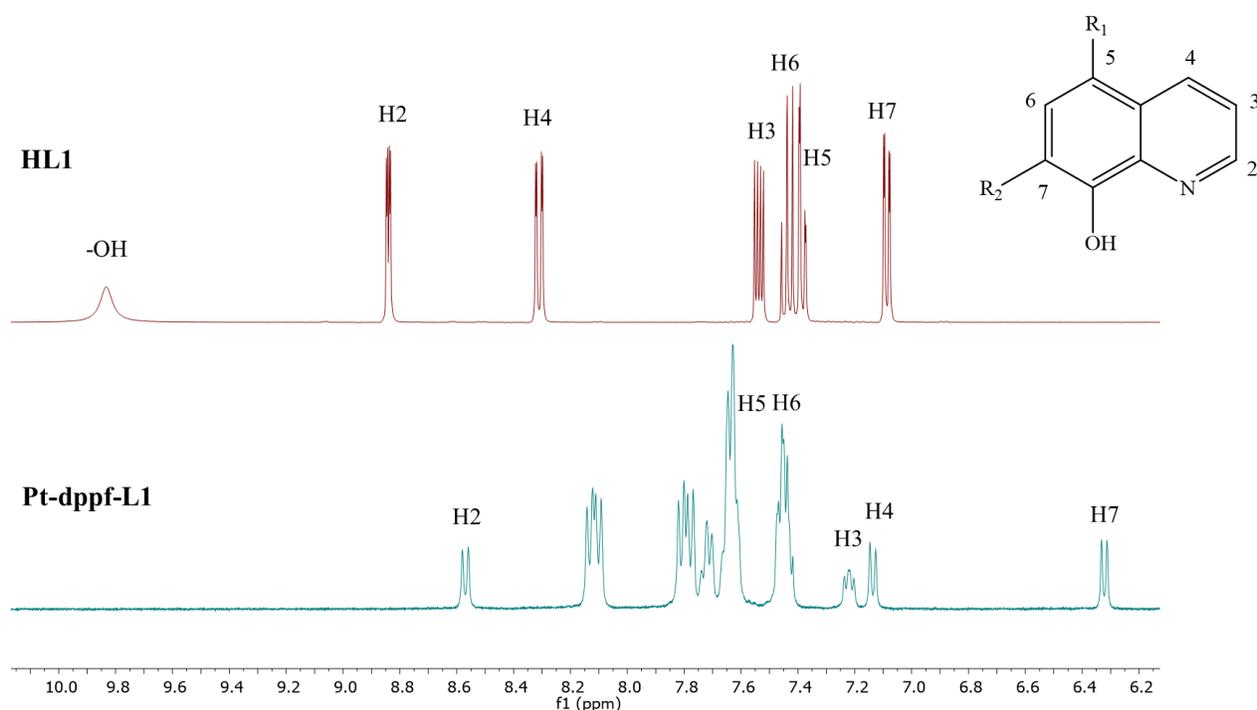


Figura 4.9: Espectros <sup>1</sup>H-RMN del ligando 8-hidroxiquinolina (HL1) y del compuesto Pt-dppf-L1.

En todos los espectros de los compuestos, la señal más desapantallada (doblete o doblete de dobletes) corresponde a H2 (como se ve en la figura 4.9), debido a su cercanía con el átomo de nitrógeno coordinante, atractor de densidad de carga. Esta asignación se corroboró a través de experimentos de COSY (figura 4.10) y coincide con la asignación realizada para otros compuestos con ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina como ligandos bidentados en complejos de coordinación [194–196]. Los protones H3 y H4 se asignaron utilizando espectros COSY; el protón

H3 generalmente se presenta como un doblete de dobletes por su acoplamiento con H2 y con H4, y H4 mostró multiplicidad variable (en algunos casos superpuesta con señales de los anillos PPh<sub>2</sub>).

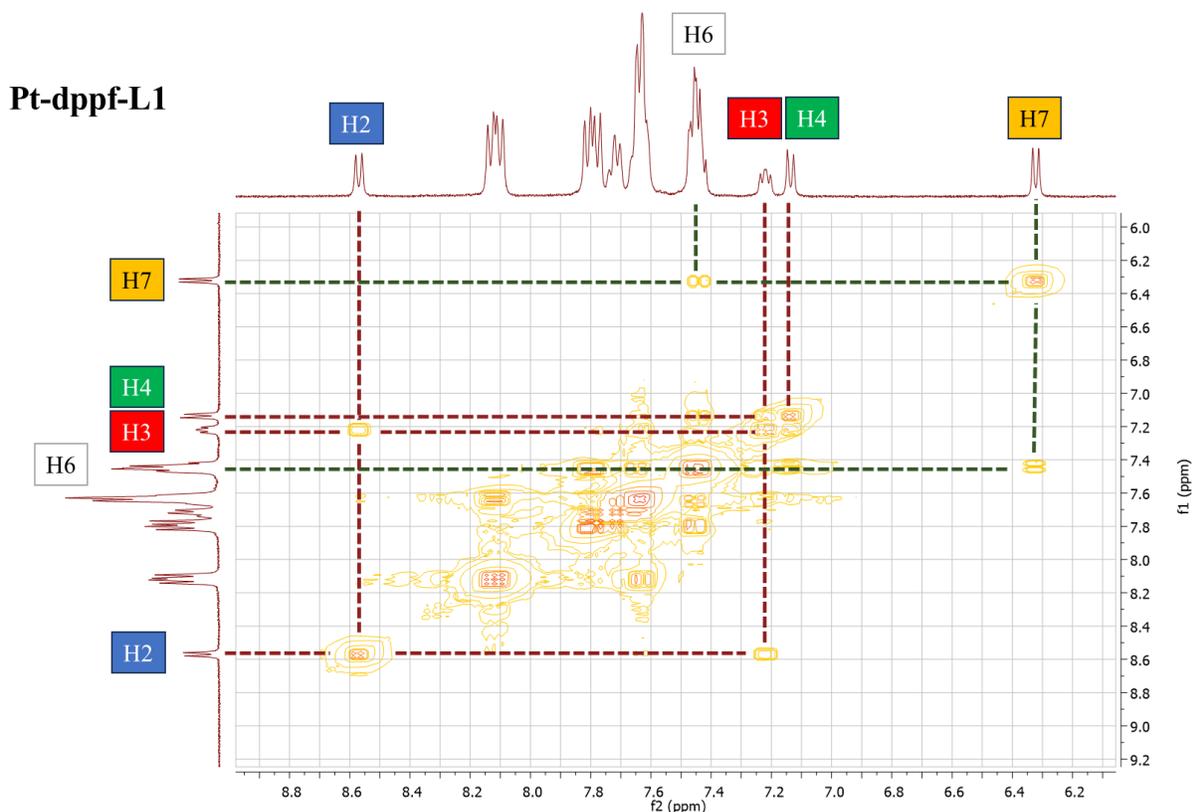


Figura 4.10: Espectro de correlación bidimensional (COSY) del compuesto Pt-dppf-L1 en la zona aromática del espectro de <sup>1</sup>H-RMN; se señalan las señales de los protones asociadas al ligando HL1.

En los espectros de los compuestos con la 8-hidroxiquinolina sin sustituir o monosustituída (Pt-dppf-L1 y Pt-dppf-L2), la señal ubicada alrededor de los 6,3 ppm corresponde a H7, la más apantallada debido a su cercanía al átomo de oxígeno, dador de densidad de carga [194,195]. Como era de esperarse, esta señal no aparece en los espectros de los compuestos con 8HQs disustituídas en sus posiciones 5 y 7 (Pt-dppf-L3 – L5). En el espectro de Pt-dppf-L1, la señal asociada a H6 fue asignada a través de experimentos de COSY, dado su acoplamiento con H7. En los espectros de los compuestos con 8HQs disustituídas, esta señal se muestra como un singlete, que varía fuertemente su desplazamiento de un complejo a otro en función de los sustituyentes del anillo fenólico.

Para ayudar a visualizar el efecto de la coordinación en el desplazamiento químico de las señales de los protones de los ligandos, se utiliza el parámetro  $\Delta\delta$  (tabla 4.8), definido como la diferencia de desplazamiento de la señal de un protón específico en el complejo y el desplazamiento de esa misma señal en el ligando libre, como se explicó en el capítulo 2. A mayor valor absoluto, mayor es el efecto de la coordinación en el desplazamiento de dicha señal. En general, luego de la coordinación las señales de los protones del anillo piridínico (H2, H3 y H4) de los ligandos 8HQ se vieron apantalladas (desplazadas hacia campo fuerte). En particular H4 fue la señal con mayor  $\Delta\delta$ , es decir, es la señal que sufrió mayor cambio en su desplazamiento químico posterior a la coordinación. Este efecto podría atribuirse a que este protón se encuentra ubicado en posición *para* al sitio de coordinación, donde la unión de los ligandos generaría un desapantallamiento por efecto de resonancia en el anillo. A su vez, se vio fuertemente apantallado H7, adyacente al átomo de oxígeno coordinado. Al sustituir el protón H5 del anillo por un grupo fuertemente atractor (-NO<sub>2</sub>), el efecto del desplazamiento de las señales es mayor y opuesto solo en el caso de H2, éste se desapantalla fuertemente [194]. Los compuestos con 8HQs disustituídas en sus posiciones 5 y 7 presentaron corrimiento en las señales de los protones H2, H3 y H4 hacia campo alto en igual medida, independientemente de los sustituyentes, al igual que en el caso del compuesto Pt-dppf-L1. La señal de H6 se vio poco afectada por la coordinación, debido a su lejanía al sitio de unión.

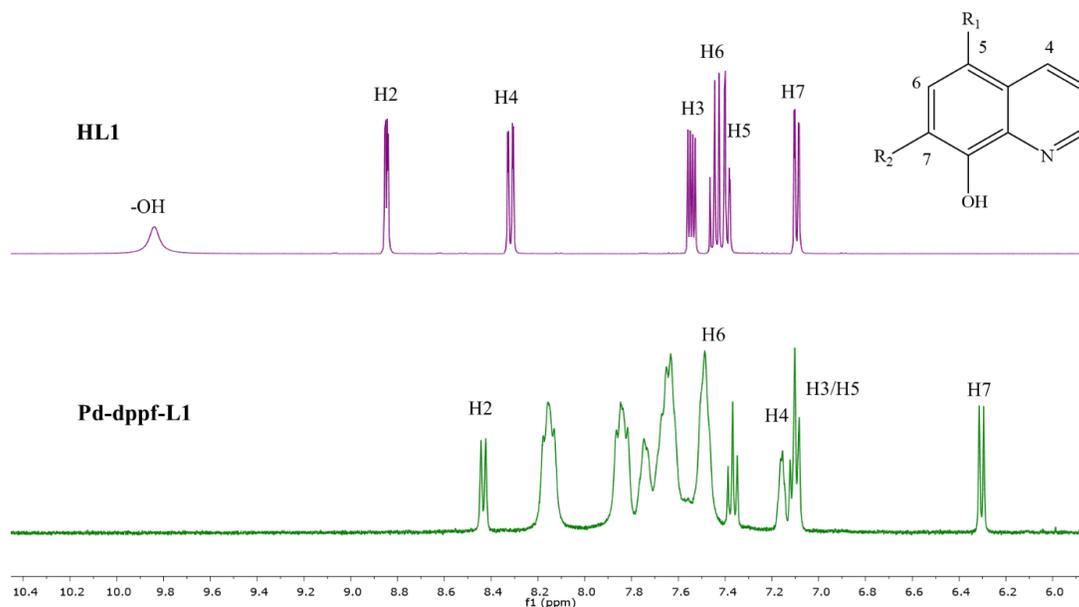


Figura 4.11: Espectros <sup>1</sup>H-RMN del ligando 8-hidroxiquinolina (HL1) y del compuesto Pd-dppf-L1.

Respecto a la asignación de los protones de los ligandos en los compuestos de Pd(II), la misma se realizó de forma tentativa y a través de experimentos de correlación COSY (figura 4.12)., teniendo en cuenta la asignación realizada para los compuestos análogos de Pt(II), ya que la resolución de los espectros obtenidos, tanto  $^1\text{H}$ -RMN como COSY, era menor a medida que los sustituyentes del anillo 8HQ era más pesados. Esto generó que no fuera posible observar multiplicidad en las señales que diera cuenta del acoplamiento existente entre las mismas.

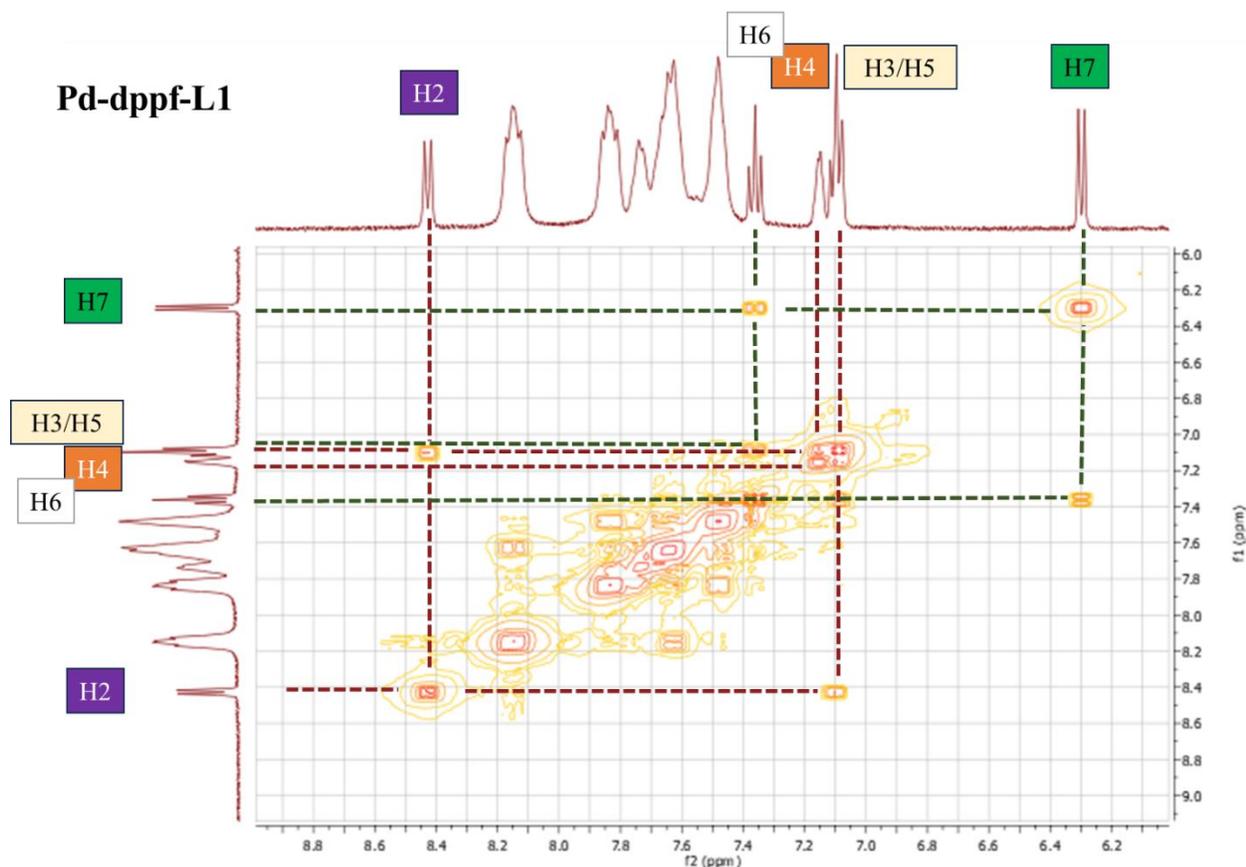
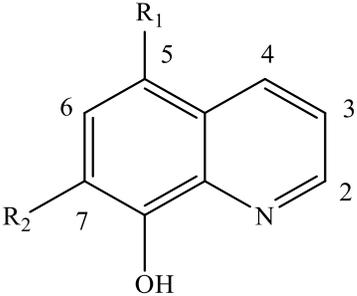
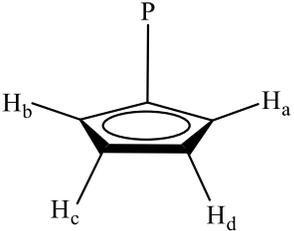


Figura 4.12: Espectro de correlación bidimensional (COSY) del compuesto Pd-dppf-L1 en la zona aromática del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. Se marcan las señales de los protones asociadas al ligando HL1.

En la tabla 4.9 se resumen los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de los cinco compuestos de Pd(II) y sus respectivos ligandos en la forma libre.

Tabla 4.9: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Pd-dppf-L y los ligandos HL = HL1-HL5 y el dppf, obtenidos a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR.

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="width: 30%;"> <p><b>a)</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>8-hidroxiquinolina</b></p> </div> <div style="width: 30%;"> <p><b>Código R<sub>1</sub> R<sub>2</sub></b></p> <p>HL1 H H <b>8-hidroxiquinolina</b></p> <p>HL2 NO<sub>2</sub> H <b>5-nitro-8-quinolinol</b></p> <p>HL3 Cl Cl <b>5,7-dicloro-8-quinolinol</b></p> <p>HL4 Cl I <b>5-cloro-7-iodo-8-quinolinol</b></p> <p>HL5 I I <b>5,7-diiodo-8-quinolinol</b></p> </div> <div style="width: 30%;"> <p><b>b)</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Anillo Cp (dppf)</b></p> </div> </div>															
H	$\delta_H$ (multiplicidad)(integración)														
	HL1	Pd-dppf-L1	$\Delta\delta^a$	HL2	Pd-dppf-L2	$\Delta\delta^a$	HL3	Pd-dppf-L3	$\Delta\delta^a$	HL4	Pd-dppf-L4	$\Delta\delta^a$	HL5	Pd-dppf-L5	$\Delta\delta^a$
2	8,84 (dd) (1)	8,43 (d)(1)	-0,41	9,02 (dd) (1)	9,31 (d)(1)	0,29	9,00 (d)(1)	8,55 (m)(1)	-0,45	8,97 (dd) (1)	8,54 (d)(1)	-0,43	8,87 (dd) (1)	8,34 (br) (1)	-0,53
3	7,54 (dd) (1)	7,10 (m)(1) <sup>c</sup>	-0,44	7,89 (dd) (1)	7,42 (dd)(1)	-0,47	7,75 (dd) (1)	7,26 (m)(2)	-0,49	7,77 (dd) (1)	7,24 (m) (1)	-0,53	7,73 (dd) (1)	7,19 (br) (1)	-0,54
4	8,31 (dd) (1)	7,15 (m)(1)	-1,16	9,15 (dd) (1)	7,54 (m)(1) <sup>b</sup>	-1,61	8,50 (d)(1)	NA	-	8,50 (dd) (1)	7,08 (br) (1)	-1,42	8,29 (dd) (1)	7,04 (br) (1)	-1,25
5	7,38 (dd) (1)	7,10 (m)(1) <sup>c</sup>	-0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	7,44 (m) (1)	7,36 (t)(1)	-0,08	8,55 (d)(1)	8,49 (d)(1)	-0,06	7,82 (s)(1)	NA	-	8,00 (s)(1)	7,92 (s) (1)	-0,08	8,34 (s) (1)	8,20 (br) (1)	-0,14

Capítulo 4 – Nuevos compuestos de Pd(II) y Pt(II) con dppf y derivados de 8HQ

7	7,09 (dd) (1)	6,30 (d)(1)	-0,79	7,20 (d)(1)	6,22 (d)(1)	-0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>α</sub>	-	5,07 (s)(2)	1,13	-	4,73				-			-			-
		3,82 (s)(2)	-0,12		(s)(4)			5,18		-		-		4,72 (br)	-
H <sub>β</sub>	-	4,81 (s)(2)	0,54	-	4,60						4,72 (s)(4)				4,57 (br)
					(s)(2)			4,67		-		4,47 (br)			(2)
		4,30				(br)(4)		-							4,29 (br)
		4,59 (s)(2)	0,32		(br)										
					(2,5)										(3)

<sup>a</sup>:  $\Delta\delta$ :  $\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$

<sup>b</sup>: superpuesta con señales de los protones de PPh<sub>2</sub>

<sup>c</sup>: los protones 3 y 5 muestran el mismo desplazamiento químico, integrando para dos protones.

NA: No asignada.

Multiplicidad: s: singulete, d:doblete, dd: doblete de dobletes, m: multiplete.

Esta distorsión de los espectros de los compuestos de Pd(II) podría estar asociada a apartamiento de la planaridad en solución del entorno plano cuadrado generado por el centro metálico y los átomos donores de los ligandos, lo que daría cuenta de que la estructura en fase sólida no se mantiene “congelada” en solución. Estas deformaciones podrían tender a generar un entorno tetraédrico en lugar del plano cuadrado verificado por estudios de DRX, generando un cambio en la distribución de electrones de los orbitales moleculares, generando especies paramagnéticas. Los complejos de Pt(II) son más estables y como consecuencia, su geometría en estado sólido y en solución tiende a ser la misma, en contraste a los complejos de Pd(II) que son lábiles. Dado que la barrera de energía para la distorsión tetraédrica de compuestos de Pd(II) debería ser menor que para compuestos de Pt(II), se podría esperar que los compuestos de Pd(II) tuvieran mayor distorsión, generando mayores diferencias en el desplazamiento de las señales de  $^{31}\text{P}$  [197]. Otra posible explicación, relacionada con la anteriormente expuesta, puede ser que la interconversión entre una especie más tetraédrica a una más plano-cuadrada ocurra en una escala de tiempo menor respecto al tiempo en el que se registran los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los espectros de los compuestos que tienen ligandos con sustituyentes más pesados presentan señales de  $^1\text{H}$ -RMN más anchas (figura 4.13) [198].

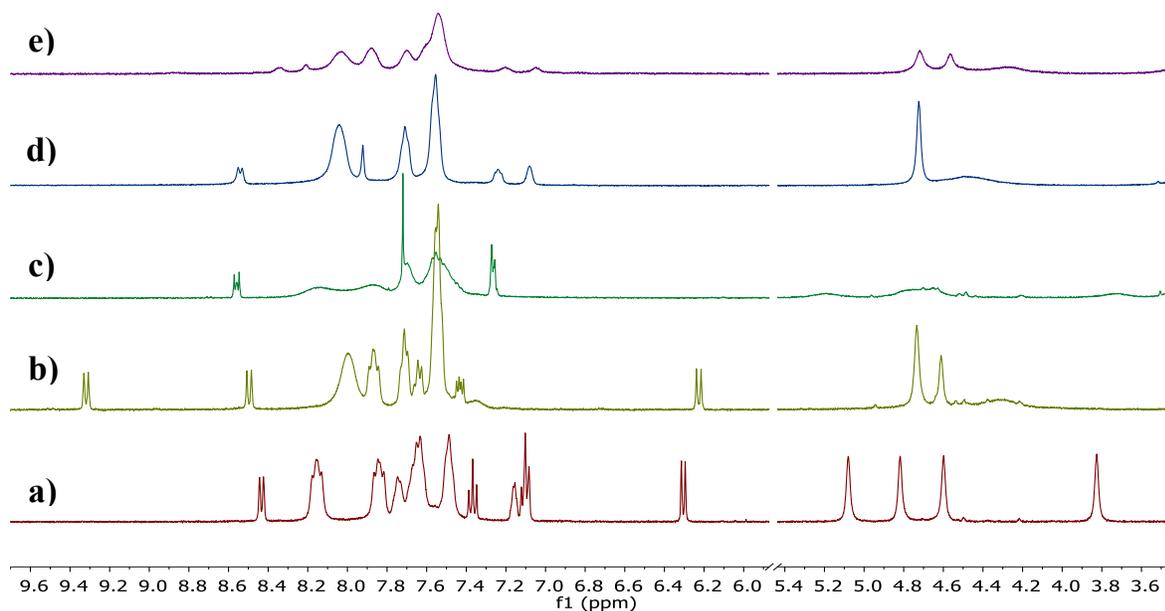


Figura 4.13: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos a) Pd-dppf-L1 b) Pd-dppf-L2 c) Pd-dppf-L3 d) Pd-dppf-L4 y e) Pd-dppf-L5 en DMSO- $d_6$ .

Por otro lado, en la zona aromática de los espectros también se encuentran las señales que involucran a los protones de los anillos fosfínicos del ligando dppf (PPh<sub>2</sub>). El ligando dppf en su forma libre presenta un singulete que integra para los 20 protones de los anillos PPh<sub>2</sub>. En el caso de los precursores M-dppf-Cl<sub>2</sub> se observaron tres multipletes que integran para 8:4:8 protones, correspondientes a los protones *o*-H, *p*-H y *m*-H de los anillos PPh<sub>2</sub>, respectivamente. Estas señales se encuentran desplazadas hacia mayor campo magnético respecto al dppf libre. En relación a los compuestos sintetizados, se observó en todos los espectros un corrimiento general de estas señales hacia alto campo debido a la coordinación de los ligandos bioactivos. Si bien existe una superposición de estas señales con señales propias de los ligandos bioactivos, se logró identificar los 20 protones de los anillos PPh<sub>2</sub> en todos los casos.

En cuanto a la zona *Cp*, el dppf en su forma libre presenta dos señales de multiplicidad singulete en la zona *Cp* [159] a 3,93 y 4,26 ppm, correspondientes a los protones H<sub>a</sub>-H<sub>b</sub> (protones alfa respecto al átomo de P) y H<sub>c</sub>-H<sub>d</sub> (protones beta respecto al átomo de P) de ambos anillos *Cp* (ver figura en tabla 4.9), como se mencionó en el capítulo anterior. De igual forma, en el espectro de los precursores M-dppf-Cl<sub>2</sub>, se observa la misma multiplicidad y número de señales (Pd: 4,24 y 4,54 ppm; Pt: 4,20 y 4,52 ppm en DMSO-d<sub>6</sub>), con desplazamientos hacia campo bajo. Respecto a la zona *Cp* de los espectros de los compuestos, los Pt-dppf-L presentaron un patrón de señales que se repite para todos los casos: cuatro singuletes que integran para dos protones cada uno (figura 4.7), patrón característico del movimiento *twist*, revelando que la coordinación de los ligandos bioactivos al centro metálico afecta tanto el tipo de fluxionalidad que presenta el ligando dppf como el desplazamiento químico de las señales. Este patrón de señales ha sido anteriormente observado en compuestos análogos con ligandos bidentados [73,104]. Por ende, en base a lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que la coordinación de los ligandos bioactivos derivados de la 8-hidroxiquinolina al centro de Pt(II) ejerce un efecto de aumento en la barrera energética que determina el tipo de movimiento del ligando dppf. Por otro lado, los compuestos de Pd(II) presentaron multiplicidad variable, pudiendo estar asociada a las distorsiones en solución mencionadas anteriormente.

## 4.4 Actividad biológica

### 4.4.1 Actividad frente a *T. brucei* y selectividad hacia el parásito

Se evaluó la actividad tripasonomicida de los diez compuestos estudiados y sus correspondientes ligandos libres (dppf, y derivados de 8HQ = HL1 – HL5) frente a la forma infectiva de *T. brucei* (cepa 427, línea celular 449-hGrxroGFP2) a través de medidas de citometría de flujo, como se detalló en el capítulo 2. Los resultados se presentan como valores de concentración que inhiben el 50 % de la viabilidad ( $IC_{50}$ ) en la tabla 4.10.

Tabla 4.10: Actividad *in vitro* de ligandos libres y compuestos M-dppf-L, donde M = Pd(II) o Pt(II), HL = HL1 – HL5, frente a la forma infectiva de *T. brucei* y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito.

Compuesto	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)		IS
	<i>T. brucei</i> (427)	Macrófagos (J774)	
dppf	>10	45 $\pm$ 6	< 4
HL1	12,4 $\pm$ 0,8	16,6 $\pm$ 1,5	1,3
HL2	0,8 $\pm$ 0,3	31,1 $\pm$ 1,2	38,9
HL3	2,5 $\pm$ 0,2	21,0 $\pm$ 0,8	8,4
HL4	2,4 $\pm$ 0,4	38,8 $\pm$ 6,7	16,2
HL5	3,0 $\pm$ 0,2	49,4 $\pm$ 9,1	16,4
Pd-dppf-L1	0,9 $\pm$ 0,2	8,5 $\pm$ 0,5	9,4
Pd-dppf-L2	0,33 $\pm$ 0,09	33,8 $\pm$ 1,7	102,4
Pd-dppf-L3	4,5 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 2,4	4,4
Pd-dppf-L4	4,8 $\pm$ 0,5	30,0 $\pm$ 3,3	6,3
Pd-dppf-L5	7 $\pm$ 4	50,4 $\pm$ 2,3	7
Pt-dppf-L1	0,3 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,4	11,3
Pt-dppf-L2	0,93 $\pm$ 0,03	25,8 $\pm$ 1,5	27,7
Pt-dppf-L3	0,22 $\pm$ 0,01	3,4 $\pm$ 0,2	15,5
Pt-dppf-L4	0,14 $\pm$ 0,05	6,7 $\pm$ 0,4	47,8
Pt-dppf-L5	0,22 $\pm$ 0,04	6,4 $\pm$ 0,3	29,0

Nifurtimox	$15 \pm 3^a$	$150 \pm 5^a$	$10^a$
IS: IC <sub>50</sub> J774/ IC <sub>50</sub> <i>T. brucei</i> <sup>a</sup> : Valores extraídos de [166].			

En general, tanto los compuestos nuevos como los ligandos libres presentaron actividad frente a la forma infectiva de *T. brucei*. Tal como se indicó en el capítulo 3, el ligando dppf no mostró actividad incluso a 10  $\mu\text{M}$ . No fue posible probar concentraciones más altas que 10  $\mu\text{M}$  debido a la baja solubilidad del compuesto en el medio de cultivo del parásito. La actividad de los ligandos libres y de los compuestos de Pd(II) es comparable, en el rango micromolar. Sin embargo, los compuestos de Pt(II) presentaron actividad mayor, incluso en el rango nanomolar. Todos los compuestos presentaron actividad mayor que el fármaco de referencia Nifurtimox (IC<sub>50</sub> = 15  $\mu\text{M}$ ) [166].

En el caso de los compuestos de Pd(II), la complejación de los ligandos bioactivos de HL al fragmento {Pd-dppf} aumentó significativamente la actividad anti-tripanosomal en el caso de Pd-dppf-L1 y Pd-dppf-L2, exhibiendo valores de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar, al igual que los compuestos de Pt(II). Los ligandos HL1 y HL2 aumentaron sus actividades 14 y 2,4 veces al coordinarse al centro de Pd(II). En el caso de los compuestos de Pt(II), la complejación de los ligandos bioactivos con el fragmento {Pt-dppf} aumentó significativamente su actividad antitripanosomal, con la excepción de HL2, cuya actividad permaneció casi sin cambios. El efecto mayor se observó para el ligando HL1, que aumentó su actividad en > 41 veces cuando se coordinó. De manera similar, la actividad aumentó entre 11 y 17 veces para HL3-HL5 por la coordinación al fragmento {Pt-dppf}. Vale la pena señalar que todos los complejos de Pt(II) demostraron ser de uno (16 veces) a dos órdenes (107 veces) de magnitud más potentes que el Nifurtimox.

Con el fin de obtener una mayor comprensión de la selectividad biológica de los diez compuestos estudiados y sus respectivos ligandos libres, se probó su citotoxicidad frente a macrófagos murinos (línea celular J774), que son células del sistema inmune que se encuentran en tejidos y se activan al ocurrir una infección por parásitos en el huésped. Los ligandos libres dppf (IC<sub>50</sub> 45  $\mu\text{M}$ ), HL4 (IC<sub>50</sub> 39  $\mu\text{M}$ ) y HL5 (IC<sub>50</sub> 49  $\mu\text{M}$ ) presentan una toxicidad bastante similar hacia los macrófagos. El ligando más citotóxico fue HL1 (IC<sub>50</sub> ~17  $\mu\text{M}$ ).

Por otro lado, los compuestos de Pd(II) mostraron una citotoxicidad similar en el modelo de células de mamífero seleccionado a la de los ligandos libres HL. En el caso de los compuestos de Pt(II), la citotoxicidad aumentó de 1,2 a 8 veces con respecto a los ligandos libres, independientemente del ligando. La estimación del índice de selectividad ( $IS = IC_{50} \text{ macrófago murino} / IC_{50} T. brucei$ ) para cada ligando libre mostró valores superiores a 10 ( $IS$  del Nifurtimox) para HL2, HL4 y HL5. El ligando HL1 y dppf carecían de especificidad hacia *T. brucei* (ambos  $IS < 4$ ). A excepción de Pd-dppf-L2, todos los compuestos basados en Pd(II) tienen valores de  $IS$  similares a Nifurtimox. Para los compuestos de Pt(II), a pesar de que la complejación de los ligandos al centro metálico aumentó la citotoxicidad contra los macrófagos, los índices de selectividad de los complejos fueron de 2 a 9 veces mayores que los de los ligandos libres correspondientes. La excepción fue Pt-dppf-L2, que mostró un valor  $IS$  similar al del ligando libre HL2. Es importante destacar que, a excepción de Pt-dppf-L1, todos los compuestos basados en Pt tienen un  $IS$  mayor que el Nifurtimox.

El compuesto más potente de los diez nuevos compuestos desarrollados es el Pt-dppf-L4 ( $IC_{50}$  0,14  $\mu$ M,  $IS = 48$ ) y el más selectivo es el Pd-dppf-L2 ( $IC_{50}$  0,33  $\mu$ M,  $IS > 100$ ). A pesar de su alta selectividad, no se continuaron estudios con este compuesto debido a problemas de solubilidad en los medios biológicos. Para dichos estudios se seleccionó el compuesto Pt-dppf-L4.

#### 4.4.2 Ensayos de citotoxicidad en células de cáncer de ovario y fibroblastos normales

El cáncer es la segunda causa de muerte global, pero es en África, Asia y América Central y del Sur donde ocurren el 70 % de las muertes a nivel mundial por esta enfermedad. Según la OMS el número anual de muertes por esta enfermedad en 2020 fue de 10 millones [199].

Como ya se indicó en el capítulo 1, células altamente proliferativas como tripanosomátidos y células tumorales presentan similitudes metabólicas que ameritan estudiar el efecto de nuevos compuestos sobre ambos. De hecho, diferentes compuestos antitumorales presentan actividad antiparasitaria y viceversa [28,29,200], por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto antiproliferativo de los nuevos complejos de platino en dos líneas celulares de cáncer de ovario, A2780 sensible al cisplatino y A2780cisR resistente al cisplatino, y compararlo con el efecto generado por el cisplatino en las mismas condiciones, ya que los compuestos de Pt(II) fueron los más activos frente a *T. brucei*. Los resultados permitirían corroborar la hipótesis de que compuestos con actividad antitripanosomal podrían presentar también actividad en células

tumorales. Los compuestos también se probaron frente a una línea celular no cancerosa (V79) para determinar la especificidad de los compuestos hacia las células cancerosas. En la tabla 4.11 se muestran los resultados de actividad citotóxica de los ligandos HL y los compuestos de Pt(II) frente a las líneas celulares A2780, A2780cisR y V79.

Tabla 4.11: Actividad citotóxica de los ligandos libres (HL1-HL5) y los compuestos Pt-dppf-L, HL = HL1 – HL5, frente a células A2780, A2780cisR, V79 (línea celular no cancerosa) a 24 h de incubación, e índice de selectividad IS hacia las células A2780.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM), 24 h			IS <sup>a</sup>
	A2780	A2780cisR	V79	
HL1	11,0 ± 3,6	-	104 ± 32	9,5
HL2	20,4 ± 6,0	-	20,4 ± 5,0	1,0
HL3	12,4 ± 3,5	-	42,6 ± 22	3,4
HL4	33,4 ± 6,9	-	59,0 ± 15	1,7
HL5	41,1 ± 9,6	-	60,1 ± 13	1,5
Pt-dppf-L1	4,4 ± 1,5	11,5 ± 6,0	1,7 ± 0,3	0,4
Pt-dppf-L2	52,2 ± 15	>100	58,4 ± 24	1,1
Pt-dppf-L3	2,7 ± 0,8	16,7 ± 6,3	2,1 ± 0,4	0,8
Pt-dppf-L4	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,55	3,1 ± 0,2	2,3
Pt-dppf-L5	1,2 ± 0,1	3,0 ± 1,2	4,0 ± 1,7	3,4
Cisplatino	26,0 ± 5,0	75,4 ± 20	-	-

IS<sup>a</sup>: IC<sub>50</sub> V79/ IC<sub>50</sub> A2780

Se observa que tanto los ligandos libres como los nuevos compuestos de Pt(II) presentan actividad citotóxica frente a la línea celular A2780, e incluso frente a la línea celular resistente al cisplatino A2780cisR, a excepción del compuesto Pt-dppf-L2, que fue el menos activo de los cinco compuestos testeados. Pt-dppf-L2 mostró actividad al menos un orden de magnitud menor que sus análogos y no mostró actividad alguna por encima de los 100 μM en la línea resistente, llegando a

ser menos activo que el control de cisplatino. Por otro lado, la citotoxicidad de los ligandos fue aproximadamente un orden de magnitud mayor al coordinarse al fragmento {Pt-dppf}, independientemente del tipo de línea celular (células A2780 o V79), con excepción de HL2. En general, comparando la tendencia observada en la actividad citotóxica de los complejos frente a macrófagos murinos e incluso frente a *T. brucei*, se observa que en todas las líneas celulares se sigue la misma tendencia, es decir, la coordinación de los derivados de 8-hidroxiquinolina al núcleo {Pt-dppf} aumenta la citotoxicidad (tabla 4.10), y en todos los casos, Pt-dppf-L2 es el compuesto menos activo y entre los más activos se encuentran los compuestos con 8HQ disustituídas, con actividades de magnitud similar. Los complejos con HL1, HL3-HL5 mostraron valores de IC<sub>50</sub> frente a células A2780 un orden de magnitud más bajos que los del fármaco de referencia cisplatino (IC<sub>50</sub> = 26,0 ± 5,0 μM). Al comparar los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en los fibroblastos V79 y las células de cáncer de ovario A2780 se observa que el ligando libre HL1 (IS ~10) fue selectivo hacia las células tumorales, pero ninguno de los complejos metálicos presentó una selectividad considerable (IS < 3) (tabla 4.11). También es importante señalar que Pt-dppf-L2 mostró baja solubilidad en DMSO, lo que puede afectar la distribución del compuesto en el medio celular.

Con el objetivo de investigar si los nuevos complejos podrían tener la capacidad de superar la resistencia a los fármacos, se evaluó su actividad antitumoral frente a las células A2780cisR, que muestran una susceptibilidad al cisplatino 3 veces menor que la línea celular parental A2780. A diferencia del cisplatino, y con la excepción de los complejos con L2 y L3, los complejos mostraron en las células resistentes A2780cisR valores de IC<sub>50</sub> en el mismo orden de magnitud que los encontrados para las células A2780 parentales (tabla 4.11). Estos resultados sugieren que estos compuestos ejercen su efecto citotóxico sobre las células tumorales a través de mecanismos diferentes al cisplatino. Los datos también destacan el efecto de la naturaleza del sustituyente en el anillo quinolínico sobre la actividad antitumoral. A las 24 h de incubación, los compuestos más activos de la serie fueron Pt-dppf-L4 (IC<sub>50</sub> 1,3 μM) y Pt-dppf-L5 (IC<sub>50</sub> 1,2 μM) con uno y dos sustituyentes de yodo, respectivamente. Teniendo en cuenta que una incubación de 24 h podría ser un tiempo corto para probar el cisplatino o incluso algunos de los complejos de Pt(II), el ensayo con MTT también se realizó después de una incubación de 48 h. Los resultados representados en la figura 4.14 muestran que Pt-dppf-L2, el compuesto menos citotóxico de la serie, y el cisplatino,

se benefician de un tiempo de incubación más prolongado. Sin embargo, los otros complejos de Pt(II) no mostraron ninguna mejora de la actividad citotóxica.

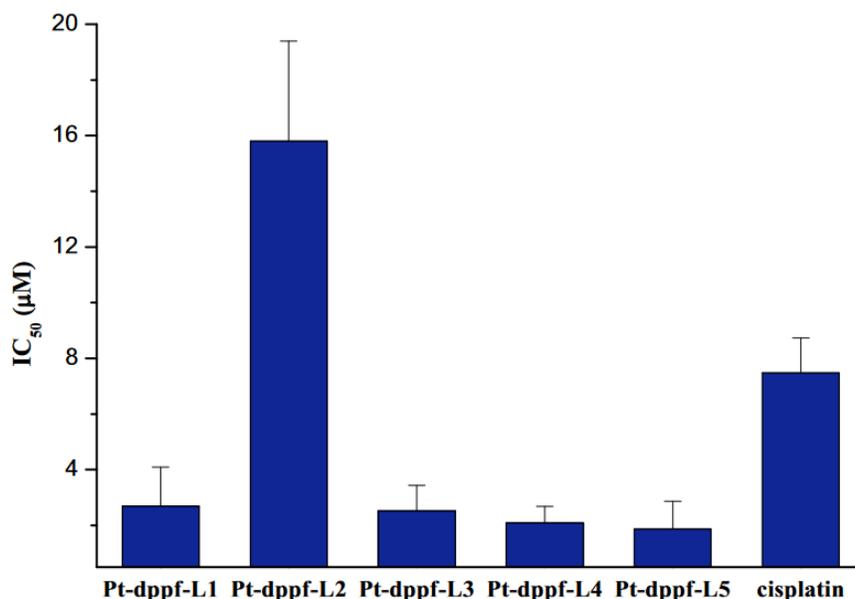


Figura 4.14: Actividad citotóxica de los compuestos Pt-dppf-L, HL = HL1 – HL5 y del cisplatino, frente a células A2780 luego de 48 h de incubación.

#### 4.5 Estudio de estabilidad en solución de los compuestos M-dppf-L4, M = Pd(II) y Pt(II).

##### 4.5.1 Estudio por resonancia magnética nuclear de fósforo (<sup>31</sup>P-RMN) y platino (<sup>195</sup>Pt-RMN)

Para obtener una idea inicial de la estabilidad de los complejos en un medio similar al medio de cultivo utilizado para los ensayos biológicos (pH 7,4), se realizaron los espectros de <sup>31</sup>P-RMN del compuesto de Pt(II) más activo, Pt-dppf-L4. Inicialmente se hicieron medidas durante 48 h a temperatura ambiente en una mezcla de DMSO-*d*<sub>6</sub>/solución tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4, tanto del compuesto como del ligando dppf y del precursor Pt-dppf-Cl<sub>2</sub>.

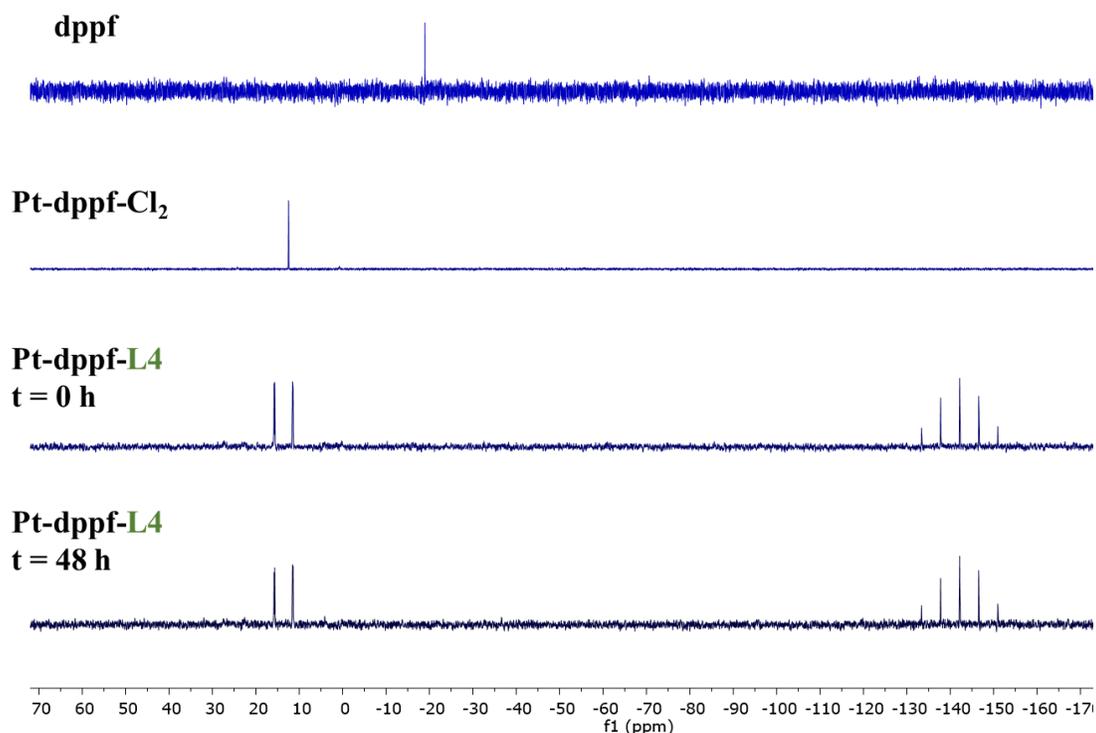


Figura 4.15: Espectros  $^{31}\text{P}$ -RMN del ligando dppf, el precursor Pt-dppf-Cl<sub>2</sub> y el compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO-d<sub>6</sub> / buffer HCl-Tris a tiempo 0 y 48 h.

El espectro  $^{31}\text{P}$ -RMN del ligando dppf muestra solo una señal alrededor de -20 ppm que corresponde a sus dos átomos de P (figura 4.15). Al coordinarse al centro de Pt(II) en el precursor Pt-dppf-Cl<sub>2</sub>, esta señal se desplaza hacia campo bajo alrededor de los 12 ppm, como suele suceder con este ligando al coordinarse a centros metálicos [201]. Por otro lado, el espectro del compuesto Pt-dppf-L4 bajo las condiciones mencionadas muestra a tiempo 0 dos señales de multiplicidad doblete que acoplan entre sí a 15,73 y 11,49 ppm ( $J_{P-P} = 23,6$  Hz), respectivamente. Estos desplazamientos y valores de constante de acoplamiento ( $J$ ) son similares a valores reportados en la bibliografía para complejos con dppf como ligando bidentado [162,202–205]. Estos dobletes corresponden a cada uno de los átomos de P del ligando dppf que, en este caso, pierden equivalencia cuando se coordina el ligando L4 al centro de Pt(II). A su vez, se observa a -144 ppm la señal que corresponde al átomo de P del contraión  $\text{PF}_6^-$ , que se presenta como un septeto por su acoplamiento con cada núcleo de F ( $J_{P-F} = 712$  Hz) [205].

Se observa en la figura 4.15 que luego de 48 horas el espectro del compuesto se mantiene sin alteraciones y no se observan nuevas señales, dando cuenta de la estabilidad del compuesto en el

medio seleccionado por ese período de tiempo. En particular, no se detectó señales ni del ligando dppf libre ni del precursor de Pt(II). Posterior a las 48 h se observó precipitación de un sólido de color similar al compuesto en estudio, por lo que se procedió a redissolver el mismo. Esto se hizo aplicando sonicación con temperatura (30 °C) por 5 min y se recolectaron nuevamente los espectros. En la figura 4.16 se observa que a las 72 h (luego de este tratamiento) se mantienen las señales correspondientes a Pt-dppf-L4 y además se observan nuevas señales hacia valores de campo bajo (56,4 y 32,0 ppm,  $J_{P-P} = 17,6$  Hz), lo cual indicaría la formación de al menos una nueva especie, distinta al compuesto en estudio y al dppf o al precursor. Al transcurrir el tiempo se observa que las señales a 56,4 y 32,0 ppm se intensifican, mientras que las del complejo de interés (15,73 y 11,49 ppm) disminuyen apreciablemente su intensidad, dando lugar a varias señales de intensidad pequeña.

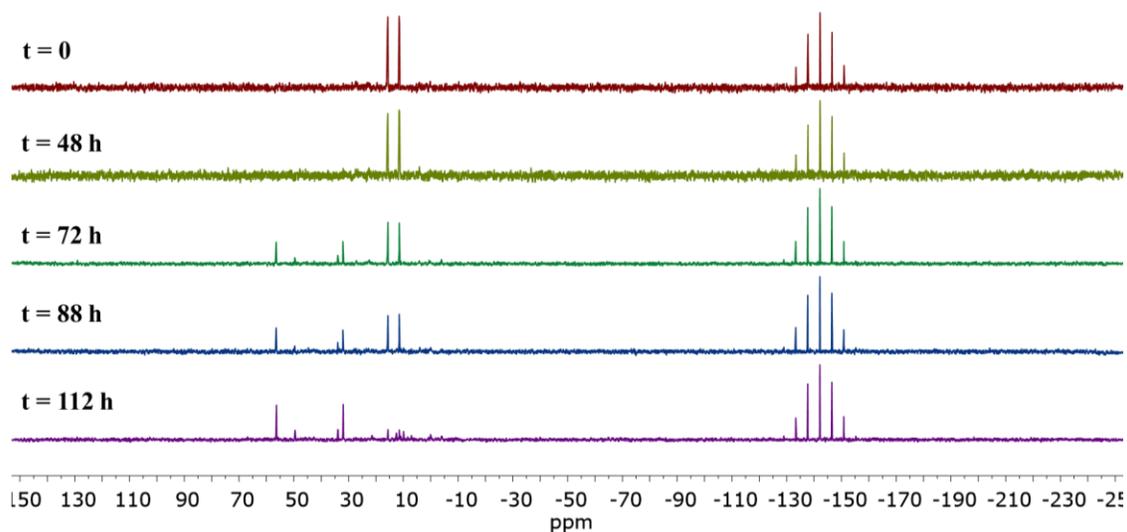


Figura 4.16: Espectros  $^{31}\text{P}$ -RMN del compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$  / buffer HCl-Tris a tiempo 0, 48, 72, 88 y 112 h.

