

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS ANÁLOGOS AL ROJO DE RUTENIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ARIADNA GARZA ORTIZ



MEXICO D.F.



2796413

1999

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

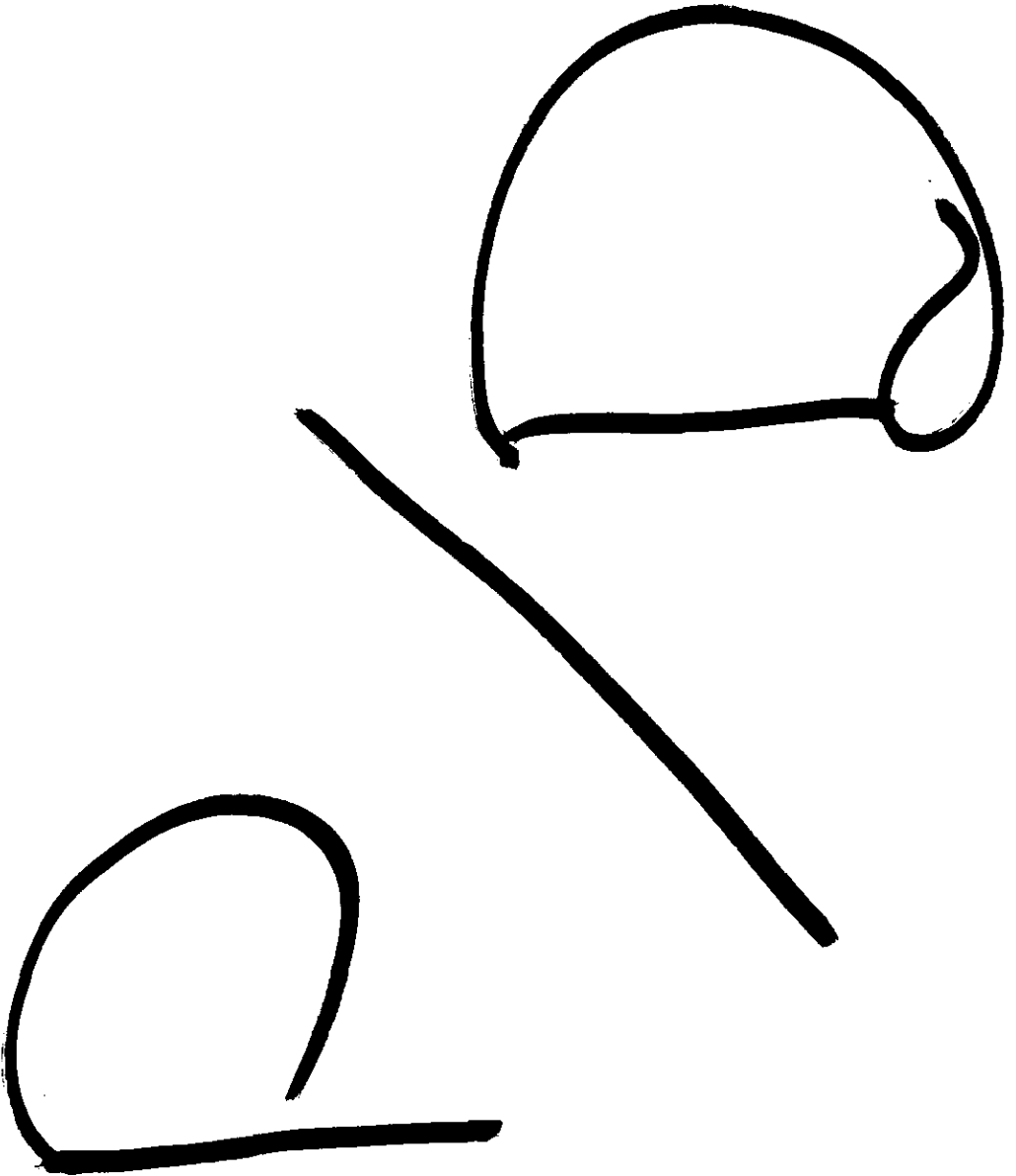


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Jurado asignado:

Presidente	Prof. BLAS LOTINA HENNSEN.
Vocal	Prof. NORAH YOLANDA BARBA BEHRENS.
Secretario	Prof. MARTHA ELENA SOSA TORRES.
1er. suplente	Prof. LAURA MARIA GASQUE SILVA.
2do. suplente	Prof. ERIKA MARTIN ARRIETA.

Sitio donde se desarrollo el tema:

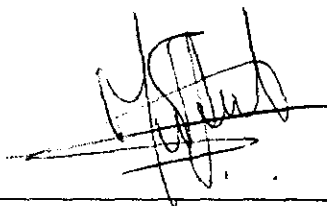
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química

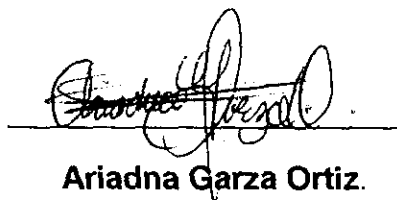
U.N.A.M.

Asesor



Dra. Martha Elena Sosa Torres

Sustentante



Ariadna Garza Ortiz.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este gran esfuerzo a las tres personas más importantes en mi vida, mi papi Jorge Garza y Franco, mi mami Cristina Ortiz y mi hermanita Cristina Garza Ortiz, quienes a cada instante me han hecho sentir la más amada hija y hermana de este planeta.

Muchas gracias papito por los innumerables desvelos a mi lado, los viajes y las esperas interminables bajo el más intenso calor, por tu apoyo, por tu confianza, por tu interminable paciencia y cariño, por ser fuerte por mí cuando la flaqueza me domino, por los sabios consejos y principalmente por tu impecable ejemplo, En lo que a mí respecta tu trabajo como padre merece mención honorífica,

Gracias mil mamita por todo tu amor, por tu fuerza, por tu paciencia, por los desvelos, por las inscripciones y entregas de libros de última hora, por los besitos y abrazos en los momentos más indicados, por hacerme ver como una persona ordenada, por tu cálida sonrisa al llegar a casa y por tu inteligencia infinita. Mi vida sin ti sería un total caos.

Muchas gracias Cris, por el apoyo, la paciencia en las incontables noches de estudio, por la tolerancia a mis caprichos, por sacarme de mi mundo a conocer nuevos horizontes, por ser mi confidente, por exponerme diferentes puntos de vista, por hacerme reír y llorar y por todas las angustias que resolviste por mí, sin la espera de nada a cambio.

Sólo me resta decir que en cada decisión que debo tomar, ustedes están en mi mente, pues mi principal objetivo en esta vida es que se sientan orgullosos de mí.

También quiero dedicar este trabajo a la Universidad Nacional Autónoma de México, distinguida por su excelente calidad profesional y por cumplir de manera relevante con su función educativa y contribución al desarrollo nacional, por darme la oportunidad de unirme a sus filas, por permitir mi superación personal y por el orgullo de ser Universitaria

También quiero dedicar este trabajo a los 19 angelitos (más los que se acumulen, ja, no es cierto papi) que Dios nos ha mandado, por su desinteresado amor, por su ejemplo de valor y por hacerme admirar cada día más a la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento sincero a la Dra. Martha E. Sosa Torres, por acogerme tan cálidamente en su grupo de investigación, por confiar en mi capacidad para el desarrollo de una de sus líneas de investigación, por su dirección, por su apoyo, por su experiencia, por su ejemplo y más que nada por su respeto y amistad.

También deseo hacer patente mi total agradecimiento a la Dra. Norah Yolanda Barba Behrens y al Dr. Blas Lotina Hensen, quienes ocuparon gran parte de su tiempo en la revisión de este trabajo, aportando muy valiosas observaciones y consejos, sin olvidar que me brindaron desinteresadamente su vasta experiencia en el campo de la ciencia y de la vida.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Al Dr. Edmundo Chávez y a la Dra. Cecilia Zazueta por su enorme contribución a este trabajo, elaborando los experimentos biológicos, por su vasta experiencia y por su sencillez y calidez.

A mi queridísima amiga la Q.F.B. M. Marcela Méndez Ortiz, por su invaluable amistad fortalecida durante los años gracias a su enorme paciencia, cariño y apoyo incondicional.

A mi entrañable amiga la I.Q. Carol Pérez Casas, por su confianza, su gran amistad y alegría.

A la Dra. Fior de María Ramírez, por su preciosa amistad, por su inaudito interés, por su total apoyo, confianza y por sus increíblemente sabios consejos. Florecita, mil gracias por darme un poco (o más bien un mucho) de tu tiempo.

A todos mis sinceros amigos, producto de mi paso por la facultad de química, por darme cabida en sus vidas.

A mis compañeros del laboratorio 212.

A la Dra. Norah Barba, al M. en C. Alberto Toxqui, al Dr. Horacio López-Sandoval y al Q. Marcos Flores Alamo por la incalculable ayuda, brindada para la obtención de los espectros mediante la técnica de reflectancia difusa y por su amistad.

A la Q. Marisela Gutiérrez del área de Infrarrojo de la USAI por la determinación de los espectros de IR.

A la Dra. Nuria y a la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales de la USAI por la determinación de los espectros de resonancia magnética nuclear.

A la Secretaría de Actualización y Superación Académica, organizadores del Subprograma 127 por el apoyo económico brindado para el desarrollo de esta tesis.

A la DGAPA de la UNAM, por el apoyo económico proporcionado a través de los proyectos IN213794 e IN107597 a cargo de la Dra. Martha E. Sosa Torres.

A todos y cada uno de los profesores que de una forma u otra han influido en mi actividad profesional y personal

Abel Gutiérrez R.
 Adelfo Escalante Lozada
 Adriana Mejía
 Aida Nava Pérez
 Alejandro Bonifaz
 Alicia B. Cervantes Peredo
 Alfredo Garzon Serra
 Ana Ester Aguilar Cárdenas
 Ana María Vázquez Álvarez
 Antonio Torres Tello de Meneses
 Armando Cabrera Ortiz
 Arturo Rosales
 Beatriz Luna Millan
 Bertha Valdés Hernández
 Biserka Sveshtarova
 Carifino Moreno Padilla
 Carmen Sansón Ortega
 Prof. Cecilia
 Claudia Huesca Gómez
 Consuelo Ayala Mondragon
 Dulce María Robles
 Elia Brosia Naranjo Rodríguez
 Erika Patricia Rendon Huerta
 Ernestina Cervera
 Eva Della Calderon Garcidueñas
 Francisco Hernández Luis
 Prof. Gempo
 Gerardo Kono Yaico
 Gloria Nevarez Luna
 Guadalupe Mercado Ramírez
 Guadalupe Vélez Pratt
 Guillermo González Vargas
 Gustavo Estrada Medrano
 Helgi Helen Jung Cook
 Homero Hernández Montes
 Honoría Fuentes Sixto
 Horacio San Vicente
 Ines Fuentes Noriega
 Irma Korkowski
 Ivonne Herrera Tejeiro
 Josefina Becerril Téllez Giron
 José Juan Zúñiga Aguilar
 José Luis Balderas Leite
 José Luis Domínguez Torix
 José Luis Ortega Cervantes
 José Luis Rubio Rubio
 José Luz González Chávez
 José Manuel Morales Hernández
 Juan José Mandoki Weitzner
 Juan José Mendoza
 Laura E. Peniche V.

Juana Vázquez Ocampo
 Karla Gabriela Cuevas Licea
 Laura Moreno Brizuela
 Lilia Vierna García
 Lilitana Aguilar Contreras
 Lourdes Mayet Cruz
 Luis Torres Septien
 Magdalena Cantú Cueva
 Ma. Adelina Jiménez Arellanos
 Ma. Alicia Hernández Campos
 Ma. de los Remedios Sánchez Díaz
 Ma. del Carmen Cortéz Decuir
 Ma del Socorro Reyna Rodríguez
 Ma. Elsa Escudero García
 Ma. Guadalupe Tsuzuki R.
 Ma. Socorro Alpízar Ramos
 Ma. Teresa Rodríguez Buentello
 Maite Astigarraga Zavaleta
 Manuel Aguilar
 Manuel Miranda
 Manuel Wong Chio
 Marisol López López
 Martha Lafont
 Martha E. Sosa Torres
 Martha Robles Rendon
 Mauro Morales
 Mirna Mejía
 Misael González Ibarra
 Moisés Azrak Cherem
 Norma Trinidad González Monzon
 Olimpia Jiménez Lignan
 Rafael Jiménez Acevedo
 Ramiro Domínguez Danache
 Raul Garza Velazco
 Raul Nieto Camacho
 Rebeca Franco Bourland
 Roman Tejeda
 Rosa Lorenía Mora Tovar y Chávez
 Rosalinda Velázquez Salgado
 Saturnino de León Chapa
 Sergio Rodríguez Morales
 Silvia Pérez Casas
 Silvia Mendoza A.
 Sofia Margarita Rodríguez Alvarado
 Sullivan López González
 Victor Fernández
 Victor M. Ugalde Saldívar
 Victor Manuel Vargas
 Yolanda Frias Ruiz
 Y a los que mi imperfecta memoria no registro

Este trabajo ha sido presentado en numerosos foros de discusión, entre los que se encuentran:

- ⊗ "XXXII Congreso Mexicano de Química", Sociedad Química de México, con el trabajo "Síntesis y Caracterización de Compuestos Análogos al Rojo de Rutenio".
- ⊗ "The Fifth Chemical Congress of North America" con el trabajo titulado "Inhibition of Mitochondrial Calcium Ion Transport by a Ruthenium Red Analogue" organizado por la Sociedad Química de México, la American Chemical Society y la Canadian Society for Chemistry.
- ⊗ "5º Expo Estudiantil de Iniciación Básica en la Investigación, con el proyecto "Síntesis, Caracterización y Aplicación Biológica de Compuestos Análogos al Rojo de Rutenio" organizada por la Secretaría Académica la Facultad de Química de la UNAM.
- ⊗ Foro "Encuentro entre Investigadores en Química" con el trabajo titulado "Síntesis, Caracterización y Aplicación Biológica de Compuestos Análogos al Rojo de Rutenio", organizado por la Academia Mexicana de Ciencias.
- ⊗ "XXXIII Congreso Mexicano de Química" organizado por la Sociedad Química de México, con el trabajo "Síntesis, Caracterización y Aplicación Biológica de Compuestos Análogos al Rojo de Rutenio",
- ⊗ Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" organizado por la Coordinación de Superación Académica.
- ⊗ "The 9th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, ICBIC", con el trabajo titulado "Mitochondrial Calcium Inhibition by a New Ruthenium Red Analogue".
- ⊗ Participación en el evento en homenaje a la Dra Rosalinda Contreras, organizado por el Depto. de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.
- ⊗ Artículo para publicación recientemente enviado titulado "Inhibitory Properties of Ruthenium Amine Complexes on Mitochondrial Calcium Uptake". Zazueta, C., Sosa-Torres M. E., Sánchez, C., Correa, F., and Garza-Ortiz, A."

INDICE

Página

INTRODUCCION.....1

CAPITULO 1

ANTECEDENTES.....3

1.1.- Caracterización y estudio de la reactividad química del rojo de rutenio.....3

1.2.- Aplicación de las propiedades del rojo de rutenio.....17

1.3.- Importancia del calcio en los seres vivos.....18

1.3.1. Química de coordinación y funciones biológicas del calcio.....18

1.3.2. Tipos de interacción del calcio con las proteínas.....23

1.3.3. El calcio como estabilizante estructural.....25

1.4.- Transporte de calcio y regulación de sus concentraciones en la célula.....25

1.5.- Transporte de calcio en la membrana interna de la mitocondria de
mamíferos.....29

1.5.1. Mitocondria. Características y Funciones.....29

1.5.2. Nuevos conocimientos del transporte de calcio mitocondrial.....31

1.6.- Trascendencia de la elucidación del mecanismo de transporte de
calcio y aislamiento del acarreador.....34

CAPITULO 2

OBJETIVOS.....35

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1.- Reactivos utilizados.....	36
3.2.- Técnicas y equipos utilizados.....	36
3.3.- Procedimiento de síntesis de los análogos al rojo de rutenio.....	37
3.3.1 Ruta general de síntesis de los compuestos análogos al rojo de rutenio.....	38
3.3.2. Síntesis del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio (IV), RRPhen1	39
3.3.3. Síntesis del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrifenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio (IV),RRPhen2.....	40
3.3.4. Síntesis del análogo al rojo de rutenio con fenantrolina y tetrafenilborato de sodio como contraión.....	41
3.4.- Procedimiento de purificación del rojo de rutenio, hexacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III)) tetraamminrutenio(IV).....	42
3.5.- Síntesis del violeta de rutenio, octacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(IV)) tetraamminrutenio(IV), ViRu.....	43
3.6.-Pruebas biológicas de los análogos sintetizados.....	43

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
4.1.- Caracterización del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen1	46

4.1.1. Propiedades físicas.....	46
4.1.2. Análisis elemental.....	48
4.1.3. Espectroscopía de Infrarrojo.....	48
4.1.4. Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C	51
4.1.5. Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F y ^{31}P	54
4.1.6. Espectroscopía UV-Vis en disolución y en sólido.....	56
4.1.7. Conductancia molar.....	59
4.2.- Caracterización del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo- bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbifenantrolinarutenio(IV), RRPhen2.....	60
4.2.1. Propiedades físicas.....	60
4.2.2. Análisis elemental.....	61
4.2.3. Espectroscopía de Infrarrojo.....	62
4.2.4. Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C	63
4.2.5. Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F y ^{31}P	64
4.2.6. Espectroscopía UV-Vis en disolución y en sólido.....	65
4.2.7. Determinación de conductancia molar.....	66
4.3.- Síntesis del análogo del rojo de rutenio con fenantrolina y tetrafenilborato de sodio como contraión.....	67
4.3.1. Caracterización del compuesto tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I), $\text{Na}(\text{C}_{12}\text{N}_2\text{H}_8)_3\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$	68
4.3.1.1 Propiedades físicas.....	68
4.3.1.2 Espectroscopía de Infrarrojo	69
4.3.1.3 Espectroscopía electrónica	70
4.3.1.4 Estudio cristalográfico	71
4.4.- Procedimiento de purificación del rojo de rutenio, hexacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III)) tetraamminrutenio(IV).....	81

4.4.1. Propiedades físicas.....	83
4.4.2. Conductancia molar.....	83
4.4.3. Espectroscopía electrónica.....	83
4.5.- Síntesis del violeta de rutenio, octacloruro de di- μ -oxo- bis(pentaamminrutenio(IV)) tetraamminrutenio(IV), ViRu.....	84
4.5.1. Propiedades físicas.....	84
4.5.2. Análisis elemental.....	85
4.5.3. Espectroscopía electrónica.....	85
4.5.4. Conductancia molar.....	86
4.6.-Pruebas biológicas de los análogos sintetizados.....	86

CAPITULO 5

CONCLUSIONES.....	91
5.1.- Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo- bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen1.....	91
5.2.- Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo- bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen2.....	92
5.3.-Análogo al rojo de rutenio con fenantrolina y tetrafenilborato de sodio como contraión.....	94
5.4.- Purificación del rojo de rutenio.....	94
5.5.- Síntesis del violeta de rutenio, octacloruro de di- μ -oxo- bis(pentaamminrutenio(IV)) tetraamminrutenio(IV), ViRu.....	95
5.6.-Pruebas biológicas de los análogos sintetizados.....	95

INTRODUCCION

El campo de la bioinorgánica adquiere constantemente mayor importancia en función de los cada día más sorprendentes descubrimientos sobre las diferentes reacciones químicas que en los seres vivos se llevan a cabo.

La principal meta que un investigador tiene en el campo de la bioinorgánica consiste en la cabal comprensión de los procesos biológicos con el fin de elaborar sistemas sintéticos igualmente eficientes en cuanto a reactividad y así definir establecer cuáles son las condiciones que llevan a un mal funcionamiento de un proceso biológico para de esta forma tratar de corregir éstas y establecer tratamientos efectivos contra ese mal funcionamiento.

En el caso específico del rojo de rutenio este se ha estudiado frecuentemente en el campo de la bioinorgánica por su especial capacidad de intervenir en varios procesos biológicos.

Una de las más enigmáticas propiedades que el rojo de rutenio presenta consiste en inhibir tanto el transporte de calcio que se verifica en la membrana interna de mitocondrias en mamíferos, como la transferencia electrónica que se lleva a cabo en la membrana tilacoidal del cloroplasto, en el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, es un compuesto cuya reactividad química no es completamente conocida, pues por ejemplo a la fecha no se conoce una estructura cristalina que apoye las evidencias experimentales.

Además, se desconoce el mecanismo mediante el cual el rojo de rutenio actúa en los procesos biológicos antes mencionados, por lo que resulta muy importante establecer cómo es que este compuesto posee la capacidad de inhibir tales procesos biológicos, y tratar de dar una mejor explicación de cómo es que estos procesos se llevan a cabo.

En este trabajo presentamos la síntesis y caracterización de compuestos análogos al rojo de rutenio, así como su reactividad y aplicación biológica.

Este trabajo de tesis consta de 7 capítulos, los cuales a continuación se resumen:

En el **Capítulo 1** se presentan los antecedentes de mayor trascendencia que se han logrado recabar en cuanto al estudio del sistema que estudiamos en este trabajo de tesis. Principalmente hacemos una amplia descripción de las evidencias experimentales que han permitido definir la composición química del rojo de rutenio, así como su reactividad química.

Además, mostramos una extensa revisión realizada sobre la importancia del calcio en los sistemas biológicos, del manejo del calcio en las células, de los transportes de calcio promovidos por transportadores especiales y específicamente revisamos los más importantes descubrimientos sobre el transporte de calcio en la membrana interna de la mitocondria.

En el **Capítulo 2** presentamos los objetivos que inicialmente nos planteamos, en cuanto al conocimiento de la química del rojo de rutenio y del transporte de calcio mitocondrial en los mamíferos, mediante el estudio biológico de los nuevos compuestos sintetizados.

En el **Capítulo 3** se describe detalladamente la metodología empleada en este trabajo de tesis.

En el **Capítulo 4** se presentan los resultados obtenidos sobre los nuevos compuestos sintetizados, así como los de los estudios biológicos. Se discuten cada uno de los resultados obtenidos tanto en el campo químico como en el biológico.

En el **Capítulo 5** se presentan las conclusiones a las que llegamos en este trabajo de síntesis.

En el **Capítulo 6** anexamos la bibliografía consultada que sirvió de apoyo para este trabajo de tesis.

Finalmente en el **Capítulo 7** se incluye un apéndice que contiene las coordenadas atómicas del cristal obtenido.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1.- Caracterización y estudio de la reactividad química del rojo de rutenio

El rojo de rutenio es un compuesto inorgánico producto de síntesis química en el laboratorio y que en la naturaleza por tanto nunca se presenta.

El rojo de rutenio fue descrito por vez primera por Joly¹ en 1892 y desde entonces se ha investigado ampliamente con el fin de conocer un poco más sus propiedades.

El rojo de rutenio es uno de los compuestos de rutenio de valencia mixta que más han llamado la atención de los investigadores de diversos campos de la ciencia, tales como el químico, histológico, bioquímico, por mencionar algunos.

En el pasado un nombre comúnmente usado para este compuesto fue el de "oxiclورو de rutenio amoniacal", el cual le fue dado por A. Joly. Sin embargo, se trataba más de una descripción de la ruta de síntesis que propiamente un nombre.

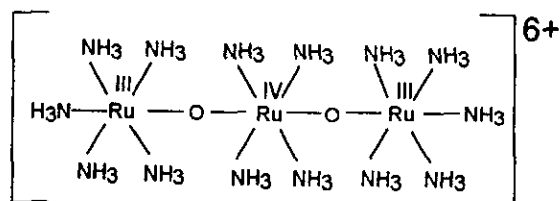
Otro de los nombres que aún actualmente es muy utilizado es el de rojo de rutenio, acuñado por el botánico francés L. Mangin², quien fue el primero en describir sus interesantes propiedades tintoriales.

Sin embargo, su nombre correcto según las reglas de la IUPAC es hexacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III)) tetraamminrutenio(IV), y como puede observarse resulta mucho más fácil manejar el nombre rojo de rutenio, como así lo llamaremos en este trabajo.

En el primer trabajo donde se abordó la caracterización del rojo de rutenio, realizado por A. Joly¹, se concluyó que la fórmula mínima de este compuesto era $\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{OH})_2 \cdot 7\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, Morgan y Burstall³ indicaron que esa fórmula era incorrecta y propusieron la siguiente $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}] \text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, la cual fue también rechazada por Gleu y Breuel⁴ en 1938, ya que sus estudios demostraron que el rojo de rutenio era una molécula diamagnética y sin embargo el compuesto que Morgan y colaboradores proponían era paramagnético. Para ese entonces ya se había sugerido que su naturaleza altamente colorida era

resultado de una estructura polinuclear. Sin embargo, la evidencia experimental con la que se contaba aún no era suficiente para confirmar esta propuesta.

Finalmente Fletcher, y colaboradores⁵ propusieron acertadamente que se trataba de un complejo iónico polinuclear, que estaba constituido por 3 rutenios de valencia 3+ y 4+ unidos mediante puentes oxo y hexacoordinado con grupos amino,; que además poseía cloruros como contraiones. Fletcher y colaboradores se interesaron mucho en el rojo de rutenio porque observaron que el diamagnetismo y la intensa coloración de muchos complejos de rutenio se debían a su naturaleza polinuclear. También demostraron que el comportamiento de este compuesto era típico para un complejo trinuclear de rutenio, que en la estructura metálica de ese compuesto no se encontraban coordinados halógenos, y que al calentarlo se liberaba amoníaco, el cual fue cuantificado, encontrándose que, coordinados a los tres átomo de rutenio, se encontraban 14 átomos de nitrógeno. Con estos resultados, los autores establecieron la primera fórmula estructural del rojo de rutenio, donde los átomos de rutenio se encontraban entrelazados mediante dos puentes oxo satisfaciéndose así la hexacoordinación de los átomos de rutenio (figura 1).



ROJO DE RUTENIO

Figura 1. Fórmula estructural del rojo de rutenio

Otra evidencia para considerar a la estructura del rojo de rutenio como trimérica fue que observaron su oxidación reversible en medio ácido a una especie café y que requería de 0.33 equivalentes de oxidante por átomo de rutenio⁵, hecho que los llevó a proponer la estructura del café de rutenio, producto de la oxidación del rojo de rutenio.

J. M. Fletcher y colaboradores determinaron finalmente que la fórmula mínima de este compuesto es $[Ru_3O_2(NH_3)_{14}]Cl_6$ con un peso molecular de 786.36 g/mol. También concluyeron que la valencia del complejo era de 6+, pues el número de oxidación promedio de los tres átomos de rutenio es de +10/3. Mientras que para el café de rutenio, de estructura muy similar, el número promedio es de 11/3.

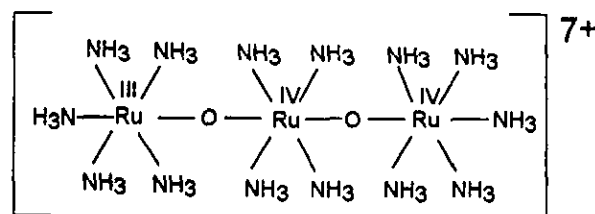
Incluso concluyeron que en este compuesto la distribución electrónica involucra enlaces π (π) lo cual no resulta muy común tratándose de compuestos de carácter inorgánico. Sin embargo, existe cierta oposición a esta hipótesis, pues se

determinó por incipientes estudios del rojo de rutenio, empleando Mössbauer⁶, que la carga de los tres átomos de rutenio se encontraba totalmente localizada.

Además de realizar la caracterización química y una ruta de síntesis detallada del rojo de rutenio, Fletcher y colaboradores⁵, dan una posible explicación del mecanismo de reacción.

Se parte de $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, el cual se mantiene en una solución amoniacal durante un par de días formándose $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, el cual se oxida con el oxígeno del aire, dando rojo de rutenio, el cual es posteriormente purificado mediante varias recristalizaciones. Sin embargo, el alto costo de la sal y el bajo rendimiento de tal reacción hacen mucho más conveniente la compra del rojo de rutenio en casas comerciales, aun cuando el grado de pureza varía considerablemente de un lote a otro, incluso en la misma casa comercial.

Mucho se sabe ya sobre sus propiedades de oxido-reducción⁵⁻¹¹. Es conocido que el rojo de rutenio (catión) es fácilmente oxidado a café de rutenio, el cual posee un numero de oxidación promedio de cada átomo de rutenio de $+11/3$. Este café de rutenio es fácil y reversiblemente reducido al rojo de rutenio. De la anterior evidencia se propuso que el café de rutenio posee la misma fórmula estructural del rojo de rutenio, con la diferencia de que uno de los rutenios (III) en el rojo de rutenio cambia a un estado de oxidación de (IV) en el café de rutenio (figura 2).



CAFÉ DE RUTENIO

Figura 2. Fórmula estructural del café de rutenio

Las medidas de susceptibilidad magnética que Fletcher y colaboradores⁵ realizaron, fueron $\mu_{\text{eff}} = 1.13$ MB por átomo de rutenio para el caso del café de rutenio, mientras que para el rojo de rutenio estos autores encontraron un μ_{eff} de 0.77 MB. Considerando que los valores absolutos de los momentos no eran significativos en términos de electrones desapareados, determinaron la diferencia existente entre el μ_{eff} de los tres átomos de rutenio del rojo y el café de rutenio [$3(1.13 - 0.77) = 1.1$ MB], encontrando que el resultado era consistente con la carga extra que el café de rutenio tiene respecto del rojo de rutenio.

También estos autores determinaron que la oxidación por el oxígeno del aire del rojo de rutenio en solución de HCl 0.1, a las 24 hrs fue del 20%, por lo que dedujeron que es un proceso lento.

Por otra parte, el rojo de rutenio en solución de HCl 2N se oxida rápidamente. Finalmente Fletcher y colaboradores⁵ explicaron que, la velocidad de oxidación se veía favorecida en condiciones en las cuales se tiende a remover el agua de solvatación del catión, tales como el calentamiento del sólido o la extracción con disolventes orgánicos de soluciones acuosas de rojo de rutenio.

Los mismos investigadores, al estudiar la naturaleza del café de rutenio determinaron que el catión era fácil y reversiblemente reducido al rojo por la acción del ion hidróxido. Estudios posteriores⁷ realizados por Earley y Fealey confirmaron esta evidencia experimental y se determinó que la reacción de oxidación del rojo al café no se veía modificada por la presencia de iones H⁺ (figura 3).

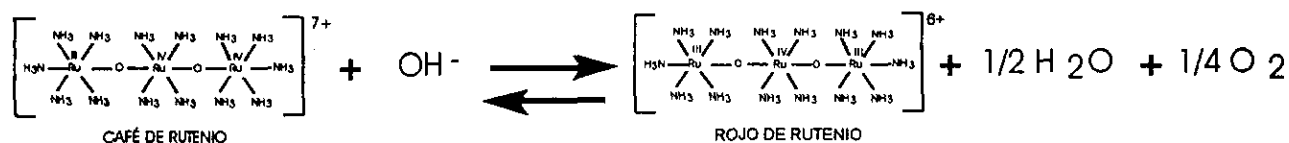


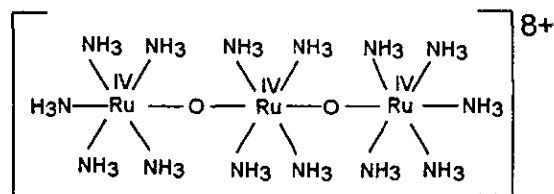
Figura 3. Reacción de reducción del café de rutenio

Estos estudios sirvieron para confirmar que la reducción del café al rojo de rutenio requería de un electrón, como anteriormente lo mencionara Fletcher en su trabajo. Además, se estableció que la posible reacción involucraba la formación de un intermediario μ -peroxo tal como $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4(\text{OOH})\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ el cual se descompone rápidamente, liberando oxígeno molecular.

Mucha de la evidencia experimental⁸ apoya el hecho de que la reacción de reducción sigue un mecanismo especial, que involucra la formación de un intermediario muy similar al rojo de rutenio, lo cual lo hace muy difícilmente detectable ya que su posición (nm) en el espectro dentro de la región UV-Vis, esta en el umbral. Para que esta reacción de reducción se lleve a cabo se supone el ataque nucleofílico del hidroxilo al átomo de rutenio central del café de rutenio. Este intermediario puede ser un peróxido del rojo de rutenio o una especie con un átomo de rutenio heptacoordinado. De hecho, este mecanismo supone la fácil oxidación del hidroxilo por el café de rutenio poco común en oxidantes inorgánicos).

En un estudio posterior realizado por Earley, Bignetti y Chalilpoyil¹¹ se confirma que la reacción de reducción es un proceso de segundo orden con $\Delta H^\ddagger = 19 \text{ cal/mol}$, descartando la generación de oxígeno durante la reducción y considerando por otro lado la formación de RuO_4^{2-} o RuO_4^- y la oxidación de los nitrógenos coordinados en el rojo de rutenio a especies tales como Ru-NO o más probablemente hidroxilaminas coordinadas. A la fecha esta es la propuesta del mecanismo de reducción del café a rojo de rutenio que prevalece.

En el trabajo de Fletcher y colaboradores, se menciona brevemente la existencia, en las muestras aun sin purificar (del rojo de rutenio sintetizado por ellos), de una pequeña impureza que presentaba un máximo de absorción en 725 nm, la cual actualmente se conoce como violeta de rutenio¹² por su composición similar a la del rojo de rutenio pero el estado de oxidación de cada uno de sus núcleos de rutenio es de (IV). Este compuesto tampoco ha podido ser caracterizado cristalográficamente, pero se sabe que la fórmula estructural es la que se muestra en la figura 4:



VIOLETA DE RUTENIO

Figura 4. Fórmula estructural del violeta de rutenio

La primera estructura de rayos-X del rojo de rutenio fue publicada por Sterling¹³ en 1970. Sin embargo, existen serias discrepancias entre los resultados químicos experimentales y las conclusiones a las que este investigador llegó (figura 5).

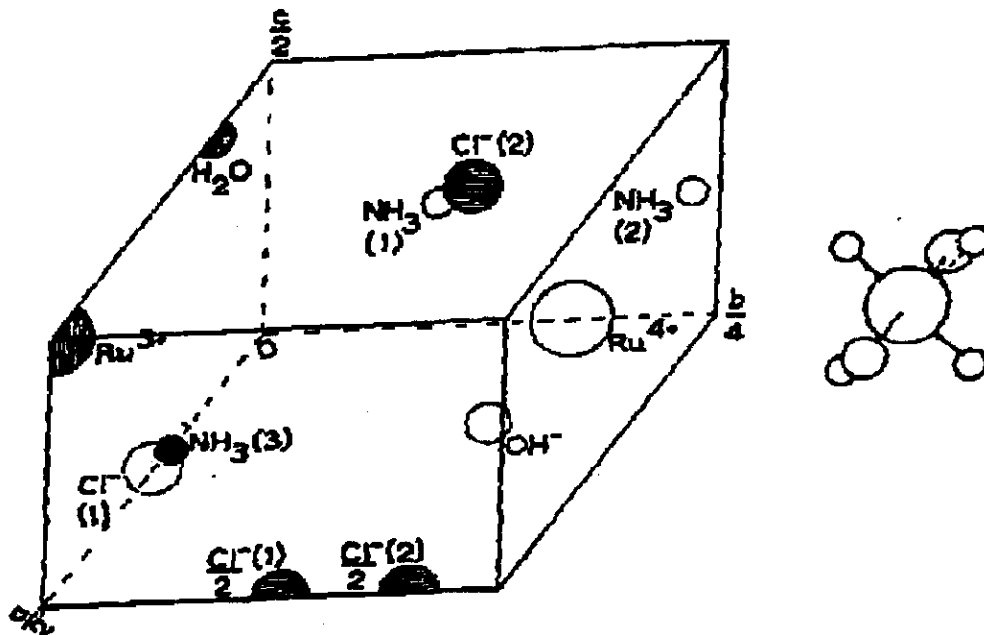


Figura 5. Estructura propuesta para el rojo de rutenio por Sterling. *Amer. J. Bot.* 57(2):172-175.1970

En su estudio, Sterling propone por el análisis de la estructura del cristal que la composición del rojo de rutenio es la siguiente $[\text{Ru}_3\text{Cl}_8(\text{OH})_3(\text{NH}_3)_{12}(\text{H}_2\text{O})_3]$, en



donde cada rutenio estaba coordinado cúbicamente con al menos 8 iones cloro y coordinado octaédricamente con 4 aminas en una configuración plana cuadrada, además de estar coordinado a dos moléculas de agua o dos hidroxilos en el eje perpendicular al plano. Sin embargo, estudios más detallados encontraron una discrepancia de 18% y por tanto se postuló desorden.

Es importante mencionar a la fecha no se ha podido obtener un cristal del rojo de rutenio con una buena resolución cristalográfica.

Posteriormente, Peter M. Smith, Terence Fealey, Joseph E. Earley y J.V. Silverton¹⁴, determinaron la estructura de rayos-X de un análogo del rojo de rutenio,, el de su etilendiamina, establecen su estructura cristalina y además determinan todos los parámetros, confirmando de esta manera las aseveraciones hechas por Fletcher y colaboradores sobre la estructura lineal del rojo de rutenio.

Así, encontraron que tal derivado altamente relacionado al rojo de rutenio cristaliza en el grupo espacial $P2_1/c$, C_{2v}^5 , del sistema monoclinico con dimensiones de la celda unitaria de $a=8.788(1)\text{\AA}$, $b=11.470(1)\text{\AA}$, $c=14.689(1)\text{\AA}$, $\beta=106.29(10)^\circ$ y $Z=2$. Las densidades observadas y calculadas son de $1.93(2)\text{ g/cm}^3$ y 1.91 respectivamente. La estructura se determinó de 2,559 reflexiones independientes, encontrándose un factor $R=0.054$.

El catión es un ion trimérico lineal centrosimétrico que contiene tres átomos de rutenio enlazados por puentes oxo. El enlace Ru-N tiene una longitud de entre 2.12 y 2.21 \AA . En dicho análogo el átomo de rutenio central está coordinado a dos moléculas de etilendiamina. La conformación de la etilendiamina es similar a la encontrada en otros complejos. Las distancias de enlace Ru-O son de 1.850(4) y 1.891(4) \AA para los átomos de rutenio terminal y central, respectivamente. Esta diferencia es estadísticamente significativa, pero no es considerada como un indicador de la localización de los estados de oxidación de los átomos de rutenio (III, IV, III).

La estructura molecular de dicho compuesto propuesta se presenta en la figura 6:

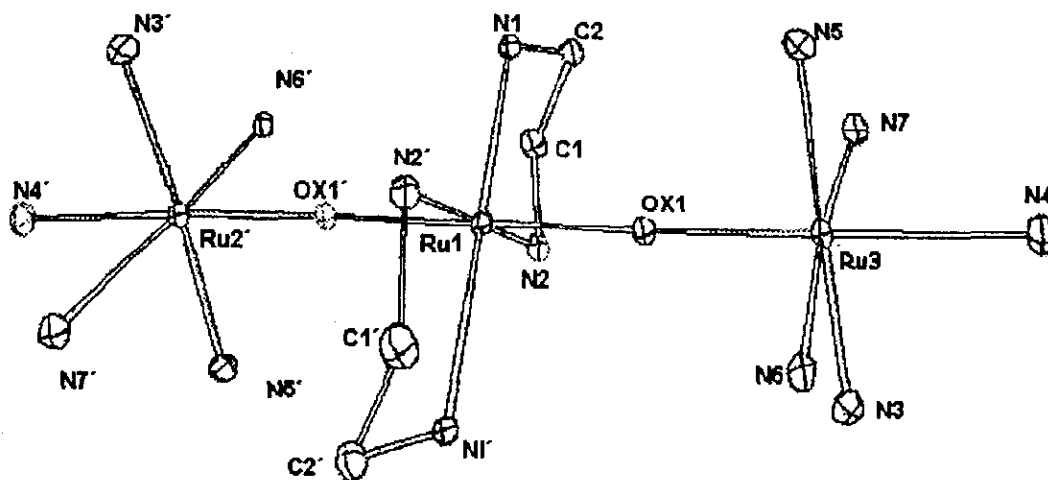


Figura 6. Peter M. Smith, Terence Fealey, Joseph E. Earley y J.V. Silverton. *Inorganic Chemistry*, 10(9), 1971

Años más tarde en 1980 se reportó la estructura cristalina del catión del rojo de rutenio que tenía como contraion tiosulfatos en lugar de cloruros. En dicho trabajo desarrollado por C.T. Carrondo, W. P. Griffith, J. P. Hall y A. C. Skapski¹⁵ se encontró por segunda vez el esqueleto lineal N-Ru-O-Ru-O-Ru-N formado a partir de tres átomos de rutenio hexacoordinados. Estos autores plantearon que el rojo de rutenio, que posee cloruros, no puede cristalizar debido al pequeño tamaño de los cloruros respecto al gran tamaño del catión y por esta razón ellos cambiaron el contraion, para favorecer la cristalización del compuesto.

Así este grupo de investigación encontró que el rojo de rutenio con tiosulfato como contraion presenta una estructura cristalina monoclinica con dimensiones de la celda unitaria de $a=15.128(4)$, $b=16.588(2)$, $c=16.057(2)\text{\AA}$; $\beta=121.72(2)$ a $13\text{ }^\circ\text{C}$, y un grupo espacial $P2_1/c$ (figura 7). En este compuesto se encontró que las dimensiones de la celda son variables aparentemente reversibles por exposición a los rayos-X. En este trabajo se llevaron a cabo un total de 3,453 reflexiones independientes que fueron medidas a $\theta=50^\circ$, de las cuales 1,062 se consideraron inobservables.

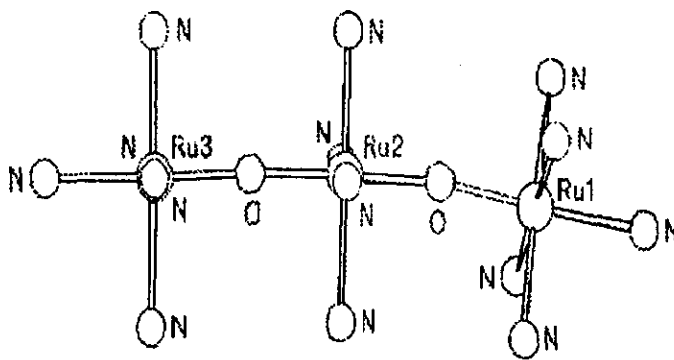


Figura 7. Carrondo C.T., Griffith W.P., Hall J.P. & Skapski A.C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 627,1980:332-334



Debido a que el rojo de rutenio y sus análogos son intensamente coloridos la medición espectrofotométrica en la región visible y UV, arroja importantes datos sobre su estructura, pureza y reactividad química .

En cuanto a su espectro en la región UV y visible, el rojo de rutenio muestra propiedades singulares. Por ejemplo, presenta altos coeficientes de extinción atribuido principalmente a su peculiar naturaleza polinuclear⁵, lo que ha sido motivo de extensos estudios.

En la literatura¹² se informa que las soluciones acuosas del rojo de rutenio y sus análogos, son sumamente inestables por lo que se recomienda el uso de soluciones de acetato de amonio a pH 7.0 como disolvente para realizar las mediciones espectrofotométricas y en las cuales el rojo de rutenio y sus análogos se mantienen estables por largo tiempo.

Por el contrario, se sabe que soluciones más alcalinas a las de amonio provocan la descomposición del rojo de rutenio.

Se ha determinado¹² que el rojo de rutenio es más estable en soluciones ácidas generadas por ácidos orgánicos, tales como el acético. Sin embargo, a pH's menores, como los generados por ácidos minerales, el rojo de rutenio es casi instantáneamente oxidado al café de rutenio.

La espectroscopia de absorción electrónica ha permitido a los investigadores establecer claras diferencias entre el rojo, café y violeta de rutenio (figura 8). Inicialmente el mismo Fletcher y luego Luft estudiaron profundamente los espectros UV-Vis de los tres compuestos antes mencionados.

Fletcher y colaboradores, presentaron los espectros tanto del rojo como de café de rutenio, posteriormente Luft presentó estos espectros muy similares a los anteriores y fue capaz de purificar el violeta de rutenio y determinar su espectro UV-Vis, los cuales se presentan en la figura 8 y como es posible observar los espectros son diferentes entre sí, permitiendo de esta forma hacer uso de esta herramienta para la identificación del rojo de rutenio y sus análogos.

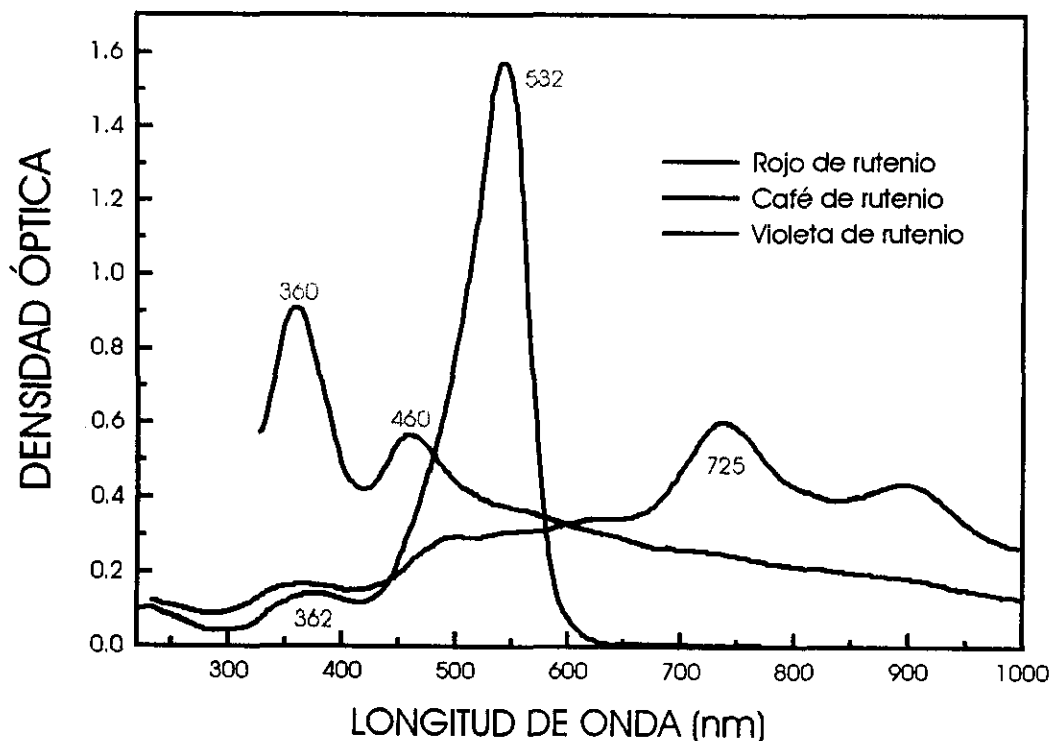


Figura 8. Espectro electrónico del rojo de rutenio y sus análogos¹²

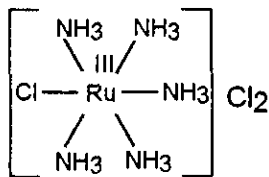
Luft detectó¹² una serie de impurezas y subproductos en las muestras comerciales de rojo de rutenio y realizó una completa caracterización, mediante espectroscopia de absorción electrónica, de éstas.

De estos resultados, Luft determinó¹² que el rojo de rutenio presenta máximos de absorción a 356 y 532 nm, mientras que en el café se encontraron máximos de absorción a 360 y 460 nm, y en el caso del violeta de rutenio se encontró un máximo de absorción a aproximadamente 725 nm (figura 8).

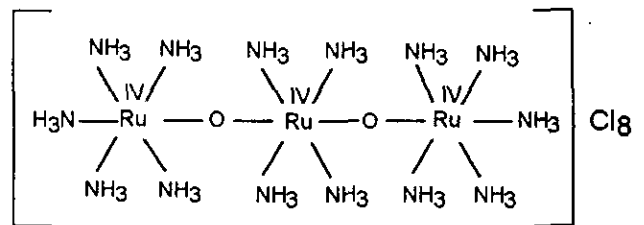
Se creía que además de estas impurezas en las muestras comerciales de rojo de rutenio, deberían encontrarse, derivados nitrosilados de rutenio, derivados aminados e incluso pequeñas cantidades de materias primas, para lo cual la espectroscopia de absorción electrónica ha resultado de mucha utilidad.

En el estudio realizado por Luft a una gran cantidad de muestras de rojo de rutenio procedentes de diferentes casas comerciales, se encontró finalmente que existían predominantemente como impurezas:

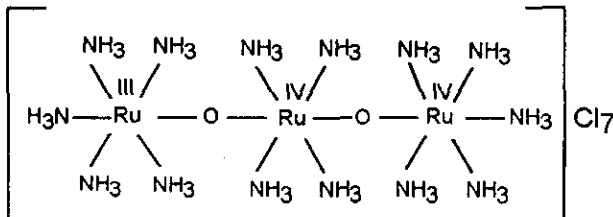
- a) café de rutenio
- b) cloruro de hexamminrutenio(III)
- c) cloruro de cloropentamminrutenio(III)
- d) cloruro de nitrosilrutenio(III) y
- e) violeta de rutenio



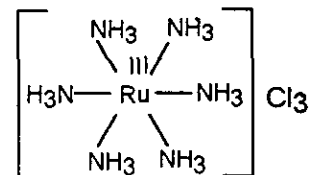
cloruro de cloropentamminrutenio(III)



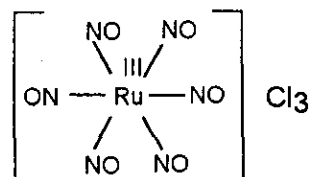
violeta de rutenio



café de rutenio



cloruro de hexamminrutenio(III)



cloruro de nitrosilrutenio(III)

Figura 9. Principales impurezas presentes en el rojo de rutenio comercial¹²

Luft también realizó los estudios correspondientes de las impurezas mediante espectroscopia electrónica, los cuales se presentan en la figura 10.

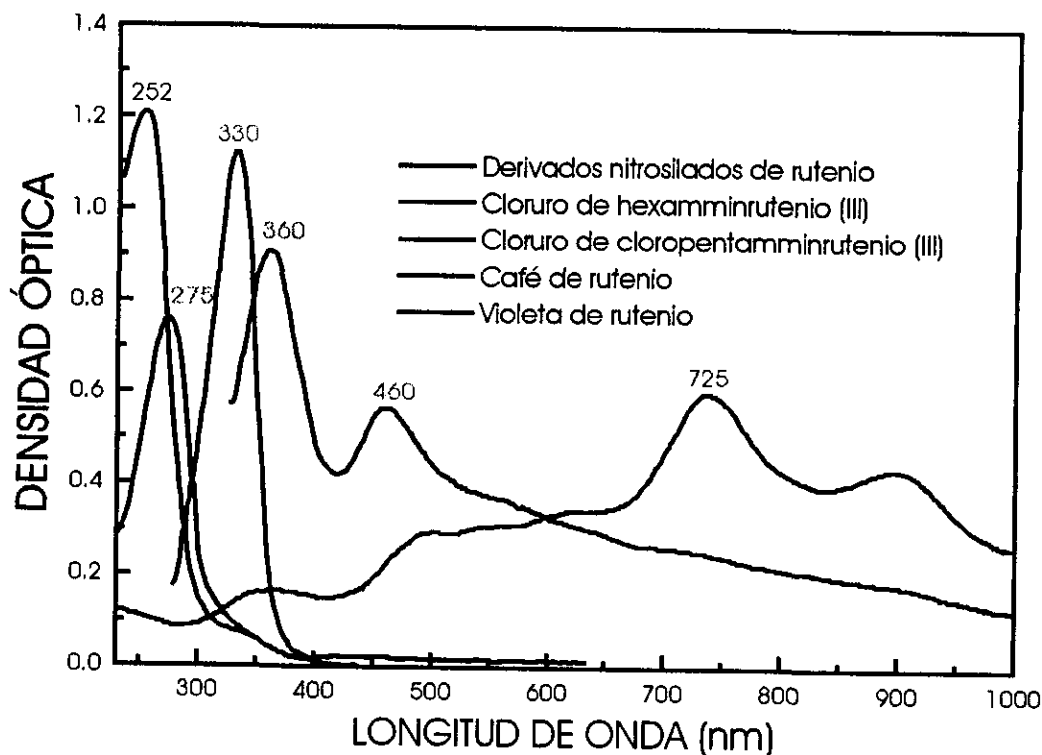


Figura 10. Espectro electrónico de las principales impurezas en el rojo de rutenio comercial¹²

En estudios similares en nuestro laboratorio encontramos el mismo tipo de impurezas en las muestras de rojo de rutenio disponibles en el mercado.

El valor reportado del coeficiente de extinción molar del máximo de absorción del rojo de rutenio puro, se encuentra alrededor de 21,000 en soluciones acuosas, mientras que es ligeramente mayor (22,700) en soluciones de acetato de amonio.

Ha sido difícil tratar de asignar las diferentes bandas en el espectro del rojo de rutenio, pues la teoría a la fecha solo ha podido explicar con certeza los espectros electrónicos de compuestos mononucleares y el rojo de rutenio al ser un compuesto trinuclear presenta características considerablemente diferentes. Sin embargo, se cree que la banda principal, más intensa, localizada a 532 nm se debe a bandas de transferencia de carga.

En cuanto al espectro infrarrojo del rojo de rutenio es importante anotar que se observan claramente todas las bandas de vibración de los grupos aminos, lo cual resulta a todas luces, conveniente, para la posterior asignación de las bandas en los análogos sintetizados.

También mediante la espectroscopía de infrarrojo ha sido posible establecer una de las principales evidencias experimentales que permite diferenciar entre el café (como nitrato y sulfato) y el rojo de rutenio (como cloruro). El complejo rojo hidratado difiere del complejo café en dos aspectos. Primero, la banda a $3,477 \text{ cm}^{-1}$, asignada a la vibración de elongación del agua en el rojo de rutenio, se encuentra desplazada a $3,361 \text{ cm}^{-1}$ en el nitrato de café de rutenio y a $3,380 \text{ cm}^{-1}$ en el sulfato de café de rutenio. En segundo lugar, las bandas de deformación y rocking de los grupos amino en el rojo de rutenio presentan sobretonos a bajas frecuencias las cuales pueden ser marcadas con deuterio.

Estudios mediante espectroscopia Raman¹⁶ sugieren la utilidad que el rojo de rutenio tiene, ya que cuenta con propiedades singulares para su estudio, el hecho de enlazarse a macromoléculas biológicas de manera más o menos específica y de poseer una banda con un alto coeficiente de extinción en la región visible del espectro electromagnético, lo cual lo habilita como una sonda espectroscópica.

Se encontró que en los espectros Raman del rojo de rutenio se generan cambios sustanciales luego de su adición a soluciones contenedoras de atrapadores o quelantes de iones Ca^{2+} . Además, se observó que la adición de calcio a la solución de rojo de rutenio y atrapador de calcio, revertían los cambios generados en los espectros Raman. A pesar de que los cambios en la frecuencia de absorción son muy pequeños, después de su enlace al sitio de unión del calcio en las diferentes moléculas, éstos permiten identificar el tipo de unión, es decir, el cambio en el espectro o el desplazamiento en la señal permite distinguir cuando el rojo de rutenio se enlaza a sitios de unión proteicos o fosfolipídicos de las membranas de los organelos.

En cuanto a sus propiedades de susceptibilidad magnética, Gleu y Breuel⁴ reportaron que el rojo de rutenio es una molécula diamagnética. En cambio las pequeñas impurezas de derivados del rojo de rutenio nitrosilado^{17, 18}, que se encuentran en el rojo de rutenio comercial generan el paramagnetismo observado en las muestras y que inicialmente se consideraba propio del rojo de rutenio.

Además, se determinó que esta molécula de rojo de rutenio diamagnética se convierte en paramagnética por procesos oxidativos dependientes del pH, en solución, lo cual brinda una magnífica oportunidad para tratar de entender un poco más de la reactividad química de este tipo de compuestos.

También se ha reportado el estudio del rojo de rutenio como posible compuesto "sonda" en los estudios con resonancia magnética nuclear. Es decir, combinando las propiedades tintoriales del rojo de rutenio en microscopía electrónica y sus características magnéticas, puede ser útil para localizar átomos particulares en el espacio (en este caso rutenio) mediante la microscopía electrónica y encontrar moléculas asociadas con estos átomos de rutenio, usando la perturbación de los espectros de resonancia magnética nuclear por tales sondas. Se pensó idealmente que la combinación de estas técnicas permitiría rastrear y localizar moléculas en el espacio¹⁹. De estos estudios finalmente se concluyó que era posible observar la preferencia de unión del rojo de rutenio a estructuras como polisacáridos y fosfolípidos, especialmente la fosfatidiletanolamina, la cardiolipina y el fosfatidilinositol. Así, el rojo de rutenio mostró ser particularmente útil como sonda de sitios de unión de poliaminas en los diferentes compartimentos celulares.

El rojo de rutenio fue y es actualmente utilizado solo o en combinación con el tetróxido de osmio como colorante, ya que tiñe selectivamente la pared celular y permite su visualización en microscopía óptica y electrónica. Las sustancias pectínicas son unos de los más importantes constituyentes químicos de la pared celular, de ahí la gran importancia del rojo de rutenio en la tinción de paredes celulares.

Inicialmente y por muchas décadas se creyó vehementemente que el rojo de rutenio era un colorante selectivo de los mucopolisacáridos. Sin embargo, recientemente se mostró histológicamente¹², que el rojo de rutenio se une a una amplia variedad de macromoléculas, incluyendo al DNA aislado de gran variedad de organismos, el ácido péptico, pectinas, heparina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido algínico, agar, gel de agaropectina, moco nasal, RNA de levaduras, ácido hialurónico, trombina bovina, goma arábiga y en general a los derivados de celulosas.

El rojo de rutenio tiñe pectinas intensamente pero no a otros constituyentes de las paredes celulares. Sin embargo, tiene dos desventajas, la primera es que el rojo de rutenio no se une de forma completamente específica a las pectinas y no puede diferenciar o teñir diferencialmente a la protopectina de la pectina y del ácido péptico o del pectato de calcio.

También se ha reportado²⁰⁻²⁴ que el rojo de rutenio interfiere en el transporte de calcio en la membrana interna de la mitocondria, probablemente por unión inespecífica del rojo de rutenio a sitios de unión del calcio de baja afinidad, constituidos principalmente de fosfolípidos. Por otro lado, este compuesto no inhibe el transporte de calcio que se lleva a cabo en membranas plasmáticas o microsomales.



Además, se ha mostrado que el rojo de rutenio interviene en la transferencia de electrones, desde el NADH citoplásmico a la cadena transportadora de electrones que se localiza en la membrana interna de la mitocondria a nivel ya sea del citocromo c o de la citocromo oxidasa. Aun se desconoce el mecanismo por el cual se llevan a cabo estos procesos.

1.2.- Aplicación de las propiedades de rojo de rutenio

Como ya se mencionó, el rojo de rutenio fue utilizado como colorante de tejidos vegetales gracias a sus peculiares propiedades tintoriales en la microscopía óptica y electrónica¹², siendo de gran ayuda en el campo de la histología vegetal.

Posteriormente se descubrió que el rojo de rutenio poseía la sorprendente capacidad de inhibir el transporte de calcio de ciertos sistemas biológicos, tales como el transporte de calcio que se verifica en la membrana interna de la mitocondria²⁰⁻²⁴ y la liberación del calcio en el retículo sarcoplásmico²⁵. En vista de tales hallazgos y el gran interés por la comprensión del papel del calcio en los sistemas biológicos, se empleó en muchos de éstos, y actualmente, es una de las principales herramientas con las que se cuenta para establecer o evidenciar los mecanismos mediante los cuales el calcio interviene en los distintos procesos celulares tales como la apoptosis^{26 y 27}.

En la búsqueda de la influencia que el rojo de rutenio pudiera tener en otros sistemas biológicos, se estudió la influencia de éste en los vegetales, encontrándose que es capaz de trabajar como un transportador electrónico en el proceso de fotosíntesis, lo cual pone de manifiesto la interacción inherente entre el rojo de rutenio y este proceso biológico²⁸⁻³⁰.

Debido a que el rojo de rutenio es capaz de inhibir muchos procesos celulares en los cuales el calcio es la pieza clave, la elucidación del mecanismo de acción del rojo de rutenio nos ayudará a comprender mejor el papel que el calcio tiene en diferentes procesos celulares, lo cual nos permitirá entender las alteraciones de estos procesos, para entonces poder establecer alguna medida para su corrección.

Por ejemplo, el entender el mecanismo por el cual el calcio desencadena el proceso apoptótico podría emplearse para establecer un tratamiento contra el cáncer, estimulando dichos procesos apoptóticos.

Recientemente se ha demostrado que el rojo de rutenio inhibe la unión Ca^{2+} -calmodulina indispensable para la activación de la cinasa encargada de activar a la miosina³¹ y también inhibe a otras enzimas dependientes de calcio, como las fosfodiesterasas que intervienen en el proceso de degradación de los ácidos nucleicos a nucleótidos³².



1.3.- Importancia del calcio en los seres vivos

1.3.1. Química de coordinación y funciones biológicas del calcio^{33 y 34}

Como es bien sabido, el calcio es un elemento esencial para cualquier forma de vida ya que tiene un gran número de funciones. Como ejemplos concretos, podemos mencionar que el calcio participa en:

- A) Parte estructural de huesos de vertebrados,
- B) Interviene en los procesos de regulación de la contracción muscular,
- C) Interviene en la regulación de la secreción,
- D) Interviene en la transmisión de los impulsos nerviosos,
- E) Mantiene en niveles fisiológicos la presión osmótica,
- F) Es esencial para el movimiento del citoesqueleto,
- G) Se requiere de él en la cascada de la coagulación sanguínea,
- H) Actúa en una gran cantidad de procesos enzimáticos como segundo mensajero,
- I) Interviene en el proceso de fotosíntesis,
- J) Es cofactor enzimático,
- K) Participa en muchas de las actividades de adhesión entre las células,
- L) Interviene en el proceso de apoptosis o muerte celular programada,
- M) Participa en el sistema inmune para que este lleve a cabo sus funciones de defensa,
- N) Su presencia es vital en procesos celulares más generales, como son la motilidad, el crecimiento y la división celular, entre otras muchas funciones celulares,
- O) Es un importante activador del metabolismo oxidativo y
- P) Participa en la regulación de vías metabólicas.

En los sistemas biológicos, las concentraciones de calcio son estrictamente controladas tanto dentro de las células como en el resto de los compartimentos celulares y en los fluidos extracelulares.

En una célula en condiciones de reposo, por lo general la concentración intracelular de Ca^{2+} se mantiene en un nivel bajo, de 10^{-7}M (aunque algunos autores creen que este valor no es constante entre los diferentes tipos celulares, debido a la diversidad de funciones celulares) contra un gradiente de concentración, y el calcio extracelular está aproximadamente en 10^{-5}M . Cuando



la célula es estimulada, por ejemplo durante la contracción muscular, se produce una entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y aumenta la concentración intracelular. Los iones de calcio entonces se encuentran en un estado constante de flujo entre los diferentes compartimentos celulares y hasta entre las células. Además, si la concentración de calcio en el citoplasma alcanza el valor de 10^{-5} M, la destrucción de la célula comienza, al activarse de inmediato proteasas internas.

El calcio libre en los fluidos extracelulares es mantenido a una concentración cercana a 10^{-3} M lo cual permite a las células manipular la precipitación de carbonatos (por ejemplo los caparzones de crustáceos), fosfatos (huesos) y oxalatos (estructuras vegetales). Hacemos hincapié en la necesidad absoluta de constancia en las concentraciones de calcio libre en los organismos complejos, dada la existencia de un estrecho rango de concentraciones entre la espontánea precipitación mineral en un sitio y los niveles de calcio necesarios para el mantenimiento de las estructuras extracelulares, tales como el tejido conectivo, entre otros.

Ahora se sabe que existe un pequeñísimo rango de concentración de calcio por el cual se presenta un error de funcionamiento en el control del calcio, como el que presentan los ancianos, a decir, osteoporosis, calcificación de arterias, entre otros, los cuales requieren de una total comprensión en aras del diseño de una terapia o un programa preventivo en el control del calcio.

A escala macroscópica, este elemento tiene un papel central en el funcionamiento de los tejidos nervioso y muscular. Para que estos dos tejidos funcionen se necesitan rápidos y grandes cambios en las concentraciones de calcio. Para efectuar dichos cambios, ha evolucionado una familia de proteínas que controlan el calcio. Algunas de éstas operan en el transporte y almacenamiento, mientras que otras pueden ya sea liberar o atrapar calcio con gran rapidez en respuesta a un estímulo bioquímico específico.

El calcio(II) es un catión duro no polarizable que tiene una afinidad similar por ligantes de tipo oxo. Las proteínas que se unen al calcio poseen muchos aminoácidos que tienen funciones de carboxilato, como los ácidos aspártico y glutámico.

A partir de 1970 se consideró al calcio como otro mensajero intracelular y, más adelante, se reconoció que actúa principalmente por medio de una serie de

proteínas que tienen la capacidad de fijar el Ca^{2+} y de servir como intermediarias para su acción reguladora.

De ahí que la comprensión absoluta del mecanismo de regulación del calcio en los organismos vivos, es de suma importancia para dilucidar algunos de los procesos enlistados que aún no tienen una total explicación.

En todos los casos la estricta regulación de las concentraciones de calcio entre los diversos compartimentos celulares es indispensable para que éstas se lleven a cabo satisfactoriamente.

El calcio se encuentra en reservas específicas entre los distintos compartimentos celulares. El citoplasma, la mitocondria, el retículo endoplásmico, el núcleo y el aparato de Golgi cuentan con sus propias reservas de calcio que se mantienen en equilibrio y constantes gracias a finos sistemas de transporte. De tales datos se sabe que una de las más importantes funciones de la mitocondria consiste en mantener los niveles normales de calcio en los distintos compartimentos para de esta forma asegurar el buen funcionamiento de la célula.

Una parte del calcio intracelular se encuentra unido a nucleótidos, distintos metabolitos o ligandos, o unidos a los componentes membranales, mientras que otra porción del calcio intracelular se encuentra libre en solución en pequeña cantidad y variable en concentración. Se sabe que en realidad existe un gradiente de concentración del calcio del interior al exterior de la célula.

Actualmente se cuenta con mucha información de los mecanismos mediante los cuales se mantiene el flujo del calcio en el citoplasma de las células eucariotas. Sin embargo, permanece sin explicación el cómo los organelos son capaces de mantener los niveles de calcio constantes.

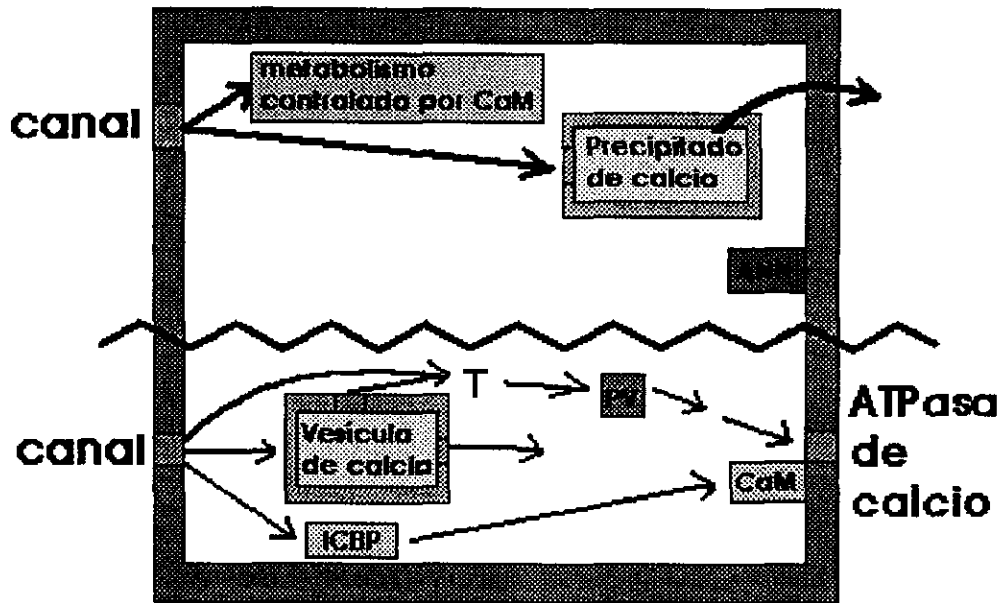


Figura 11. Este diagrama³⁴ muestra las actividades intracelulares que son reguladas por las concentraciones de calcio existentes. Se encuentran dentro de éstas el control mediante calmodulina (CaM) de procesos como el metabolismo, formación biomineral, la tensión en los microfilamentos (T), y el bombeo mediante ATPasas. La proteína anexina ANN controla la secreción de calcio de las vesículas y mantiene la interacción entre membrana y filamentos. El transporte de calcio se encuentra controlado por la proteína de unión a calcio intestinal (ICBP), y las concentraciones de calcio son controladas por la acción de la parvalbúmina (PV). W. Kaim y B. Swederski. Bioinorganic Chemistry.

El calcio es un catión divalente de gran tamaño, con un radio de 114 pm y se encuentra disponible en todo el planeta, cuyas sales más comunes son parcialmente solubles. Tiene una fuerza de enlace intermedia tanto en estructuras inorgánicas como en moléculas orgánicas, si se compara con la enorme fuerza de enlace que presentan los metales que se encuentran entre los transicionales, como es el caso del zinc, el cual es sumamente útil en el control de los cambios conformacionales y en general en muchas de las actividades celulares.

Frecuentemente, calcio y sodio se unen al mismo tipo de ligantes por poseer unos radios similares. Sin embargo, el calcio es más polarizable y puede ser distinguido por ligantes con sustituyentes hidrofóbicos.

Es necesario que los disparadores de la respuesta a las concentraciones de calcio sean rápidos y mediados mediante enlaces de fuerza intermedia, para que su efectividad sea máxima.

Los hallazgos más importantes sobre la reactividad del calcio se resumen de la siguiente manera:

1.- La capacidad de unión del calcio es selectiva como resultado de: a) su capacidad de interacción con donadores oxigenados neutros, tales como los grupos carbonilo y alcoholes, un tipo de interacción que casi nunca se presenta en la química del magnesio en solución, ejerciendo por tanto una competencia con el sodio; y b) su capacidad de unión a un gran número de centros reversiblemente, una habilidad no compartida por el magnesio ni por pequeños cationes como el zinc, cuyo radio es de 88 pm. Estos dos factores dan al calcio una capacidad de unión muy selectiva, basado principalmente en su relación carga-radio, los cuales dan origen a un agente formador de enlaces transversales ideal, como se ha observado en las estructuras de calcio de compuestos y complejos, por ejemplo en las paredes celulares y membranas biológicas.

2.- Las estructuras con calcio difieren de aquellas que cuentan con magnesio, el otro elemento divalente más importante para los seres vivos. El calcio como el potasio, sodio, estroncio, bario y la mayoría de los cationes de los lantánidos, poseen altos números de coordinación en compuestos y complejos. La geometría que los complejos presentan es generalmente distorsionada, estando controlada, tanto por la segunda esfera de coordinación y solvatación en solución, como por la primera esfera de coordinación. Esto explica porqué el calcio es utilizado en la naturaleza para la estabilización de paredes celulares y otras estructuras, ya que involucra sitios con geometría distorsionada y números de coordinación elevados, tales como los números de coordinación 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 12. Un ejemplo es el caso de la parvalbumina, una proteína de los músculos de los peces en la cual la coordinación del calcio es aproximadamente tetraédrica (figura 12).

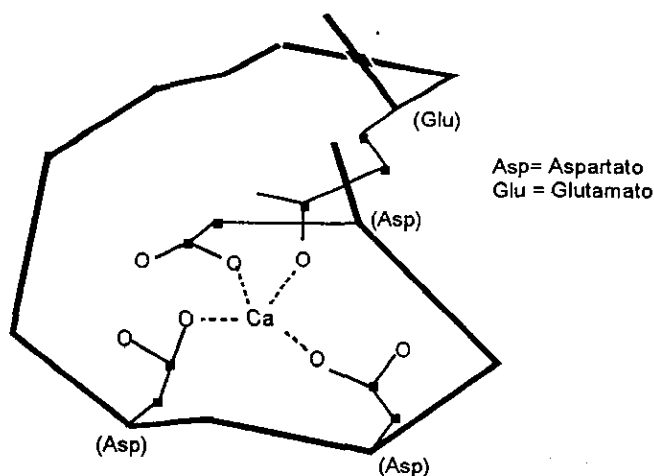


Figura 12. Representación esquemática del centro de unión del calcio en la parvalbumina. La coordinación del ion calcio es aproximadamente tetraédrica. I. S. Butler y J. F. Harrod. *Química Inorgánica*. Addison-Wesley Iberoamericana. 1992.

3.- Los estudios cinéticos muestran que el comportamiento de los complejos de calcio en los sistemas vivos es muy diferente del comportamiento de los complejos de calcio no presentes en éstos, principalmente en dos aspectos: primero, el calcio intercambia agua a un valor muy cercano del límite de difusión que es de 10^{10} s^{-1} . En segundo lugar, dentro del complejo, los ligantes en el ion de calcio mantienen movimientos fluctuantes.

1.3.2. Tipos de interacción del calcio con las proteínas³⁵

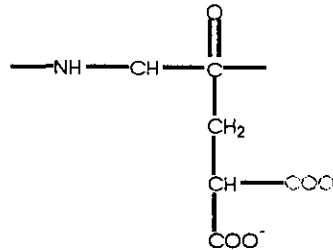
Los principales grupos donadores en las proteínas que se pueden combinar con el calcio son los centros carbonilo y oxhidrilo. Estos grupos pueden encontrarse próximos entre sí de diferentes formas, pero se conocen sólo tres estructuras diferentes básicas en las moléculas biológicas. La primera incluye un limitado grupo de donadores mantenidos próximos entre sí en la cadena proteica, donde la unión del calcio no genera la formación de enlaces transversales en la proteína entre partes lejanas de la secuencia, con el fin de favorecer la fuerza del enlace. Este es el tipo de enlace que se presenta en la calmodulina y en otras de las proteínas activadoras intracelulares. Es muy probable que durante la falta de calcio unido a los sitios de unión, éstos se mueven constantemente y dan lugar a una repulsión electrostática de considerable magnitud entre el gran número de centros negativamente cargados.

El segundo tipo de unión involucra la participación de aminoácidos localizados a posiciones distantes entre sí en la cadena proteica y depende en gran medida de la fuerza del enlace para dar lugar a una cavidad inmóvil para el calcio. Un ejemplo de este tipo de estructura se encuentra en la fosfolipasa A_2 . Las relevantes diferencias entre estos dos tipos de sitios de unión se deben a: 1) el efecto del calcio en las estructuras y 2) la velocidad de activación de las reacciones. Este sitio de unión que no presenta una gran tensión, se entaza rápidamente al calcio, generando un ajuste considerable de la estructura de la proteína terciaria.

La bien definida cavidad del sitio de unión del calcio lo incorpora lentamente, lo que no representa virtualmente un cambio conformacional.

El tercer tipo de sitio de unión de calcio contiene una gran serie de aniones en la superficie, muchas veces pertenecientes a polímeros tomados al azar, los cuales se mantienen enlazados a la cadena y entre los cuales el calcio es capaz de viajar rápidamente, como ejemplos se tienen a algunas fosfoproteínas, las glucoproteínas aniónicas del tejido conectivo y los péptidos que muestran en su estructura al gama-carboxiglutamato tales como la protrombina y la proteína ósea osteocalcina.

Las proteínas Gla (que poseen γ -carboxiglutamato) requieren de vitamina K para su biosíntesis, y en particular para la formación de los residuos γ -carboxiglutamato (figura 13). El grupo γ -carboxiglutamato parece ser un excelente sitio de unión del calcio³⁶.



γ -Carboxiglutamato

Figura 13. Representación esquemática del grupo γ -carboxiglutamato

A la fecha se ha aislado un gran número de proteínas las cuales necesitan interaccionar con el calcio para llevar a cabo sus funciones, de fuentes tanto intracelulares como extracelulares³⁷⁻⁴³. Todas ellas están involucradas en los procesos de almacenamiento del calcio, en el mantenimiento de las concentraciones constantes de calcio en los diferentes compartimentos celulares y en el disparo de un amplio rango de procesos que involucran el transporte membranar, secreción y acciones enzimáticas. Algunas de las proteínas de este tipo más importantes se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 1 Algunas proteínas relacionadas con el calcio

Proteína	Función
Protrombina	Disparador extracelular
Calmodulina	Disparador intracelular de enzimas y bombas
Troponina C	Disparador de sistemas de contracción
Miocinasa	Disparador de algunas células musculares
S100	Disparador de células nerviosas
Calcineurina	Fosfoproteínofatasas
CaBp intestinal	Transporte de calcio
Parvalbumina	Modulados de las concentraciones de calcio
Calsequestrina	Almacenaje intracelular
Calelectrina	Promoción de agregación membranar
Proteínas del Hueso	Proteínas Gla
Proteínas Salivales	Protección dental (ricas en prolina)
Esteriferina	

1.3.3. El calcio como estabilizante estructural

Se ha reportado una gran cantidad de estructuras biológicas en las cuales el calcio es de vital importancia para el mantenimiento de las mismas. Los iones de calcio son necesarios para enlazar los compuestos agregados de 24 subunidades del acarreador hemocianina de *Limulus polyphemus* en la molécula de conformación nativa constituida por 48 subunidades⁴⁴. Probablemente por el carácter divalente del calcio, éste puede enlazarse a los grupos negativos de las subunidades. Esta es la misma explicación que se ha sugerido para la estabilización de la hemoglobina gigante llamada eritrocruorina⁴⁵.

Aunque se sabe de la existencia de Mg^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} en las paredes celulares bacterianas, parece ser de particular importancia la presencia del calcio en estas estructuras para el mantenimiento de su integridad, probablemente por su capacidad de enlazar grupos carboxilatos. La incubación de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de EDTA un agente secuestrador del calcio, genera especies osmóticamente frágiles, las cuales pueden ser restauradas mediante la posterior incorporación de calcio al medio de cultivo.

1.4.-Transporte de calcio y regulación de sus concentraciones en la célula

El aumento o la disminución de la concentración de calcio ya sea en el interior de la célula (figura 14) o en los líquidos extracelulares pueden disparar una gran cantidad de procesos fisiológicos y bioquímicos.

Para la mejor comprensión de los procesos es necesario entender cómo el calcio es capaz de acceder al interior de las células, conocer el sitio de unión del calcio en las estructuras celulares, determinar cómo es que se realizan las actividades subsecuentes a esta interacción y cómo el calcio es removido o almacenado del citoplasma o de los organelos.

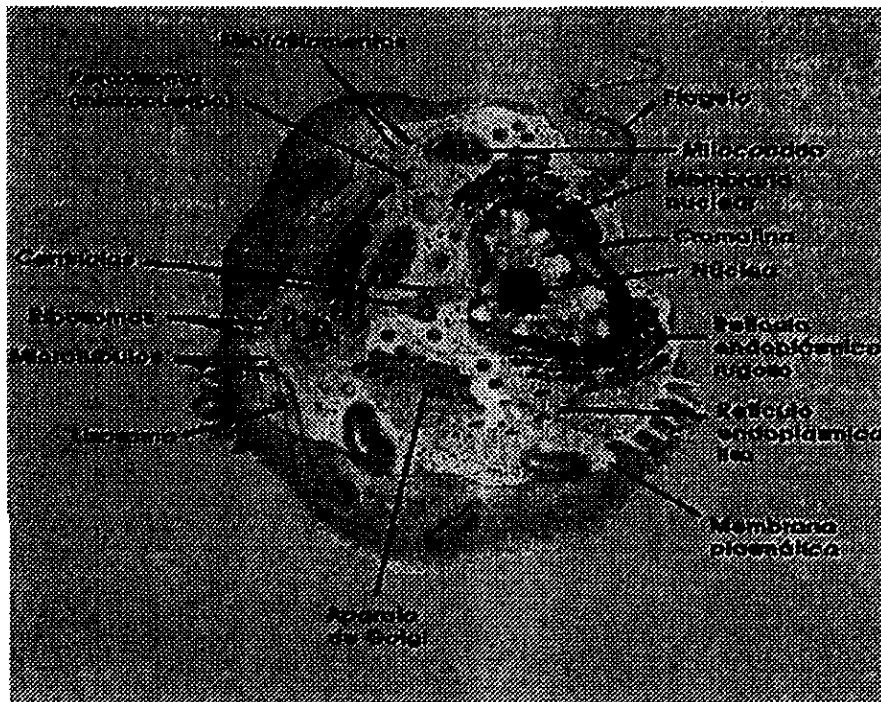


Figura 14. Representación general de una célula eucariota, donde se muestran las principales estructuras que la conforman. Voet D, *BIOQUÍMICA*. Ed. Omega.1990.

El Ca^{2+} actúa a menudo como segundo mensajero, de manera similar al AMPc. Un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica provoca numerosas respuestas celulares, incluyendo la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la degradación de glucógeno. Además el calcio es un importante activador del mecanismo oxidativo.

En espacios extracelulares, la $[\text{Ca}^{2+}]$ (aprox $1500 \mu\text{M}$) es cuatro órdenes de magnitud superior a las concentraciones en el citosol (aprox $0.1 \mu\text{M}$). Este importante gradiente de concentración se mantiene mediante el transporte activo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, el retículo endoplásmico (retículo sarcoplásmico en el músculo) y la membrana mitocondrial interna.

La membrana plasmática y el retículo endoplásmico contienen ambos una Ca^{2+} -ATPasa que bombea activamente el Ca^{2+} fuera del citosol a expensas de la hidrólisis de ATP^{46 y 47}. Sus mecanismos cinéticos son muy similares a los de la (Na^+-K^+) -ATPasa. De hecho, hay una similitud significativa entre estas proteínas, sugiriendo que provienen de un antepasado común (figura 15).

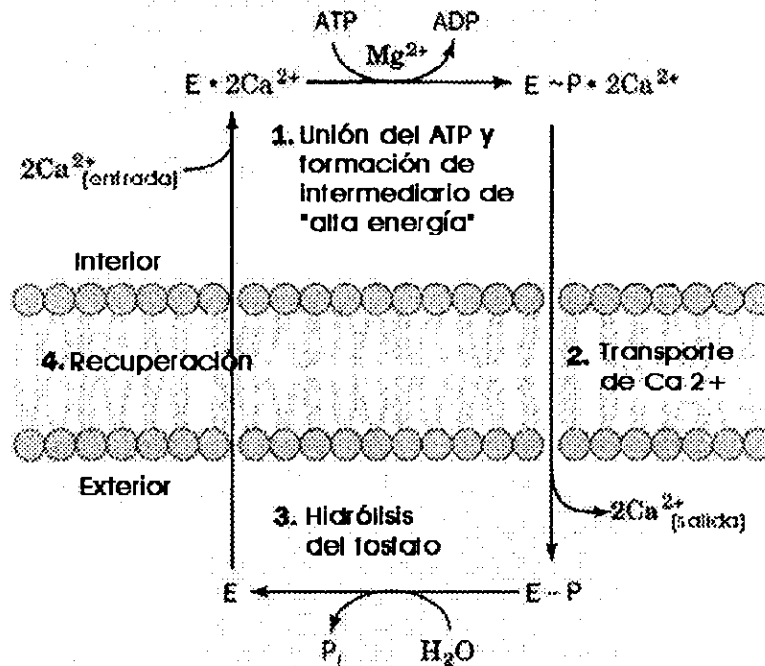


Figura 15. Mecanismo cinético de la Ca^{2+} -ATPasa. En este caso entrada se refiere al citosol y salida se refiere a la parte exterior de la célula para la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática o al lumen del retículo endoplásmico (retículo sarcoplásmico) para la Ca^{2+} -ATPasa de dicha membrana. Voet D. *Bioquímica*. Ed. Omega.1990

Para que una célula se mantenga en su estado fisiológico característico, debe regular las actividades de sus bombas iónicas con precisión. La regulación de la bomba de Ca^{2+} en la membrana plasmática se controla por el nivel de Ca^{2+} , mediado por calmodulina (CaM). Esta proteína eucariótica ubicua, que une Ca^{2+} , participa en numerosos procesos reguladores celulares, señalando el nivel de Ca^{2+} a una gran variedad de proteínas, incluyendo las bombas de calcio, las proteínas quinasas y las proteínas responsables de la motilidad. La secuencia de 148 restos de CaM, muy conservada, presenta el rasgo característico de que la Lys 115 está trimetilada, de modo que su amina cuaternaria se encuentra siempre cargada positivamente. La proteína, cuya estructura de rayos-X fue determinada por Charles Bugg, tiene una curiosa estructura en forma de pesas, que consiste en dos dominios globulares conectados por una hélice α con siete vueltas.

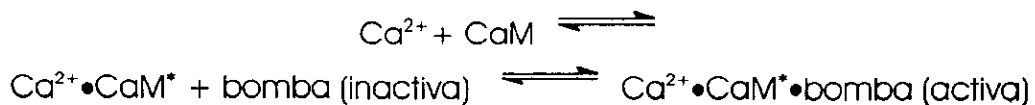
La calmodulina tiene cuatro sitios de fijación de Ca^{2+} de elevada afinidad, dos en cada uno de sus dominios globulares. Todos ellos están formados por motivos hélice-lazo-hélice casi superponibles, conocidos como manos EF, también presentes en otras proteínas fijadoras de Ca^{2+} de estructuras conocidas. En cada uno de estos sitios, el ion Ca^{2+} está coordinado octaédricamente por átomos de oxígeno de la cadena principal y de las cadenas laterales de la región del lazo,



así como de una molécula de agua asociada a la proteína. La unión del Ca^{2+} a cualquiera de los dominios de CaM induce un cambio conformacional en dicho dominio, de forma que resulta expuesta una región hidrofóbica rica en Met, que de otro modo se hallaría oculta. Esta región, a su vez, se une con elevada afinidad, aunque con amplia especificidad de secuencia, a las hélices α básicas anfífilas de las proteínas diana y, con ello, modula las actividades de estas proteínas. De hecho, segmentos de estas hélices de aproximadamente 20 residuos, así como hélices anfífilas compuestas sólo de restos de Leu, Lys y Trp, se unen a CaM tan fuertemente como las mismas proteínas diana. La amplia especificidad de secuencia de CaM se explica, en parte, por la flexibilidad de sus cadenas laterales de Met, que se cree permiten que sus fragmentos hidrofóbicos se adapten a una variedad de cadenas laterales hidrofóbicas en las hélices anfífilas de las proteínas diana³⁶.

A pesar de la apariencia extendida de CaM, en su estructura de rayos-X, varios estudios recientes indican que sus dominios globulares pueden unirse simultáneamente a una única hélice diana. Evidentemente, la hélice α central de CaM sirve más como una atadura flexible que como un espaciador rígido, propiedad que probablemente hace crecer aún más la variedad de secuencias diana a las cuales puede unirse CaM.

La Ca^{2+} -calmodulina activa la Ca^{2+} -ATPasa de las membranas plasmáticas. La activación, tal como se deduce del estudio de la ATPasa aislada, da lugar a una disminución en su K_M para el Ca^{2+} desde 20 a $0.5 \mu\text{M}$. Así el Ca^{2+} regula su propia concentración citoplasmática de la siguiente manera: A niveles de Ca^{2+} por debajo de la constante de disociación de la calmodulina para el Ca^{2+} , aproximadamente de $1 \mu\text{M}$, la Ca^{2+} -ATPasa es relativamente inactiva. Sin embargo, si la $[\text{Ca}^{2+}]$ aumenta hasta este nivel, el Ca^{2+} se une a la calmodulina que, a su vez, se une y activa a la bomba de Ca^{2+} :



(CaM* indica calmodulina activada). Esta interacción disminuye la K_M de la bomba para el Ca^{2+} hasta un valor por debajo de la $[\text{Ca}^{2+}]$ del ambiente, haciendo, así, que el Ca^{2+} sea bombeado fuera del citosol. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ disminuye suficientemente, el Ca^{2+} se disocia de la calmodulina y esta serie de sucesos se invierte, inactivando así la bomba. El sistema completo es, por tanto, análogo a la bomba del sumidero de un sótano que se activa automáticamente mediante una boya cuando el agua alcanza un nivel determinado.

1.5.- Transporte de calcio en la membrana interna de la mitocondria de mamíferos

1.5.1. Mitocondria. Características y funciones³⁶

Las mitocondrias (del griego: *mitos*, filamento + *chondros*, gránulo) son el lugar en el que se verifica la respiración celular (metabolismo aerobio) en casi todos los eucariotas. Estos orgánulos citoplásmicos, que son lo suficientemente grandes para haber sido descubiertos por los citólogos del siglo XIX, varían de tamaño y de forma pero, con frecuencia, son elipsoidales con dimensiones de alrededor de 1.0 x 2.0 μm , casi como una bacteria (figura 16). Una célula eucariótica contiene típicamente del orden de 2,000 mitocondrias que ocupan aproximadamente, una quinta parte del volumen celular total.

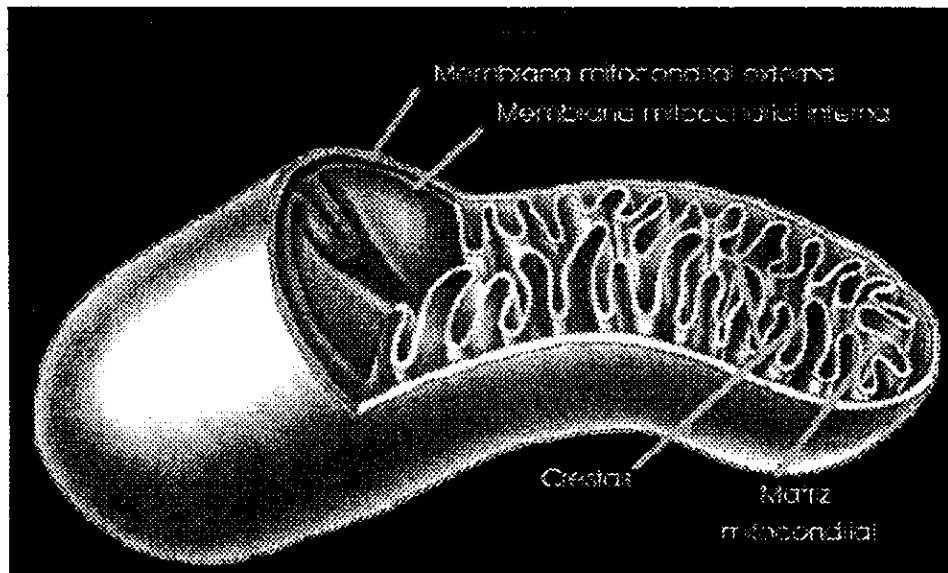


Figura 16. Representación general de una mitocondria eucariota, donde se muestran las principales estructuras que la conforman. Voet D. *BIOQUÍMICA*. Ed. Omega.1990

Las mitocondrias, tal como lo revelaron desde un principio los estudios de microscopía electrónica efectuados por George Palade y Fritjof Sjöstrand, poseen dos membranas: una membrana exterior lisa y una membrana interna muy plegada cuyas invaginaciones reciben el nombre de crestas. Las mitocondrias contienen, de este modo, dos compartimentos, el espacio intermembranoso y el espacio de la matriz interna. Las enzimas que catalizan las reacciones de la respiración son componentes o de la matriz gelatinosa o de la membrana mitocondrial interna. Estas enzimas acoplan la oxidación productora de energía de los nutrientes, con la síntesis del trifosfato de adenosina (ATP) que

precisa energía. El trifosfato de adenosina, después de que ha sido exportado al resto de la célula, alimenta sus diversos procesos que consumen energía⁴⁶.

Las mitocondrias son semejantes a las bacterias en algo más que tamaño y la forma. El espacio de la matriz contiene DNA específico de la mitocondria, RNA y ribosomas que participan en la síntesis de varios componentes mitocondriales. Además, se reproducen por fisión binaria y los procesos respiratorios en los que intervienen muestran un notable parecido con los de las bacterias aeróbicas modernas. Estas observaciones conducen a la hipótesis defendida por Lynn Margulis, ampliamente aceptada en la actualidad, de que la mitocondria evolucionó desde una bacteria aeróbica que vivía libre originalmente y que estableció una relación simbiótica con un eucariota anaerobio primitivo. Los nutrientes suministrados por el eucariota y consumidos por la bacteria fueron, probablemente, compensados varias veces por el eficaz metabolismo oxidante que la bacteria confería al eucariota. Esta hipótesis está confirmada por la observación de que la ameba *Pelomyxa pelustris*, uno de los pocos eucariotas que carecen de mitocondrias, hospeda permanentemente bacterias aeróbicas con las que establece una relación simbiótica de este tipo.

Así, como ya lo mencionamos con anterioridad, la mitocondria es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo eucariótico. Contiene, como Albert Lehninger y Eugene Kennedy demostraron en 1948, las enzimas que median este proceso, incluyendo la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico, las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox implicadas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. Es pues con razón que se describe a la mitocondria como la central "productora de energía" de la célula.