En la figura 4.17 se muestran espectros de  $^{195}\text{Pt}$ -RMN del compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$  / buffer HCl-Tris a distintos tiempos. El  $^{195}\text{Pt}$  es una especie con un 33,8 % de abundancia natural, por lo que es posible que el equipamiento utilizado no posea sensibilidad suficiente para obtener espectros con mayor resolución. A  $t = 0$  se observa una señal de multiplicidad triplete a -4105,3 ppm ( $J_{Pt-P} = 3805$  Hz). Este valor de desplazamiento y constante de acoplamiento ( $J_{Pt-P}$ ) se asemeja a valores reportados en bibliografía para compuestos de Pt(II) con dppf como ligando bidentado en su esfera de coordinación [202,206,207]. Pasadas 48 horas el espectro se mantiene inalterado,

al igual que en los espectros de  $^{31}\text{P}$ -RMN, dando cuenta de la estabilidad del compuesto durante este tiempo. Luego del tratamiento aplicado a la muestra, se observan nuevas señales (figura 4.17,  $t = 75$  h) a  $-4356$  y a  $-4400$  ppm), indicando la generación de al menos una nueva especie en solución. Al cabo de 122 h (5 días), la señal de Pt-dppf-L4 desaparece, mientras que la señal a  $-4400$  ppm aumenta en intensidad. Esta nueva especie podría corresponder a la sustitución de alguno de los ligandos (probablemente L4) por DMSO, ya que el S es átomo donador que posee gran afinidad por el Pt(II). Compuestos de Pt(II) con ligandos con átomos donadores con fuerte carácter  $\pi$ -aceptor (como P o S) muestran señales de  $^{195}\text{Pt}$  en el rango  $-5500 \sim -3500$  ppm [208].

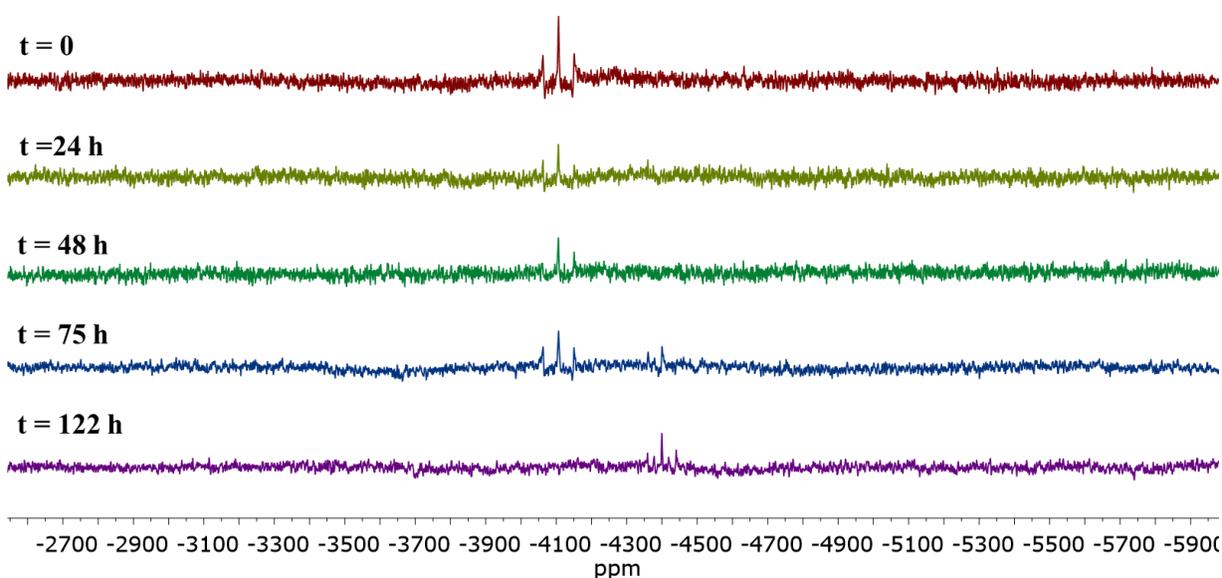


Figura 4.17: Espectros  $^{195}\text{Pt}$ -RMN del compuesto Pt-dppf-L4 en DMSO- $d_6$  / buffer HCl-Tris a tiempo 0, 24, 48, 75 y 122 h.

Mediante los dos estudios de estabilidad realizados se evidencia que, bajo las condiciones de estudio, el compuesto Pt-dppf-L4 se mantiene estable hasta por lo menos 48 horas, es decir, se mantiene la esfera de coordinación del centro de Pt(II). Este período de tiempo es suficiente para llevar a cabo estudios de actividad biológica en células de macrófagos murinos o especies como *T. brucei* o *Leishmania infantum* [105,209]. A su vez, hacia el final de ese período de tiempo se da la precipitación de un sólido, probablemente el compuesto en estudio. Al redissolver dicho sólido aplicando calentamiento y sonicación, se propició la generación de otra especie de Pt(II), probablemente con los ligandos dppf y DMSO en su esfera de coordinación.

#### 4.5.2 Estudio de estabilidad en solución por HPLC

Adicionalmente al estudio de estabilidad realizado por RMN, se realizaron estudios por HPLC para los compuestos M-dppf-L4, donde M = Pd(II) o Pt(II), en DMSO y DMSO/solución tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1), con el fin de evaluar la estabilidad del mismo compuesto seleccionado para los estudios por RMN y la de su análogo de Pd(II) por una misma técnica, sin tratamientos intermedios de la muestra y por períodos de tiempo más largos. Inicialmente, los compuestos, precursores y ligandos se evaluaron usando solo DMSO como disolvente. Los cromatogramas de los compuestos M-dppf-L4 se obtuvieron en t = 0, t = 24 h y t = 7 días. En la tabla 4.12 se muestran los tiempos de retención (TR) de los ligandos, los precursores y los compuestos M-dppf-L4 a tiempo 0.

Tabla 4.12: Valores de tiempo de retención para precursores M-dppf-Cl<sub>2</sub>, ligandos HL4 y dppf y compuestos M-dppf-L4, M = Pd(II) o Pt(II) usando DMSO como solvente en t = 0.

Compuesto	TR (min)
dppf	27,3
HL4	22,3
Pd-dppf-Cl <sub>2</sub>	22,2
Pt-dppf-Cl <sub>2</sub>	21,8
Pd-dppf-L4	24,8
Pt-dppf-L4	24,4

Los valores de TR para los ligandos, precursores y compuestos M-dppf-L4 mostraron diferencias de acuerdo con lo esperado. Considerando una fase estacionaria lipofílica como la usada (columna C18), el dppf, que es el compuesto más lipofílico, tuvo un TR superior al resto de los compuestos. El TR de los precursores es de aprox. 22 minutos y el de ambos compuestos fue aprox. 24 min, lo cual evidencia el mayor carácter lipofílico de los compuestos M-dppf-L4 respecto a sus precursores y al ligando libre HL4. Posteriormente, los compuestos M-dppf-L4 se disolvieron en DMSO/ buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) y se evaluaron a t = 0 y t = 24 h, tiempo mínimo requerido para realizar las pruebas biológicas. Al comparar los tiempos de retención de los

compuestos en DMSO y en DMSO/buffer, no varían significativamente (a  $t = 24$  h, Pd-dppf-L4: 24,862 min y Pt-dppf-L4: 24,713 min).

En los cromatogramas correspondientes a los compuestos M-dppf-L4 se observó una única señal tanto a  $t = 0$  como a  $t = 24$  h (figura 4.18); los valores de TR se mantuvieron hasta  $t = 7$  días. La forma inalterada del pico a lo largo del tiempo, así como la variación no significativa del área asociada, refleja la estabilidad de los compuestos en el medio estudiado. De esta forma se confirmó la estabilidad química de ambos compuestos en los medios mencionados por un período de 7 días.

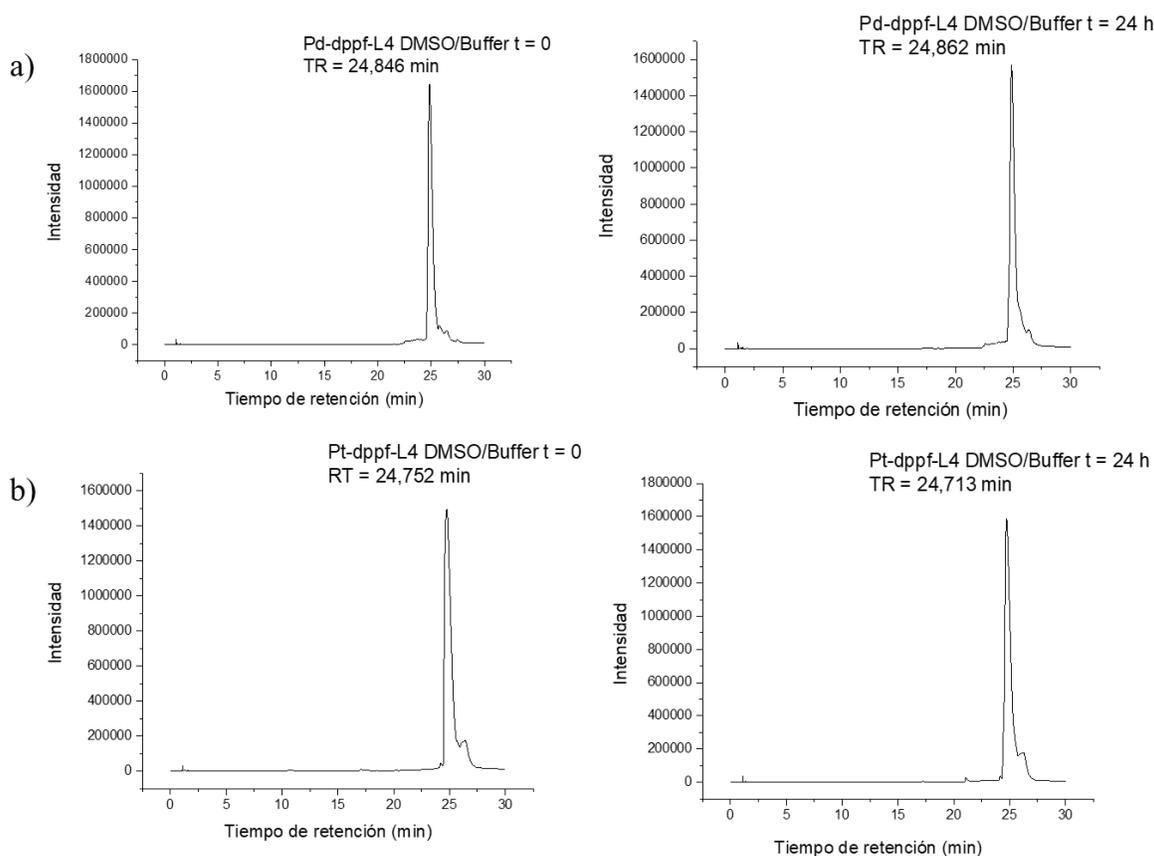


Figura 4.18: Cromatogramas de los compuestos a) Pd-dppf-L4 y b) Pt-dppf-L4 en DMSO/buffer tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) a  $t = 0$  y  $t = 24$  h

Considerando los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad por  $^{31}\text{P}$ -RMN y  $^{195}\text{Pt}$ -RMN, se podría concluir que la aparición de nuevas señales en los espectros de fósforo luego de las 48 horas es a causa del tratamiento aplicado y no de la descomposición de los compuestos en el medio utilizado durante el tiempo de estudio. También debe considerarse que los experimentos de RMN se realizan a concentraciones mayores que los de HPLC.

## 4.6 Lipofilia

Como se mencionó en el capítulo anterior, la lipofilia es una propiedad fisicoquímica que afecta significativamente el comportamiento biológico de un fármaco, por lo que es importante determinar si existe una correlación entre la lipofilia y la actividad biológica de un potencial fármaco. Por esta razón se determinaron valores de  $R_f$  y  $R_M$  para todos los compuestos y ligandos según lo descrito en el capítulo 2, utilizando TLC de fase reversa, donde la fase estacionaria (placas C18 precubiertas) puede considerarse un símil a lípidos de membranas biológicas o receptores, y la fase móvil (MeOH:DMF:H<sub>2</sub>O (65:5:30 v/v/v)) puede considerarse similar al medio biológico acuoso [74]. Los resultados se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13: Valores de  $R_f$  y  $R_M$  de los complejos M-dppf-L (M = Pd(II), Pt(II)) y sus respectivos ligandos HL usando la fase móvil MeOH:DMF:H<sub>2</sub>O (65:5:30 v/v/v).

Compuesto	$R_f$	$R_M$
HL1	0,73	-0,43
HL2	0,73	-0,43
HL3	0,31	0,35
HL4	0,23	0,51
HL5	0,19	0,65
Pd-dppf-L1	0,15	0,76
Pd-dppf-L2	0,06	1,21
Pd-dppf-L3	0,12	0,88
Pd-dppf-L4	0,07	1,15
Pd-dppf-L5	0,04	1,34
Pt-dppf-L1	0,13	0,84
Pt-dppf-L2	0,10	0,97
Pt-dppf-L3	0,11	0,91
Pt-dppf-L4	0,08	1,04
Pt-dppf-L5	0,08	1,07
$R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$		

Se puede observar que en todos los casos los compuestos presentan valores de  $R_f$  mucho menores que los ligandos libres, independientemente del centro metálico, lo que indica que presentan un carácter más lipofílico (a menor valor de  $R_f$ , mayor la afinidad por la fase estacionaria y, por lo tanto, mayor carácter lipofílico). Este comportamiento se corresponde a lo esperado, ya que el co-ligando dppf es un fragmento altamente lipofílico. A su vez, se puede observar que a medida que los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  de los derivados de 8HQ se hacen más pesados, menor es el valor de  $R_f$ . En general, la lipofilia de los compuestos de Pd(II) y la de los compuestos de Pt(II) es muy similar. Más adelante se discutirá la posible correlación entre la lipofilia y la actividad sobre *T. brucei*.

## 4.7 Mecanismo de acción

### 4.7.1 Interacción con ADN

Como ya se indicó, el estudio de la interacción entre el ADN y los complejos estudiados se basa en el desplazamiento del bromuro de etidio (BE) del aducto que se genera entre éste y el ADN ( $\{ADN-BE\}$ ) en solución, y esto se registra mediante medidas de emisión de fluorescencia. En la figura 4.19 se muestra la variación de los espectros de emisión fluorescente del aducto  $\{ADN-BE\}$  al variar la concentración de los compuestos M-dppf-L1, de forma ilustrativa.

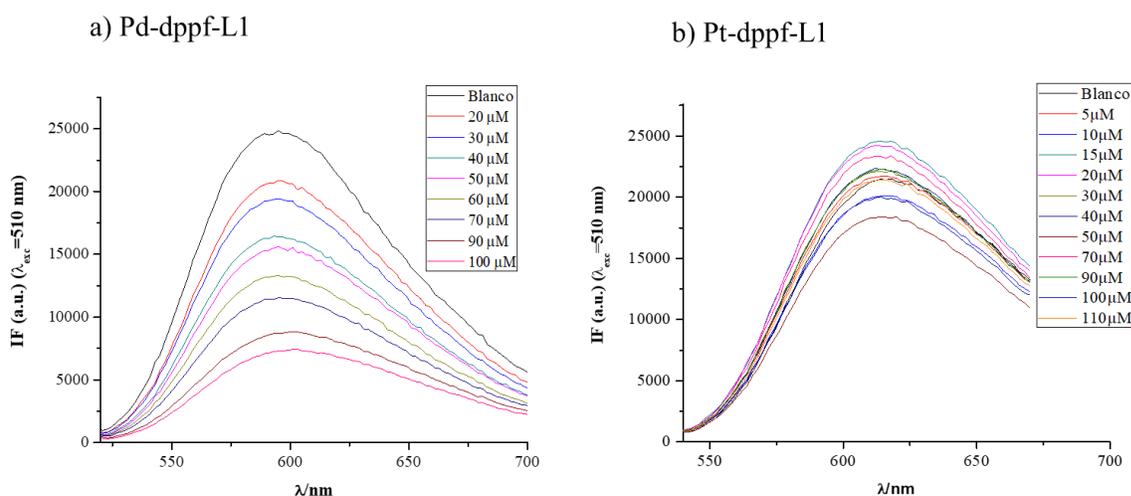


Figura 4.19: Disminución de la emisión de fluorescencia del aducto  $\{ADN-BE\}$  ( $\lambda_{exc} = 510$  nm) observada en soluciones de concentración variable con el complejo a) Pd-dppf-L1 y b) Pt-dppf-L1.

En todos los casos se observó una disminución de la intensidad fluorescencia (*quenching*) del aducto al aumentar la concentración de complejo hasta concentraciones de aproximadamente 100

$\mu\text{M}$ . En la figura 4.19 se observa que el compuesto de Pd-dppf-L1 generó mayor *quenching* que su compuesto análogo de Pt(II) para una misma concentración de complejo. Esta tendencia se observó para todos los compuestos de Pd(II) respecto a sus análogos de Pt(II). Por otro lado, los ligandos libres no manifestaron interacción alguna con el aducto, excepto HL2, que generó una disminución de la intensidad de fluorescencia relativa (% IF) del 16% a 110  $\mu\text{M}$ ; la máxima concentración testada. Este porcentaje es comparable con el efecto causado por el compuesto Pd-dppf-L2 a una concentración de 15  $\mu\text{M}$ .

En la figura 4.20 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia relativa en el máximo de emisión del aducto (594 nm) al aumentar la concentración de complejo. Se observa que todos los complejos presentaron interacción con el aducto, con afinidades variables. Esto se traduce en una interacción apreciable con el ADN a través de este método. Los compuestos de Pd(II) generaron un porcentaje de disminución de fluorescencia mucho mayor que los compuestos de Pt(II). Esto se aprecia claramente en la figura 4.20, al seleccionar los compuestos que presentaron mayor interacción: Pd-dppf-L5 disminuyó el % IF en un 77 % y Pt-dppf-L2 en un 40 %, ambos a la máxima concentración. Esta diferencia entre compuestos análogos de Pd(II) y Pt(II) se ha visto en complejos estudiados anteriormente con los mismos centros metálicos [72].

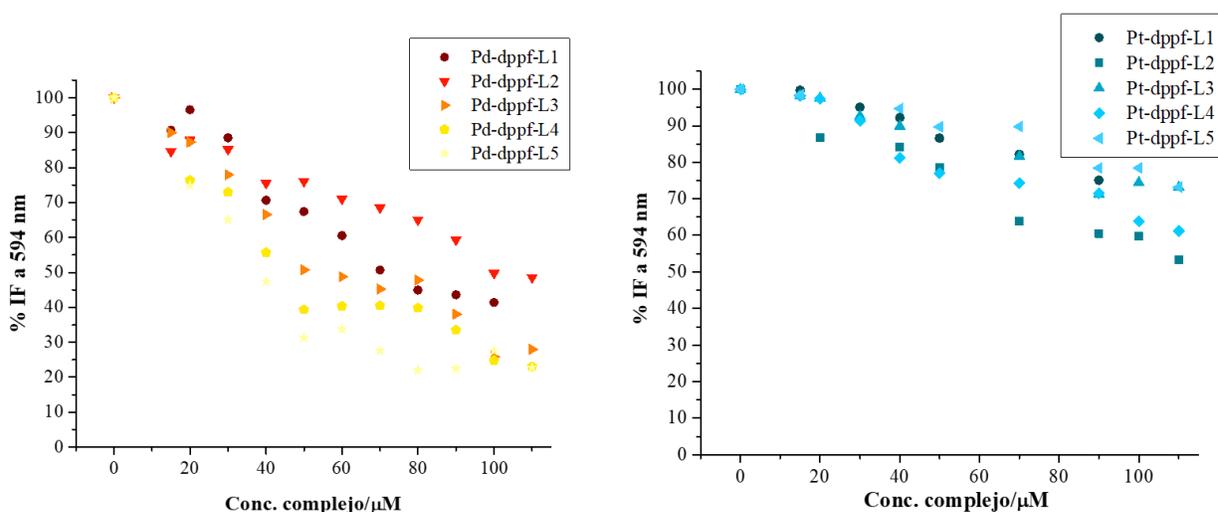


Figura 4.20: Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a  $\lambda_{\text{em}} = 594 \text{ nm}$  aumentando la concentración de complejo para los complejos de Pd(II) y los complejos de Pt(II) de fórmula M-dppf-L.

En el caso de los compuestos de Pd(II), se observó un porcentaje de quenching mayor por parte de los compuestos con 8HQs con sustituyentes voluminosos y atractores de densidad electrónica y menor quenching por parte de los compuestos sin sustituyentes o con sustituyente dador por resonancia (el grupo -NO<sub>2</sub> del HL2). Por otra parte, la magnitud del quenching generado por los compuestos de Pt(II) fue similar para todos los compuestos.

Los resultados, en ambos casos, son consistentes con una interacción de los compuestos con el ADN que induce cambios conformacionales y desplaza a BE del aducto {ADN-BE} en las condiciones testeadas. La técnica utilizada no permite determinar el tipo de interacción que se establece.

Los mecanismos implicados en la disminución de la fluorescencia efectuada por los complejos pueden evaluarse mediante el análisis de la ecuación de Stern-Volmer (1). En esta ecuación, IF<sub>0</sub> e IF corresponden a la intensidad de emisión fluorescente del aducto en ausencia y presencia de complejo, respectivamente; K<sub>SV</sub> es la constante de Stern-Volmer; y [Q] corresponde a la concentración de complejo [175]. A concentraciones bajas de complejo la gráfica IF<sub>0</sub>/IF es lineal (figura 4.21), lo que permite calcular la constante K<sub>SV</sub> para cada sistema, lo que daría cuenta de la magnitud relativa de la afinidad de los compuestos por el ADN (tabla 4.14).

$$\frac{IF_0}{IF} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

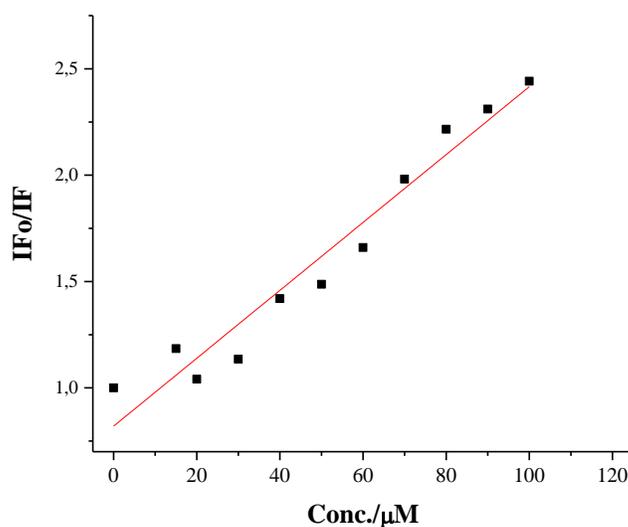


Figura 4.21: Gráfica de Stern-Volmer para el complejo Pd-dppf-L1.

Tabla 4.14: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los sistemas M-dppf-L, M = Pd(II) o Pt(II), HL= HL1-HL5, para la unión competitiva {ADN-EB}, en medio 5 % DMSO/Tris-HCl.

Complejos	$K_{SV} (M^{-1})$	$\text{Log}(K_{SV})$	$R^2$
Pd-dppf-L1	15957	4,2	0,94649
Pd-dppf-L2	6793	3,8	0,95128
Pd-dppf-L3	19525	4,3	0,96876
Pd-dppf-L4	23471	4,4	0,96331
Pd-dppf-L5	43942	4,6	0,94586
Pt-dppf-L1	2102	3,3	0,95968
Pt-dppf-L2	7744	3,9	0,96193
Pt-dppf-L3	3599	3,6	0,98973
Pt-dppf-L4	6053	3,8	0,95477
Pt-dppf-L5	3505	3,5	0,95891

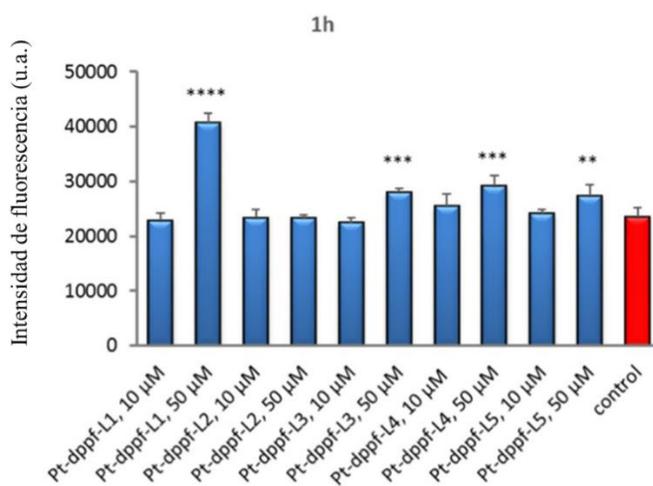
Aunque  $K_{SV}$  informa sobre la disminución de la intensidad de fluorescencia producida por los compuestos, es un parámetro útil que indica indirectamente la afinidad de los compuestos por el ADN. Los resultados del ajuste señalan, que tal como se mencionó anteriormente, todos los compuestos interaccionan con el aducto; en mayor medida los compuestos de Pd(II) que los compuestos de Pt(II). Esto se refleja en los valores mayores de  $\log K_{SV}$ . Se observa, en el caso de los compuestos de Pd(II), que el grado de interacción de los compuestos aumenta ligeramente a medida que aumenta el tamaño de los sustituyentes del anillo quinolínico. Los valores de  $K_{SV}$  obtenidos se encuentran dentro del mismo orden que lo observado en otros complejos similares previamente estudiados [71,72,104,105], pero más bajos que los valores reportados previamente para otros complejos con ligandos típicos intercalantes de ADN (19 – 30) [68].

Cabe destacar que, aunque HL2 genera una disminución de la intensidad de fluorescencia relativa del 16 % (a 110  $\mu\text{M}$ );  $\log K_{SV} = 3,0$ ), el valor de  $K_{SV}$  encontrado para sus complejos de Pd(II) y Pt(II) fue mayor que el encontrado para el ligando libre. Los resultados muestran que en todos los casos los complejos {M-dppf} de los ligandos HL generan una interacción con el aducto {ADN-BE}, que estaba ausente en el caso de los ligandos HL libres. Todo el conjunto de resultados sugiere que el ADN podría ser uno de los blancos moleculares de estos complejos en el parásito.

Sin embargo, no debería ser la diana principal ya que los compuestos de Pd(II) muestran valores de  $K_{sv}$  más altos que los análogos de Pt(II), pero los compuestos de Pt(II) muestran en general actividades más altas que los de Pd(II).

#### 4.7.2 Niveles intracelulares de EROs en células de cáncer de ovario A2780

El cisplatino y la mayoría de los fármacos anticancerosos inducen la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). Se cree que el efecto anticancerígeno está mediado por el aumento del estrés oxidativo que, a su vez, puede activar los mecanismos de muerte celular e inducir la apoptosis [72]. El diacetato de dihidrofluoresceína es una sonda muy utilizada para la detección de EROs basada en la oxidación del reactivo no fluorescente permeable celular ( $H_2DCFDA$ ) para producir diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente, mediante esterasas intracelulares. Este método es conocido por su alta sensibilidad para detectar la producción de EROs, en particular el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo en células intactas [73]. Como las EROs son moléculas químicamente reactivas, los complejos se ensayaron en tiempos de incubación cortos. Las concentraciones utilizadas en los ensayos se seleccionaron teniendo en cuenta los valores de  $IC_{50}$  de los complejos a las 3 h de incubación. La inducción de EROS intracelular por los cinco compuestos Pt-dppf-L en las células A2780 se analizó en  $\lambda_{exc.} = 492 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em.} = 517 \text{ nm}$ . Como se muestra en la figura 4.22, y con la excepción del compuesto menos activo Pt-dppf-L2, todos los complejos inducen la formación de EROS, en particular Pt-dppf-L1. Este efecto fue más evidente al aumentar el tiempo de incubación.



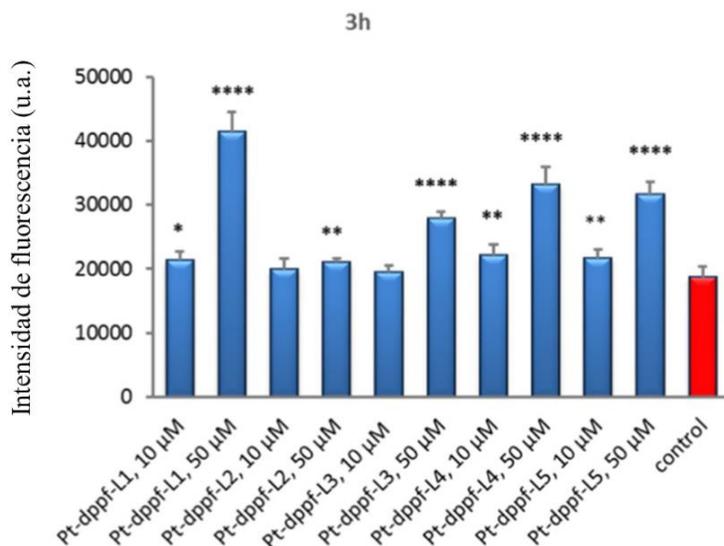


Figura 4.22: Especies reactivas del oxígeno inducidas por los complejos Pt-dppf-L con HL= HL1- HL5 a 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, usando la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.D. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

A 10 y 50  $\mu$ M, la incubación durante 2 h adicionales condujo a un mayor aumento en los niveles de EROs para los complejos con HL = HL3, HL4 y HL5, mientras que para HL1 la producción de EROs retuvo el nivel alcanzado con 1 h de tratamiento. Estos resultados indican que el efecto citotóxico de los complejos de Pt(II) puede, en parte, estar mediado por EROs. De hecho, las altas concentraciones de compuestos requeridas para poner en evidencia la formación de EROs sugieren que pueden estar involucrados otros mecanismos de acción además del desequilibrio redox. Los fármacos quimioterapéuticos cisplatino y doxorubicina también se incluyeron en el estudio como controles positivos, para confirmar su capacidad para inducir la formación de EROs en las condiciones de prueba.

#### 4.8 Estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR)

En los últimos años, en el grupo de investigación donde he realizado mi trabajo de tesis de doctorado se ha desarrollado una serie de compuestos heterobimetálicos de estructura general [M(L)(dppf)](PF<sub>6</sub>), mostrada en la figura 4.23. Estos compuestos comparten la entidad estructural {M-dppf}, donde M es invariablemente Pd(II) o Pt(II) y L son diferentes ligandos bioactivos bidentados. Tres familias de estos compuestos han presentado actividad frente a la forma infectiva

de *T. brucei*: compuestos con “HL” 5-nitrofuril tiosemicarbazonas y dos familias de compuestos desarrollados en este Trabajo de Tesis: con “HL” derivados de tropolona y con “HL” derivados de 8-hidroxiquinolina [105,141,209]. Dada la similitud estructural de todos estos compuestos y su actividad en común frente a *T. brucei*, se planteó realizar un estudio que permitiera determinar la posible correlación entre la estructura química o propiedades fisicoquímicas de los compuestos y la actividad biológica de los mismos, por lo que se realizó un estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR). Para realizar este estudio se tomaron en cuenta factores electrónicos, lipofílicos y la identidad del centro metálico de los compuestos, tal como se detalla en el capítulo 2 (tabla 4.15).

Tabla 4.15: Valores de lipofilia ( $R_M$ ),  $IC_{50}$  contra la forma infectiva de *T. brucei* y de  $\Delta\delta$  de los compuestos  $[M^{II}(L)(dppf)](PF_6)$  con  $M = Pd(II)$  o  $Pt(II)$ , HL= HL1-HL5, Htrop, Hhino, HTN, HTM, HTE o HTF (figura 4.23)

Compuesto	$R_M$	$\Delta\delta^b$	<i>T. brucei GFP</i>		$R_M$	$\Delta\delta^b$	<i>T. brucei GFP</i>	
			$IC_{50} \pm SD / \mu M$	Compuesto			$IC_{50} \pm SD / \mu M$	Compuesto
Pd-dppf-L1	0,76	1,13	$0,9 \pm 0,2$	Pt-dppf-L1	0,84	1,24	$0,3 \pm 0,1$	
Pd-dppf-L2	1,21	-	$0,33 \pm 0,09$	Pt-dppf-L2	0,97	1,31	$0,93 \pm 0,03$	
Pd-dppf-L3	0,88	-	$4,5 \pm 0,1$	Pt-dppf-L3	0,91	1,33	$0,22 \pm 0,01$	
Pd-dppf-L4	1,15	-	$4,8 \pm 0,5$	Pt-dppf-L4	1,04	1,12	$0,14 \pm 0,05$	
Pd-dppf-L5	1,34	-	$7 \pm 4$	Pt-dppf-L5	1,07	1,12	$0,22 \pm 0,04$	
Pd-dppf-hino	1,02	0,80	$1,2 \pm 0,1$	Pt-dppf-hino	0,95	0,73	$4,5 \pm 0,1$	
Pd-dppf-trop	0,93	0,56	$1,3 \pm 0,1$	Pt-dppf-trop	0,76	0,47	$2,1 \pm 0,1$	
Pd-dppf-TF <sup>a</sup>	0,31	0,82	$1,56 \pm 0,04$	Pt-dppf-TF <sup>a</sup>	0,35	0,79	$1,01 \pm 0,04$	
Pd-dppf-TE <sup>a</sup>	0,16	0,83	$0,98 \pm 0,06$	Pt-dppf-TE <sup>a</sup>	0,16	0,81	$0,52 \pm 0,03$	
Pd-dppf-TM <sup>a</sup>	0,07	0,85	$0,93 \pm 0,03$	Pt-dppf-TM <sup>a</sup>	0,10	0,77	$0,60 \pm 0,03$	

Pd-dppf-TN <sup>a</sup>	0,03	0,83	0,90 ± 0,05	Pt-dppf-TN <sup>a</sup>	-0,02	0,82	0,77 ± 0,02
<sup>a</sup> valores extraídos de [74]							
<sup>b</sup> $\Delta\delta$ : $\delta_{\text{dppf complejo}} - \delta_{\text{dppf libre}}$							

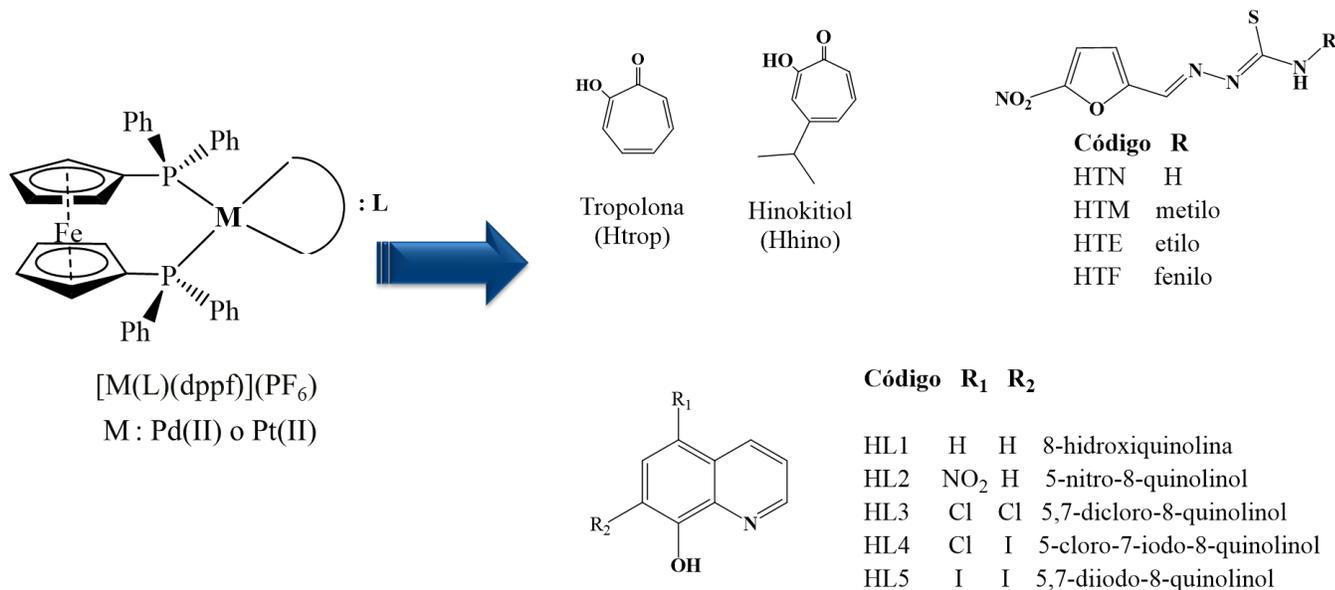


Figura 4.23: Estructura general de los 22 compuestos  $[M(L)(dppf)](PF_6)$  seleccionados para el estudio cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).

En primera instancia, considerando toda la serie de 22 compuestos, se tuvo la dificultad de no contar con valores de  $\Delta\delta$  para cuatro de los cinco compuestos de Pd(II), debido a distorsión de las señales de los protones Cp en sus espectros de <sup>1</sup>H-RMN, como se mencionó previamente (tabla 4.15). De esta manera, el estudio se realizó con 18 compuestos. Inicialmente se encontró una relación multivariable entre la actividad biológica y los factores electrónicos, lipofílicos y la identidad del centro metálico estadísticamente poco robusta:

$$(2) \text{ Log (IC}_{50}) = 0,5499 (\pm 1,3270) - 0,999 (\pm 2,817) * \Delta\delta + 0,01959 (\pm 1,53149) * \Delta\delta^2 + 1,1296 (\pm 1,047) * R_M - 0,9741 (\pm 0,9280) * R_M^2 + 0,1386 (\pm 0,1584) * VI$$

$$R^2 = 0,35392; F = 2,8625; p = 0,06291; n = 18$$

en donde:

**IC<sub>50</sub>** = concentración de compuesto que inhibe el 50 % de crecimiento de los parásitos.

$\Delta\delta = \delta$  señal H $\alpha$  más desapantallada en el complejo -  $\delta$  señal H $\alpha$  del dppf libre

$R_M$ , en donde  $R_M = \log_{10}[(1/R_f)-1]$

$VI$ = variable indicadora asociada a la identidad del centro metálico, donde  $VI = 1$  para compuestos con Pd(II) y  $VI = 0$  para compuestos con Pt(II).

Al comparar la actividad biológica observada y la actividad biológica predicha según esta relación (2), se identificaron dos compuestos como *outliers*: el Pt-dppf-L2 y el Pt-dppf-hino (figura 4.24). Estos compuestos podrían tener mecanismos de acción distintos o adicionales al resto de los compuestos de la serie.

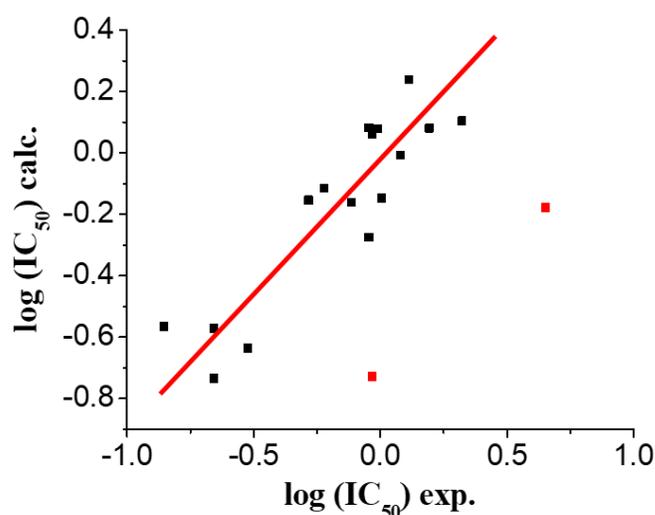


Figura 4.24: Log(IC<sub>50</sub>) calculado según la ecuación preliminar 2 en función del Log(IC<sub>50</sub>) experimental, obtenido de los valores de la tabla 4.15. En rojo, compuestos Pt-dppf-L2 y el Pt-dppf-hino, seleccionados como *outliers*.

Al no incluir en la población en estudio los compuestos mencionados y eliminar parámetros con desviaciones muy grandes, se obtiene una relación multivariable estadísticamente satisfactoria:

$$(3) \text{ Log (IC}_{50}\text{)} = 0,611 (\pm 0,186) - 0,942 (\pm 0,201) * \Delta\delta - 0,112 (\pm 0,103) * R_M^2 + 0,252 (\pm 0,086) * VI$$

$$R^2 = 0,7577; F = 16,6; p = 0,00014; n = 16$$

La ecuación (3) refleja la contribución de todas las variables consideradas en la actividad biológica deseada. Por una parte, refleja la importancia del efecto electrónico que produce el ligando bioactivo sobre la actividad anti-*T. brucei* de los compuestos. Cuando el ligando bioactivo posee grupos atractores de densidad electrónica, la actividad biológica se incrementa (disminuye el IC<sub>50</sub>). A su vez, se evidencia también la contribución de la componente lipofílica de los compuestos; a mayor lipofilia, mejor actividad para esta población. Por otra parte, la presencia de centros de platino contribuye a la disminución de valores de IC<sub>50</sub>.

Al examinar los errores asociados a cada una de las variables independientes que integran la ecuación (3), se observa que el valor de R<sub>M</sub><sup>2</sup> se equipara con su error, por lo que podría eliminarse de la ecuación y re-analizar la correlación sin esta variable. Realizando nuevamente la regresión multivariable con los descriptores restantes, se obtiene la siguiente ecuación:

$$(4) \text{ Log (IC}_{50}) = 0,628 (\pm 0,187) - 1,202 (\pm 0,189) * \Delta\delta + 0,257 (\pm 0,087) * \text{VI}$$

$$R^2 = 0,7573; F = 24,02; p = 0,00004; n = 16$$

Se observa que al eliminar la componente lipofílica de (3), el valor de R<sup>2</sup> se mantiene pero que los valores de F y p mejoran, ya que F es mayor (contrastando aún más la hipótesis nula de que R<sup>2</sup> es cero) y p es menor que en el caso de (3). A su vez, se puede visualizar que los errores de cada uno de los coeficientes de la ecuación mejoran en forma notoria.

La correlación encontrada entre la actividad biológica, los parámetros electrónicos, lipofílicos y variable indicadora expresan de forma cuantitativa las observaciones anteriormente realizadas: el compuesto más activo de toda la serie (Pt-dppf-L4) posea un centro metálico de Pt(II), alta lipofilia y un ligando bioactivo con grupos atractores de densidad electrónica. En suma, estas ecuaciones pueden ser utilizadas como una herramienta de diseño para el desarrollo de compuestos que puedan tener un mejor perfil biológico.

#### 4.9 Estudios de eficacia terapéutica del compuesto Pt-dppf-L4 en ratones

Del conjunto de compuestos desarrollados en este capítulo y en el anterior, se encontraron dos compuestos considerados “hit”, con actividad biológica importante y/o índices de selectividad elevados: Pd-dppf-L2 (IC<sub>50</sub> = 0,33 μM; IS = 102) y Pt-dppf-L4 (IC<sub>50</sub> = 0,14 μM; IS = 48). Por tal razón se consideraron candidatos para ensayos preliminares de eficacia terapéutica. Sin embargo,

debido a problemas de baja solubilidad de Pd-dppf-L2, el estudio *in vivo* de eficacia terapéutica se realizó con el compuesto Pt-dppf-L4.

En primer lugar, se probó la toxicidad de Pt-dppf-L4 en ratones no infectados, administrándolo por vía intraperitoneal a una concentración de 10,5 mg/kg al día durante cuatro días, para verificar que el compuesto por sí mismo no fuese tóxico para los animales y así determinar el régimen de administración a los animales infectados. Considerando que el volumen de fluidos extracelulares de un ratón es de 4,8 mL [210], la concentración usada es cercana a 260 veces el IC<sub>50</sub> determinado *in vitro*. No hubo signos clínicos de toxicidad aguda (diarrea, hiper/hipoventilación, excitación, ataxia, supresión del peso corporal, pérdida de pelo, etc.) en los animales en estudio durante el tiempo de administración del compuesto.

Posteriormente, se infectaron tres grupos de 3 ratones cada uno con una línea celular bioluminiscente de *T. brucei* (*T. brucei*-LUC). Se inició el tratamiento con una administración intraperitoneal de Pt-dppf-L4 (10,5 mg/kg × 4 días), vehículo (DMSO 2,75 g/kg × 4 días) o una dosis única del fármaco Berenil (DAC 40 mg/kg) como control positivo a cada grupo correspondiente. Como se muestra en la figura 4.25, la carga relativa de parásitos se controló de forma no invasiva mediante imágenes *in vivo* de ratones anestesiados en diferentes momentos.

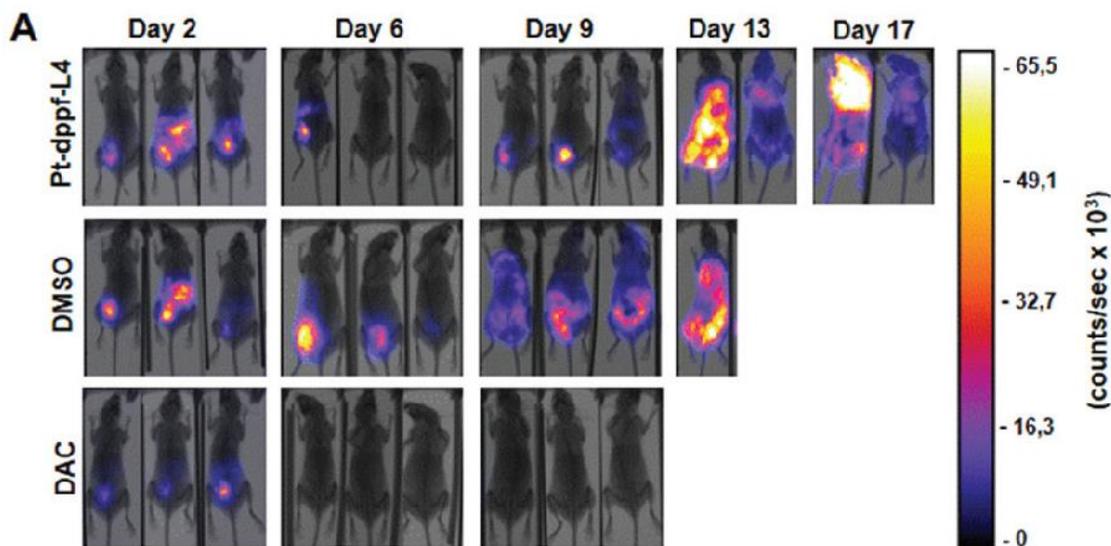


Figura 4.25: Estudios de eficacia terapéutica en un modelo murino para Tripanosomiasis Africana Humana (HAT). Imágenes *in vivo* de ratones infectados con *T. brucei*-LUC. La señal de bioluminiscencia se adquirió con los animales en posición ventral y utilizando un equipo Xtreme II (Bruker).

Dado el pequeño número de animales, solo se realizó un análisis cualitativo de los datos. Las imágenes del día 2, inmediatamente antes del inicio del tratamiento, confirman que todos los animales se infectaron con éxito. La bioluminiscencia en los días 6 y 9 posteriores a la infección (que corresponde a 24 h y 96 h posteriores a la finalización de los tratamientos) muestra que los animales tratados con Pt-dppf-L4 presentan un área e intensidad de señal comparativamente más bajas que aquellos que recibieron vehículo solo (DMSO). Vale la pena señalar que en el día 9, la bioluminiscencia en los animales tratados con Pt-dppf-L4 todavía estaba confinada a la región abdominal (similar al día 6), mientras que, en los ratones del grupo del vehículo, la señal se extendió a la región torácica. A partir del día 11, la señal de bioluminiscencia aumentó y se extendió por todo el cuerpo de los animales de ambos grupos. A su vez, se observa en la figura 4.25 que el tratamiento con una dosis única del fármaco control DAC demostró ser muy eficaz para controlar y eliminar los parásitos de los ratones [211], como lo demuestra la falta de señal de bioluminiscencia desde el día 6 después de la infección y hasta el final del experimento. A pesar de que este estudio es bastante preliminar, los resultados muestran que Pt-dppf-L4 carece de toxicidad aguda cuando se aplica a animales en la dosis/régimen descrito anteriormente, y también sugieren que el compuesto es capaz de ejercer un efecto antiproliferativo en parásitos que extiende ligeramente la supervivencia de los animales, pero no es curativo. Teniendo en cuenta que este compuesto es uno de los más lipofílicos de la serie de Pt(II), su falta de eficacia *in vivo* podría atribuirse en parte a una baja biodistribución del compuesto en los fluidos extracelulares (los tripanosomas africanos son predominantemente parásitos extracelulares). Sin embargo, otros factores podrían explicar la falta de actividad *in vivo*, como la metabolización del compuesto y unión a proteínas plasmáticas.

#### 4.10 Conclusiones parciales

Se desarrolló una familia de 10 nuevos compuestos heterobimetálicos de Pd(II)-Fe y Pt(II)-Fe que contienen el derivado de ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf) y los ligandos bioactivos (HL) derivados de la 8-hidroxiquinolina (8HQ) con fórmula general  $[M^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  (M-dppf-L), y se logró obtenerlos con un rendimiento de síntesis que oscila entre el 30 % y el 60 %.

Estos compuestos se caracterizaron exhaustivamente tanto en estado sólido como en solución. En estado sólido se verificó la presencia del fragmento {M-dppf-} y los ligandos coordinados y se

asignaron de forma tentativa bandas de vibración IR para los nuevos compuestos. Se obtuvo la estructura cristalina de 6 de los 10 nuevos compuestos: 3 de compuestos de Pd(II) y 3 de compuestos de Pt(II). Se verificó la coordinación de los ligandos a los centros de Pd(II) y Pt(II), según se postuló a través del estudio por espectroscopía infrarroja. Todas las estructuras cristalinas son isoestructurales entre sí. En solución se comprobó que estos compuestos se comportan como electrolitos 1:1 y por resonancia magnética nuclear se asignaron señales de los protones de los fragmentos {M-dppf} y de los ligandos derivados de 8HQ en todos los casos, dando cuenta de que en solución los nuevos compuestos se mantienen como una entidad de estructura similar al estado sólido. Además, se sugiere que la diferencia en el perfil de los espectros de los compuestos de Pd(II) y Pt(II) podría deberse a una distorsión de la geometría planar cuadrada hacia una geometría más "tetraédrica", lo que podría afectar su carácter diamagnético.