La membrana interna de la mitocondria presenta una gran cantidad de invaginaciones. El número de invaginaciones, denominadas crestas, varía con la actividad respiratoria del tipo particular de célula. Ello es debido a que las proteínas que median el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están unidas a la membrana mitocondrial interna, de modo que la tasa de respiración varía con el área de la superficie de la membrana. El hígado, por ejemplo, que tiene una tasa de respiración más o menos baja, contiene mitocondrias con relativamente pocas crestas, mientras que las células del músculo cardíaco contienen muchas. No obstante, el área total de las membranas mitocondriales internas en una célula hepática es aproximadamente unas 15 veces mayor que la de su membrana plasmática. El compartimento mitocondrial interno consiste en una sustancia de apariencia gelatinosa con menos de 50% de agua, denominada matriz, que contiene concentraciones notablemente elevadas de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, así como sustratos, cofactores nucleotídicos e iones inorgánicos.

La matriz contiene también la maquinaria genética mitocondrial -DNA, RNA y ribosomas- que genera algunas proteínas mitocondriales (pero de ningún modo todas).

La membrana mitocondrial externa contiene porina, una proteína que forma poros no específicos, que permiten la libre difusión de moléculas de hasta 10 kD.

La membrana interna, que contiene aproximadamente 75% en peso de proteínas, es considerablemente más rica en proteínas que la membrana externa. Sólo es completamente permeable al O_2 , CO_2 y H_2O y contiene, además de las proteínas de la cadena respiratoria, numerosas proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} y fosfato. Esta impermeabilidad controlada de la membrana mitocondrial interna a la mayoría de los iones, metabolitos y compuestos de masa molecular pequeña permite la generación de gradientes iónicos a través de esta barrera y da lugar a la división en compartimentos de funciones metabólicas entre el citosol y la mitocondria. Los tres principales fosfolípidos constituyentes de la membrana interna de la mitocondrias son lecitina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina.

1.5.2. Nuevos conocimientos del transporte de calcio mitocondrial^{36, 48 y 49}

En cuanto al transporte del calcio, los adelantos que se han obtenido a lo largo del tiempo, en parte se han logrado mediante la aplicación de agentes inhibidores del transporte de calcio, entre ellos el rojo de rutenio, llegándose a reunir la siguiente evidencia.

Puesto que el Ca^{2+} , al igual que el AMPc, funciona como segundo mensajero, su concentración citosólica debe controlarse con precisión.

La mitocondria, el retículo endoplásmico y los espacios extracelulares actúan como depósitos de almacenamiento de calcio. Los sistemas de transporte de la membrana mitocondrial interna median separadamente la entrada y la salida de Ca^{2+} (figura 17).

La entrada de Ca^{2+} la impulsa el potencial de membrana de la membrana mitocondrial interna (negativo en el interior), que atrae los iones cargados positivamente. La velocidad de entrada varía con la $[Ca^{2+}]$ externa porque la K_M del transporte de Ca^{2+} para este sistema es mayor que la concentración de Ca^{2+} citosólica^{50 y 51}.

CAPITULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- A) Realizar la síntesis y caracterización de compuestos análogos al rojo de rutenio, determinar su actividad en el transporte de calcio mitocondrial en mamífero y establecer el mecanismo de acción en este sistema biológico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A. Realizar una completa búsqueda bibliográfica sobre el rojo de rutenio y compuestos análogos,
- B. Sintetizar compuestos análogos al rojo de rutenio,
- C. Sobre la base de los resultados obtenidos afinar la ruta de síntesis,
- D. Caracterizar químicamente los derivados que de tal ruta de síntesis surjan,
- E. Proporcionar conocimientos sobre la reactividad química de este tipo de compuestos,
- F. Probar la actividad biológica de los análogos sintetizados y establecer un patrón estructura-actividad biológica,
- G. Esclarecer el mecanismo de inhibición del rojo de rutenio y compuestos análogos en el transporte de calcio que se verifica en la membrana interna de la mitocondria
- H. Aislar la proteína transportadora de calcio,
- I. Buscar posibles aplicaciones a los conocimientos obtenidos.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Reactivos

Los reactivos utilizados son rojo de rutenio (cloruro de di- μ -oxo-bis(pentamminrutenio(III)) tetramminrutenio(IV), 1,10-fenantrolina monohidratada, hexafluorofosfato de amonio, tetrafenilborato de sodio y sulfato de calcio obtenidos de Aldrich Chem. Co. Un lote de fenantrolina se obtuvo también de Mallinckrodt.

El hidróxido de amonio e hidróxido de sodio (perlas), se obtuvieron de la casa comercial J. T. Baker.

Finalmente el carbonato de amonio grado reactivo se obtuvo de Mallinckrodt.

En lo que respecta a los disolventes tanto el metanol anhidro grado reactivo (>99%) como etanol anhidro grado reactivo (>99%) se obtuvieron de Merck o Aldrich Chem. Co.

3.2.- Técnicas y equipos utilizados

Análisis Elemental: Las determinaciones del contenido de C, H, N, Cl y P fueron realizadas en un microanalizador elemental, en los laboratorios Christopher Ingold de la Universidad de Londres, Inglaterra.

Espectroscopía Infrarroja: Los espectros de infrarrojo de los compuestos, en pastillas de KBr, en el intervalo de 4000-450 cm^{-1} , se obtuvieron con el espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 599 B en la USAI de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resonancia magnética nuclear: Los espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , RMN- ^{19}F y RMN- ^{31}P a 300 y 500 MHz en DMSO deuterado se obtuvieron a temperatura ambiente en un equipo Varian VXR 30-S, del Instituto de Química y en un equipo Varian Unity Inova, en la USAI de la Facultad de Química de la UNAM.

Espectroscopía electrónica: Los espectros UV-Vis de los compuestos sintetizados y del rojo de rutenio se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett Packard 8452, en solución acuosa empleando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los espectros en estado sólido (reflectancia difusa) se obtuvieron a temperatura ambiente en un equipo Varian Cary 5E UV-Vis-NIR.

Conductancia molar: Las medidas de conductancia molar de los nuevos compuestos sintetizados se hicieron en soluciones acuosas a 25°C en el Conductímetro de Hanna Instruments modelo HI 8033.

Determinación del punto de fusión: Las determinaciones del punto de fusión se realizaron en un aparato de puntos de fusión Fisher-Johns, modelo 4020.

3.3.- Procedimiento de síntesis de los análogos al rojo de rutenio

Para llevar a cabo la síntesis de compuestos análogos al rojo de rutenio iniciamos una extensa búsqueda bibliográfica relacionada con las propiedades químicas del rojo de rutenio, para de esta forma poder diseñar la más conveniente ruta de síntesis. También se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica con relación a la síntesis y caracterización de compuestos análogos al rojo de rutenio por un lado y, por otro, buscamos en la bibliografía las últimas aplicaciones biológicas descubiertas en el rojo de rutenio y en compuestos análogos a éste.

En vista de la información obtenida se diseñó una ruta de síntesis innovadora, que nos permitió sintetizar los compuestos análogos al rojo de rutenio.

Después, fue necesario estudiar toda la evidencia experimental existente hasta la fecha respecto al efecto inhibitor del rojo de rutenio, en el transporte de calcio de la membrana interna de la mitocondria, en células de mamífero, con el fin de sintetizar los compuestos análogos que aportaran más información sobre el mecanismo de acción en el transporte de calcio.

Determinamos que el efecto de la conformación, el tamaño, la aromaticidad y la carga eran los factores más relevantes del efecto del rojo de rutenio en el transporte de calcio mitocondrial, así que decidimos modificar la estructura del rojo de rutenio mediante la sustitución de ligantes que presentaran estas características.

De la evidencia experimental reportada en la bibliografía nos percatamos de que la precipitación y cristalización del rojo de rutenio¹³ y del compuesto

contiene a las mitocondrias, con una solución de KCl 0.1 M, ya con el calcio marcado que lograron incorporar a la matriz mitocondrial en ese tiempo. El objetivo de este lavado es eliminar el calcio marcado que no se incorporó pero que puede permanecer adherido a la membrana mitocondrial externa, el cual genera resultados falsamente elevados de la cantidad de calcio incorporada por la mitocondria.

6.- En el papel filtro, que contiene a las mitocondrias con el calcio marcado incluido en la matriz mitocondrial, se mide entonces el número de cuentas por minuto que registra como consecuencia de la incorporación del calcio radiactivo.

7.- Se hace el mismo tipo de ensayo, pero para determinar la actividad del rojo de rutenio éste es adicionado al medio en el cual se incuban las mitocondrias, y se determina mediante el mismo procedimiento la cantidad de calcio radiactivo que permitió el rojo de rutenio que las mitocondrias incorporaran. El rojo de rutenio es adicionado como soluciones de diferentes concentraciones, para de esta forma establecer la concentración de rojo de rutenio que genera la mayor inhibición, generándose una curva patrón, la cual es empleada para compararla con el comportamiento que cada uno de los compuestos análogos muestra.

8.- Los datos obtenidos son analizados como estudios de cinética enzimática para de esta forma establecer datos importantes como lo son la I_{50} y la K_i , donde la constante de inhibición es el valor que se utiliza como parámetro del efecto inhibitor de tales compuestos y mediante la que se hace la comparación del efecto inhibitor del rojo de rutenio con los diferentes análogos.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Caracterización del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolina rutenio(IV), RRPhen1

4.1.1. Propiedades físicas

Este producto es estable bajo condiciones ambientales. El rendimiento calculado para la reacción fue del 46 %.

El compuesto obtenido muestra una coloración gris verdosa opaca, pero al microscopio es posible observar la apariencia microcristalina de éste. A continuación se presenta la tabla 1 en la cual resumimos sus principales propiedades físicas:

TABLA 1. Propiedades físicas de RRPhen1

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad
$C_{72}O_2Ru_3N_{20}H_{72}Cl_3(PF_6)_3$	2094.12	Gris verdoso microcristalino	Agua (púrpura) + + +
			Acetona (púrpura) + + +
			Metanol (verde) + + +
			Acetonitrilo (verde) + +
			Etanol +
			Diclorometano +
			Hexano +
			CS ₂ (púrpura) +

+ insoluble, ++ parcialmente soluble y +++ soluble

Como es posible observar de la tabla, se trata de un compuesto soluble en la mayoría de los disolventes polares, presentando adicionalmente propiedades coloridas singulares, ya que las soluciones acuosas adquieren una coloración púrpura, mientras que las soluciones en metanol son verdes.

Este compuesto descompone por arriba de 250 °C.

También determinamos que la adición de HCl a una solución acuosa de este compuesto acelera su proceso de oxidación, mientras que la adición de una solución concentrada de sosa genera la decoloración de la solución.

El producto obtenido se caracterizó por medio de análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de flúor, espectroscopía UV-Vis en sólido (reflectancia difusa) y en solución y conductancia molar.

De acuerdo a la ruta de síntesis, es necesario disolver el rojo de rutenio (0.3 g) en la mínima cantidad de agua (aprox. 10 mL), bajo corriente de nitrógeno, para evitar al máximo la posible oxidación de este compuesto al análogo café.

Sin embargo es conveniente mencionar que nuestra experiencia dicta que la oxidación no se efectúa tan rápidamente como en la bibliografía se ha mencionado, aún cuando hemos tomado en todos los casos esta precaución.

La solución inmediatamente es filtrada bajo atmósfera de nitrógeno, nuevamente con la finalidad de prevenir la formación adicional de café de rutenio por la exposición del reactivo con el aire. La filtración del rojo de rutenio disuelto en agua se hace con el fin de separar cualquier impureza insoluble que el reactivo pudiera contener¹⁴.

La solución recién filtrada de rojo de rutenio se adiciona a un matraz bola en el cual se encuentra la fenantrolina previamente disuelta en metanol (30 mL).

En esta síntesis decidimos adicionar la fenantrolina en relación 4:1 respecto al rojo de rutenio, con el fin de llevar a cabo la sustitución de algunas de las posiciones en la estructura metálica.

Una vez con ambos reactivos en el matraz de reacción, se cierra rápidamente el sistema y se procede a mantener la mezcla de reacción en agitación constante durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno, empleando por ello la línea de vacío.

La reacción se lleva a cabo en una atmósfera inerte de N_2 , ya que como se ha reportado es posible que el oxígeno ambiental sea capaz de oxidar al rojo de rutenio a café de rutenio, modificándose de esta manera la valencia del catión, lo que resultaría inconveniente para nuestros propósitos.

En esta reacción, la experiencia nos ha dictado que es muy importante conservar estrictamente las cantidades o proporciones de los diferentes reactivos, no alterar los tiempos de reacción como tampoco las temperaturas de reacción, ya que por ejemplo encontramos que un incremento de la temperatura (por arriba de $70^\circ C$) de la solución acuosa del rojo de rutenio acelera su oxidación al café de rutenio y un calentamiento, por arriba de $100^\circ C$ genera la descomposición del rojo de rutenio.

Una vez adicionado el contraión con el fin de facilitar la precipitación de compuesto, al proceder a eliminar el exceso de disolvente mediante vacío pudimos observar la formación de un precipitado oscuro que al secarse por completo adquirió una coloración gris verdoso.

Este sólido se lavó exhaustivamente bajo una corriente de nitrógeno con etanol dado que resultó insoluble el producto. De esta forma pudimos eliminar fácilmente la fenantrolina remanente, no coordinada a la estructura metálica.

4.1.2. Análisis elemental

En la tabla 2 se da la fórmula mínima calculada a partir de los resultados del análisis elemental.

TABLA 2. Análisis Elemental de RRPhen1.

Elemento	C	N	H
% Experimental	42.10	13.64	3.61
% Teórico	41.26	13.37	3.47

De los cuales se propone la fórmula mínima $C_{72}O_2Ru_3N_{20}H_{72}Cl_3(PF_6)_3$ con un peso molecular de 2094.12, lo que representa la coordinación de 6 moléculas de fenantrolina a la estructura metálica.

De esta forma, se propone que los rutenios se encuentran unidos a 8 grupos aminos remanentes y los contraiones que se presentan en cada una de las moléculas del análogo del rojo de rutenio son tres cloruros por tres PF_6 .

4.1.3. Espectroscopía de Infrarrojo

En los espectros de Infrarrojo (figuras 3 y 4) podemos observar que, en el compuesto RRPhen1, la sustitución de las fenantrolinas fue exitosa, pues el espectro de RRPhen1 muestra las bandas de vibración características de la fenantrolina (figura 2), con un ligero corrimiento respecto a las bandas en ésta, lo cual indica que la coordinación de la fenantrolina se efectuó. Además, en el espectro se observan las bandas características de los modos de vibración de los grupos amino, coordinados al rojo de rutenio (figura 1).

En términos generales, podemos observar en el espectro de RRPhen1 que la mayoría de las bandas características de las materias primas están presentes en el RRPhen1 y muestran un ligero corrimiento respecto a las frecuencias reportadas en el caso de cada una de las materiales de partida, de tal forma,

se sugiere que la coordinación de las fenantrolinas a la estructura metálica se llevó a cabo.

El espectro IR del rojo de rutenio (figura 1) muestra bandas generadas por todos los modos de vibración del grupo amino⁵⁸. En este espectro podemos observar las bandas asignadas a la vibración de elongación simétrica a $3228-3144\text{ cm}^{-1}$, la vibración de deformación degenerada, presente a 1616 cm^{-1} y de deformación simétrica ubicada a 1298 cm^{-1} , como también la vibración tipo "rocking", localizada a 804 cm^{-1} . Los datos se recopilaron en la Tabla 3.

En la fenantrolina (figura 2), las bandas más importantes son las correspondientes a la vibración del anillo aromático como es la banda de elongación del enlace =C-H presente a 3058 cm^{-1} , la serie de bandas de elongación simétrica localizadas entre 1600 y 1500 cm^{-1} generadas por el enlace C=C, las bandas de deformación en el plano del enlace =C-H localizadas a 1216 , 1138 y 1090 cm^{-1} , y las bandas fuera del plano presentes a 854 y 738 cm^{-1} . La Tabla 3a resume esta información.

Es importante mencionar que las bandas intensas localizadas a 831 y 560 cm^{-1} , en el espectro del compuesto análogo (figura 3 y 4), corresponden al contraión: el hexafluorofosfato de amonio (figura 5). Sin embargo, estas bandas características del contraión se superponen a una banda característica del rojo de rutenio, la banda de deformación tipo "rocking" del enlace N-H de los grupos amino, localizada a 804 cm^{-1} y a dos bandas características de la fenantrolina que son las localizadas a 854 y 738 cm^{-1} , correspondientes como antes se ha mencionado a las bandas de deformación fuera del plano del enlace =C-H.

La asignación de las bandas presentes en el hexafluorofosfato de amonio se resume en la siguiente tabla⁵⁸:

TABLA 3. Principales bandas en el hexafluorofosfato de amonio

BANDAS	NH_4PF_6 (cm^{-1})
$\nu_{\text{N-H}}$	3132
$\delta_{\text{N-H}}$	3040 y 1425
$\nu\text{ P-F}$	830
$\delta\text{ F-P-F}$	562

En el espectro de infrarrojo del rojo de rutenio (figura 1), se observa una banda adicional a 1852 cm^{-1} que no corresponde al rojo de rutenio, sino a una impureza, que es un derivado nitrosilado de rutenio.

El análogo contiene a la impureza en una cantidad muy pequeña, constituida por el derivado nitrosilado de rutenio, ya que el infrarrojo muestra una señal débil, característica de la vibración N-O, localizada a 1852 cm^{-1} .

La banda de vibración N-O simétrica se presenta, aproximadamente, entre 1910 y 1810 cm^{-1} , mientras que la banda de vibración Ru-NO simétrica se presenta generalmente entre 615 y 600 cm^{-1} , se conoce también la existencia de la banda localizada entre 590 - 560 cm^{-1} asignada a la vibración Ru-NO tipo "rocking"⁶¹⁻⁶⁴.

En el espectro de la fenantrolina (figura 2) se pueden observar dos bandas una muy intensa a 3382 asignada a la vibración de elongación simétrica del enlace O-H del agua y una de mediana intensidad a 1642 cm^{-1} que corresponde a la vibración O-H fuera del plano y esto es consistente con la presencia en la materia prima de una molécula de agua de cristalización.

Tales señales del agua de cristalización en la fenantrolina pura, no se presentan en el espectro de RRPhen1. Esto es una evidencia más del cambio en la fenantrolina lo que indica que la esta se coordinó a la estructura metálica.

TABLA 3a. Principales bandas en Infrarrojo de RRPhen1^{58,59}

BANDAS	ROJO DE RUTENIO	FENANTROLINA	RRPhen1
$\nu\text{ NH}_2$	3228,3144		3300-3100
$\delta_s\text{ NH}_2$	1616		1618
$\delta_a\text{ NH}_2$	1299		1296
$\rho\text{ NH}_2$	805		831 cubierta
$\nu\text{ Ru-NO}$	1852		1852
$\nu\text{ N-O}$	610		No presente
$\nu\text{ =C-H}$		3058	3059
$\delta\text{ =C-H}$ en plano		1216,1138,1090	1218,1140,1098
$\delta\text{ =C-H}$ fuera del plano		854	831 cubierta
$\delta\text{ =C-H}$ fuera del plano		738	730
$\nu\text{ C=C}$ $\nu\text{ C=N}$		1586,1502 y 1422	1598 y 1510,1422
$\nu\text{ C-H}$		2920,2851	2918, 2840

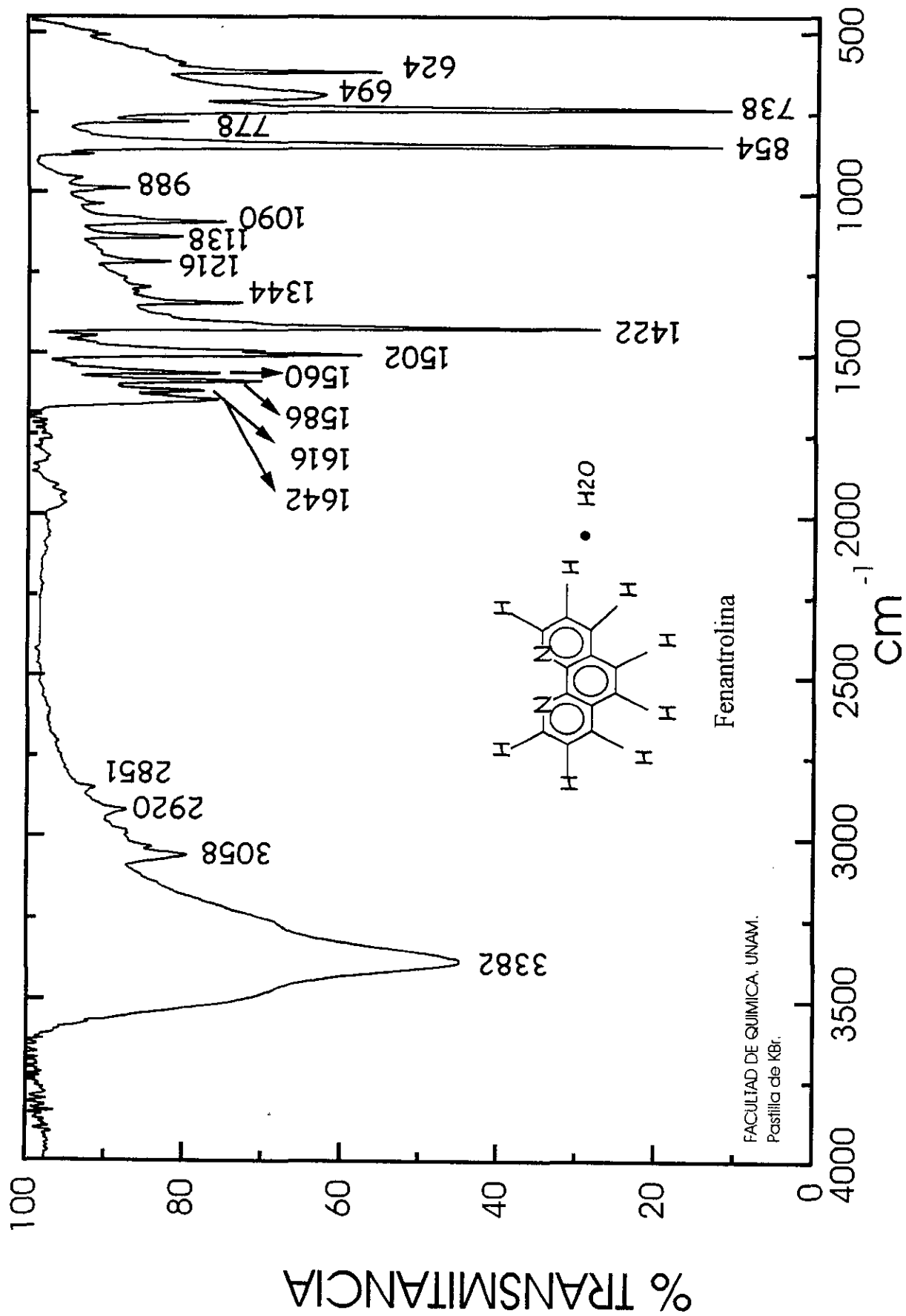


Figura 2. Espectro de infrarrojo en la región media del IR de la Fenantrolina en KBr

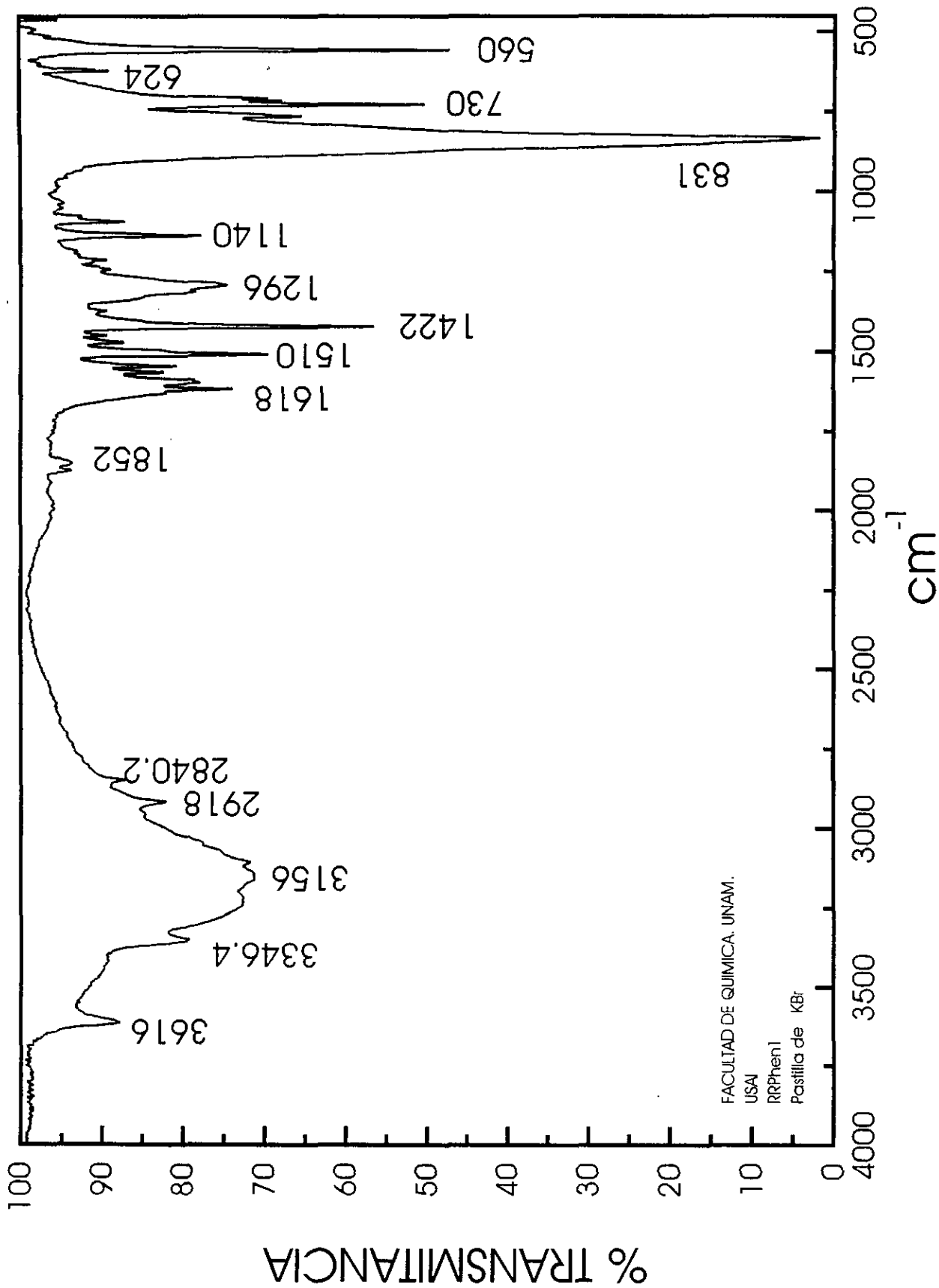


Figura 3. Espectro infrarrojo en la región media del IR de RRPhen1 en KBr

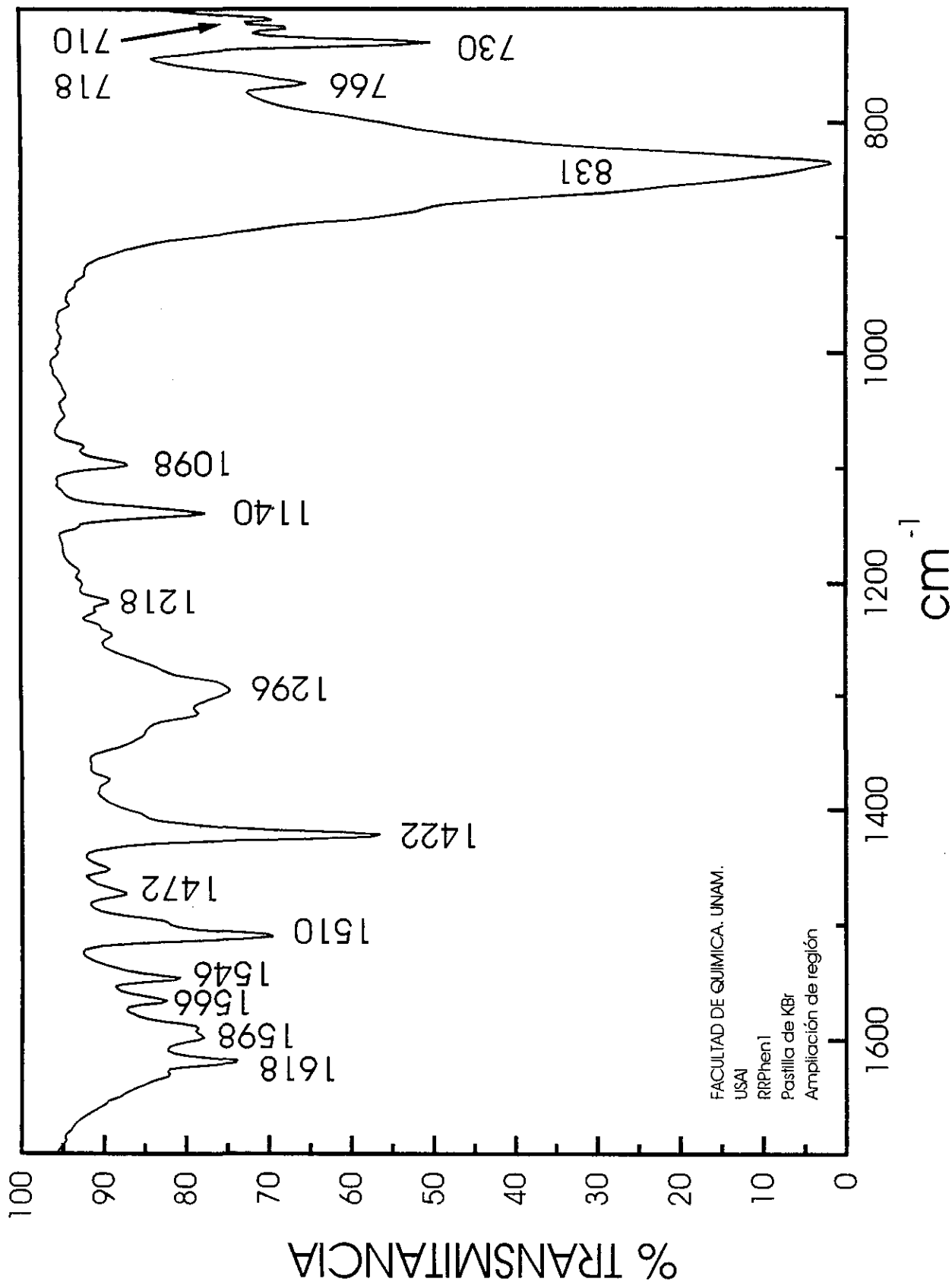


Figura 4. Espectro infrarrojo en la región media del IR de RRPhen1 en KBr

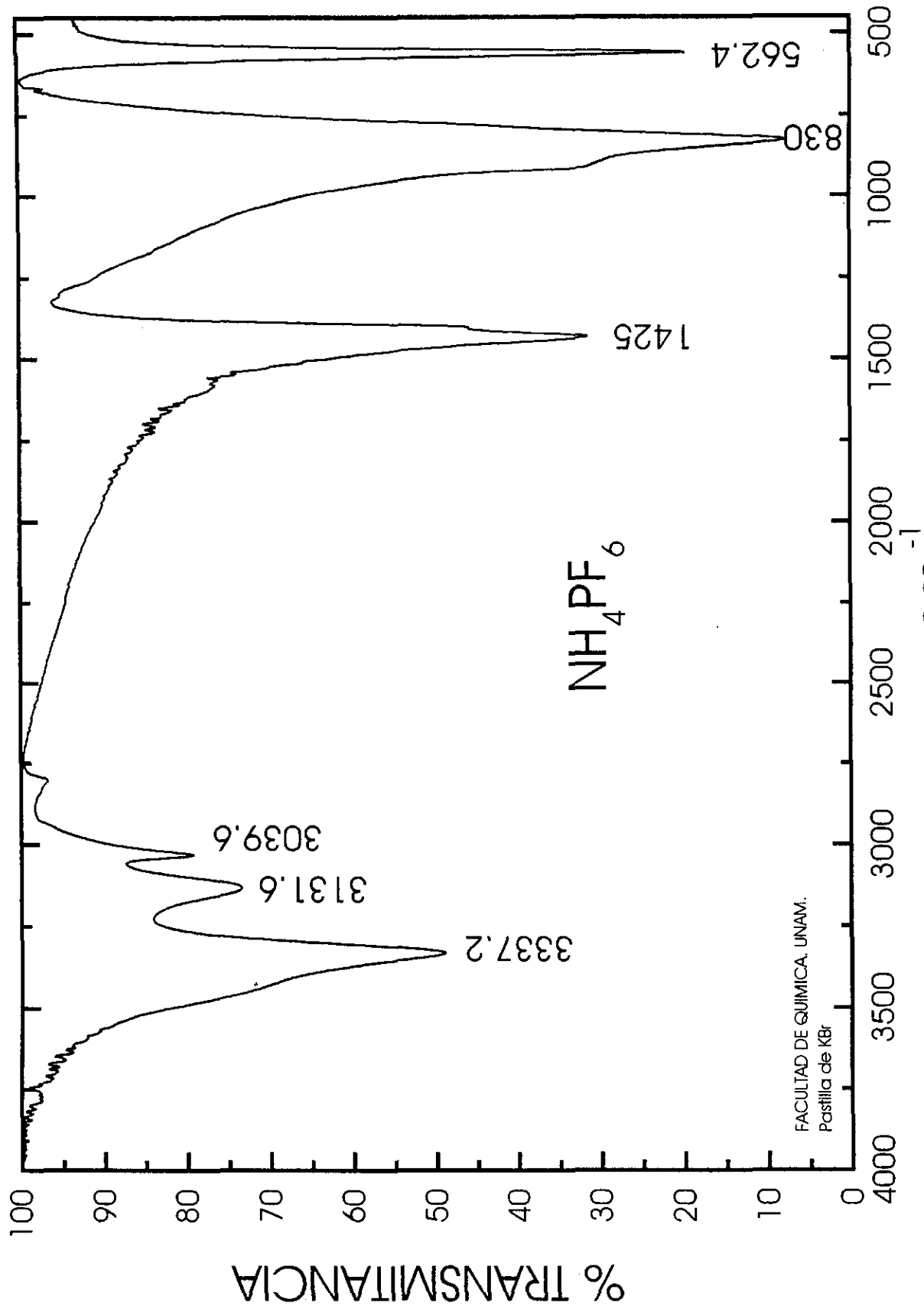


Figura 5. Espectro infrarrojo en la región media del IR del NH_4PF_6 en KBr

4.1.4. Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C

A) Resonancia Magnética Nuclear ^1H

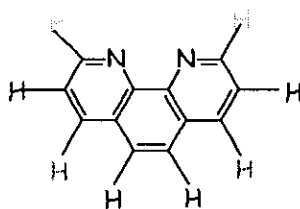
Es importante mencionar que en el espectro de rojo de rutenio únicamente se observa una banda de mediana intensidad a aproximadamente 4.3 ppm, que se caracteriza por ser muy ancha (figura 8), correspondiente a los H's de los grupos amino del compuesto.

En el espectro de RRPhen1 (figura 9 y 10) observamos las misma bandas que las que se presentan en el espectro de la fenantrolina (figura 6 y 7), aunque es posible observar un ligero desplazamiento de las señales, indicando que la fenantrolina se coordinó a la estructura metálica. También por la limpieza del espectro podemos inferir que el compuesto se encuentra puro, y, además por el patrón de señales podemos determinar que la estructura del análogo es muy simétrica, pues las fenantrolinas coordinadas se muestran equivalentes.

Las señales que se presentan aproximadamente a 7 ppm las asignamos a los núcleos en los grupos amino, ya que tales señales desaparecen después de la deutерación (figura 11). Sin embargo no descartamos que se trate de alguna impureza ya que la integración de estas señales dio valores muy pequeños, casi cero.

De tal forma, es posible que las señales generadas por los protones de los grupos amino aun coordinados a la estructura metálica se encuentren bajo la señal generada por el DMSO.

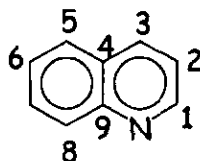
Para la asignación de las señales analizaremos el espectro de la fenantrolina y la estructura de la molécula:



Antes de hacer la asignación de las señales en el espectro, es conveniente mencionar que la fenantrolina posee 8 hidrógenos, los cuales por pares son equivalentes. Los hidrógenos en posición *orto* (de color amarillo) son los que se encuentran más desprotegidos por encontrarse más cerca del nitrógeno, y por tanto son los que se presentarán a campo más bajo. Los hidrógenos en posición *para* (de color verde) son los que en segundo lugar sienten la desprotección, generada por la atracción que el átomo de nitrógeno ejerce sobre los electrones de los átomos de hidrógeno, originada principalmente por la

deslocalización electrónica propia de la molécula. Por el mismo efecto de deslocalización electrónica los hidrógenos que se localizan fuera de los anillos piridínicos, que en la figura tienen el color azul, son los que presentan cierta desprotección menor a la que presentan los dos tipos de hidrógenos antes vistos. Por último, los hidrógenos localizados en posición *meta*, de color rojo, son los que sienten menos la electronegatividad del átomo de nitrógeno por lo que se presentan a campo más alto.

El mismo comportamiento se encontró en compuestos con estructuras similares, como es el caso de la quinolina, lo cual confirma nuestra asignación^{59 y 60}.



En las figuras 6 y 7 mostramos el espectro de RMN ¹H de la fenantrolina pura con la correspondiente asignación de las bandas a los hidrógenos en la fenantrolina.

El singulete presente en el espectro de la fenantrolina pura (figura 6) a aproximadamente 3.35 ppm corresponde esencialmente al agua de cristalización que la materia prima posee.

La multiplicidad de las señales se puede explicar considerando que existe un acoplamiento inicialmente del núcleo de hidrógeno en posición *orto* (de color amarillo) con el núcleo vecino a éste que se localiza en la posición *meta* en el anillo piridínico (de color rojo), pero a la par existe el acoplamiento con el núcleo de hidrógeno en posición *para* (debido a la naturaleza aromática de la fenantrolina), que en la figura tiene el color verde, por tanto inicialmente se esperaría un doblete pero debido al acoplamiento adicional se observa el desdoblamiento de cada una de las señales del doblete generándose la señal que proponemos se trata de dos dobletes muy próximos entre sí. Las constantes de acoplamiento de tal señal confirman nuestra propuesta. Es importante mencionar que en el caso de este compuesto los espectros se corrieron en un equipo de 500 MHz por ello la gran definición de las señales.

La misma explicación se tiene para la señal generada por el núcleo de hidrógeno en posición *para*, representado con el color verde.

Debido a la simetría de la molécula es obvio considerar a los hidrógenos que se localizan fuera de los anillos piridínicos, de color azul equivalentes química y magnéticamente por lo cual se presentará una sola señal, como queda demostrado en el espectro. Además no se presenta ningún tipo de

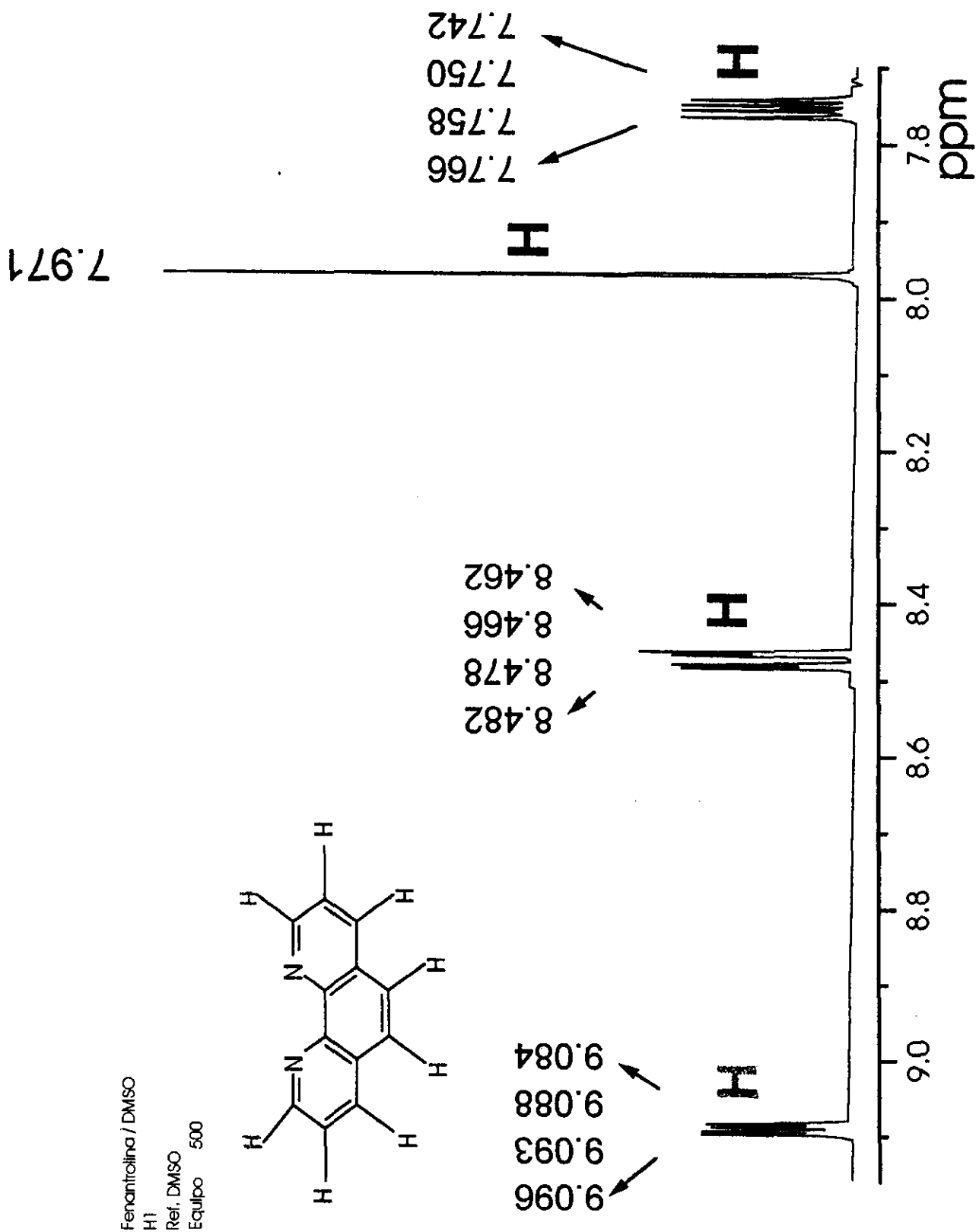
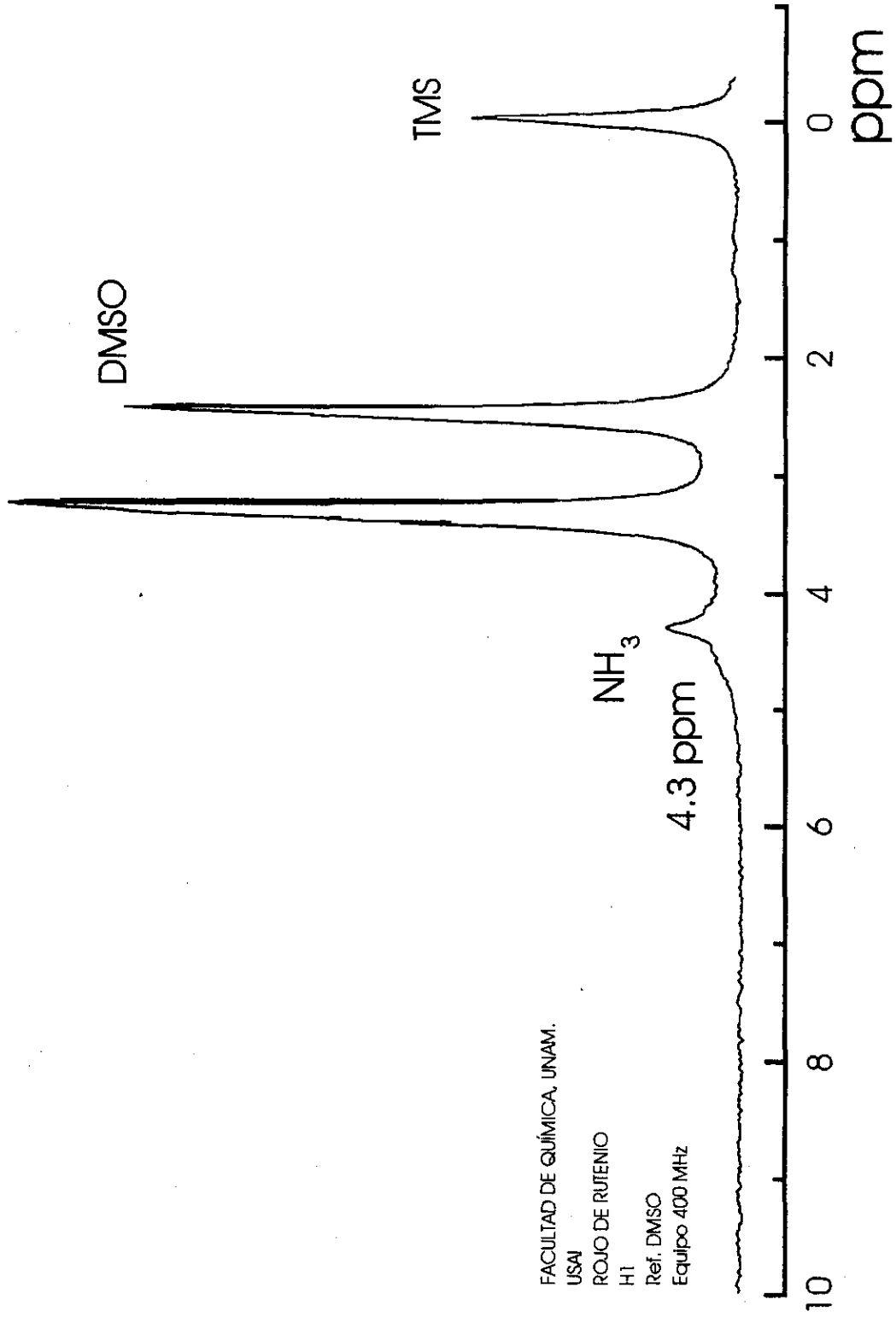


Figura 7. Espectro RMN ^1H de la fenantrolina



FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
USAI
ROJO DE RUTENIO
H1
Ref. DMSO
Equipo 400 MHz