Todos los compuestos se evaluaron frente a la forma infectiva de *T. brucei* y sobre macrófagos murinos como modelo de células de mamífero. Todos mostraron actividad frente a *T. brucei* en el rango micromolar y submicromolar, en particular los compuestos de Pt(II), que resultaron ser los más activos de toda la familia (IC<sub>50</sub> 0,14 – 0,93 μM) y, en general, los más selectivos. Los compuestos de Pd(II) mostraron actividad anti-*T. brucei* y citotoxicidad en el modelo de células de mamífero seleccionado en el mismo orden que los ligandos libres HL. Adicionalmente, los compuestos de Pt(II) fueron evaluados en células de cáncer de ovario A2780/A2780cisR, sensible al cisplatino y resistente al mismo, respectivamente. La mayoría de los complejos mostró una actividad citotóxica superior a la del cisplatino. Los compuestos mostraron valores de IC<sub>50</sub> frente a células resistentes al cisplatino, A2780cisR, del mismo orden de magnitud que los encontrados para las células A2780, mostrando índice de selectividad aceptables.

En cuanto al probable mecanismo de acción, los compuestos no alteran la homeostasis tiol-redox intracelular del parásito. La interacción de los complejos con el ADN sugirió que esta biomolécula podría ser un blanco potencial. Es de resaltar el estudio QSAR realizado, dado que este tipo de estudio es poco común en Química Inorgánica Medicinal debido a que no es habitual disponer de un número adecuado de compuestos estructuralmente relacionados que permita realizarlo. Según el estudio QSAR realizado, los compuestos con centros de Pt(II), ligandos aceptores de electrones y mayor lipofilicidad darían como resultado una mayor actividad anti-*T. brucei*. Entre todos los compuestos desarrollados, el compuesto Pt-dppf-L4 se seleccionó para realizar un estudio

preclínico exploratorio en ratones infectados. Aunque este compuesto no curó la infección, contribuyó a prolongar la supervivencia de los ratones.

## Capítulo 5:

Nuevos compuestos de Ru(II) con dppf, derivados de la 1,10-fenantrolina y derivados de la 8-hidroxiquinolina

## 5.1 Introducción

Este capítulo trata sobre el desarrollo de un grupo de cuatro nuevos compuestos heterobimetálicos Ru(II)-Fe(II) de fórmula general  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$ , donde HL son ligandos bioactivos seleccionados derivados de la 8-hidroxiquinolina (8HQ), dppf es el derivado de ferroceno 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf), NN corresponde a derivados seleccionados de la 1,10-fenantrolina y X corresponde a los contraiones hexafluorofosfato ( $\text{PF}_6^-$ ) o cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), según sea el caso. Estos compuestos se identificarán de aquí en adelante como Ru-NN-L(X) (figura 5.1). Estos compuestos se desarrollaron utilizando los resultados de nuestras investigaciones previas para avanzar en el diseño racional de nuevos compuestos metálicos multifuncionales con actividad antiparasitaria. Se modifica la naturaleza del centro metálico para aumentar su número de coordinación y así habilitar la posibilidad de incluir dos ligandos bioactivos bidentados diferentes junto al coligando dppf en la misma especie híbrida.

En este apartado se expone la síntesis y caracterización en estado sólido y en solución, tanto de los nuevos compuestos como de los precursores necesarios para su obtención. A su vez, se describen los resultados de la evaluación de propiedades fisicoquímicas de interés biológico de los compuestos (lipofilia y estabilidad en solución), la evaluación *in vitro* sobre la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), sobre promastigotes de *L. infantum* y sobre macrófagos murinos como modelo de células mamíferas sanas. Adicionalmente se estudian posibles mecanismos de acción, como su interacción con ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs).

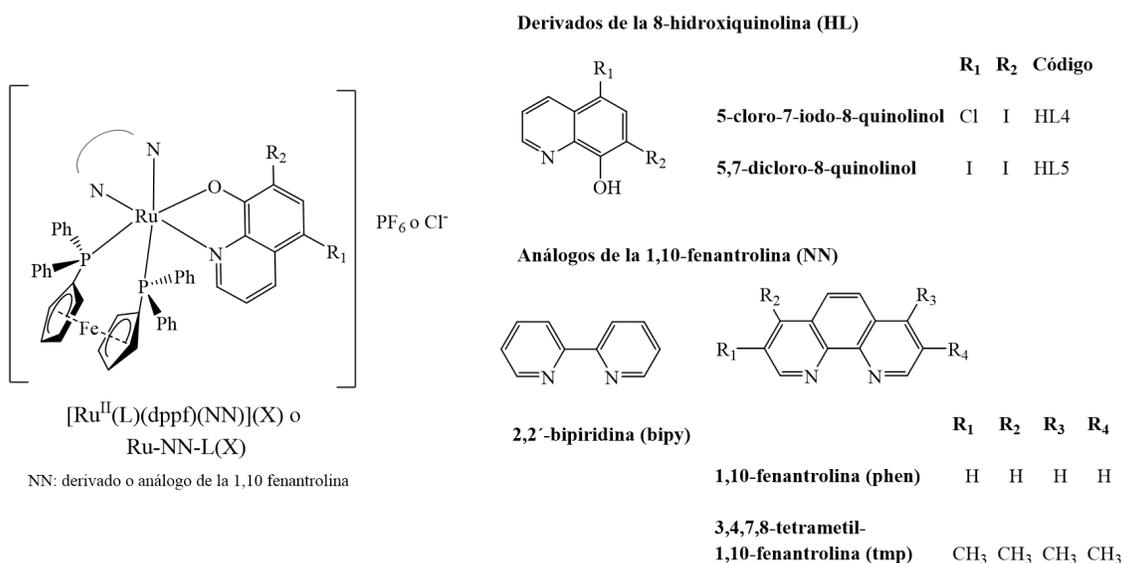


Figura 5.1: Estructura general de los nuevos complejos heterobimetálicos desarrollados Ru-NN-L(X).

## 5.2 Síntesis

Los compuestos finales  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{dppf})(\text{NN})](\text{X})$  o Ru-NN-L(X) se obtuvieron a través de un procedimiento sintético de cuatro pasos según se muestra en el esquema de la figura 5.2. El procedimiento se basa en la obtención de un primer compuesto de coordinación de Ru(II): el *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4]$  (PRE1) a partir de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , para luego llevar a cabo la sustitución sucesiva de ligandos  $\text{Cl}^-$  o DMSO por los ligandos bioactivos de interés.

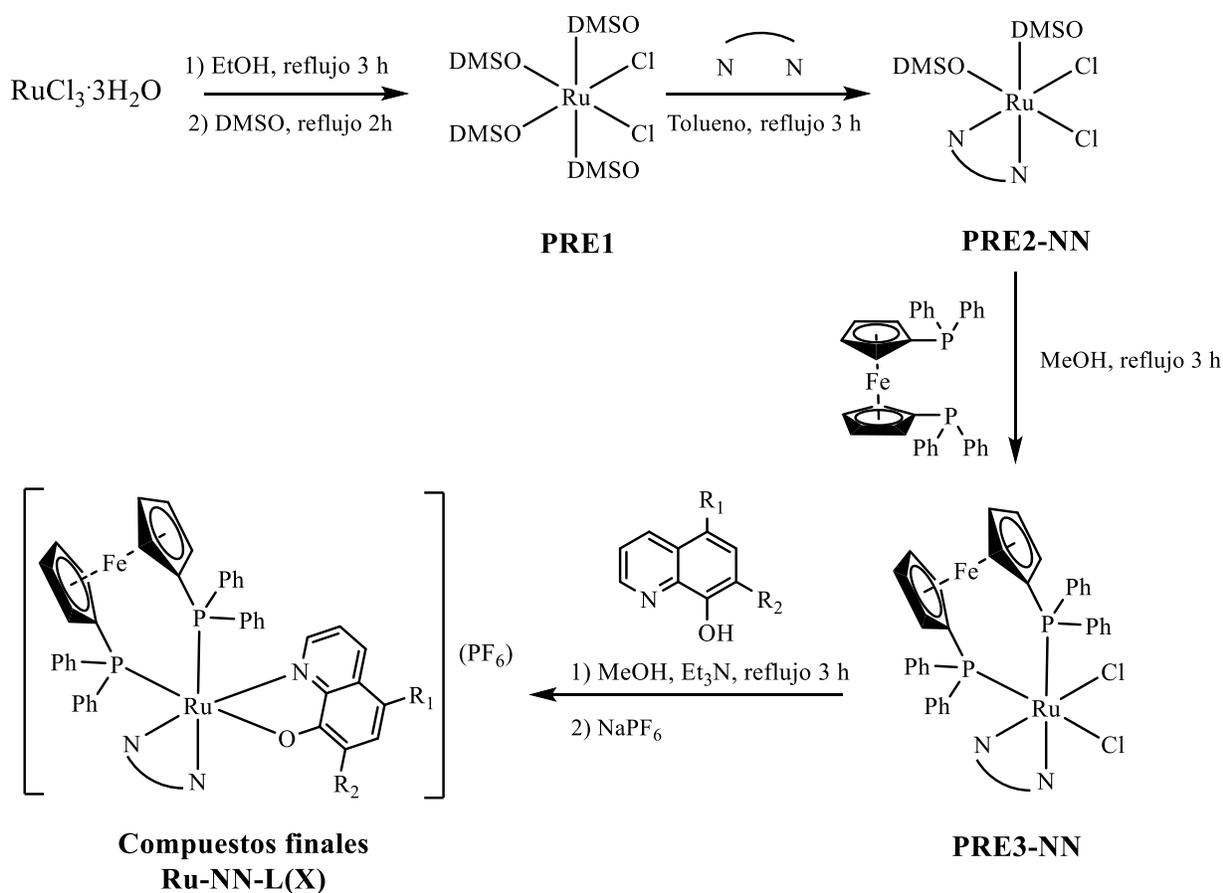


Figura 5.2: Esquema de síntesis en cuatro etapas de los compuestos finales Ru-NN-L(X) a partir de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

### 5.2.1 Síntesis de precursores

#### 5.2.1.1 Síntesis de PRE 1 o *cis, fac*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]

Inicialmente, la síntesis de PRE1 se realizó según lo reportado por Evans *et al.* [212], en donde se suspende RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O en DMSO y se calienta a reflujo por 5 minutos. El rendimiento y la pureza del sólido obtenido al aplicar esta técnica repetidas veces fue muy variable, por lo que se intentó obtener el precursor siguiendo la técnica reportada por Bratsos *et al.* [101], que es una modificación de la planteada inicialmente por Evans *et al.* Esta modificación implica un procedimiento de dos etapas, descrito en el capítulo 2. En la primera etapa se calienta a reflujo RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O en etanol y en la segunda, la solución obtenida en la primera etapa se calienta a reflujo con DMSO. Es importante mencionar que el “RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O” comercial, a pesar de ser uno de los materiales de partida más comunes para la síntesis de numerosos compuestos de Ru, es universalmente reconocido como una mezcla heterogénea no definida, de estado de oxidación variable, compuesta por oxocloro e hidroxocloro complejos de rutenio monoméricos y poliméricos [213]. Esto, sumado al hecho de que se desconocen los mecanismos por los que ocurre la reacción de obtención de PRE1, dificulta la identificación de la(s) especie(s) obtenidas al finalizar la primera etapa de síntesis. Es posible que en presencia de etanol y agua se obtenga una mezcla de especies complejas hidrolizadas que contengan ligandos cloruro, en donde probablemente coexistan estados mixtos de oxidación de Ru. En la segunda etapa, parte de los ligandos de estas especies complejas son sustituidos por moléculas de DMSO para finalmente obtener la especie *cis, fac*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]. La aplicación de ésta última técnica llevó a resultados más consistentes.

#### 5.2.1.2 Síntesis de los PRE2-NN: *cis, cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(DMSO)<sub>2</sub>], donde NN = 1, 10-fenantrolina (phen), 2,2'-bipiridina (bipy) o 3,4,7,8-tetrametilfenantrolina (tmp)

En un segundo paso, se obtuvo los PRE2-NN o *cis, cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(DMSO)<sub>2</sub>] por reacción de PRE1 y el correspondiente NN (phen, bipy o tmp) en tolueno a reflujo. Hasta donde se conoce, la síntesis de PRE2-tmp se reporta por primera vez en el marco de este Trabajo de Tesis [214]. Se sintetizó poniendo a punto un procedimiento similar al reportado para PRE2-phen y PRE2-bipy [102,103]. Los sólidos obtenidos presentaron distintas tonalidades entre el amarillo y el verde, con altos rendimientos en todos los casos: PRE2-phen, R = 90 %, PRE2-bipy, R = 94 % y PRE2-tmp, R = 90 %.

### 5.2.1.3 Síntesis de los PRE3-NN: *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(dppf)], donde dppf = 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno

En un tercer paso, los PRE3-NN se obtuvieron por reacción de los PRE2-NN con dppf en metanol a reflujo. Si bien los complejos PRE3-phen y PRE3-bipy han sido reportados anteriormente, ambas síntesis parten de un precursor distinto al utilizado en este Trabajo de Tesis: el *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NN)] [204]. Inicialmente, la ruta sintética planteada para la obtención de los compuestos finales incluía el uso de este precursor, sin embargo, no fue posible obtener resultados reproducibles. Además, dicha ruta sintética requería el uso de técnicas Schlenk, no disponibles en nuestro laboratorio, mientras que la ruta sintética utilizada en este trabajo no.

Por otro lado, hasta donde se conoce, la síntesis de PRE3-tmp se reporta por primera vez en el marco de este Trabajo de Tesis [214]. Se sintetizó a través de un procedimiento similar al informado anteriormente para PRE3-phen y PRE3-bipy. Los tres precursores fueron obtenidos con altos rendimientos: PRE3-phen, R = 77 %, PRE3-bipy, R = 91 % y PRE3-tmp, R = 78 %.

### 5.2.2 Síntesis de los compuestos finales Ru-NN-L(X) o [Ru<sup>II</sup>(L)(dppf)(NN)](X)

Los complejos finales con los ligandos seleccionados derivados de la 8HQ fueron sintetizados según lo indicado en el capítulo 2. El método de síntesis está basado en la reacción de sustitución de los ligandos cloruro del respectivo PRE3-NN por el ligando bidentado HL correspondiente previamente desprotonado por acción de la trietilamina, para generar un catión complejo. El agregado del contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup> permite aislar los compuestos en forma de sólidos amorfos. Posteriormente, los sólidos obtenidos fueron recristalizados mediante difusión lenta líquido-líquido CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano, obteniéndose cristales de color naranja y/o rojo. En el caso del compuesto con NN = tmp se obtuvo ambos tipos de cristales. A través de esta técnica fue posible obtener solamente compuestos con NN = bipy o tmp; no fue posible aislar los compuestos con NN = phen con rendimiento y una pureza adecuada.

Por otro lado, la síntesis del compuesto Ru-bipy-L5(Cl) se basa en el intercambio del contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup> por Cl<sup>-</sup> en el compuesto Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) previamente obtenido, haciendo uso de una resina de intercambio catiónico cargada de iones cloruro. En la tabla 5.1 se presenta los rendimientos obtenidos en la síntesis de cada nuevo complejo. En el caso de los compuestos con NN = tmp, el

rendimiento reportado corresponde a los cristales naranja; los cristales rojos se obtuvieron con rendimiento muy bajo.

Tabla 5.1: Rendimientos de síntesis de los nuevos compuestos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5 y X = PF<sub>6</sub><sup>-</sup> o Cl<sup>-</sup>.

Compuesto	Rendimiento (%)
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	65
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	55
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	68
Ru-bipy-L5(Cl)	70

## 5.3 Caracterización

### 5.3.1 Caracterización de los precursores

Para la caracterización de todos los precursores se utilizaron las técnicas de análisis elemental de elementos livianos, FTIR y <sup>1</sup>H-RMN. En el caso de precursores previamente reportados en bibliografía, se compararon los resultados obtenidos con los valores reportados. En todos los casos, los resultados concuerdan con lo esperado.

#### 5.3.1.1 PRE1 o *cis, fac*-[RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]

Tabla 5.2: Análisis elemental de PRE1

	%C	%N	%H	%S
Teórico	19,83	0,00	4,99	26,47
Experimental	19,87	0,00	5,00	26,43

Tabla 5.3: Principales bandas vibracionales IR de PRE1

	$\nu(\text{S=O})$ DMSO <i>S-bonded</i>	$\nu(\text{S=O})$ DMSO <i>O-bonded</i>
Reportado [101]	1122, 1095	921
Experimental	1115, 1096	925

Los resultados de análisis elemental obtenidos se ajustan a la fórmula planteada. Está reportado que este compuesto posee tres moléculas de DMSO unidas por el átomo de S (*S-bonded*) y una molécula de DMSO unida por el átomo de O (*O-bonded*). Las tres moléculas de DMSO unidas por S se encuentran en una disposición facial, y los dos cloruros en disposición *cis* [215]. Las bandas vibracionales IR concuerdan con lo reportado, observándose bandas de estiramiento tanto para DMSO *S-bonded* como para DMSO *O-bonded*. En el caso del espectro  $^1\text{H-RMN}$ , se observaron las señales correspondientes a los protones metílicos de cada molécula de DMSO (tabla 5.4), no equivalentes entre sí. Además, de acuerdo con lo reportado, se observaron señales adicionales debido a la presencia de especies producto de la descomposición del compuesto.

Tabla 5.4: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE1

Desplazamiento (ppm)	DMSO <i>S-bonded</i>	DMSO <i>S-bonded</i>	DMSO <i>S-bonded</i>	DMSO <i>O-bonded</i>
Reportado (D <sub>2</sub> O) [101]	3,46	3,44	3,32	2,80
Experimental (CDCl <sub>3</sub> )	3,43	3,37	3,26	2,66

### 5.3.1.2 PRE2-NN o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(DMSO)<sub>2</sub>]

- PRE2-phen o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)(DMSO)<sub>2</sub>]

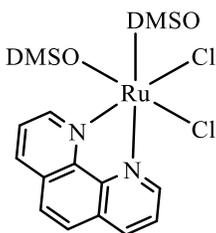


Tabla 5.5: Análisis elemental de PRE2-phen

	%C	%N	%H	%S
Teórico	37,80	5,51	3,97	12,61
Experimental	37,89	5,61	3,95	12,43

Tabla 5.6: Principales bandas vibracionales IR de PRE2-phen

	$\nu$ (C=N) y (C=C)	$\delta$ (C-N) y (C-C)	$\nu$ (S=O) DMSO
Reportado [102]	-	1418	1082
Experimental	1512, 1494	1432, 1415	1085

Tabla 5.7: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE2-phen

$\delta$ (ppm)	
Reportado [102] (CDCl <sub>3</sub> )	PRE2-phen (CDCl <sub>3</sub> )
10,07	10,05
9,98	9,92
8,47	8,43
8,37	8,32
7,98	7,94
7,92	7,90
7,87	7,87
7,76	7,71
3,62; 3,59; 3,12 y 2,44	3,56; 3,53; 3,09 y 2,44

Se confirma que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado para PRE2-phen. Se confirma través de <sup>1</sup>H-RMN que la disposición de los ligandos cloruro y DMSO es *cis,cis*.

- PRE2-bipy o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bipy)(DMSO)<sub>2</sub>]

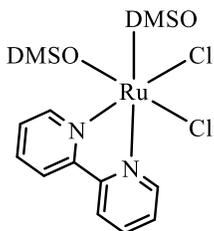


Tabla 5.8: Análisis elemental de PRE2-bipy

	%C	%N	%H	%S
Teórico	34,71	5,78	4,16	13,24
Experimental	34,72	5,74	4,11	13,17

Tabla 5.9: Principales bandas vibracionales IR de PRE2-bipy

	$\nu$ (C=N) y (C=C)	$\delta$ (C-N) y (C-C)	$\nu$ (S=O) DMSO
Reportado [103]	1602, 1473	-	1085
Experimental	1605, 1475	1420	1091

Tabla 5.10: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE2-bipy

$\delta$ (ppm)	
Reportado [103](CDCl <sub>3</sub> )	PRE2-bipy (CDCl <sub>3</sub> )
9,90	9,87
9,73	9,71
8,19	8,16
8,14	8,11

8,04	8,00
7,93	7,89
7,63	7,60
7,48	7,44
3,58; 3,55; 3,24 y 2,68	3,56; 3,52; 3,21 y 2,63

Se confirma que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado para PRE2-bipy.

- PRE2-tmp o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(tmp)(DMSO)<sub>2</sub>]

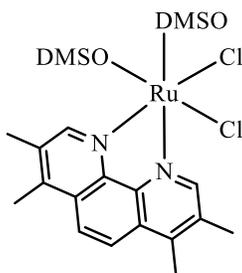


Tabla 5.11: Análisis elemental de PRE2-tmp

	%C	%N	%H	%S
Teórico	42,55	4,96	5,00	11,36
Experimental	42,65	4,93	5,04	10,95

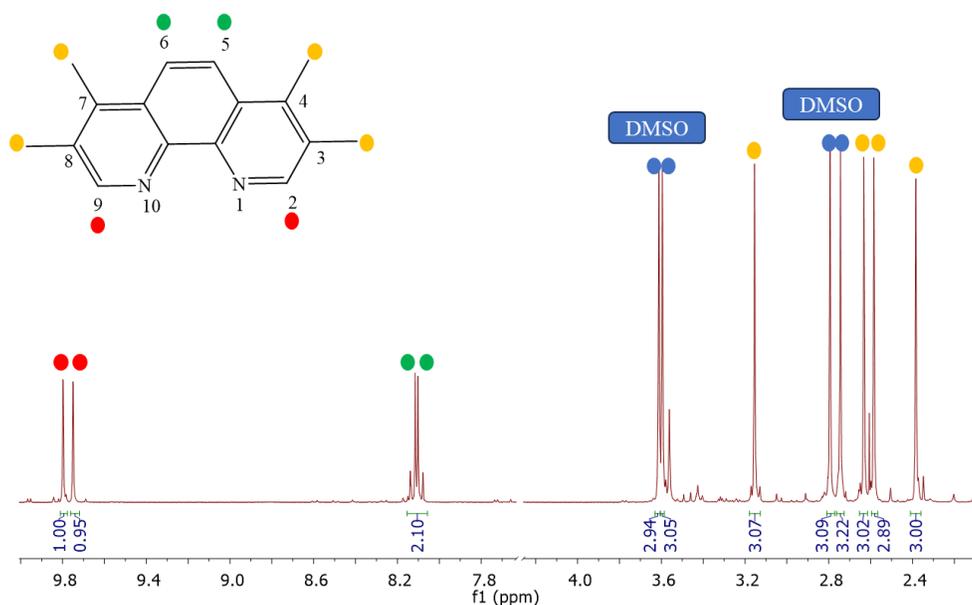
Los resultados de análisis elemental concuerdan con los valores teóricos calculados para la fórmula propuesta. Por otro lado, se asignó tentativamente las principales bandas vibracionales IR teniendo en cuenta las del ligando tmp libre y la asignación de las principales bandas de sus compuestos análogos PRE2-phen y PRE2-bipy.

Tabla 5.12: Asignación de principales bandas vibracionales IR de PRE2-tmp

	$\nu$ (C=N) y (C=C)	$\delta$ (C-N) y (C-C)	$\nu$ (C-CH <sub>3</sub> )	$\nu$ (S=O) DMSO
tmp	1611, 1567, 1510	1420	1380, 1263	-
PRE2-tmp	1618, 1578, 1524	1430	1392, 1270	1090, 1015

Se identificaron señales del ligando tmp y de los ligandos DMSO. Se observa un desplazamiento hacia frecuencias mayores en las bandas correspondientes a vibraciones C=N y C=C al coordinar, y las mismas pierden intensidad. También aumenta la frecuencia de vibración C-CH<sub>3</sub>. La señal de 1107 cm<sup>-1</sup> en PRE1 (tabla 5.3) pierde intensidad notoriamente, mientras que la intensidad de la señal a 1085 cm<sup>-1</sup> se mantiene, presentando un pequeño desplazamiento a frecuencias mayores.

En la figura 5.3 se muestra el espectro <sup>1</sup>H-RMN del nuevo precursor, donde se muestran las señales asociadas al ligando tmp y las señales de los protones de las moléculas de DMSO. En el espectro de la tmp libre se observa un total de 4 señales: dos señales en la zona aromática (entre 8 – 9 ppm), correspondientes a H2/H9 y H5/H6, y dos señales en la zona alifática alrededor de 2,5 ppm correspondientes a los grupos metilo de las posiciones C3/C8 y C4/C7. Al coordinarse al centro de Ru(II) sustituyendo dos moléculas de DMSO de PRE1, los protones del ligando tmp pierden su equivalencia por lo que en el espectro se ven todos los protones diferenciados, con un total de 8 señales asociadas al ligando tmp.


 Figura 5.3: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de PRE2-tmp en CDCl<sub>3</sub>

Como se aprecia en la tabla 5.13, todas las señales del ligando tmp modifican su desplazamiento químico, integración y número de señales al coordinarse con el centro de Ru(II).

Tabla 5.13: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm y asignación de las señales de los protones de PRE2-tmp

H	$\delta_H$ (multiplicidad) (integración)	
	tmp	PRE2-tmp
2	8,89 (s) (2)	9,80 (s) (1)
5	8,00 (s) (2)	8,13 (d) (1)
6	8,00 (s) (2)	8,09 (d) (1)
9	8,89 (s) (2)	9,75 (s) (1)
-CH <sub>3</sub> tmp	2,65 (s) (6), y 2,50 (s) (6)	2,80 (s) (3); 2,75 (s) (3); 2,63 (s) (3); 2,59 (s) (3)
-CH <sub>3</sub> DMSO	-	3,61 (s) (3); 3,60 (s) (3); 3,16 (s) (3), y 2,39 (s) (3)
Multiplicidad: s: singulete, d: doblete.		

En este precursor los ligandos cloruro poseen la misma disposición *cis* que en PRE1. Si la coordinación del ligando tmp fuese tal que las moléculas de DMSO quedaran *trans* entre sí, el compuesto sería simétrico y se obtendría un número menor de señales <sup>1</sup>H-RMN. De esta forma se confirma que la disposición de los ligandos cloruro y DMSO es *cis,cis*.

5.3.1.3 PRE3-NN o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NN)(dppf)]

- PRE3-phen o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)(dppf)]

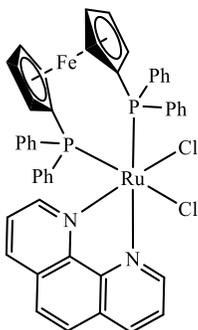


Tabla 5.14: Análisis elemental de PRE3-phen

	%C	%N	%H	%S
Teórico	60,94	3,09	4,00	0,00
Experimental	61,08	3,12	3,96	0,00

Tabla 5.15: Principales bandas vibracionales IR de PRE3-phen

	$\nu$ (C=N) y (C=C)	$\delta_{oop}$ (C-H)
Reportado [204]	1585, 1482, 1432	810, 745, 696
Experimental	1580, 1472, 1429	809, 743, 697
$\delta_{oop}$ : deformación fuera del plano		

Tabla 5.16: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE3-phen

$\delta$ (ppm)			
Reportado [204]	PRE3-phen (CDCl <sub>3</sub> )	8,28	8,25
		8,22	8,17
		8,18	7,98
9,60	9,64	7,95	7,77
8,50	8,54	7,82	7,64

7,70	7,53	5,07	5,06
7,40	7,35	4,51	4,46
7,19	7,11	4,42	4,38
7,08	7,06	4,37	4,31
6,91	6,92	4,27	4,22
6,83	6,71	4,15	4,04
6,78	6,64	3,38	3,24
	6,54	<sup>31</sup> P-RMN (no reportado): 45,05(d, $J = 30,45$ Hz); 36,78 (d, $J = 30,50$ Hz).	
6,12	6,37		

De los valores de desplazamiento químico de la tabla 5.16 se tienen algunas diferencias en el desplazamiento o en el número de señales respecto a lo reportado en bibliografía. Es importante mencionar que en la bibliografía no se especifica el solvente deuterado utilizado. La selección del solvente en el que se realizan las medidas puede afectar el desplazamiento e incluso el desdoblamiento de las señales, lo que podría explicar las diferencias de desplazamiento observadas. Independientemente de esto, realizando un análisis exhaustivo de la multiplicidad y de las constantes de acoplamiento entre las señales, se logró identificar inequívocamente la identidad del compuesto, que coincidió con lo esperado.

- PRE3-bipy o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bipy)(dppf)]

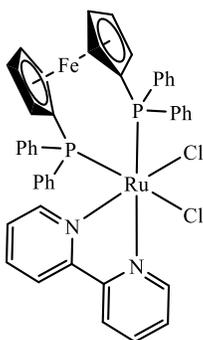


Tabla 5.17: Análisis elemental de PRE3-bipy

	%C	%N	%H	%S
Teórico PRE3-bipy	59,88	3,17	4,11	0,00
Teórico PRE3-bipy·MeOH	59,10	3,06	4,41	0,00
Experimental	59,08	3,14	4,53	0,00

Los resultados obtenidos no se ajustan adecuadamente a la fórmula PRE3-bipy. Sin embargo, considerando la presencia de una molécula de MeOH en la estructura, proveniente del solvente donde se realizó la síntesis, los resultados experimentales tienen un ajuste aceptable al valor teórico.

Tabla 5.18: Principales bandas vibracionales IR de PRE3-bipy

	$\nu$ (C=N) y (C=C)	$\delta_{oop}$ (C-H)
Reportado [204]	1603, 1482, 1432	816, 747, 696
Experimental	1604, 1481, 1433	817, 751, 697
$\delta_{oop}$ : deformación fuera del plano		

Tabla 5.19: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de PRE3-bipy

δ (ppm)	
Reportado [204]	PRE3-bipy (CDCl <sub>3</sub> )
9,32	9,41
8,38	8,52
8,12	8,24
7,83	8,13
7,74	7,79
7,68	7,72
7,64	7,52
7,61	7,33
7,48	7,20
7,38	7,05

7,11	6,97
6,99	6,89
6,92	6,40
6,43	6,23
5,98	5,00
4,97	4,47
4,47	4,31
4,34	4,23
4,24	4,08
4,15	3,30
3,41	3,49 (MeOH)
<sup>31</sup> P-RMN (no reportado): 43,45 (d, <i>J</i> = 30,25 Hz); 35,76 (d, <i>J</i> = 30,69 Hz).	

Si bien en el espectro <sup>1</sup>H-RMN se observa alguna diferencia en el desplazamiento o desdoblamiento de algunas señales, al igual que en el caso de PRE3-phen, se logró identificar inequívocamente la identidad del compuesto, concordando con lo esperado.

- PRE3-tmp o *cis,cis*-[RuCl<sub>2</sub>(tmp)(dppf)]

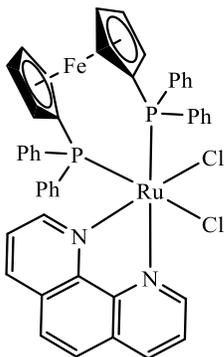


Tabla 5.20: Análisis elemental de PRE3-tmp

	%C	%N	%H	%S
Teórico PRE3-tmp	62,38	2,91	4,61	0,00
Experimental	62,52	2,91	4,59	0,00

Los resultados de análisis elemental concuerdan con los valores teóricos calculados para la fórmula propuesta. Por otro lado, se asignó tentativamente las principales bandas vibracionales IR teniendo en cuenta las del ligando tmp libre y la asignación de las principales bandas de sus compuestos análogos PRE3-phen y PRE3-bipy.

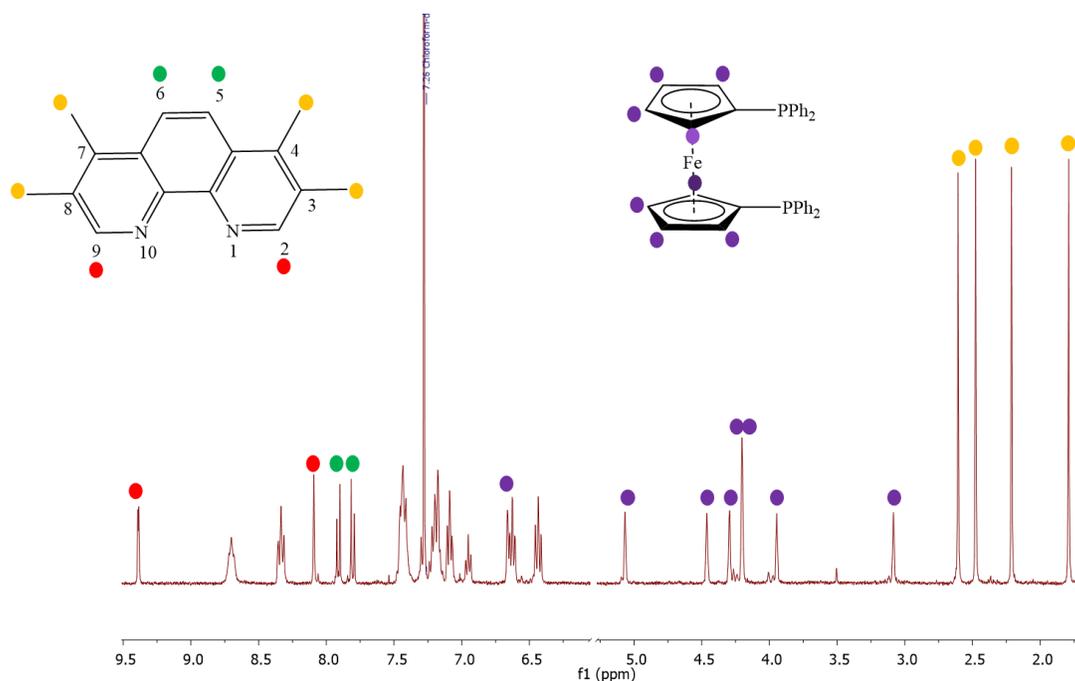
Tabla 5.21: Asignación de principales bandas vibracionales IR de PRE3-tmp

	$\nu$ (C=C) y (C=N)	$\nu$ (C-P)	$\nu$ (S=O) DMSO	$\delta_{oop}$ (C- H)	$\nu$ (Cp-Fe)
dppf	1474, 1429	1093	-	697	490
PRE2-tmp	1431	1093 (asociada a $\nu$ (S=O))	1090, 1015	-	-
PRE3-tmp	1482, 1433	1090	-	697	495

$\delta_{oop}$ : deformación fuera del plano

En el espectro FTIR del PRE3-tmp se evidencia la desaparición de la banda a  $1015\text{ cm}^{-1}$  asociada al estiramiento  $\nu$ (S=O), lo cual está de acuerdo con la sustitución de las moléculas de DMSO del PRE2-tmp por dppf. A su vez, se observa aparición de bandas correspondientes a deformaciones fuera del plano de enlaces C-H de anillos aromáticos y de vibraciones de enlace Cp-Fe.

En la figura 5.4 se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del nuevo precursor PRE3-tmp, donde se muestran las señales asociadas al ligando tmp y las señales de los protones de los anillos Cp del ligando dppf. El resto de las señales corresponde a los protones de los anillos fosfina del mismo ligando (PPh<sub>2</sub>).


 Figura 5.4: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de PRE3-tmp en  $\text{CDCl}_3$ 

De la tabla 5.22 se observa que los desplazamientos químicos de todas las señales del dppf se modifican al coordinarse al centro metálico. Además, se observa un mayor número de señales respecto al espectro del dppf libre debido a la pérdida de equivalencia de los protones al coordinarse al centro de Ru(II).

Tabla 5.22: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm y asignación de las señales de los protones de PRE3-tmp

H	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidad) (integración)		
	tmp	dppf	PRE3-tmp
2	8,89 (s) (2)	-	9,37 (d) (1)
5	8,00 (s) (2)	-	7,88 (d) (1)

6	8,00 (s) (2)	-	7,77 (d) (1)
9	8,89 (s) (2)	-	8,07 (s) (1)
-CH <sub>3</sub> tmp	2,65 (s) (6), y 2,50 (s) (6)		2,56 (s) (3), 2,45 (s) (3), 2,19 (s) (3), 1,77 (s) (3)
Cp anillo a	-	4,25 (m) (4)	6,64 (s) (1), 4,44 (s) (1), 3,93 (s) (1), 3,06 (s) (1)
Cp anillo b	-	3,99 (m) (4)	5,05 (s) (1), 4,27 (s) (1), 4,18 (s) (2)
PPh <sub>2</sub>	-	7,29 (m) (20)	8,68 (t) (2), 8,32 (m) (2), 7,41 (m) (5), 7,17 (m) (4), 7,07 (t) (2), 6,93 (t) (1), 6,61 (td) (2), 6,41 (t) (2)
Multiplicidad: s: singulete, d: doblete, t: triplete, td: triplete de doblete, m: multiplete.			

En cuanto al espectro de <sup>31</sup>P-RMN, el dppf libre presenta una sola señal de multiplicidad singulete a -17,26 ppm. Al coordinarse al centro metálico de Ru(II), se obtienen dos señales de desplazamientos mucho mayores y de multiplicidad doblete: 48,35 (d,  $J = 31,68$  Hz); 37,67 (d,  $J = 31,74$  Hz). El desdoblamiento de las señales indicaría que los dos átomos de P no son magnéticamente equivalentes, lo cual confirma que la disposición entre los dos ligandos cloruro es *cis*; si la disposición fuera *trans*, el compuesto sería simétrico y los átomos de P equivalentes. El desplazamiento hacia campo bajo es un comportamiento observado anteriormente al coordinarse el dppf a un centro metálico [216]. Tanto el desplazamiento de las señales como su multiplicidad y constantes de acoplamiento son similares a las de los precursores análogos (tablas 5.16 y 5.19).

### 5.3.2 Caracterización de los compuestos finales

Para la caracterización de los compuestos finales se hizo uso de las mismas técnicas que para los precursores: análisis elemental de elementos livianos, FTIR y <sup>1</sup>H-RMN. A continuación, se discutirá con mayor profundidad los resultados obtenidos con cada técnica para los cuatro nuevos compuestos, haciendo énfasis en el análisis comparativo entre los mismos.

En primer lugar, los resultados de análisis elemental de elementos livianos confirmaron la fórmula propuesta para cada complejo, asegurando la ausencia de S en las muestras que pudiera provenir de los precursores PRE1 o PRE2-NN (tabla 5.23)

Tabla 5.23: Resultados del análisis elemental de C, N y H de los complejos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5 y X = PF<sub>6</sub><sup>-</sup> o Cl<sup>-</sup>.

<b>Compuesto</b>	<b>%C<sub>exp</sub></b> <b>(%C<sub>teórico</sub>)</b>	<b>%H<sub>exp</sub></b> <b>(%H<sub>teórico</sub>)</b>	<b>%N<sub>exp</sub></b> <b>(%N<sub>teórico</sub>)</b>
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	52,57 (52,84)	3,64 (3,61)	3,12 (3,13)
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )·2H <sub>2</sub> O	48,58 (48,25)	3,50 (3,57)	2,92 (2,86)
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	46,78 (47,07)	2,81 (2,98)	3,28 (3,11)
Ru-bipy-L5(Cl) <sup>-</sup> ·4H <sub>2</sub> O	48,45 (48,41)	3,74 (3,68)	3,18 (3,20)
Los valores de %S fueron 0,00 en todos los casos			

### 5.3.2.1 Caracterización en estado sólido

#### 5.3.2.1.1 Espectroscopía infrarroja

Al igual que en el caso de los precursores nuevos PRE2-tmp y PRE3-tmp, la espectroscopía infrarroja se utilizó para identificar algunas de las bandas de vibración características de los ligandos y para asignar tentativamente dichas bandas en los espectros de los complejos obtenidos. Es importante mencionar que todos los sólidos obtenidos de las síntesis fueron recristalizados (excepto para el compuesto con Cl<sup>-</sup> de contraión), y que en el caso de los compuestos Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) se obtuvo cristales de dos tipos: de color naranja y de color rojo oscuro.

En la figura 5.5 se muestra de forma comparativa el espectro IR de ambos tipos de cristales obtenidos en la síntesis del compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>). Dado que no se logró identificar grandes diferencias entre ambos espectros y que, además, solo se obtuvo estructura de rayos X para los cristales de color naranja, solo se tomaron en cuenta los espectros de IR de éstos últimos para la asignación y discusión de resultados, tanto para Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) como para Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

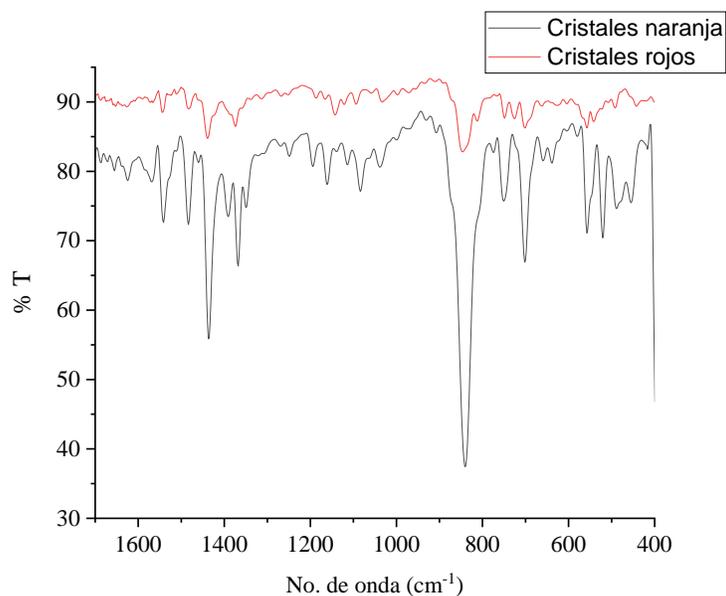


Figura 5.5: Espectros de IR de los cristales naranjas y rojos obtenidos en la síntesis del compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>), en el rango entre 1700-400 cm<sup>-1</sup>.

En la figura 5.6 se muestran los espectros de IR obtenidos para todos los compuestos Ru-NN-L(X) de forma comparativa, donde se evidencia un perfil espectral similar.

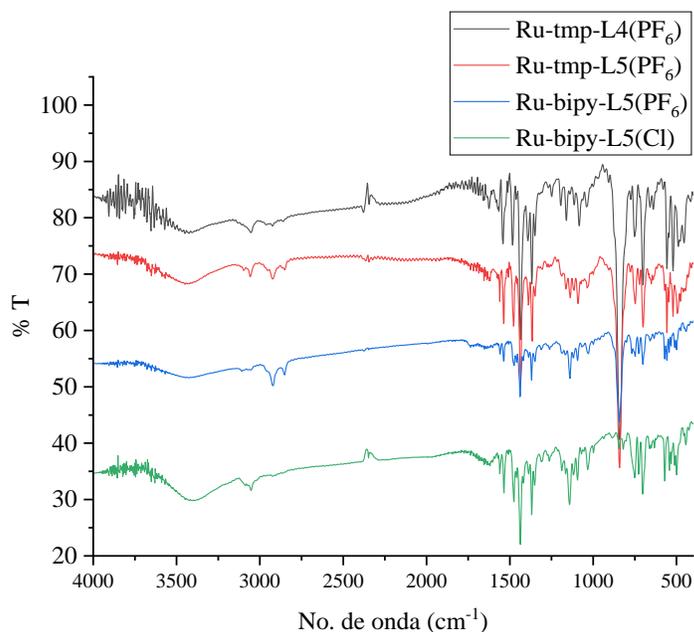


Figura 5.6: Espectros de infrarrojo de los complejos Ru-NN-L (X) desarrollados en el rango entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

Al ampliar la zona entre 1500 – 500  $\text{cm}^{-1}$  (figura 5.7) es notoria la presencia de las bandas características del anión  $\text{PF}_6^-$ , alrededor de los 840  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}(\text{P-F})$ ) y 560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta(\text{F-P-F})$ ) [148] en los espectros de los compuestos con este contraión, y la ausencia de dichas bandas en el espectro del compuesto Ru-tmp-L5(Cl), de acuerdo a lo esperado. A su vez, se observa un pequeño corrimiento del perfil espectral hacia números de onda de menor energía en los compuestos con diferente HL: Ru-tmp-L4 (en negro) y Ru-tmp-L5 (en rojo). Este comportamiento también se observó en los compuestos de Pd(II) y Pt(II) descritos en el capítulo anterior con los mismos ligandos derivados de 8HQ.

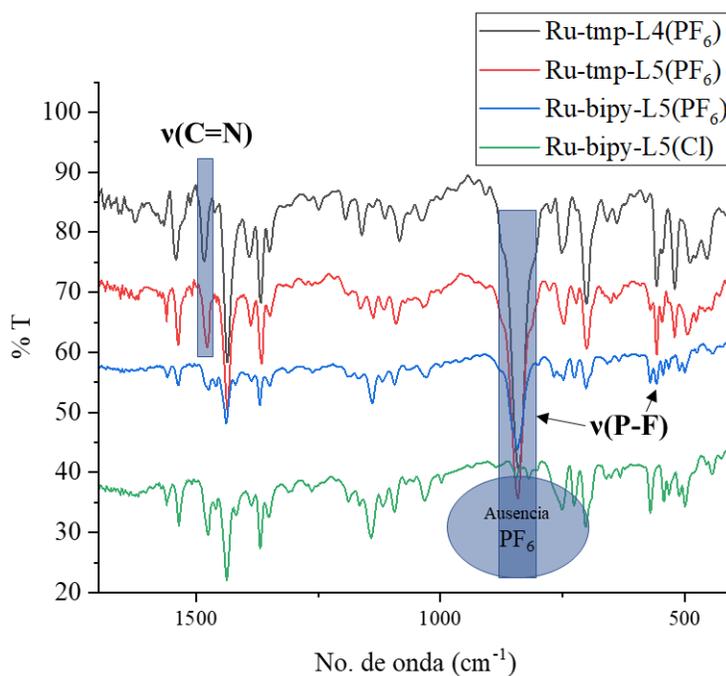


Figura 5.7: Espectros de infrarrojo de los complejos Ru-NN-L(X) en el rango entre 1700 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Se muestra la ausencia de las bandas características del  $\text{PF}_6^-$  en el espectro de Ru-tmp-L5(Cl) (en verde) y el desplazamiento de la banda vibracional  $\nu(\text{C}=\text{N})$  para los compuestos con  $\text{L} = \text{L4}$  y  $\text{L5}$ .

En todos los espectros se observaron bandas de absorción características  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$  y  $\nu(\text{C}-\text{O})$  (figura 5.8). En el caso de los compuestos en estudio, la diferencia fundamental con su respectivo precursor PRE3-NN es el “agregado” de un ligando derivado de la 8HQ, que son dos anillos aromáticos fusionados. Desde el punto de vista de la espectroscopía IR, esta estructura no difiere fundamentalmente de la de los anillos de los ligandos NN, debido a que posee los mismos tipos de enlace. Por tal razón, no es posible asociar una banda o grupo de bandas a un ligando u a

otro. De esta forma, se tuvo en cuenta el comportamiento vibratorio observado en los complejos de Pd(II) y Pt(II) del capítulo anterior y asignaciones previas para los ligandos HL en compuestos de Ru(II) y de otros metales, para la asignación tentativa de las principales bandas en los complejos finales [182,184,185,191].

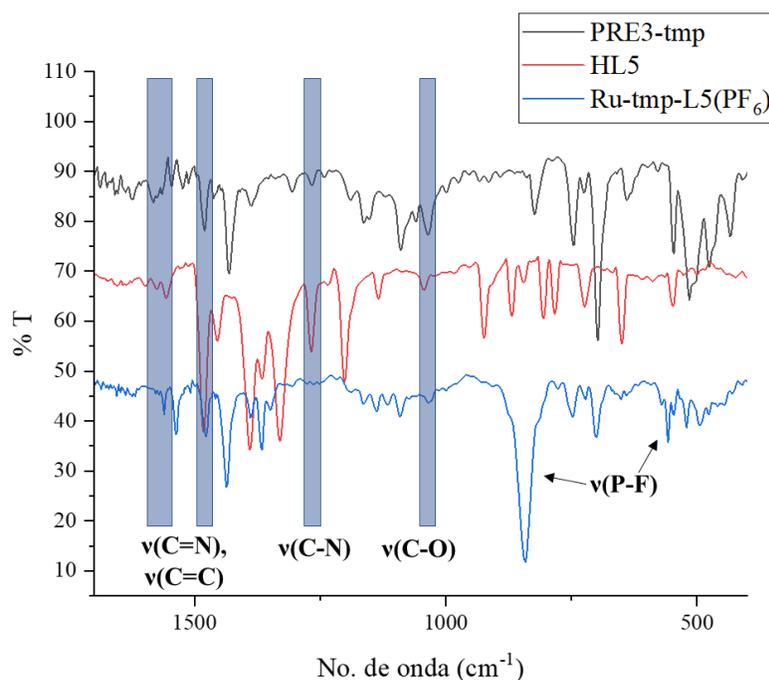


Figura 5.8: Espectro infrarrojo del precursor PRE3-tmp (línea negra), del ligando libre HL5 (línea roja) y del complejo Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) (línea azul) en el rango entre 1700-400 cm<sup>-1</sup>.

En los espectros de los ligandos HL libres, en la región entre 3200-2800 cm<sup>-1</sup>, se encuentra la banda asociada al estiramiento del enlace O-H. Esta banda no es observada en los espectros de los complejos, indicando que este grupo está desprotonado y por lo tanto, disponible para participar en el enlace con el centro metálico [180,182]. En general, se observó el desplazamiento y/o cambio en la intensidad de las principales bandas vibracionales (figura 5.8 y tabla 5.24), dando cuenta de la coordinación de los derivados de 8HQ al centro de Ru(II).

Tabla 5.24: Principales bandas vibracionales IR de HL= HL4 o HL5 y los complejos Ru-NN-L(X) correspondientes ( $\text{cm}^{-1}$ ).

	HL4	Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	HL5	Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	Ru-bipy-L5(Cl)
<b>v(O-H)</b>	3172 (m)	-	3428 (m)	-	-	-
<b>v(C=N), v(C=C)</b>	1577(m), 1490 (s)	1561(m), 1484 (m)	1556 (w), 1483 (s)	1561 (m), 1478 (m)	1559 (w), 1474 (m)	1560 (w), 1476 (m)
<b>v(C-N)</b>	1273 (m)	1268 (m)	1269 (m)	1263 (vw)	1262 (w)	1262 (w)
<b>v (C-O)</b>	1043 (w)	1038 (w)	1043 (w)	1036 (w)	1033 (w)	1033 (w)

Intensidad de banda: (vs) muy fuerte, (s) fuerte, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (sh) hombro

### 5.3.2.1.2 Difracción de rayos X en monocristal (DRX)

Se obtuvieron cristales de dos de los cuatro nuevos compuestos sintetizados, mediante recrystalización por difusión lenta líquido-líquido ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$ ). A través de esta técnica se obtuvo dos tipos de cristales: cristales de color naranja y cristales de color rojo, tanto para Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>), ambos compuestos con NN = tmp. Solo los cristales color anaranjado resultaron adecuados para su estudio por difracción de rayos X de monocristal. En la figura 5.9 se muestra la estructura cristalina resuelta de los complejos.

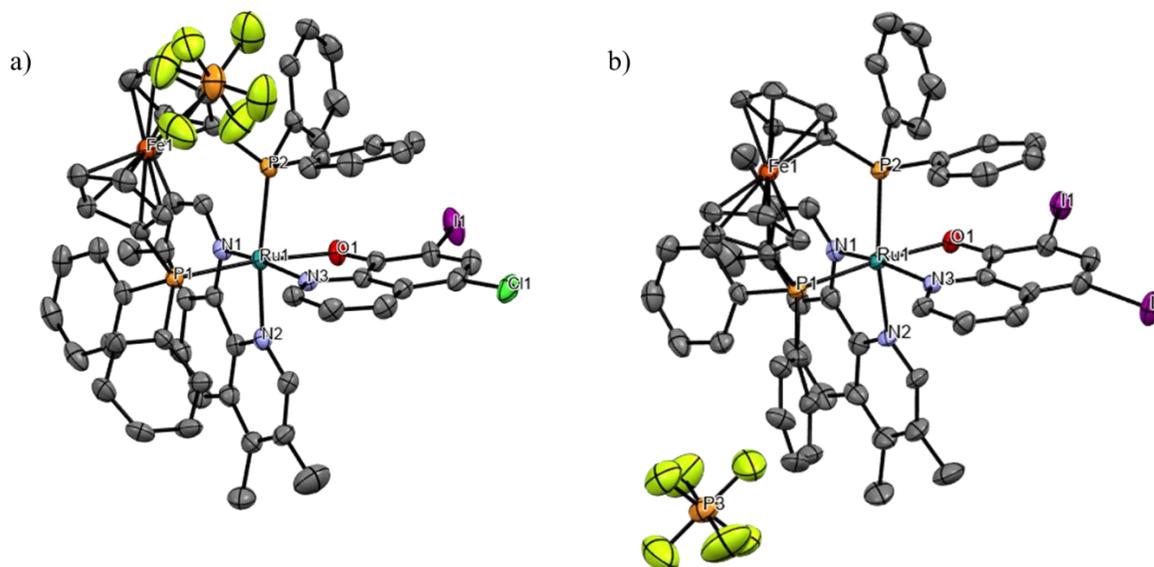


Figura 5.9: Estructura cristalina de los complejos (a) Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y (b) Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>). Se muestran elipsoides de desplazamiento atómico con un nivel de probabilidad del 50%. Los átomos de hidrógeno y moléculas de disolvente han sido removidos para mayor claridad.

En la tabla 5.25 se resumen los datos cristalográficos relevantes para la resolución de las estructuras, los parámetros de celda, y los procedimientos de la recolección de datos y resultados de refinación de ambos complejos.

Tabla 5.25: Datos cristalográficos y de refinamiento de los compuestos Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

	Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )·0,267 H <sub>2</sub> O	Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )·0,25 H <sub>2</sub> O
	C <sub>59</sub> H <sub>48</sub> ClF <sub>6</sub> FeIN <sub>3</sub> OP <sub>3</sub> Ru·0,267 H <sub>2</sub> O	C <sub>59</sub> H <sub>48</sub> F <sub>6</sub> FeI <sub>2</sub> N <sub>3</sub> OP <sub>3</sub> Ru·0,25 H <sub>2</sub> O
Peso fórmula	1346,00	1437,13
Temperatura (K)	160(1)	160(1)
Longitud de onda (Å)	MoK $\alpha$ ( $\lambda = 0,71073$ )	CuK $\alpha$ ( $\lambda = 1,54178$ )
Sistema cristalino	Ortorrónico	Monoclínico
Grupo espacial	Pbca	P2 <sub>1</sub> /n
Dimensiones de celda unida		
a (Å)	24,0230(3)	15,8228(2)
b (Å)	16,4962(2)	16,6361(2)
c (Å)	27,1979(3)	21,3327(3)
$\beta$ (°)	90 (1)	98,7370(10)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	10778,2(2)	5550,24(13)
Z; densidad (calculada, g cm <sup>-3</sup> )	8; 1,659	4; 1,720
Coefficiente de absorción (mm <sup>-1</sup> )	1,32 8	14,397
F (000)	5381,0	2834,0
Forma/color del cristal	Prisma rectangular / naranja	Prisma rectangular /naranja
Tamaño (mm <sup>3</sup> )	0,33 × 0,28 × 0,22	0,09 × 0,06 × 0,03
Rango de 2 $\theta$ (°) para recolección de datos	4,194 a 61,016	6,506 to 136,502
Rangos de indexado	-31 ≤ h ≤ 34, -23 ≤ k ≤ 23, -28 ≤ l ≤ 26	-17 ≤ h ≤ 19, -20 ≤ k ≤ 14, -25 ≤ l ≤ 25
Reflexiones colectadas	8953 2	54174
Reflexiones independientes	16454	10167
Datos / restricciones / parámetros	16454/0/702	10167/0/698

Calidad del ajuste de $F^2$	1,107	1,095
Índices R finales <sup>a</sup> [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0514$ ; $wR_2 = 0,1075$	$R_1 = 0,0392$ ; $wR_2 = 0,0896$
Índices R (todos los datos)	$R_1 = 0,0750$ ; $wR_2 = 0,1190$	$R_1 = 0,0632$ ; $wR_2 = 0,1066$
Mayor diferencia de pico (e.Å <sup>-3</sup> )	1,22/-1,97	1,01/-1,35
<sup>a</sup> $R_1 = \sum   F_o  -  F_c   / \sum  F_o $ , $wR_2 = [\sum w( F_o ^2 -  F_c ^2)^2 / \sum w( F_o ^2)^2]^{1/2}$		

El estudio de difracción de rayos X de monocristal mostró que, al igual que para las estructuras de Pd(II) y Pt(II) estudiadas en los capítulos anteriores, las obtenidas para los compuestos de Ru(II) son isoestructurales entre sí, es decir, a pesar de tener dimensiones de celda y composición distinta, poseen la misma estructura cristalina [153]. En ambos casos el centro de Ru(II) exhibe una geometría octaédrica ligeramente distorsionada, donde los ligandos NN y quinolinato coordinan de forma bidentada, al igual que el coligando dppf. Todos se encuentran en disposición *cis*, de acuerdo a lo esperado. Además, se observa que el complejo catiónico es neutralizado por el contraión  $PF_6^-$  en ambos casos. Al extender la estructura, se puede observar interacciones intermoleculares que favorecen la estabilización del empaquetamiento, como enlaces de hidrógeno entre átomos de F del anión  $PF_6^-$  y átomos de H del grupo metilo del ligando tmp o de los anillos fosfínicos (figura 5.10). También se observan interacciones de corto alcance de naturaleza similar entre el átomo de cloro del ligando L4 de una unidad Ru-tmp-L4, y un átomo de C de una unidad vecina, particularmente el átomo de C adyacente al enlace C-Cl de dicha unidad. En el caso de la estructura del compuesto Ru-tmp-L5( $PF_6$ ), esta última interacción no se observa. Esto es probablemente debido a que el átomo de yodo es menos electronegativo que el de cloro, por lo que el átomo de carbono adyacente no se ve tan deficiente de densidad electrónica y no tiende a interactuar en este tipo de enlaces (tipo dipolo-dipolo). Lo que sí se observan son interacciones entre un átomo de yodo y un átomo de F del anión  $PF_6^-$ . En el caso de ambas estructuras, las moléculas de agua de cristalización participan en enlaces de hidrógeno con átomos de F del anión  $PF_6^-$ .

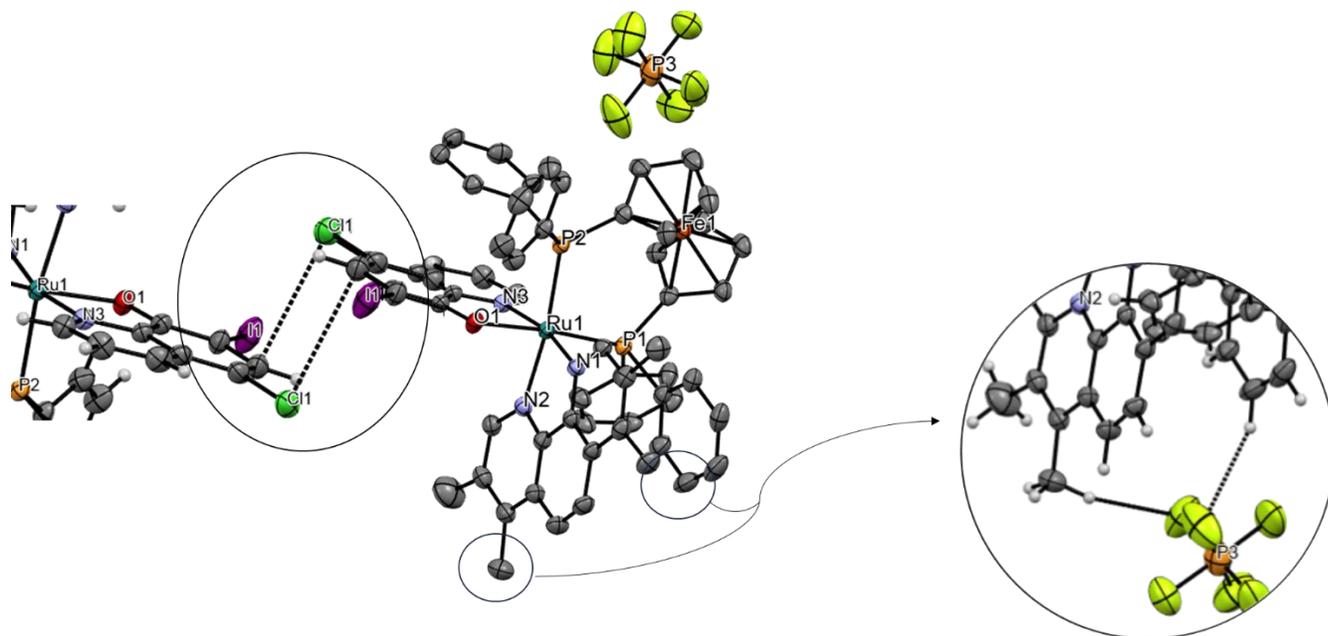


Figura 5.10: Interacciones intermoleculares en la estructura cristalina del compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>).

Los ángulos de mordida N–Ru–N y N–Ru–O están en el rango 77,77(11) – 79,27(14)°, mientras que los ángulos P–Ru–P son más grandes: 99,86(3) y 100,15(4)° debido a que los anillos fosfínicos son bastante voluminosos y a que el ligando dppf es estructuralmente flexible. La sustitución de un átomo de cloro por uno de yodo en el ligando HL no cambia significativamente la estructura molecular de los compuestos. Las distancias Ru–P también se encuentran dentro de los rangos observados en otros complejos con el ligando bidentado dppf [204,205,217] (tabla 5.26).

Tabla 5.26. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del centro metálico en los complejos Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

	<b>Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>)</b>	<b>Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>)</b>
<b>Distancias de enlace (Å)</b>		
Ru–O1	2,105 (3)	2,104 (2)
Ru–N1	2,084 (4)	2,104 (3)
Ru–N2	2,109 (4)	2,110 (3)
Ru–N3	2,086 (4)	2,084 (3)

Ru-P1	2,3472 (12)	2,3485 (9)
Ru-P2	2,3628 (12)	2,3666 (9)
<b>Ángulos de enlace (°)</b>		
N1-Ru-N2	78,85 (16)	77,77 (11)
N3-Ru-O1	79,27 (14)	79,25 (10)
P1-Ru-P2	100,15 (4)	99,86 (3)
<b>Ángulo de torsión (°)</b>		
P1-centroide $Cp_1$ -centroide $Cp_2$ -P2	22,43	24,36

En todas las estructuras el ligando dppf mostró la conformación antiprisma pentagonal alrededor del átomo de hierro, con los anillos  $Cp$  escalonados entre sí. Este comportamiento se observó también en los compuestos de Pd(II) y Pt(II) estudiados en los capítulos 4 y 5, pero en este caso se observan ángulos de torsión menores. Las distancias Fe-C están en el rango de 1,6315 – 1,648 Å, siendo similares a otros compuestos con la entidad {Ru-dppf} [205,218] y menores que en los compuestos de Pd(II) y Pt(II).

### 5.3.2.2 Caracterización en solución

#### 5.3.2.2.1 Conductimetría

La conductividad fue medida en soluciones de concentración 1 mM de complejo en DMSO. Se obtuvieron valores de conductividad molar entre 19,3 – 24,3  $\text{Scm}^2/\text{mol}$ , de nuevo ligeramente por debajo del rango reportado para electrolitos 1:1 en solución de DMSO (23 – 42  $\text{Scm}^2/\text{mol}$ ), probablemente debido a su gran tamaño en comparación con los electrolitos reportados [114,158]. La conductividad fue medida durante cinco días sin observarse cambios significativos en estos valores, dando cuenta de la estabilidad de los compuestos en DMSO en relación con la posible generación de especies con diferente carga por sustitución de los ligandos por DMSO.

#### 5.3.2.2.2 Resonancia magnética nuclear

Parte de la caracterización en solución de los cuatro nuevos complejos se realizó mediante resonancia magnética nuclear unidimensional ( $^1\text{H-RMN}$ ) y bidimensional (COSY) a temperatura ambiente y en solución de  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$ . En todos los espectros se observaron las señales

correspondientes a los protones de los ligandos derivados de 8HQ (L4 y L5), ligandos NN (bipy o tmp) y del coligando dppf. Las integraciones, multiplicidades y desplazamientos de las señales concuerdan con la estequiometría propuesta para los complejos.

En general, los perfiles de los espectros  $^1\text{H-NMR}$  de todos los compuestos son similares (figura 5.11). En los capítulos anteriores se han definido zonas específicas en los espectros: la zona *Cp* (3,5 – 5,5 ppm), donde se observan las señales de los protones de los anillos *Cp* del coligando dppf, y la zona aromática (6,0 – 9,5 ppm), que involucra señales de los protones de los ligandos derivados de 8HQ, NN y señales de los protones de los anillos fosfínicos del dppf ( $\text{PPh}_2$ ). En el caso de esta serie de compuestos, la zona *Cp* se amplía hasta cerca de los 7 ppm en algunos casos; la zona aromática se mantiene dentro del rango previamente establecido.

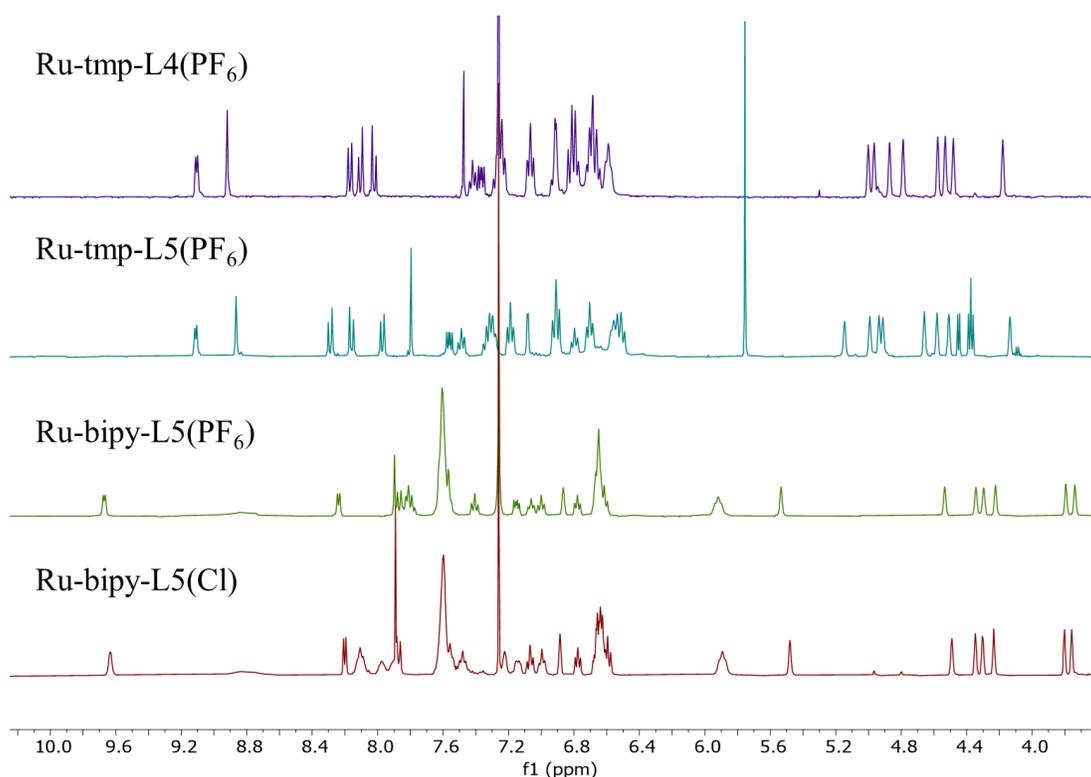


Figura 5.11: Espectros  $^1\text{H-RMN}$  de los cuatro nuevos compuestos: Ru-tmp-L4( $\text{PF}_6$ ), Ru-tmp-L5( $\text{PF}_6$ ), Ru-bipy-L5( $\text{PF}_6$ ) y Ru-bipy-L5(Cl).

Todos los compuestos sintetizados fueron recristalizados, a excepción del Ru-bipy-L5(Cl). De los compuestos Ru-tmp-L4( $\text{PF}_6$ ) y Ru-tmp-L5( $\text{PF}_6$ ) (ambos con NN = tmp) se obtuvieron dos tipos de cristales: naranjas y rojos. En la figura 5.12 se muestran los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  tanto de los

cristales naranja como de los cristales rojos obtenidos de la síntesis del compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

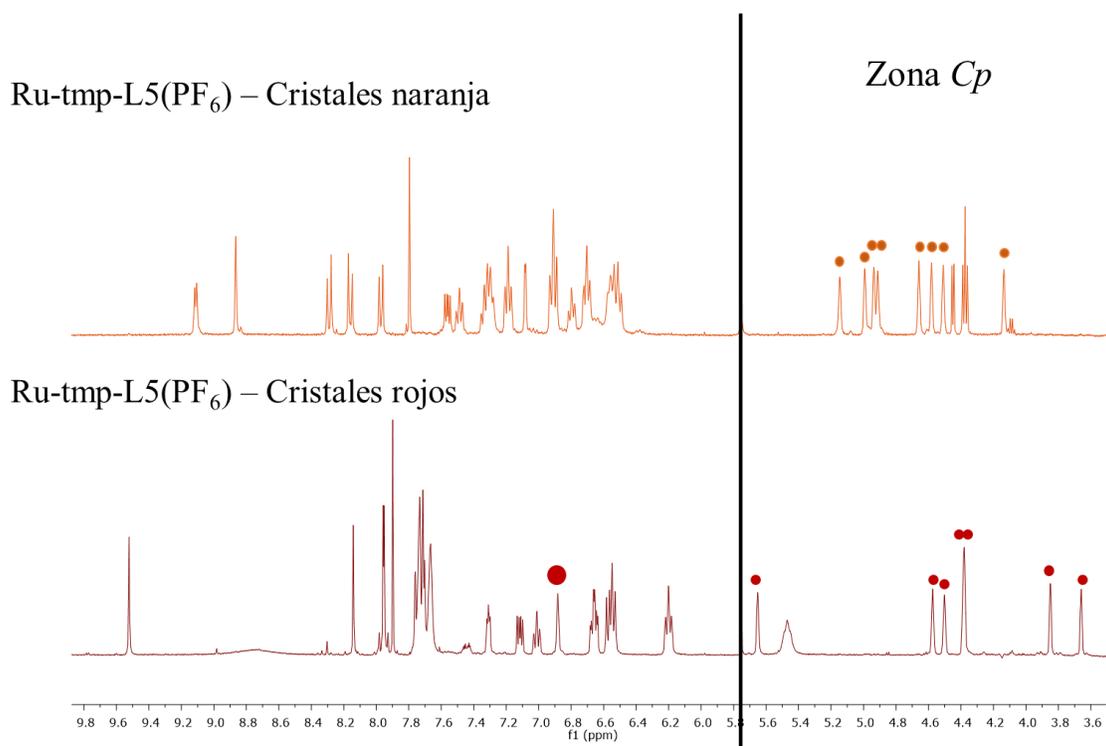


Figura 5.12: Espectros <sup>1</sup>H-RMN de los cristales obtenidos de la síntesis del compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) en DMSO-d<sub>6</sub>. Comparación de las señales de los protones en la zona Cp.

En primer lugar, se observa que los espectros son diferentes; esto indica que de una misma síntesis se obtienen por lo menos dos productos diferentes. En segundo lugar, se observa que el “compuesto rojo” tiene señales de protones Cp y protones aromáticos con desplazamientos y multiplicidades comparables a las señales del espectro del “compuesto naranja”, es decir, en las mismas zonas del espectro. Al considerar la integración total de las señales se tiene el mismo número de protones en ambos casos, lo que lleva a pensar que los compuestos son estereoisómeros entre sí, en donde podría variar la orientación del ligando L (figura 5.13). Sin embargo, la muy pequeña cantidad obtenida del “compuesto rojo” dificultó su completa caracterización, por lo que, de ahora en adelante al referirse a Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) o Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>), se referirá solo al correspondiente “compuesto naranja”.



Figura 5.13: Posibles estereoisómeros para Ru-NN-L.

En general, en los espectros de los compuestos no se observó la señal correspondiente al protón del grupo -OH de los ligandos libres HL, lo cual confirma la deprotonación del átomo de oxígeno para su coordinación al centro de Ru(II). Esto concuerda con los resultados anteriormente observados en los espectros de FTIR y en las estructuras cristalinas obtenidas por DRX.

Se pueden hacer varias comparaciones entre los espectros de los compuestos desarrollados. Al comparar los espectros de Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>), que solo difieren en el derivado de 8HQ seleccionado, se observa que el perfil es bastante similar (particularmente la zona *Cp*), a pesar de haber realizado la medida en distintos solventes (figura 5.14). Esto concuerda con lo esperado, teniendo en cuenta que las estructuras cristalinas de ambos compuestos son isoestructurales (figura 5.9) y que la mayor diferencia entre ellas serían los sustituyentes en el anillo del ligando HL.

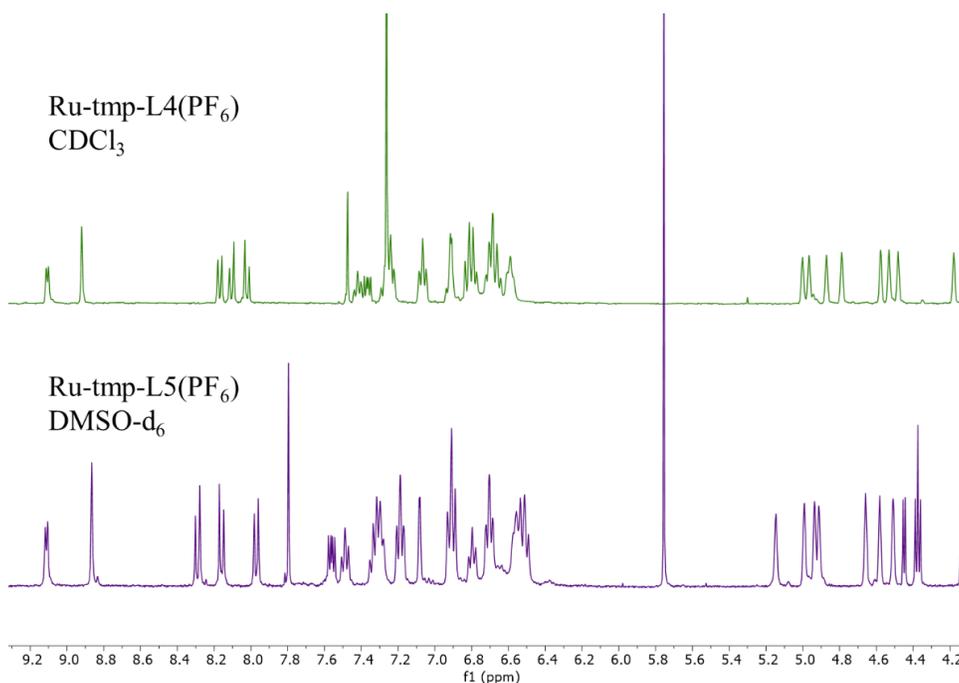


Figura 5.14: Espectros <sup>1</sup>H-RMN de los cristales obtenidos de la síntesis del compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

Por otro lado, al comparar los espectros de los compuestos que solo difieren en su contraión: Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) y Ru-bipy-L5(Cl) (figura 5.15), se observan que tanto la zona Cp como la zona aromática poseen básicamente el mismo perfil espectral. Sin embargo, el desplazamiento de algunas señales varía, particularmente las señales de los protones H4, H5 y H6 del ligando bipy, que se desapantallan al cambiar el contraión por Cl<sup>-</sup> (ver tabla 5.28).

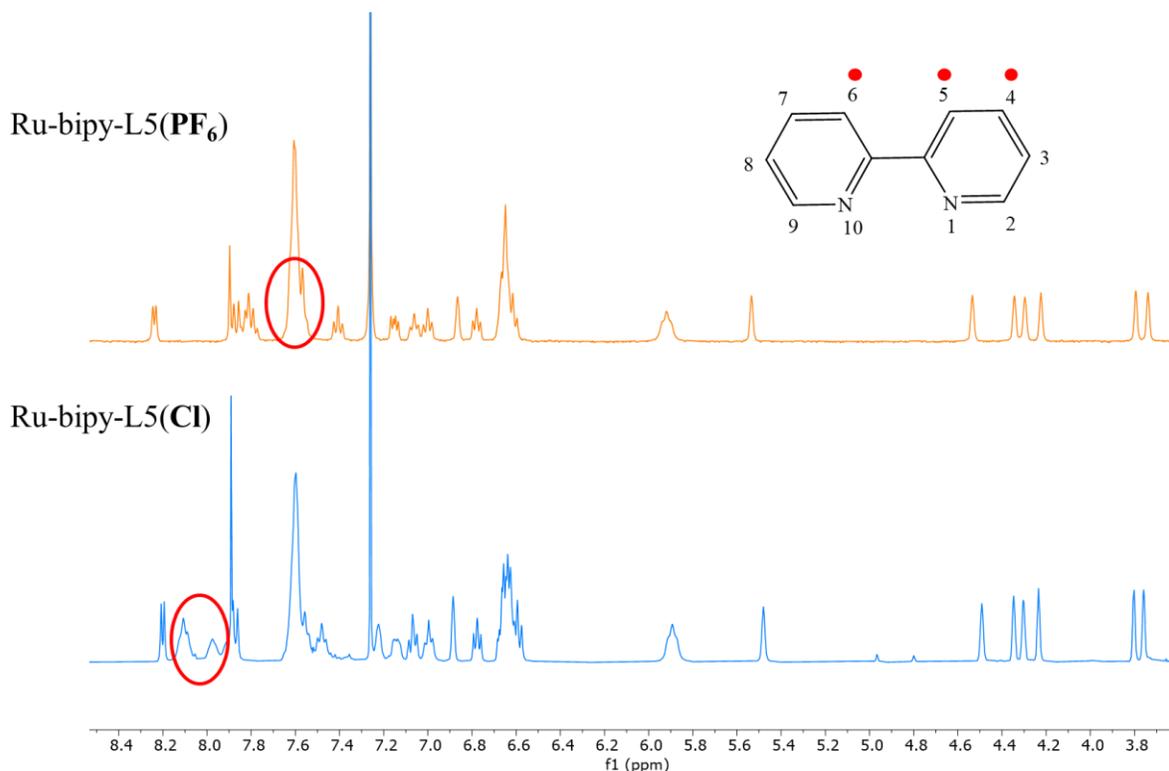


Figura 5.15: Espectros <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos con distinto contraión: Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) y Ru-bipy-L5(Cl) en CDCl<sub>3</sub>.

En las tablas 5.27 y 5.28 se resumen los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en ppm de las señales de los protones de los cuatro compuestos de Ru(II) y sus respectivos ligandos. La asignación de señales se realizó tomando en cuenta la integración, multiplicidad, desplazamiento, constantes de acoplamiento de las señales y espectros bidimensionales (COSY), al igual que en los capítulos anteriores. Las señales de los protones de todos los ligandos libres fueron asignadas y en algunos casos corroboradas teniendo en cuenta bibliografía [194].

Tabla 5.27: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Ru-tmp-L(PF<sub>6</sub>), con L = L4 o L5, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup>H-NMR en CDCl<sub>3</sub> (a excepción de los indicados).

H	$\delta_H$ (multiplicidad) (integración)							
	tmp	dppf	L4	Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	$\Delta\delta^a$	L5 (DMSO-d <sub>6</sub> )	Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> ) (DMSO-d <sub>6</sub> )	$\Delta\delta^a$
2	8,89 (s)(2)	-	-	8,92 (s)(1)	0,03	-	8,86 (s)(1)	-0,03
5	8,00 (s)(2)	-	-	8,10 (d)(1)	0,10	-	8,29 (d)(1)	0,29
6	8,00 (s)(2)	-	-	8,02 (d)(1)	0,02	-	8,16 (d)(1)	0,16
9	8,89 (s)(2)	-	-	7,47 (s)(1)	-1,42	-	7,80 (s)(1)	-1,09
CH <sub>3</sub> tmp	2,65 (s)(6), 2,50 (s)(6)			2,73 (s)(3); 2,67 (s)(3); 2,10 (s)(3); 2,03 (s)(3)			2,73 (s)(3); 2,67 (s)(3); 2,11 (s)(3); 2,02 (s)(3)	
12	-	-	8,82 (dd)(1)	9,11 (d)(1)	0,29	8,45 (d)(1)	9,11 (d)(1)	0,66
13	-	-	7,59 (dd)(1)	7,37 (dd)(1)	-0,22	7,31 (dd)(1)	7,56 (dd)(1)	0,25
14	-	-	8,50 (dd)(1)	8,17 (d)(1)	-0,33	7,61 (m)(1)	7,97 (d)(1)	0,36
16	-	-	7,87 (s)(1)	6,91 (m)(2) <sup>b</sup>	-0,96	8,34 (s)(1)	7,08 (d)(1)	-1,26
Anillos Cp	-	4,25 (s)(4), 3,99 (s)(4)	-	5,00 (m)(1); 4,97 (m)(1); 4,87 (m)(1); 4,79 (m)(1); 4,58 (m)(1); 4,53 (m)(1); 4,48 (m)(1); 4,18 (m)(1)	-	-	5,15 (m)(1); 4,99 (m)(1); 4,94 (m)(1); 4,91 (m)(1); 4,66 (m)(1); 4,58 (m)(1); 4,51 (m)(1); 4,14 (m)(1)	-
PPh <sub>2</sub>	-	7,28 (m)(20)	-	7,42 (t)(1); 7,25 (m)(2) <sup>d</sup> ; 7,07 (t)(2); 6,91 (m)(2) <sup>c</sup> ; 6,80 (m)(4);	-	-	7,49 (t)(1); 7,32 (m)(3); 7,19 (m)(2); 6,91 (m)(3); 6,80 (m)(1);	-

				6,68 (m)(5); 6,59 (m)(2)			6,70 (m)(3); 6,52 (m)(5)	
<sup>a</sup> : $\Delta\delta$ : $\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$ <sup>b</sup> : superpuesta con señales de los protones PPh <sub>2</sub> Multiplicidad: s: singulete, d:doblete, dd: doblete de dobletes, t: triplete, m: multiplete.								

Tabla 5.28: Valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de las señales de los protones de los complejos Ru-bipy-L5(X), con X = PF<sub>6</sub><sup>-</sup> o Cl<sup>-</sup>, obtenidos a partir de los espectros de <sup>1</sup>H-NMR en CDCl<sub>3</sub>.

H	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicidad) (integración)						
	bipy	dppf	L5	Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	$\Delta\delta^a$	Ru-bipy-L5(Cl)	$\Delta\delta^a$
2	8,67 (ddd)(2)	-	-	9,67 (dd)(1)	1,00	9,63 (s)(1)	1,04
3	7,30 (ddd)(2)	-	-	7,81 (m)(2)	0,51	7,87 (m)(1)	0,57
4	7,81 (dd)(2)	-	-	7,59 (m)(11) <sup>b</sup>	-0,22	7,98 (m)(1)	0,18
5	8,37 (dt)(2)	-	-	7,59 (m)(11) <sup>b</sup>	-0,78	8,10 (m)(2)	-0,27
6	8,37 (dt)(2)	-	-	7,59 (m)(11) <sup>b</sup>	-0,78	8,10 (m)(2)	-0,27
7	7,81 (dd)(2)	-	-	7,41 (td)(1)	-0,40	7,48 (td)(1)	-0,33
8	7,30 (ddd)(2)	-	-	6,78 (t)(1)	-0,52	6,78 (t)(1)	-0,52
9	8,67 (ddd)(2)	-	-	8,24 (d)(1)	-0,43	8,20 (d)(1)	-0,47
12	-	-	8,74 (dd)(1)	7,26 <sup>e</sup>	-1,48	7,22 (s)(1)	-1,52
13	-	-	7,56 (dd)(1)	7,16 (dd)(1)	-0,40	7,15 (m)(1)	0,41
14	-	-	8,31 (dd)(1)	7,87 (d)(1)	-0,44	7,87 (d)(1)	-0,44
16	-	-	8,32 (s)(1)	7,90 (s)(1)	-0,42	7,87 (s)(1)	-0,42

Anillos <i>Cp</i>	-	4,25 (s)(4), 3,99 (s)(4)	-	6,87 (m)(1); 5,53 (m)(1); 4,54 (m)(1); 4,34 (m)(1); 4,30 (m)(1); 4,23 (m)(1); 3,80 (m)(1); 3,74 (m)(1)		6,88 (m)(1); 5,48 (m)(1); 4,49 (m)(1); 4,35 (m)(1); 4,30 (m)(1); 4,23 (m)(1); 3,80 (m)(1); 3,76 (m)(1)	
PPh <sub>2</sub>	-	7,28 (m)(20)	-	7,59 (m)(11) <sup>b</sup> ; 7,06 (m)(1); 7,00 (t)(1); 6,64 (m)(7); 5,92 (t)(2)		7,60 (m)(10); 7,07 (m)(1); 7,00 (t)(1); 6,63 (m)(7); 5,89 (m)(2)	
<sup>a</sup> : $\Delta\delta$ : $\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{ligando}}$ <sup>b</sup> : superpuesta con señales de los protones PPh <sub>2</sub> Multiplicidad: s: singulete, d:doblete, dd: doblete de dobletes, t: triplete, m: multiplete,							

En términos generales se observó en todas las señales un corrimiento en los valores de desplazamiento químico luego de la coordinación al centro de Ru(II). En el caso de los compuestos Ru-tmp-L(PF<sub>6</sub>), se observó un comportamiento bastante diferente para los protones adyacentes al sitio de coordinación para el ligando tmp: el protón H2 se ve poco afectado luego de la coordinación y el protón H9 mostró un  $\Delta\delta$  (diferencia de desplazamiento de una señal X en el complejo y el desplazamiento de la señal X en el ligando libre) de más de una unidad. Esto confirma que a pesar de la simetría del ligando NN, su disposición en el espacio hace que porciones del mismo tengan entornos químicos muy diferentes. Para el caso de los ligandos HL se observa en general un cambio en el desplazamiento de la señal del protón H16, situado en la posición entre los sustituyentes del anillo quinolínico (figura 5.16).

En el caso de los compuestos Ru-bipy-L5(X), con X = PF<sub>6</sub><sup>-</sup> o Cl<sup>-</sup>, se observó una gran influencia en el desplazamiento de las señales de los protones H2 del ligando bipy, protón adyacente al sitio de coordinación. Este comportamiento se ha observado anteriormente en otros compuestos. Respecto al ligando libre, las señales de los protones H4, H5, H6 y H7 se apantallan luego de la coordinación, particularmente los protones H5 y H6. Como se mencionó anteriormente, las señales de estos protones varían considerablemente su desplazamiento entre el complejo con contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y el complejo con Cl<sup>-</sup>. Respecto a las señales del ligando HL5, se observó un gran  $\Delta\delta$  para el protón H12, adyacente al sitio de coordinación.

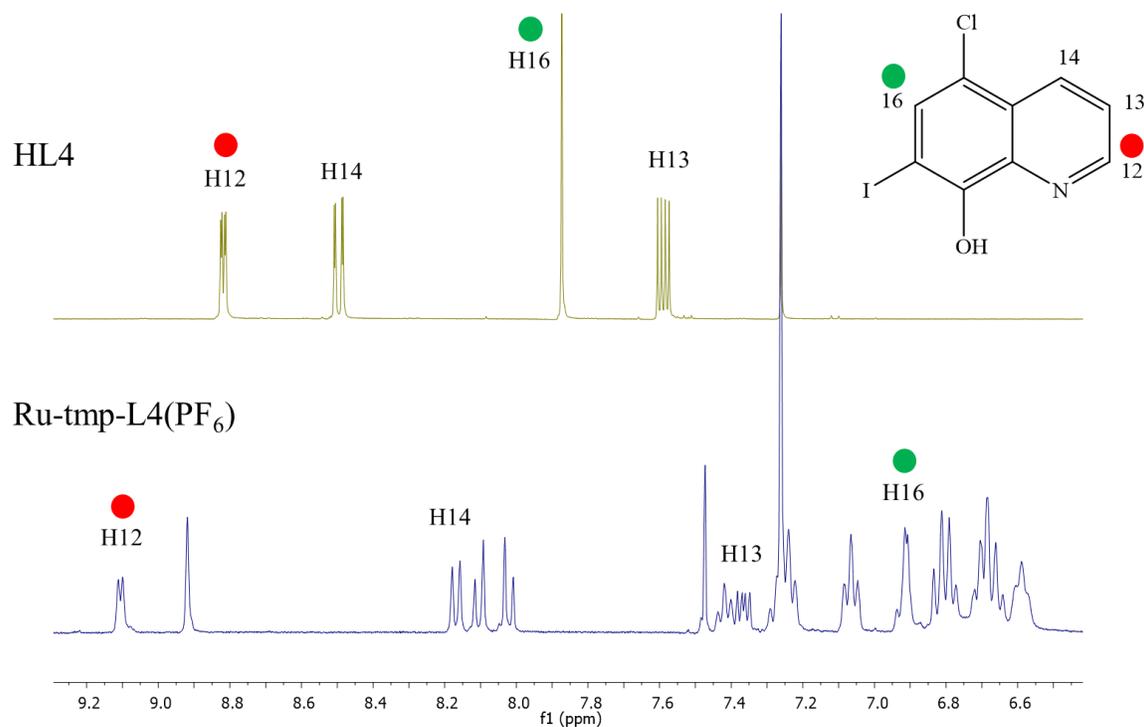


Figura 5.16: Espectros  $^1\text{H}$ -RMN del ligando HL4 y del compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>).

El comportamiento de las señales de los protones de los anillos *Cp* del dppf respecto a su precursor PRE3-NN se mantiene; se observa un total de ocho señales que corresponde a cada uno de los protones de los anillos *Cp*, en contraposición del comportamiento observado para el dppf libre (dos señales que integran para cuatro protones cada una) [216]. Este aumento en el número de señales al coordinarse al centro de Ru(II) se debe a una pérdida de movilidad de los anillos *Cp* en torno al eje centroide anillo *Cp*-Fe- centroide anillo *Cp* [160]. Este comportamiento ha sido anteriormente observado en numerosos compuestos con este coligando. Como se explicó en el capítulo 4, la movilidad de los anillos *Cp* de ferroceno puede verse afectada por factores energéticos y/o factores estéricos. En el caso de los compuestos de Pd(II) y Pt(II) estudiados en los capítulos anteriores, se postula que los factores energéticos son determinantes, ya que en comparación con los nuevos compuestos de Ru(II), el dppf tendría mayor movilidad en un complejo plano cuadrado que en un complejo octaédrico (ambos complejos con ligandos bidentados). En este caso se postula que la limitación de la movilidad está mayormente dada por factores estéricos, asociada a la geometría del compuesto, al tamaño de los ligandos y a la disposición espacial de los mismos (bidentado, todos en *cis*).

## 5.4 Actividad biológica

### 5.4.1 Actividad frente a *Trypanosoma brucei* y selectividad hacia el parásito

Se evaluó la actividad anti-*T. brucei* de los cuatro compuestos estudiados y sus correspondientes ligandos libres (dppf, NN = tmp y bipy y HL = HL4 y HL5) frente a la forma infectiva de *T. brucei*, cepa 427. A diferencia de los ensayos realizados a los compuestos estudiados en los capítulos 3 y 4, la línea celular utilizada en este caso expresa una enzima luciferasa (LUC), lo que permite registrar la viabilidad celular a través de un ensayo bioluminiscente (detalles en el capítulo 2). Los resultados se presentan como valores de concentración que inhiben el 50 % de la viabilidad (IC<sub>50</sub>) en la tabla 5.29.

Tabla 5.29: Actividad *in vitro* de ligandos libres y compuestos Ru-NN-L(X), donde NN = tmp o bipy, HL = HL4 o HL5, frente a la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* y macrófagos murinos (J774) y valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)		IS
	<i>T. brucei</i> -LUC	Macrófagos (J774)	
tmp	0,12 ± 0,02	2,5 ± 0,7	20,8
bipy	>10	ND	-
HL4	2,0 ± 0,3	38,8 ± 6,7	19,4
HL5	1,7 ± 0,8	49,4 ± 9,1	29,0
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	0,14 ± 0,01	3,3 ± 0,3	23,6
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	0,22 ± 0,07	3,3 ± 0,1	15,0
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	0,31 ± 0,07	5,7 ± 0,5	18,4
Ru-bipy-L5(Cl)	0,13 ± 0,02	4,9 ± 0,1	37,7
Nifurtimox	6,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	150 ± 5 <sup>a</sup>	25
IS: IC <sub>50</sub> J774/ IC <sub>50</sub> <i>T. brucei</i> ND: No determinado <sup>a</sup> : Valor extraído de [219]			

En la tabla 5.29 se muestra que en general, tanto ligandos libres como compuestos mostraron actividad frente a la forma infectiva de *T. brucei*-LUC. Particularmente, todos los compuestos de Ru(II) mostraron valores de IC<sub>50</sub> en el rango submicromolar, siendo más activos que los ligandos libres, excepto por el ligando tmp. Por otro lado, el ligando bipy careció de actividad antiparasitaria al probarse a una concentración de 10 µM. Si bien la actividad mostrada por el ligando tmp es comparable con la actividad mostrada por los compuestos con este ligando, se observa que los compuestos de bipy muestran un incremento de actividad de entre 77 – 32 veces respecto al ligando bipy. En el caso de los ligandos HL4 y HL5, ambos mostraron actividades similares entre sí y además, se observó un aumento de la actividad entre 17 – 14 veces al comparar con la actividad de sus respectivos compuestos Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>). Esta similitud entre la actividad de los ligandos HL libres frente a *T. brucei*-LUC también fue observada en la evaluación frente a la línea celular utilizada con los compuestos de los capítulos 3 y 4 (línea celular 449-hGrxroGFP2). Sin embargo, importante destacar que si bien la especie es la misma, la actividad de los compuestos en ambas líneas celulares no necesariamente debe ser similar, ni se debe mantener una correlación entre los valores observados [121].

En el caso de los complejos [Ru-bipy-L5]<sup>+</sup> con diferente contraión, se observó un aumento en la actividad anti-*T. brucei* de 2,4 veces al cambiar PF<sub>6</sub><sup>-</sup> por Cl<sup>-</sup>. Este aumento podría estar relacionado con una mayor biodisponibilidad del compuesto, asociada a una mejora en la solubilidad del mismo como consecuencia del intercambio de un contraión grande por uno más pequeño. Anteriormente se ha descrito que la naturaleza del contraión en una sal farmacéutica bioactiva puede tener un impacto en la solubilidad, la farmacocinética, la toxicidad y la potencia [220]. Respecto al fármaco de referencia, todos los compuestos presentaron mayor actividad, demostrando ser entre 46 – 19 veces más potentes que el Nifurtimox. Por otro lado, los nuevos compuestos muestran una actividad del mismo orden en *T. brucei* a la presentada por los compuestos de Pt(II) con derivados de 8HQ estudiados en el capítulo 5, pero mayor que la de los compuestos análogos de Pd(II). Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos se encuentran todos en el rango submicromolar y muestran claramente la ventaja de agregar un centro metálico de Ru(II) en las estructuras diseñadas.

Respecto a la selectividad de los compuestos desarrollados, los mismos mostraron buena selectividad hacia *T. brucei* (38 – 15) considerando que la selectividad del Nifurtimox en las

mismas condiciones es de 23,3 [219]. Los ligandos libres presentaron selectividades similares a los compuestos desarrollados. El cambio de contraión  $\text{PF}_6^-$  por  $\text{Cl}^-$  para el complejo  $[\text{Ru-bipy-L5}]^+$  afectó favorablemente la selectividad, aumentando al doble. Si bien la toxicidad sobre macrófagos murinos es ligeramente mayor para el compuesto con  $\text{Cl}^-$  que para el compuesto con  $\text{PF}_6^-$ , el aumento en la selectividad es mayormente debido a la diferencia significativa en la actividad contra los parásitos. Coincidentemente, el compuesto más potente y más selectivo de los cuatro nuevos compuestos desarrollados es el Ru-bipy-L5(Cl) ( $\text{IC}_{50}$  0,13  $\mu\text{M}$ ; IS = 38).

#### 5.4.2 Actividad *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania infantum*

Para investigar la potencialidad de los compuestos desarrollados como fármacos de amplio espectro contra distintos parásitos tripanosomátidos, se evaluaron los cuatro compuestos contra la forma celular promastigote del tripanosomátido *Leishmania infantum* (*L. infantum*). Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 5.30 como valores de  $\text{IC}_{50}$ .

Tabla 5.30: Actividad *in vitro* de ligandos libres y compuestos Ru-NN-L(X) frente a la forma promastigote de *Leishmania infantum*.

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		IS
	<i>L. infantum</i>	Macrófagos (J774) <sup>a</sup>	
tmp	1,8 ± 0,7	2,5 ± 0,7	1,4
bipy	>25	ND	-
HL4	6,3 ± 1,4	38,8 ± 6,7	6,2
HL5	18,5 ± 6,6	49,4 ± 9,1	2,7
Ru-tmp-L4( $\text{PF}_6$ )	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,3	1,1
Ru-tmp-L5( $\text{PF}_6$ )	4,8 ± 0,7	3,3 ± 0,1	0,7
Ru-bipy-L5( $\text{PF}_6$ )	3,6 ± 0,5	5,7 ± 0,5	1,6
Ru-bipy-L5(Cl)	1,0 ± 0,40	4,9 ± 0,1	4,9
<sup>a</sup> : Valores extraídos de tabla 5.29 IS: $\text{IC}_{50 \text{ J774}} / \text{IC}_{50 \text{ L. infantum}}$ ND: No determinado			

De forma general, los ligandos libres y compuestos mostraron actividad frente a la forma promastigote de *L. infantum* en el rango micromolar. Al igual que en el caso de la actividad frente a *T. brucei*, todos los compuestos son más activos que los ligandos libres, excepto por el ligando tmp, aunque no son más activos que frente a *T. brucei*. Nuevamente, el ligando bipy careció de actividad anti-*L. infantum* al probarse a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  y la actividad del ligando libre tmp es comparable a la actividad de los nuevos compuestos de Ru(II). En cuanto a la actividad de los ligandos libres respecto a los nuevos compuestos, se observó una disminución en la actividad del ligando tmp luego de coordinarse al centro de Ru(II), contrario al caso del ligando bipy, el cual aumentó su actividad entre 25 – 7 veces. Por otro lado, las actividades de los ligandos HL son bastante diferentes entre sí y se observó un aumento en las mismas entre 3,8 – 2,1 veces al coordinarse a la entidad {Ru-dppf-tmp}. Respecto al complejo [Ru-bipy-L5]<sup>+</sup>, se repite el comportamiento donde el compuesto con Cl<sup>-</sup> como contraión presenta mayor actividad que el compuesto con PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, en este caso 3,6 veces mayor actividad. Esto concordaría con lo expuesto en el apartado anterior, donde se podría atribuir este aumento en la actividad a un aumento en la solubilidad del compuesto.

Un aspecto a destacar de estos resultados es la baja selectividad de los compuestos (y ligandos libres) al comparar con los resultados de la evaluación frente a *T. brucei*. Al comparar las tablas 5.29 y 5.30 se puede observar que la diferencia en la selectividad radica en el efecto sobre los parásitos; es decir, *T. brucei* es mucho más sensible al efecto de los compuestos que *L. infantum*. Finalmente, el compuesto más potente y más selectivo es nuevamente Ru-bipy-L5(Cl).

### 5.5 Estudio de estabilidad en solución de los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) por HPLC

La realización de evaluaciones biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* involucra la preparación de soluciones stock de los compuestos en DMSO, debido a su baja solubilidad en medio acuoso. Por esta razón se realizaron estudios de estabilidad de los nuevos compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) en DMSO y DMSO/solución tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) a través de medidas de HPLC. Inicialmente los ligandos libres y compuestos nuevos se evaluaron usando solo DMSO como disolvente. Los cromatogramas de los compuestos se obtuvieron en t = 0 y t = 72 h, tiempo mayor

al mínimo requerido para realizar las pruebas biológicas (24 h). En la tabla 5.31 se muestran los tiempos de retención (TR) de los ligandos libres y los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) a t = 0.

Tabla 5.31: Valores de tiempo de retención para ligandos libres NN y HL y compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) usando DMSO como solvente a t = 0.

Compuesto	TR (min)
tmp	21,7
bipy	16,9
HL4	22,3
HL5	24,2
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	25,8
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	26,5
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	27,8

Los valores de TR para los ligandos libres y compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) mostraron diferencias de acuerdo con lo esperado, siendo mayores para los compuestos que para los ligandos. Esto se relaciona directamente con la lipofilia relativa de ligandos y compuestos (se discute más adelante). Posteriormente los compuestos se disolvieron en DMSO/ Buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) y se evaluaron a t = 0 y t = 72 h nuevamente. Se verificó que los tiempos de retención de los compuestos en DMSO y en DMSO/buffer no varían significativamente. En los cromatogramas de todos los compuestos se observó una única señal tanto a t = 0 como a t = 72 h. En la figura 5.17 se muestran los cromatogramas para el compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>), a modo de ejemplo. La forma inalterada del pico a lo largo del tiempo, así como la variación no significativa del área asociada, refleja la estabilidad de los compuestos en el medio estudiado durante al menos 72 horas.