Figura 8. Espectro de RMN ¹H del rojo de rutenio en DMSO-d₆

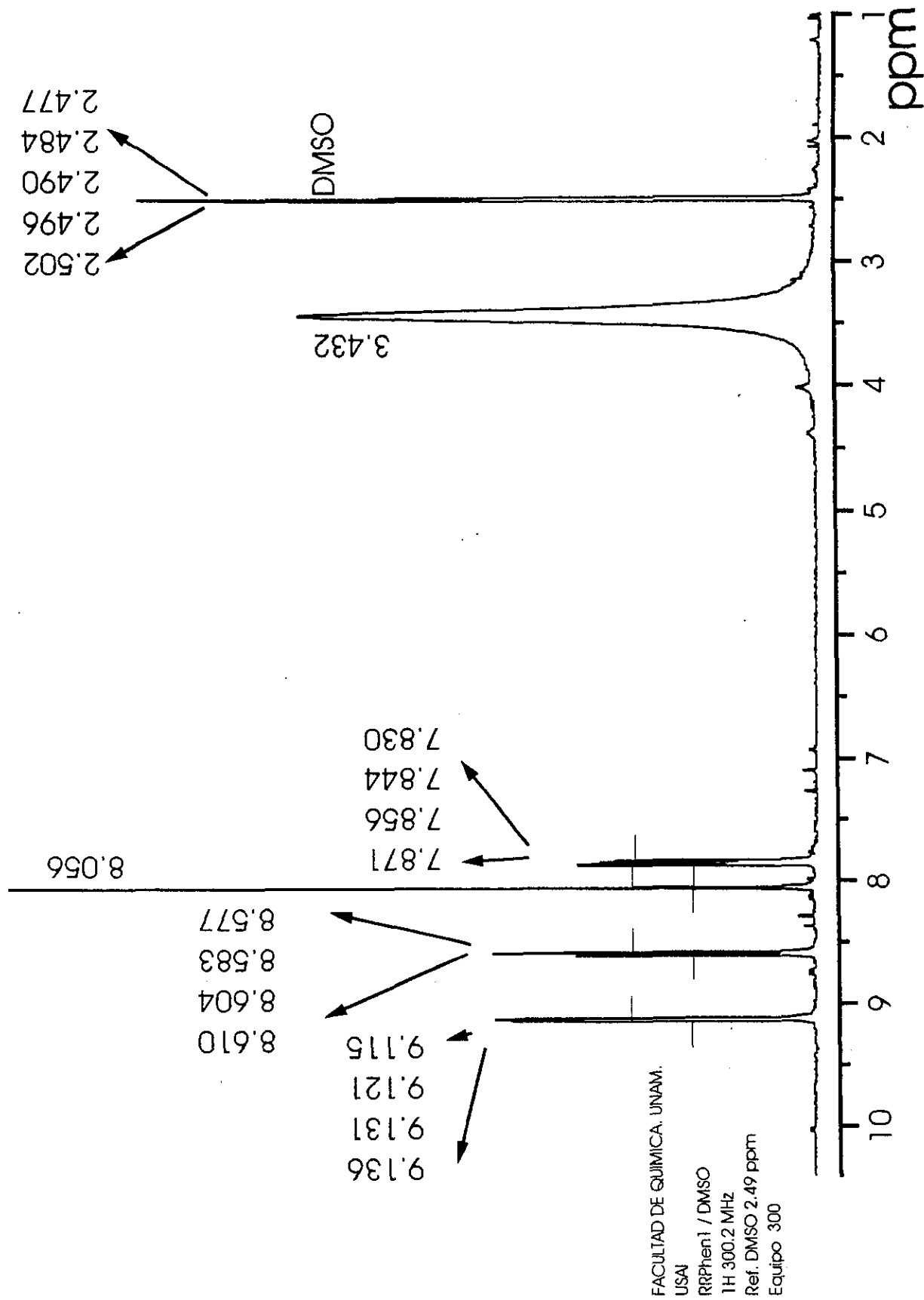


Figura 9. Espectro de RMN ^1H de RRPhen1 en DMSO- d_6

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

RRPhen1 / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. DMSO 2.49 ppm

Equipo 300

Amplificación de región

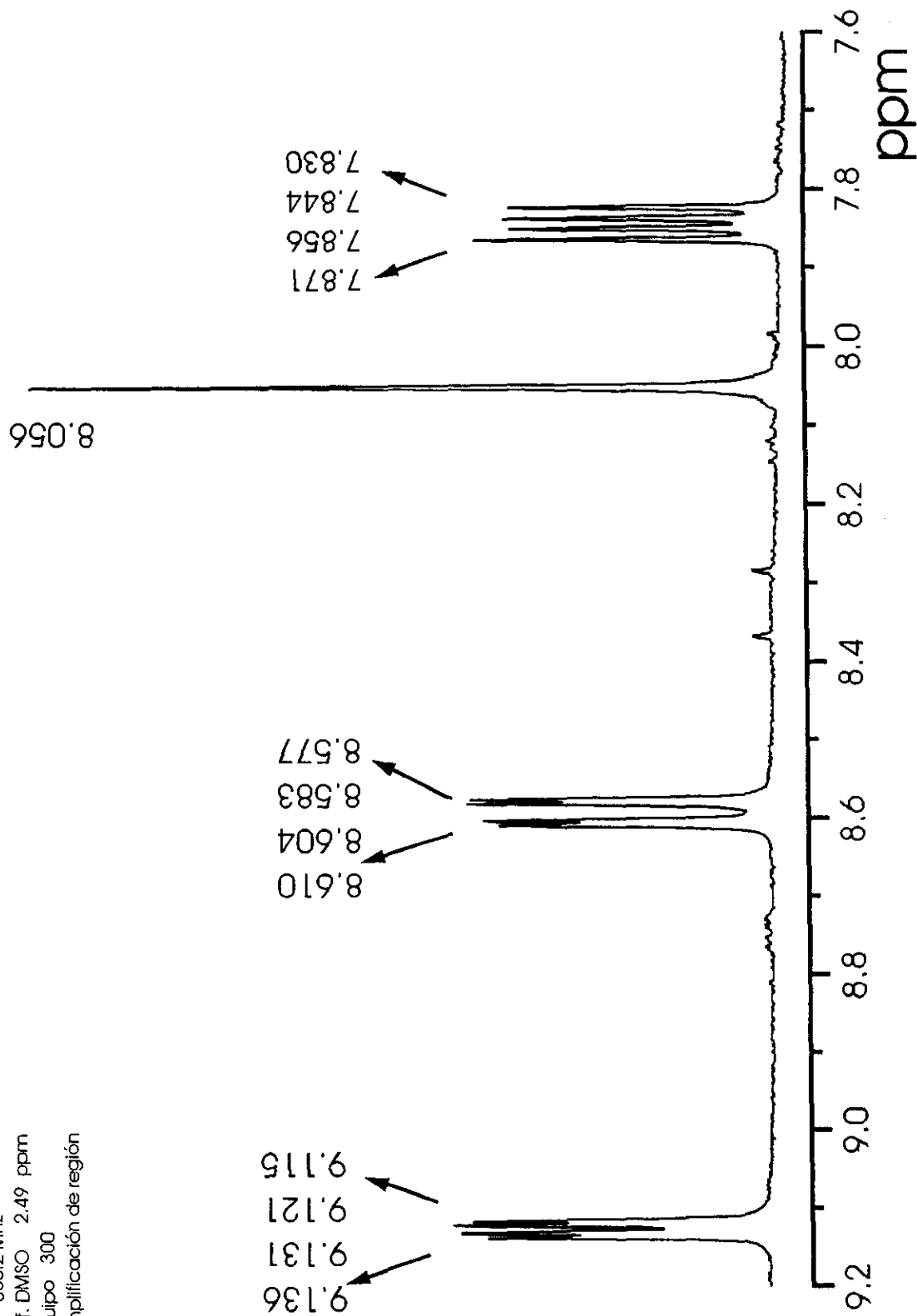


Figura 10. Espectro de RMN ¹H del análogo RRPhen1 en DMSO-d₆

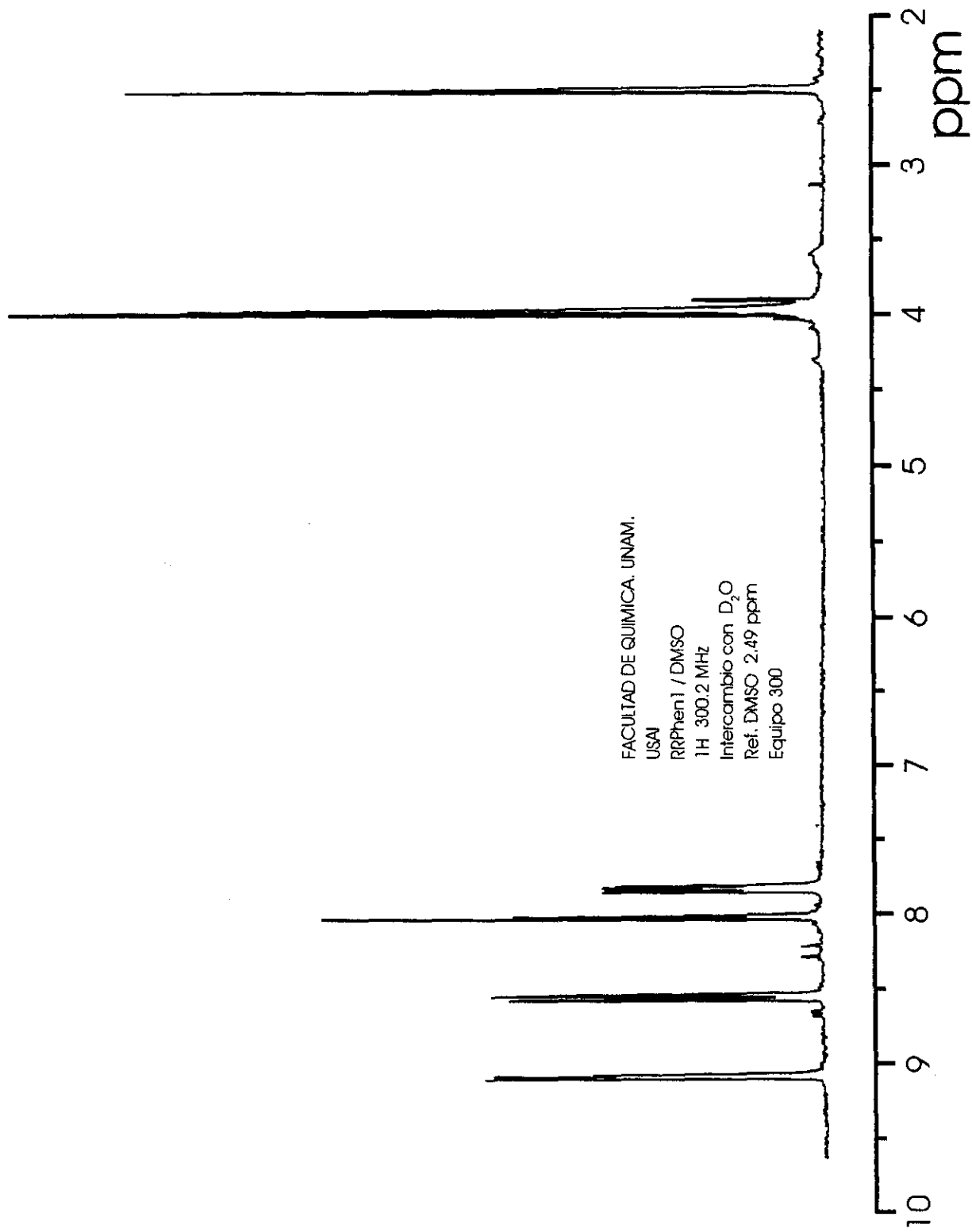


Figura 11. Espectro del análogo RRPhen1. Intercambio con D₂O.

acoplamiento con los demás núcleos de hidrógeno, presentes en la molécula de fenantrolina.

Finalmente la señal generada por los núcleos de hidrógeno en posición *meta* (de color rojo), es resultado de que los núcleos de hidrógeno en las posiciones *orto*, *meta* y *para* del anillo piridínico (representados con los colores amarillo, rojo y verde), no son equivalentes. Es así, que existe un acoplamiento del núcleo en posición *meta* (rojo), con el núcleo en posición *orto* (amarillo), lo cual inicialmente generará un doblete. Sin embargo también se tiene el acoplamiento del hidrógeno en posición *meta* (rojo) con el hidrógeno en posición *para* (verde), por lo cual cada señal del doblete inicial sufrirá el desdoblamiento, presentándose así, nuevamente una señal como dos dobletes muy próximos entre sí.

B) Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C

Debido a que los datos de esta espectroscopía para la fenantrolina no se han reportado en el catálogo Aldrich ni en el catálogo Sadtler, la asignación de las señales la realizamos considerando un modelo muy similar del cual sí se han reportado el espectro y la asignación en el catálogo Aldrich, que es la quinolina.

Como es posible observar en el espectro de la fenantrolina pura, se presenta un patrón característico de seis bandas, cuya asignación^{59,60} se muestra en el espectro correspondiente, en la figura 12.

En el espectro de RRPhen1 (figura 13) es visto el mismo patrón de señales, lo que confirma que la sustitución de las fenantrolinas en la estructura metálica se llevó a cabo. Nuevamente es posible observar un espectro muy limpio, el cual nos habla de la pureza del compuesto y por la presencia de un solo patrón de bandas se pone de manifiesto la simetría de la molécula.

El espectro de la quinolina es muy similar y a la fecha se reportan en tablas los desplazamientos químicos para cada uno de los núcleos de carbono, los cuales se registran a continuación:

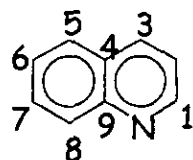
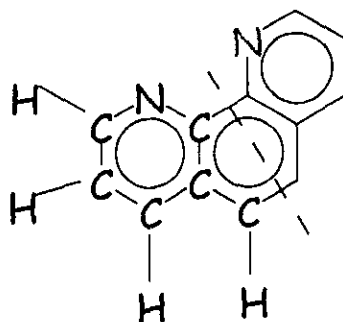


TABLA 4. Desplazamientos en RMN ^1H y ^{13}C para la quinolina^{59,60}.

NUCLEO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
^1H	8.92	7.39	8.12	-	7.82	7.54	7.72	8.15	-
^{13}C	150.9	121.5	136.0	128.7	128.3	126.8	129.7	130.1	149

Siguiendo el comportamiento de este compuesto se hizo la asignación de las seis señales en el espectro de la fenantrolina, considerando también que la fenantrolina presenta nuevamente núcleos equivalentes y podemos considerar que los núcleos que generaran una señal son los siguientes:



Confirmando de esta manera que existen seis núcleos de carbono generadores de señales y cuatro núcleos de hidrógeno que no son equivalentes.

Utilizando el mismo argumento para la asignación de las señales en la resonancia protónica, encontramos el mismo resultado que se obtuvo inicialmente, al considerar los efectos de acoplamiento, lo cual da certidumbre a la asignación de las señales en la resonancia de carbono.

4.1.5. Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F y ^{31}P

A) Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F

Debido a que se ha reportado en la literatura⁶⁵⁻⁶⁸ que el hexafluorofosfato de amonio (NH_4PF_6) tiende a sufrir cambios en su composición, cuando en su ambiente químico se encuentra un átomo metálico, dando origen a la especie PF_2O_2 , y dado que existen reportes^{66,67}, en donde se menciona, que probablemente el catalizador de la hidrólisis de este compuesto es un rutenio $2+$, decidimos que era conveniente hacer el análisis por medio de resonancia magnética nuclear, con el fin de detectar si en nuestros análogos este contraíón presentó esta reactividad.

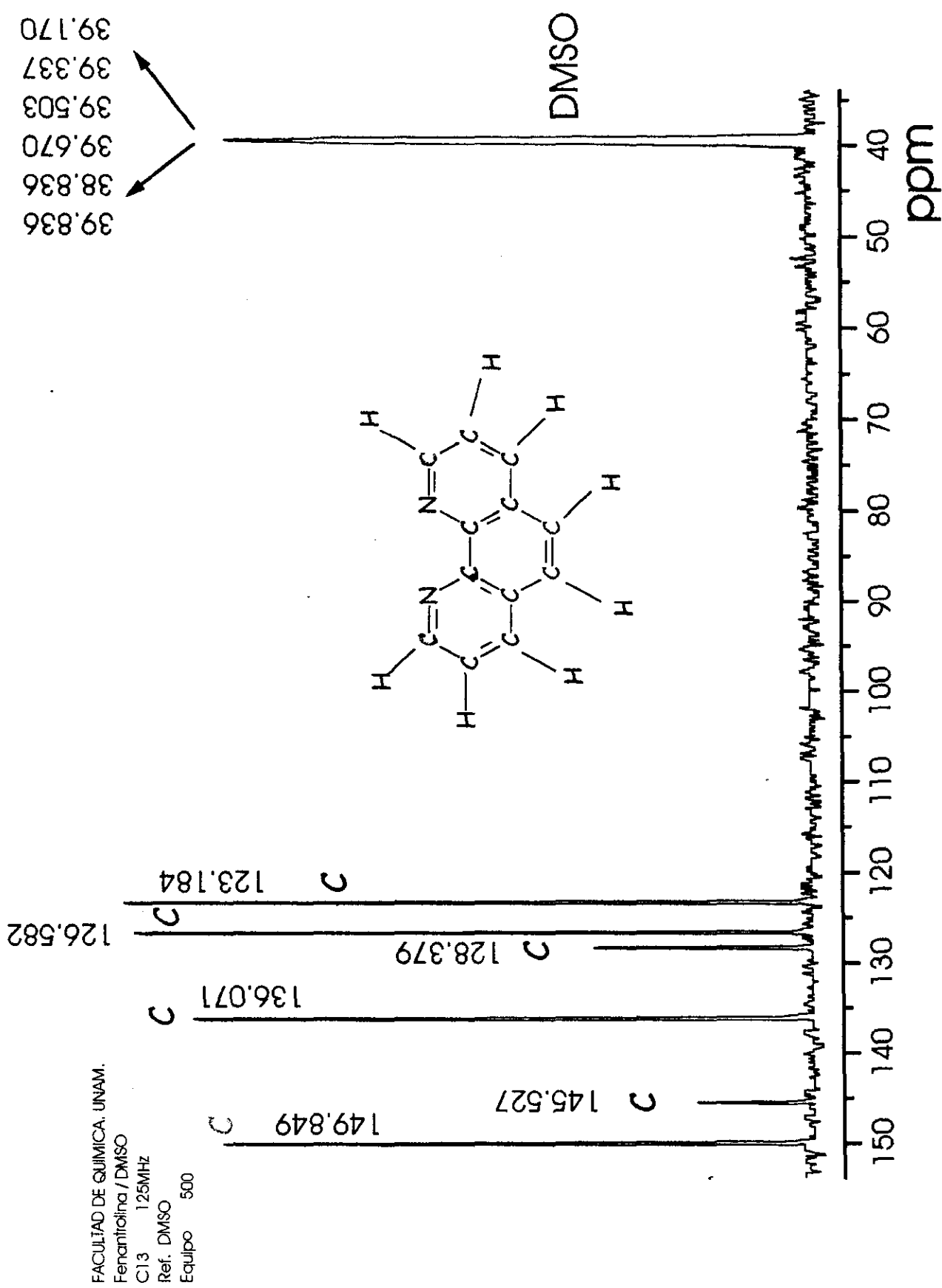


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C de la fenantrolina en DMSO-d₆.

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

USAI

RRPhen1 / DMSO

C13 75.5MHz

Ref. DMSO 39.5 ppm

Equipo 300

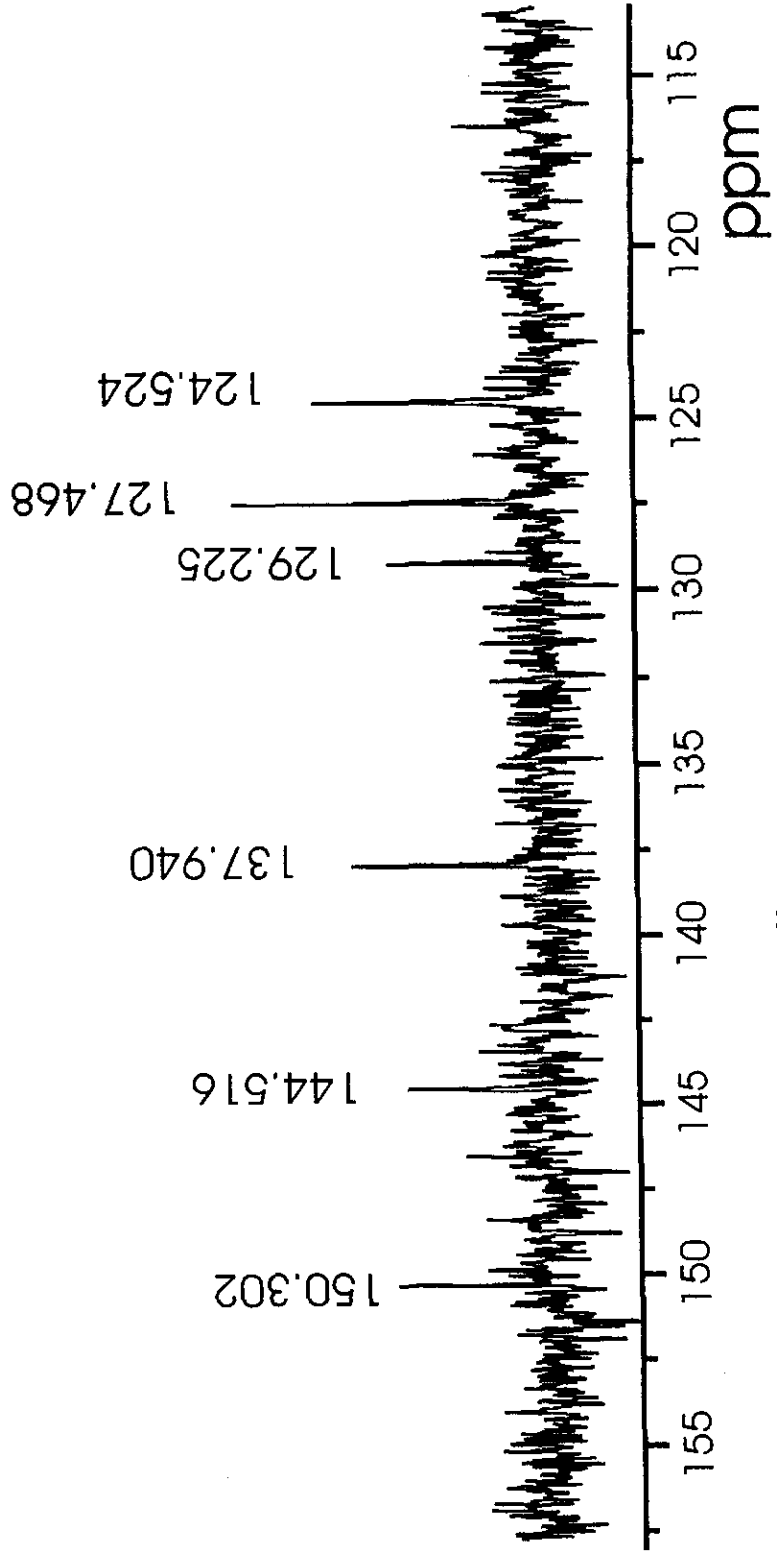


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C del análogo RRPhen1 en DMSO- d_6 .

Para realizar el análisis del espectro de RRPhen1, obtuvimos primeramente el espectro de RMN ^{19}F del hexafluorofosfato de amonio, cuya fórmula es NH_4PF_6 , en el cual podemos notar la existencia de seis núcleos de flúor los cuales son equivalentes entre sí magnéticamente (figura 14). En este espectro se presentan dos señales, generadas por el acoplamiento que este núcleo (flúor) presenta con el fósforo, pues el flúor 19 y el fósforo 31 tienen un espín nuclear de $I=1/2$ y una abundancia del 100% así que existe un acoplamiento nuclear F-P donde la multiplicidad está dada por la siguiente fórmula $2nI+1$. El número de núcleos de fósforo vecinos al flúor es de $n=1$ y el espín nuclear $I=1/2$, de donde, sustituyendo tales datos tenemos que:

$$\text{Multiplicidad} = 2*(1)*(1/2) + 1 = 2$$

Así se explica el doblete obtenido.

Analizando este resultado en el espectro de fósforo del análogo (figura 15) encontramos un patrón similar manifestándose que se tiene el mismo contraíón, y que el hexafluorofosfato no sufrió ningún cambio químico.

El estándar interno que se empleó para realizar el espectro fue el ácido trifluoroacético.

B) Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, decidimos obtener un espectro de RMN ^{31}P de RRPhen1.

Los espectros de RMN de fósforo del hexafluorofosfato de amonio (figura 16), y del compuesto análogo al rojo de rutenio (figura 17) muestran un patrón de señales similar, por lo que descartamos cualquier cambio químico, atribuido a la reactividad química del hexafluorofosfato de amonio.

Sin embargo, es importante analizar y dar explicación al comportamiento encontrado en el hexafluorofosfato de amonio.

Considerando, que el fósforo y el flúor tienen un espín nuclear de $I=1/2$ y una abundancia del 100% queda de manifiesto que existe un acoplamiento nuclear P-F donde la multiplicidad de la señal está dada por la fórmula $2nI+1$.

El número de núcleos de flúor vecinos al fósforo es de $n=6$, $I=1/2$, así que sustituyendo estos datos tenemos que:

$$\text{Multiplicidad} = 2*(6)*(1/2)+1 = 7$$

Así, es de esperarse un heptuplete, el cual está presente en los espectros de RMN ³¹P tanto en la materia prima como en RRPhe1, y por tanto no hay cambio aparente en el contraíón luego de llevar a cabo la reacción, como se ha observado en otros casos.

En el caso de esta técnica, el estándar que fue empleado para realizar las mediciones fue el ácido fosfórico.

4.1.6. Espectroscopía UV-Vis en disolución y en sólido

A) UV-Vis en disolución

El espectro UV-Vis tanto del rojo de rutenio como de la fenantrolina se presentan en la figura 18 y 19 respectivamente.

En el caso del espectro electrónico del rojo de rutenio, se ha reportado que la presencia de bandas de transferencia de carga, una banda en el visible y altos coeficientes de extinción son característicos.

El rojo de rutenio por tratarse de un complejo de valencia mixta presenta un comportamiento por demás intrincado ya que se tienen tres centros metálicos de los cuales el Ru(IV) con un ambiente octaédrico presenta transiciones permitidas por espín pero prohibidas por Laporte. Por otro lado, el Ru(III) con un ambiente octaédrico no presenta transiciones permitidas por espín ni por Laporte, en un campo fuerte y por ello se esperarían dos bandas y se ha podido constatar que efectivamente el rojo de rutenio genera dos bandas.

Por otra parte es importante mencionar que el rojo de rutenio que se adquiere comercialmente presenta unas impurezas que ya han sido identificadas, las cuales generan bandas en el espectro del compuesto (figuras 20 y 21).

Entre tales impurezas destacan el café de rutenio, el violeta de rutenio, el tricloruro de hexamminrutenio(III), el cloruro de cloropentamminrutenio(III) y los nitrosilos de rutenio que modifican considerablemente el espectro de la materia prima en la región UV principalmente.

Es necesario mencionar que el estudio de UV-Vis lo realizamos utilizando como disolvente agua destilada, a diferencia de la mayoría de los estudios que emplean soluciones amortiguadoras del pH con el fin de mantenerlo estable alrededor 7, pues se considera que el rojo de rutenio se descompone tanto en

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USAI
 NH_4PF_6 / DMSO
F 19 282.47 MHz
Referencia al Ácido Trifluoroacético
Equipo 300

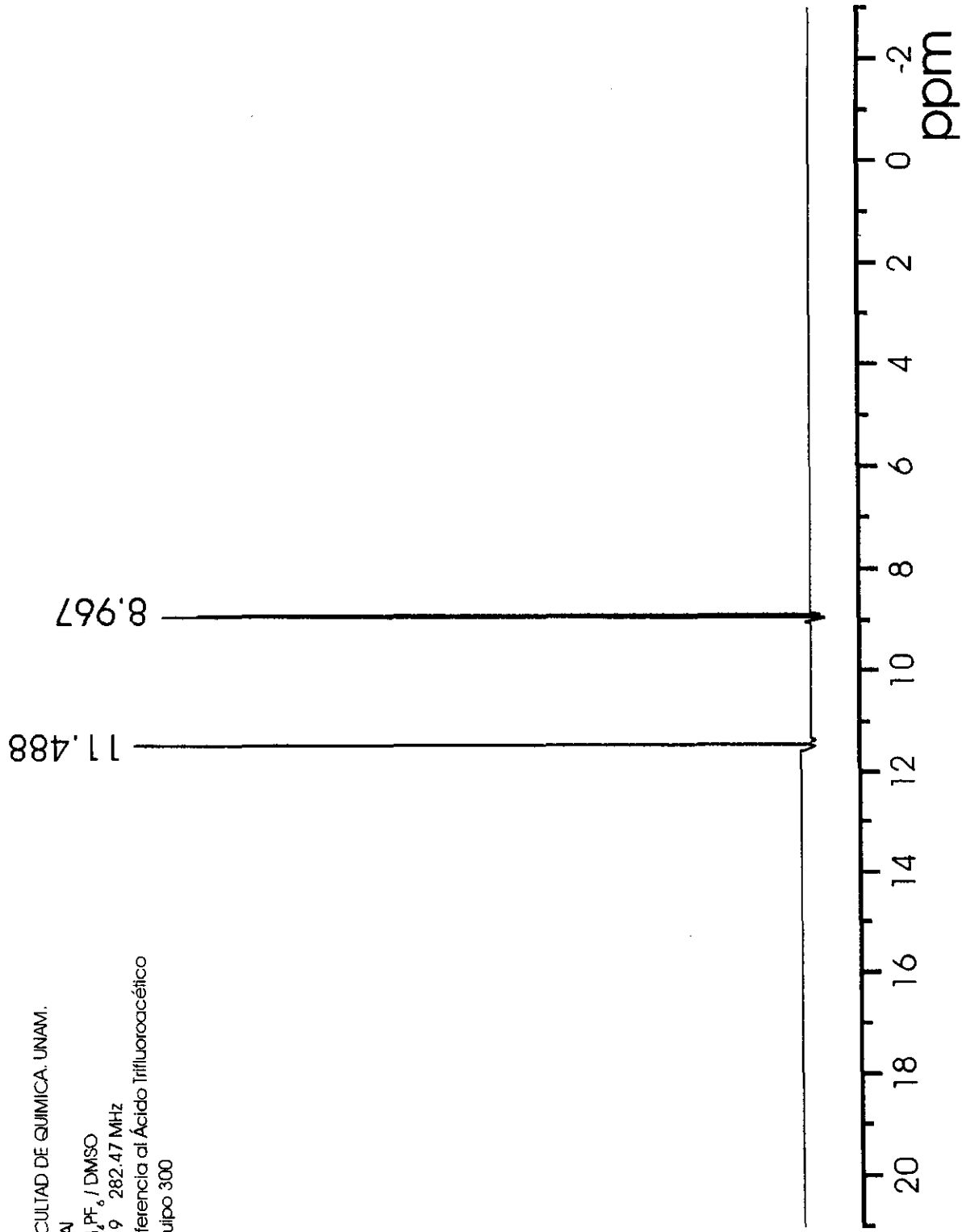


Figura 14. Espectro de RMN ^{19}F del hexafluorofosfato de amonio en DMSO-d_6 .

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USA1

RRPhen1 /DMSO

F 19 281.9 MHz

Referencia TFA 0 ppm

Equipo 300

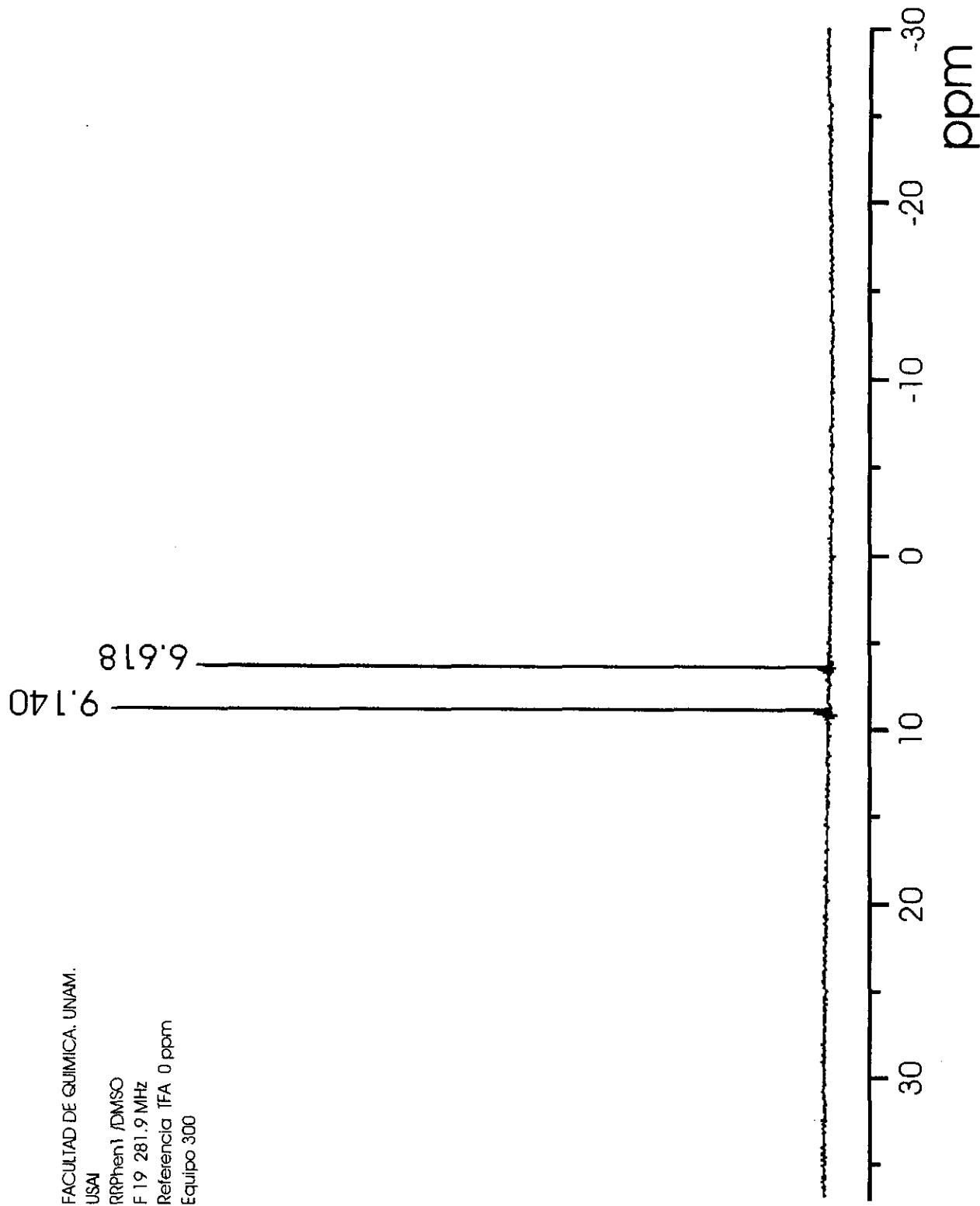


Figura 15. Espectro de RMN ^{19}F del análogo RRPhen1 en DMSO- d_6

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USA
 NH_4PF_6 / DMSO
P31 161.9 MHz
Referencia a 0 ppm H_3PO_4
Equipo 400

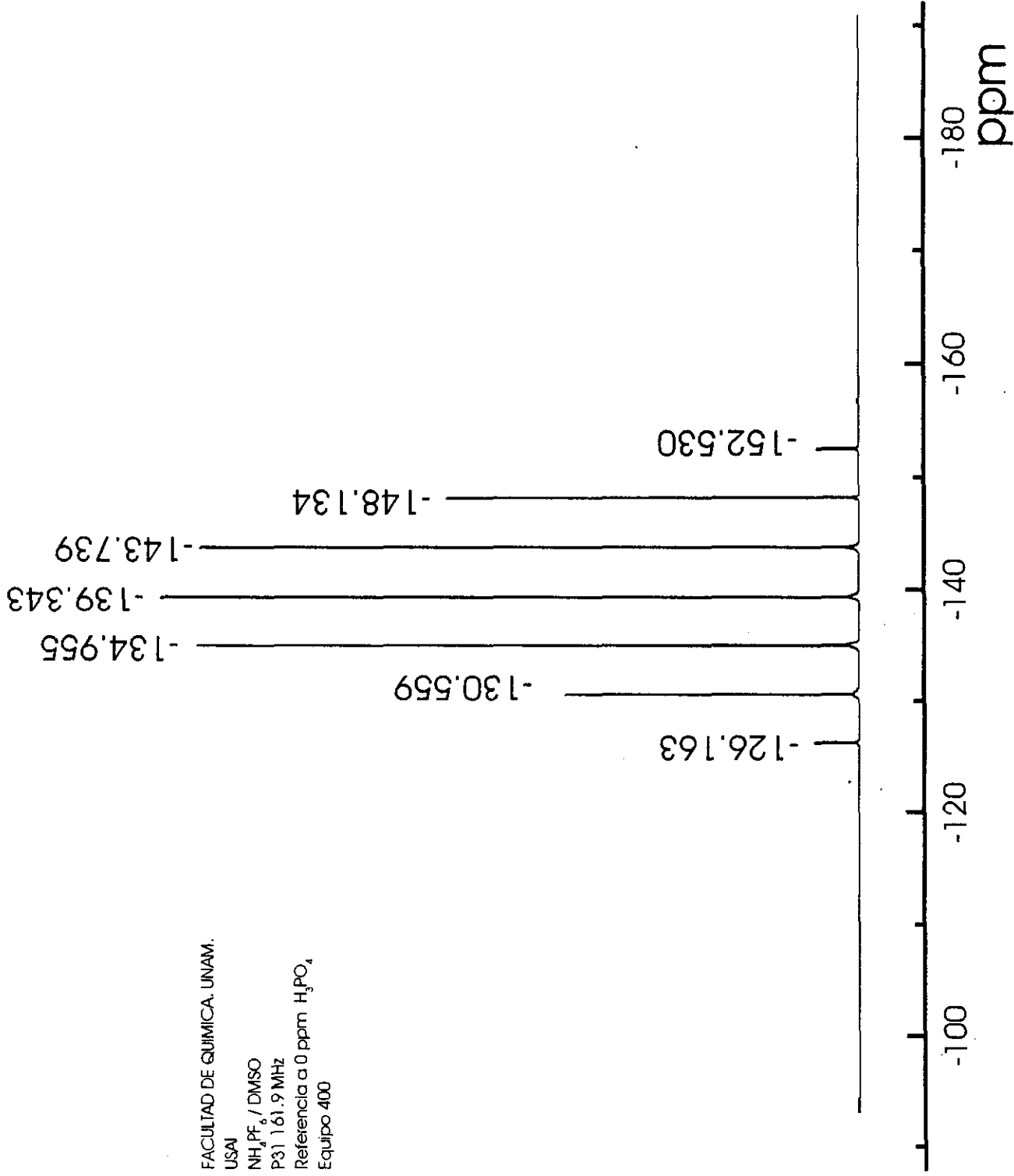


Figura 16. Espectro de RMN ^{31}P del hexafluorofosfato de amonio en DMSO- d_6 .

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USAI
RRPhen1 / DMSO
P.31 121.5MHz
Ref. 0 ppm H_3PO_4
Equipo 300

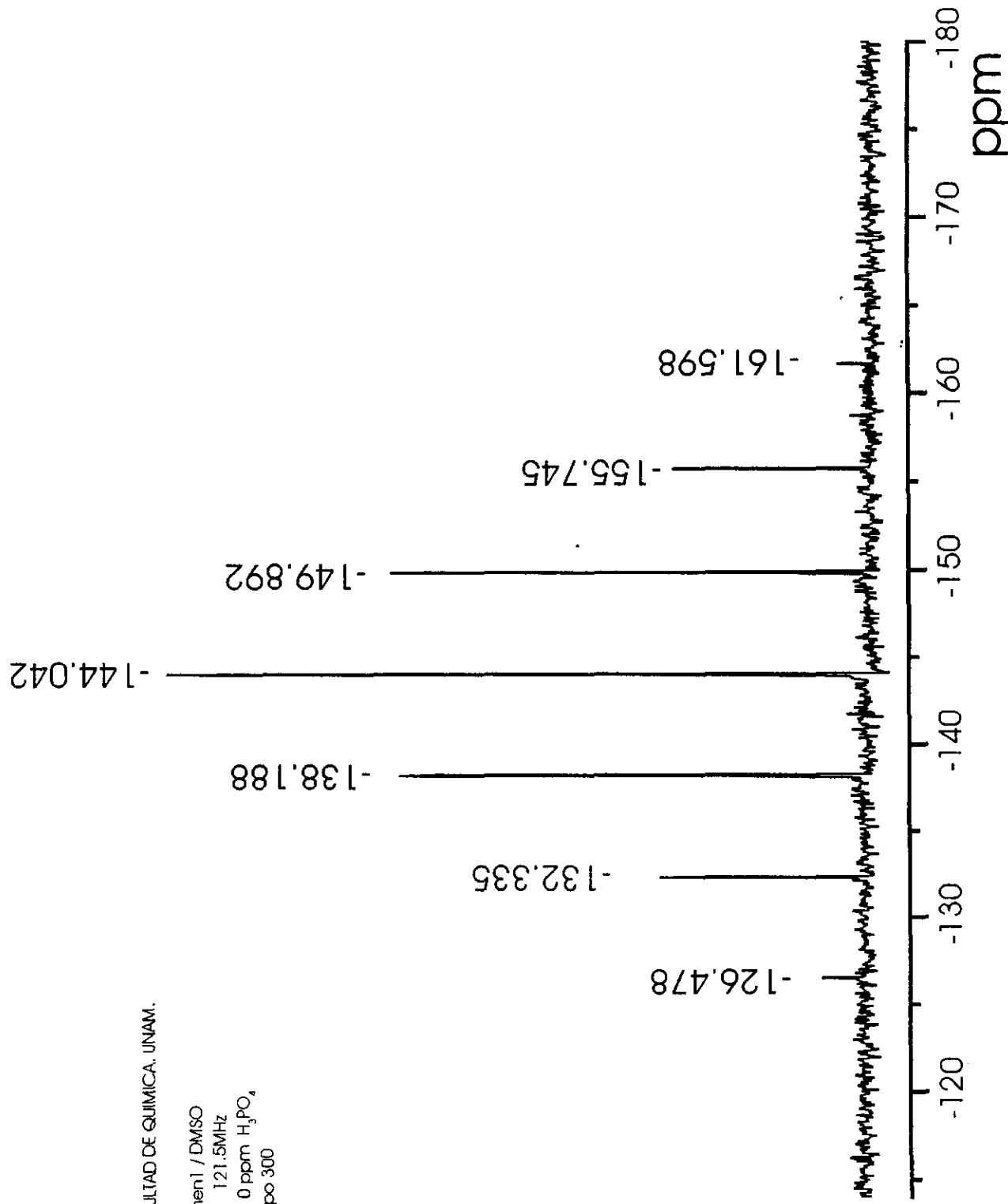


Figura 17. Espectro de RMN ^{31}P del análogo RRPhen1 en DMSO- d_6 .

soluciones ácidas como en soluciones alcalinas. Sin embargo, nuestra experiencia nos ha indicado que el rojo de rutenio es muy estable disuelto en agua destilada por mucho tiempo, por tres o cuatro meses, por lo cual decidimos realizar nuestros estudios en agua destilada.

En el rojo de rutenio de Aldrich, el coeficiente de extinción calculado para la banda presente a 532 nm fue de sólo 4000 nm (figura 22). En la literatura^{5,12} se ha reportado que el coeficiente de extinción de la banda que se presenta en el visible (aprox. 532 nm) es mucho mayor, de aproximadamente 21000. Este hecho experimental se debe a la presencia de las impurezas en el rojo de rutenio comercial.

En vista de tales evidencias, decidimos realizar la purificación de la materia prima empleando el mismo procedimiento que se utiliza en los estudios biológicos. En la figura 22 podemos observar el espectro del rojo de rutenio sin purificar y en la figura 18 mostramos el espectro del rojo de rutenio luego de su purificación. Aún después del proceso de purificación permanece una pequeña impureza de violeta de rutenio cuya presencia se identifica con la banda a 738 nm¹².

En el caso de la fenantrolina es posible observar las bandas producto de la transferencia electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos aromáticos a longitudes de onda tan bajas como 230 nm con altos coeficientes de extinción (figura 19). Es posible observar estas bandas en los análogos al rojo de rutenio lo cual nos indica que las fenantrolinas se encuentran coordinadas a la estructura metálica.

En el espectro de RRPhen1 (figuras 23 y 24) es evidente que las bandas intensas a bajo de 300 nm son generadas por las fenantrolinas coordinadas, mismas que resultan muy intensas, mientras que la banda de mediana intensidad que se encuentra a 535 nm corresponde al rojo de rutenio. En el caso de este análogo se presenta un ligero corrimiento de las señales de 228 y 263 en la fenantrolina pura a 230 y 254 nm.

Además, por la ausencia de otras bandas como la presente a 460 nm o a 750 nm, se descarta la presencia de café o violeta de rutenio respectivamente, aún cuando para la síntesis partimos del rojo de rutenio sin purificar, de tal modo que el mismo procedimiento de síntesis permitió obtener el análogo con bastante pureza.

Del espectro no es fácil detectar la presencia de las impurezas de rutenio(III) por la intensidad de las señales generadas por la fenantrolina.

Sin embargo, es posible observar la banda característica del rojo de rutenio en la región visible, la cual ha sido empleada en la mayoría de los trabajos sobre el

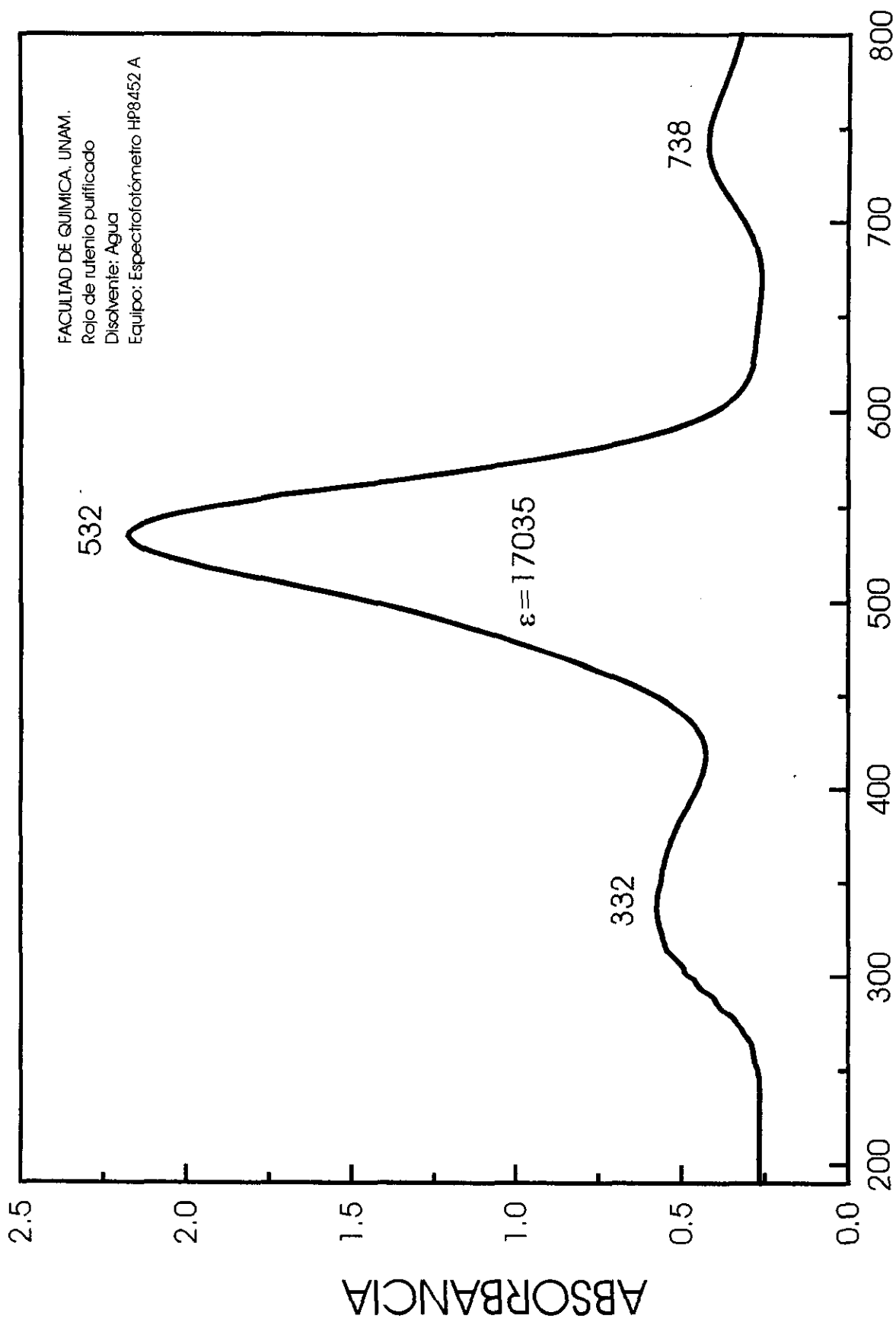


Figura 18. Espectro electrónico del rojo de rutenio purificado

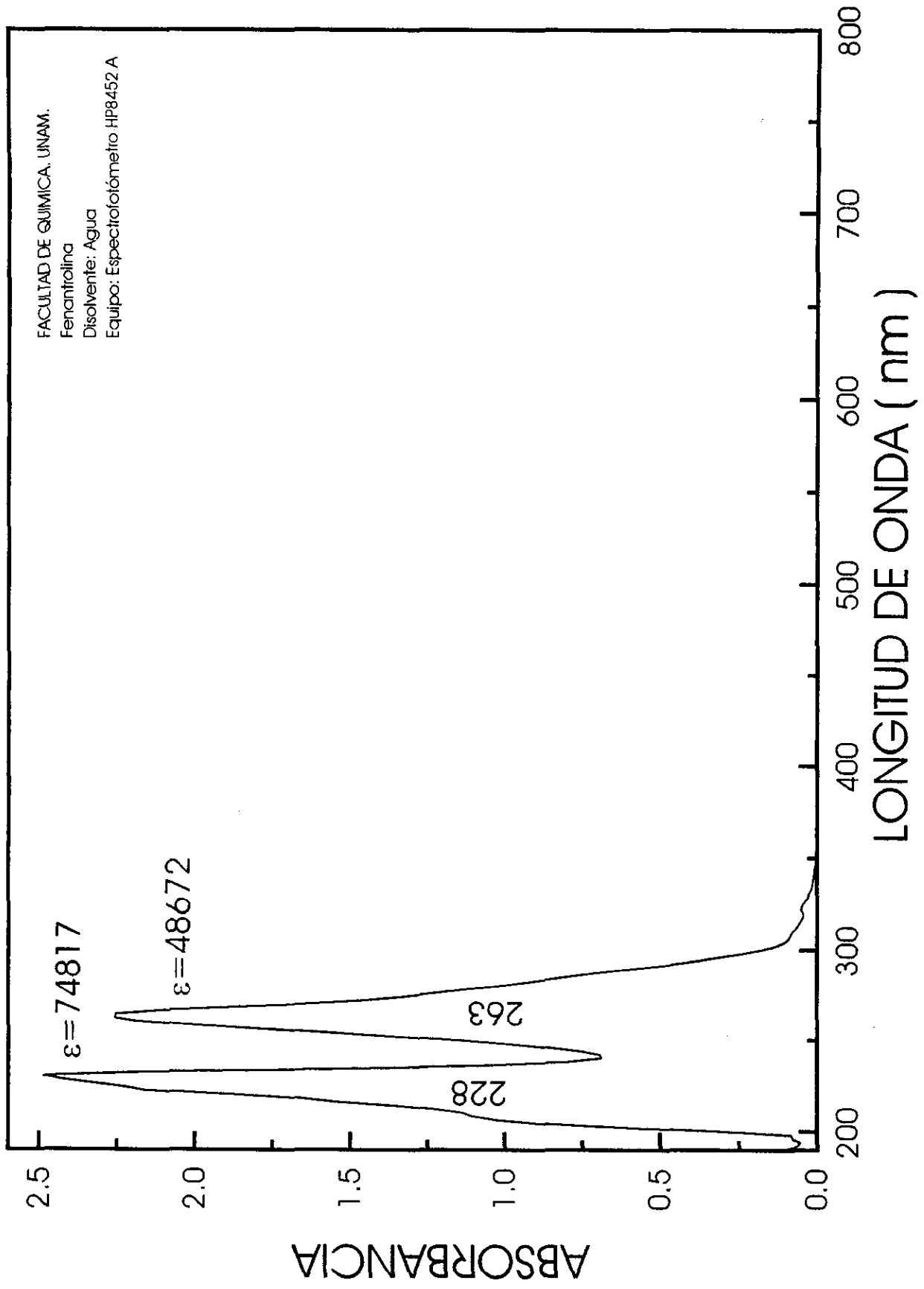
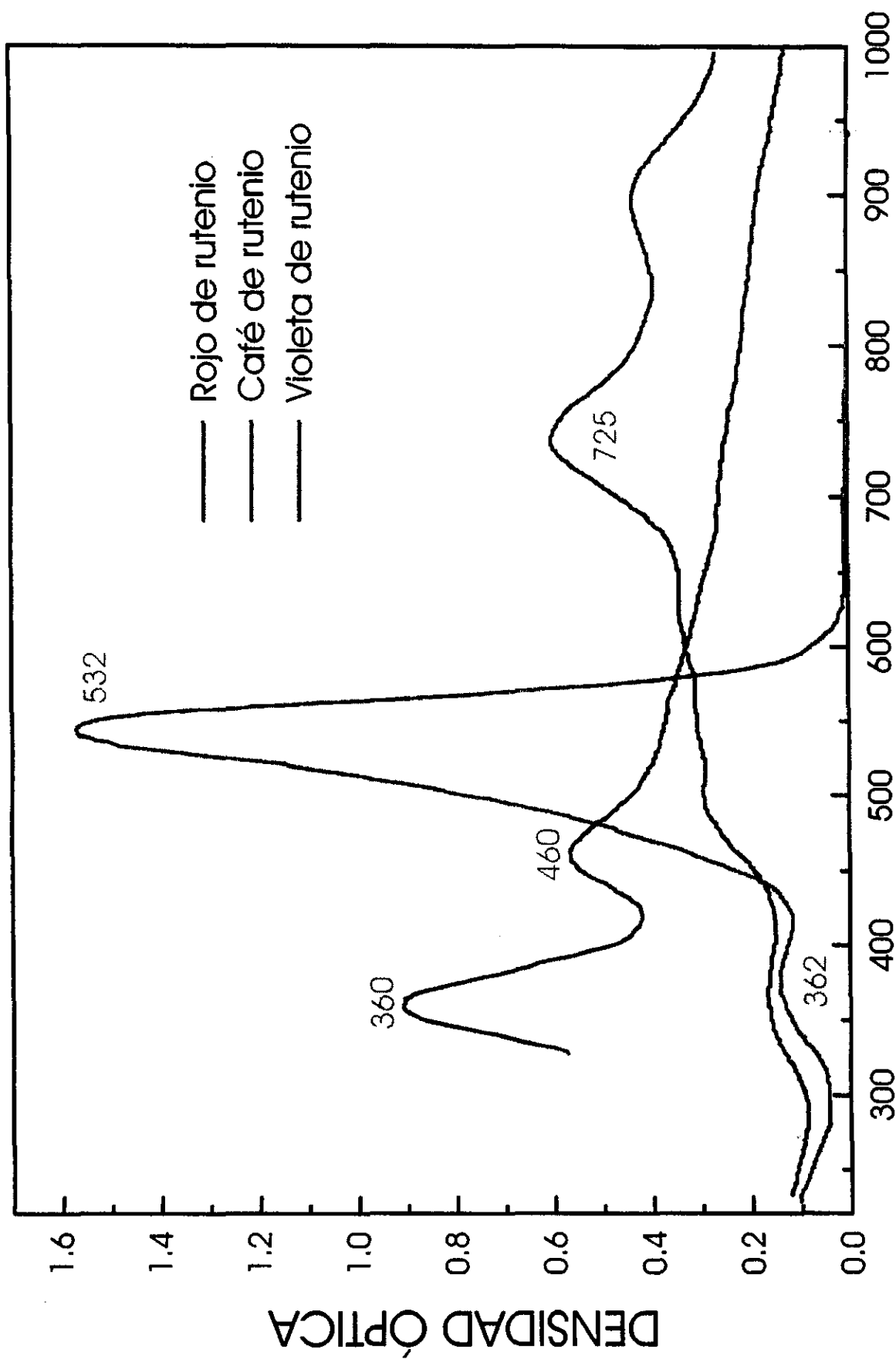


Figura 19. Espectro electrónico de la fenantrolina



LONGITUD DE ONDA (nm)¹²
 Figura 20. Espectro electrónico de los compuestos trinucleares de rutenio

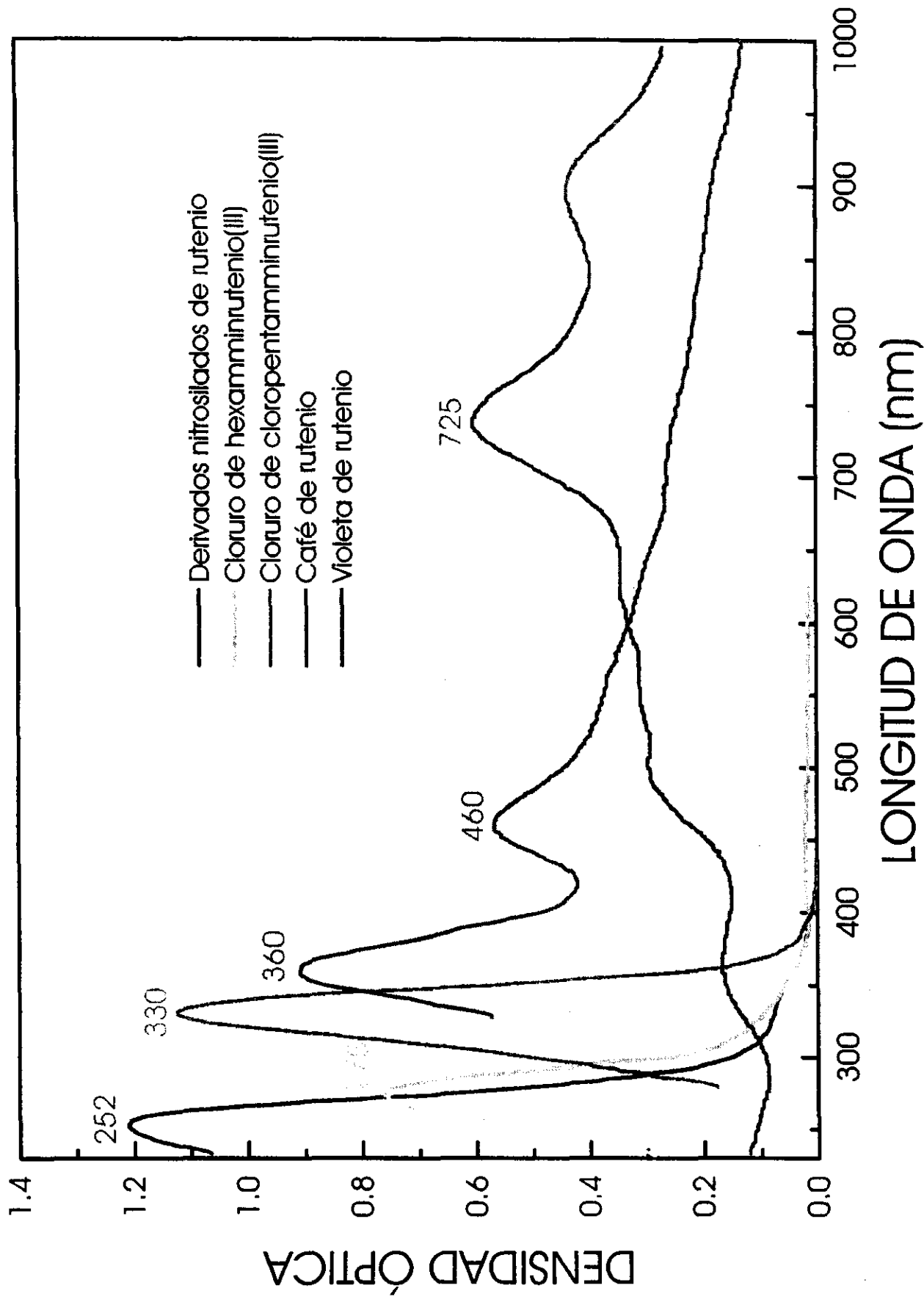


Figura 21. Espectro electrónico de las principales impurezas en el rojo de rutenio comercial¹²

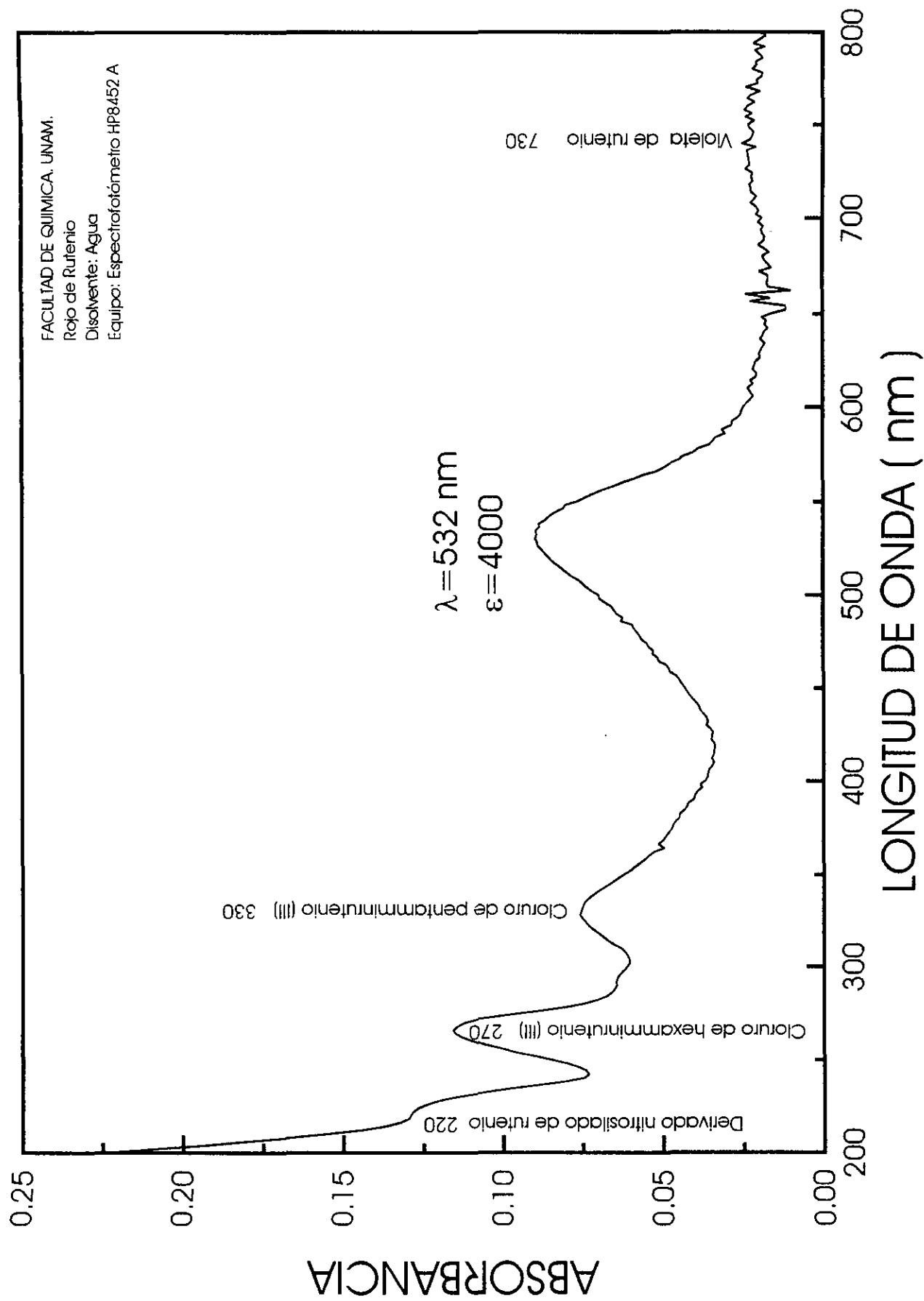


Figura 22. Espectro electrónico del rojo de rutenio no purificado

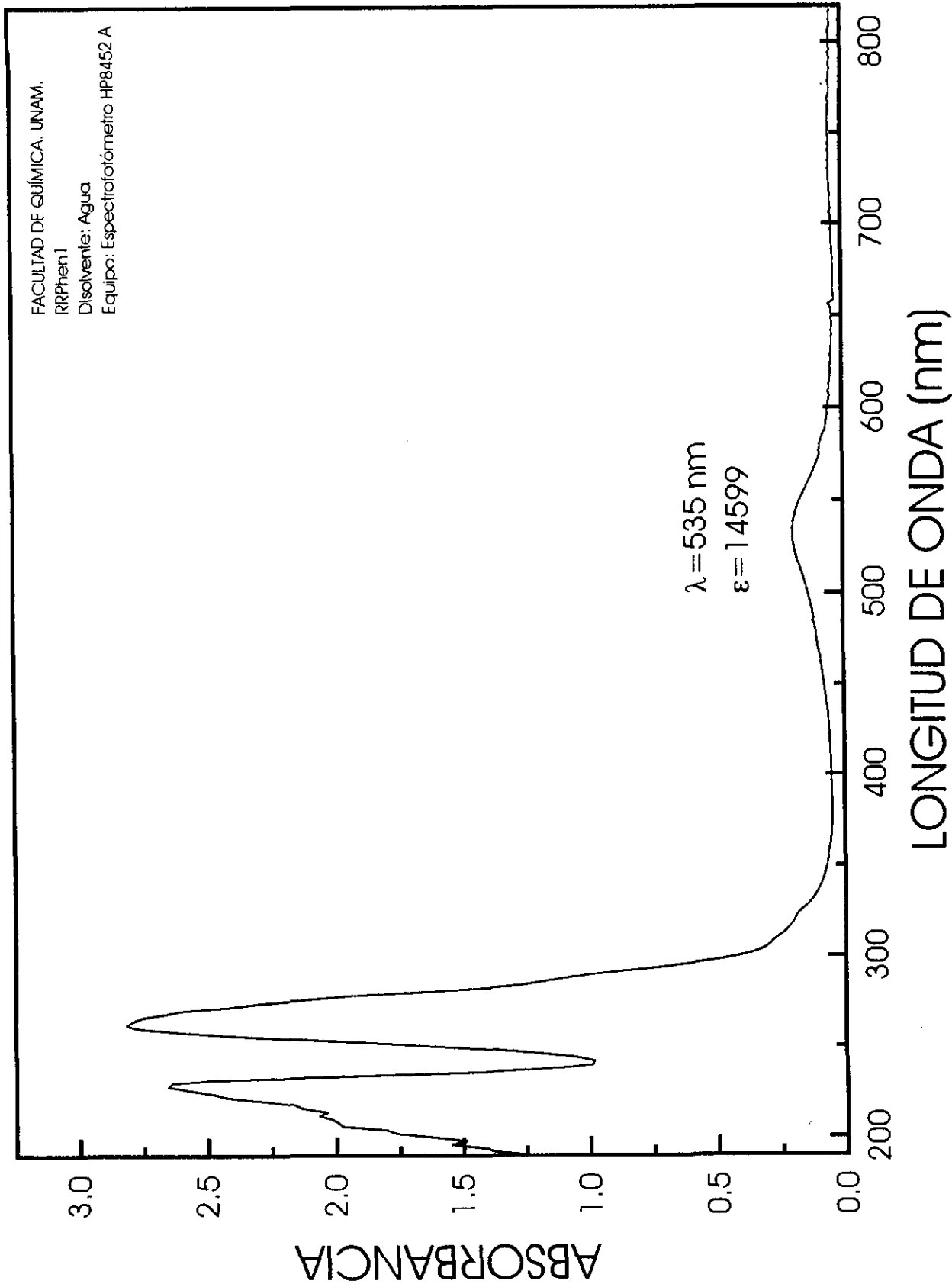
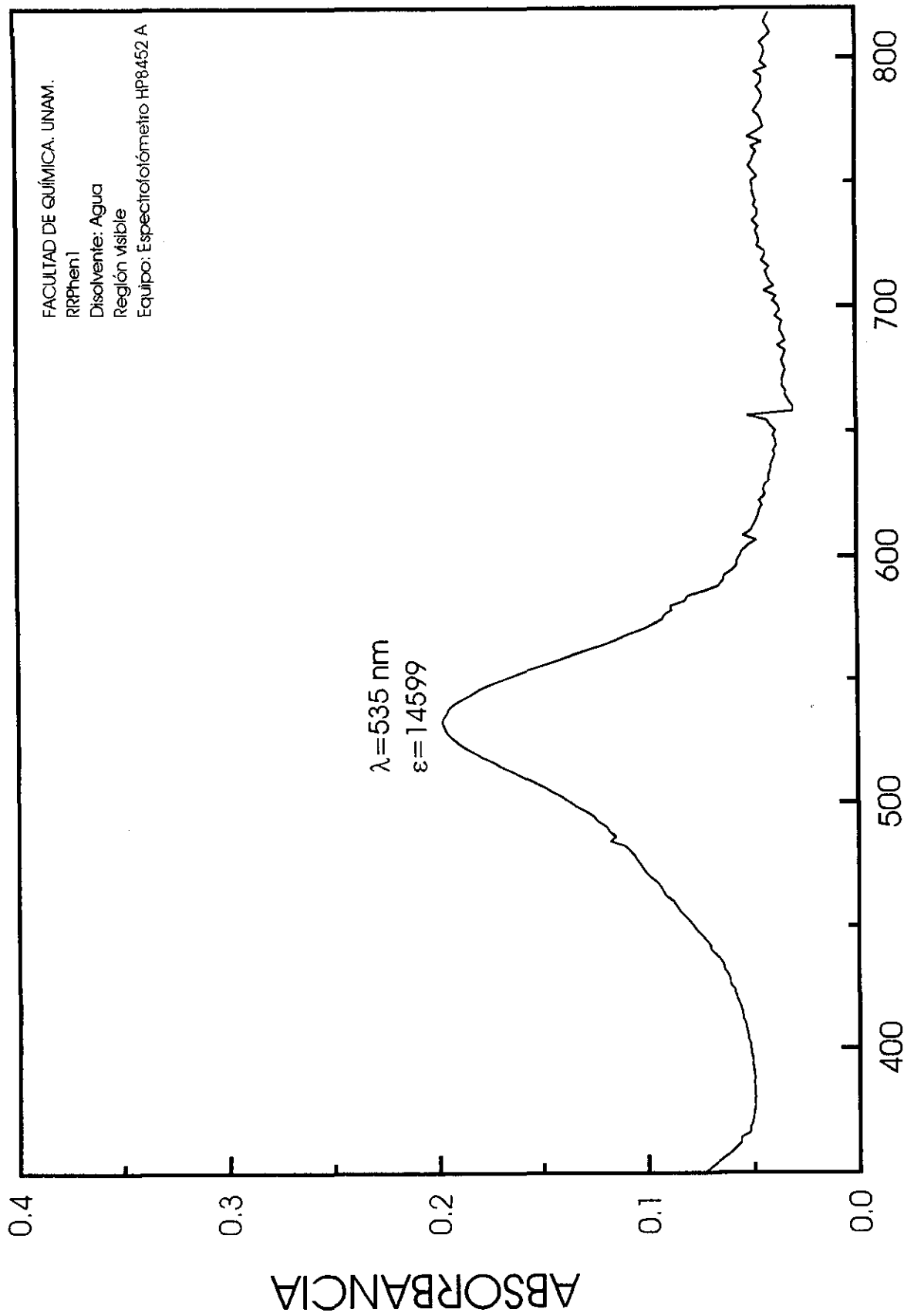


Figura 23. Espectro electrónico del análogo RRPhen1 en agua



LONGITUD DE ONDA (nm)

Figura 24. Espectro electrónico del análogo RRPhen1 en agua en la región visible

rojo de rutenio, como un útil marcador de cambios en la actividad biológica y en la reactividad del rojo de rutenio y de compuestos análogos a éste.

Del espectro del rojo de rutenio purificado (figura 18), calculamos, para la banda en la región visible, el coeficiente de absorción molar obteniéndose un $\epsilon=17035$. Este valor es un poco menor al esperado, aunque respecto a los valores registrados por la materia prima, es considerablemente elevado.

Para el caso de RRPhen1 encontramos un coeficiente de extinción de 14599, que es elevado y que va de acuerdo con la intensidad de color que las soluciones acuosas presentan.

B) UV-Vis en sólido (reflectancia difusa)

Esta técnica permite determinar la absorbancia propia de la materia sin la contribución del disolvente, como se da en el caso de la determinación del espectro electrónico de la materia en solución. Sin embargo, el espectro de absorbancia resultado de la incidencia de un haz luminoso sobre la muestra, en la técnica de reflectancia difusa, es producto de la contribución de la absorbancia inherente de la muestra y de fenómenos físicos asociados tal como la luz reflejada por la muestra. Así, esta técnica nos permite detectar interacciones de la muestra con el disolvente y propiedades particulares de la muestra.

Inicialmente se muestra el espectro obtenido mediante esta técnica del rojo de rutenio comercial (figura 25). En el caso del rojo de rutenio, es posible detectar en el espectro, un comportamiento diferente al que presenta el mismo compuesto en disolución, lo cual se puede atribuir a los fenómenos físicos característicos de compuestos oscuros. Emplearemos este comportamiento como marco de referencia para el estudio de los análogos al rojo de rutenio.

El espectro del compuesto análogo, RRPhen1, presenta el mismo comportamiento que el rojo de rutenio, es posible observar las tres señales principales en la región del visible con un ligero corrimiento, lo cual pone de manifiesto nuevamente que se realizó la coordinación de las fenantrolinas a la estructura metálica (figura 26).

A la fecha no se ha reportado el espectro del rojo de rutenio y de sus análogos mediante esta técnica espectrofotométrica, y consideramos que la comprensión del comportamiento del rojo de rutenio con esta técnica sería valiosa, por ejemplo, para corroborar los resultados obtenidos por la espectroscopía UV visible en solución.

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
Rojo de rutenio
Técnica de Reflectancia Difusa
Región visible.

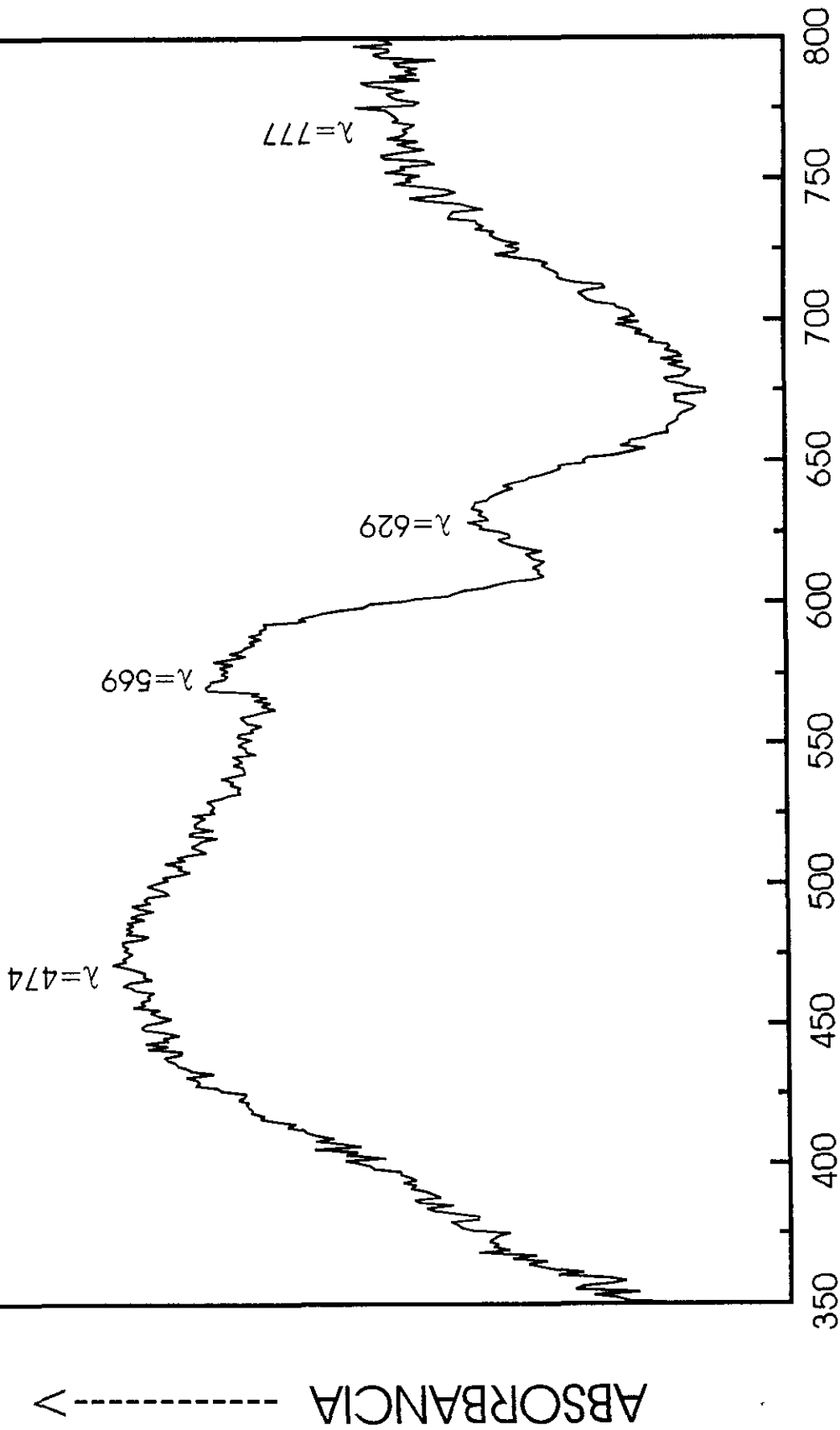


Figura 25. Espectro electrónico del rojo de rutenio

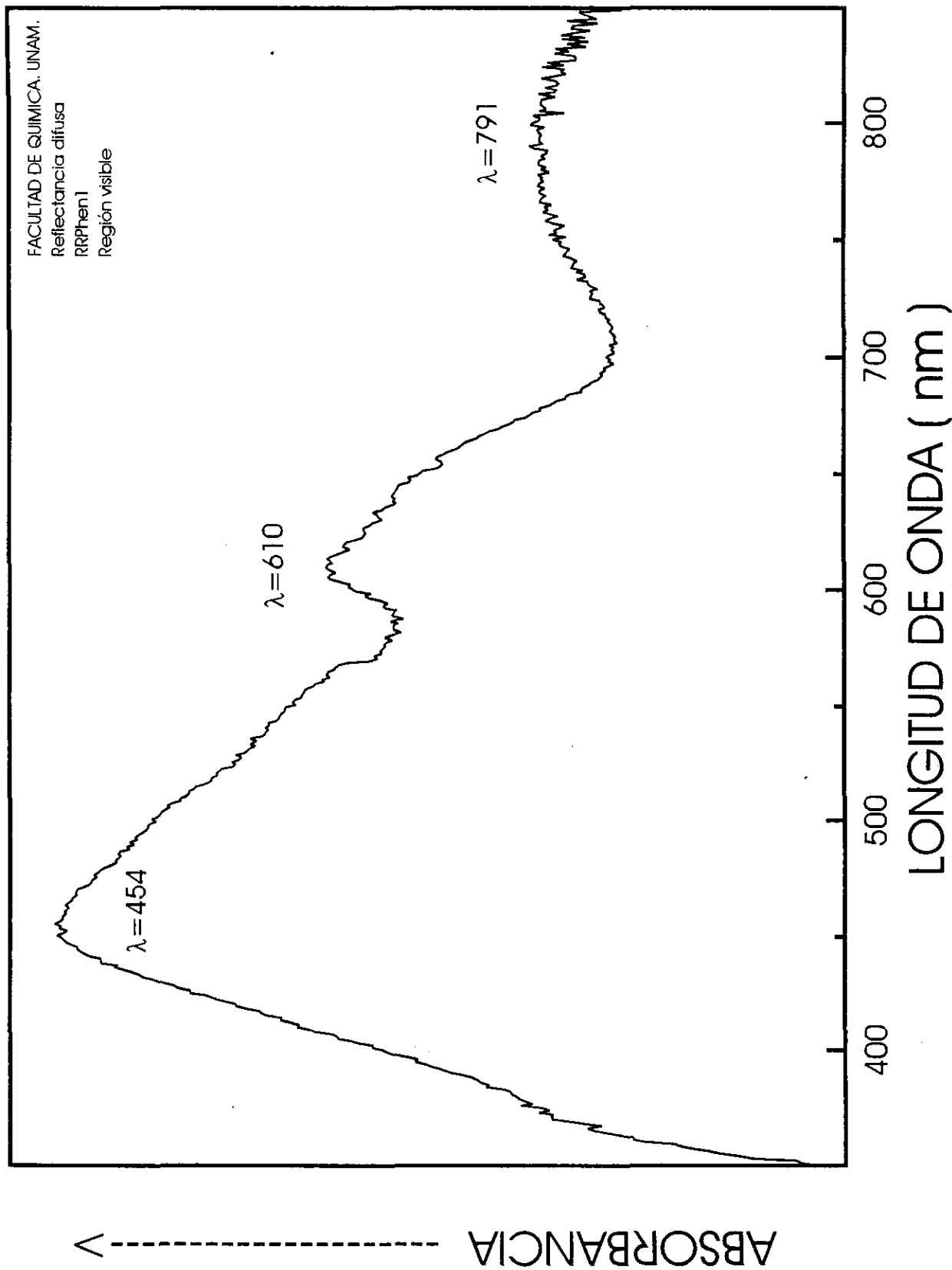


Figura 26. Espectro electrónico del análogo RRPhen1

4.1.7. Conductancia molar

Con el fin de asegurar que la carga del catión se conservara aún después de llevar a cabo la reacción de síntesis, decidimos emplear las mediciones de conductancia molar como herramienta.

Para ello fue necesario inicialmente obtener una curva patrón de conductancia molar del rojo de rutenio ya que no encontramos reportado en la literatura estos datos para un catión de carga tan alta como la que el rojo de rutenio presenta.

Una vez realizadas las mediciones correspondientes para la construcción de la curva patrón a partir de soluciones estándar del rojo de rutenio se trazó dicha gráfica, la cual presentamos en la Figura 27.

Preparamos una solución 2.4273×10^{-5} molar del RRPhen1 encontrando que presenta una conductancia molar de $29 \mu\text{S}$ como promedio de cinco determinaciones y la conductancia esperada es de $28 \mu\text{S}$, valor muy próximo al experimental. Por lo que la carga del catión se deduce que es de seis.

Por lo tanto concluimos que el compuesto RRPhen1 presenta la coordinación de 6 fenantrolinas a la estructura metálica, permaneciendo 8 grupos amino coordinados a los tres rutenios.

Esto por ende representa un aumento en el número de coordinación de los rutenios a un número de coordinación 8, que revisando en la literatura ha sido reportado frecuentemente para el rutenio y sobre todo en el caso del rutenio III^{65, 69 y 70}.

Además como contraión el catión del análogo diamagnético del rojo de rutenio presenta una mezcla de 3 cloruros y tres PF_6^- . Por otra parte es importante mencionar que RRPhen1 posee una carga $6+$ como se demuestra con las mediciones de conductancia molar y una pequeña impureza de derivados nitrosilados de rutenio, provenientes de la materia prima., como se pudo determinar mediante IR.

La siguiente fórmula estructural representa las observaciones anteriores:

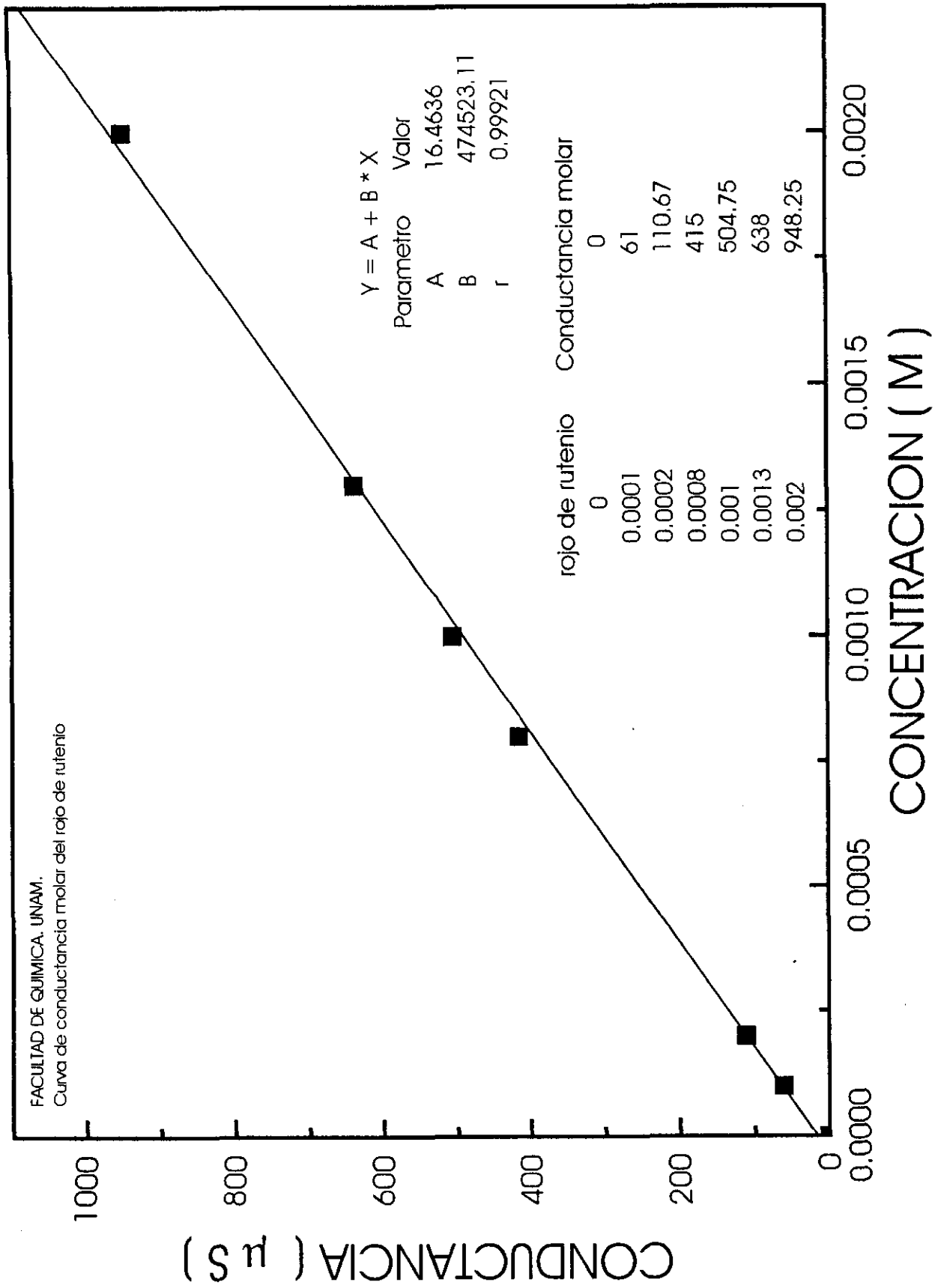
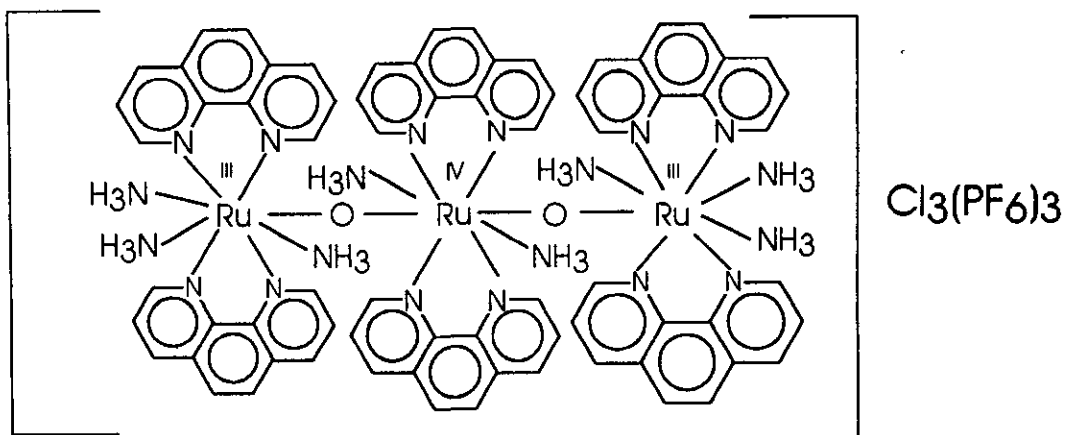


Figura 27. Curva patrón de conductancia molar del rojo de rutenio



El RRPhen1 tiene un peso molecular de 2094.12 g/mol.

El nombre sistemático de este compuesto es cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV).

4.2.- Caracterización del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolina rutenio(IV), RRPhen2

El producto obtenido fue caracterizado por las mismas técnicas que se emplearon para el análogo anterior y los resultados se exponen a continuación:

4.2.1. Propiedades físicas

Este compuesto presenta una coloración gris opaca, diferente a la observada en el caso de RRPhen1, que presenta una coloración gris verde.

Nuevamente, este compuesto es estable bajo las condiciones ambientales normales, y aun en solución acuosa por bastante tiempo.

La observación del compuesto mediante microscopía óptica permitió detectar una apariencia microcristalina.

El rendimiento calculado para esta reacción fue del 88% y es un compuesto soluble en la mayoría de los disolventes polares.

RRPhen2 no presenta en solución cambios de coloración en función del tipo de disolvente como las observadas en el caso del análogo anterior.

En la tabla 5 se presentan algunas de las propiedades físicas de este compuesto:

TABLA 5. Propiedades físicas de RRPhen2

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
$C_{96}N_{20}H_{76}Ru_3O_2Cl_3P_3F_{18}$	2386.16	Gris claro Opaco microcristalino	Agua	++
			Acetona	++
			Metanol	+++
			Acetonitrilo (verde)	+++
			Acetato de etilo	++
			Etanol	+
			Hexano	+
			CS ₂ (púrpura)	+

+ Insoluble, ++ parcialmente soluble y +++ soluble

Este compuesto es parcialmente soluble en los disolventes polares. Este compuesto resulto ser ligeramente menos soluble en agua, pero fue más soluble en acetona y acetonitrilo, que RRPhen1, lo cual nos hace suponer que RRPhen2 posee un ligeramente mayor carácter no polar. Se encontró también que RRPhen2 descompone por arriba de 250 °C.

Este compuesto también se oxida rápidamente en presencia de HCl diluido y descompone en presencia de soluciones de NaOH.

4.2.2. Análisis elemental

El análisis elemental de este compuesto generó los resultados que son concentrados en la tabla 6:

TABLA 6. Análisis Elemental de RRPhen2

Elemento	C	N	Cl	P	H
% Experimental	48.41	13.64	3.04	4.70	3.33
% Calculado	48.32	11.74	3.89	4.46	3.21

El resultado nos indica la siguiente fórmula mínima:



la que constituye la coordinación de 8 moléculas de fenantrolina a la estructura metálica, conservando 4 grupos amino coordinados.

Para la formula mínima que establecemos se tienen un peso molecular de 2386.16 g/mol.

Debido a la naturaleza quelante de la fenantrolina creemos muy poco probable que la fenantrolina se una al rutenio por sólo uno de los nitrógenos, es más probable entonces que al coordinarse la fenantrolina se genere un aumento en el número de coordinación, de 6 a 8, hecho que confirma la afirmación en el caso del compuesto RRPPhen1.