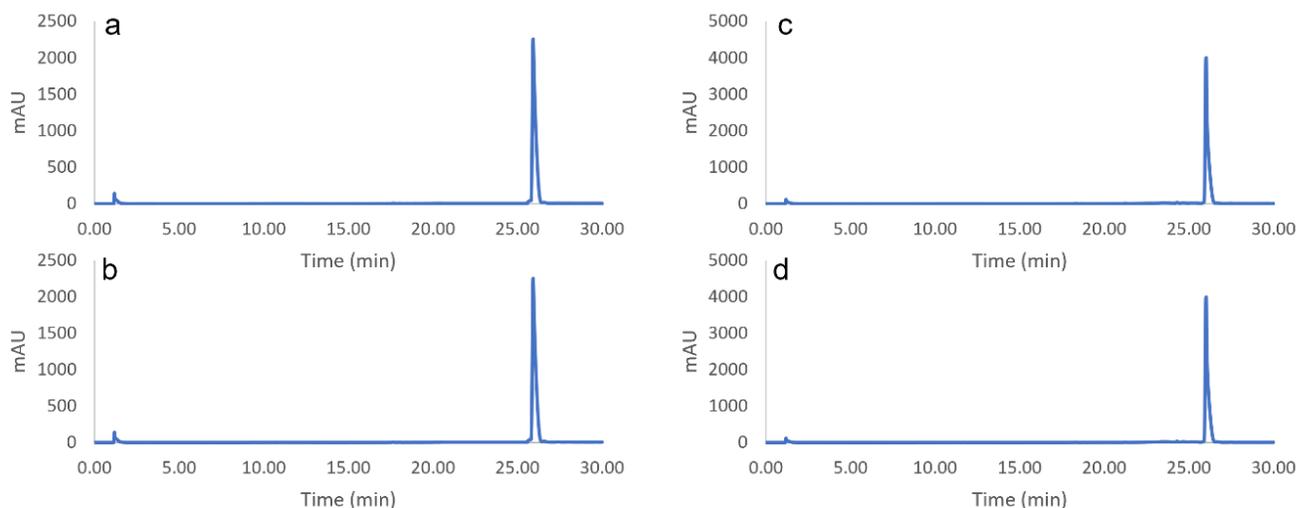


Figura 5.17: Cromatogramas del compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) a) en DMSO a t = 0 y b) en DMSO a t = 72 h; c) en DMSO/buffer tris-HCl 10 mM pH 7,4 (4:1) a t = 0 y d) a t = 72 h

## 5.6 Lipofilia

Se determinaron valores de  $R_f$  y  $R_M$  para todos los compuestos y ligandos según lo descrito en el capítulo 2, utilizando TLC de fase reversa, donde la fase estacionaria se considera similar a lípidos de membranas biológicas o receptores y la fase móvil se considera similar al medio biológico acuoso [74]. Los resultados se muestran en la tabla 5.32.

Tabla 5.32: Valores de  $R_f$  y  $R_M$  de los complejos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) y sus respectivos ligandos libres usando la fase móvil MeOH:DMF:H<sub>2</sub>O (65:5:30 v/v/v).

Compuesto	$R_f$	$R_M$
bipy	0,73	-0,44
tmp	0,54	-0,06
HL4	0,23	0,52
HL5	0,19	0,63
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	0,07	1,11
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	0,06	1,19
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	0,06	1,23
$R_M = \log_{10} [(1/R_f) - 1]$		

Por un lado, se puede observar que los grupos de ligandos (ligandos NN: tmp y bipy; ligandos HL: HL4 y HL5) presentan valores de  $R_f$  diferentes entre sí; los valores de  $R_f$  de los ligandos NN son mayores que para los ligandos HL. Este comportamiento también se observó en los tiempos de retención por HPLC para el estudio de estabilidad de los compuestos (tabla 5.31). Esto indica que los ligandos NN son más hidrofílicos (o menos lipofílicos) que los ligandos HL. Recordemos que, a mayor valor de  $R_f$ , mayor afinidad por la fase móvil y, a menor valor  $R_f$ , mayor afinidad por la fase estacionaria, lo que indicaría un mayor carácter lipofílico.

Por otro lado, se aprecia que los valores de  $R_f$  de todos los nuevos compuestos son mucho menores que para los ligandos libres, independientemente del grupo de ligandos. Esto evidencia el mayor carácter lipofílico de los compuestos respecto a los ligandos libres. Este comportamiento se corresponde a lo esperado, ya que el co-ligando dppf es un fragmento altamente lipofílico y su inclusión en los compuestos finales supone un aumento considerable de la lipofilia. Esto también se evidenció en los compuestos de Pd(II) y Pt(II) con ligandos HL del capítulo 4, cuyos valores de  $R_f$  y  $R_M$  muestran una lipofilia similar a los de Ru(II). Se aprecia además una diferencia muy pequeña entre los valores de  $R_f$  de los nuevos compuestos. Para una mejor apreciación se puede hacer una comparación usando los valores de  $R_M$ , cuya escala logarítmica permite diferenciar de mejor manera la lipofilia de los compuestos. En este caso, a mayor valor de  $R_M$ , mayor lipofilia. Se observa una ligera tendencia donde la lipofilia desciende según:



Es decir, los compuestos más lipofílicos tienen el ligando tmp en su estructura. Según lo comentado anteriormente, en base al comportamiento mostrado por los grupos de ligandos, se esperaba que el aporte a la lipofilia de los compuestos finales fuera mayor por parte de los HL que por parte de los NN, lo que teóricamente mostraría la tendencia:



anteponiendo la presencia de L5 sobre L4. Sin embargo, los resultados muestran que el ligando NN genera un aporte ligeramente mayor a la lipofilia que los HL. La tendencia mostrada experimentalmente en cuanto a los compuestos no estaría de acuerdo con el comportamiento observado por los grupos de ligandos libres.

En suma, los tres nuevos complejos de Ru(II) son más lipofílicos que los ligandos libres 8HQ y NN y son más activos frente a *T. brucei* y *L. infantum* que los ligandos libres (tablas 5.29 y 5.30), con la excepción de tmp. Los valores exhibidos por los complejos patógenos no mostraron correlación directa con la actividad frente a *T. brucei*.

## 5.7 Mecanismo de acción

### 5.7.1 Interacción con ADN

#### 5.7.1.1 Interacción con ADN a través de emisión de fluorescencia

Se ha demostrado que el ADN es un objetivo molecular de las series de compuestos de Pd(II) y Pt(II) desarrolladas en los capítulos anteriores. A su vez, es ampliamente aceptado que el ADN es un potencial blanco de compuestos citotóxicos de Ru(II) [221,222]. Para los nuevos compuestos de Ru(II) descritos en este capítulo, esta posibilidad se ve reforzada por la presencia de los ligandos NN, ya que son clásicos intercalantes del ADN [68]. El estudio de la interacción entre el ADN y los complejos se realizó aplicando la misma técnica que para los compuestos estudiados en los capítulos 3 y 4. En la figura 5.18 se muestra la variación de los espectros de emisión fluorescente del aducto {ADN-BE} (BE: bromuro de etidio) al variar la concentración de los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>).

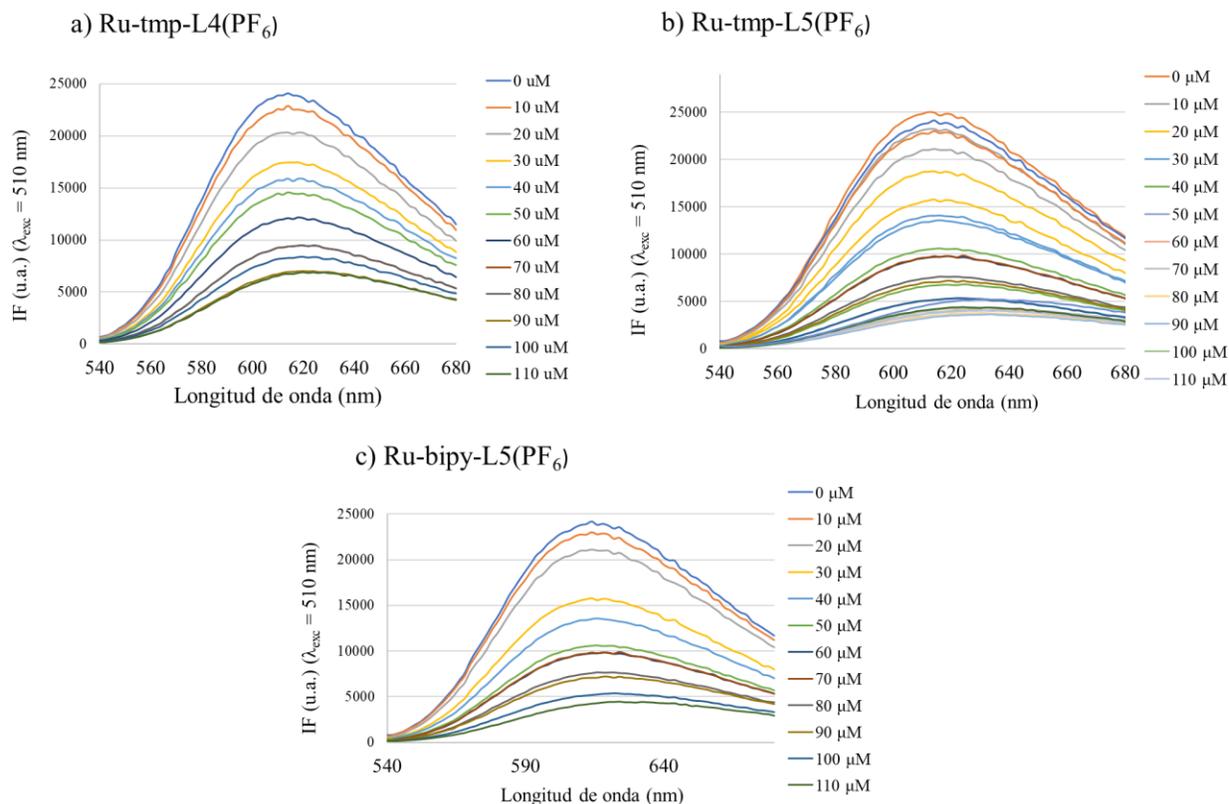


Figura 5.18: Disminución de la emisión de fluorescencia del aducto {ADN-BE} ( $\lambda_{exc} = 510 \text{ nm}$ ) observada en soluciones de concentración variable con los complejos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>).

Los ligandos libres HL no manifestaron interacción alguna con el aducto, al igual que los controles ADN + compuesto y EB + compuesto. En el caso de los nuevos compuestos de Ru(II), se observó una disminución de la intensidad fluorescencia (*quenching*) del aducto al aumentar la concentración de complejo en todos los casos (figura 5.18). Esta disminución de la fluorescencia se traduce como un desplazamiento de BE del aducto, dependiente de la concentración del complejo. Se observa además que el compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) generó el mayor *quenching* del aducto fluorescente. El resto de los compuestos generaron una disminución de la intensidad de fluorescencia en menor medida y de magnitud comparable.

En la figura 5.19 se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia relativa en el máximo de emisión del aducto (614 nm) al aumentar la concentración de complejo. Se confirma que todos los complejos presentaron interacción con el aducto, con afinidades variables. El compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) generó una disminución del porcentaje de fluorescencia de hasta un 80 %, mientras que los compuestos Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>) y Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) cerca de un 60 % a su concentración más

alta. Estos resultados sugieren la interacción de los compuestos con el ADN en las condiciones ensayadas. Aunque este enfoque experimental no permite determinar la naturaleza de la interacción ADN/compuesto, sugiere que esta interacción disminuye la afinidad del ADN por el intercalante fluorescente BE y este se libera del aducto.

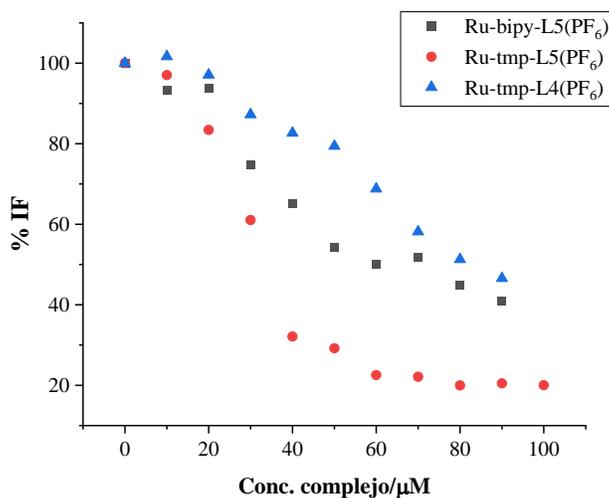


Figura 5.19: Intensidad relativa de fluorescencia (% IF) a  $\lambda_{em} = 614$  nm aumentando la concentración de complejo para los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>)

Como se ha mencionado en los capítulos 3 y 4, es posible evaluar los mecanismos implicados en la disminución de la fluorescencia causada por los complejos, a través del análisis de la ecuación de Stern-Volmer (1). En esta ecuación,  $IF_0$  e  $IF$  corresponden a la intensidad de emisión fluorescente del aducto en ausencia y presencia de complejo, respectivamente;  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer; y  $[Q]$  corresponde a la concentración de complejo [175]. A concentraciones bajas de complejo la gráfica  $IF_0/IF$  es lineal (figura 20), lo que permite calcular la constante  $K_{SV}$  para cada sistema, lo que daría cuenta de la magnitud relativa de la afinidad de los compuestos por el ADN (tabla 5.33).

$$\frac{IF_0}{IF} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

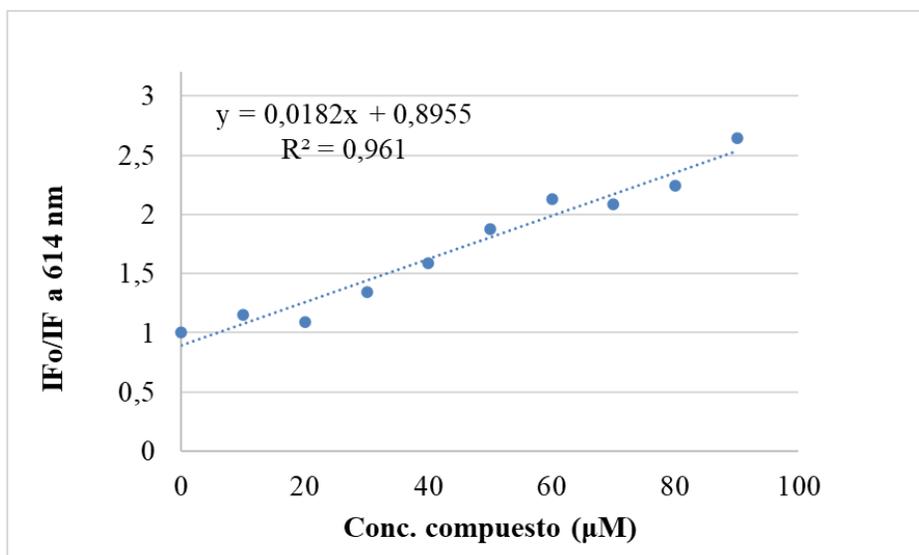

 Figura 5.20: Gráfica de Stern-Volmer para el complejo Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>).

Tabla 5.33: Constantes de Stern-Volmer obtenidas para los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>), para la unión competitiva {ADN-BE}, en medio 5% DMSO/Tris/HCl.

Complejos	$K_{SV}$ (M <sup>-1</sup> )	log( $K_{SV}$ )
Ru-tmp-L4(PF <sub>6</sub> )	13039	4,12
Ru-tmp-L5(PF <sub>6</sub> )	49009	4,69
Ru-bipy-L5(PF <sub>6</sub> )	16886	4,23

Aunque  $K_{SV}$  informa sobre la disminución de la intensidad de fluorescencia producida por los compuestos, es un parámetro útil que indica indirectamente la afinidad de los compuestos por el ADN. Los valores de log  $K_{SV}$  obtenidos para los tres complejos son similares a los mostrados por la mayoría de los complejos de Pd(II) de los capítulos 3 y 4 (log  $K_{SV}$  = 3,8 – 4,6), los cuales son bastante más grandes que los mostrados por los compuestos de Pt(II) (log  $K_{SV}$  = 3,1 – 3,9). Sin embargo, de forma general son menores que los informados previamente para otros complejos con ligandos planos típicos intercalantes de ADN (19 – 30) [68].

De la tabla 5.33 se aprecia aún más la afinidad del compuesto Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) por el ADN; a su vez, el efecto de disminución de fluorescencia es más fuerte para los complejos que contienen el ligando L5 que para el que contiene L4. Esto puede estar relacionado con el efecto del átomo pesado, en el que los compuestos que contienen elementos más pesados apagan la fluorescencia al

aumentar fuertemente la tasa de cruce entre sistemas [223]. No se observó una correlación clara entre la interacción con ADN y la actividad biológica de los compuestos. Todo el conjunto de resultados sugiere que el ADN podría ser uno de los blancos moleculares de estos complejos en el parásito.

### 5.7.1.2 Interacción con ADN a través de electroforesis en gel

Con el objetivo de ahondar en el efecto de los compuestos Ru-NN-L(PF<sub>6</sub>) sobre el ADN, se estudió su interacción con ADN plasmídico mediante electroforesis en gel. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que se encuentran mayormente en células procariotas; generalmente son de forma circular y sus extremos están unidos covalentemente [224]. A través de este método es posible evaluar el efecto de los complejos sobre la estructura terciaria del ADN, lo que se traduce como cambios en la velocidad de migración del mismo, asociados a su grado de compactación o enrollamiento. Partiendo de una forma de ADN superenrollado (forma I) (figura 5.21), que muestra mayor movilidad por ser más compacto, podría ocurrir la ruptura de una de las hebras del ADN que generara una forma circular relajada (forma II), de menor movilidad, o podrían ocurrir eventos de escisión que produjeran una forma completamente lineal (forma III), de movilidad intermedia.

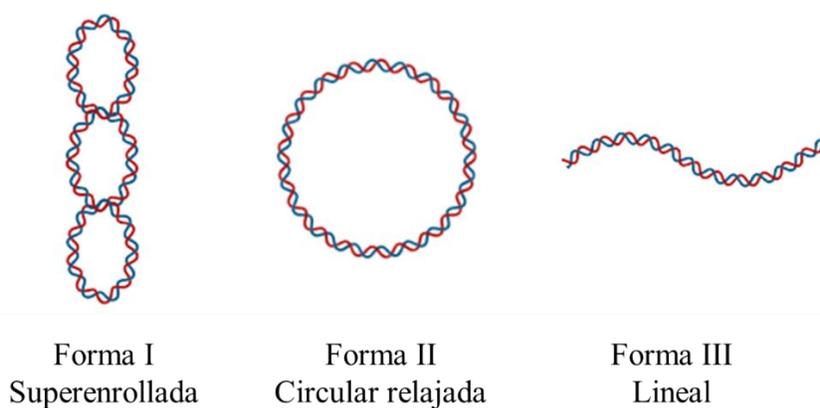


Figura 5.21: Morfologías del ADN plasmídico

El efecto de los complejos en el ADN superenrollado se estudió variando relaciones molares de mol de complejo: mol de pares de bases de ADN (ri) entre 3 y 30, e incubándose a 37 °C durante 24 h. Dado que los geles se ejecutaron en ausencia de colorantes intercalantes, como el bromuro de etidio utilizado en el estudio previo, fue posible evaluar el efecto de los complejos directamente

sobre la estructura terciaria del ADN y no sobre el aducto {ADN-BE}. En la figura 5.22 se muestran los resultados para las corridas con los compuestos Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y Ru-bipy-L5(PF<sub>6</sub>).

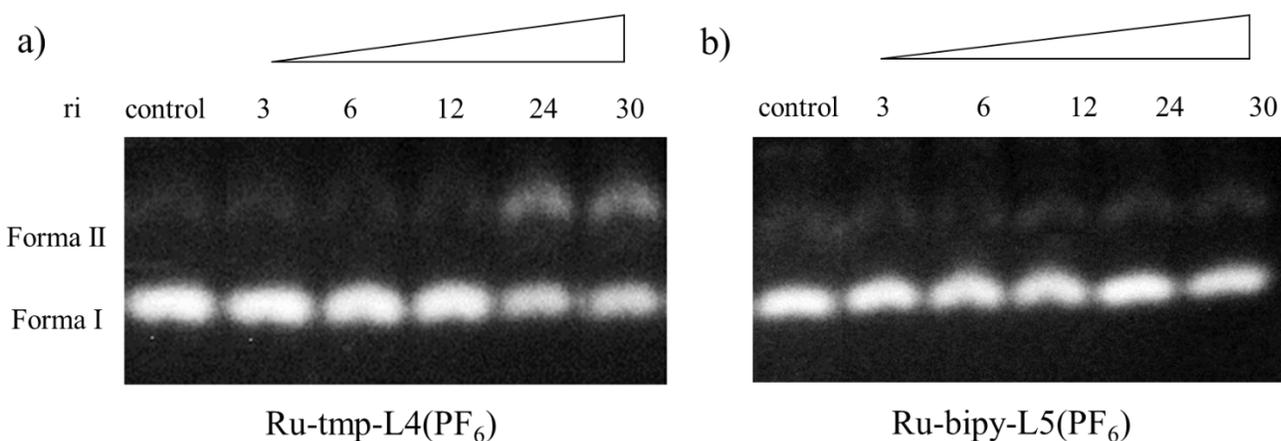


Figura 5.22: Interacción del ADN plasmídico con a) Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y b) Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>).

En ambos geles (con más claridad en el a)), se observa que a medida que la relación ri aumenta, hay un aumento de la forma II y una disminución de la forma I. Es decir, a medida que se tiene mayor cantidad de complejo, la forma superenrollada se transforma en la forma circular relajada. Esto se muestra con más detalle en la figura 5.23, donde se presenta la variación de la abundancia relativa (%) de las formas I y II en función de la relación ri. Se observa que ambos compuestos generan el mismo efecto en la estructura terciaria del ADN, con una disminución de la forma I más marcada para el compuesto Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>). La cantidad de plásmido superenrollado disminuye progresivamente por la ruptura de una hebra, lo que conduce a una acumulación de forma II circular relajada. Hasta la relación molar estudiada no se observó la forma lineal (forma III) para ninguno de los complejos ensayados. La migración de la forma de ADN superenrollada y relajada no cambió con la incubación con los complejos metálicos, lo que sugiere que no se forman estructuras anómalas ADN/complejo. Este comportamiento se ha observado en otros compuestos de Ru(II) con y sin ligandos intercalantes del ADN [221,225], lo que sugiere que la presencia de los ligandos NN no es determinante para generar este efecto en el ADN.

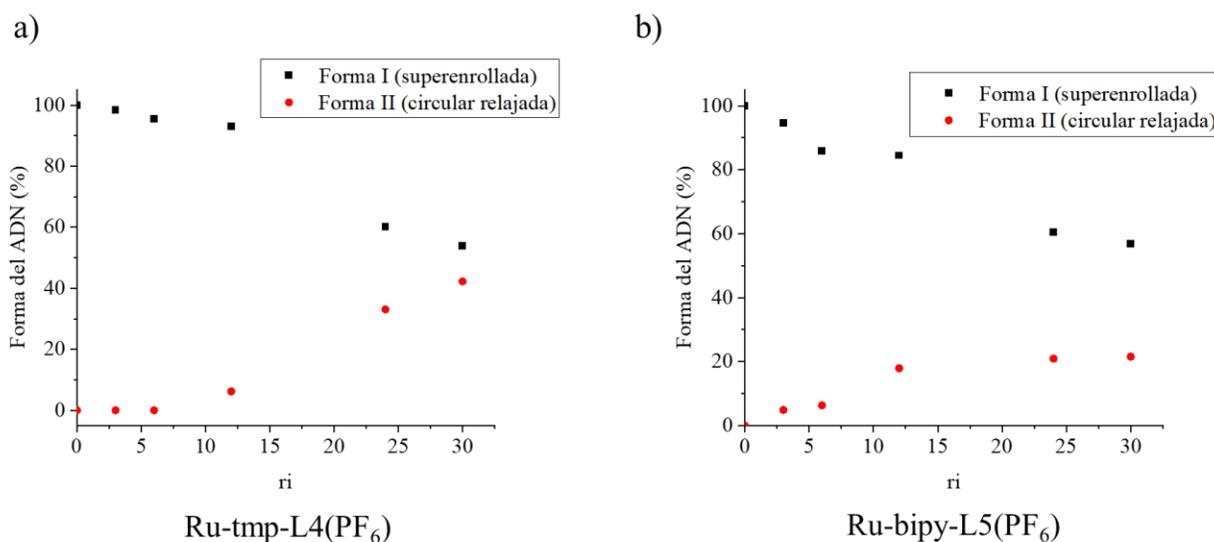


Figura 5.23: Efecto de (a) Ru-tmp-L4(PF<sub>6</sub>) y (b) Ru-tmp-L5(PF<sub>6</sub>) sobre la abundancia relativa (%) de la correspondiente forma de ADN a diferentes proporciones de complejo metálico:ADN (ri).

En resumen, ambos complejos mostraron un comportamiento similar en la interacción *in vitro* con el ADN, lo que sugiere que los compuestos son capaces de generar cambios en la estructura terciaria del mismo, generando rupturas de una sola hebra en la forma superenrollada (forma I) para generar ADN circular relajado (forma II), y esta capacidad depende de la dosis de compuesto. Todo el conjunto de resultados en este apartado sugiere que el ADN podría ser uno de los blancos moleculares de estos nuevos compuestos de Ru(II).

### 5.7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en *L. infantum*

Para determinar si los complejos inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como mecanismo citotóxico en *L. infantum*, se incubaron parásitos con 1x, 5x y 10x el valor IC<sub>50</sub> previamente determinado de cada uno de los cuatro nuevos compuestos (tabla 5.30) durante varios periodos de tiempo hasta un máximo de 6 horas. Se utilizó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) para detectar EROs y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como control positivo. Como ya se explicó en capítulos anteriores, el H<sub>2</sub>DCFDA es una forma de fluoresceína químicamente reducida no fluorescente que, tras la oxidación y la escisión de los grupos acetato por esterasas intracelulares, se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente [123]. Si en presencia de los compuestos se llegase a generar un aumento

en la intensidad de fluorescencia, esto indicaría que se produjo DCF a causa de la generación de EROs en los parásitos.

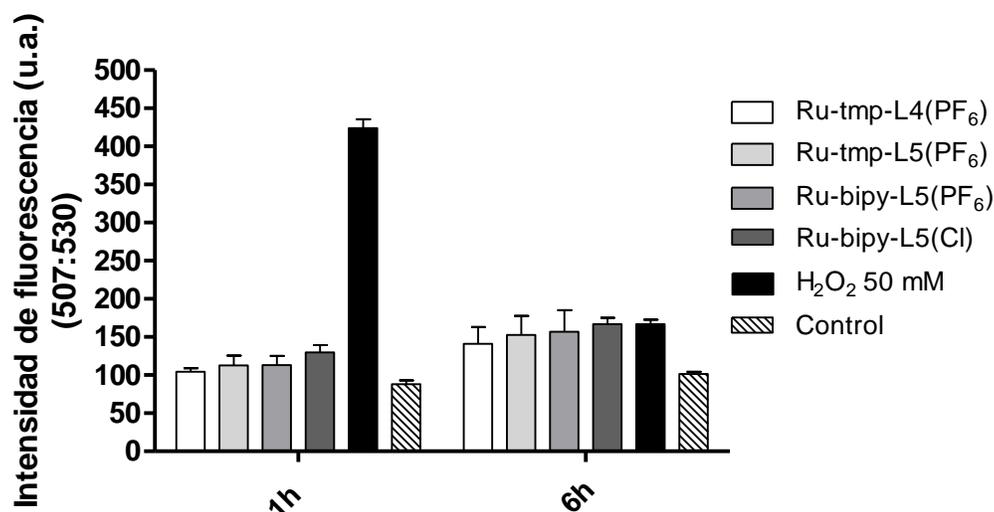


Figura 5.24: Análisis de la generación de EROs en promastigotes de *L. infantum*, tras tratamiento con  $1 \times IC_{50}$  de complejos de Ru(II) a distinto tiempo de incubación.

En la figura 5.24 se observa la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) generada en presencia de los complejos a  $t = 1$  h y  $t = 6$  h. En general, los compuestos presentaron un comportamiento similar, mostrando un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia respecto al control (parásitos no tratados), pero mucho menor que el control positivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, todos los compuestos aumentaron significativamente el nivel de EROs al aumentar el tiempo de incubación en comparación con el grupo de control.

En suma, los compuestos aumentaron significativamente el nivel de EROs a concentraciones de  $1 \times IC_{50}$  respecto a parásitos no tratados, indicando que la generación de EROs podría ser un posible mecanismo de acción de los compuestos desarrollados.

## 5.8 Conclusiones parciales

Se desarrolló una familia de cuatro nuevos compuestos heterobimetálicos de Ru(II)-Fe de fórmula general  $[Ru^{II}(L)(dppf)(NN)](X)$  (código Ru-NN-L(X)) que contienen ligandos bioactivos (HL) seleccionados derivados de la 8-hidroxiquinolina (8HQ), ligandos bioactivos seleccionados derivados de la 1,10-fenantrolina o phen (NN), el derivado de ferroceno 1,1'-

bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf), y un contraión X, hexafluorofosfato ( $\text{PF}_6^-$ ) o cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). Los compuestos se obtuvieron a través de una síntesis de 4 pasos con rendimientos de síntesis entre 65 – 70 %. Además, se logró la síntesis de dos precursores nuevos: PRE2-tmp y PRE3-tmp.

Todos los precursores y los compuestos finales fueron completamente caracterizados en estado sólido y en solución. Respecto a la caracterización en estado sólido de los compuestos finales, se verificó la presencia de los ligandos coordinados y se asignaron de forma tentativa bandas de vibración IR; para el caso de compuesto Ru-tmp-L5( $\text{Cl}$ ) se verificó la ausencia de las bandas características del anión  $\text{PF}_6^-$  según lo esperado. Se obtuvo la estructura cristalina de 2 de los 4 nuevos compuestos, que difieren en el HL derivado de 8HQ coordinado: Ru-tmp-L4( $\text{PF}_6$ ) y Ru-tmp-L5( $\text{PF}_6$ ). Se verificó la coordinación de los ligandos en disposición *cis* al centro de Ru(II). En solución se verificó que los compuestos finales obtenidos son electrolitos 1:1 y por resonancia magnética nuclear se asignaron señales de los protones de los ligandos derivados de 8HQ (HL4 y HL5), ligandos NN (bipy o tmp) y del coligando dppf en todos los casos, dando cuenta de la coordinación de los ligandos según lo esperado y de que en solución los nuevos compuestos se mantienen como una entidad similar a la observada en el estado sólido. Además, se postula a través de  $^1\text{H}$ -RMN que se obtuvo estereoisómeros en la síntesis de los compuestos Ru-tmp-L4( $\text{PF}_6$ ) y Ru-tmp-L5( $\text{PF}_6$ ).

Los nuevos compuestos mostraron actividad *in vitro* contra dos parásitos tripanosomátidos diferentes: *L. infantum* y *T. brucei*. Los compuestos resultaron más activos en *T. brucei*. El cambio del contraión  $\text{PF}_6^-$  por  $\text{Cl}^-$  triplicó la actividad contra ambos parásitos, lo que resalta la relevancia de la naturaleza del contraión en la actividad biológica. La inclusión de los dos ligandos bioactivos dio lugar a compuestos que son en su mayoría más activos que los ligandos libres, lo que muestra que la estrategia de incluir estos ligandos en una misma entidad fue exitosa. En su conjunto, todos los nuevos compuestos de Ru(II) mostraron por primera vez valores de  $\text{IC}_{50}$  en *T. brucei* en el rango submicromolar, del mismo orden que los mejores compuestos Pt-dppf-L descritos en el capítulo anterior y mayores a los de sus análogos de Pd(II). Esta misma tendencia se observa en cuanto a la selectividad hacia *T. brucei*.

Se investigó el posible mecanismo de acción de los nuevos compuestos. Según los resultados, los compuestos interactúan con el ADN y generan un aumento significativo de EROs, por lo que se postulan ambos como potenciales mecanismos de acción. No se detectó correlación entre la

lipofilia, la interacción con el ADN o la generación de EROs y la potencia biológica. Estos compuestos son candidatos prometedores para un mayor desarrollo farmacológico y como punto de partida para el diseño de nuevos compuestos contra parásitos tripanosomátidos.

Capítulo 6:  
Sistemas encapsulantes nanoestructurados

## 6.1 Introducción

En este capítulo se describen los sistemas seleccionados para el encapsulamiento de los compuestos hit, identificados entre las tres familias de compuestos desarrolladas en los capítulos 3, 4 y 5 de este Trabajo de Tesis. Los compuestos seleccionados son  $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L4})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L5})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{Cl})$ , que de ahora en adelante se identificarán como PtL4 y RuL5, respectivamente (figura 6.1). En este apartado se expone la síntesis y caracterización de los nanosistemas, así como la evaluación de su estabilidad en el tiempo, perfil de liberación y evaluación *in vitro* sobre la forma infectiva de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) y sobre macrófagos murinos como modelo de células de mamífero sanas.

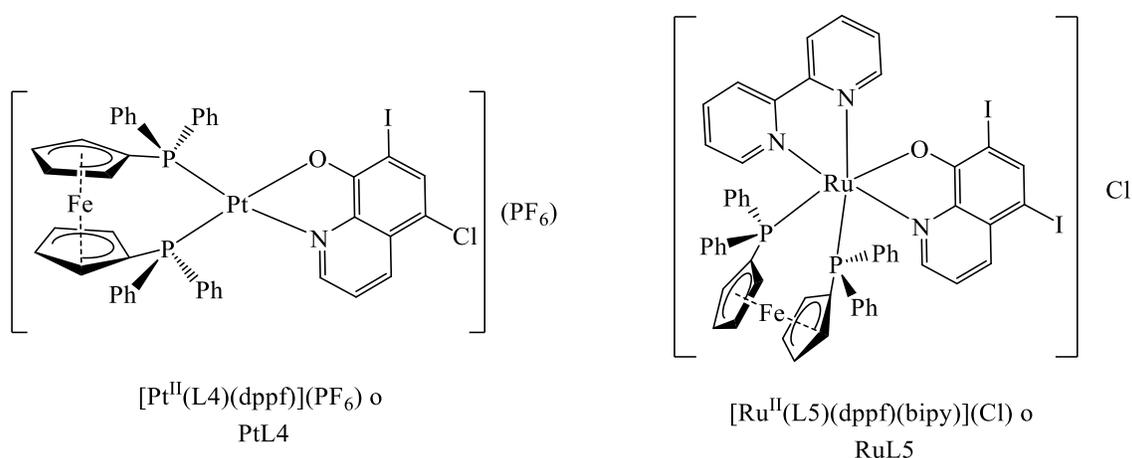


Figura 6.1: Estructura de los compuestos hit, seleccionados para su encapsulación en sistemas nanométricos.

### 6.1.1 Sistemas nanoestructurados como *drug delivery systems*

Como se mencionó en el capítulo 1, un recurso muy utilizado actualmente en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades es el uso de nanotecnología. Entre los nanosistemas encapsulantes más comúnmente utilizados se encuentran los liposomas (figura 6.2), los cuales son vesículas formadas por los mismos materiales que las membranas celulares. Estructuralmente se forman cuando se coloca un exceso de agua, fosfolípidos y otros lípidos, pudiendo formar bicapas lipídicas concéntricas cerradas, logrando el atrapamiento de agua y solutos disueltos (fármacos) en el proceso de formación [226]. La estructura química de los fosfolípidos que forman los liposomas determina ciertas características de los mismos. El grupo o cabeza polar determina la carga de los lípidos y, por lo tanto, la carga

global de la membrana del liposoma. La cabeza polar puede poseer grupos con fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) o fosfatidilserina (PS). De este modo, por su estructura, PC y PE generarían lípidos con carga neutra, mientras que PG, PI y PS dan lugar a lípidos cargados negativamente [227].

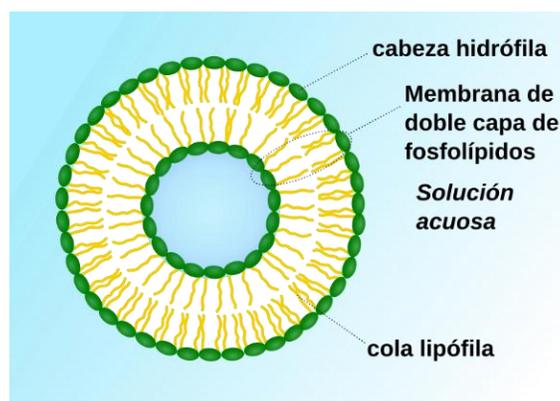


Figura 6.2: Estructura general de un liposoma.

Los liposomas han sido ampliamente estudiados debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. Actualmente varias formulaciones liposomales son utilizadas a nivel clínico: Doxil®, conteniendo doxorubicina para cáncer de ovario, Ambisome®, conteniendo anfotericina B para el tratamiento de infecciones por hongos y para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, DepoDur™, formulación analgésica conteniendo morfina, entre otras [91]. También, varios sistemas nanoliposomales, incluyendo fármacos de platino de uso clínico (cisplatino, oxaliplatino), se encuentran actualmente en fases clínicas avanzadas [32,92].

Otros sistemas más recientemente desarrollados son las nanopartículas poliméricas, que pueden denominarse nanocápsulas, nanoesferas o micelas según su composición y método de preparación. Las nanocápsulas son estructuras vesiculares que se forman en presencia de componentes lipídicos, en donde el fármaco se confina en una cavidad rodeada de una membrana polimérica, mientras que las nanoesferas proporcionan una matriz de cadenas poliméricas donde el fármaco se encuentra uniformemente disperso (figura 6.3 a) [228,229]. Las micelas poliméricas (MPs) se forman espontáneamente en solución a partir de copolímeros anfifílicos, que al superar cierta concentración se unen para formar estructuras de tipo *core-shell* (núcleo-caparazón) con un núcleo hidrofóbico y una coraza hidrofílica (figura 6.3 b) [230]. El estudio de estos sistemas como sistemas de entrega de fármacos (o *drug delivery systems* en inglés) se ha

centrado por años en el desarrollo de agentes antitumorales; la primera formulación polimérica para el tratamiento del cáncer que alcanzó la evaluación clínica fue una mezcla del fármaco doxorubicina con micelas Pluronic® L61 y F127, que desde 2007 se encuentra en estudio clínico internacional fase III [231,232].

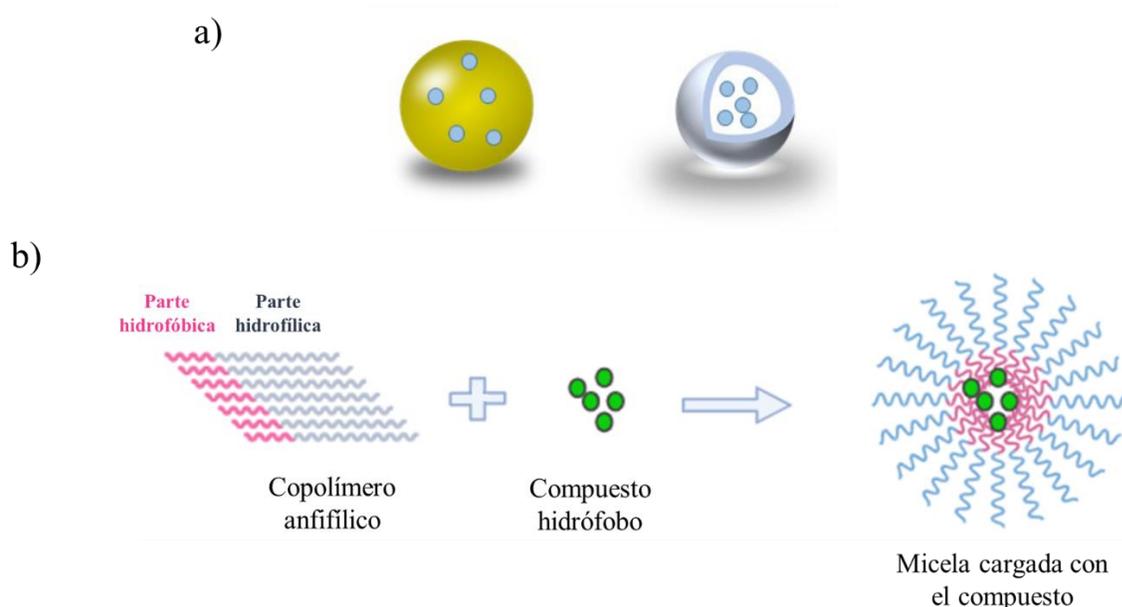


Figura 6.3: Representación gráfica de a) nanoesferas (izquierda) y nanocápsulas (derecha); b) esquema de formación de micelas poliméricas.

Entre los polímeros más utilizados se encuentra el ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, aprobado por la FDA (*food and drug administration, EE.UU.*) y ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Dependiendo del peso molecular y de la relación láctico:glicólico se pueden obtener distintas formas de PLGA con propiedades fisicoquímicas diferentes, como la cristalinidad, solubilidad, tiempo de degradación, entre otras [233]. El PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua produciendo sus monómeros originales: ácido láctico y ácido glicólico. Estos dos monómeros son subproductos de varias vías metabólicas en condiciones fisiológicas normales, lo que lo ha hecho conveniente para la fabricación de muchos dispositivos médicos, como injertos, suturas, implantes, dispositivos protésicos, películas de sellado quirúrgico, micro y nanopartículas [233].

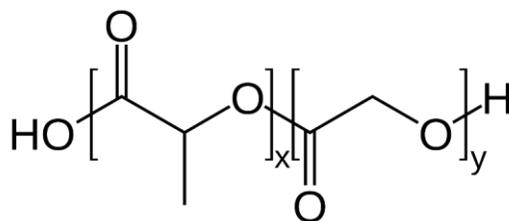


Figura 6.4: Estructura general del ácido poli(láctico-co-glicólico). Unidad “x”: ácido láctico; unidad “y”: ácido glicólico.

### 6.1.2 Nanosistemas y enfermedades tropicales desatendidas (ETD)

El desarrollo de sistemas liposomales para el tratamiento del cáncer fue el área más explorada en términos de sistemas encapsulantes como productos clínicamente aprobados. A través de los años se han desarrollado sistemas para el tratamiento de otras enfermedades como antifúngicos, analgésicos, entre otros. Una de las primeras aplicaciones de sistemas liposomales fue apuntar hacia el tratamiento de infecciones causadas por patógenos intracelulares, aprovechando el funcionamiento del sistema fagocítico mononuclear (MPS), donde células del sistema inmune (monocitos y macrófagos) se encargan de eliminar microorganismos y cuerpos extraños mediante fagocitosis [234,235]. De esta manera, los liposomas ingresan a las células infectadas y liberan su contenido en el interior de los macrófagos. Por esta razón, los liposomas son estudiados mayormente para el tratamiento de la leishmaniasis en comparación con cualquier otra enfermedad parasitaria.

Tal es el caso del Ambisome®, una formulación liposomal de Anfotericina B. En 1997 se aprobó clínicamente su uso y en 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó su uso para el tratamiento de leishmaniasis [236]. Por otro lado, la utilidad de los liposomas en la tripanosomiasis se ha explorado en un grado muy inferior en comparación con la leishmaniasis. Se han llevado a cabo estudios *in vivo* encapsulando benznidazol, fármaco utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que mostraron que la toxicidad del fármaco se vio reducida por la encapsulación [16,17].

Por otro lado, el desarrollo de formulaciones poliméricas para el tratamiento de este tipo de enfermedades es aún menos difundido. Mendonça *et al.* desarrollaron un sistema con un poloxámero similar al Pluronic® F127 (Poloxamer 407) encapsulando anfotericina B, con

resultados *in vitro* e *in vivo* interesantes frente a *Leishmania amazonensis* [237]. El mismo grupo ha desarrollado sistemas similares con clioquinol o naftoquinona con eficacia demostrada frente a la misma cepa de *Leishmania* [238]. Al igual que en el caso de los sistemas liposomales, el estudio de este tipo de sistemas se ha centrado mayormente en el tratamiento de la leishmaniasis. Sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios en *T. cruzi* y *T. brucei* con resultados alentadores. De Morais *et al.* encapsularon hipericina (un fotosensibilizador que mediante terapia fotodinámica genera especies reactivas del oxígeno, EROs) en micelas poliméricas utilizando copolímeros Pluronic® F127 y P123, mostrando actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* en el rango submicromolar [239]. Simonazzi *et al.* sintetizaron dispersiones sólidas utilizando el poloxámero P407 para mejorar la biodisponibilidad del benznidazol [240]. Un trabajo similar ha sido desarrollado por Eloy *et al.* para aumentar la biodisponibilidad de ácido ursólico, potencial candidato para el tratamiento de la enfermedad de Chagas [241].

Si bien hasta la fecha no hay muchos registros de sistemas poliméricos para el tratamiento de infecciones causadas por *T. brucei*, se han desarrollado algunos sistemas con excelentes resultados. Arias *et al.* sintetizaron nanopartículas de polietilenglicol-ácido poli(láctico-co-glicólico) (PEG-PLGA) cargadas con pentamidina ancladas a un fragmento de anticuerpo específico del parásito, las cuales mostraron eficacia contra *T. brucei* en dosis 100 veces más reducidas que la pentamidina libre cuando se administra por vía intraperitoneal en el modelo de ratón infectado [242]. Estos y otros ejemplos demuestran que la nanoencapsulación de fármacos para terapia antitripanosomal puede ejercer un profundo impacto, mejorando la eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*, reduciendo la toxicidad y/o superando la resistencia a los fármacos [4,98].

## 6.2 Selección de compuestos hit y sistemas encapsulantes

En función de los resultados obtenidos tras la evaluación de la actividad anti-*T. brucei* de todos los compuestos desarrollados en este Trabajo de Tesis, se seleccionaron dos de los compuestos más promisorios:

- 1) De las familias de compuestos de Pd(II) y Pt(II) se seleccionó el compuesto [Pt<sup>II</sup>(L4)(dppf)](PF<sub>6</sub>) (código **PtL4**), por ser el compuesto más activo y presentar un

índice de selectividad elevado respecto al resto de los compuestos y al fármaco de referencia.

- 2) De la familia de compuestos de Ru(II) se seleccionó el compuesto [Ru<sup>II</sup>(L5)(dppf)(bipy)](Cl) (código **RuL5**), por ser el compuesto más activo y más selectivo de esta familia.

En la tabla 6.1 se resumen los resultados de las evaluaciones biológicas, donde se observa que la actividad de ambos compuestos es similar, mientras que la citotoxicidad de PtL4 frente a macrófagos murinos es ligeramente menor que para RuL5, lo que genera que su índice de selectividad sea el mayor de ambos compuestos. Es importante recordar que, como se mencionó en el capítulo anterior, la actividad de los compuestos fue evaluada en diferentes líneas celulares de *T. brucei*, por lo que no necesariamente estos resultados se relacionan entre sí.

Tabla 6.1: Actividad *in vitro* de los compuestos hit seleccionados frente a la forma infectiva de *T. brucei* y macrófagos murinos (J774), valores del índice de selectividad (IS) hacia el parásito y descriptores de lipofilia.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)		IS	R <sub>f</sub> /R <sub>M</sub> <sup>c</sup>
	<i>T. brucei</i> (427)	Macrófagos (J774)		
PtL4	0,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,4	47,8	0,08/1,04
RuL5	0,13 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,1	37,7	0,07/1,11

IS: IC<sub>50</sub> J774/ IC<sub>50</sub> *T. brucei*

<sup>a</sup>: evaluado frente a la línea *T. brucei* 449-hGrxroGFP2 o *T.b.* GFP

<sup>b</sup>: evaluado frente a la línea *T. brucei* LUC o *T.b.* LUC

<sup>c</sup>: valores de R<sub>f</sub> y R<sub>M</sub>, descriptores de lipofilia

En cuanto a la selección de los sistemas encapsulantes, se seleccionaron dos tipos:

- 1) Sistemas liposomales basados en fosfatidilcolina de soja. Estos sistemas se desarrollaron en el Centro NanoMat, Facultad de Química, Instituto Polo Tecnológico de Pando bajo la tutoría de la Dra. Helena Pardo en el marco de una pasantía por créditos.

- 2) Sistemas poliméricos basados en PLGA. Parte de estos sistemas (los desarrollados para el compuesto PtL4) se desarrollaron en el marco de una pasantía de 2 meses en el grupo Gnano del Instituto de Física de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo (IFSC-USP), Brasil, bajo de la tutoría del Dr. Valtencir Zucolotto. En función de lo aprendido durante esta instancia, se desarrollaron sistemas para el compuesto RuL5 en el Área de Química Inorgánica de Facultad de Química, UdelaR.

A continuación, se discutirán los resultados de síntesis, caracterización y evaluación biológica de los sistemas con cada compuesto seleccionado.

## 6.3 Sistemas encapsulantes con el compuesto PtL4

### 6.3.1 Liposomas

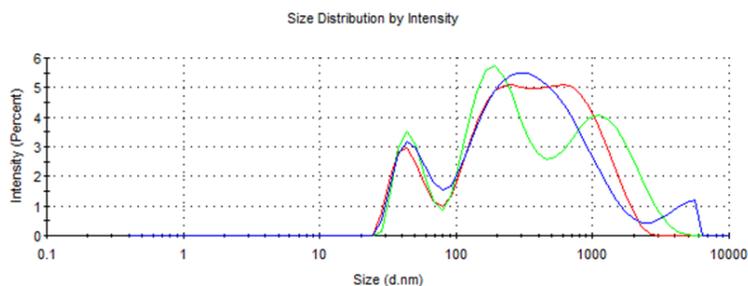
#### 6.3.1.1 Síntesis y caracterización

Para la síntesis de los liposomas se utilizó la técnica de hidratación de film lipídico [142] (*Thin-film hydration*) como se describe en el capítulo 2, en donde inicialmente se obtiene un film seco compuesto por los lípidos seleccionados y el compuesto hidrófobo y luego se hidrata para generar vesículas multilamelares de gran tamaño (VMLs), con tamaños por encima de los 500 nm. Posteriormente se aplican técnicas de reducción de tamaño que permitan obtener vesículas pequeñas unilamelares (SUVs), con tamaños entre 20 – 100 nm [143]. En el caso de este sistema, se aplicó sonicación como técnica de reducción de tamaño. Se probaron dos métodos distintos: con baño de agua y con puntero. En la figura 6.4 se muestra la distribución de tamaño de partícula de las suspensiones de liposomas cargados con el compuesto PtL4 (LC-PtL4) luego de aplicar sonicación por ambos métodos.

El índice de polidispersidad (PDI) es una medida de la distribución de tamaño en una población de partículas; se expresa como un valor adimensional entre 0 – 1, en donde valores de aprox. 0,2 indican muestras monodispersas y valores mayores a 0,7 indican distribución de tamaños muy amplia, no apropiada para la técnica de DLS [243]. Se observa en la figura 6.5 que la sonicación en baño de agua por 15 minutos continuos generó una suspensión bastante más polidispersa ( $PDI = 0,6 \pm 0,2$ ) que la sonicación con puntero ( $PDI = 0,346 \pm 0,006$ ). Además, los tamaños promedio son significativamente más grandes para la muestra sonicada en baño de agua ( $D_h = 189 \pm 12$

nm) que para la muestra sonicada con puntero ( $D_h = 94,4 \pm 0,3$  nm). Por esta razón se seleccionó el método de sonicación con puntero como técnica de reducción de tamaño de los liposomas sintetizados.

a) LC-PtL4 crudo - sonicación en baño (15 min continuos)



b) LC-PtL4 crudo - sonicación con puntero (15 min intermitentes)

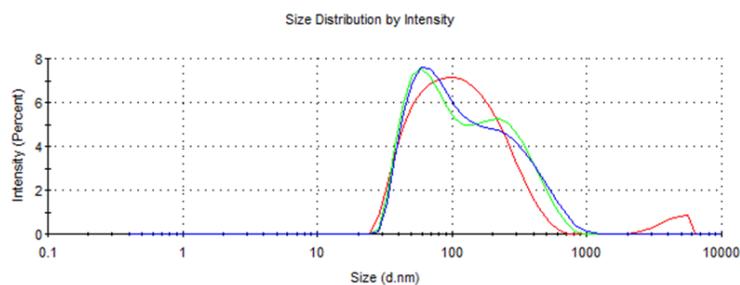


Figura 6.5: Distribución de tamaño de partícula de la suspensión de liposomas cargados con el compuesto PtL4 (LC-PtL4) luego de aplicar sonicación por dos métodos diferentes.

Luego se prepararon liposomas vacíos y cargados con PtL4 a partir de una solución madre de lípidos, y se evaluó el efecto del agregado de compuesto en el tamaño y la estabilidad de las suspensiones preparadas. En la tabla 6.2 se muestran los resultados de tamaño, PDI y potencial Z (ZP) de las suspensiones de liposomas vacíos y cargados con compuesto.

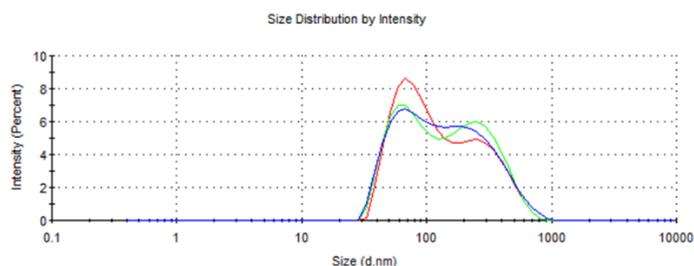
Tabla 6.2: Caracterización fisicoquímica de liposomas vacíos y cargados con PtL4.

	<b>Dh (nm)<sup>1</sup></b> <b>±D.S.</b>	<b>PDI<sup>2</sup></b> <b>±D.S.</b>	<b>ZP (mV)<sup>3</sup></b> <b>±D.S.</b>
Liposomas vacíos (LV)	105 ± 2	0,33 ± 0,03	(-)5,8 ± 0,4
Liposomas cargados (LC-PtL4)	88,6 ± 0,4	0,272 ± 0,006	0,6 ± 0,1
<sup>1</sup> Diámetro hidrodinámico promedio a 25°C <sup>2</sup> Índice de polidispersidad a 25°C <sup>3</sup> Potencial Z a 25°C D.S.: desviación estándar			

Se muestra que el tamaño de los liposomas vacíos (LV) y de los liposomas cargados con el compuesto (LC-PtL4) está alrededor de los 100 nm, lo que indicaría que se obtuvo vesículas pequeñas unilamelares (SUVs), es decir, liposomas de una sola bicapa lipídica [143]. Esto indicaría que el proceso de reducción de tamaño seleccionado fue eficaz. A su vez, se observa que el tamaño de los LC-PtL4 es menor que el de los LV, indicando que la presencia de compuesto ejerce un efecto sobre el tamaño de los liposomas. Esta reducción podría deberse a interacciones atractivas entre el compuesto y las cadenas alifáticas de la fosfatidilcolina que generen una contracción en el tamaño de los liposomas, considerando que los mismos no se comportan como estructuras rígidas [143,244].

El valor de PDI obtenido indica que ambas dispersiones poseen una distribución de tamaño similar, aunque más dispersa para los LV que para los LC-PtL4. Esto se aprecia en la figura 6.6, donde se observan dos poblaciones predominantes para los LV (con tamaño medio cerca de los 90 y 300 nm), mientras que para los LC-PtL4 se observa una población mayoritaria cercana a los 80 nm y una minoritaria hacia los 800 nm. Nanopartículas con diferentes tamaños pueden distribuirse de manera diferente en el cuerpo y, por lo tanto, tener diferentes efectos inhibitorios sobre parásitos u otros blancos [245,246].

a) Liposomas vacíos (LV)



b) Liposomas cargados (LC-PtL4)

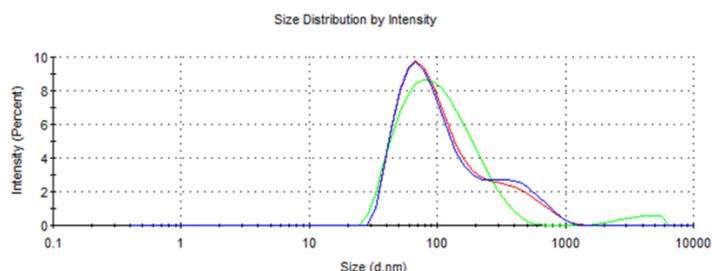


Figura 6.6: Distribución de tamaño de partícula de las suspensiones de liposomas vacíos y cargados con el compuesto PtL4.

Los valores de potencial Zeta (ZP) de los LV muestran una carga superficial levemente negativa, cercana a la neutralidad. Esto concuerda con el uso de un fosfolípido como la fosfatidilcolina, de carga neutra. Al incorporar el compuesto al sistema, la carga aumenta ligeramente, resultando efectivamente neutra. El ZP es también un parámetro muy importante en cuanto a propiedades del sistema nanométrico, ya que influye directamente sobre la estabilidad, farmacocinética, eficiencia de encapsulación, liberación del fármaco e incluso sobre la potencial captación por el sistema inmune. Nanopartículas con carga superficial negativa o positiva ( $> \pm 30$  mV) tienden a ser más estables en el tiempo, debido a que la repulsión entre las cargas evita agregación de las mismas [247].

Con el objetivo de evaluar la estabilidad del sistema a corto plazo, se hicieron medidas de tamaño, PDI y ZP de las suspensiones preparadas durante 3 días (tabla 6.3)

Tabla 6.3: Caracterización fisicoquímica de los liposomas cargados con PtL4.

	Liposomas vacíos (LV)			Liposomas cargados (LC-PtL4)		
	Dh (nm) <sup>1</sup> ±D.S.	PDI <sup>2</sup> ±D.S.	ZP (mV) <sup>3</sup> ±D.S.	Dh (nm) <sup>1</sup> ±D.S.	PDI <sup>2</sup> ±D.S.	ZP (mV) <sup>3</sup> ±D.S.
Día 1	105 ± 2	0,33 ± 0,03	(-)5,8 ± 0,4	88,6 ± 0,4	0,272 ± 0,006	0,6 ± 0,1
Día 2	104,3 ± 0,3	0,276 ± 0,007	(-)4,16 ± 0,2	87,3 ± 0,7	0,246 ± 0,006	2,7 ± 0,1
Día 3	103,0 ± 0,6	0,276 ± 0,004	(-)5,7 ± 0,4	88,3 ± 0,9	0,28 ± 0,02	1,8 ± 0,2

<sup>1</sup> Diámetro hidrodinámico promedio a 25°C  
<sup>2</sup> Índice de polidispersidad a 25°C  
<sup>3</sup> Potencial Z a 25°C

Se observa que tanto los valores de tamaño para los LV como para los LC-PtL4 no varían considerablemente en el período de estudio. Por otro lado, los valores de PDI de los LV disminuyen y se mantienen, indicando estabilización del sistema en el tiempo, donde la carga también se mantiene. En el caso de los LC-PtL4, en general se mantiene tanto el PDI como la carga. Estos resultados indican que los sistemas son estables por al menos 72 horas, tiempo suficiente para realizar ensayos *in vitro* [105,209]. Sin embargo, es recomendable estudiar la estabilidad durante períodos de tiempo mayores.

### 6.3.1.2 Eficiencia de encapsulamiento (EE)

La eficiencia de encapsulación de los LC-PtL4 se determinó a través de medidas de espectrometría de absorción atómica (AA) del sobrenadante luego de haber separado los liposomas por centrifugación, según se informó en el capítulo 2. Para la síntesis descrita se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento del  $99,96 \pm 0,01\%$ . Este resultado indica que existe gran afinidad entre el compuesto seleccionado, que se caracteriza por ser de los más lipofílicos de su familia, y el sistema liposomal, lo que sugiere que este tipo de sistemas puede admitir una cantidad de compuesto mayor a la encapsulada.

### 6.3.1.3 Perfil de liberación

Un punto esencial en la evaluación de sistemas encapsulantes es la velocidad a la que el fármaco es liberado del sistema. Las pruebas de disolución/liberación generalmente se utilizan no solo en

el control de calidad de la formulación de fármacos, sino también para predecir el comportamiento *in vivo* y para estudiar el comportamiento de la matriz encapsulante en el medio [248]. En este caso, para la determinación del perfil de liberación se colocó un volumen definido de suspensión LC-PtL4 en una membrana de diálisis de 2 kD, que a su vez se sumergió en un volumen determinado de medio de liberación (medio de cultivo, en este caso). La membrana permite el paso de compuesto liberado del sistema, pero no de los liposomas. Se determinó la cantidad de compuesto liberado al medio de cultivo por espectrometría de absorción atómica de Pt. En la figura 6.7 se muestra el perfil de liberación del compuesto PtL4 de la formulación LC-PtL4.

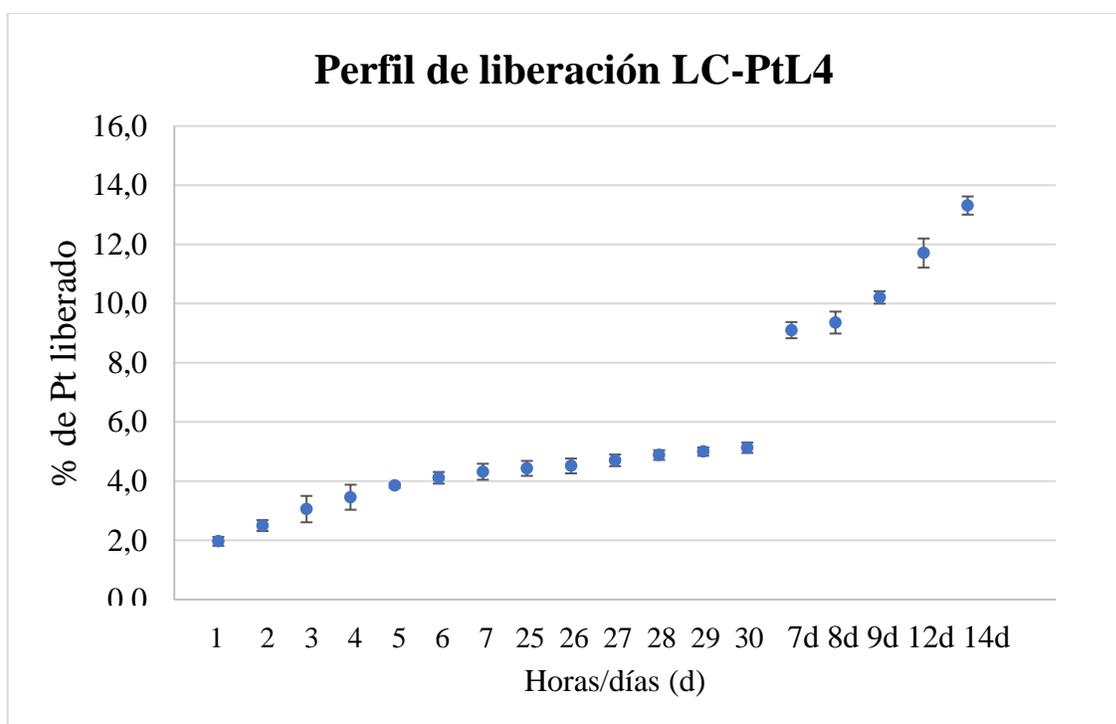


Figura 6.7: Perfil de liberación del compuesto PtL4 de la formulación LC-PtL4.

Se observa en la gráfica que a medida que transcurre el tiempo, el porcentaje de Pt determinado en el medio de cultivo aumenta de acuerdo a lo esperado. A su vez, se observa que durante las 30 primeras horas el porcentaje de Pt en el medio se mantiene constante y que finalmente, luego de una semana, el porcentaje liberado aumenta de forma más pronunciada. Esto da la pauta de que la liberación del compuesto se da de forma lenta. Sin embargo, el porcentaje de Pt(II) liberado es bastante bajo (un máximo de 13 %). Una posible explicación a este comportamiento es la gran afinidad del compuesto por el sistema y, por otro lado, la poca cantidad de compuesto

en relación a la cantidad de PC (solo 16 mg de compuesto/ 600 mg PC), lo que lleva a pensar que en solución se establece un equilibrio en donde no se ve favorecida la liberación del compuesto.

#### 6.3.1.4 Evaluación biológica

Las suspensiones de LV y LC-PtL4 se evaluaron de forma preliminar frente a la forma infectiva de *T. brucei*, con la intención de evaluar el efecto de los nanosistemas sobre la actividad biológica, respecto a la actividad del compuesto libre. La selección de las concentraciones a evaluar se hizo en base al valor del IC<sub>50</sub> determinado para el compuesto libre frente a *T. b.*-GFP (0,14 μM). Se consideró un rango que va desde una concentración 5 veces mayor al IC<sub>50</sub> hasta una 5 veces menor. La evaluación se realizó en las dos líneas celulares utilizadas en este Trabajo de Tesis. En la tabla 6.4 se muestran los resultados de la evaluación.

Tabla 6.4: Actividad *in vitro* del compuesto PtL4, los liposomas vacíos (LV) y cargados (LC-Pt4) frente a dos formas celulares de *T. brucei*

Sistema	Concentración (μM)	% Viabilidad	
		<i>T. b.</i> -GFP	<i>T. b.</i> -LUC
PtL4	0,7 (5x IC <sub>50</sub> )	17 ± 3	13 ± 3
	0,14 (IC <sub>50</sub> )	59 ± 8	102 ± 7
	0,028 (1/5x)	49 ± 5	92 ± 1
LV	0,7*	74 ± 4	113 ± 11
	0,14*	79 ± 8	120 ± 6
	0,028*	70 ± 7	126 ± 7
LC-PtL4	0,7	1,6 ± 0,2	5,0 ± 0,6
	0,14	89 ± 5	119 ± 8
	0,028	80 ± 11	97 ± 15

\*Volumen de suspensión de LV equivalente al utilizado para obtener la concentración final de PtL4 correspondiente en LC-PtL4

En primer lugar, se observa que para el compuesto libre a medida que aumenta la concentración, disminuye el porcentaje de parásitos vivos, de acuerdo a lo esperado. A su vez, el porcentaje de viabilidad al evaluar el compuesto PtL4 a la concentración IC<sub>50</sub> se encuentra dentro de valores esperados. Además, se observa que a esa misma concentración el compuesto no ejerce ningún

efecto sobre la viabilidad celular de *T. b.*-LUC, corroborando que no existe correlación entre los resultados obtenidos al evaluar a PtL4 frente a líneas celulares diferentes, como se había mencionado anteriormente.

Por otro lado, se observa que los LV ejercen el mismo efecto en ambas líneas celulares, independientemente de la concentración. En el caso de *T. b.*-GFP, el control utilizado en el ensayo ejerció un efecto inusual sobre los parásitos, lo que ocasionó una viabilidad < 100%. Este resultado indicaría que la disminución en la viabilidad se debe a una condición de susceptibilidad en los parásitos y no por la presencia de los LV, lo que se podría traducir como que los LV no ejercen efecto alguno sobre la viabilidad de los parásitos.

Finalmente, para el caso de LC-PtL4, a la concentración equivalente al IC<sub>50</sub> del compuesto libre no se observa un porcentaje de viabilidad del 50 %, sino mayor. Eso quiere decir que a una concentración equivalente al IC<sub>50</sub>, la formulación es menos citotóxica que el compuesto libre, lo que podría interpretarse como una disminución de la potencia. Sin embargo, al evaluar la formulación a una concentración mayor (5x IC<sub>50</sub>) se observa el efecto contrario; se da una clara disminución de la viabilidad celular en ambas líneas celulares respecto al compuesto libre, por lo que se evidencia un efecto favorable en la actividad del compuesto en presencia del sistema liposomal.

Una limitación importante que presenta este sistema es la imposibilidad de trabajar con rangos amplios de volúmenes de muestra que permitan obtener curvas de dosis-respuesta en todo el rango (de 0 - 100% de parásitos vivos), debido a limitaciones en el diseño del ensayo biológico en sí mismo, el cual solo permite el uso aproximado de 2 µL de muestra/pocillo. De esta manera, se restringen las posibilidades de obtener valores de IC<sub>50</sub>. Por esta razón se planteó sintetizar un nuevo sistema que permitiera encapsular mayor cantidad de compuesto, de manera de trabajar con mayor concentración de compuesto encapsulado y volúmenes más pequeños. Estas pruebas se realizaron, pero los resultados no fueron los esperados, obteniéndose sistemas con tamaños promedio de 800 nm y PDI cercanos a la unidad, por lo que los estudios con este tipo de sistemas no se continuaron.

Otra limitación se relaciona con el mantenimiento de los materiales con los que se sintetizan los liposomas, particularmente el cuidado de la fosfatidilcolina de soja. Al ser un lípido con

insaturaciones tiende a sufrir oxidación, por lo que debe almacenarse bajo condiciones específicas de temperatura, aislada de la luz, entre otras consideraciones.

### 6.3.2 Sistemas poliméricos

En la búsqueda de nuevos sistemas encapsulantes del compuesto PtL4 cuya síntesis contemplara el fácil manejo/almacenamiento de los materiales, se trabajó con polímeros biodegradables comerciales, particularmente el ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA.

#### 6.3.2.1 Síntesis y caracterización

La síntesis de estos sistemas se realizó mediante la técnica de nanoprecipitación, empleada para el encapsulamiento de compuestos hidrófobos solubles en solventes orgánicos miscibles con agua. Esta técnica consiste en agregar una solución de compuesto y polímero encapsulante (disueltos en un solvente orgánico) a una solución acuosa de tensioactivos mediante goteo [145]. Para ajustar las condiciones de síntesis se realizaron pruebas con diferentes tensioactivos con valores variados de HLB. Esta propiedad, conocida como equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB, *hydrophilic-lipophilic balance* en inglés), categoriza a los surfactantes de acuerdo a su grado de lipofiliidad o hidrofiliidad, determinado por los porcentajes de pesos moleculares de las porciones hidrofílicas y lipofílicas de una molécula de surfactante. Un valor de HLB de 0 corresponde a una molécula completamente hidrófoba y un valor de 20 corresponde a una molécula completamente hidrófila [249]. Esta definición se ha ido reformulando con el tiempo, por lo que el rango definido se ha ampliado [250].

Inicialmente se probaron tres surfactantes que abarcaran un rango amplio de valores de HLB (HLB Tween® 80 = 15, HLB Pluronic® F127 = 22, HLB Pluronic® F188 = 28) [251]. Se seleccionó el tensioactivo que permitiera obtener una suspensión estable en el tiempo (sin presencia o con poca presencia de agregados visibles). En este caso el surfactante más adecuado resultó el Tween® 80, con el que se observó menor cantidad de agregados. Finalmente, se realizó una prueba con Tween® 60, cuyo resultado fue una suspensión sin agregados visibles. Posteriormente, se hicieron síntesis por triplicado con este surfactante y se caracterizaron a través de medidas de tamaño promedio, potencial Z (ZP) e índice de polidispersidad (PDI) tanto para nanopartículas poliméricas cargadas con PtL4 como para nanopartículas vacías. Los valores se muestran en la tabla 6.5.

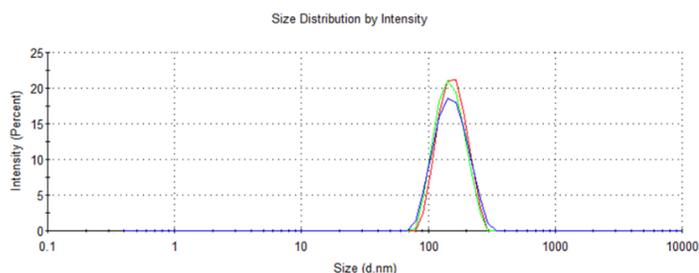
Tabla 6.5: Caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas vacías y cargadas con PtL4.

		<b>Dh (nm)<sup>1</sup></b> <b>(±D.S.)</b>	<b>PDI<sup>2</sup></b> <b>(±D.S.)</b>	<b>ZP (mV)<sup>3</sup></b> <b>(±D.S.)</b>
	NP vacías (NPv)	162 ± 4	0,24 ± 0,03	(-)22,1 ± 0,6
NP cargadas con PtL4 (NP-PtL4)	1	180 ± 3	0,24 ± 0,05	(-)3,9 ± 0,3
	2	175 ± 2	0,20 ± 0,06	(-)3,7 ± 0,2
	3	187 ± 7	0,23 ± 0,05	(-)6,9 ± 0,2

<sup>1</sup> Diámetro hidrodinámico promedio a 25°C  
<sup>2</sup> Índice de polidispersidad a 25°C  
<sup>3</sup> Potencial Z a 25°C

Los resultados indican que el diámetro hidrodinámico obtenido para las NPv se acerca a los 160 nm, mientras que al estar cargadas de compuesto su tamaño aumenta un poco más de un 10 %. Estos tamaños son mayores a los obtenidos con el sistema liposomal descrito anteriormente. Los valores de PDI tanto para las NPv como para NP-PtL4 son similares, considerándose formulaciones monodispersas, como se muestra en la figura 6.8.

a) NP vacías (NPv)



b) NP cargadas (NP-PtL4)

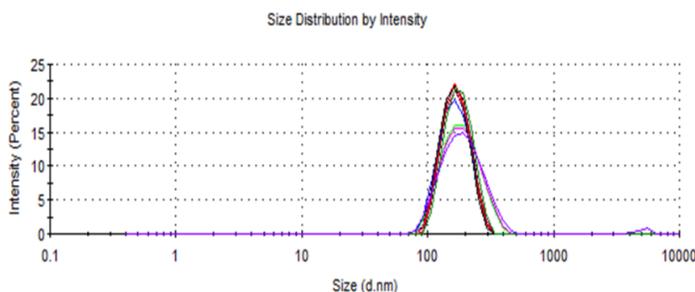


Figura 6.8: Distribución de tamaño de partícula de las suspensiones de NPv y NPc-PtL4.

Por otro lado, se observó un cambio importante en la carga superficial de las partículas al pasar de partículas vacías a partículas cargadas con el compuesto. Para las NPv se observó una carga superficial marcadamente negativa de acuerdo a lo esperado, ya que el PLGA utilizado cuenta con grupo carboxílicos terminales que en el medio de síntesis se encuentran deprotonados, confiriéndole una carga neta negativa al polímero [252]. Para las NP-PtL4 se observó una carga superficial más cercana a la neutralidad, lo que sugiere que el compuesto neutraliza la carga superficial del PLGA.

### 6.3.2.2 Medición del tamaño de partículas por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Como se mencionó en el capítulo 2, esta técnica permite obtener medidas de alta resolución de tamaño de nanopartículas y a su vez permite determinar la concentración de partículas por unidad de volumen, dando un valor preciso que no es posible obtener por el resto de las técnicas utilizadas en este Trabajo. En la tabla 6.6 se muestran los resultados obtenidos tanto para sistemas cargados con PtL4 como para sistemas vacíos.

Tabla 6.6: Caracterización fisicoquímica de NP cargadas con PtL4 (NP-PtL4).

		<b>Dh (nm)<sup>1</sup></b> <b>(±D.S.)</b>	<b>Concentración</b> <b>(partículas/mL) (±D.S.)</b>
	NP vacías (NPv)	145,9 ± 6,3	8,97 ± 0,18 x 10 <sup>12</sup>
NP cargadas con PtL4 (NP-PtL4)	1	140,8 ± 2,9	1,15 ± 0,09 x 10 <sup>13</sup>
	2	131,7 ± 5,2	9,31 ± 0,50 x 10 <sup>12</sup>
	3	143,6 ± 3,9	9,58 ± 0,8 x 10 <sup>12</sup>
<sup>1</sup> Diámetro hidrodinámico promedio a 25°C			

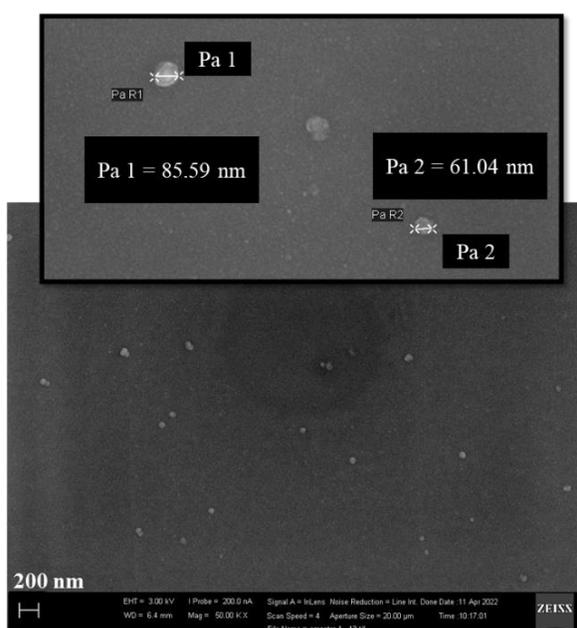
Los resultados muestran que en general el tamaño de partícula determinado a través de esta técnica para los sistemas sintetizados es menor que el determinado a través de DLS. A su vez, la diferencia de tamaño entre las NPv y las NP-PtL4 no es tan marcada como en el caso de las medidas por DLS. Esto es debido a la mayor resolución que permite alcanzar esta técnica. De la tabla se puede observar que los tamaños de partícula de ambas formulaciones (vacías y cargadas) son similares. Esta misma similitud se observa en cuanto a los valores de concentración de

partículas: se encuentran dentro del mismo orden tanto para las NPv como para las NP-PtL4. Estos resultados son complementarios a los obtenidos por DLS.

### 6.3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de estudiar los sistemas en estado sólido, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 6.9 se muestran las imágenes obtenidas de los sistemas NPv y NP-PtL4.

#### NPv



#### NP-PtL4

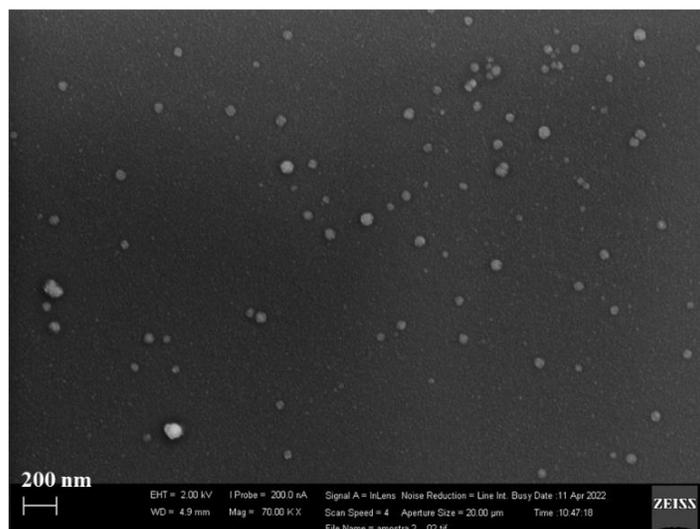


Figura 6.9: Imágenes de SEM de los sistemas cargados con PtL4 (NP-PtL4) y sistemas vacíos (NPv).

En las imágenes de SEM se encontraron nanopartículas esféricas de NPv entre 60 – 85 nm y para las NP-PtL4 se encontraron partículas de tamaño muy similar, lo que se ajusta a los resultados obtenidos por NTA. Estos resultados también muestran que el tamaño determinado a través de esta técnica es menor que el tamaño determinado por DLS. Esto concuerda con lo esperado, ya que el tamaño medido por DLS es el diámetro hidrodinámico, que se define como el tamaño de una esfera rígida hipotética que se disemina del mismo modo que la partícula que se mide [243]. Es decir, se considera un radio total que involucra una porción del solvente y del tensoactivo, por lo que es esperable que los tamaños determinados por DLS sean mayores que los

determinados al estado sólido. Lamentablemente, debido a la preparación de una muestra muy diluida, no fue posible obtener imágenes de mejor calidad que permitieran extraer mayor información sobre los sistemas.

#### 6.3.2.4 Eficiencia de encapsulamiento (EE)

Para el cálculo de la eficiencia de encapsulamiento se determinó la cantidad de compuesto no encapsulado en el sobrenadante luego de una separación de las nanopartículas por centrifugación, según se describe en el capítulo 2. Los resultados de eficiencia de encapsulación se muestran en la tabla 6.7 por triplicado.

Tabla 6.7: Eficiencia de encapsulación del compuesto PtL4 en los sistemas NP-PtL4

Muestra	% EE <sup>a</sup>	% EE Prom (±D.S.)
1	47,3	44,2 ± 3,9 %
2	45,5	
3	30,8	
<sup>a</sup> : eficiencia de encapsulamiento		

Los resultados muestran que la eficiencia de encapsulamiento para el sistema NP-PtL4 sintetizado es de aproximadamente 44 %, menor que para los sistemas liposomales mencionados anteriormente. Este resultado podría explicarse por la composición de los distintos sistemas. Como se mencionó anteriormente, los liposomas están compuestos por fosfolípidos y colesterol, sustancias bastante lipofílicas a las cuales el compuesto seleccionado es más afín. Por otro lado, el sistema polimérico utilizado está compuesto de dímeros cíclicos del ácido glicólico y el ácido láctico en una proporción 50:50, es decir, la porción con carácter más lipofílico (el fragmento láctico) no es mayoritaria. Ésta, entre otras variables, afecta la eficiencia de encapsulación de compuestos hidrófobos [144].

6.3.2.5 Estabilidad de los nanosistemas

La evaluación de la estabilidad de las suspensiones se realizó a través de medidas de tamaño promedio, ZP y PDI tanto para sistemas cargados con PtL4 como para sistemas vacíos (figura 6.10).

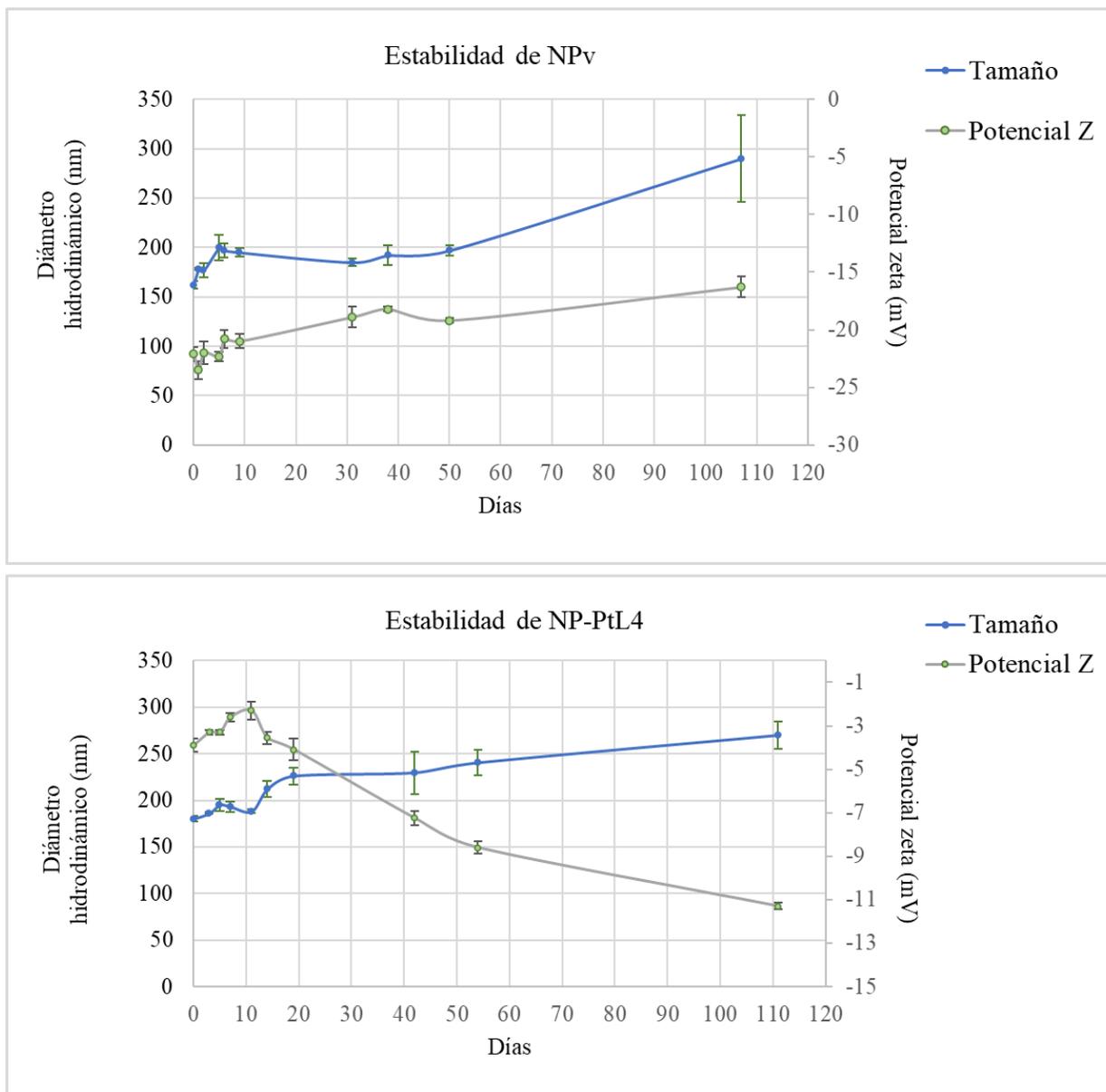


Figura 6.10: Variación del tamaño y ZP para sistemas cargados con PtL4 (NP-PtL4) y para sistemas vacíos (NPv).

Se observa que en el caso de las NPv los valores de tamaño muestran un ligero aumento en los primeros 10 días (160 a 195 nm) y luego se mantiene constante hasta cerca de dos meses (aprox. 60 días), para finalmente mostrar un aumento marcado hacia el final de la evaluación (290 nm a los 110 días). En el caso de las NP-PtL4, se observa básicamente el mismo comportamiento: un aumento inicial de tamaño (180 a 220 nm) para luego mantenerse constante y finalmente mostrar un aumento considerable de tamaño hacia el final (270 nm). El aumento de tamaño inicial de los sistemas está relacionado con la absorción de agua por parte de la matriz polimérica, lo que se conoce como “hinchamiento” [253]. Por otro lado, es bien conocido que el PLGA 50:50 exhibe una degradación por hidrólisis más rápida que otras formas de PLGA con proporciones diferentes (aproximadamente dos meses) [254]. Sin embargo, dado el perfil de las curvas de estabilidad de ambas suspensiones, se podría pensar que los sistemas no sufren este tipo de degradación en el período de estudio, ya que se esperaría encontrar poblaciones de partículas con tamaños más pequeños que los iniciales.

Respecto al ZP, se observan tendencias distintas. Las NPv muestran un ligero descenso en su carga superficial (de -22 mV a -19 mV) en los primeros 30 días para luego mantenerse durante el tiempo de análisis. Por otro lado, las NP-PtL4 presentan la misma tendencia en los primeros días para luego mostrar un aumento marcado en su carga superficial (de -2 mV a -11 mV). Este comportamiento podría deberse a una liberación de forma prolongada del compuesto PtL4 del sistema encapsulante, por lo que la carga superficial se haría más negativa a medida que se libera el compuesto, alcanzando valores de ZP más parecidos a las NP vacías.

### 6.3.2.6 Perfil de liberación

Para la determinación del perfil de liberación de este sistema se realizaron una serie de estudios previos, de forma de ajustar condiciones que permitan diseñar un sistema de liberación adecuado para la formulación desarrollada. En primer lugar, se seleccionó como medio de liberación buffer PBS pH 7,4, ya que simula condiciones fisiológicas. Sin embargo, el compuesto seleccionado es muy poco soluble en medio acuoso. Con el fin de obtener un medio de liberación donde el compuesto efectivamente se disperse (y no precipite), se optó por agregar el agente tensoactivo lauril sulfato de sodio (LSS). El agregado de este tipo de aditivos al sistema de liberación es bastante difundido para sistemas encapsulantes de compuestos hidrófobos, ya que además de

“acelerar” la liberación del compuesto (que sería muy lenta para compuestos hidrófobos en medio completamente acuoso), toma en consideración la gran cantidad de moléculas tensioactivas que existen en el cuerpo humano. Es recomendado que el porcentaje en peso de este surfactante sea menor al 1%, ya que a concentraciones mayores puede desintegrar las nanopartículas y liberar completamente el compuesto encapsulado, obteniendo perfiles de liberación completamente modificados [144].

Tabla 6.8: Solubilidad de PtL4 en PBS con concentraciones de LSS entre 0,25 y 1,00 % m/v.

	<b>Peso PtL4 (mg)</b>	<b>Abs medida</b>	<b>Solubilidad PtL4 (mg/mL)</b>	<b>1/3 solubilidad (mg/mL)</b>
<b>0,75 %LSS</b>	1,03	0,791	0,1578	0,053
<b>0,5 %LSS</b>	1,02	0,683	0,1358	0,045
<b>0,25 %LSS</b>	1,03	0,438	0,086	0,028
<b>0,1 %LSS</b>	1,02	0,239	0,045	0,015

Se simularon condiciones fisiológicas (agitación continua y 37 °C) y se testearon concentraciones entre 0 – 0,75 % LSS en presencia del compuesto libre. Se determinó por UV-Vis la solubilidad de PtL4 en los medios y se determinó que el medio de liberación más adecuado fue buffer PBS pH 7,4 con 0,5% LSS (tabla 6.8). A dicha concentración de LSS se disuelve una cantidad de compuesto (0,1358 mg PtL4/mL) que, en función de los volúmenes de trabajo seleccionados, permite realizar el ensayo de liberación en condiciones *sink* o de “no saturación”; es decir, la cantidad de compuesto disuelto corresponde a una concentración aproximada de 1/3 de la solubilidad máxima de dicho compuesto en el medio de liberación seleccionado. Trabajar en condiciones de “no saturación” es importante, ya que de lo contrario la liberación dependería de las condiciones del ensayo y no describiría las propiedades intrínsecas del sistema de liberación [255].

Posteriormente se evaluó la estabilidad del compuesto PtL4 en el medio de liberación seleccionado. Para esto se preparó una solución de concentración conocida en el medio y se registró su espectro UV-Vis a distintos tiempos hasta 24 h. Se observa en la figura 6.11 que el espectro UV-Vis del compuesto se mantiene invariable en el tiempo de estudio, manteniendo la

forma y mismo número de bandas de absorción, lo que indica que efectivamente el compuesto es estable en el medio de liberación seleccionado durante 24 h.

Debido a que el medio de liberación seleccionado no coincide con el solvente donde se evaluó la eficiencia de encapsulación, se preparó una nueva curva de calibración que permitiera cuantificar la cantidad de compuesto liberada al medio (capítulo 2). Finalmente, se realizó el ensayo para la determinación del perfil de liberación del compuesto por triplicado (figura 6.12).

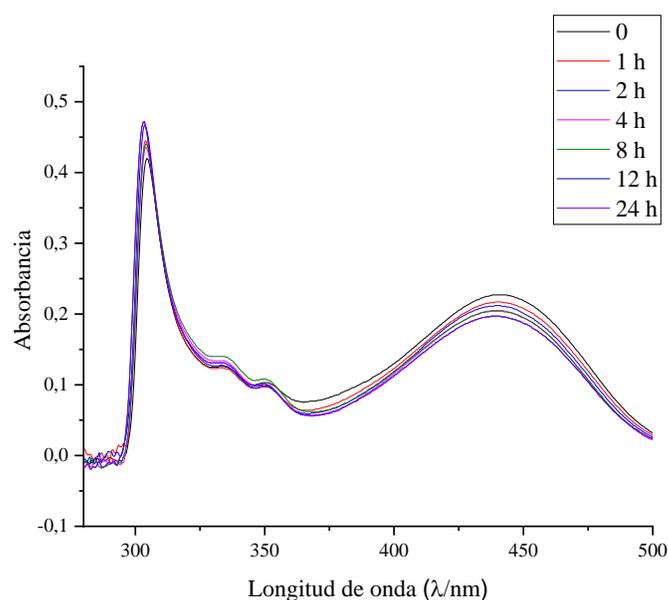


Figura 6.11: Espectros de absorción UV-Vis del compuesto PtL4 en el medio de liberación seleccionado.

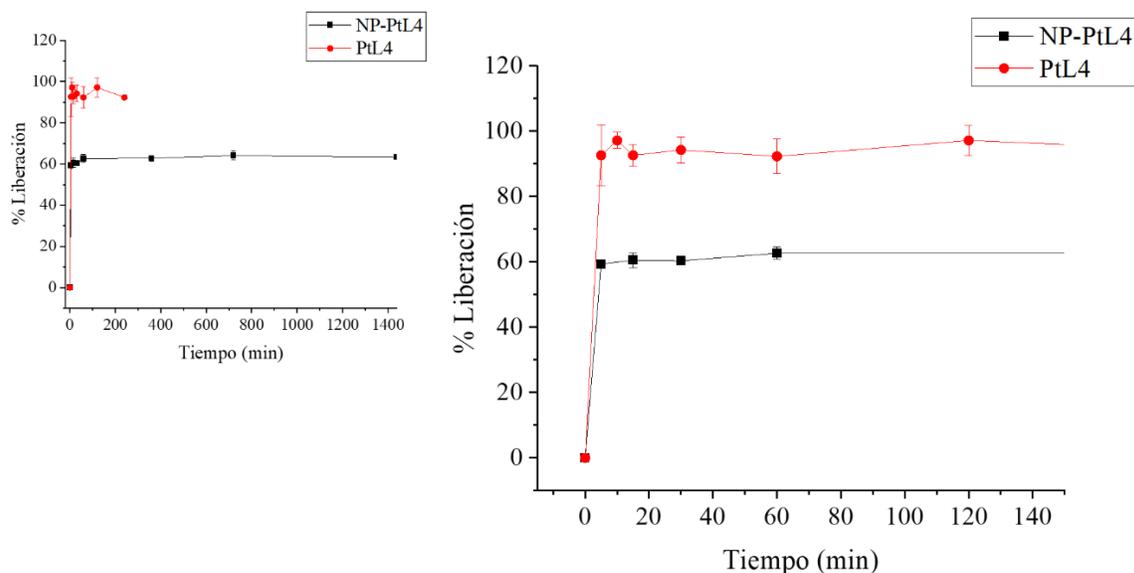


Figura 6.12: Perfil de liberación del compuesto PtL4 del sistema NP-PtL4 (ampliación a la derecha).

Se observa en la figura 6.12 que en los primeros minutos del ensayo ocurre la dispersión total de la cantidad de compuesto libre colocada (curva roja), que es equivalente a la colocada en las NP-PtL4. Esta curva representa el 100% de la cantidad de compuesto que se espera liberar; la inclusión de esta muestra en el ensayo permite asegurar que todo el compuesto colocado tiene la capacidad de dispersarse completamente en el medio (confirmación de condiciones *sink*). Por otro lado, se observa que en los primeros minutos ocurre una rápida dispersión del compuesto en el caso de la formulación NP-PtL4 (curva negra); esto corresponde a la dispersión de PtL4 que no logró encapsularse (aprox. un 60%, ya que  $\% EE_{NPc-PtL4} = 44,2 \pm 3,9\%$ ). Se aprecia que luego de la dispersión inicial, el porcentaje de compuesto en solución se mantiene constante durante el tiempo de análisis, lo que muestra que no se alcanza una liberación del 100 % en ese lapso de tiempo.

Este resultado por sí mismo no muestra un perfil de liberación completo para un sistema de liberación prolongada. Sin embargo, en conjunto con los resultados de la estabilidad del sistema, que se evaluó en un periodo de tiempo mucho más amplio, se podría pensar que la liberación del compuesto encapsulado sucede luego de un período aproximado de un mes. De igual forma, debe considerarse que el medio de liberación seleccionado y el medio en el cual se evaluó la estabilidad del sistema no es exactamente el mismo, lo que podría generar diferencias en los resultados.

### 6.3.2.7 Evaluación biológica

Las suspensiones de NPv y NP-PtL4 se evaluaron frente a la forma infectiva de *T. brucei* con la intención de evaluar el efecto de la encapsulación sobre la actividad biológica respecto a la actividad del compuesto libre. En la tabla 6.9 se muestran los resultados de la evaluación frente a la forma infectiva de *T. brucei*. Como se mencionó anteriormente, el ensayo biológico en el que se evalúa la actividad citotóxica de los sistemas frente a los parásitos solo permite el uso de volúmenes pequeños de muestra, por lo que se tiene la misma limitación que en el caso de la evaluación de los sistemas liposomales. Por esta razón, solo se evaluaron pocos valores de concentración. A pesar de esto, se obtuvieron valores de viabilidad en todo el rango para las NP-PtL4.

En primer lugar, se observa que las NPv, a una concentración equivalente a 0,7 y 0,14  $\mu\text{M}$ , (recordando que el  $\text{IC}_{50\text{PtL4}} = 0,14 \mu\text{M}$ ) no ejercen efecto alguno sobre la viabilidad de los parásitos. Por otro lado, para las NP-PtL4 se observa un efecto en la viabilidad de *T. brucei* dependiente de la concentración. Por ejemplo, a una concentración de 0,7  $\mu\text{M}$  se observa una disminución de la viabilidad celular del 93% respecto a las NPv. Con los valores mostrados en la tabla 6.9 fue posible calcular un  $\text{IC}_{50 \text{ NPc-PtL4}} = 0,43 \pm 0,06 \mu\text{M}$ .

Tabla 6.9: Actividad *in vitro* de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-PtL4) frente a la forma infectiva de *T. brucei* (*T.b.-LUC*)

Sistema	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	% Viabilidad
		<i>T. b.-LUC</i>
NPv	0,7*	100 $\pm$ 6
	0,14*	100 $\pm$ 5
NP-PtL4	0,7	7 $\pm$ 1
	0,42	57 $\pm$ 9
	0,28	84 $\pm$ 3
	0,14	121 $\pm$ 18
PtL4	0,5	40 $\pm$ 2

\*Volumen de suspensión de NP equivalente al utilizado para obtener la concentración final de PtL4 correspondiente en NP-PtL4

Es importante mencionar que el valor de referencia de IC<sub>50</sub> que se ha usado a lo largo de este capítulo ha sido del resultado de la evaluación frente a la línea celular *T.b.*-GFP y no frente a la línea *T.b.*-LUC (esta última se intentó obtener, pero no fue posible obtener valores de viabilidad en todo el rango). El valor que se pudo obtener de referencia en *T.b.*-LUC se muestra al final de la tabla 6.9, donde a una concentración de 0,5 µM de PtL4 se tuvo un valor de viabilidad del 40%. Esto da la pauta de que *T.b.*-GFP es más sensible a PtL4 que *T.b.*-LUC (se precisa menor concentración de compuesto para generar un efecto mayor). Por otro lado, al comparar esta actividad aproximada del compuesto libre con el valor de IC<sub>50</sub> calculado para NP-PtL4 se podría decir que tienen un efecto comparable sobre la línea celular *T.b.*-LUC.

Las suspensiones de NPv y NP-PtL4 también fueron evaluadas frente a macrófagos murinos, con la intención de evaluar el efecto de la encapsulación sobre un modelo de células mamíferas sanas (tabla 6.10). De los valores de esta tabla se observa que tanto las NPv como las NP-PtL4 ejercen gran efecto sobre la viabilidad de los macrófagos murinos, es decir, el efecto citotóxico mostrado no se debe necesariamente a la presencia del compuesto, a diferencia de lo observado frente a los parásitos. En ninguno de los casos se logró evaluar una concentración que causara la muerte del 50% de los macrófagos, por lo que es más complicado en este caso sugerir un valor con el cual comparar el valor de IC<sub>50</sub> calculado para NP-PtL4 frente a *T. brucei*. De esta evaluación solo se puede sugerir un aproximado de índice de selectividad entre 5,8 – 0,2 si se define el índice de selectividad de forma similar a como se ha definido anteriormente:  $IS = \frac{IC_{50 J774}}{IC_{50 NPc-PtL4}}$ , el cual es bajo en comparación al obtenido por compuestos libres en capítulos anteriores.

Tabla 6.10: Actividad *in vitro* de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-PtL4) frente a macrófagos murinos (línea celular J774).