4.2.3. Espectroscopía de Infrarrojo

En el caso de este análogo, RRPPhen2, (figura 28 y 29) encontramos un comportamiento similar al análogo anterior, las principales bandas de las materias primas y las asignaciones correspondientes en el caso de este análogo se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 7. Principales bandas en Infrarrojo de RRPPhen2, rojo de rutenio y fenantrolina

BANDAS	ROJO DE RUTENIO	FENANTROLINA	RRPPhen2
ν NH ₂	3228,3144		3300-3100
δ NH ₂	1616		1620
δ NH ₂	1299		1296
ρ NH ₂	805		838 cubierta
ν Ru-NO	1852		1852
ν N-O	610		No presente
ν =C-H		3058	3052
δ =C-H en plano		1216,1138,1090	1218,1141,1097
δ =C-H fuera del plano		854	838 cubierta
δ =C-H fuera del plano		738	730
ν C=C ν C=N		1586,1502 y 1422	1590 y 1512,1424 (11)
ν C-H		2920,2851	2918, 2840

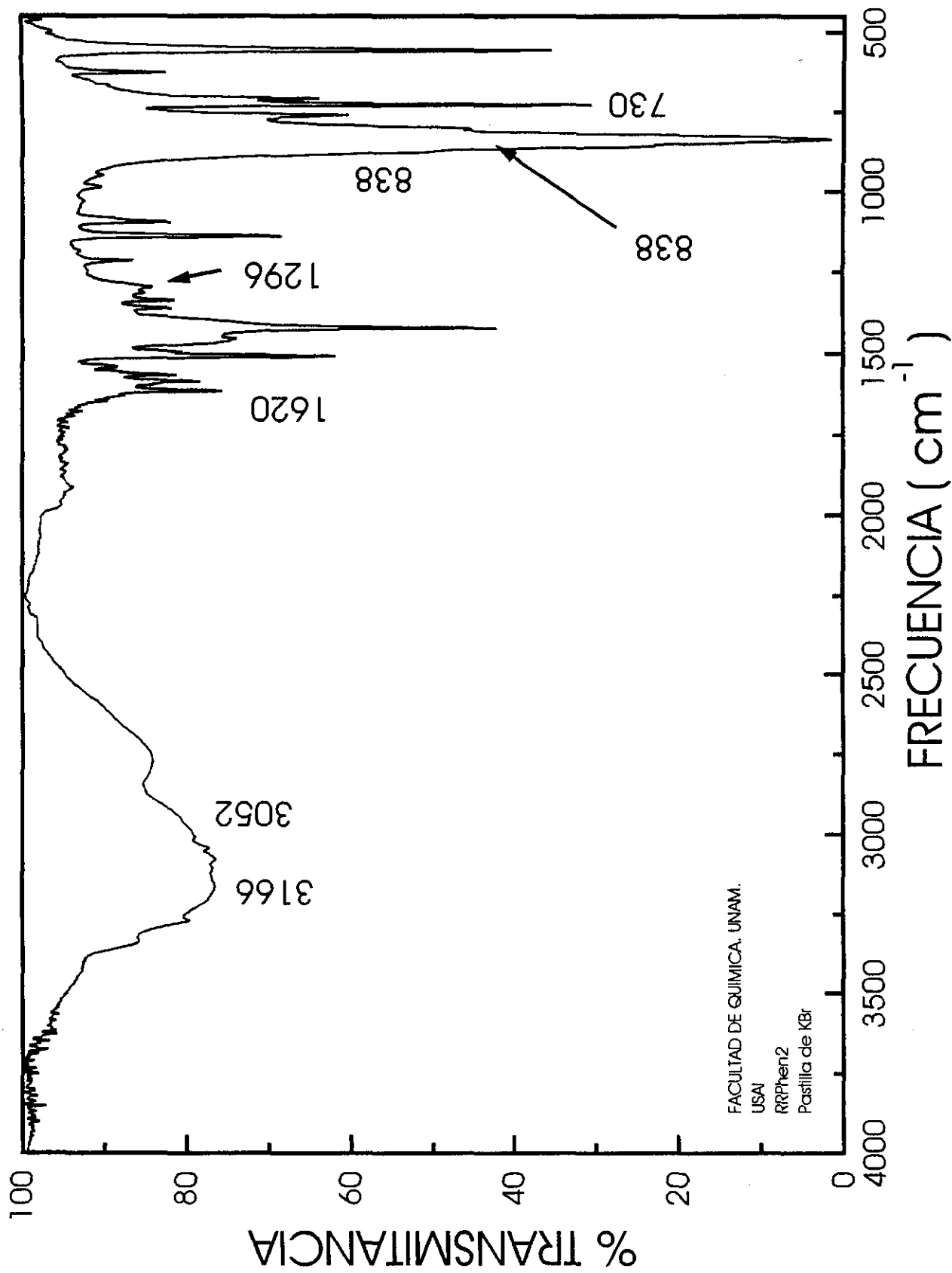


Figura 28. Espectro infrarrojo en la región media del análogo RRPhen2

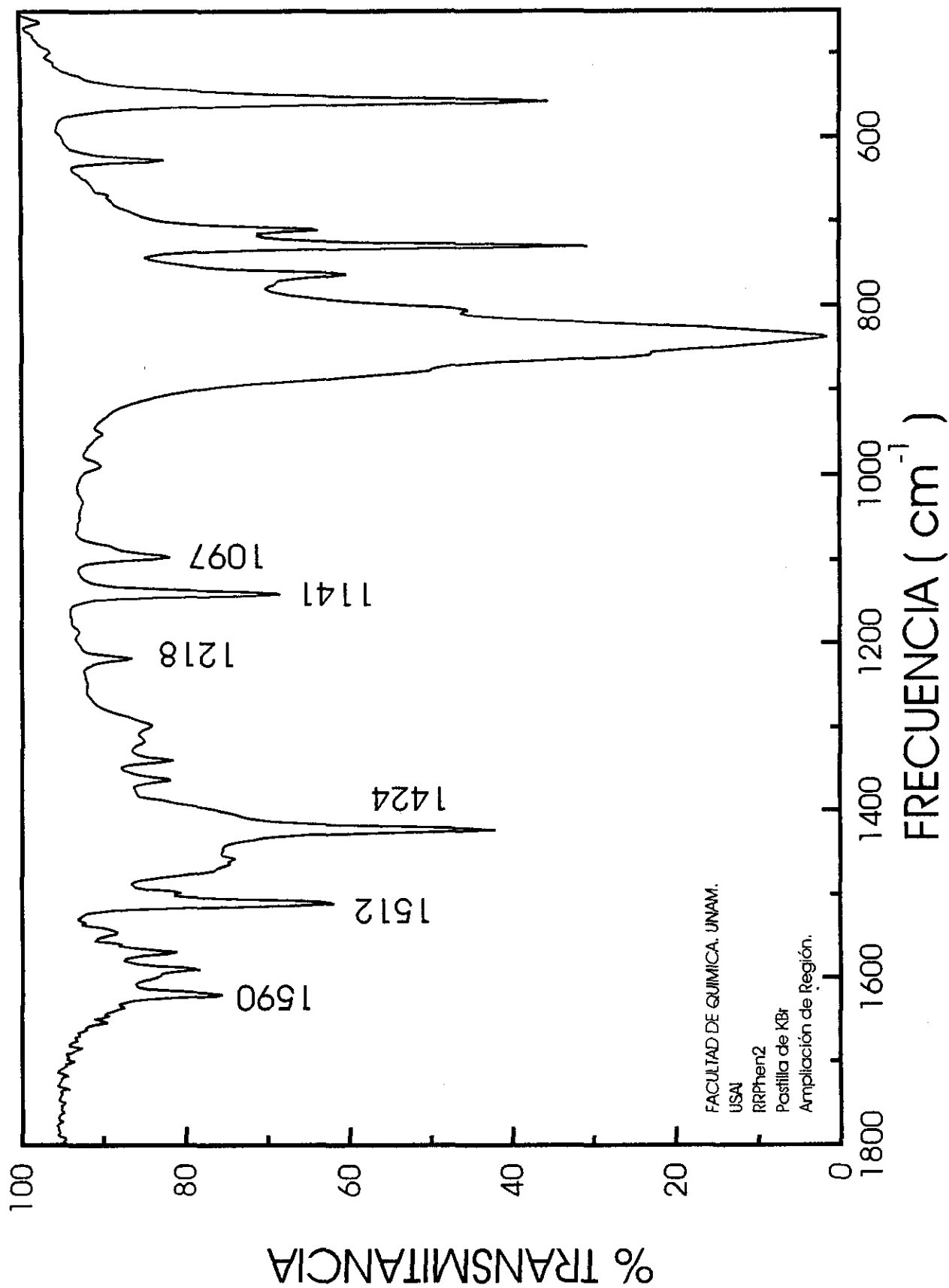


Figura 29. Espectro infrarrojo en la región media del análogo RRPhen2

Debido a que en el espectro es posible observar a las bandas características de la fenantrolina recorridas con respecto a la fenantrolina libre, en el espectro de RRPhen2, se concluye que si se coordinó a la estructura metálica.

También es importante mencionar, que las bandas características en la fenantrolina, asignadas al agua de cristalización no se observan en el compuesto análogo, por lo cual proponemos la coordinación de la fenantrolina a la estructura metálica ya que existe un cambio evidente en ésta.

4.2.4. Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C

A) Resonancia Magnética Nuclear ^1H

En esta técnica podemos observar si es que efectivamente la coordinación de la fenantrolina se llevó a cabo dado que el rojo de rutenio *per se* solo presenta un tipo de señal que se atribuye a los protones de los grupos amino coordinados a la estructura metálica y dicha señal se presenta aproximadamente a 4.3 ppm y se trata de una señal de mediana intensidad caracterizada por ser muy ancha, así que de lograrse la coordinación nuevamente esperamos encontrar un patrón de señales muy similar al que se observa en la fenantrolina, generado por los núcleos de hidrógeno en ésta. En el espectro de RRPhen2 (figura 30 y 31) observamos el mismo patrón de bandas que se presentan en el espectro de la fenantrolina (figura 6 y 7), aunque es posible observar un desplazamiento de las señales en comparación con la fenantrolina, lo cual es indicativo de que la fenantrolina se coordinó a la estructura metálica.

Es también importante mencionar que el compuesto se encuentra puro, como lo demuestra el espectro, además, de las señales podemos inferir que las fenantrolinas se encuentran coordinadas a la estructura metálica de forma tal que todas las fenantrolinas coordinadas son equivalentes, por lo cual se trata de una estructura muy simétrica.

Las señales que se presentan a aproximadamente a 7.2 ppm las asignamos a los grupos amino presentes en la estructura metálica ya que como podemos observar desaparecen luego del intercambio con agua deuterada (figura 32), sin descartar la posibilidad de que se trate de una impureza, la cual posee núcleos protónicos ácidos como el caso de los compuestos aminados.

La asignación de las señales ya se discutió detalladamente en el capítulo correspondiente a la resonancia magnética protónica del análogo RRPhen1. Además en la figura 6 mostramos el espectro de RMN ^1H de la fenantrolina pura con la correspondiente asignación de las bandas con los núcleos de hidrógenos

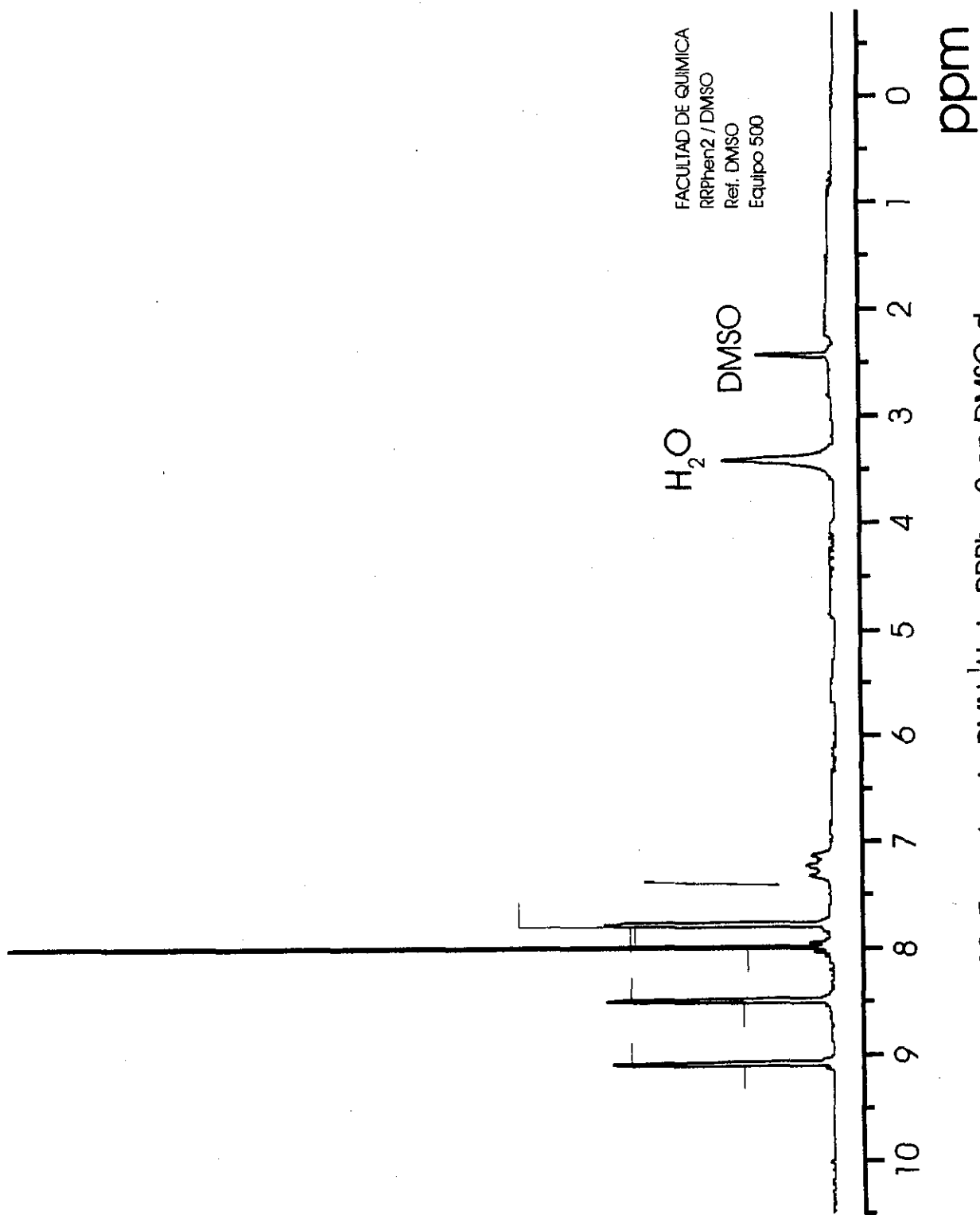


Figura 30. Espectro de RMN ¹H de RRPhen2 en DMSO-d₆.

FACULTAD DE QUIMICA
RRPhen2 / DMSO
H1
Ref. DMSO
Equipo 500

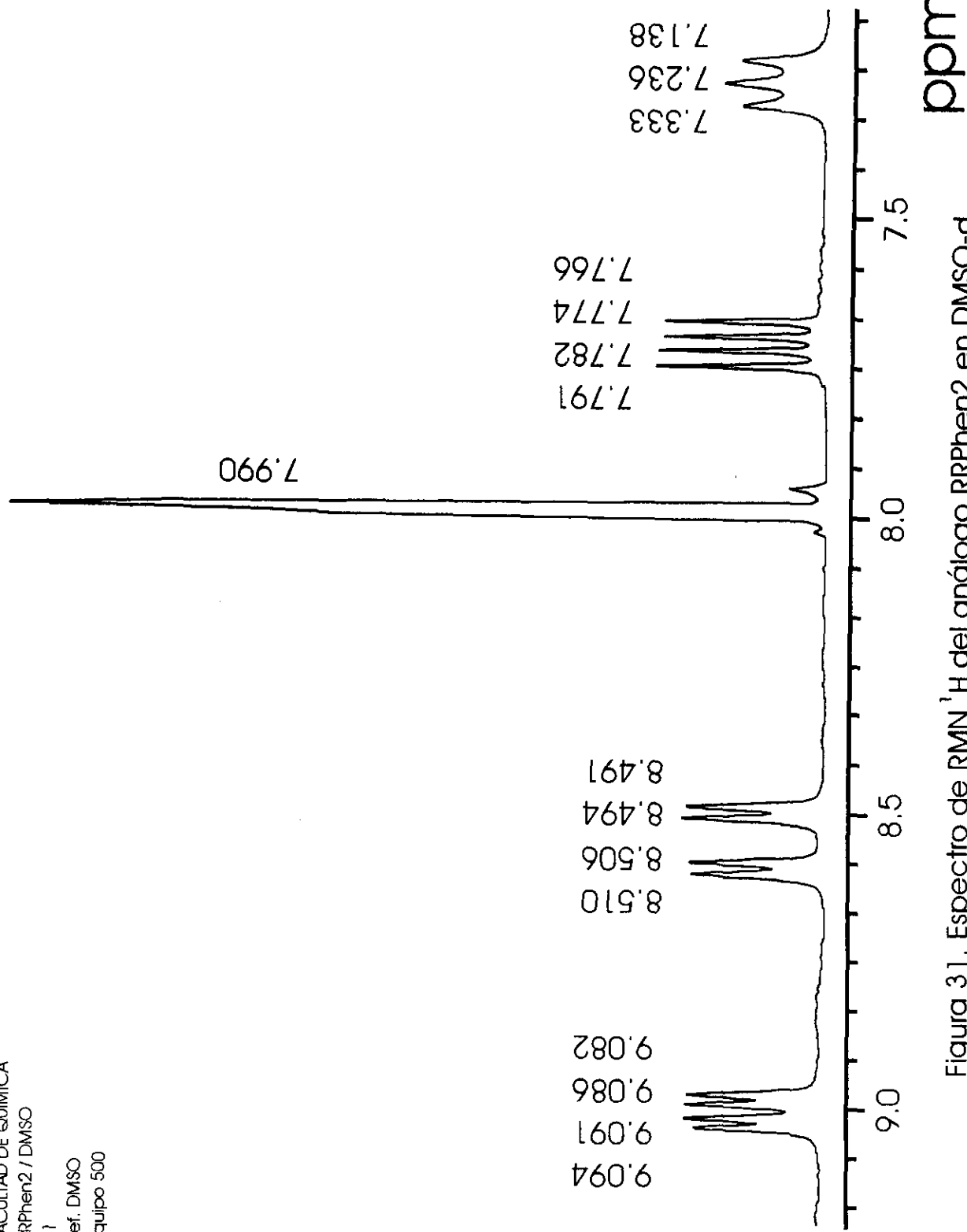


Figura 31. Espectro de RMN ^1H del análogo RRPhen2 en DMSO-d_6

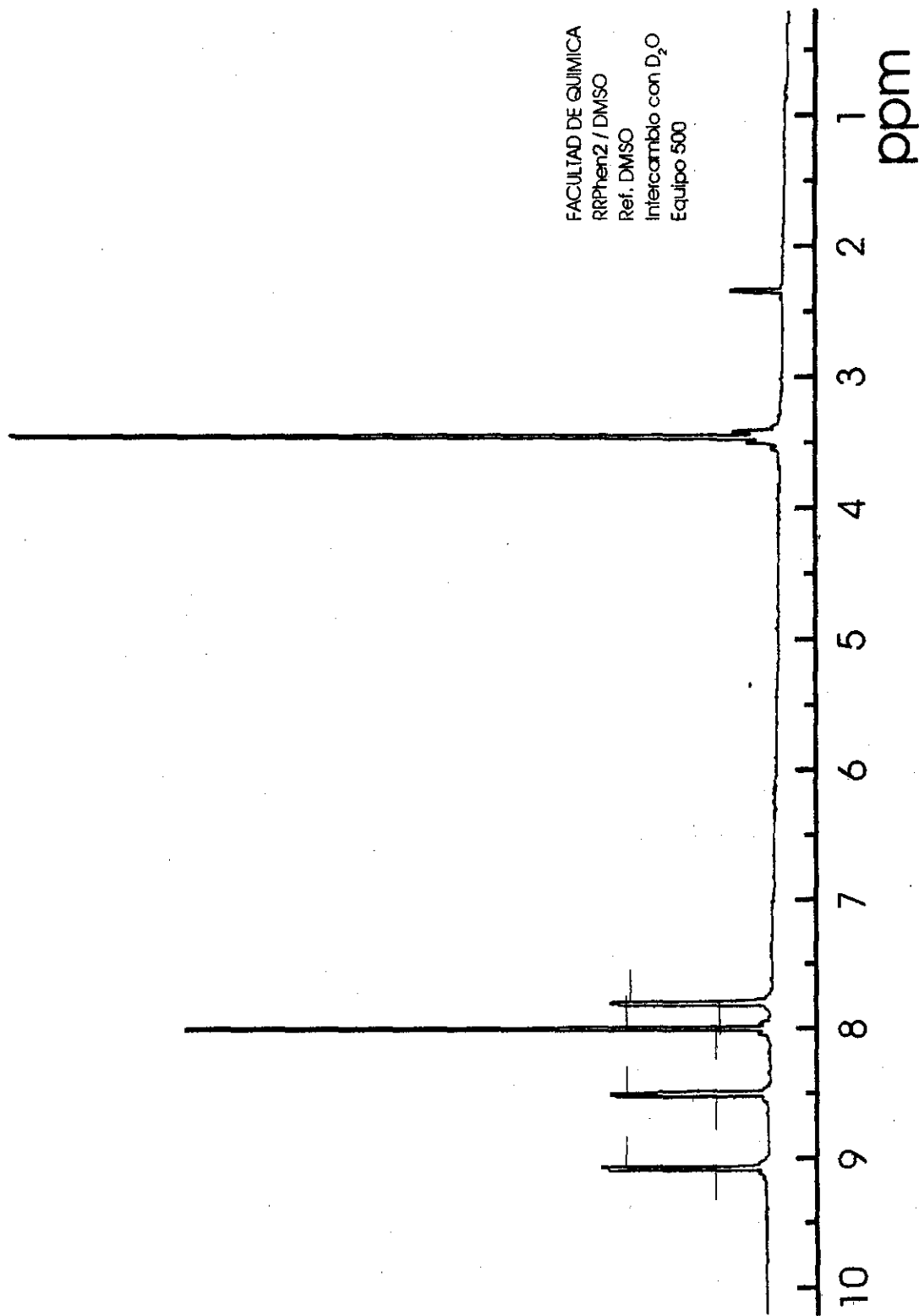


Figura 32. Espectro de RMN ¹H del análogo RRPhen2. Intercambio con D₂O

correspondientes de la fenantrolina. También es importante mencionar que la banda intensa en la figura 6 que se presenta aproximadamente a 3.35 ppm corresponde esencialmente al agua de cristalización que la materia prima posee.

B) Resonancia Magnética Nuclear de RMN ^{13}C

Creemos importante recordar que en el espectro de la fenantrolina pura, se observan seis bandas características cuya asignación se ilustra en el espectro correspondiente, en la figura 12. Dicha asignación como ya se ha explicado antes, se hizo tomando como referencia a la quinolina compuesto extensamente estudiado.

En el espectro del compuesto análogo se observa el mismo patrón de señales, con un pequeño corrimiento de todas, lo que confirma que la sustitución de las fenantrolinas en la estructura metálica se llevó a cabo. Nuevamente es posible observar un espectro muy limpio, el cual nos habla de la pureza del compuesto y por la presencia de un solo patrón de bandas en el espectro se pone de manifiesto la simetría de la molécula (figuras 33 y 34).

4.2.5. Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F y ^{31}P

A) Resonancia Magnética Nuclear de ^{19}F

Como ya lo hemos mencionado, decidimos utilizar esta resonancia debido a la posibilidad de la generación de una reacción de hidrólisis en el contraión, el hexafluorofosfato de amonio, que generalmente da origen a la especie aniónica PO_2F_2^- , como ya a sido reportado ampliamente en la literatura, lo cual podría alterar de manera significativa nuestros resultados.

Ya que contamos con el espectro de RMN ^{19}F del hexafluorofosfato de amonio (figura 14) realizamos la comparación con el espectro del análogo (figura 35).

En ambos espectros podemos observar el mismo patrón, se presentan dos señales producto del acoplamiento existente entre los núcleos de Flúor-Fósforo, pues el flúor 19 y el fósforo 31 tienen un espín nuclear de $I = \frac{1}{2}$ y una abundancia del 100%. Como ya se explicó la multiplicidad dada por la fórmula $2ni + 1$ nos da un valor de 2.

El desplazamiento de las señales es muy similar lo que confirma que el contraión hasta este momento no ha sufrido cambio.

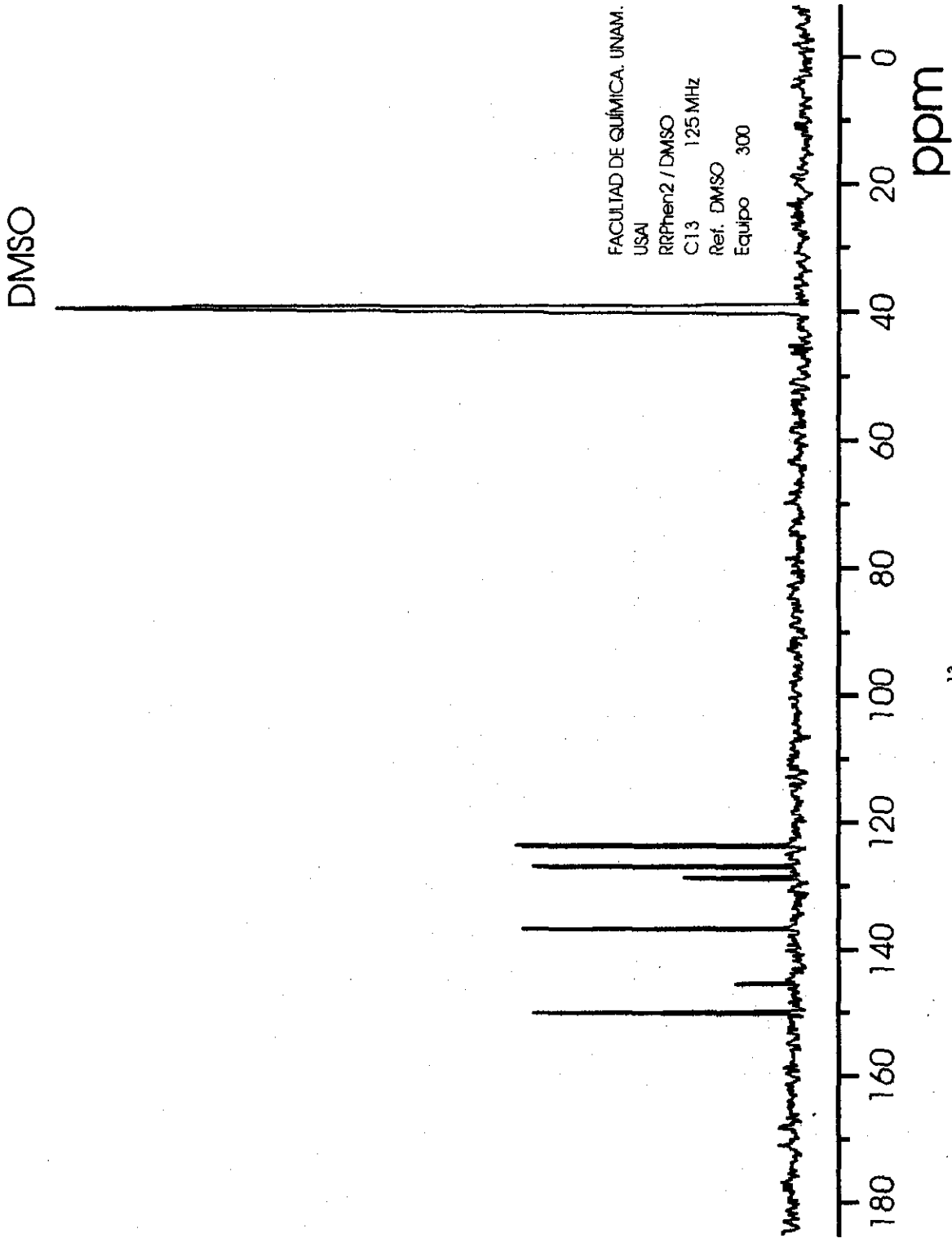


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C de RRPhen2 en DMSO- d_6

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.
USAI
RRPhen2 / DMSO
C13
125 MHz
Equipo 300

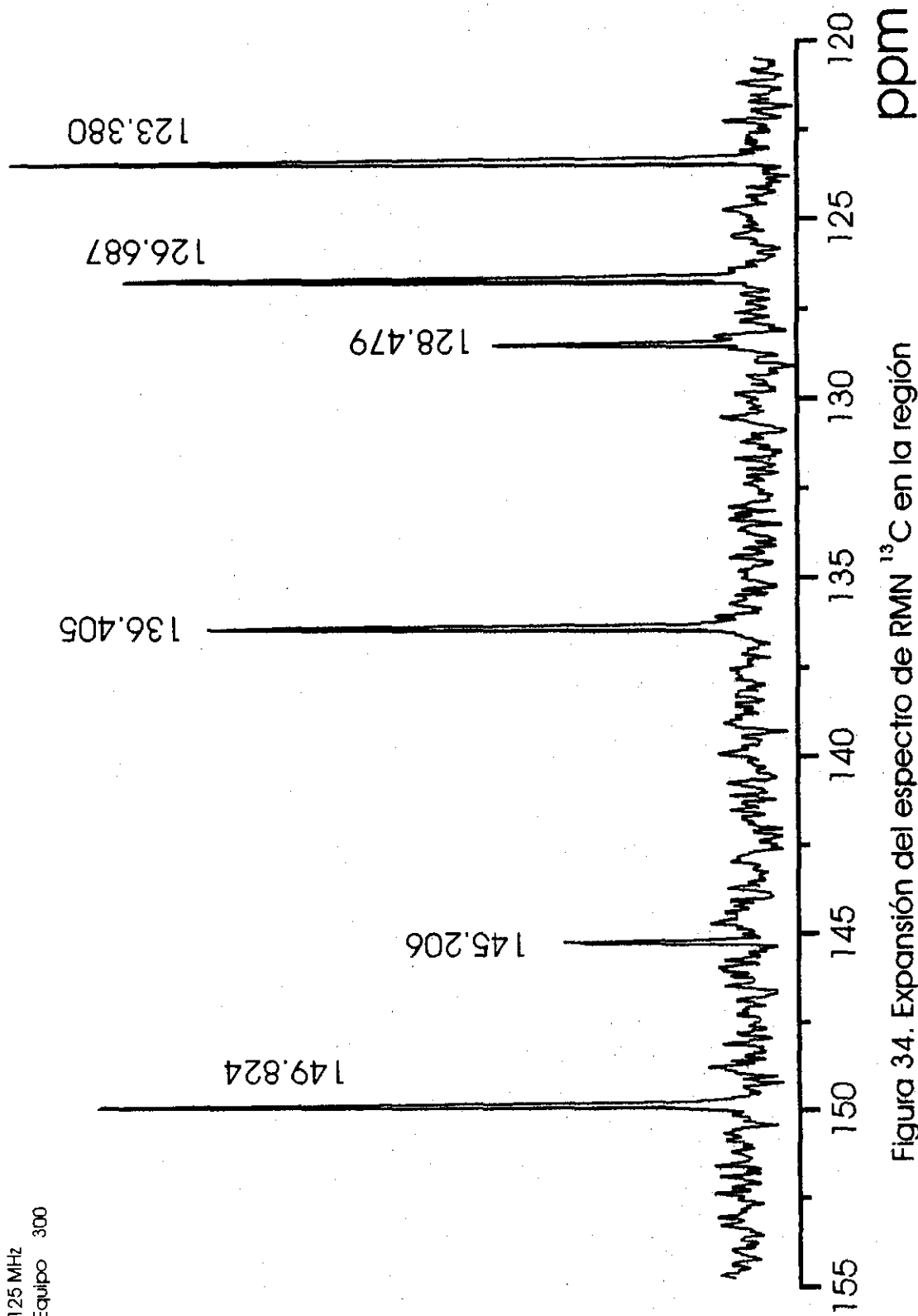


Figura 34. Expansión del espectro de RMN ¹³C en la región de 120 a 150 ppm, de RRPhen2 en DMSO-d₆.

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USAI
RRPhen2 / DMSO
F19 282.47
Ref. al Ácido Trifluoroacético
Equipo 300

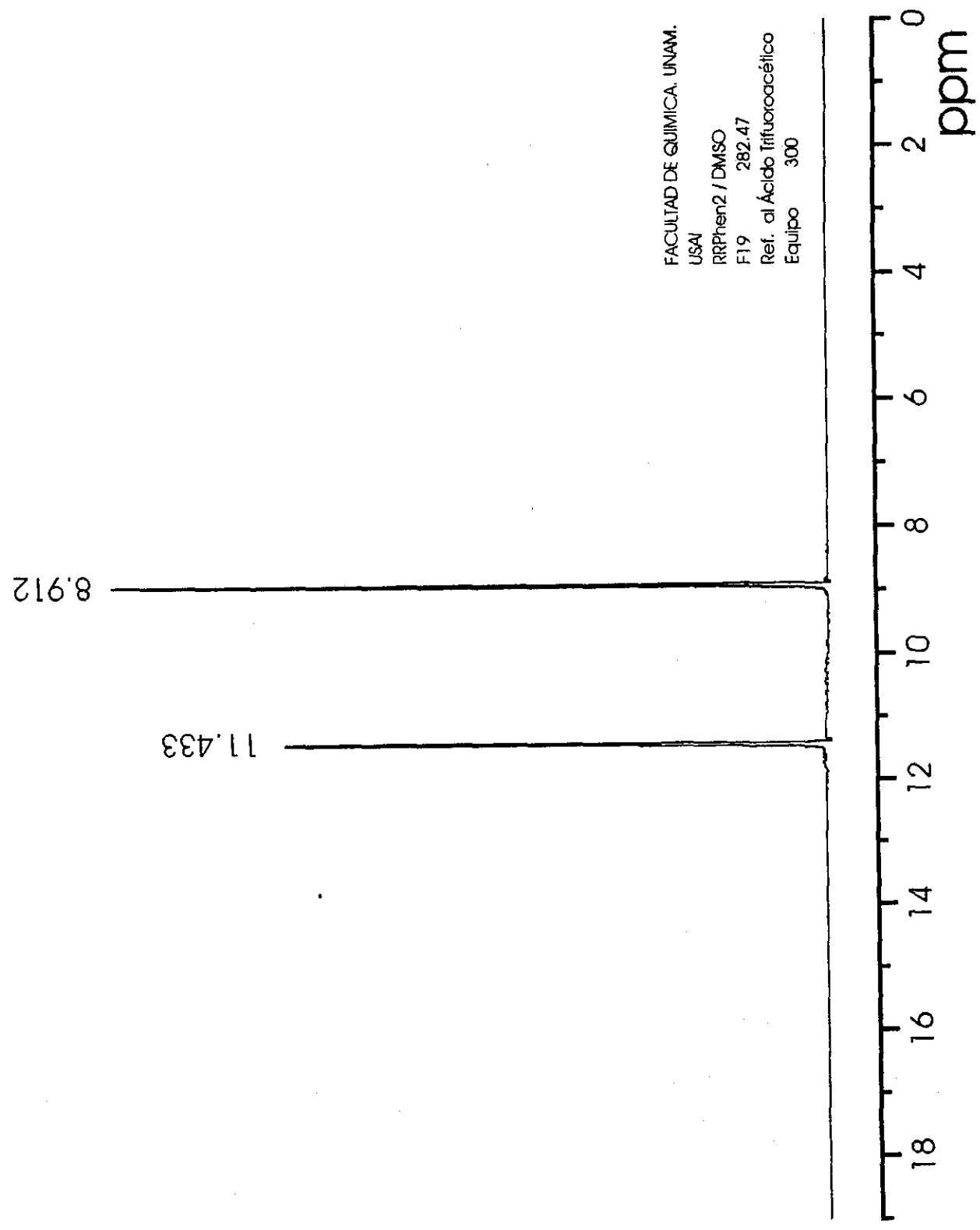


Figura 35. Espectro de RMN ¹⁹F del análogo RRPhen2 en DMSO-d₆.

B) Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P

Nuevamente debido a que se reporta que el hexafluorofosfato de amonio posee cierta reactividad química decidimos observar el comportamiento que el fósforo, en el contraión de RRPhen2, presenta en la resonancia.

Una vez con los espectros de RMN ^{31}P del hexafluorofosfato de amonio (figura 16) y del análogo (figura 36), realizamos la comparación encontrándose el mismo comportamiento. Con tal evidencia experimental se descarta cualquier cambio químico.

De la presencia de las siete señales ya explicadas, sólo es importante mencionar que existe un acoplamiento entre el núcleo de fósforo y de flúor los cuales poseen un espín nuclear de $l=1/2$ y una abundancia del 100% donde la multiplicidad de la señal esta dada por la fórmula $2nl+1$, que da un valor de 7 en este caso, debido al número de núcleos vecinos.

4.2.6. Espectroscopía UV-Vis en disolución y en sólido

A) UV-Vis en disolución

El espectro del compuesto análogo al rojo de rutenio se muestra en las figuras 37 y 38.

En este espectro podemos observar la banda en el visible, característica del rojo de rutenio y las bandas típicas de la fenantrolina, de donde podemos percibir que se trata de un espectro muy similar al de RRPhen1. Sin embargo, es importante hacer notar que el coeficiente de extinción molar es de 2437, que es 6 veces menor al coeficiente de absorción del RRPhen1. Este hecho lo confirmamos experimentalmente, mediante la observación de que las soluciones de este análogo no muestran intensidad que las soluciones acuosas del RRPhen1 presentan.

Por otra parte, es posible observar una banda a aproximadamente 739 nm, correspondiente a una pequeña impureza de violeta de rutenio, del cual ya se ha discutido ampliamente en los capítulos 1 y 4, sección 4.1.6. de esta tesis.

Las bandas generadas por las transiciones electrónicas en los anillos fenantrolínicos son similares a las observadas en la materia prima, aunque con ligeros desplazamientos en la región UV.

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

USAI

RRPhen2 / DMSO

P31 161.9 MHz

Ref. α 0 ppm H_3PO_4

Equipo 400

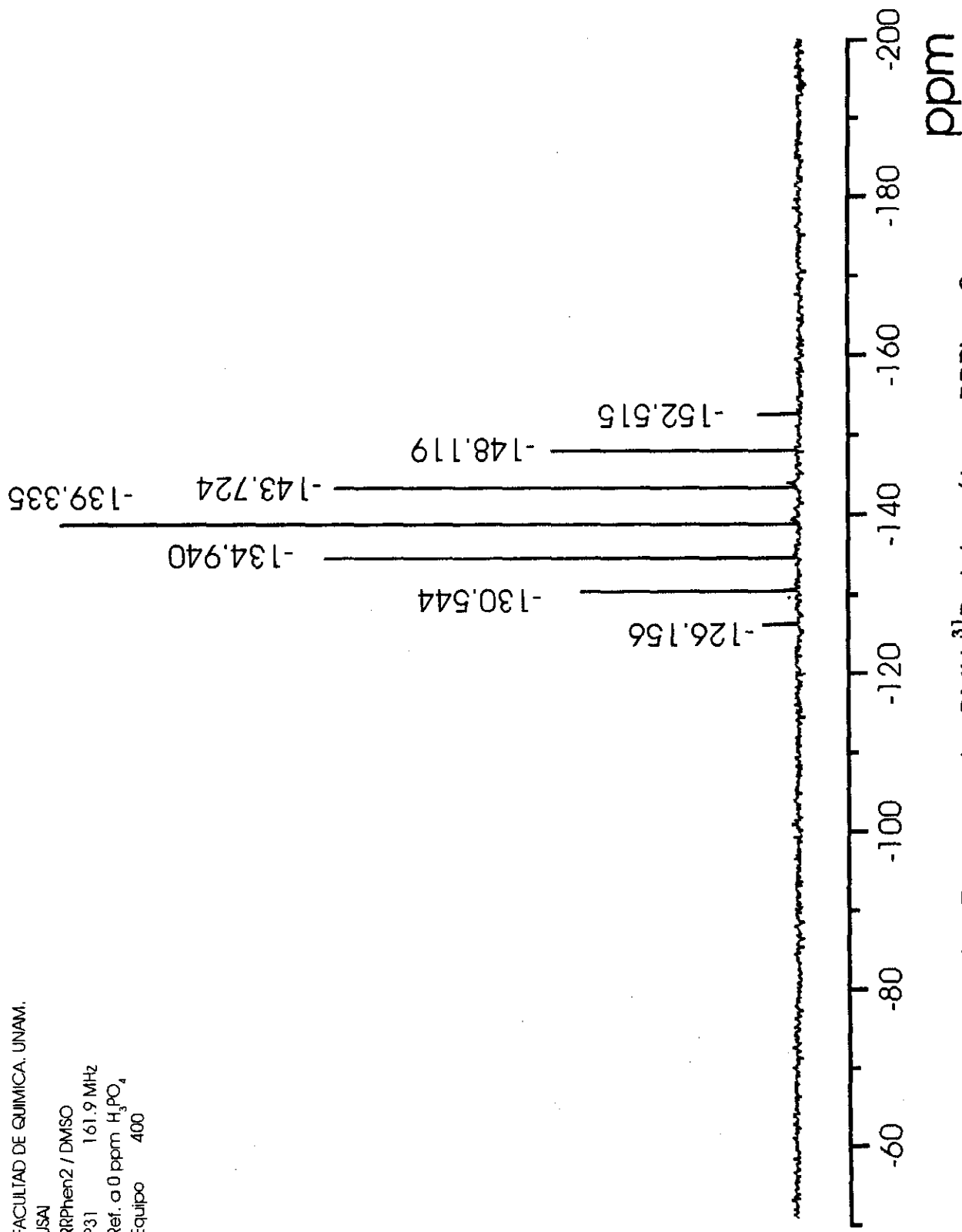
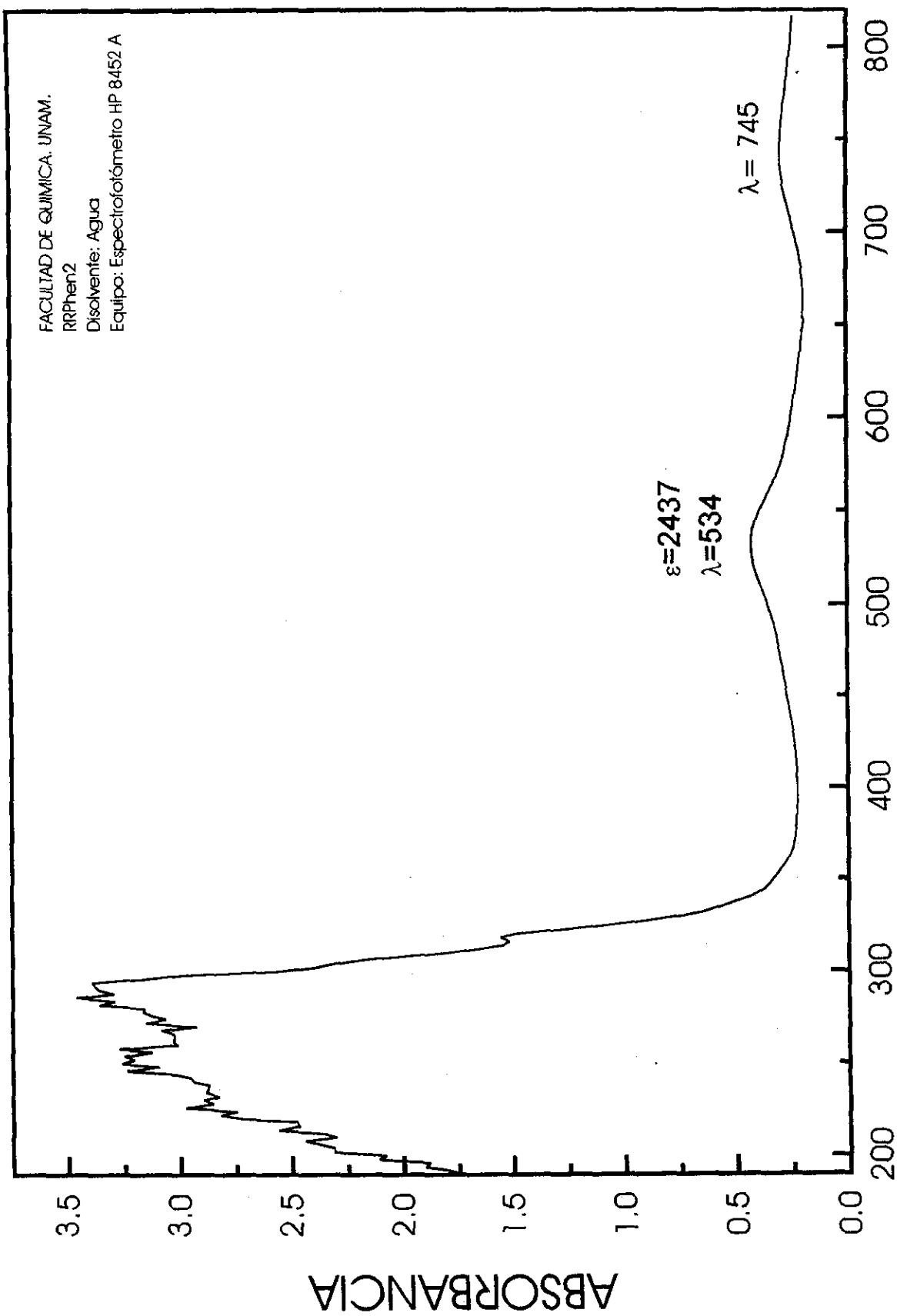


Figura 36. Espectro de RMN ^{31}P del análogo RRPhen2



LONGITUD DE ONDA (nm)

Figura 37. Espectro electrónico del análogo RRPhen2 en agua

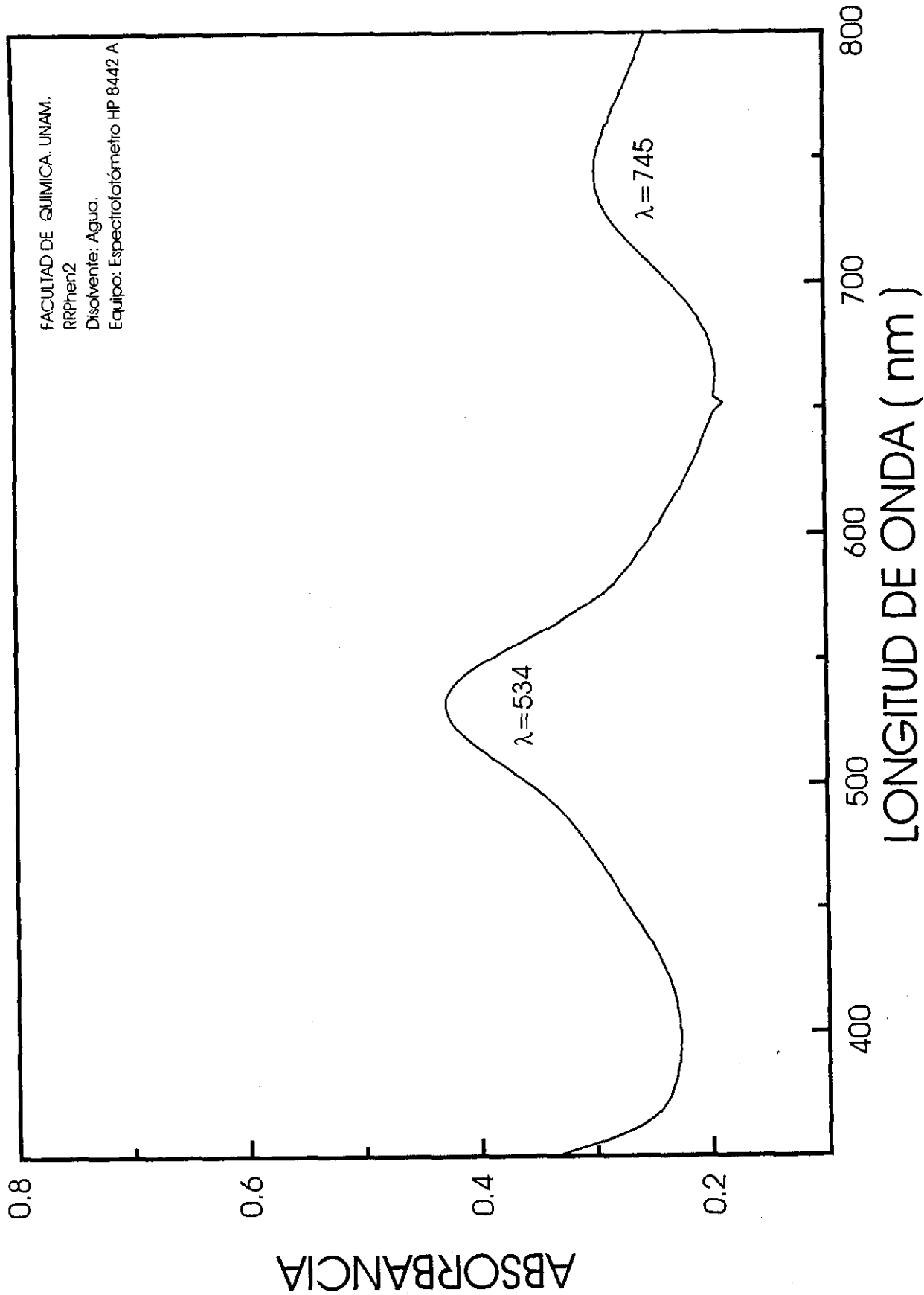


Figura 38. Espectro electrónico de RRPhen2 en agua. Expansión de la región visible

B) UV-Vis en sólido (reflectancia difusa)

El comportamiento que el derivado del rojo de rutenio tiene, es ligeramente diferente. Podemos ver una banda intensa a aproximadamente 280 nm que la atribuimos a la gran cantidad de fenantrolinas coordinadas que en esta cantidad le dan este comportamiento diferente al compuesto. Es necesario realizar una investigación profunda empleando esta técnica espectrofotométrica con el fin de establecer una explicación a esta diferencia (figuras 39 y 40).