		<b>% Viabilidad</b>
<b>Sistema</b>	<b>Concentración (µM)</b>	<b>Macrófagos murinos (J774)</b>
NPv	10*	0 ± 2

	5*	0,1 ± 0,4
	2,5*	26 ± 4
	1*	101 ± 2
NP-PtL4	10	0,7 ± 1
	5	0,2 ± 0,2
	2,5	3 ± 1
	0,1	106 ± 2
*Volumen de suspensión de NP equivalente al utilizado para obtener la concentración final de PtL4 correspondiente en NP-PtL4		

Posterior a estos resultados, se planteó la preparación de NPs frescas para repetir nuevamente estos ensayos biológicos. Sin embargo, tras numerosos intentos, no fue posible obtener una suspensión de nanopartículas con las mismas características fisicoquímicas ni la misma estabilidad que la obtenida en el sistema sintetizado en el IFSC-USP, Brasil.

#### 6.4 Sistemas con el compuesto RuL5

El segundo compuesto para el que se planteó desarrollar sistemas encapsulantes fue el  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L5})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{Cl})$  (código **RuL5**) (figura 6.13). Con los conocimientos adquiridos y habilidades desarrolladas en las instancias de formación relacionadas con el tema de interés en este capítulo, se desarrollaron sistemas basados en PLGA. A continuación, se expone la síntesis, caracterización y evaluación biológica preliminar de estos sistemas.

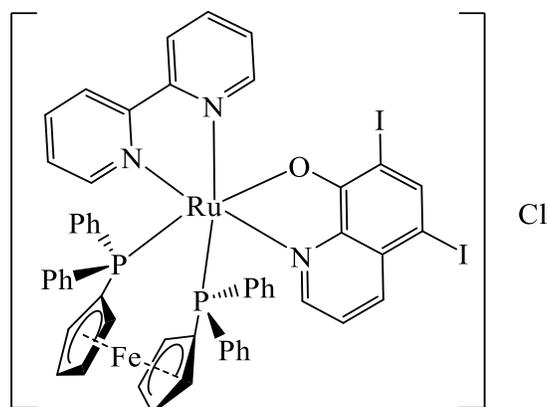


Figura 6.13: Estructura del compuesto  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L5})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{Cl})$  (código **RuL5**).

### 6.4.1 Síntesis y caracterización

Los compuestos PtL4 y RuL5 comparten algunas similitudes respecto a propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad en solventes orgánicos, lipofilia, entre otros. Por esta razón, la síntesis de estos nuevos sistemas se realizó mediante la técnica de nanoprecipitación, al igual que para los sistemas NP-PtL4 anteriormente descritos. Para ajustar las condiciones de síntesis se realizaron pruebas con diferentes formas de PLGA (50:50 y 75:25), diferentes tensoactivos (Tween 60®, Tween 80® y Pluronic® F127), distinto volumen de fase orgánica y fase acuosa y velocidad de agitación. Se seleccionaron las condiciones que permitieran obtener una suspensión estable en el tiempo.

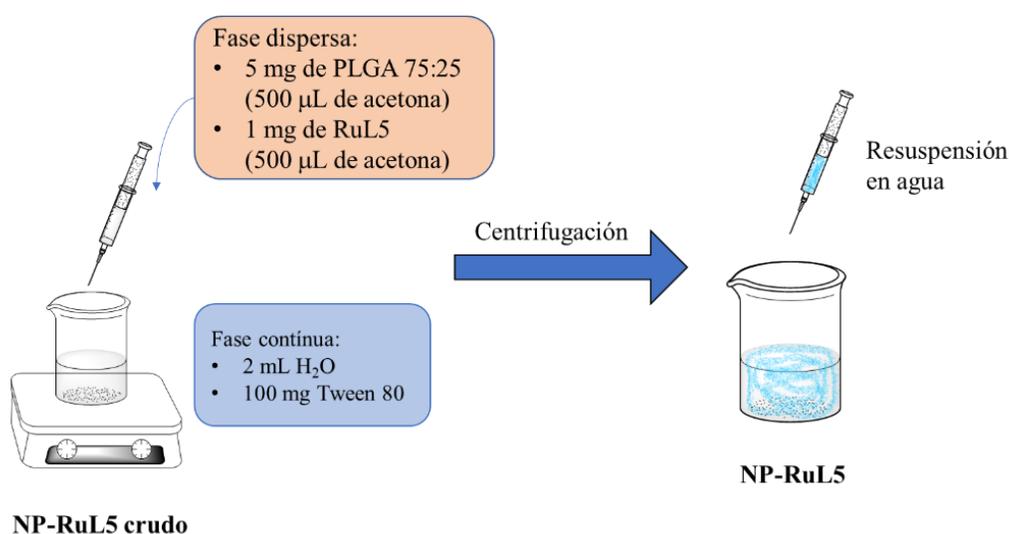


Figura 6.14: Esquema de síntesis de los sistemas NP-RuL5

Se hicieron síntesis por triplicado según lo descrito en el capítulo 2, para sistemas cargados con RuL5 y sistemas vacíos. En este caso, se separaron por centrifugación las nanopartículas luego de formarlas y se resuspendieron en agua miliQ. Esto permite estudiar el sistema sin la presencia de compuesto no encapsulado o sin exceso de surfactante (figura 6.14).

Tanto las nanopartículas antes de separar como después de separar (vacías y cargadas con RuL5) se caracterizaron a través de medidas de tamaño promedio e índice de polidispersidad. Es importante mencionar que las mediciones se realizaron en un equipo de marca y modelo distinto que los estudios con los sistemas anteriores, por lo que los resultados se expresan de manera diferente. Además, el modelo Nanoptic 90 (Bettersize), disponible en el laboratorio de Química

Inorgánica de Facultad de Química, UdelaR, utilizado para la caracterización en este caso, no permite realizar medidas de potencial Z. Los valores de la caracterización se muestran en la tabla 6.11.

Tabla 6.11: Caracterización fisicoquímica de los sistemas antes (crudo) y después de la separación por centrifugación (sistemas vacíos y cargados con RuL5)

	<b>Dh<sup>1</sup> (nm) ± D.S.</b>			<b>PDI<sup>2</sup> ± D.S.</b>
	<b>D10</b>	<b>D50</b>	<b>D90</b>	
NPv crudo	95 ± 3	113 ± 4	137 ± 3	0,23 ± 0,01
NPv	93 ± 8	111 ± 10	137 ± 13	0,23 ± 0,04
NP-RuL5 crudo	164 ± 11	200 ± 12	247 ± 12	0,16 ± 0,02
NP-RuL5	154 ± 7	190 ± 8	233 ± 12	0,15 ± 0,06
1 Dh expresado en función del valor D50				
2 Índice de polidispersidad a 25°C				

En este caso, los resultados de tamaño se expresan en función de los valores de D10, D50 y D90 (diámetro equivalente de las partículas con porcentajes acumulados del 10 %, 50 % y 90 %, respectivamente). Los valores de la tabla 6.11 se representan de forma más gráfica en la figura 6.15. Al comparar los sistemas vacíos y cargados con compuesto se observa una clara diferencia en tamaño. Por otro lado, se evidencia que la resuspensión de la muestra luego de la centrifugación no afecta considerablemente el tamaño de las nanopartículas.

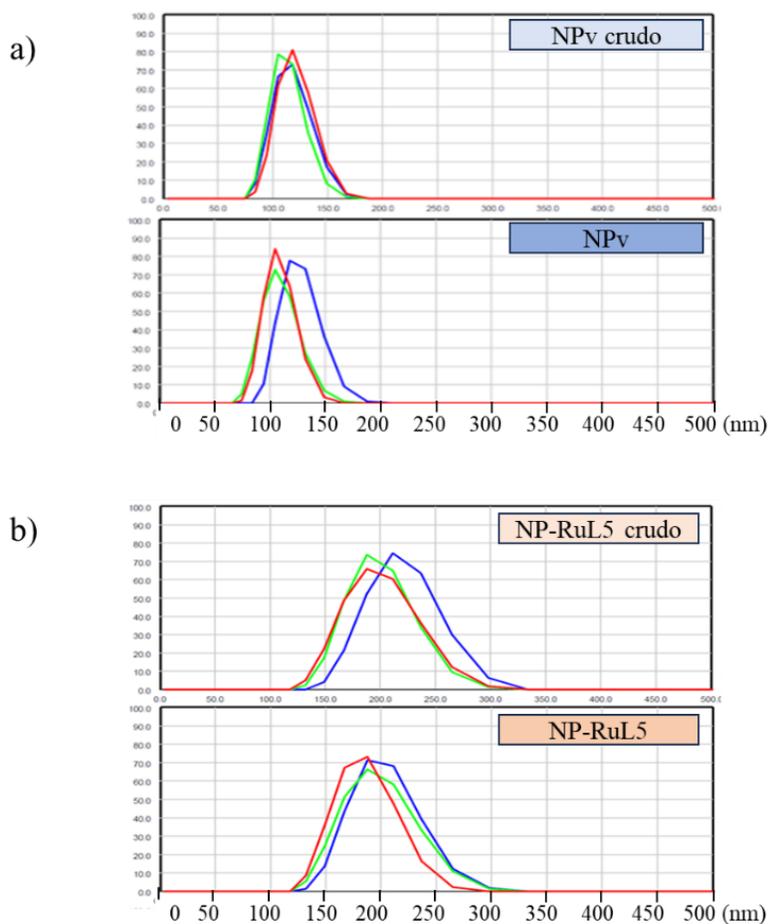


Figura 6.15: Distribución de tamaño para a) muestra sin compuesto antes de centrifugar (NPv-crudo) y después de centrifugar (NPv); b) muestra cargada con RuL5 antes de centrifugar (NP-RuL5 crudo) y después de centrifugar (NP-RuL5).

#### 6.4.2 Eficiencia de encapsulamiento (EE)

Para el cálculo de la eficiencia de encapsulamiento se determinó la cantidad de compuesto no encapsulado en el sobrenadante mediante espectrofotometría UV-Vis, haciendo uso de una curva de calibración descrita en el capítulo 2. Los resultados de eficiencia de encapsulación de muestras en la tabla 6.12 por triplicado.

Tabla 6.12: Eficiencia de encapsulación del compuesto RuL5 en los sistemas NP-RuL5

<b>Muestra</b>	<b>% EE<sup>a</sup></b>	<b>% EE Prom (±D.S.)</b>
1	75,4	76,1 ± 1,5
2	77,6	
3	75,3	
<sup>a</sup> : eficiencia de encapsulamiento		

Los resultados muestran que la eficiencia de encapsulamiento para el sistema NP-RuL5 es de aproximadamente 76%, mayor que para los sistemas poliméricos con el compuesto PtL4. Este resultado podría explicarse en parte por la composición del PLGA seleccionado. El PLGA 75:25 posee fragmentos de ácido láctico en mayor proporción que los fragmentos de ácido glicólico, es decir, la porción con carácter más lipofílico en este caso es mayoritaria. Esto propicia que el porcentaje de encapsulamiento de compuestos hidrófobos como RuL5 sea mayor [144].

#### 6.4.3 Estabilidad de los nanosistemas

La evaluación de la estabilidad de los sistemas se realizó a través de medidas de tamaño promedio y PDI para NP-RuL5. En la figura 6.16 se muestra el tamaño de partícula registrado inmediatamente tras resuspender las nanopartículas y tras tres semanas. Se observa que con el paso del tiempo el sistema reduce ligeramente su tamaño (figura 6.16b). Este comportamiento podría estar de acuerdo con la liberación de compuesto, lo cual haría que el tamaño de partícula se reduzca a medida que se libera.

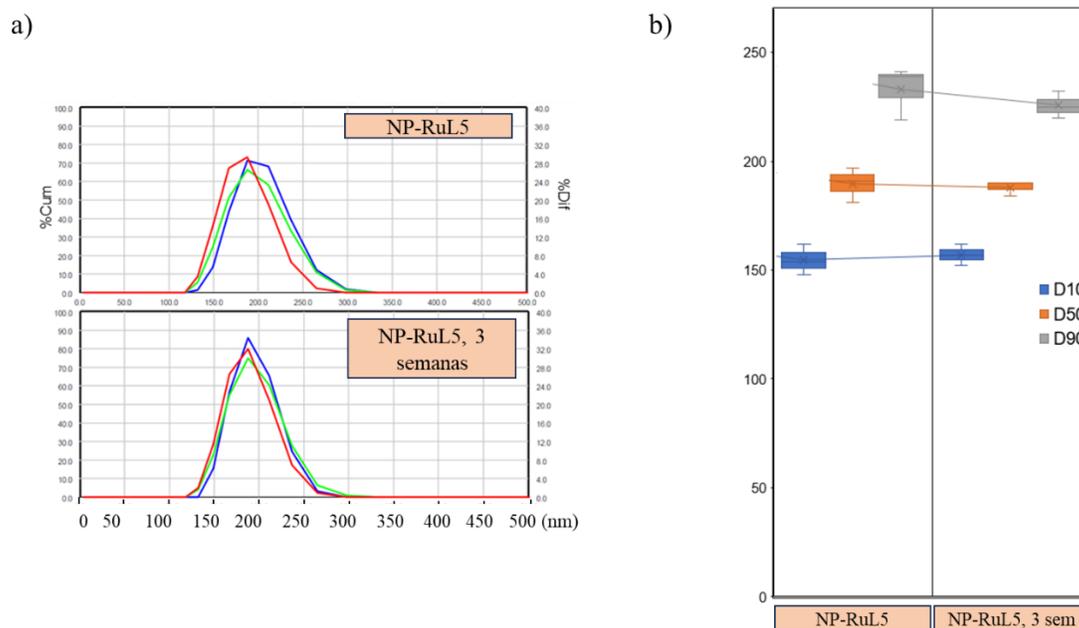


Figura 6.16: a) Distribución de tamaño para la muestra NP-RuL5 a  $t = 0$  y a las 3 semanas; (b) valores de D10, D50 y D90 para las mismas muestras.

#### 6.4.4 Perfil de liberación

Al igual que para el sistema NP-PtL4, se realizaron estudios previos para ajustar parámetros del ensayo de liberación del compuesto RuL5 del sistema NP-RuL5. Inicialmente se realizaron pruebas de solubilidad del compuesto en buffer PBS pH 7,4 con LSS entre 0 – 0,75 %. Se determinó que el medio de liberación más adecuado fue buffer PBS pH 7,4 con 0,75 % LSS, siguiendo el mismo criterio que para el sistema NP-PtL4. Posteriormente se evaluó la estabilidad del compuesto RuL5 en el medio de liberación seleccionado; para esto se preparó una solución de concentración conocida (manteniendo condiciones *sink*) y se registró su espectro UV-Vis a distintos tiempos hasta 72 h. Se observa en la figura 6.17 que el espectro UV-Vis del compuesto se mantiene invariable en el tiempo de estudio, indicando que es estable en el medio de liberación seleccionado por un período de 72 h.

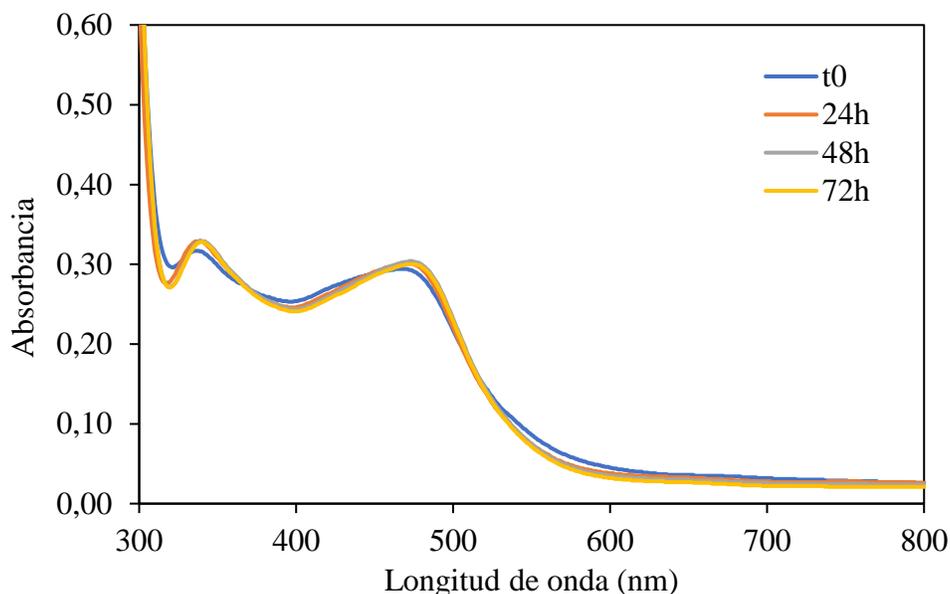


Figura 6.17: Espectros de absorción UV-Vis de RuL5 en PBS con 0,75 % m/v de LSS.

Posteriormente se preparó una curva de calibración de RuL5 en PBS con 0,75 % m/v LSS que permitiera cuantificar la cantidad de compuesto liberada al medio y se llevó a cabo el ensayo para la determinación del perfil de liberación del compuesto, cuyo resultado se muestra en la figura 6.18). Se preparó también compuesto libre en las mismas condiciones del ensayo para confirmar que se trabaja en condiciones *sink*.

Se observa que en los primeros minutos del ensayo ocurre una liberación rápida del compuesto, cercana al 80 % del RuL5 encapsulado. Esta etapa de liberación rápida inicial se conoce normalmente como “fase I” de un perfil de liberación trifásico clásico. Generalmente se describe como una liberación en ráfaga y se atribuye a partículas de fármaco adheridas en la superficie o moléculas de fármaco cercanas a la superficie que son de fácil acceso mediante hidratación. Luego de los primeros 10 minutos se observa que el porcentaje de compuesto en solución se mantiene constante durante el tiempo de análisis (72 horas). Esta etapa podría considerarse como una “fase II” del perfil de liberación, durante la cual el fármaco se difunde lentamente, ya sea a través del polímero relativamente denso o a través de los pocos poros existentes, mientras continúa la degradación y la hidratación del polímero. En el estudio realizado en este trabajo no se logró observar la “fase III”, la cual suele ser un período de liberación rápida también, asociada al inicio de la erosión del sistema [253], por lo que se podría justificar que durante el tiempo de estudio no se haya alcanzado una liberación del 100 % el compuesto.

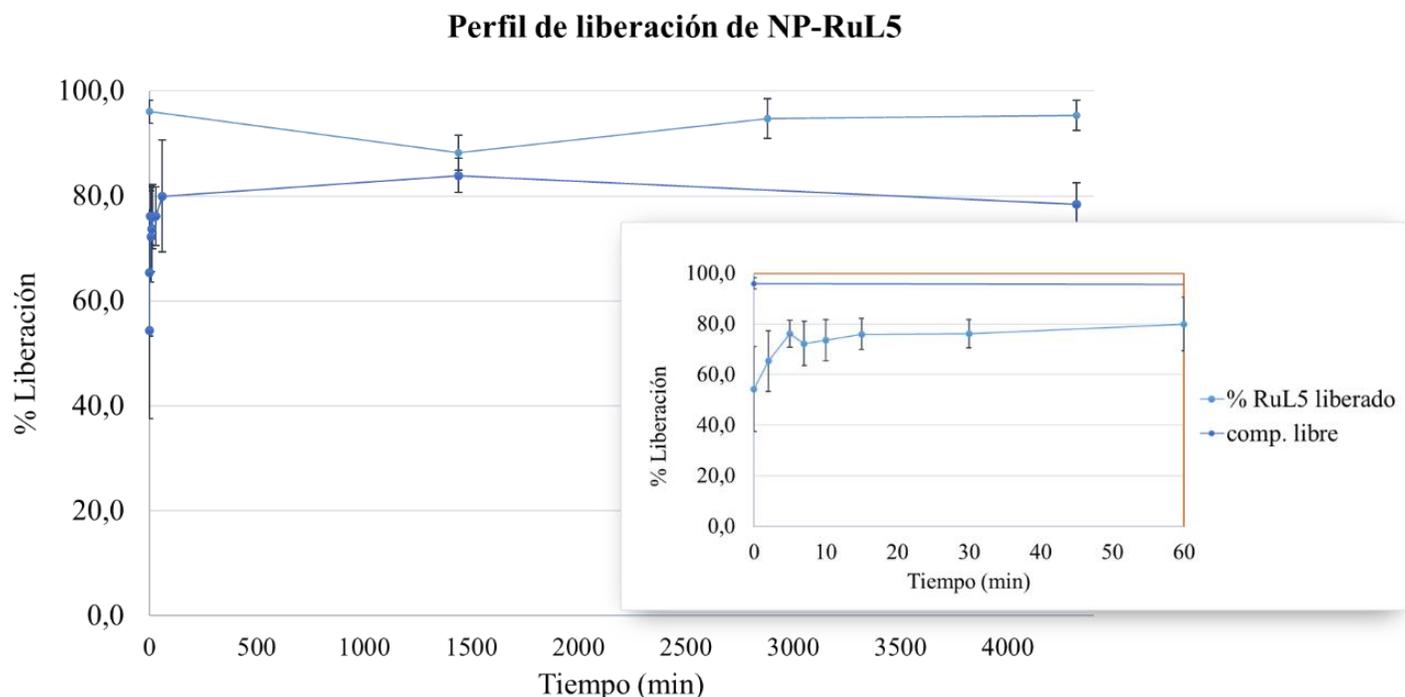


Figura 6.18: Perfil de liberación del compuesto RuL5 del sistema NP-RuL5 (ampliación a la derecha para los primeros 60 min).

#### 6.4.5 Evaluación biológica

En esta ocasión la evaluación biológica se realizó primeramente frente a macrófagos murinos, con el objetivo de determinar el volumen de suspensión de nanopartículas vacías que no generara efectos sobre la viabilidad celular del modelo de células sanas. Una vez determinado este volumen, se procedió a trabajar con volúmenes menores para la evaluación de la suspensión de las nanopartículas cargadas con RuL5 y así trabajar en rangos de concentración donde se pudieran realizar aproximaciones acerca de la selectividad de estos sistemas.

En la tabla 6.13 se muestran los resultados de la evaluación biológica de los sistemas frente a macrófagos murinos. Es importante mencionar que en el caso de este ensayo no se tiene la limitación de volumen de suspensión de NP como en el caso de los ensayos con *T. brucei* (ver detalles en el capítulo 2), por lo que se trabajó con un rango de volúmenes entre 20 – 1,68  $\mu\text{L}$  Nps/100  $\mu\text{L}$  medio, tanto para NPv como para NP-RuL5. El volumen de 1,68  $\mu\text{L}$  se seleccionó

debido a que contiene una concentración de RuL5 equivalente al IC<sub>50</sub> determinado en macrófagos murinos ( $4,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ).

Tabla 6.13: Actividad *in vitro* de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-RuL5) frente a macrófagos murinos (línea celular J774).

	<b>Vol Np/100 μL medio</b>	<b>Concentración (μM)</b>	<b>% Viabilidad (J774)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
NPv	20	-	19,7 ± 0,9	24,0 ± 2,5
	10	-	49 ± 6	
	5	-	99 ± 3	
	2,5	-	112 ± 1	
	1,68 (IC <sub>50</sub> )	-	110 ± 11	
NP-RuL5	20	57,805	20,5 ± 0,6	9,7 ± 1,3
	10	28,902	19,7 ± 0,4	
	5	14,451	25,7 ± 0,9	
	2,5	7,226	90 ± 3	
	1,678 (IC <sub>50</sub> )	4,877 (IC <sub>50</sub> )	99 ± 3	
IC <sub>50</sub> RuL5 = $4,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$				

De los valores de la tabla se observa en primer lugar que las NPv generan un efecto sobre la viabilidad de los macrófagos murinos dependiente de la concentración. Solo a volúmenes iguales o menores a 5 μL no se ve afectada la viabilidad de las células. Con los valores de viabilidad obtenidos fue posible calcular un valor de IC<sub>50</sub> para las NPv de  $24,0 \pm 2,5 \mu\text{M}$ . En segundo lugar, se observa que las NP-RuL5 también ejercen un efecto dependiente de la concentración; se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de  $9,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ , lo que indica que el sistema cargado con compuesto afecta la viabilidad en mayor medida que las NPv. Se observa también que en general las NP en una concentración equivalente al IC<sub>50</sub> del compuesto libre no afectan la viabilidad de los macrófagos, por lo que la formulación polimérica cargada de compuesto es menos citotóxica que el compuesto libre, es decir, se reduce la toxicidad del compuesto al estar soportado en el sistema polimérico.

Posterior a este estudio, se procedió a la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas frente a *T. brucei*. Considerando que se desea evaluar la selectividad de los sistemas de la misma forma que se determinó para los compuestos desarrollados en este Trabajo de Tesis, se trabajó con volúmenes de suspensión de NP  $\leq 5 \mu\text{L}$  Nps/100 uL de medio. Además, como ya se ha mencionado, el ensayo con parásitos limita el uso de volúmenes entre 2-5  $\mu\text{L}$ , siendo 2,2  $\mu\text{L}$  el volumen usado en los ensayos con compuestos libres. Los resultados de esta evaluación se muestran en la tabla 6.14.

Tabla 6.14: Actividad *in vitro* de las nanopartículas vacías (NPv) y cargadas (NP-RuL5) frente a *T. brucei*-LUC

Volumen de NP	Concentración aprox. RuL5 ( $\mu\text{M}$ )	% Viabilidad <i>T. brucei</i> -LUC
2,2 $\mu\text{L}$ NPv	-	99,44 $\pm$ 0,05
2,2 $\mu\text{L}$ NP-RuL5	0,795	5 $\pm$ 1
4,4 $\mu\text{L}$ NPv	-	17 $\pm$ 5
4,4 $\mu\text{L}$ NP-RuL5	1,59	0,3 $\pm$ 1,5

De la tabla se observa que usando volúmenes de 2,2  $\mu\text{L}$  de NP se genera una diferencia en la viabilidad pronunciada: las NPv no tienen efecto sobre los parásitos, mientras que las NP-RuL5 redujeron la viabilidad de los mismos en un 95%. Al colocar el doble del volumen en el caso de las NPv se aprecia que la viabilidad disminuye de forma pronunciada en un 82 %; en estas condiciones las NP-RuL5 eliminaron completamente a los parásitos, de acuerdo a lo esperado.

Los resultados obtenidos solo permiten hacer comparaciones aproximadas en cuanto a la selectividad de las formulaciones, ya que no fue posible calcular valores de  $\text{IC}_{50}$  frente a los parásitos y de esa forma calcular índices de selectividad según:  $\text{IS} = \text{IC}_{50 \text{ J774}} / \text{IC}_{50 \text{ T.brucei}}$ . De la tabla 6.14 se puede decir que el potencial valor de  $\text{IC}_{50}$  para NP-RuL5 frente a *T. brucei* es menor de 0,795  $\mu\text{M}$ . Considerando que se determinó un  $\text{IC}_{50} = 9,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$  frente a macrófagos murinos, el IS sería mayor o igual a 12, indicando que los sistemas nanométricos muestran una selectividad de aceptable a buena. Por otra parte, es más complicado comparar respecto al compuesto libre, ya que RuL5-cuenta con un  $\text{IC}_{50 \text{ T.brucei}} = 0,13 \pm 0,02 \mu\text{M}$  y en este caso solo se

determinó el efecto de las formulaciones a dos concentraciones fijas. Sin embargo, se evidenció que los sistemas poliméricos reducen la citotoxicidad del compuesto libre en el modelo de células sanas y que existe un efecto claro del compuesto encapsulado en comparación con el sistema encapsulante. En suma, la encapsulación de compuestos en sistemas de este tipo se muestra como una potencial herramienta para la mejora del índice terapéutico de potenciales fármacos, ya sea por una disminución de la citotoxicidad y/o por un aumento en la potencia respecto al fármaco libre.

### 6.5 Conclusiones parciales

Se desarrollaron sistemas nanoencapsulantes para dos compuestos hit seleccionados, ambos desarrollados en el marco de este Trabajo de Tesis:  $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{L4})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L5})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{Cl})$  (código PtL4 y RuL5, respectivamente). Éstos resultaron ser los más activos y/o selectivos de las 3 familias de compuestos desarrolladas. Para el compuesto PtL4 se desarrollaron sistemas liposomales y sistemas poliméricos basados en ácido poli(láctico-co-glicólico) o PLGA, mientras que para el compuesto RuL5 se desarrollaron sistemas basados en PLGA. En general, los sistemas mostraron tamaños entre 88 – 105 nm para los liposomas y entre 110 – 200 nm para sistemas basados en PLGA, considerados todos dentro de la escala nanométrica. Las formulaciones mostraron una distribución de tamaño considerada monodispersa y valores de carga superficial (potencial Z) cercanos a la neutralidad.

La eficiencia de encapsulación de los sistemas liposomales muestra ser mayor (cerca al 100%) que para los sistemas poliméricos (40 % con PtL4 y 76 % con RuL5), lo que podría explicarse por la afinidad de los compuestos hidrófobos por matrices con características lipofílicas. Respecto a la estabilidad, los sistemas liposomales muestran estabilidad a corto plazo en términos de tamaño y carga, aunque es recomendable un estudio de estabilidad extendido en el tiempo. Los sistemas poliméricos muestran estabilidad prolongada en general, siendo el máximo tiempo estudiado 110 días. Los perfiles de liberación de los sistemas muestran aparentemente una liberación prolongada, en donde no se logró la liberación de un 100 % de la carga encapsulada en el tiempo de estudio.

En cuanto a la evaluación biológica, no fue posible obtener curva de  $\text{IC}_{50}$  de todas las formulaciones respecto a *T. brucei*, de modo de comparar con los valores obtenidos para los compuestos sin encapsular. Estas limitaciones están principalmente dadas por el diseño de los

ensayos biológicos utilizados. Las evaluaciones preliminares realizadas muestran en el caso de la formulación liposomal para el compuesto PtL4, mayor potencia anti-*T.brucei* a concentraciones de 5x IC<sub>50</sub> del compuesto libre en comparación al compuesto sin encapsular, además de verificar que los liposomas vacíos no ejercían efecto alguno sobre los parásitos. En el caso de los sistemas poliméricos con el mismo compuesto, fue posible calcular un valor de IC<sub>50</sub> en la línea celular utilizada de *T. brucei* (*T.b. LUC*). Sin embargo, este valor no es comparable con el del compuesto libre, ya que fue evaluado en una línea celular diferente. A su vez, se evidenció que los sistemas poliméricos vacíos no ejercen efecto sobre los parásitos, por lo que la actividad mostrada se debe al compuesto encapsulado en sí.

Con los sistemas poliméricos desarrollados para el compuesto RuL5 fue posible obtener valores de IC<sub>50</sub> en macrófagos murinos, tanto para la formulación sin compuesto como para la formulación con compuesto encapsulado (IC<sub>50 NP-RuL5</sub> = 9,7 ± 1,3 μM). Estos resultados muestran el efecto positivo de la encapsulación en la actividad biológica, ya que se observó que la formulación polimérica cargada de compuesto es menos citotóxica que el compuesto libre (IC<sub>50 RuL5</sub> = 4,9 ± 0,1 μM), lo que se traduce en una disminución de la citotoxicidad en células sanas al incluir al compuesto en el sistema polimérico. Finalmente, la evaluación preliminar de esta formulación frente a *T. brucei* mostró selectividad > 12 hacia el parásito, considerada de aceptable a buena.

En suma, se puede concluir que la inclusión de los compuestos en sistemas encapsulantes puede generar un efecto de disminución de la citotoxicidad en células sanas, lo que se traduce como un aumento en el índice terapéutico de los compuestos desarrollados.

Los conocimientos y experiencia adquiridos en esta nueva temática me permitirán brindar a mi grupo herramientas para avanzar en el desarrollo de sistemas nanométricos que incluyan nuevos potenciales fármacos metálicos contra parásitos tripanosomátid

Capítulo 7:  
Conclusiones y perspectivas

## 7.1 Conclusiones generales

Teniendo en cuenta los objetivos planteados, se puede llegar a las siguientes conclusiones generales:

Se desarrollaron tres nuevas familias de compuestos heterobimetálicos Fe(II)-Pd(II), Fe(II)-Pt(II) y Fe(II)-Ru(II) con ligandos bioactivos y un coligando derivado del ferroceno: **1)** los  $[M(\text{trop})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y  $[M(\text{hino})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$ ; **2)** los  $[M(\text{L})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  y **3)** los  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NN})(\text{dppf})](\text{X})$ , en donde  $M = \text{Pd(II)}$  o  $\text{Pt(II)}$ ,  $\text{HL} = \text{HL1} - \text{HL5}$  (derivados de la 8HQ),  $\text{NN} = 2,2'$ -bipiridina (bipy) o 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (tmp) y  $\text{X} = \text{PF}_6^-$  o  $\text{Cl}^-$ . Se resolvió la estructura cristalina de 12 de los 18 compuestos. Todos los complejos se caracterizaron analítica, fisicoquímica y estructuralmente de forma exhaustiva, confirmando su identidad, y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas relacionadas con la actividad biológica, como la lipofilia y la estabilidad en medio biológico.

En cuanto al estudio de la potencialidad de estos compuestos como agentes antiparasitarios, todos mostraron actividad biológica *in vitro* frente a *T. brucei* y *L. infantum*, lo que demostró la factibilidad del desarrollo de fármacos metálicos de amplio espectro contra parásitos tripanosomátidos. Al incluir estudios de citotoxicidad sobre células mamíferas modelo, se determinaron índices de selectividad hacia el parásito. A nivel general, los mejores resultados fueron los obtenidos para los compuestos de Pt(II) de la familia 2) y los compuestos de Ru (II) de la familia 3), tanto en potencia como en selectividad. Se estudiaron diferentes blancos de acción probables de los 18 complejos desarrollados. En todos los casos se sugiere al ADN como potencial blanco de acción y en algunos casos la generación de especies reactivas de oxígeno.

Varios de los compuestos desarrollados también mostraron actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* o células tumorales seleccionadas de interés del grupo que integro, lo que expande la potencialidad de los compuestos metálicos desarrollados.

Respecto a la exploración de sistemas nanométricos para el encapsulamiento de compuestos promisorios, se logró una eficiente encapsulación de los compuestos, lo que resultó en general en una disminución de la citotoxicidad en células sanas. La evaluación preliminar, aunque con limitaciones, mostró selectividad hacia los parásitos *in vitro*. El desarrollo de este trabajo, me

permitió dar los primeros pasos en una temática poco explorada como lo es la aplicación de este tipo de sistemas nanométricos en el desarrollo de formulaciones contra parásitos tripanosomátidos.

En suma, este trabajo de investigación aborda principalmente la síntesis y caracterización de compuestos heterobimetálicos con aplicaciones potenciales como fármacos antiparasitarios. Además, se destaca la potencialidad de la encapsulación en sistemas nanométricos como herramienta para reducir la citotoxicidad y mejorar la selectividad de estos compuestos en células sanas y parásitos. Estos hallazgos podrían tener un impacto significativo en el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos.

Parte del trabajo informado en esta tesis se plasmó en las publicaciones siguientes y se presentó en eventos regionales e internacionales:

- F. Rivas, A. Medeiros, E. Rodríguez Arce, M. Comini, C.M. Ribeiro, F.R. Pavan, D. Gambino, New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and Mycobacterium tuberculosis, *J. Inorg. Biochem.* 187 (2018) 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.07.013>.
- F. Rivas, A. Medeiros, M. Comini, L. Suescun, E. Rodríguez Arce, M. Martins, T. Pinheiro, F. Marques, D. Gambino, New Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells., *J. Inorg. Biochem.* 199 (2019) 110779. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110779>.
- F. Rivas, A. Medeiros, C. Quiroga, D. Benítez, M. Comini, E. Rodríguez-Arce, I. Machado, H. Cerecetto, D. Gambino, New Pd-Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt-Fe analogues, *Dalton Trans.* 50 (2021) 1651–1665. <https://doi.org/10.1039/D0DT03963B>.
- F. Rivas, C. Del Marmol, G. Scalese, L. Pérez-Díaz, I. Machado, O. Blacque, A. Medeiros, M. Comini, D. Gambino, New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*, *J. Inorg. Biochem.* 237 (2022) 112016. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112016>.

## 7.2 Perspectivas

En cuanto a las perspectivas futuras, se vislumbran varias áreas de investigación prometedoras que se derivan de este trabajo. Por un lado, la potencialidad de desarrollar nuevas familias de compuestos basadas principalmente en Pt(II) y Ru(II) utilizando los conocimientos y experiencia adquiridos podría ser el foco de futuros proyectos de investigación. Explorar nuevas familias de ligandos bioactivos o derivados de las familias seleccionadas en este trabajo, manteniendo el fragmento {M-dppf}, permitiría realizar un futuro estudio de relación estructura – actividad que englobase a todas las familias. Esto serviría como insumo para el desarrollo de nuevos compuestos con potencial actividad biológica. Tomando en cuenta los resultados informados en este Trabajo de Tesis, ya están en marcha investigaciones que involucran nuevos compuestos {Ru-dppf} con otras familias de ligandos bioactivos que han mostrado resultados muy promisorios

Por otro lado, es crucial profundizar en el diseño y caracterización de sistemas encapsulantes nanométricos para comprender aún más sus mecanismos y aplicaciones potenciales. Es fundamental abordar la caracterización de estos sistemas a través de diferentes técnicas que incluyan el estado sólido (SEM, TEM, entre otros). Además, posterior a la evaluación *in vitro* de los sistemas desarrollados, como se llevó a cabo en este estudio, se plantea la posibilidad de realizar una evaluación frente a sistemas *in vivo*. Dado que estos últimos son inherentemente más complejos, se anticipa que proporcionarán información más detallada sobre el efecto de la formulación en la actividad biológica de los compuestos desarrollados.

## Referencias bibliográficas

- [1] N. Farrell, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, Royal Society of Chemistry, 1999.
- [2] Z. Guo, P.J. Sadler, *Metals in Medicine*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 1512–1531. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990601\)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990601)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y).
- [3] C. Orvig, M.J. Abrams, *Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction*, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201–2204. <https://doi.org/10.1021/cr980419w>.
- [4] S.P. Fricker, *Metal based drugs: from serendipity to design*, *Dalton Trans.* (2007) 4903–4917. <https://doi.org/10.1039/b705551j>.
- [5] V.M. Miranda, *Medicinal inorganic chemistry: an updated review on the status of metallodrugs and prominent metallodrug candidates*, *Rev. Inorg. Chem.* 42 (2022) 29–52. <https://doi.org/10.1515/revic-2020-0030>.
- [6] D. Gambino, L. Otero, *Facing diseases caused by trypanosomatid parasites: rational design of Pd and Pt complexes with bioactive ligands*, *Front. Chem.* 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.816266>.
- [7] *Enfermedades tropicales desatendidas*, (n.d.). <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases> (accessed July 30, 2023).
- [8] D. Engels, X.-N. Zhou, *Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities*, *Infect. Dis. Poverty.* 9 (2020) 10. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-0630-9>.
- [9] Geneva: World Health Organization, *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a rationale for continued investment in tackling neglected tropical diseases 2021–2030*, (2022).
- [10] DNDi – Best science for the most neglected, (2019). <https://dndi.org/> (accessed July 31, 2023).
- [11] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renauld, E.A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D.C. Bartholomeu, B.J. Haas, A.-N. Tran, J.R. Wortman, U.C.M. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J.M. Carlton, G.C. Cerqueira, T. Creasy, A.L. Delcher, A. Djikeng, T.M. Embley, C. Hauser, A.C. Ivens, S.K. Kummerfeld, J.B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S.L. Salzberg, J. Shallom, J.C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S.E. Melville, J.E. Donelson, B. Andersson, K.D. Stuart, N. Hall, *Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa*, *Science.* 309 (2005) 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>.
- [12] A.P. Jackson, *Genome evolution in trypanosomatid parasites*, *Parasitology.* 142 (2015) S40–S56. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000894>.
- [13] S. Patterson, D.C. Jones, E.J. Shanks, J.A. Frearson, I.H. Gilbert, P.G. Wyatt, A.H. Fairlamb, *Synthesis and evaluation of 1-(1-(benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase*, *ChemMedChem.* 4 (2009) 1341–1353. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900098>.
- [14] V. Kourbeli, E. Chontzopoulou, K. Moschovou, D. Pavlos, T. Mavromoustakos, I.P. Papanastasiou, *An overview on target-based drug design against kinetoplastid protozoan infections: human african trypanosomiasis, Chagas disease and leishmaniases*, *Molecules.* 26 (2021) 4629. <https://doi.org/10.3390/molecules26154629>.

- [15] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human african trypanosomiasis, *The Lancet*. 390 (2017) 2397–2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6).
- [16] C. García-Estrada, Y. Pérez-Pertejo, B. Domínguez-Asenjo, V.N. Holanda, S. Murugesan, M. Martínez-Valladares, R. Balaña-Fouce, R.M. Reguera, Further investigations of nitroheterocyclic compounds as potential antikinoplastid drug candidates, *Biomolecules*. 13 (2023) 637. <https://doi.org/10.3390/biom13040637>.
- [17] Human African trypanosomiasis (sleeping sickness), (n.d.). <https://www.who.int/health-topics/human-african-trypanosomiasis> (accessed August 2, 2023).
- [18] A. Bhattacharya, A. Corbeil, R.L. do Monte-Neto, C. Fernandez-Prada, Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery, *Genes*. 11 (2020) 722. <https://doi.org/10.3390/genes11070722>.
- [19] M. Imran, S.A. Khan, M.K. Alshammari, A.M. Alqahtani, T.A. Alanazi, M. Kamal, T. Jawaid, M.M. Ghoneim, S. Alshehri, F. Shakeel, Discovery, development, inventions and patent review of fexinidazole: the first all-oral therapy for human african trypanosomiasis, *Pharmaceuticals*. 15 (2022) 128. <https://doi.org/10.3390/ph15020128>.
- [20] Leishmaniasis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud, (n.d.). <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis> (accessed May 30, 2023).
- [21] Leishmaniasis, (n.d.). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed May 20, 2019).
- [22] Leishmaniasis. Confirman ciclo de transmisión de enfermedad en Uruguay | Portal Universidad de la República, (n.d.). <http://www.universidad.edu.uy/prensa/renderItem/itemId/36928/refererPageId/12> (accessed May 20, 2019).
- [23] ElPais, Por primera vez se confirmó en Uruguay un caso de leishmaniasis visceral en un humano, D. EL PAIS Urug. (n.d.). <https://www.elpais.com.uy/informacion/salud/primeravez-confirmando-uruguay-caso-leishmaniasis-visceral-humano.html> (accessed May 20, 2019).
- [24] Essential Maps – LeishinfoWHO-CC55, (n.d.). <https://leishinfowho-cc55.es/essential-maps/> (accessed September 2, 2023).
- [25] Y.C. Ong, S. Roy, P.C. Andrews, G. Gasser, Metal compounds against neglected tropical diseases, *Chem. Rev.* 119 (2019) 730–796. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00338>.
- [26] N.P. Farrell, J. Williamson, D.J.M. McLaren, Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes, *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984) 961–971. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90501-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90501-X).
- [27] J. Williamson, T.J. Scott-Finnigan, Trypanocidal activity of antitumour antibodies and other metabolic inhibitors, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69 (1975) 1–2.
- [28] M.A. Fuertes, P.A. Nguewa, J. Castilla, C. Alonso, J.M. Pérez, Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 433–439. <https://doi.org/10.2174/092986708783503221>.
- [29] Z. Dorosti, M. Yousefi, S.M. Sharafi, H.Y. Darani, Mutual action of anticancer and antiparasitic drugs: are there any shared targets?, *Future Oncol. Lond. Engl.* 10 (2014) 2529–2539. <https://doi.org/10.2217/fon.14.65>.
- [30] World Health Organization, World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019, World Health Organization, 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325771> (accessed November 22, 2022).

- [31] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [32] R.J. Browning, P.J.T. Reardon, M. Parhizkar, R.B. Pedley, M. Edirisinghe, J.C. Knowles, E. Stride, Drug delivery strategies for platinum-based chemotherapy, *ACS Nano*. 11 (2017) 8560–8578. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04092>.
- [33] J. Ribas Gispert, *Coordination Chemistry*, Wiley-VCH, 2008. <https://www.wiley.com/en-us/Coordination+Chemistry-p-9783527318025> (accessed October 24, 2022).
- [34] R. Czarnomysy, D. Radomska, O.K. Szewczyk, P. Roszczenko, K. Bielawski, Platinum and palladium complexes as promising sources for antitumor treatments, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8271. <https://doi.org/10.3390/ijms22158271>.
- [35] M.J. Clarke, M. Buchbinder, A.D. Kelman, Binding of pentaammineruthenium(III) to double-helical and single-stranded DNA, *Inorganica Chim. Acta.* 27 (1978) L87–L88. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)87238-2](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)87238-2).
- [36] M.J. Clarke, B. Jansen, K.A. Marx, R. Kruger, Biochemical effects of binding  $[(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_5\text{Ru(II)}]^{2+}$  to DNA and oxidation to  $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru(III)}]^{3+}$ —DNA., *Inorganica Chim. Acta.* 124 (1986) 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)82080-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)82080-0).
- [37] E. Alessio, G. Mestroni, G. Nardin, W.M. Attia, M. Calligaris, G. Sava, S. Zorzet, Cis- and trans-dihalotetrakis(dimethyl sulfoxide)ruthenium(II) complexes ( $\text{RuX}_2(\text{DMSO})_4$ ; X = Cl, Br): synthesis, structure, and antitumor activity, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 4099–4106. <https://doi.org/10.1021/ic00296a006>.
- [38] S. Leijen, S.A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy, *Invest. New Drugs.* 33 (2015) 201–214. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>.
- [39] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013>.
- [40] G.S. Kulkarni, L. Lilge, M. Nesbitt, R.J. Dumoulin-White, A. Mandel, M.A.S. Jewett, A phase 1b clinical study of intravesical photodynamic therapy in patients with Bacillus Calmette-Guérin-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer, *Eur. Urol. Open Sci.* 41 (2022) 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.euros.2022.04.015>.
- [41] G. Shi, S. Monro, R. Hennigar, J. Colpitts, J. Fong, K. Kasimova, H. Yin, R. DeCoste, C. Spencer, L. Chamberlain, A. Mandel, L. Lilge, S.A. McFarland, Ru(II) dyads derived from  $\alpha$ -oligothiophenes: A new class of potent and versatile photosensitizers for PDT, *Coord. Chem. Rev.* 282–283 (2015) 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.012>.
- [42] W. Han Ang, P.J. Dyson, Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006 (2006) 4003–4018. <https://doi.org/10.1002/ejic.200600723>.
- [43] P. Chellan, P.J. Sadler, Enhancing the activity of drugs by conjugation to organometallic fragments, *Chem. – Eur. J.* 26 (2020) 8676–8688. <https://doi.org/10.1002/chem.201904699>.
- [44] R.J. Cox, A. Al-Fahad, Chemical mechanisms involved during the biosynthesis of tropolones, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17 (2013) 532–536. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.029>.

- [45] M. Saniewski, M. Horbowicz, S. Kanlayanarat, The biological activities of troponoids and their use in agriculture, *J. Hortic. Res.* 22 (2014) 5–19. <https://doi.org/10.2478/johr-2014-0001>.
- [46] Y. Dutt, R.P. Singh, M. Katyal, Metal complexes with tropolones, *Talanta*. 16 (1969) 1369–1382. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(69\)80179-7](https://doi.org/10.1016/0039-9140(69)80179-7).
- [47] K. Lyczko, Tropolone as anionic and neutral ligand in lead(II) and bismuth(III) complexes: Synthesis, structure, characterization and computational studies, *J. Mol. Struct.* 1127 (2017) 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.08.005>.
- [48] K. Lyczko, M. Lyczko, M. Banasiewicz, K. Wegrzynska, A. Ziółko, A. Baraniak, J.C. Dobrowolski, Thallium(I) tropolonates: synthesis, structure, spectral characteristics, and antimicrobial activity compared to lead(II) and bismuth(III) analogues, *Molecules*. 27 (2022) 183. <https://doi.org/10.3390/molecules27010183>.
- [49] L.M. Balsa, M.C. Ruiz, L. Santa Maria de la Parra, E.J. Baran, I.E. León, Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres, *J. Inorg. Biochem.* 204 (2020) 110975. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110975>.
- [50] K. Nomiya, K. Onodera, K. Tsukagoshi, K. Shimada, A. Yoshizawa, T. Itoyanagi, A. Sugie, S. Tsuruta, R. Sato, N.C. Kasuga, Syntheses, structures and antimicrobial activities of various metal complexes of hinokitiol, *Inorganica Chim. Acta*. 362 (2009) 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2008.02.061>.
- [51] K. Nomiya, A. Yoshizawa, K. Tsukagoshi, N.C. Kasuga, S. Hirakawa, J. Watanabe, Synthesis and structural characterization of silver(I), aluminium(III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.07.002>.
- [52] X. Mo, K. Chen, Z. Chen, B. Chu, D. Liu, Y. Liang, J. Xiong, Y. Yang, J. Cai, F. Liang, Antitumor activities for two Pt(II) complexes of tropolone and 8-hydroxyquinoline derivative, *Inorg. Chem.* 60 (2021) 16128–16139. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01763>.
- [53] V. Oliveri, G. Vecchio, 8-hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective, *Eur. J. Med. Chem.* 120 (2016) 252–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>.
- [54] F.L.F. Silva, W.O. Matos, G.S. Lopes, Determination of cadmium, cobalt, copper, lead, nickel and zinc contents in saline produced water from the petroleum industry by ICP OES after cloud point extraction, *Anal. Methods*. 7 (2015) 9844–9849. <https://doi.org/10.1039/C5AY01026H>.
- [55] S.M. Seyed Alizadeh Ganji, S.Z. Shafaei, N. Goudarzi, A. Azizi, Investigating the best mixture extraction systems in the separation of rare earth elements from nitric acid solution using Cyanex272, D2EHPA, and 8-Hydroxyquinoline, *Geosystem Eng.* 19 (2016) 32–38. <https://doi.org/10.1080/12269328.2015.1084243>.
- [56] H.A. Saadeh, K.A. Sweidan, M.S. Mubarak, Recent advances in the synthesis and biological activity of 8-hydroxyquinolines, *Molecules*. 25 (2020) 4321. <https://doi.org/10.3390/molecules25184321>.
- [57] J. Zhou, H. Zhang, P. Gu, J.B. Margolick, D. Yin, Y. Zhang, Cancer stem/progenitor cell active compound 8-quinolinol in combination with paclitaxel achieves an improved cure of

- breast cancer in the mouse model, *Breast Cancer Res. Treat.* 115 (2009) 269–277. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0072-8>.
- [58] S.D. Rubbo, A. Albert, M.I. Gibson, The influence of chemical constitution on anti-bacterial activity. Part V: the antibacterial action of 8-hydroxyquinoline (oxine), *Br. J. Exp. Pathol.* 31 (1950) 425–441.
- [59] S. Zhai, L. Yang, Q.C. Cui, Y. Sun, Q.P. Dou, B. Yan, Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 259–269. <https://doi.org/10.1007/s00775-009-0594-5>.
- [60] P. Leanderson, C. Tagesson, Iron bound to the lipophilic iron chelator, 8-hydroxyquinoline, causes DNA strand breakage in cultured lung cells, *Carcinogenesis*. 17 (1996) 545–550. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.3.545>.
- [61] V.F. S. Pape, N. V. May, G. Tamás Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fülöp, G. Szakács, É. A. Enyedy, Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases, *Dalton Trans.* 47 (2018) 17032–17045. <https://doi.org/10.1039/C8DT03088J>.
- [62] D. Havrylyuk, B.S. Howerton, L. Nease, S. Parkin, D.K. Heidary, E.C. Glazer, Structure-activity relationships of anticancer ruthenium(II) complexes with substituted hydroxyquinolines, *Eur. J. Med. Chem.* 156 (2018) 790–799. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.044>.
- [63] I.M. Savić-Gajić, I.M. Savić, Drug design strategies with metal-hydroxyquinoline complexes, *Expert Opin. Drug Discov.* 15 (2020) 383–390. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1702964>.
- [64] H. Sheshbaradaran, R. Baerga, J. Cobb, Method of treating pancreatic cancer, US20130090322A1, 2013. <https://patents.google.com/patent/US20130090322A1/en> (accessed August 12, 2023).
- [65] A. Bencini, V. Lippolis, 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 2096–2180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>.
- [66] M. Fernández, J. Varela, I. Correia, E. Birriel, J. Castiglioni, V. Moreno, J.C. Pessoa, H. Cerecetto, M. González, D. Gambino, A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors, *Dalton Trans.* 42 (2013) 11900–11911. <https://doi.org/10.1039/C3DT50512J>.
- [67] L. Viganor, O. Howe, P. McCarron, M. McCann, M. Devereux, The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 1280–1302. <https://doi.org/10.2174/1568026616666161003143333>.
- [68] B.-Y. Wu, L.-H. Gao, Z.-M. Duan, K.-Z. Wang, Syntheses and DNA-binding studies of two ruthenium(II) complexes containing one ancillary ligand of bpy or phen:  $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{pp}[2,3]\text{p})_2](\text{ClO}_4)_2$  and  $[\text{Ru}(\text{phen})(\text{pp}[2,3]\text{p})_2](\text{ClO}_4)_2$ , *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1685–1691. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.05.012>.
- [69] Á. Sánchez-González, N.A.G. Bandeira, I. Ortiz de Luzuriaga, F.F. Martins, S. Elleuchi, K. Jarraya, J. Lanuza, X. Lopez, M.J. Calhorda, A. Gil, New insights on the interaction of phenanthroline based ligands and metal complexes and polyoxometalates with duplex DNA and G-quadruplexes, *Molecules*. 26 (2021) 4737. <https://doi.org/10.3390/molecules26164737>.

- [70] J.A. Cowan, Metal ions in biological systems. Interactions of metal ions with nucleotides, nucleic acids, and their constituents, *J. Med. Chem.* 32 (1996) 4346–4346. <https://doi.org/10.1021/jm960473+>.
- [71] M. Fernández, E.R. Arce, C. Sarniguet, T.S. Morais, A.I. Tomaz, C.O. Azar, R. Figueroa, J. Diego Maya, A. Medeiros, M. Comini, M. Helena Garcia, L. Otero, D. Gambino, Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites, *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.018>.
- [72] M. Cipriani, J. Toloza, L. Bradford, E. Putzu, M. Vieites, E. Curbelo, A.I. Tomaz, B. Garat, J. Guerrero, J.S. Gancheff, J.D. Maya, C.O. Azar, D. Gambino, L. Otero, Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and mechanism of action of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2014 (2014) 4677–4689. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402614>.
- [73] E.R. Rodríguez A., M.F. Mosquillo, L. Pérez-Díaz, G.A. Echeverría, O.E. Piro, A. Merlino, E.L. Coitiño, C.M. Ribeiro, C.Q.F. Leite, F.R. Pavan, L. Otero, D. Gambino, Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases, *Dalton Trans.* 44 (2015) 14453–14464. <https://doi.org/10.1039/C5DT00557D>.
- [74] E. Rodríguez Arce, E. Putzu, M. Lapier, J.D. Maya, C. Olea Azar, G.A. Echeverría, O.E. Piro, A. Medeiros, F. Sardi, M. Comini, G. Risi, G. Salinas, I. Correia, J.C. Pessoa, L. Otero, D. Gambino, New heterobimetallic ferrocenyl derivatives are promising antitrypanosomal agents, *Dalton Trans.* (2019). <https://doi.org/10.1039/c9dt01317b>.
- [75] A.L. Noffke, A. Habtemariam, A.M. Pizarro, P.J. Sadler, Designing organometallic compounds for catalysis and therapy, *Chem. Commun.* 48 (2012) 5219–5246. <https://doi.org/10.1039/C2CC30678F>.
- [76] C.G. Hartinger, P.J. Dyson, Bioorganometallic chemistry--from teaching paradigms to medicinal applications, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 391–401. <https://doi.org/10.1039/b707077m>.
- [77] L.-C. Campeau, D.E. Fogg, The roles of organometallic chemistry in pharmaceutical research and development, *Organometallics.* 38 (2019) 1–2. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.8b00918>.
- [78] M. Cini, T.D. Bradshaw, S. Woodward, Using titanium complexes to defeat cancer: the view from the shoulders of titans, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 1040–1051. <https://doi.org/10.1039/C6CS00860G>.
- [79] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>.
- [80] S. Chien, T.S.A. Hor, *Ferrocenes: ligands, materials and biomolecules*, John Wiley & Sons, 2008.
- [81] M. Ravera, E. Moreno-Viguri, R. Paucar, S. Pérez-Silanes, E. Gabano, Organometallic compounds in the discovery of new agents against kinetoplastid-caused diseases, *Eur. J. Med. Chem.* 155 (2018) 459–482. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.044>.
- [82] C. Biot, Ferroquine: a new weapon in the fight against malaria, *Curr. Med. Chem. - Anti-Infect. Agents.* 3 (2004) 135–147. <https://doi.org/10.2174/1568012043354008>.
- [83] F. Dubar, T.J. Egan, B. Pradines, D. Kuter, K.K. Ncokazi, D. Forge, J.-F. Paul, C. Pierrot, H. Kalamou, J. Khalife, E. Buisine, C. Rogier, H. Vezin, I. Forfar, C. Slomianny, X. Trivelli, S. Kapishnikov, L. Leiserowitz, D. Dive, C. Biot, The antimalarial ferroquine: role of the

- metal and intramolecular hydrogen bond in activity and resistance, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 275–287. <https://doi.org/10.1021/cb100322v>.
- [84] J.S. McCarthy, T. Rückle, E. Djeriou, C. Cantalloube, D. Ter-Minassian, M. Baker, P. O'Rourke, P. Griffin, L. Marquart, R. Hooft van Huijsduijnen, J.J. Möhrle, A Phase II pilot trial to evaluate safety and efficacy of ferroquine against early *Plasmodium falciparum* in an induced blood-stage malaria infection study, *Malar. J.* 15 (2016) 469. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1511-3>.
- [85] F. Dubar, J. Khalife, J. Brocard, D. Dive, C. Biot, Ferroquine, an ingenious antimalarial drug: thoughts on the mechanism of action, *Mol. Basel Switz.* 13 (2008) 2900–2907. <https://doi.org/10.3390/molecules13112900>.
- [86] N. Chavain, H. Vezin, D. Dive, N. Touati, J.-F. Paul, E. Buisine, C. Biot, Investigation of the redox behavior of ferroquine, a new antimalarial, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 710–716. <https://doi.org/10.1021/mp800007x>.
- [87] F. Dubar, C. Slomianny, J. Khalife, D. Dive, H. Kalamou, Y. Guérardel, P. Grellier, C. Biot, The ferroquine antimalarial conundrum: redox activation and reinvasion inhibition, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 7690–7693. <https://doi.org/10.1002/anie.201303690>.
- [88] G. Marr, T. Hunt, Unsymmetrically disubstituted ferrocenes. Part VIII. Synthesis and reactivity of some 2-substituted ferrocenylphosphines, *J. Chem. Soc. C Org.* (1969) 1070–1072. <https://doi.org/10.1039/J39690001070>.
- [89] A. Togni, T. Hayashi, eds., *Ferrocenes: Homogeneous catalysis, organic synthesis, materials science*, in: *Ferrocenes*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1994: pp. 1–23. <https://doi.org/10.1002/9783527615599.fmatter>.
- [90] F. Vahedifard, K. Chakravarthy, Nanomedicine for COVID-19: the role of nanotechnology in the treatment and diagnosis of COVID-19, *Emergent Mater.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00168-8>.
- [91] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, Liposomal formulations in clinical use: an updated review, *Pharmaceutics.* 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- [92] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M.-H. Kang, J.-H. Kim, A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles, *Nanomaterials.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9121719>.
- [93] A.B.C. Santos-Valle, G.R.R. Souza, C.Q. Paes, T. Miyazaki, A.H. Silva, M.J. Altube, M.J. Morilla, E.L. Romero, T.B. Creczynski-Pasa, H. Cabral, F. Pittella, Nanomedicine strategies for addressing major needs in neglected tropical diseases, *Annu. Rev. Control.* 48 (2019) 423–441. <https://doi.org/10.1016/j.arcontrol.2019.08.001>.
- [94] L.L. Chaves, Y. Patriota, J.L. Soares-Sobrinho, A.C.C. Vieira, S.A.C. Lima, S. Reis, Drug delivery systems on leprosy therapy: moving towards eradication?, *Pharmaceutics.* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121202>.
- [95] A.E.K. Peh, Y.-S. Leo, C.S. Toh, Current and nano-diagnostic tools for dengue infection, *Front. Biosci. Sch. Ed.* 3 (2011) 806–821. <https://doi.org/10.2741/189>.
- [96] E.H. Chang, J.B. Harford, M.A.W. Eaton, P.M. Boisseau, A. Dube, R. Hayeshi, H. Swai, D.S. Lee, Nanomedicine: Past, present and future - A global perspective, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468 (2015) 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.136>.
- [97] A. Manuja, S. Kumar, N. Dilbaghi, G. Bhanjana, M. Chopra, H. Kaur, R. Kumar, B.K. Manuja, S.K. Singh, S.C. Yadav, Quinapyramine sulfate-loaded sodium alginate

- nanoparticles show enhanced trypanocidal activity, *Nanomed.* 9 (2014) 1625–1634. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.148>.
- [98] K. Prayag, D.H. Surve, A.T. Paul, S. Kumar, A.B. Jindal, Nanotechnological interventions for treatment of trypanosomiasis in humans and animals, *Drug Deliv. Transl. Res.* 10 (2020) 945–961. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00764-x>.
- [99] T.A.K. Al-Allaf, L.J. Rashaan, A.S. Abu-Surrah, R. Fawzi, M. Steimann, Chemical properties and cytotoxic activity of complexes of platinum(II) and palladium(II) containing dmsO and various anions; synthesis and structural characterization of [Pt(dmsO)<sub>2</sub>{O<sub>2</sub>(CO)2CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>}], *Transit. Met. Chem.* 23 (1998) 403–406. <https://doi.org/10.1023/A:1006942125847>.
- [100] T.A.K. Al-Allaf, H. Schmidt, K. Merzweiler, C. Wagner, D. Steinborn, Carboxylation of (DPPF)-MCl<sub>2</sub> [DPPF=1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene; M=Pt or Pd] in aqueous and non-aqueous solution: Crystal and molecular structures of [Pt(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(DPPF)] and of [PtCl(NO<sub>3</sub>)(DPPF)], *J. Organomet. Chem.* 678 (2003) 48–55. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(03\)00397-8](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(03)00397-8).
- [101] I. Bratsos, E. Alessio, M. Ringenberg, T. Rauchfuss, Ruthenium complexes, in: *Inorg. Synth.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2010: pp. 148–163. <https://doi.org/10.1002/9780470651568.ch8>.
- [102] R.C. van der Drift, J.W. Sprengers, E. Bouwman, W.P. Mul, H. Kooijman, A.L. Spek, E. Drent, Ruthenium-catalyzed isomerization of allylic alcohols: oxidation state determines resistance against diene inhibition, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2002 (2002) 2147–2155. [https://doi.org/10.1002/1099-0682\(200208\)2002:8<2147::AID-EJIC2147>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1099-0682(200208)2002:8<2147::AID-EJIC2147>3.0.CO;2-L).
- [103] T.S. Kamatchi, N. Chitrapriya, S.L.A. Kumar, J.Y. Jung, H. Puschmann, F.R. Fronczek, K. Natarajan, The effect of incorporating carboxylic acid functionalities into 2,2'-bipyridine on the biological activity of the complexes formed: synthesis, structure, DNA/protein interaction, antioxidant activity and cytotoxicity, *RSC Adv.* 7 (2017) 16428–16443. <https://doi.org/10.1039/C7RA00425G>.
- [104] F. Rivas, A. Medeiros, E. Rodríguez Arce, M. Comini, C.M. Ribeiro, F.R. Pavan, D. Gambino, New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: Evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Inorg. Biochem.* 187 (2018) 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.07.013>.
- [105] F. Rivas, A. Medeiros, M. Comini, L. Suescun, E. Rodríguez Arce, M. Martins, T. Pinheiro, F. Marques, D. Gambino, New Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells., *J. Inorg. Biochem.* 199 (2019) 110779.
- [106] F. Rivas, A. Medeiros, C. Quiroga, D. Benítez, M. Comini, E. Rodríguez-Arce, I. Machado, H. Cerecetto, D. Gambino, New Pd-Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt-Fe analogues, *Dalton Trans.* 50 (2021) 1651–1665. <https://doi.org/10.1039/D0DT03963B>.
- [107] J. Karges, F. Heinemann, M. Jakubaszek, F. Maschietto, C. Subecz, M. Dotou, R. Vinck, O. Blacque, M. Tharaud, B. Goud, E. Viñuelas Zahinos, B. Spingler, I. Ciofini, G. Gasser, Rationally designed long-wavelength absorbing Ru(II) polypyridyl complexes as photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 6578–6587. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13620>.

- [108] K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, applications in coordination, organometallic and bioinorganic chemistry*, John Wiley & Sons, 2009.
- [109] C. Giacovazzo, H.L. Monaco, G. Artioli, D. Viterbo, M. Milanesio, G. Gilli, P. Gilli, G. Zanotti, G. Ferraris, M. Catti, C. Giacovazzo, C. Giacovazzo, eds., *3 The diffraction of X-rays by crystals*, in: *Fundam. Crystallogr.*, Oxford University Press, 2011: p. 0. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199573653.003.0003>.
- [110] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. A.* 64 (2008) 112–122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
- [111] CrysAlis Pro | Rigaku Global Website, (n.d.). <https://www.rigaku.com/products/crystallography/crysalis> (accessed September 29, 2022).
- [112] G.M. Sheldrick, SHELXT - integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* 71 (2015) 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
- [113] B. Rees, L. Jenner, M. Yusupov, Bulk-solvent correction in large macromolecular structures, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61 (2005) 1299–1301. <https://doi.org/10.1107/S0907444905019591>.
- [114] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81–122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- [115] I.S. Alonso, S.G. Ruiz, D.P. Quintanilla, S.M. Zarcero, *Analisis Instrumental*, Netbiblo, 2009.
- [116] S. Keller, Y.C. Ong, Y. Lin, K. Cariou, G. Gasser, A tutorial for the assessment of the stability of organometallic complexes in biological media, *J. Organomet. Chem.* 906 (2020) 121059. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.121059>.
- [117] J. Franco, A. Medeiros, D. Benítez, K. Perelmutter, G. Serra, M.A. Comini, L. Scarone, In vitro activity and mode of action of distamycin analogues against African trypanosomes, *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 776–788. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.002>.
- [118] A.C. Donahue, M. Albitar, *Antibodies in biosensing*, in: M. Zourob (Ed.), *Recognit. Recept. Biosens.*, Springer, New York, NY, 2010: pp. 221–248. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0919-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0919-0_5).
- [119] K.D. Piatkevich, V.V. Verkhusha, Chapter 17 - Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry, in: Z. Darzynkiewicz, E. Holden, A. Orfao, W. Telford, D. Wlodkowic (Eds.), *Methods Cell Biol.*, Academic Press, 2011: pp. 431–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374912-3.00017-1>.
- [120] F. Maiwald, D. Benítez, D. Charquero, M.A. Dar, H. Erdmann, L. Preu, O. Koch, C. Hölscher, N. Loaëc, L. Meijer, M.A. Comini, C. Kunick, 9- and 11-substituted 4-azapallones are potent and selective inhibitors of African trypanosoma, *Eur. J. Med. Chem.* 83 (2014) 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.020>.
- [121] D. Benítez, E. Dibello, M. Bonilla, M.A. Comini, A simple, robust, and affordable bioluminescent assay for drug discovery against infective African trypanosomes, *Drug Dev. Res.* (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/ddr.21634>.
- [122] G. Scalese, I. Machado, I. Correia, J. Costa Pessoa, L. Bilbao, L. Pérez-Díaz, D. Gambino, Exploring oxidovanadium(IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents., *New J. Chem.* 43 (2019) 17756–17773. <https://doi.org/10.1039/C9NJ02589H>.

- [123] G. Scalese, I. Machado, G. Salinas, L. Pérez-Díaz, D. Gambino, Heteroleptic oxidovanadium(V) complexes with activity against infective and non-infective stages of *Trypanosoma cruzi*, *Molecules*. 26 (2021) 5375. <https://doi.org/10.3390/molecules26175375>.
- [124] J.-C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>.
- [125] B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sánchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, V. Moreno, A. Medeiros, M.A. Comini, L. Otero, D. Gambino, New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents, *Dalton Trans.* 41 (2012) 1534–1543. <https://doi.org/10.1039/C1DT11519G>.
- [126] M. Miyata, F.R. Pavan, D.N. Sato, L.B. Marino, M.H. Hirata, R.F. Cardoso, F.A.F. de Melo, C.F. Zanelli, C.Q.F. Leite, Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: phenotypic and genotypic methods, *Biomed. Pharmacother.* 65 (2011) 456–459. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.04.021>.
- [127] N.H. Mendes, F.A. Melo, A.C. Santos, J.R. Pandolfi, E.A. Almeida, R.F. Cardoso, H. Berghs, S. David, F.K. Johansen, L.G. Espanha, S.R. Leite, C.Q. Leite, Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil, *BMC Res. Notes*. 4 (2011) 269. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-269>.
- [128] I.C. Silva, C.R. Polaquini, L.O. Regasini, H. Ferreira, F.R. Pavan, Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid, *Food Chem. Toxicol.* 105 (2017) 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.033>.
- [129] F.R. Pavan, P.I. da S. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Deflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898–1905. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.028>.
- [130] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The MTT assay: utility, limitations, pitfalls and interpretation in bulk and single-cell analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.
- [131] C. Hansch, Comparative QSAR: understanding hydrophobic interactions, in: *Class. Three-Dimens. QSAR Agrochem.*, American Chemical Society, 1995: pp. 254–262. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0606.ch019>.
- [132] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, P. Saenz, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, C. Olea-Azar, 1,2,5-oxadiazole N-Oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure–activity relationships, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 1941–1950. <https://doi.org/10.1021/jm9805790>.
- [133] Jean-Bernard Le Pecq, Pierre Yot, Claude Paoletti, Interaction du bromhydrate d'éthidium (BEC) avec les acides nucléiques (A. N.) Étude spectrofluorimétrique., *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci.* 259 (1964) 1786.
- [134] F. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, Short protocols in molecular biology, 24 (1996) 68–68. <https://doi.org/10.1002/bmb.1996.5690240143>.
- [135] M. Vieites, P. Smircich, M. Pagano, L. Otero, F.L. Fischer, H. Terenzi, M.J. Prieto, V. Moreno, B. Garat, D. Gambino, DNA as molecular target of analogous palladium and

- platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: a comparative study, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1704–1711. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.018>.
- [136] E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros, Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species, *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 3 (2000) 3–8.
- [137] S. Krieger, W. Schwarz, M.R. Ariyanayagam, A.H. Fairlamb, R.L. Krauth-Siegel, C. Clayton, Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 542–552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01721.x>.
- [138] M. Gutscher, A.-L. Pauleau, L. Marty, T. Brach, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, A.J. Meyer, T.P. Dick, Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential, *Nat. Methods.* 5 (2008) 553.
- [139] M.A. Comini, Measurement and meaning of cellular thiol: disulfide redox status, *Free Radic. Res.* 50 (2016) 246–271. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1110241>.
- [140] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods.* 9 (2012) 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- [141] E.R. Arce, M.F. Mosquillo, L. Pérez-Díaz, G.A. Echeverría, O.E. Piro, A. Merlino, E.L. Coitiño, C.M. Ribeiro, C.Q.F. Leite, F.R. Pavan, L. Otero, D. Gambino, Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases, *Dalton Trans.* 44 (2015) 14453–14464. <https://doi.org/10.1039/C5DT00557D>.
- [142] J.S. Dua, A.C. Rana, D.A.K. Bhandari, Liposome: methods of preparation and applications, *Int. J. Pharm. Stud. Res. III* (2012) 14–20.
- [143] H. Zhang, Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation, *Methods Mol. Biol.* 1522 (2017) 17–22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2).
- [144] C. Wischke, S.P. Schwendeman, Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 298–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>.
- [145] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 471–476. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102197>.
- [146] Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) | Malvern Panalytical, (n.d.). <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis> (accessed August 20, 2023).
- [147] T. Hayashi, M. Konishi, Y. Kobori, M. Kumada, T. Higuchi, K. Hirotsu, Dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II): an effective catalyst for cross-coupling of secondary and primary alkyl Grignard and alkylzinc reagents with organic halides, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 158–163. <https://doi.org/10.1021/ja00313a032>.
- [148] A.M. Heyns, The i.r. and Raman spectra of sodium hexafluorophosphate monohydrate, NaPF<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O, *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* 33 (1977) 315–322. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(77\)80036-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(77)80036-6).
- [149] H. Junge, I.R.-Spektrum von [18O]Tropon, *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* 24 (1968) 1951–1956. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(68\)80254-5](https://doi.org/10.1016/0584-8539(68)80254-5).
- [150] B.S. Parajón-Costa, E.J. Baran, J. Romero, R. Sáez-Puche, G. Arrambide, D. Gambino, Synthesis and characterization of bistropolonato oxovanadium(IV and V) complexes, *J. Coord. Chem.* 64 (2011) 57–70. <https://doi.org/10.1080/00958972.2010.531131>.

- [151] M.C. Barret, M.F. Mahon, K.C. Molloy, J.W. Steed, P. Wright, Synthesis and Structural Characterization of Tin(II) and Zinc(II) Derivatives of Cyclic  $\alpha$ -Hydroxyketones, Including the Structures of Sn(maltol)<sub>2</sub>, Sn(tropolone)<sub>2</sub>, Zn(tropolone)<sub>2</sub>, and Zn(hinokitiol)<sub>2</sub>, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 4384–4388. <https://doi.org/10.1021/ic0100368>.
- [152] G. Girolami, X-Ray Crystallography, University Science Books, University of Illinois, 2015. <https://uscibooks.aip.org/books/x-ray-crystallography/> (accessed November 7, 2022).
- [153] Online Dictionary of Crystallography, (n.d.). [https://dictionary.iucr.org/Main\\_Page](https://dictionary.iucr.org/Main_Page) (accessed November 28, 2022).
- [154] A. Camard, Y. Ihara, F. Murata, K. Mereiter, Y. Fukuda, W. Linert, The use of solvatochromic mixed copper(II) chelates with N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine and tropolonato or hinokitiolato ligands, [Cu(trop/hino)(tmen)]B(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>, as indicator for Lewis basicity of solvents and low-coordinating anions, *Inorganica Chim. Acta.* 358 (2005) 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.08.021>.
- [155] T. Hayashi, M. Konishi, Y. Kobori, M. Kumada, T. Higuchi, K. Hirotsu, Dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II): an effective catalyst for cross-coupling of secondary and primary alkyl Grignard and alkylzinc reagents with organic halides, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 158–163. <https://doi.org/10.1021/ja00313a032>.
- [156] D.A. Clemente, G. Pilloni, B. Corain, B. Longato, M. Tiripicchio-Camellini, Chemistry of heterobimetallic metal complexes. Part I. synthesis, X-ray structure and solution chemistry of [Fe( $\eta$ 5-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PtCl<sub>2</sub>], *Inorganica Chim. Acta.* 115 (1986) L9–L11. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)87684-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)87684-7).
- [157] I.R. Butler, W.R. Cullen, T. Jeong, Kim, S.J. Rettig, James. Trotter, 1,1'-Bis(alkylarylphosphino)ferrocenes: synthesis, metal complex formation. Crystal structure of three metal complexes of Fe( $\eta$ 5-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, *Organometallics.* 4 (1985) 972–980. <https://doi.org/10.1021/om00125a003>.
- [158] P.G. Sears, G.R. Lester, L.R. Dawson, A study of the conductance behavior of some uni-univalent electrolytes in dimethyl sulfoxide at 25°, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1433–1436. <https://doi.org/10.1021/j150544a024>.
- [159] D.T. Hill, G.R. Girard, F.L. McCabe, R.K. Johnson, P.D. Stupik, J.H. Zhang, W.M. Reiff, D.S. Eggleston, [ $\mu$ -1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]bis(chlorogold): synthesis, iron-57 and gold-197 Moessbauer spectroscopy, x-ray crystal structure, and antitumor activity, *Inorg. Chem.* 28 (1989) 3529–3533. <https://doi.org/10.1021/ic00317a027>.
- [160] D. Cauzzi, C. Graiff, C. Massera, G. Predieri, A. Tiripicchio, D. Acquotti, Chelating versus bridging behaviour and NMR fluxionality of dppf in the nido clusters [M<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>(CO)<sub>7</sub>(dppf)] [M = Fe or Ru, dppf = Fe( $\eta$ 5-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]. Crystal structure of the chelated ruthenium derivative†, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1999) 3515–3521. <https://doi.org/10.1039/A904866I>.
- [161] T. Hayashi, Asymmetric catalysis with chiral ferrocenylphosphine ligands, in: A. Togni, T. Hayashi (Eds.), *Ferrocenes*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1994: pp. 105–142. <https://doi.org/10.1002/9783527615599.ch02>.
- [162] L.L. Maisela, A.M. Crouch, J. Darkwa, I.A. Guzei, Bidentate aryldichalcogenide complexes of [(diphosphino)ferrocene]palladium(II) and [(diphosphino)ferrocene]platinum(II). Synthesis, molecular structures and electrochemistry, *Polyhedron.* 20 (2001) 3189–3200. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(01\)00923-8](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(01)00923-8).
- [163] D.J. Bertelli, T.G. Andrews, P.O. Crews, Synthesis and study of pseudoaromatic compounds. X. A reevaluation of the question of aromatic character in tropone, tropolone,

- and substituted heptafulvenes based on the analysis of the nuclear magnetic resonance spectra of these and several related compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 5286–5296. <https://doi.org/10.1021/ja01047a018>.
- [164] K. Lyczko, M. Lyczko, K. Wozniak, M. Stachowicz, W.P. Oziminski, K. Kubo, Influence of pH and type of counterion on the formation of bismuth(III) complexes with tropolonato and 5-methyltropolonato ligands: Synthesis, structure, spectroscopic characterization and calculation studies, *Inorganica Chim. Acta.* 436 (2015) 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.07.011>.
- [165] M. Hojo, T. Ueda, M. Ike, K. Okamura, T. Sugiyama, M. Kobayashi, H. Nakai, Observation by UV-visible and NMR spectroscopy and theoretical confirmation of 4-isopropyltropolonate ion, 4-isopropyltropolone (Hinokitiol), and protonated 4-isopropyltropolone in acetonitrile, *J. Chem. Eng. Data.* 55 (2010) 1986–1989. <https://doi.org/10.1021/je900923c>.
- [166] D. Benítez, A. Medeiros, L. Fiestas, E.A. Panozzo-Zenere, F. Maiwald, K.C. Prousis, M. Roussaki, T. Calogeropoulou, A. Detsi, T. Jaeger, J. Šarlauskas, L.P. Mašič, C. Kunick, G.R. Labadie, L. Flohé, M.A. Comini, Identification of novel chemical scaffolds inhibiting trypanothione synthetase from pathogenic trypanosomatids, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) e0004617. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004617>.
- [167] Tuberculosis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud, (n.d.). <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis> (accessed September 10, 2023).
- [168] O. Bernal, R. López, E. Montoro, P. Avedillo, K. Westby, M. Ghidinelli, Determinantes sociales y meta de tuberculosis en los Objetivos de Desarrollo Sostenible en las Américas, *Rev. Panam. Salud Pública.* 44 (2020) e153. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.153>.
- [169] J. Secrist, S. Anathan, C. Kwong, J. Maddry, R. Reynolds, A. Poffenberger, M. Michael, L. Miller, J. Krahenbuh, L. Adams, A. Biswas, S. Franzblau, D. Rouse, D. Winfield, J. Brooks, I. Orme, Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 1943–1946. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.1943-1946.2001>.
- [170] C. Hansch, P.P. Maloney, T. Fujita, R.M. Muir, Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients, *Nature.* 194 (1962) 178–180. <https://doi.org/10.1038/194178b0>.
- [171] L. Shargel, W.P. Susanna, A.B. Yu, Chapter 10: Physiological drug distribution and protein binding, in: *Appl. Biopharm. Pharmacokinet.*, 6th ed., McGraw-Hill Medical, New York, NY, USA, 2012: p. 211.
- [172] F. Ashall, Cancer cells and parasites: two of a kind, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 518–520. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(86\)90087-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(86)90087-3).
- [173] J.E. Salcedo-Sora, E. Caamano-Gutierrez, S.A. Ward, G.A. Biagini, The proliferating cell hypothesis: a metabolic framework for Plasmodium growth and development, *Trends Parasitol.* 30 (2014) 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.001>.
- [174] S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž.D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakula, B. Petrović, New bimetallic palladium(II) and platinum(II) complexes: studies of the nucleophilic substitution reactions, interactions with CT-DNA, bovine serum albumin and cytotoxic activity, *Dalton Trans.* 45 (2016) 12444–12457. <https://doi.org/10.1039/C6DT02226J>.
- [175] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [176] A.I. Matesanz, E. Jimenez-Faraco, M.C. Ruiz, L.M. Balsa, C. Navarro-Ranninger, I.E. León, A.G. Quiroga, Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an  $\alpha$ -N-heterocyclic

- thiosemicarbazone: Cytotoxicity, solution behaviour and interaction: Versus proven models from biological media, *Inorg. Chem. Front.* 5 (2018) 73–83. <https://doi.org/10.1039/c7qi00446j>.
- [177] S. Ghosh, O. Mendoza, L. Cubo, F. Rosu, V. Gabelica, A.J.P. White, R. Vilar, Assembly of Palladium(II) and Platinum(II) Metallo-Rectangles with a Guanosine-Substituted Terpyridine and Study of Their Interactions with Quadruplex DNA, *Chem. – Eur. J.* 20 (2014) 4772–4779. <https://doi.org/10.1002/chem.201304905>.
- [178] L. Fabbri, The ferrocenium/ferrocene couple: a versatile redox switch, *ChemTexts.* 6 (2020) 22. <https://doi.org/10.1007/s40828-020-00119-6>.
- [179] M. Boiani, L. Piacenza, P. Hernández, L. Boiani, H. Cerecetto, M. González, A. Denicola, Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1736–1745. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>.
- [180] S.M. El-Megharbel, M.S. Refat, Ligational behavior of clioquinol antifungal drug towards Ag(I), Hg(II), Cr(III) and Fe(III) metal ions: Synthesis, spectroscopic, thermal, morphological and antimicrobial studies, *J. Mol. Struct.* 1085 (2015) 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.12.081>.
- [181] H.F. Aly, F.M. Abdel Kerim, A.T. Kandil, I.R. spectra of lanthanide 8-hydroxyquinoline complexes, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 33 (1971) 4340–4344. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(71\)80538-9](https://doi.org/10.1016/0022-1902(71)80538-9).
- [182] I. Potočňák, P. Vranec, Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. I: Crystal structure, spectroscopic, and thermal properties of the first row transition metal coordination compounds with clioquinol, *Monatshefte Chem.* 143 (2012) 217–226. <https://doi.org/10.1007/s00706-011-0678-0>.
- [183] M.E. Mahmoud, S.S. Haggag, T.M. Abdel-Fattah, Surface layer-by-layer chemical deposition reaction for thin film formation of nano-sized metal 8-hydroxyquinolate complexes, *Polyhedron.* 28 (2009) 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.09.030>.
- [184] Z.-F. Chen, J.-H. Wei, Y.-C. Liu, M. Liu, Y.-Q. Gu, K.-B. Huang, M. Wang, H. Liang, High antitumor activity of 5,7-dihalo-8-quinolinolato cerium complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 68 (2013) 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.007>.
- [185] K.S.O. Ferraz, D.C. Reis, J.G. Da Silva, E.M. Souza-Fagundes, E.J. Baran, H. Beraldo, Investigation on the bioactivities of clioquinol and its bismuth(III) and platinum(II,IV) complexes, *Polyhedron.* 63 (2013) 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.07.008>.
- [186] C.C. Wagner, S. Calvo, M.H. Torre, E.J. Baran, Vibrational spectra of clioquinol and its Cu(II) complex, *J. Raman Spectrosc.* 38 (n.d.) 373–376. <https://doi.org/10.1002/jrs.1654>.
- [187] C.C. Wagner, A.C. González-Baró, E.J. Baran, Vibrational spectra of the Ga(III) complexes with oxine and clioquinol, *Spectrochim. Acta - Part Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 1762–1765. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.053>.
- [188] A. Sharma, D. Singh, J.K. Makrandi, M.N. Kamalasanan, R. Shrivastva, I. Singh, Electroluminescent characteristics of OLEDs fabricated with bis(5,7-dichloro-8-hydroxyquinolinato)zinc(II) as light emitting material, *Mater. Lett.* 61 (2007) 4614–4617. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.02.078>.
- [189] Y.-M. Hu, J. Qu, Y.-L. Yi, H.-L. Gao, J.-Z. Cui, Syntheses, crystal structures, and properties of four transition metal complexes based on 5-nitro-8-hydroxyquinoline, *J. Coord. Chem.* 66 (2013) 18–27. <https://doi.org/10.1080/00958972.2012.744972>.

- [190] R.G. Charles, H. Freiser, R. Friedel, L.E. Hilliard, W.D. Johnston, Infra-red absorption spectra of metal chelates derived from 8-hydroxyquinoline, 2-methyl-8-hydroxyquinoline, and 4-methyl-8-hydroxyquinoline, *Spectrochim. Acta.* 8 (1956) 1–8. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(56\)80018-0](https://doi.org/10.1016/0371-1951(56)80018-0).
- [191] J. Kljun, I.E. León, Š. Peršič, J.F. Cadavid-Vargas, S.B. Etcheverry, W. He, Y. Bai, I. Turel, Synthesis and biological characterization of organoruthenium complexes with 8-hydroxyquinolines, *J. Inorg. Biochem.* 186 (2018) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.009>.
- [192] C. Martín Santos, S. Cabrera, C. Ríos-Luci, J.M. Padrón, I. López Solera, A.G. Quiroga, M.A. Medrano, C. Navarro-Ranninger, J. Alemán, Novel clioquinol and its analogous platinum complexes: importance, role of the halogen substitution and the hydroxyl group of the ligand, *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003. 42 (2013) 13343–13348. <https://doi.org/10.1039/c3dt51720a>.
- [193] R.W. Cahn, Twinned crystals, *Adv. Phys.* 3 (1954) 363–445. <https://doi.org/10.1080/00018735400101223>.
- [194] O. Sigouin, A.L. Beauchamp, Oxo-rhenium(V) complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives, *Can. J. Chem.* 83 (2005) 460–470. <https://doi.org/10.1139/v05-063>.
- [195] B.C. Baker, D.T. Sawyer, Proton nuclear magnetic resonance studies of 8-quinolinol and several of its metal complexes, *Anal. Chem.* 40 (1968) 1945–1951. <https://doi.org/10.1021/ac60269a012>.
- [196] S. Shahraki, A. Heidari, H.R. Mirzaei, M. Saeidifar, N. Ahmadasab, H. Mansouri-Torshizi, Synthesis, characterization, cytotoxicity, DNA binding and computational studies of an anionic palladium(II) complex derived from 8-hydroxyquinoline and 1,1-cyclobutanedicarboxylate, *J. Iran. Chem. Soc.* 15 (2018) 697–709. <https://doi.org/10.1007/s13738-017-1269-8>.
- [197] J.A. Rahn, D.J. O'Donnell, A.R. Palmer, J.H. Nelson, Solid-state distortions of nominally square-planar palladium and platinum (R<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>MX<sub>2</sub> complexes as determined by a combination of carbon-13 {proton} and phosphorus-31 {proton} NMR spectroscopy, *ACS Publ.* (1989). <https://doi.org/10.1021/ic00312a025>.
- [198] J. Flapper, H. Kooijman, M. Lutz, A.L. Spek, P.W.N.M. van Leeuwen, C.J. Elsevier, P.C.J. Kamer, Nickel and palladium complexes of new pyridine-phosphine ligands and their use in ethene oligomerization, *Organometallics.* 28 (2009) 3272–3281. <https://doi.org/10.1021/om900038u>.
- [199] Cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed September 10, 2023).
- [200] K.E. Kinnamon, E.A. Steck, D.S. Rane, Activity of antitumor drugs against african trypanosomes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 15 (1979) 157–160.
- [201] A.T. Tamio Hayashi, *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis*, Organic Synthesis, Materials Science., (1995).
- [202] D. Giardina-Papa, I. Ara, S. Ibáñez, P. Mastroilli, V. Gallo, J. Forniés, Synthesis and reactivity of phosphanido bridged 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene complexes [(RF)<sub>2</sub>Pt(μ-PPh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>M(dppf)] [M=Pt, Pd], *Polyhedron.* 120 (2016) 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.05.040>.
- [203] R.S. Chauhan, D.B. Cordes, A.M.Z. Slawin, S. Yadav, C. Dash, Reactivity of hemilabile pyridyl- and methyl-substituted pyrimidylselenolates with [MCl<sub>2</sub>(dppf)] (M = Pd, pt;

- dppf = bis(diphenylphosphino)ferrocene), *Inorganica Chim. Acta.* 478 (2018) 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.03.034>.
- [204] T.F. Gallati, A.L. Bogado, G.V. Poelhsitz, J. Ellena, E.E. Castellano, A.A. Batista, M.P. de Araujo, Heterobimetallic [Ru(II)/Fe(II)] complexes: On the formation of trans- and cis-[RuCl<sub>2</sub>(dppf)(diimines)], *J. Organomet. Chem.* 692 (2007) 5447–5452. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2007.08.038>.
- [205] P. Appelt, J.P. da Silva, O. Fuganti, L.E.N. Aquino, B. Sandrino, K. Wohnrath, V.A.Q. Santos, M.A.A. Cunha, A. Veiga, F.S. Murakami, D.F. Back, M.P. de Araujo, New heterobimetallic ruthenium (II) complexes [Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub>: Synthesis, molecular structure, electrochemistry, DFT, antioxidant and antibacterial potential, *J. Organomet. Chem.* 846 (2017) 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.07.005>.
- [206] T. Nicksch, H. Görls, M. Friedrich, R. Oilunkaniemi, R. Laitinen, W. Weigand, Synthesis and characterisation of 2,2-bis(hydroxymethyl)-1,3-diselenolato metal(II) complexes bearing various phosphanes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010 (2010) 74–94. <https://doi.org/10.1002/ejic.200900824>.
- [207] M.M. Karjalainen, W. Weigand, R. Oilunkaniemi, R.S. Laitinen, Synthesis and characterization of 1,1'-ferrocenyldichalcogenolato complexes of palladium and platinum, *Polyhedron.* 101 (2015) 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.09.014>.
- [208] J.R.L. Priqueler, I.S. Butler, F.D. Rochon, An overview of 195Pt nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Appl. Spectrosc. Rev.* 41 (2006) 185–226. <https://doi.org/10.1080/05704920600620311>.
- [209] F. Rivas, A. Medeiros, E. Rodríguez Arce, M. Comini, C.M. Ribeiro, F.R. Pavan, D. Gambino, New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Inorg. Biochem.* 187 (2018) 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.07.013>.
- [210] M.E. Chapman, L. Hu, C.F. Plato, D.E. Kohan, Bioimpedance spectroscopy for the estimation of body fluid volumes in mice, *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 299 (2010) F280–F283. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00113.2010>.
- [211] R. Brun, R. Kaminsky, Animal models of acute (first stage) sleeping sickness. *Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy*, in: *Handb. Anim. Models Infect.*, 1999: pp. 789–793.
- [212] I.P. Evans, A. Spencer, G. Wilkinson, Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 0 (1973) 204–209. <https://doi.org/10.1039/DT9730000204>.
- [213] E.A. Seddon, K.R. Seddon, eds., 8 - Ruthenium(III), in: *Top. Inorg. Gen. Chem.*, Pergamon, 1984: pp. 155–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42375-7.50016-6>.
- [214] F. Rivas, C. Del Mármol, G. Scalese, L. Pérez-Díaz, I. Machado, O. Blacque, A. Medeiros, M. Comini, D. Gambino, New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*, *J. Inorg. Biochem.* 237 (2022) 112016. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112016>.
- [215] A. Mercer, J. Trotter, Crystal and molecular structure of dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1975) 2480–2483. <https://doi.org/10.1039/DT9750002480>.
- [216] Wiley, ed., *Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science*, in: *Ferrocenes*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1994: pp. 1–23. <https://doi.org/10.1002/9783527615599.fmatter>.

- [217] J.E. Takarada, A.P.M. Guedes, R.S. Correa, E. de P. Silveira-Lacerda, S. Castelli, F. Iacovelli, V.M. Deflon, A.A. Batista, A. Desideri, Ru/Fe bimetallic complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity and study of their interactions with DNA/HSA and human topoisomerase IB, *Arch. Biochem. Biophys.* 636 (2017) 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.015>.
- [218] V. Cadierno, P. Crochet, J. Díez, S.E. García-Garrido, J. Gimeno, Efficient transfer hydrogenation of ketones catalyzed by the bis(isocyanide)–ruthenium(II) complexes trans,cis,cis-[RuX<sub>2</sub>(CNR)<sub>2</sub>(dppf)] (X = Cl, Br; dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene): Isolation of active mono- and dihydride intermediates, *Organometallics*. 23 (2004) 4836–4845. <https://doi.org/10.1021/om0400651>.
- [219] C. Ortíz, F. Moraca, M. Laverriere, A. Jordan, N. Hamilton, M.A. Comini, Glucose 6-phosphate dehydrogenase from trypanosomes: selectivity for steroids and chemical validation in bloodstream *Trypanosoma brucei*, *Molecules*. 26 (2021) 358. <https://doi.org/10.3390/molecules26020358>.
- [220] E.A. Thackaberry, Non-clinical toxicological considerations for pharmaceutical salt selection, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8 (2012) 1419–1433. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.717614>.
- [221] L. Otero, P. Smircich, M. Vieites, M. Ciganda, P.C. Severino, H. Terenzi, H. Cerecetto, D. Gambino, B. Garat, DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.08.004>.
- [222] A. Rilak Simović, R. Masnikosa, I. Bratsos, E. Alessio, Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure, *Coord. Chem. Rev.* 398 (2019) 113011. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.07.008>.
- [223] B. Valeur, M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2012.
- [224] Plasmid, *Genome.Gov.* (n.d.). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid> (accessed July 26, 2023).
- [225] P. Uma Maheswari, M. Palaniandavar, DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines – effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.09.003>.
- [226] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238-IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- [227] J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci.* 10 (2015) 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- [228] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 70 (2001) 1–20. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(00)00339-4).
- [229] S.S. Guterres, M.P. Alves, A.R. Pohlmann, Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications, *Drug Target Insights*. 2 (2007) 147–157.
- [230] M.C.I.M. Amin, A.M. Butt, M.W. Amjad, P. Kesharwani, Chapter 5 - Polymeric micelles for drug targeting and delivery, in: V. Mishra, P. Kesharwani, M.C.I. Mohd Amin, A. Iyer

- (Eds.), *Nanotechnol.-Based Approaches Target. Deliv. Drugs Genes*, Academic Press, 2017: pp. 167–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00006-3>.
- [231] Supratek Pharma Inc. Announces Agreement with the FDA for Phase III SP1049C, BioSpace. (n.d.). <https://www.biospace.com/article/supratek-pharma-inc-announces-agreement-with-the-fda-for-phase-iii-sp1049c/> (accessed May 12, 2020).
- [232] A. Pitto-Barry, N.P. E. Barry, Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances, *Polym. Chem.* 5 (2014) 3291–3297. <https://doi.org/10.1039/C4PY00039K>.
- [233] S. Sharma, A. Parmar, S. Kori, R. Sandhir, PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications, *TrAC Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.014>.
- [234] C.R. Alving, E.A. Steck, W.L. Chapman, V.B. Waits, L.D. Hendricks, G.M. Swartz, W.L. Hanson, Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome-encapsulated drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 2959–2963.
- [235] M. Owais, C.M. Gupta, Targeted drug delivery to macrophages in parasitic infections, *Curr. Drug Deliv.* 2 (2005) 311–318. <https://doi.org/10.2174/156720105774370177>.
- [236] Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010, World Health Organization, 2010. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412> (accessed May 13, 2020).
- [237] D.V.C. Mendonça, L.M.R. Lage, D.P. Lage, M.A. Chávez-Fumagalli, F. Ludolf, B.M. Roatt, D. Menezes-Souza, A.A.G. Faraco, R.O. Castilho, C.A.P. Tavares, J.M. Barichello, M.C. Duarte, E.A.F. Coelho, Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 169 (2016) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.005>.
- [238] D.V.C. Mendonça, G.S.V. Tavares, D.P. Lage, T.G. Soyer, L.M. Carvalho, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, F.M. Ottoni, L.M.R. Antinarelli, D.L. Vale, F. Ludolf, M.C. Duarte, E.S. Coimbra, M.A. Chávez-Fumagalli, B.M. Roatt, D. Menezes-Souza, J.M. Barichello, R.J. Alves, E.A.F. Coelho, In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.143>.
- [239] F.A.P. De Moraes, A. Enumo, R.S. Gonçalves, G.B. Cesar, N. Miranda, B.H. Vilsinski, R.C. da Silva, C.V. Nakamura, N. Hioka, W. Caetano, Hypericin photodynamic activity. Part III: in vitro evaluation in different nanocarriers against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 18 (2019) 487–494. <https://doi.org/10.1039/C8PP00444G>.
- [240] A. Simonazzi, C. Davies, A.G. Cid, E. Gonzo, L. Parada, J.M. Bermúdez, Preparation and characterization of poloxamer 407 solid dispersions as an alternative strategy to improve benzimidazole bioperformance, *J. Pharm. Sci.* 107 (2018) 2829–2836. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.06.027>.
- [241] J.O. Eloy, J. Saraiva, S. de Albuquerque, J.M. Marchetti, J.O. Eloy, J. Saraiva, S. de Albuquerque, J.M. Marchetti, Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate, *Braz. J. Pharm. Sci.* 51 (2015) 101–109. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000100011>.

- [242] J.L. Arias, J.D. Unciti-Broceta, J. Maceira, T. Del Castillo, J. Hernández-Quero, S. Magez, M. Soriano, J.A. García-Salcedo, Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of african trypanosomiasis, *J Control Release*. 197 (2015) 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.002>.
- [243] Dynamic Light Scattering (DLS) - Definition & Terms | Malvern Panalytical, (n.d.). <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined> (accessed August 24, 2023).
- [244] R. Gharib, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, C. Charcosset, L. Auezova, Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge, *Carbohydr. Polym.* 129 (2015) 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.048>.
- [245] Y. Sun, D. Chen, Y. Pan, W. Qu, H. Hao, X. Wang, Z. Liu, S. Xie, Nanoparticles for antiparasitic drug delivery, *Drug Deliv.* 26 (2019) 1206–1221. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1692968>.
- [246] S. Stolnik, L. Illum, S.S. Davis, Long circulating microparticulate drug carriers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.029>.
- [247] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 265–273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- [248] I. Henriksen, S.A. Sande, G. Smistad, T. Ågren, J. Karlsen, In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis, *Int. J. Pharm.* 119 (1995) 231–238. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00403-R](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00403-R).
- [249] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by “HLB,” *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 (1949) 311–26.
- [250] R.C. Pasquali, N. Sacco, C. Bregni, The studies on hydrophilic-lipophilic balance (HLB): sixty years after William C. Griffin’s pioneer work (1949-2009), *Lat. Am. J. Pharm.* 28, no. 2 (2009). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7764> (accessed August 25, 2023).
- [251] M. Sainz-Ramos, I. Villate-Beitia, I. Gallego, N. Al Qtaish, M. Menéndez, L. Lagartera, S. Grijalvo, R. Eritja, G. Puras, J.L. Pedraz, Correlation between biophysical properties of niosomes elaborated with chloroquine and different tensioactives and their transfection efficiency, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1787. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111787>.
- [252] Q.T.H. Shubhra, J. Tóth, J. Gyenis, T. Feczko, Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 122 (2014) 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.025>.
- [253] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson, The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review, *Int. J. Pharm.* 415 (2011) 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.
- [254] N. Samadi, A. Abbadessa, A. Di Stefano, C.F. van Nostrum, T. Vermonden, S. Rahimian, E.A. Teunissen, M.J. van Steenberg, M. Amidi, W.E. Hennink, The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) particles, *J. Controlled Release*. 172 (2013) 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.034>.
- [255] P. Saarinen-Savolainen, T. Järvinen, H. Taipale, A. Urtti, Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions, *Int. J. Pharm.* 159 (1997) 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00264-0).