4.2.7. Determinación de conductancia molar

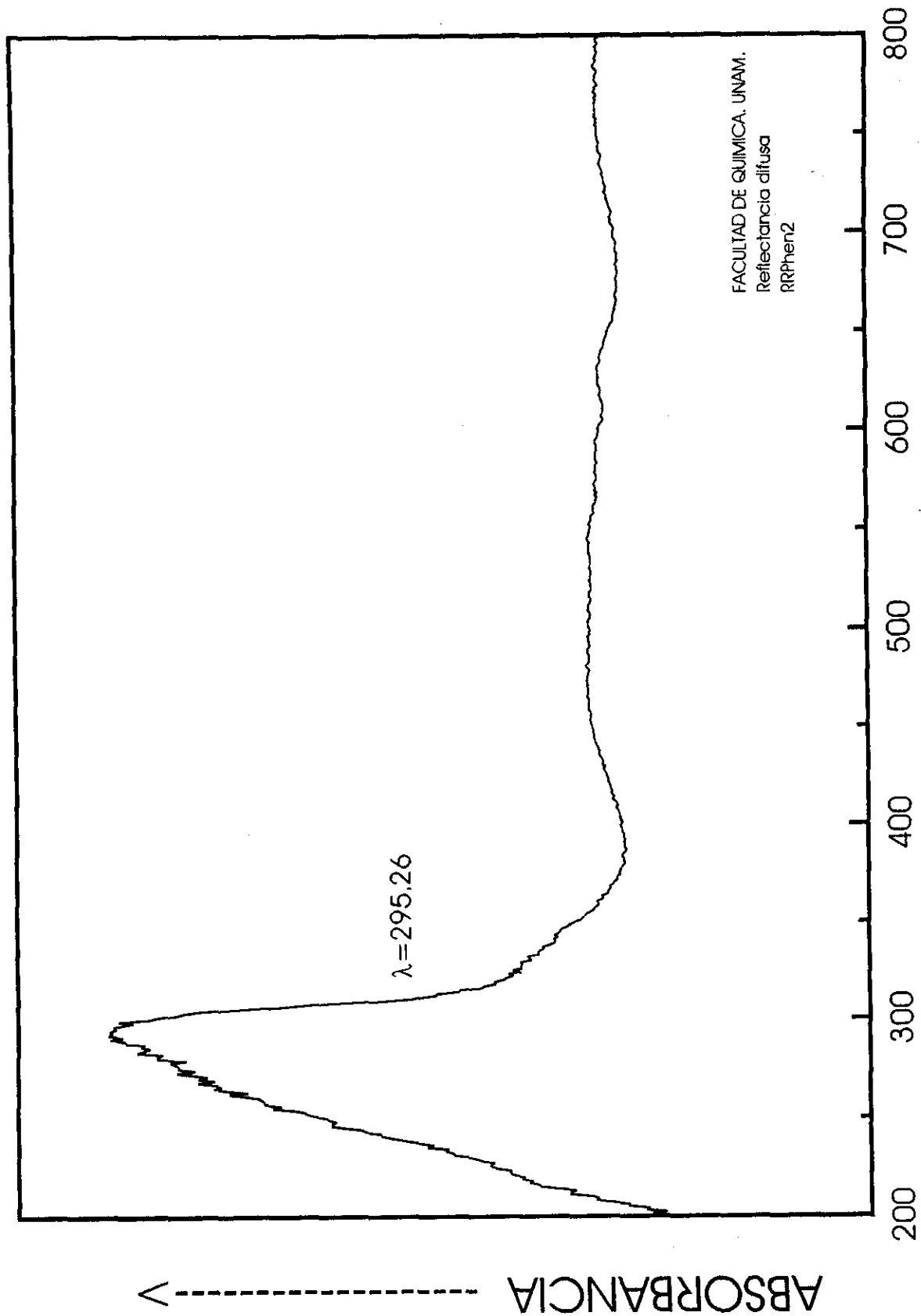
En el caso de este análogo se preparó una solución molar de concentración de 1.1734×10^{-4} a la cual teóricamente le corresponde una conductividad de $72 \mu\text{S}$, mientras que experimentalmente se encontró una conductividad de $73 \mu\text{S}$, tales valores son muy próximos entre sí lo que pone de manifiesto que la carga del catión de RRPhen2 es de 6 cargas positivas.

Así la proximidad entre los resultados experimental y teórico nos permite concluir que el compuesto conserva la carga $6+$ y por tanto en los estudios biológicos solamente se determinará la influencia de la conformación y la forma y no de la carga.

En vista de tal evidencia observamos que el compuesto RRPhen2 analizado es un compuesto análogo al rojo de rutenio que presenta la coordinación de 8 moléculas de fenantrolina a los núcleos metálicos y permanecen coordinados a la estructura metálica 4 grupos amino, lo cual pone de manifiesto un incremento en el número de coordinación en los núcleos de rutenio. Esta conclusión es similar a la encontrada en el compuesto anterior RRPhen1, lo cual nos indica un comportamiento específico.

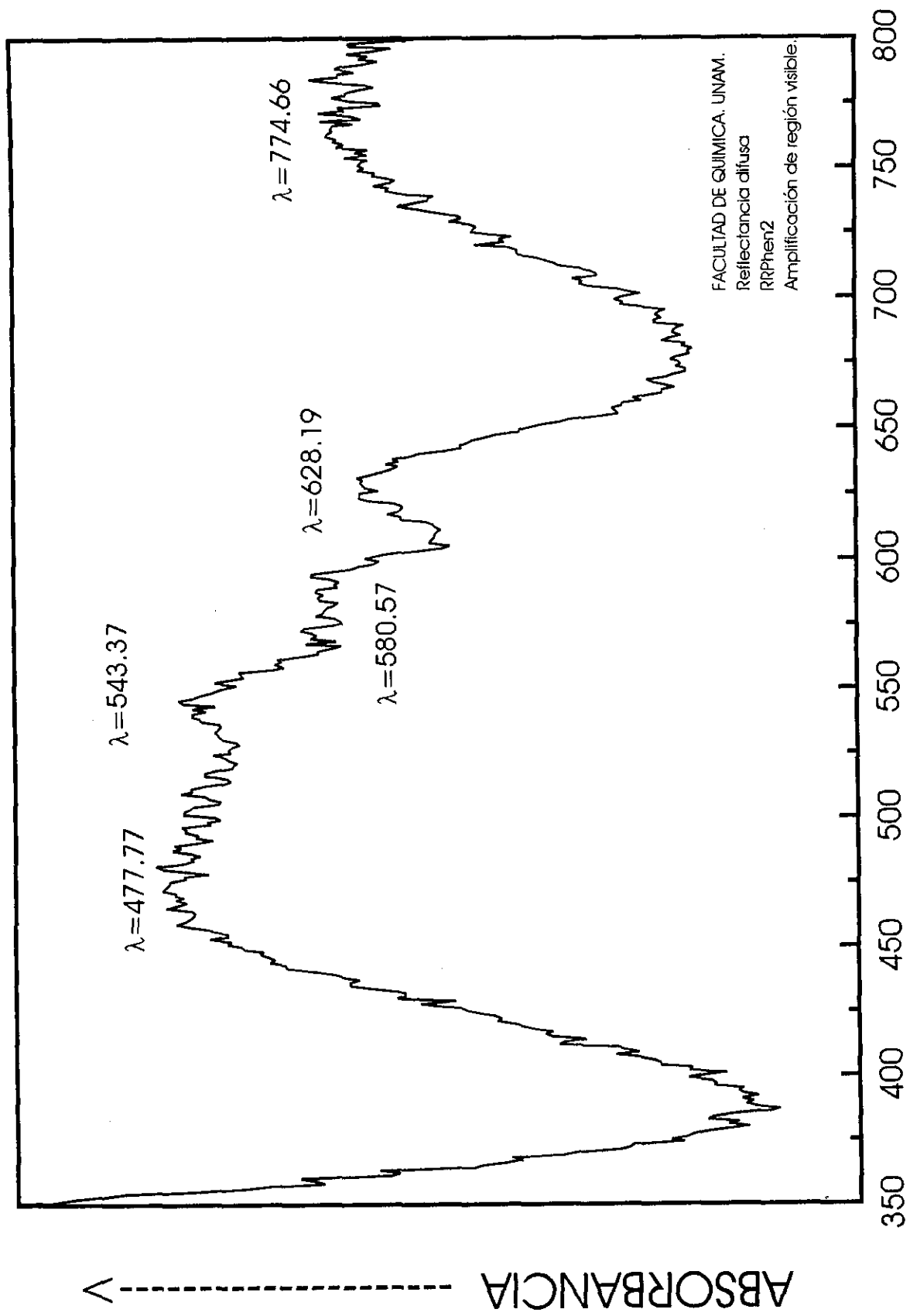
Además encontramos que como contraión este catión del compuesto RRPhen2 presenta 3 PF_6^- y 3 cloruros. Como se pudo determinar por medio de los estudios de conductancia molar este compuesto RRPhen2 presenta una carga $6+$.

Así de tales afirmaciones se muestra la formula estructural del compuesto RRPhen2:



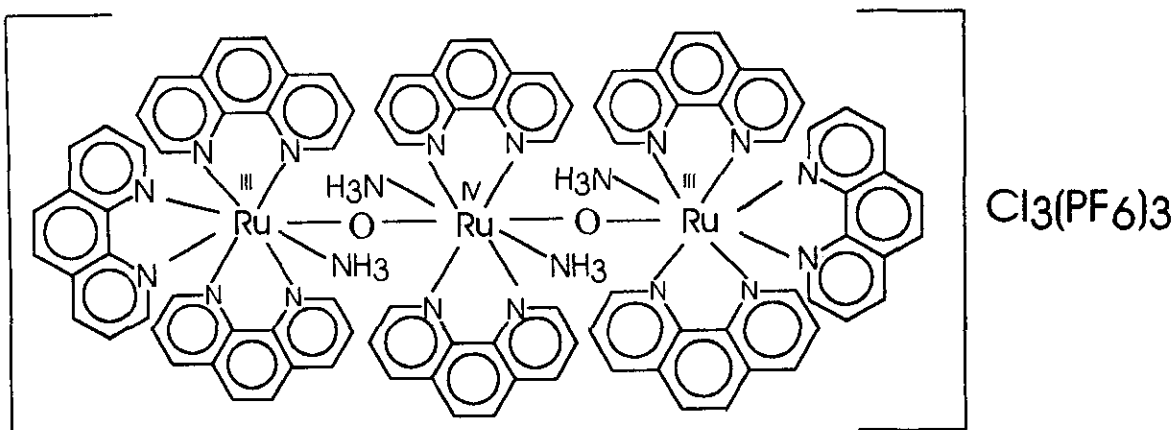
LONGITUD DE ONDA (nm)

Figura 39. Espectro electrónico de RRPhen2 mediante la técnica de reflectancia difusa



LONGITUD DE ONDA (nm)

Figura 40. Espectro electrónico de RRPhen2. Expansión de la región visible



El compuesto que hemos nombrado como RRPhen2 tiene un peso molecular de 2386.16 g/mol.

Finalmente podemos mencionar que el nombre sistemático de este compuesto es cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(amminotrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV).

4.3.- Síntesis del análogo del rojo de rutenio con fenantrolina y tetrafenilborato de sodio como contraión

Como ya lo mencionamos anteriormente, creemos importante establecer la influencia que el contraión tiene en la estabilidad o reactividad de los compuestos análogos de fenantrolina del rojo de rutenio.

La ruta de síntesis es idéntica a la empleada en el caso de RRPhen2, en donde la única diferencia radica en el uso del tetrafenilborato de sodio como contraión.

El contraión se adicionó en una proporción 6:1 respecto del rojo de rutenio, por lo que, para los 0.3 g de rojo de rutenio inicial calculamos adicionar 0.8030g de tetrafenilborato de sodio.

Realizando las actividades correspondientes para la síntesis, luego del calentamiento moderado, procedimos a realizar la adición del contraión, éste fue previamente disuelto en metanol, y se adicionó de inmediato a la mezcla de reacción. La formación de un precipitado color plata, brillante al adicionar el contraión fue instantánea. De tal forma que el tetrafenilborato de sodio resultó hasta este momento, ser el mejor agente precipitante para el rojo de rutenio y sus compuestos análogos.

El lavado del precipitado se hizo con agua, ya que el compuesto obtenido resultó insoluble en este disolvente, de tal forma que fue posible eliminar el rojo de rutenio que no reaccionó con la fenantrolina, la cual es ligeramente soluble en agua.

Creímos por la apariencia del compuesto que su recristalización podría llevarse a cabo muy fácilmente, así que decidimos disolver una parte del compuesto obtenido (0.8655 g), en una mezcla acetato de etilo agua (1:1), la solución resultante se mantuvo resguardada en el refrigerador, con el fin de permitir la evaporación del acetato de etilo, pero de la manera más lenta posible.

Al cabo de un par de días observamos el cambio de la solución de un tono púrpura tenue a un tono café intenso, sin embargo, en el fondo del recipiente se observó la formación de unos cristales de color amarillo verdoso. Esos cristales fueron aislados y lavados con agua

El crecimiento de estos cristales nos permitió realizar el estudio de la estructura cristalina y molecular del compuesto. Los resultados del análisis de este compuesto cristalino se muestran a continuación:

4.3.1 Caracterización del compuesto tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I), $\text{Na}(\text{C}_{12}\text{N}_2\text{H}_8)_3\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$

4.3.1.1. Propiedades físicas

En la tabla siguiente se resumen algunas de las propiedades observadas en el compuesto cristalino.

TABLA 8. Propiedades físicas

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad
$\text{Na}(\text{C}_{12}\text{N}_2\text{H}_8)_3\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$	651.53	Amarillo verdoso	Agua +
			Acetona +++
			Metanol +++
			Etanol +++

+ insoluble, ++ parcialmente soluble y +++ soluble

Los cristales son estables por un tiempo relativamente corto, 2 a tres meses en las condiciones atmosféricas, ya que gradualmente pierde la cristalinidad.

El nombre sistemático de este compuesto es el de tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I).

4.3.1.2. Espectroscopía de Infrarrojo

El estudio de infrarrojo de los cristales del complejo catiónico de sodio generó los resultados de las asignaciones que se resumen en la tabla 9.

El espectro de infrarrojo se presenta en la figura 41, mientras que el espectro de la fenantrolina y el tetrafenilborato de sodio, los constituyentes principales de este compuesto se presentan en las figuras 2 y 42 respectivamente.

TABLA 9. Principales bandas en Infrarrojo del complejo catiónico de sodio

BANDAS	NaB(C ₆ H ₅) ₄	FENANTROLINA	Na(C ₁₇ N ₂ H ₁₅)B(C ₆ H ₅) ₄
$\nu =C-H$	3056-3074		3052
$\tau =C-H$	746, 712		732, 706
Zona de sobretónicas	1964-1782 monosustitución		1926 no definido
$\nu =C-C$	1578, 1478, 1426		1508, 1418
$\rho =C-H$	1148-1030		1140-1032
$\tau =C-C$	488, 466		468
$\nu =C-H$		3058	3052
$\delta =C-H$ en plano		1216,1138,1090	1242, 1140 y 1096
$\delta =C-H$ fuera del plano		854	842
$\delta =C-H$ fuera del plano		738	732
$\nu C=C$ $\nu C=N$		1586,1502 y 1422	1582,1508 y 1418
$\nu =C-H$		2920,2851	2982
	ACETATO DE ETILO		
$\nu C=O$	1750-1735		1734
$\nu_{as} C-C-O$	1300-1000		1242
$\nu C-H$	3000-2900		2982

En el caso del tetrafenilborato de sodio, como puede observarse en el espectro correspondiente, se identifican claramente las bandas correspondientes a las vibraciones de elongación del enlace =C-H presentes a 3056-3074 cm⁻¹; en el

patrón de bandas localizado en la región de $1970-1780\text{ cm}^{-1}$ es posible detectar la zona de sobretonos que corresponde a un grupo fenilo monosustituído, como es el caso en el tetrafenilborato de sodio; también fue posible detectar a 746 y 712 cm^{-1} las bandas correspondientes a la flexión en el enlace $=\text{C-H}$ fuera del plano, características de los compuestos aromáticos.

Otra banda característica del anillo aromático se localiza a 1578 , 1478 y 1426 cm^{-1} que corresponde a la vibración de elongación del enlace $=\text{C-C}$.

Las bandas características y su asignación en el caso de la fenantrolina se ha hecho en la sección 4.1.3, correspondiente al análisis por espectroscopía de infrarrojo del análogo RRPhen1.

En el caso del tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I), se puede observar la presencia de una banda característica del grupo carbonilo, al cual no le pudimos dar explicación hasta la realización del estudio cristalográfico, pues se determinó mediante la difracción de rayos X que, para la estabilización del cristal era necesaria la presencia del disolvente, en este caso el acetato de etilo, y efectivamente en el espectro de infrarrojo de los cristales de este compuesto es posible detectar la presencia de acetato de etilo en la muestra mediante la banda que se localiza a 1734 cm^{-1} , característica de la vibración de elongación del enlace C=O , principalmente.

Es posible observar, en el espectro del tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I), el corrimiento de las señales generadas por la fenantrolina, lo cual pone de manifiesto que efectivamente, la fenantrolina se coordinó al sodio.

En conclusión, el espectro infrarrojo del compuesto es compatible con los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X, que se analizan adelante.

4.3.1.3. Espectroscopía electrónica

El espectro electrónico de este complejo de sodio se presenta en la figura 43, del cual es importante mencionar que la disolución se realizó con acetona, teniendo cuidado de trabajar rápidamente para evitar errores en las mediciones debido a la gran volatilidad de la acetona, lo que arrastra variaciones en la concentración de la solución.

De este espectro podemos observar una banda intensa a 330 nm , que asignamos como una banda generada por la gran cantidad de núcleos aromáticos presentes en la molécula del complejo, la cual presenta un corrimiento, respecto de la fenantrolina pura, el cual se atribuye a la influencia

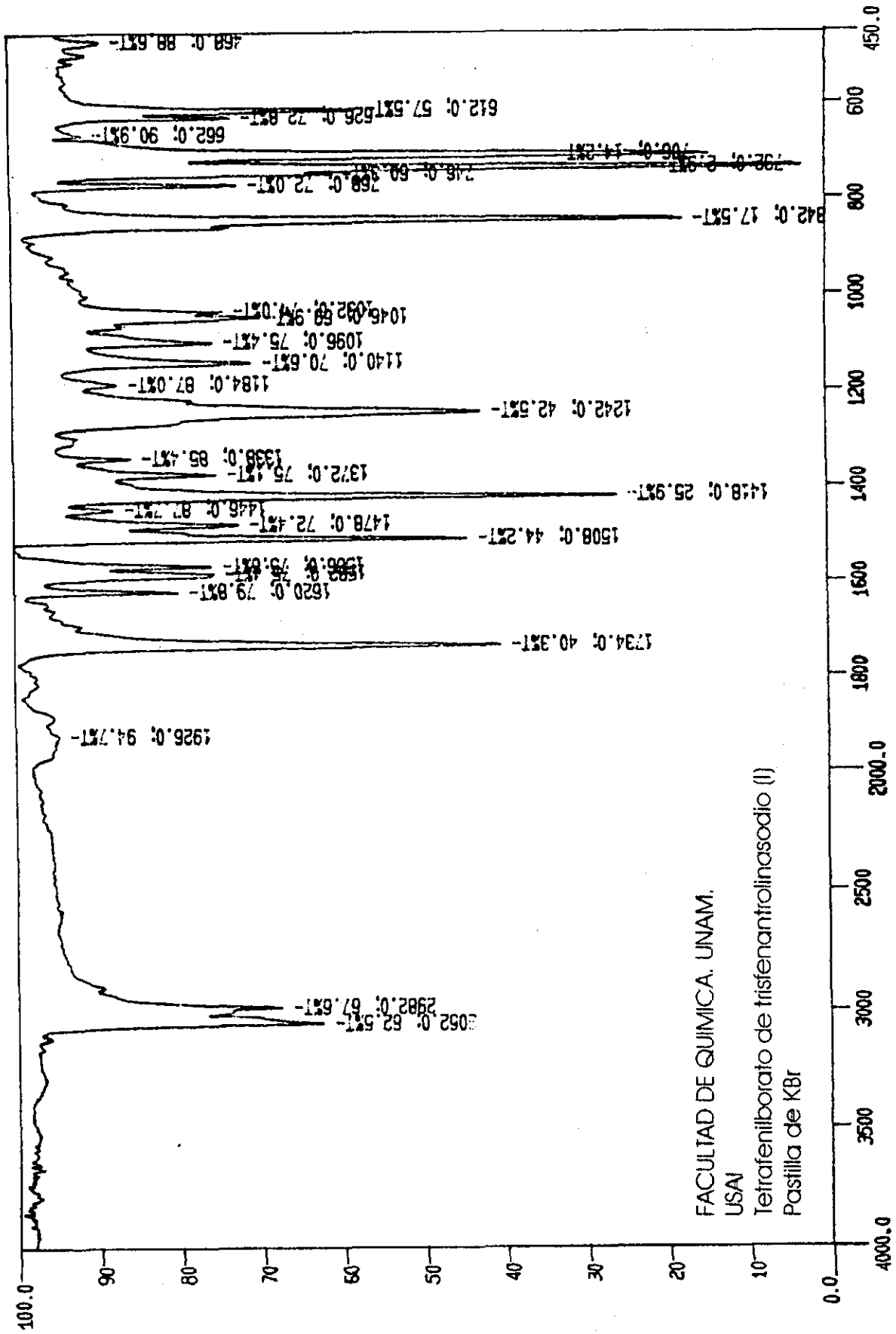


Figura 41. Espectro infrarrojo en la región media del IR del tetrafluoroborato de trifluorotrihidruro de sodio (I), en KBr

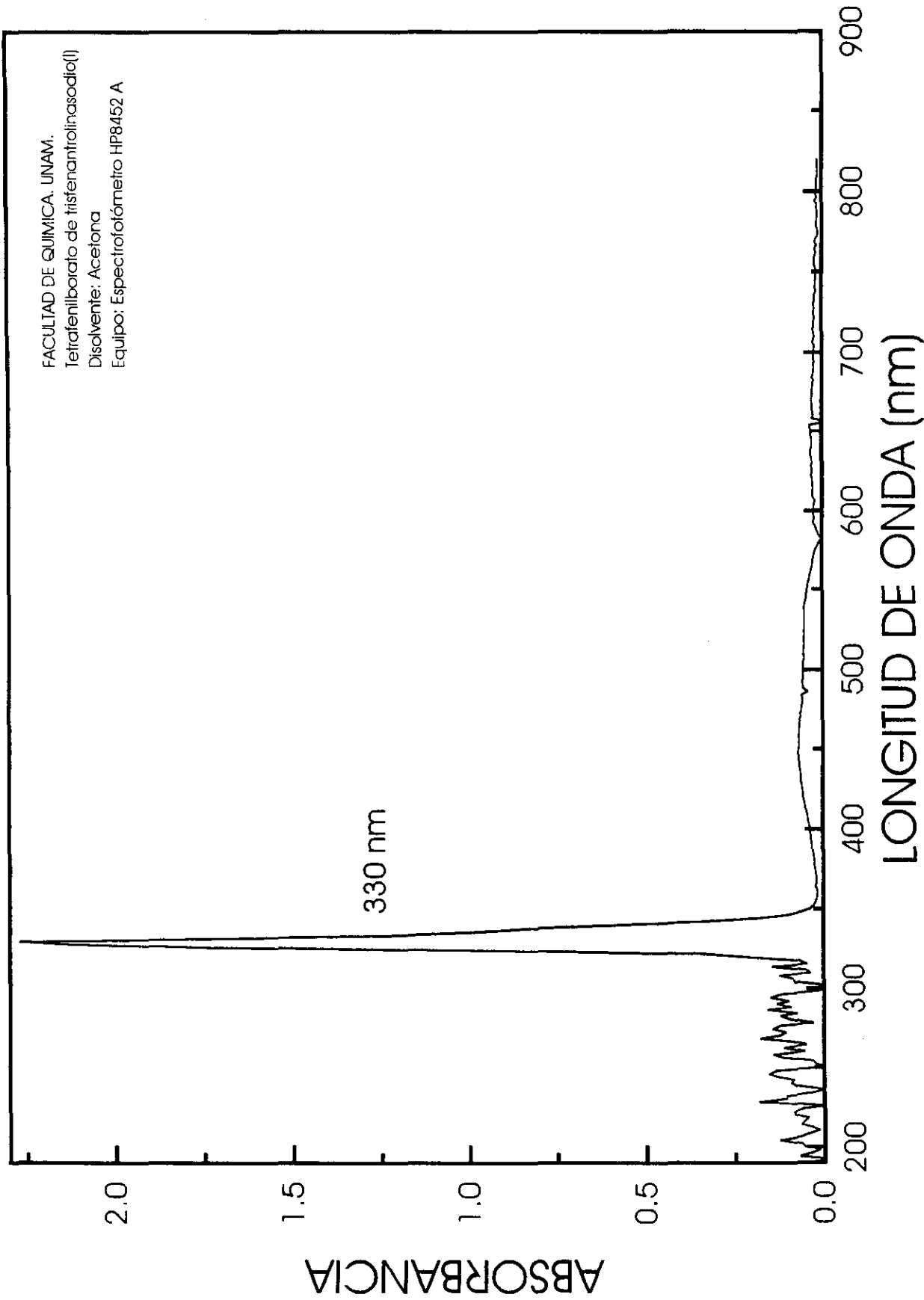


Figura 43. Espectro electrónico del compuesto $\text{Na}(\text{C}_{12}\text{N}_2\text{H}_8)_3\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4$

del disolvente, ya que en este caso empleamos acetona, pues este complejo es insoluble en agua.

4.3.1.4. Estudio cristalográfico

De estos estudios se determinó que fue estabilizado un complejo de sodio.

En este complejo, al sodio están coordinadas 3 moléculas de fenantrolina y como contraión, este complejo presenta un ion tetrafenilborato. Además es posible observar que una molécula de disolvente (acetato de etilo) favoreció la estabilización del compuesto.

Tal compuesto que muestra que la fenantrolina se coordinó al sodio, hasta hace algunos años resultaba muy difícil de considerar, sin embargo a la fecha se han reportado tres compuestos similares, cuya principal diferencia es que presentan contraiones distintos y el compuesto que obtuvimos con tetrafenilborato como contraión no se ha sido reportado en la literatura hasta ahora.

El nombre sistemático de este compuesto es el de tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I).

Estos cristales con el tiempo pierden la cristalinidad, esto se explica por el fenómeno de evaporación del disolvente, que estabiliza al cristal.

En la tabla 10 se agrupan los datos generales del compuesto, mientras que en las tablas 11 y 12 presentamos las distancias de enlace y los ángulos de enlace. Finalmente las coordenadas atómicas se presentan en el apéndice I al final de este trabajo.

En la figura 44 se muestra el catión del complejo de sodio con las fenantrolinas coordinadas, mientras que en la figura 45 presentamos la estructura del anión. En la figura 46 se muestra la estructura cristalina del complejo catiónico de sodio y por último en la figura 47 se presenta la estructura del complejo catiónico y su interacción con una molécula de disolvente.

TABLA 10. Datos generales del compuesto

Fórmula empírica	$C_{60}H_{44}B_1N_6Na_1 \cdot C_2H_5COOCH_3$
Color	amarillo, plano irregular
Tamaño del cristal	0.6x0.5x0.1 mm ³
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	<i>P</i> 1
Dimensiones de la celda unitaria	a=14.074(2) b=14.742(3) c=15.763(2)Å α=92.47(1) β=111.62(1) γ=114.83
Volumen	2862.2(2)Å ³
Z	2
Peso fórmula	970.92
Densidad calculada	1.202 g·cm ³
Coefficiente de absorción	0.008 mm ⁻¹
F(000)	1020

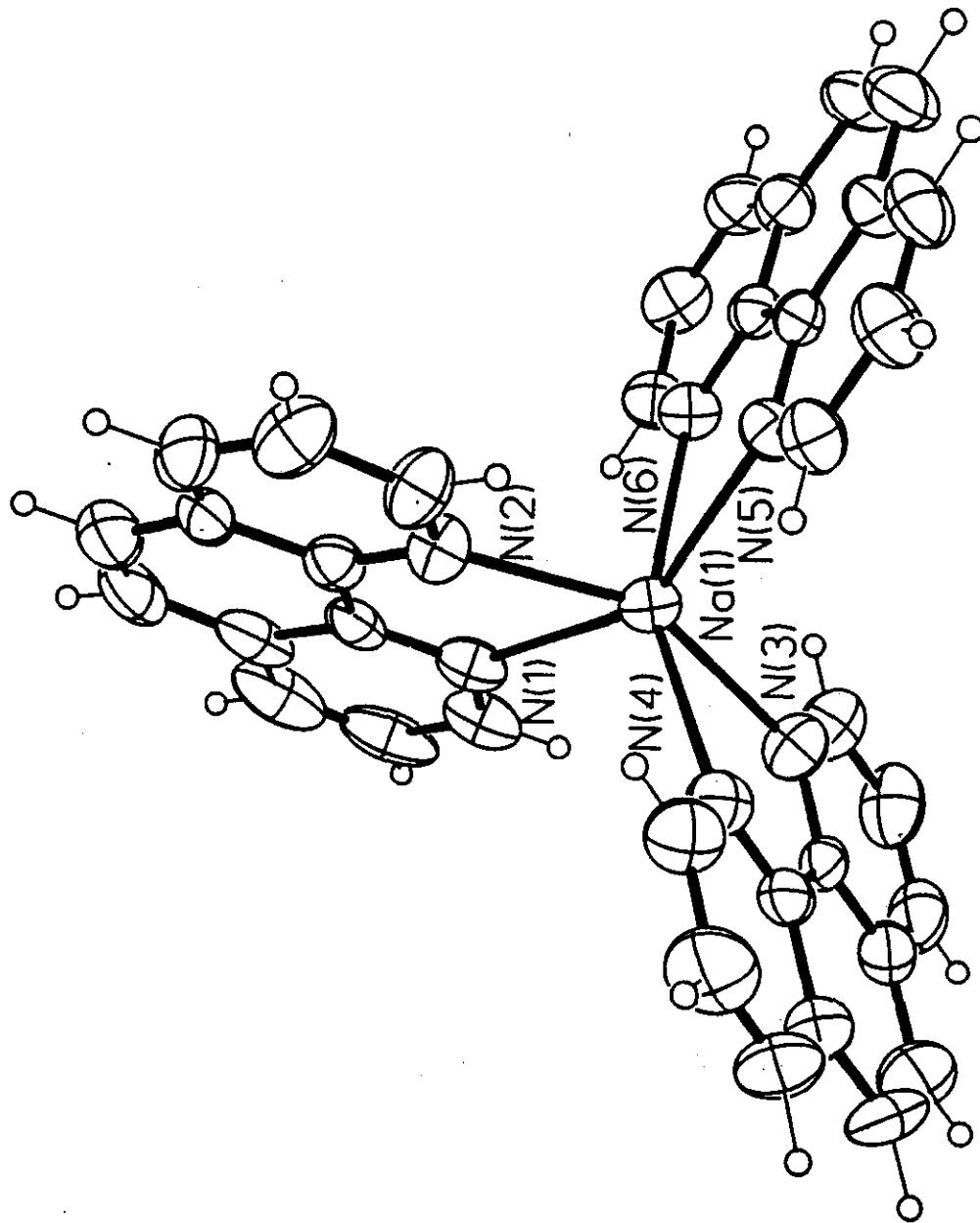


Figura 44. Diagrama del catión del compuesto de coordinación tetrafenilborato de trisfenilborinasodio(I) mostrando la conformación y geometría de coordinación obtenido mediante difracción de rayos-X

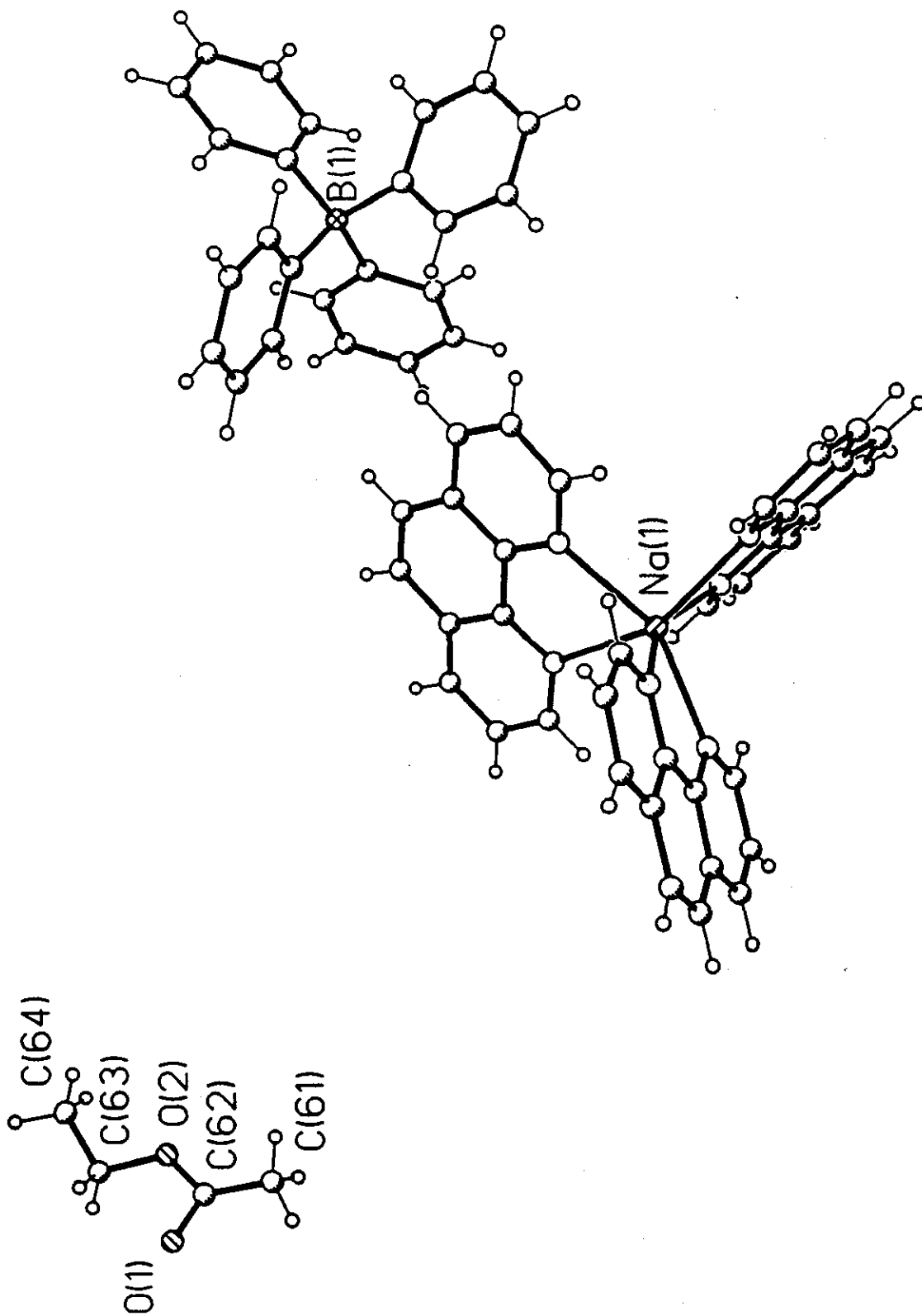


Figura 47. Vista de la celda unitaria del compuesto de coordinación tetrafenilborato de trisfenantrolinasodio(I) mostrando la conformación y geometría de coordinación

TABLA 11. Distancias de enlace

Distancias de enlace (Å)

Na(1)-N(1)	2.526 (7)	Na(1)-N(2)	2.421 (6)
Na(1)-N(3)	2.427 (7)	Na(1)-N(4)	2.499 (5)
Na(1)-N(5)	2.494 (8)	Na(1)-N(6)	2.477 (5)
N(1)-C(1)	1.320 (11)	N(1)-C(12)	1.370 (11)
N(2)-C(10)	1.320 (10)	N(2)-C(11)	1.352 (10)
N(3)-C(13)	1.324 (10)	N(3)-C(24)	1.339 (11)
N(4)-C(22)	1.327 (10)	N(4)-C(23)	1.361 (12)
N(5)-C(25)	1.326 (7)	N(5)-C(36)	1.359 (10)
N(6)-C(34)	1.313 (8)	N(6)-C(35)	1.359 (12)
C(1)-C(2)	1.403 (16)	C(2)-C(3)	1.364 (17)
C(3)-C(4)	1.382 (16)	C(4)-C(5)	1.447 (15)
C(4)-C(12)	1.408 (14)	C(5)-C(6)	1.331 (18)
C(6)-C(7)	1.399 (14)	C(7)-C(8)	1.394 (14)
C(7)-C(11)	1.422 (12)	C(8)-C(9)	1.342 (14)
C(9)-C(10)	1.376 (12)	C(11)-C(12)	1.436 (11)
C(13)-C(14)	1.379 (14)	C(14)-C(15)	1.317 (16)
C(15)-C(16)	1.395 (14)	C(16)-C(17)	1.389 (15)
C(16)-C(24)	1.409 (15)	C(17)-C(18)	1.316 (16)
C(18)-C(19)	1.442 (19)	C(19)-C(20)	1.386 (16)
C(19)-C(23)	1.395 (12)	C(20)-C(21)	1.343 (18)
C(21)-C(22)	1.393 (12)	C(23)-C(24)	1.436 (11)
C(25)-C(26)	1.387 (14)	C(26)-C(27)	1.353 (13)
C(27)-C(28)	1.399 (9)	C(28)-C(29)	1.420 (13)
C(28)-C(36)	1.406 (14)	C(29)-C(30)	1.331 (11)
C(30)-C(31)	1.426 (15)	C(31)-C(32)	1.393 (10)
C(31)-C(35)	1.402 (11)	C(32)-C(33)	1.359 (15)
C(33)-C(34)	1.388 (11)	C(35)-C(36)	1.449 (8)
B(1)-C(37)	1.639 (11)	B(1)-C(43)	1.638 (8)
B(1)-C(49)	1.649 (9)	B(1)-C(55)	1.643 (11)
C(37)-C(38)	1.390 (13)	C(37)-C(42)	1.392 (8)
C(38)-C(39)	1.379 (14)	C(39)-C(40)	1.358 (11)
C(40)-C(41)	1.370 (16)	C(41)-C(42)	1.383 (12)
C(43)-C(44)	1.393 (11)	C(43)-C(48)	1.376 (10)
C(44)-C(45)	1.371 (10)	C(45)-C(46)	1.342 (14)
C(46)-C(47)	1.363 (12)	C(47)-C(48)	1.402 (9)

TABLA 11. Distancias de enlace

Distancias de enlace (Å)

C(49)-C(50)	1.379 (11)	C(49)-C(54)	1.381 (11)
C(50)-C(51)	1.381 (11)	C(51)-C(52)	1.355 (15)
C(52)-C(53)	1.369 (16)	C(53)-C(54)	1.386 (11)
C(55)-C(56)	1.388 (11)	C(55)-C(60)	1.395 (8)
C(56)-C(57)	1.382 (12)	C(57)-C(58)	1.366 (10)
C(58)-C(59)	1.364 (12)	C(59)-C(60)	1.380 (11)
C(61)-C(62)	1.348 (27)	C(62)-O(1)	1.118 (24)
C(62)-O(2)	1.277 (21)	C(63)-C(64)	1.368 (17)
C(63)-O(2)	1.338 (23)		

TABLA 12. Ángulos de enlace

Ángulos de enlace (°)

N(1)-Na(1)-N(2)	66.4(2)	N(1)-Na(1)-N(3)	93.5(2)
N(2)-Na(1)-N(3)	153.1(3)	N(1)-Na(1)-N(4)	110.0(2)
N(2)-Na(1)-N(4)	101.7(2)	N(3)-Na(1)-N(4)	67.2(2)
N(1)-Na(1)-N(5)	149.2(2)	N(2)-Na(1)-N(5)	93.6(2)
N(3)-Na(1)-N(5)	111.6(3)	N(4)-Na(1)-N(5)	96.5(2)
N(1)-Na(1)-N(6)	92.3(2)	N(2)-Na(1)-N(6)	99.9(2)
N(3)-Na(1)-N(6)	98.6(2)	N(4)-Na(1)-N(6)	153.7(2)
N(5)-Na(1)-N(6)	67.2(2)		
Na(1)-N(1)-C(1)	126.6(6)	Na(1)-N(1)-C(12)	115.8(5)
C(1)-N(1)-C(12)	117.4(7)	Na(1)-N(2)-C(10)	122.1(5)
Na(1)-N(2)-C(11)	120.9(5)	C(10)-N(2)-C(11)	116.5(6)
Na(1)-N(3)-C(13)	124.0(5)	Na(1)-N(3)-C(24)	118.4(5)
C(13)-N(3)-C(24)	116.7(7)	Na(1)-N(4)-C(22)	127.2(5)
Na(1)-N(4)-C(23)	115.4(4)	C(22)-N(4)-C(23)	116.8(6)
Na(1)-N(5)-C(25)	125.3(6)	Na(1)-N(5)-C(36)	117.2(4)
C(25)-N(5)-C(36)	117.5(7)	Na(1)-N(6)-C(34)	124.5(6)
Na(1)-N(6)-C(35)	118.3(3)	C(34)-N(6)-C(35)	117.2(6)
N(1)-C(1)-C(2)	123.7(9)	C(1)-C(2)-C(3)	118.0(10)
C(2)-C(3)-C(4)	121.3(11)	C(3)-C(4)-C(5)	123.5(10)
C(3)-C(4)-C(12)	116.9(10)	C(5)-C(4)-C(12)	119.6(10)
C(4)-C(5)-C(6)	119.8(10)	C(5)-C(6)-C(7)	123.6(10)
C(6)-C(7)-C(8)	125.0(9)	C(6)-C(7)-C(11)	118.0(9)
C(8)-C(7)-C(11)	117.0(8)	C(7)-C(8)-C(9)	120.3(9)
C(8)-C(9)-C(10)	118.6(8)	N(2)-C(10)-C(9)	125.2(7)
N(2)-C(11)-C(7)	122.4(7)	N(2)-C(11)-C(12)	117.2(7)
C(7)-C(11)-C(12)	120.5(8)	N(1)-C(12)-C(4)	122.8(8)
N(1)-C(12)-C(11)	118.7(7)	C(4)-C(12)-C(11)	118.4(8)
N(3)-C(13)-C(14)	125.5(7)	C(13)-C(14)-C(15)	118.3(9)
C(14)-C(15)-C(16)	119.8(11)	C(15)-C(16)-C(17)	122.7(11)
C(15)-C(16)-C(24)	118.6(9)	C(17)-C(16)-C(24)	118.6(9)
C(16)-C(17)-C(18)	123.0(13)	C(17)-C(18)-C(19)	120.6(10)
C(18)-C(19)-C(20)	123.7(9)	C(18)-C(19)-C(23)	119.2(9)
C(20)-C(19)-C(23)	117.1(11)	C(19)-C(20)-C(21)	120.8(9)
C(20)-C(21)-C(22)	118.7(8)	N(4)-C(22)-C(21)	123.5(9)
N(4)-C(23)-C(19)	123.1(8)	N(4)-C(23)-C(24)	118.4(7)
C(19)-C(23)-C(24)	118.6(9)	N(3)-C(24)-C(16)	121.2(7)
N(3)-C(24)-C(23)	118.8(8)	C(16)-C(24)-C(23)	120.0(8)
N(5)-C(25)-C(26)	123.9(7)	C(25)-C(26)-C(27)	119.3(6)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 12. Ángulos de enlace

Ángulos de enlace (°)

C(26)-C(27)-C(28)	119.0(10)	C(27)-C(28)-C(29)	122.3(10)
C(27)-C(28)-C(36)	118.5(8)	C(29)-C(28)-C(36)	119.3(7)
C(28)-C(29)-C(30)	121.4(11)	C(29)-C(30)-C(31)	121.9(8)
C(30)-C(31)-C(32)	123.7(8)	C(30)-C(31)-C(35)	118.8(6)
C(32)-C(31)-C(35)	117.6(9)	C(31)-C(32)-C(33)	120.2(7)
C(32)-C(33)-C(34)	117.9(6)	N(6)-C(34)-C(33)	124.8(9)
N(6)-C(35)-C(31)	122.3(6)	N(6)-C(35)-C(36)	118.2(7)
C(31)-C(35)-C(36)	119.5(8)	N(5)-C(36)-C(28)	121.8(5)
N(5)-C(36)-C(35)	119.0(8)	C(28)-C(36)-C(35)	119.2(7)
C(37)-B(1)-C(43)	110.2(6)	C(37)-B(1)-C(49)	111.1(6)
C(43)-B(1)-C(49)	108.4(4)	C(37)-B(1)-C(55)	107.7(4)
C(43)-B(1)-C(55)	109.3(6)	C(49)-B(1)-C(55)	110.1(6)
B(1)-C(37)-C(38)	125.0(5)	B(1)-C(37)-C(42)	120.7(7)
C(38)-C(37)-C(42)	114.3(7)	C(37)-C(38)-C(39)	122.7(6)
C(38)-C(39)-C(40)	120.4(10)	C(39)-C(40)-C(41)	119.9(9)
C(40)-C(41)-C(42)	118.6(6)	C(37)-C(42)-C(41)	124.0(8)
B(1)-C(43)-C(44)	120.4(7)	B(1)-C(43)-C(48)	125.3(6)
C(44)-C(43)-C(48)	114.2(6)	C(43)-C(44)-C(45)	123.2(8)
C(44)-C(45)-C(46)	121.3(8)	C(45)-C(46)-C(47)	118.4(7)
C(46)-C(47)-C(48)	120.4(8)	C(43)-C(48)-C(47)	122.5(7)
B(1)-C(49)-C(50)	124.2(6)	B(1)-C(49)-C(54)	121.2(7)
C(50)-C(49)-C(54)	114.5(6)	C(49)-C(50)-C(51)	123.8(7)
C(50)-C(51)-C(52)	119.8(9)	C(51)-C(52)-C(53)	119.0(8)
C(52)-C(53)-C(54)	120.1(8)	C(49)-C(54)-C(53)	122.8(8)
B(1)-C(55)-C(56)	125.1(5)	B(1)-C(55)-C(60)	120.6(6)
C(56)-C(55)-C(60)	114.2(7)	C(55)-C(56)-C(57)	122.5(6)
C(56)-C(57)-C(58)	121.3(8)	C(57)-C(58)-C(59)	118.3(8)
C(58)-C(59)-C(60)	120.2(6)	C(55)-C(60)-C(59)	123.5(6)
C(61)-C(62)-O(1)	122.2(18)	C(61)-C(62)-O(2)	124.6(15)
O(1)-C(62)-O(2)	113.0(21)	C(64)-C(63)-O(2)	107.1(14)
C(62)-O(2)-C(63)	114.1(12)		

Este complejo de sodio, no es muy común pues se trata de uno de los muy escasos ejemplos de compuestos de coordinación de metales alcalinos.

Como mencionamos al inicio de este apartado, discutiríamos la caracterización de los complejos análogos al rojo de rutenio con fenantrolina, pero con tetrafenilborato de sodio como contraión.

Como inicialmente detectamos al tratar de cristalizar el sólido obtenido, unos 10 días después de la síntesis de este compuesto nos percatamos que cambiaban progresivamente su coloración de gris brillante a café, finalmente, luego de repetir la síntesis un par de veces obtuvimos los mismos resultados, los compuestos cambiaban su apariencia lo cual nos mostró que se estaba generando un cambio en estos, probablemente una oxidación.

Finalmente decidimos que no era conveniente utilizar estos complejos tan inestables, sobre todo por que los estudios biológicos requerían de algún tiempo y los resultados no serían del todo confiables.

Además, nos enfrentamos a que en el infrarrojo la asignación de las señales se complicaba por la presencia de los núcleos aromáticos del tetrafenilborato de sodio, complicándose la visualización de la coordinación de las fenantrolinas a la estructura metálica. El mismo problema enfrentábamos en el espectroscopía de UV-Vis y en RMN, por lo cual decidimos no continuar con la caracterización de éstos compuestos.

Así, el ion tetrafenilborato facilita la precipitación de nuestros complejos análogos al rojo de rutenio pero no favorece la estabilidad de éstos.

En vista de tales resultados y debido a que necesitamos compuestos lo suficientemente estables para llevar a cabo los estudios biológicos, no continuar empleando este contraión.

4.4. Procedimiento de purificación del rojo de rutenio, hexacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III)) tetraamminrutenio(IV)

Para la purificación del rojo de rutenio suelen emplearse la cromatografía de intercambio iónico, por elución con soluciones en gradiente de concentración y la purificación que involucra el uso de las propiedades de solubilidad de las impurezas presentes en el rojo de rutenio.

La experiencia al realizar ambas técnicas nos mostró que el procedimiento que hace uso de las propiedades de solubilidad es eficiente y no involucra el uso del procedimiento de liofilizado, por lo cual decidimos utilizar esta técnica para la purificación del rojo de rutenio.

Llevamos a cabo la purificación del rojo de rutenio comercial, ya que en los estudios biológicos resulta imprescindible contar con compuestos puros o por lo menos tener una idea clara de las impurezas presentes en tales compuestos, para de esta forma generar conclusiones confiables sobre la actividad biológica de cualquier compuesto en estudio.

Hemos mencionado que el rojo de rutenio presenta varias impurezas, que si bien están completamente identificadas, es por demás mencionar que la confiabilidad de los resultados sería considerablemente mejorada si lográramos disminuir el número de impurezas presentes en el rojo de rutenio comercial y, en general, en los compuestos sometidos a estudio biológico, o en el mejor de los casos eliminar totalmente las impurezas.

En la literatura se ha reportado un procedimiento de purificación¹² que aprovecha las diferencias de solubilidad, tanto de las impurezas como del rojo de rutenio.

Debido a que el rojo de rutenio es parcialmente soluble incluso a 0 °C en soluciones acuosas de NH_3 , 0.1 M, y el resto de las impurezas comúnmente presentes en el rojo de rutenio no lo son, inicialmente se realiza la disolución de la muestra de rojo de rutenio en la solución de NH_3 , sometiendo a un ligero calentamiento para de esta forma favorecer aun más la disolución. Posteriormente todas las impurezas no solubles son eliminadas de la solución de rojo de rutenio mediante centrifugación y eliminación del sedimento, para finalmente mantener el rojo de rutenio purificado en un desecador con atmósfera de amoníaco y un agente secante para eliminar el disolvente y obtener el rojo de rutenio purificado en sólido.

Fue necesario en este caso no calentar por arriba de 60°C pues se acelera la oxidación y hasta aparentemente la descomposición del rojo de rutenio.

Además, se cree que la disolución de la muestra comercial de rojo de rutenio en la solución amoniacal, disuelve al rojo y al café de rutenio, pero a la vez genera las condiciones para que el café de rutenio rápidamente se reduzca al rojo de rutenio.

Realizamos un seguimiento de los cambios en la disolución de rojo de rutenio durante el procedimiento mediante espectroscopía electrónica, que como hemos demostrado es una herramienta muy útil en la detección de impurezas en el rojo de rutenio.

4.4.1. Propiedades Físicas

Luego de la purificación del rojo de rutenio obtuvimos un rojo de rutenio diferente físicamente del material de partida, primeramente, el color es totalmente diferente al color de las muestras comerciales, que es rojo ladrillo, o un café oscuro, mientras que el compuesto obtenido mediante esta purificación es sumamente oscuro casi negro. Además la apariencia del compuesto purificado es cristalina.

En la tabla 13 se resumen las propiedades físicas y la tabla de solubilidades del rojo de rutenio purificado:

TABLA 13. Propiedades físicas del rojo de rutenio purificado

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad
$Ru_3O_2(NH_3)_4Cl_6$	786.36	Púrpura oscuro	Agua + + +
			Acetona + + +
			Metanol + +
			Disulfuro de carbono + +
			Diclorometano +
			Etanol +
Hexano +			

+ insoluble, ++ parcialmente soluble y +++ soluble

El rojo de rutenio comercial y aún el purificado descomponen por arriba de 250°C.

4.4.2. Conductancia molar

El promedio de tres mediciones de la conductancia molar arrojó una conductancia de 49.5 μS , mientras que se esperaba un valor de tan sólo 46.63 μS . La pequeña diferencia entre los valores de conductancia la atribuimos a la impureza de violeta de rutenio presente en el rojo de rutenio purificado.

4.4.3. Espectroscopía electrónica

Los resultados finales del proceso de purificación, observados mediante esta espectroscopía, se mostraron en la figura 18.

Por tanto, la purificación del rojo de rutenio dio buenos resultados, se eliminaron, mediante el procedimiento de purificación, todas las impurezas presentes en la materia prima que generaban una señal en la región UV.

Mediante este procedimiento de purificación logramos incrementar casi cinco veces el coeficiente de extinción de la banda característica de rojo de rutenio localizada a 532 nm, desde 4000 a 17035.

En ese momento indicamos que se encontraba como impureza remanente en el rojo de rutenio purificado una pequeña cantidad de violeta de rutenio, que gracias al seguimiento por espectroscopía electrónica se determinó que no está presente en la materia prima, sino que se forma durante el procedimiento de purificación, específicamente al tiempo que la evaporación del disolvente se lleva a cabo en el desecador.

Es necesario por tanto, reducir al mínimo el tiempo de evaporación del disolvente, tal vez sería conveniente liofilizar el producto, para evitar la formación indeseable de violeta de rutenio.

En vista de la presencia del violeta de rutenio en el rojo de rutenio purificado se penso en la necesidad de sintetizar el violeta de rutenio para posteriormente probar su actividad biológica.

A continuación se reportan los resultados de la síntesis del violeta de rutenio.

4.5.- Síntesis del violeta de rutenio, octacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(IV)) tetraamminrutenio(IV), ViRu

Para la obtención del violeta de rutenio decidimos disolver una muestra de rojo de rutenio purificado en agua destilada, y oxidarlo mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 30 %, ya que eso nos aseguraba no contaminar la muestra. Finalmente al cabo de 2 días, filtramos el sólido obtenido y procedimos a realizarle un espectro UV-Vis, por ser una de las más confiables técnicas con la cual contamos para identificar si tenemos el violeta de rutenio o mezclas de los diferentes estados de oxidación del rojo de rutenio, a decir rojo de rutenio, café de rutenio o violeta de rutenio.

4.5.1. Propiedades físicas

El violeta de rutenio obtenido mediante esta reacción de oxidación presenta una coloración muy intensa morado oscuro, casi negra, de apariencia cristalina.

Las principales propiedades físicas como su solubilidad en algunos disolventes se agrupan en la tabla 14.

TABLA 14. Principales propiedades físicas del violeta de rutenio

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad
$Ru_3O_2(NH_3)_4Cl_6$	857.26	Morado oscuro, casi negro	Agua + + +
			Acetona ++
			Metanol ++
			Disulfuro de carbono ++
			Diclorometano +
			Etolol +
			Hexano +

+ insoluble, ++ parcialmente soluble y +++ soluble

Nuevamente este compuesto descompone a temperaturas superiores a los 250°C.

4.5.2. Análisis elemental

En la tabla 15 se muestran los porcentajes teórico y experimental de N, H y Cl del violeta de rutenio sintetizado:

TABLA 15. Análisis elemental del ViRu

Elemento	N	Cl	H
% Experimental	21.84	33.75	5.05
% Teórico	22.87	33.08	4.94

Como podemos observar, los porcentajes experimental y teórico están muy próximos entre sí, lo cual nos permite confirmar que obtuvimos el violeta de rutenio.

4.5.3. Espectroscopía electrónica

En la figura 48 presentamos el espectro obtenido en medio acuoso. Podemos observar un comportamiento muy característico del violeta de rutenio como ha sido reportado en la literatura¹².

Esta nueva evidencia experimental nos permite concluir que efectivamente aislamos al ViRU, sin ninguna impureza espectroscópicamente detectable y por tanto este compuesto será sometido a estudio biológico para poder descartar

completamente, que el efecto biológico observado, se debe al rojo de rutenio exclusivamente y no a las impurezas presentes en éste.

Como podemos observar la asignación de las bandas se complica aún más.

4.5.4. Conductancia molar

Las mediciones de conductancia molar obtenidas experimentalmente fueron, luego de un promedio de tres determinaciones, de $69.5 \mu S$. La medida de conductancia esperada para un compuesto de carga $6+$ es de aproximadamente 46.63. El resultado experimental es un valor superior por casi 20 unidades, lo que nos indica que la carga del compuesto caracterizado como ViRu tiene una carga mayor a $6+$, evidencia totalmente esperada.

4.6.- Pruebas biológicas de los análogos sintetizados

Como ya se mencionó con anterioridad los estudios biológicos fueron llevados a cabo en el Instituto de cardiología bajo la dirección de la M. en C. Cecilia Zazueta.

En este grupo se ha estudiado el papel del calcio en los diferentes procesos celulares en mamíferos y es uno de los grupos pioneros en el estudio de la inhibición que el rojo de rutenio presenta en el transporte de calcio, en la membrana mitocondrial interna en mamíferos.

Inicialmente era necesario evaluar el efecto que el rojo de rutenio puro presenta en el transporte de calcio en la membrana interna de la mitocondria. Como se ha reportado en la bibliografía¹², las muestras comerciales del rojo de rutenio contienen un porcentaje de impurezas, que en el caso de los experimentos biológicos resulta de gran importancia, por lo que desde los trabajos que Luft realizara, se consideró importante llevar a cabo un procedimiento de purificación del rojo de rutenio.

Una vez con el rojo de rutenio purificado, se iniciaron los estudios biológicos de estos compuestos.

Se realizó el estudio con el rojo de rutenio purificado, en donde se encontró un comportamiento un tanto diferente a lo reportado en la literatura²⁴, en cuanto al valor de la I_{50} , indicando que el rojo de rutenio purificado en nuestro grupo genera una inhibición del 50 % de la actividad a una concentración mayor del

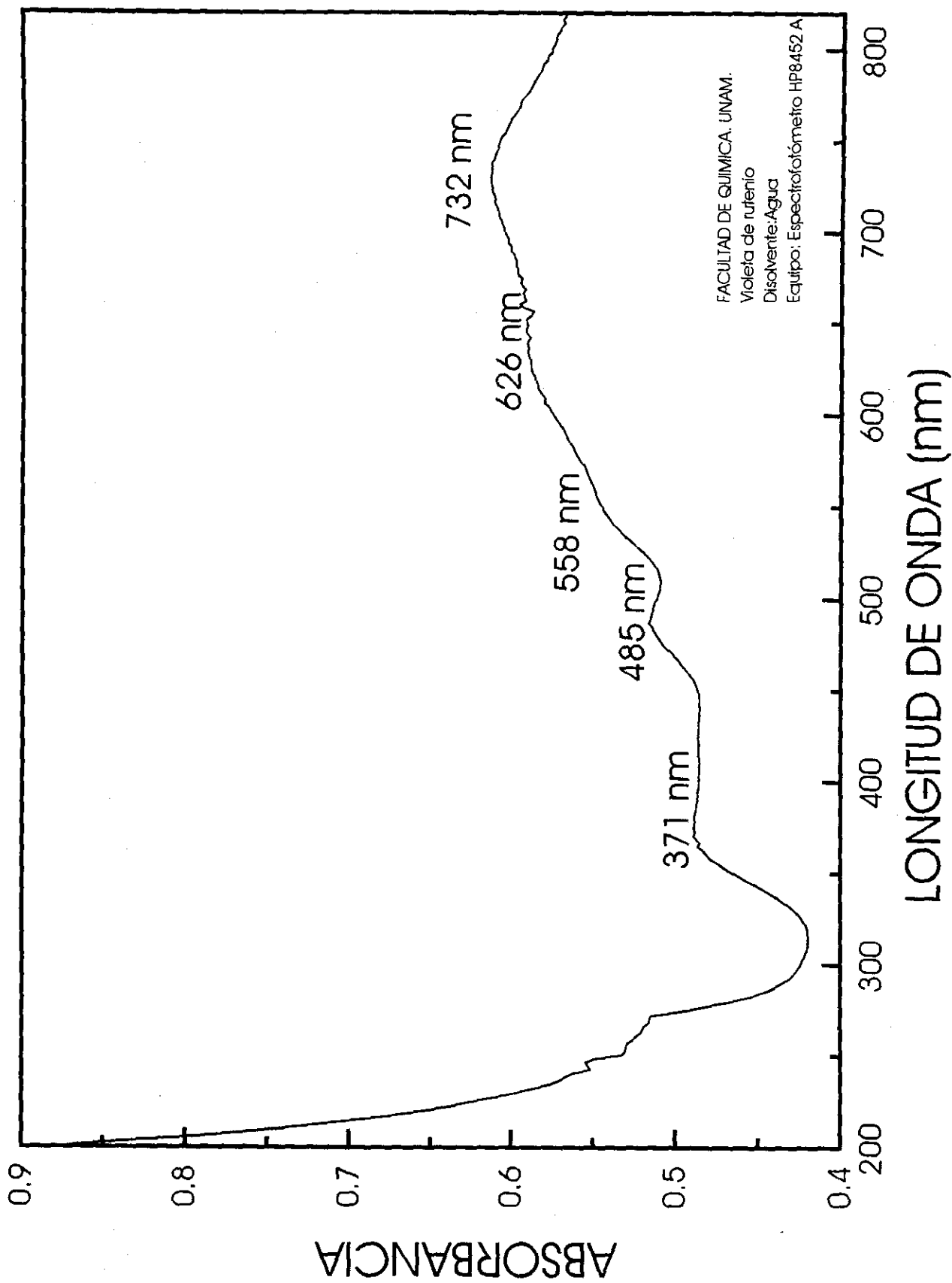


Figura 48. Espectro electrónico del Violeta de rutenio

rojo de rutenio, sin embargo es importante mencionar que este parámetro no es del todo confiable, por lo que se prefiere calcular la K_i que arroja resultados más cercanos a la realidad. A la fecha no se ha reportado un estudio de este tipo en el que se manejen valores de K_i del rojo de rutenio.

De los resultados se determinó que la $K_i=50$ nM, valor que tomaremos como referencia para analizar el efecto inhibitorio que los compuestos análogos poseen.

En la figura 49 se presenta la gráfica del comportamiento inhibitor del rojo de rutenio, podemos observar una clara inhibición del transporte de calcio mitocondrial por la incorporación del rojo de rutenio.

En la misma figura se presenta la gráfica generada del análisis cinético enzimático del comportamiento de la proteína involucrada en el transporte de calcio que nos encontramos estudiando de donde se obtiene la K_i .

Para analizar el comportamiento inhibitor del compuesto análogo RRPhen2, es necesario remitirnos a la figura 50 en la cual se registra el comportamiento inhibitor de éste. Podemos en primera instancia detectar que las concentraciones necesarias para generar una inhibición perceptible son del orden de microgramos, tres órdenes de magnitud mayor a las concentraciones necesarias para obtener el mismo comportamiento inhibitorio en el caso del rojo de rutenio.

De esta primera observación nos percatamos que el efecto inhibitor del rojo de rutenio es mayor que la de RRPhen2.

Finalmente de la misma figura el estudio cinético enzimático nos permitió calcular la $K_i=0.47$ μ M, lo cual indica como ya lo habíamos mencionado que se requiere de una concentración de RRPhen2 mucho mayor para obtener el mismo grado de inhibición. De este resultado podemos concluir que el análogo RRPhen2 muestra un poder inhibitor menor al del rojo de rutenio, por lo que en este mecanismo de transporte del calcio al interior de la matriz mitocondrial, es un hecho, que el tamaño y la forma son un factor predominante para que éste se lleve a cabo.

Los resultados en el caso del compuesto RRPhen1 fueron muy similares a los obtenidos en el compuesto RRPhen2, por lo cual sólo mostramos los resultados de uno sólo de los compuestos.

En vista de tales resultados es conveniente analizar la evidencia existente en la literatura sobre un compuesto muy similar al rojo de rutenio, que de hecho, es un producto secundario de la reacción de síntesis industrial del rojo de rutenio y al cual atribuyen una mayor actividad inhibitor del transporte de calcio que se

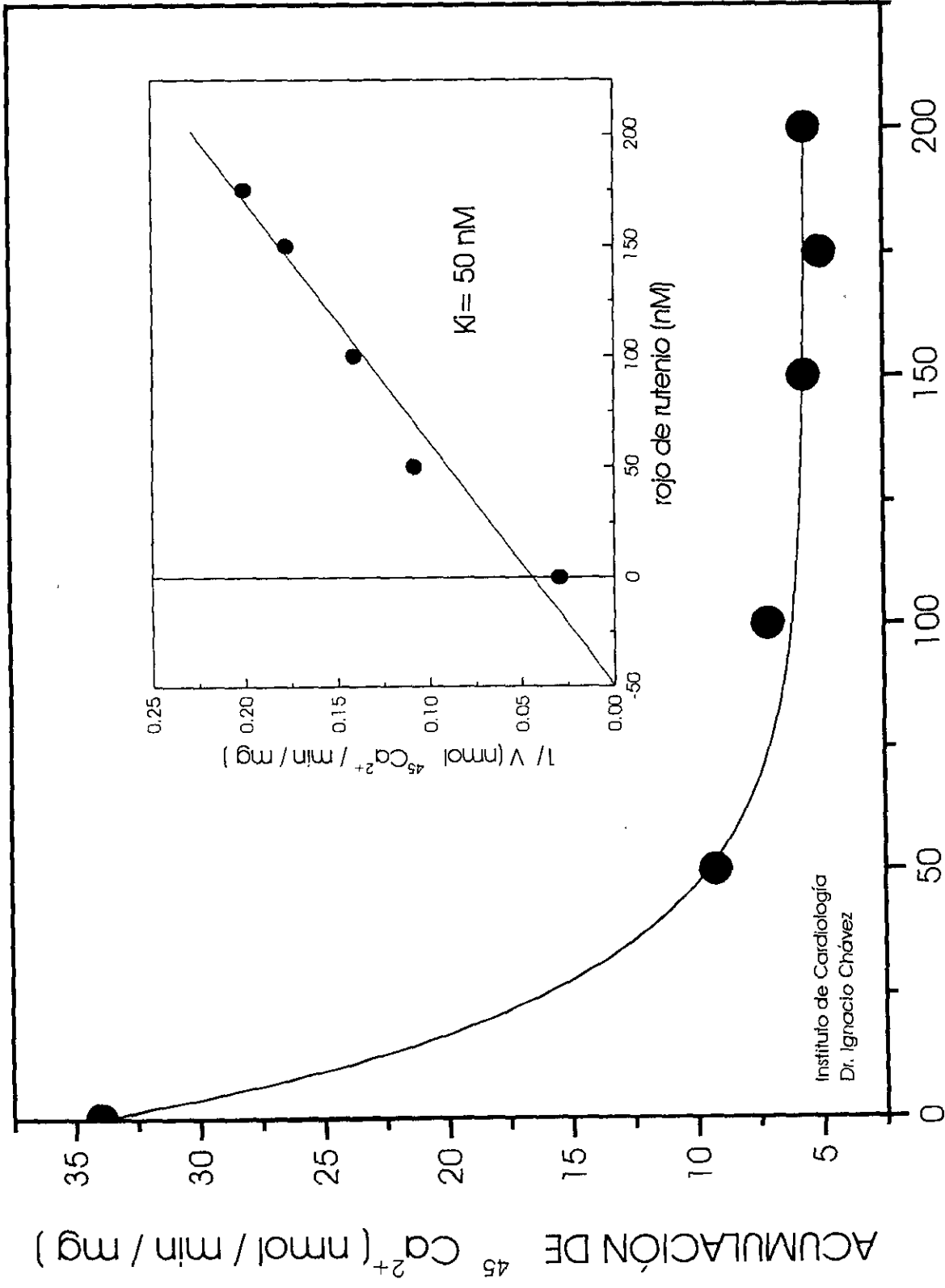


Figura 49. Efecto inhibidor del rojo de rutenio

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

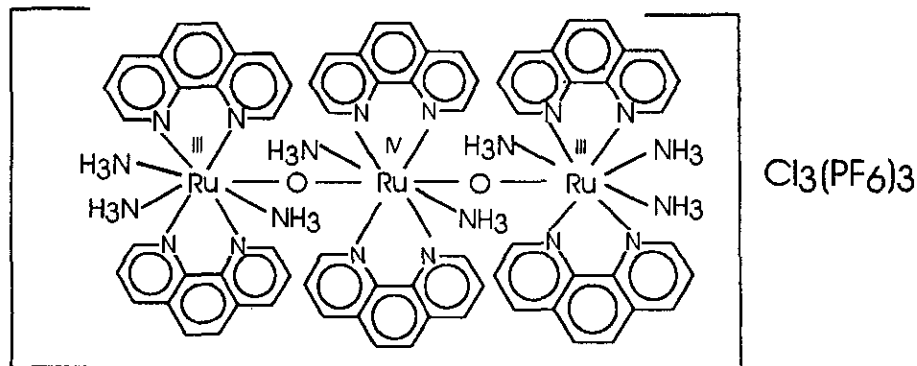
5.1.- Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolina rutenio(IV), RRPhen1

Podemos concluir en el caso del compuesto RRPhen1, que su fórmula mínima es $C_{96}N_{20}H_{76}Ru_3O_2Cl_3P_3F_{18}$, lo que corresponde a la coordinación de 6 moléculas de fenantrolina a la estructura metálica, mientras 8 grupos amino permanecen unidos a ésta. El peso molecular de RRPhen1 es de 2094,12. Como contralón se concluye que el nuevo análogo al rojo de rutenio RRPhen1 posee 3 cloruros y 3 PF_6^- , manteniendo la carga original de 6+ presente en la materia de partida, el rojo de rutenio.

Este hecho pone de manifiesto un aumento en el número de coordinación de los rutenios, ya que si consideramos a los tres rutenios hexacoordinados esto genera 14 sitios de coordinación del ligantes, en la estructura metálica típica del rojo de rutenio, ya con los oxígenos coordinados, lo que genera la estructura lineal Ru-O-Ru-O-Ru, mientras que los resultados arrojados en nuestro estudio demuestran la coordinación de 20 posiciones.

El aumento es de rutenios hexacoordinados a rutenios octacoordinados, un número de coordinación no típico en el caso del rutenio en estado de oxidación 3+ y 4+, sin embargo creemos que este cambio en el número de coordinación es promovido por la fenantrolina misma, por su naturaleza quelante, para de esta forma encontrarse coordinada al metal, por sus dos posiciones posibles.

En función de estos hechos determinamos la formula estructural más posible para RRPhen1 que se muestra a continuación:



La cual es compatible con los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas empleadas para la caracterización de RRPhen1.

El nombre sistemático de este compuesto es cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(triamminbisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV).

La síntesis de este compuesto es reproducible y nos permitió determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la síntesis de los compuestos análogos al rojo de rutenio, en las que las materias primas sufrieran el menor grado de descomposición. Es importante mencionar nuevamente que el rojo de rutenio y la fenantrolina son compuestos sensibles al oxígeno ambiental y a la luz.

También de esta síntesis determinamos que era muy conveniente llevar a cabo la sustitución de la máxima cantidad de fenantrolinas permitida por la estructura metálica, hecho que se cumplió al llevar a cabo la síntesis del compuesto RRPhen2.

Ha la fecha no ha podido obtenerse un cristal de RRPhen1, sin embargo, creemos estar avanzando en el camino indicado, para en el futuro crecer el monocristal, ya que la apariencia microcristalina de este compuesto nos permite mantener este objetivo.

En el espectro de RMN ^1H , encontramos una señal a 7 ppm que asignamos a los protones en los grupos amino, dado que desaparecen luego del intercambio con agua deuterada, sin embargo, hasta este punto no podemos descartar que se trate de una impureza.

La actividad biológica generada por este compuesto nos ha permitido establecer un mecanismo posible de su acción biológica, lo que representa un gran avance en este campo de la investigación.

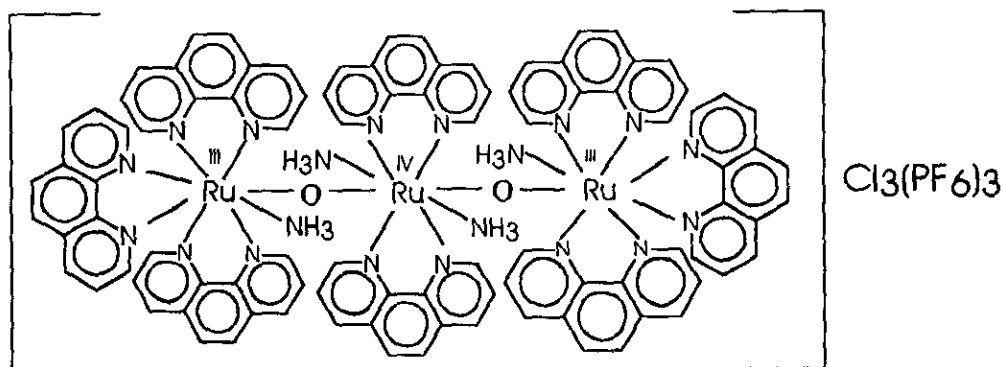
5.2.- Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolina rutenio(IV), RRPhen2

En el caso de este compuesto encontramos que se coordinaron a la estructura metálica 8 fenantrolinas por 4 grupos amino que permanecieron coordinados.

Este resultado sin lugar a dudas indica que el número de coordinación de los rutenios presentes aumentó nuevamente a un número de coordinación de 8, lo cual da apoyo a la afirmación preliminar en el caso del compuesto RRPhen1,

estableciéndose entonces que el aumento en el número de coordinación de los rutenios es un comportamiento típico, creemos estimulado por las propiedades químicas de la fenantrolina.

De los resultados obtenidos del proceso de caracterización de RRPhen2 se encontró la siguiente fórmula mínima $C_{96}N_{20}H_{76}Ru_3O_2Cl_3P_3F_{18}$, compuesto que tiene un peso molecular de 2386.16 g/mol, mientras que la formula estructural es la siguiente:



El nombre sistemático de este compuesto es cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(amminitrisfenantrolinarutenio(III)) diamminbisfenantrolinarutenio(IV).

De la experiencia primera con el compuesto RRPhen1 logramos determinar las mejores condiciones de reacción, y como se vio en el caso de RRPhen2 el rendimiento se vio incrementado considerablemente.

Ambos compuestos RRPhen1 y RRPhen2 son estables secos bajo condiciones atmosféricas.

RRPhen1 y RRPhen2 se diferencian por el número de fenantrolinas coordinadas, determinado por las condiciones de reacción, mientras que en el caso de RRPhen2 adicionamos un exceso de fenantrolina, en RRPhen1, el reactivo limitante fue precisamente el ligante aromático.

También es importante mencionar que en ambos compuestos se manifiesta un aumento en el número de coordinación, promovido por la fenantrolina, que como podemos percibir posee un alto poder coordinante. Aún cuando no es muy común encontrar un número de coordinación de ocho en rutenio III o IV, este fenómeno se presenta gracias al alto poder coordinante de la fenantrolina, que estabiliza altos números de coordinación.

Este alto poder coordinante se pone de manifiesto una vez más al ser capaz, la fenantrolina, de estabilizar un compuesto de coordinación de sodio.

En cuanto al espectro de resonancia magnética, asignamos la señal presente a aproximadamente 7 ppm como la generada por los protones de los grupos amino, pues desaparecen después del intercambio de agua deuterada, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que se trate de una impureza.

5.3.- Análogo al rojo de rutenio con fenantrolina y tetrafenilborato de sodio como contraión

De esta actividad experimental podemos concluir que aun cuando la adición del tetrafenilborato de sodio favorece considerablemente el proceso de precipitación, da origen a compuestos altamente sensibles a las condiciones atmosféricas, lo cual es inconveniente, dado que los experimentos en sistemas biológicos se llevan a cabo en dichas condiciones.

Es importante mencionar que el empleo de este contraión por su naturaleza altamente aromática dificulta la caracterización de los análogos de fenantrolina, la cual es otra razón para no considerar llevar a cabo la síntesis de este tipo de compuesto.

Sin embargo de esta experiencia concluimos que sería muy conveniente tratar de sintetizar análogos con contraiones de gran tamaño, con lo cual favoreceríamos la precipitación y posiblemente la cristalización de los compuestos análogos al rojo de rutenio.

5.4.- Purificación del rojo de rutenio

Logramos obtener un rojo de rutenio lo suficientemente puro como se discutió en la sección correspondiente.

Creemos que la técnica de purificación se haría más eficiente si se reduce el tiempo de evaporación del disolvente, ya sea adicionando grandes cantidades del agente secante en el desecador o mejor aún sometiendo a liofilización al compuesto.

Aún cuando el rojo de rutenio purificado presenta una pequeña impurificación por el ViRu, detectado mediante espectroscopía electrónica, se determinó que

su actividad biológica, no parece ser significativa por lo cual la actividad inhibidora del transporte de calcio que detectamos se atribuye al rojo de rutenio.

5.5.- Síntesis del violeta de rutenio, octacloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(IV)) tetraamminrutenio(IV), ViRu

Hemos sintetizado un violeta de rutenio lo suficientemente puro, como lo demuestran las diferentes técnicas empleadas para la caracterización de este compuesto.

Este hecho nos permitirá estudiar más la reactividad química del rojo de rutenio y los compuestos análogos a éste.

Proponemos oxidar al rojo de rutenio hasta violeta de rutenio empleando agentes oxidantes no muy potentes para de esta forma no promover la descomposición de la estructura metálica del complejo.

5.6.- Pruebas biológicas de los análogos sintetizados

Se determinó que la capacidad de inhibir el transporte de calcio, en la membrana interna de la mitocondria, en donde se encuentra localizado el acarreador uniportador, por los compuestos análogos al rojo de rutenio sintetizados, presentan menor actividad comparada con el rojo de rutenio.

Este hecho experimental se atribuye a la naturaleza altamente liposoluble de los análogos sintetizados, lo cual creemos favorece su adsorción a ambientes liposolubles, como lo es la membrana lipídica, dificultando su acercamiento a los sitios de baja afinidad del calcio.

El gran tamaño del catión del análogo al rojo de rutenio (RRPhen1 ó RRPhen2) presenta impedimento estérico y dificulta de esta forma su libre acceso a dichos sitios de baja afinidad.

Mediante los estudios del transporte de calcio mitocondrial, se determinaron los valores de las constantes de inhibición, K_i , datos que no han sido reportados en la literatura a la fecha y que constituyen una importante contribución, ya que se reportaban los valores I_{50} , de los compuestos inhibidores, los cuales ahora se considera no son lo suficientemente confiables.

Estas evidencias experimentales, aunadas a las evidencias ya reportadas en la literatura permitieron establecer el posible mecanismo de acción del rojo de rutenio y de los compuestos análogos, el cual ha sido fuente de investigación por muchos años.

En términos generales se postula que el rojo de rutenio es un compuesto que presenta afinidad por los sitios de "baja afinidad para el calcio". Sin inhibidor, la unión del calcio a los sitios de baja afinidad potencializa la entrada de calcio, una vez que el calcio se encuentra en los sitios de alta afinidad. Al encontrarse el rojo de rutenio, este inhibe el sitio de baja afinidad inhibiendo también el de alta afinidad al dejar de potencializar el transporte y lo que finalmente se observa es la inhibición del transporte de calcio. Por esto, aún cuando el rojo de rutenio inhibe el transporte de calcio considerablemente, no lo hace por completo, ya que su afinidad no está dirigida a los sitios de "alta afinidad", sino a los sitios de "baja afinidad" por el calcio.

Los resultados obtenidos de este estudio han permitido continuar con el avance en este campo, por lo que se cree factible a corto plazo aislar a la proteína transportadora de calcio involucrada en este proceso.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFIA

1. A. Joly, Composés Ammoniacaux Dérivés du Sesquichlorure de Ruthénium. *C. R. Acad. Sci.* 1892: 115. 1299-1301.
2. L. Mangin. Sur les Réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane. *C. R. Acad. Sci.* 1890: 111. 120-123.
3. G. T. Morgan, y F. H. Burstall. Researches on Residual Affinity and Coordination. Part XXXVI. The Constitution of "Ruthenium Red". *J. Chem. Soc.* 1936: 41-45.
4. Gleu y Breuel. *Z. Anorg. Chem.* 1938: 237.350.
5. J. M. Fletcher, B. F. Greenfield, C. J. Hardy, D. Scargill y J. L. Woodhead. Ruthenium Red. *J. Chem. Soc.* 1961: 2000-2006.
6. C. A. Clausen, R. A. Prados y M. L. Good. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, 1971: 7.485.
7. Earley E.J., Fealey T. Hydroxide Ion as a Reducing Agent for Mixed-Valence Trimers. *Chemical Communications*. 1971: 331.
8. Earley E.J., Razavi H. Oxygen Evolution: An Inorganic Example. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1973: 9. 331-335.
9. Earley E.J., Fealey T. Hydroxide Ion as a Reducing Agent for Cations Containing Three Ruthenium Atoms in Nonintegral Oxidations States. *Inorganic Chemistry*. 1973:12(2). 323-327.
10. Earley E.J. y cols. Apparent Reduction of Ruthenium Trimers by Hydroxide Ion. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1973:36. 2385.
11. Earley E.J., Chalilpoyil P., Bignetti P.L. On the Reaction Between "Ruthenium Brown" and Hydroxide Ion. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1981:43. 190.
12. Luft H. J. Ruthenium Red and Violet. Chemistry, Purification, Methods of use for Electron microscopy and Mechanism of Action. *Anat. Rec.* 1971:171. 347-368.

13. C. Sterling. Crystal Structure of Ruthenium Red and Stereochemistry of its Pectic Stain. *Am. J. Botany*. 1970: 57(2). 172-175.
14. P. M. Smith, T. Fealey, J. E. Earley y J. V. Silverton. The Crystal and Molecular Structure of Di- μ -oxo-bis(pentaammineruthenium)bis(ethylenediamine) ruthenium Hexachloride. The Ethylenediamine Analog of "Ruthenium Red". *Inorg. Chem.* 1971:10(9). 1943-1947.
15. C.T. Carrondo, W. P. Griffith, J. P. Hall y A. C. Skapski. X-Ray Structure of $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]^{6+}$, Cation of the Cytological Reagent Ruthenium Red. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1980: 627. 332-334.
16. J. M. Friedman, D. L. Rousseau, G. Navon, S. Rosenfeld, P. Glynn y K. B. Lyons. Ruthenium Red as a Resonance Raman Probe of Ca^{2+} Binding Sites in Biological Materials. *Anal. of Biochemistry and Biophysics*. 1979: 1. 14-21.
17. F. Bottomley. Nitrosyl Complexes of Ruthenium. *Coordination Chemistry Reviews*. 1978: 26.7-32.
18. R. D. Felham. *Inorgánica Chemistry*. 1978: 1-41.
19. C. Slater y R. J. P. Williams. Ruthenium Red as a Paramagnetic Probe in NMR Spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 1979:10.179-182.
20. A. L. Lehninger, E. Carafoli y C. S. Rossi. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1967:29. 259-320.
21. C. L. Moore. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971:42.293-305.
22. F. D. Vasington, P. Gazzotti, R. Tiozzo y E. Carafoli. *Biochim. Biophys. Acta*. 1972:256.43-54.
23. K. C. Reed y F. Bygrave. *Biochem. J.* 1974:140.143-155.
24. Weng-Long Ying, y col. Inhibition of Mitochondrial Calcium Ion Transport by an Oxo-Bridged Dinuclear Ruthenium Ammine Complex. *Biochemistry*. 1991:30. 4949-4952.
25. L. de Meis. *J. Biol. Chem.* 1991:266.5736-5742.
26. A. R. Melnicke, S. S. Zavan, A. M. C. Ferreira A. E. Vercesi y E. J. H. Bechara. The calcium Sensor Ruthenium Red Can Act as a Fenton-Type Reagent. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1996: 328(2). 239-244.

27. A. R. Meinicke, E. J. H. Bechara y A. E. Vercesi. Ruthenium Red-Catalyzed Degradation of Peroxides Can Prevent Mitochondrial Oxidative Damage Induced by either tert-Butyl Hydroperoxide or Inorganic Phosphate. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1998: 349(2),275-280.
28. P. Jursinic, N. Miller y R. Carpentier. Ruthenium Red Inhibition of Oxygen Evolution and Specific Release of the Extrinsic 16 kDa Polypeptide in a Photosystem II Preparation. *Photochemistry and Photobiology.* 1991 :51(5), 705-712.
29. S. Lemieux y R. Carpentier. Inhibition at the Ca^{2+} Sensitive site of the Oxygen Evolving Center by Ruthenium Red. Biggens, J. (de.), *Progress in Photosynthesis Research.* 1987. Vol I. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands.
30. N. Miller, S. Lemieux y R. Carpentier. Ruthenium Red as Inhibitor of the Oxygen evolving Complex of Photosystem 2. *Photosynthetica.* 1987 :21(4), 509-514.
31. T. Sasaki, M. Naka, F. Nakamura y T. Tanaka. *J. Biol. Chem.* 1992: 267. 21518-21523.
32. H. Masuoka, J. Masooki, T. Nakano, M. Naka y T. Tanaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990: 169. 315-322.
33. J. J. R. Fraústo da Silva y R. J. P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements.* 1ª ed. Edit. Clarendon Press Oxford. 1991. Cap. 10. 268-296.
34. W. Kaim y B. Schwederski. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life.* 1ª ed. Edit. John Wiley & Sons. 1991. 267-300.
35. M. N. Hugues. *Comprehensive Coordination Chemistry Coordination Compounds in Biology.* 1ª ed. Edit. Pergamon Press. London England. 1990: 562-597.
36. D. Voet y J. G. Voet. *Biochemistry.* 1ª ed. Edit. John Wiley & Sons. 1990. New York, U.S.A.
37. W. Drabikowski, H. Strezelecka-Golaszewska y E. Carafoli. *Calcium Binding Proteins.* Elsevier. Amsterdam Holland. 1974.
38. R. H. Wasserman, R. A. Corradino, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. MacLennan y F. L. Siegel. *Calcium Binding Proteins and Calcium Function.* North Holland, New York. 1977.

39. F. L. Siegel, E. Carafoli, R. H. Kretsinger, D. H. MacLennan y R. H. Wasserman. *Calcium Binding Proteins: Structure and Function*. Elsevier. North Holland, New York. 1980.
40. E. Carafoli. *Membrane Transport of Calcium*. Academic London. 1982.
41. W. Y. Heung. *Calcium and Cell Function*. Academic London. 1980.
42. D. Dalgarno, R. E. Klevit, B. A. Levine y R. J. P. Williams. *Trends Pharm. Sci.* 1984;5. 266.
43. B. A. Levine y R. J. P. Williams. *Calcium and Cell Function*. Academic . New York. 1982.
44. M. Brenowitz, C. Bonaventura y J. Bonaventura. *Biochemistry*. 1984: 23. 879.
45. E. Antonini y E. Chiancone. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1977: 6.239.
46. Hinkle C.P., McCarty E.R. How Cells Make ATP. *Sci Amer.* 1978 :238(3). 104-123.
47. D. G: Nicholls y S. J. Ferguson. *Bioenergetics* 2.1ª ed. Edit Academic Press. Great Britain. England. 1982: 207-233.
48. D. Nicholls D. Some Recent Advances in Mitochondrial Calcium Transport. *TIBS*. February. 1981.
49. D. G. Nicholls y M. D. Brand. *Biochem J.* 1980: 186. 113-118.
50. D. G. Nicholls y M. Crompton. *FEBS. Lett.* 1980:111. 261-268.
51. N. E. Saris y K. E. O. Akerman. *Curr. Topics Bioenerg.* 1980: 10.
52. J. S. Puski, T. E. Gunter, K.K. Gunter y P. R. Russell. *Biochemistry*. 1976: 15. 3834-3842.
53. M. Crompton, M. Capano y E. Carafoli. *Eur J. Biochem.* 1976: 176. 463-474.
54. P. Mitchell. *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*. Glynn Research, Bodmin, Cornwall. U. K. 1966.
55. P. Mitchell. *Eur J. Biochem.* 1979: 95. 1-20.
56. Harris Wesley r., Ichiro Hurae, Timmons James H. y Martell Arthur E. *Inorganic Chemistry*. 1978: 17.(4). 889-894

57. E. Chávez, R. Briones, B. Michel, C. Bravo y D. Jay. Evidence for the Involvement of Dithiol Groups in Mitochondrial Calcium Transport: Studies with Cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985; 242(2), 493-497.
58. K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 3^a ed. Edit. Wiley-Interscience. 1978
59. R. M. Silvestein, G. C. Bassler y T. C. Morrill. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 1^a ed. Edit. John Wiley & Sons. USA. 1980.
60. H. Günther. *NMR Spectroscopy*. 1^a ed. Edit. John Wiley & Sons. USA. 1980.
61. F. Bottomley. Nitrosyl Complexes of Ruthenium. *Coordination Chemistry Reviews*. 1978; 26, 7-32.
62. J. B. Godwin y T. J. Meyer. The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline. *Inorganic Chemistry*. 1971; 10(3), 471-474.
63. B. P. Gans, A. Sabatini y L. Sacconi. Infrared Spectra and Bonding in Transition Metal Nitrosyl Complexes. *Inorganic Chemistry*. 1966; 5(11), 1877-1886.
64. A. F. Schreiner, S. W. Lin, P. J. Hauser, E. A. Hopcus, D. J. Hamm y J. D. Gunter. Chemistry and Optical Properties of 4d and 5d Transition Metals. Chemistry and Electronic Structures of Ruthenium Acidonitrosylammines, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{NO})(\text{L})]^{9+10}$. *Inorganic Chemistry*. 1972; 11(4), 880-888.
65. M. Bennett, T. W. Matheson, G. B. Robertson, W. L. Steffen y T. W. Turney. Isolation of a Co-ordinated Ketol Intermediate in the Hydrolysis of PF_6^- Initiated by the Cations $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{acetone})_3]^{2+}$; X-Ray Crystal Structure of Acetone(4-hydroxy-4-methylpentan-2-one)-(η^6 -mesitylene)ruthenium Bistetrafluoroborate. *J. C. S. Chem. Comm.* 1979. 32-33.
66. G. Smith, D. J. Cole-Hamilton, A. C. Gregory y N. G. Gooden. Reactions of Dichlorobis(ditertiaryphosphine) ruthenium(II) with Carbon Monoxide: Preparation of Dicarbonylbis(ditertiaryphosphine) ruthenium(II) cations. *Polyhedron*. 1982. 1(1), 97-103.
67. G. Bruno, S. LoSchiavo, P. Piraino y F. Faraone. Addition of Silver Electrophiles to an Electron-Rich Rhodium-Rhodium Bond. Synthesis and X-ray Crystal Structure of the $[\text{Rh}_2(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2(\mu\text{-CO})(\mu\text{-Ph}_2\text{PCH}_2\text{PPh}_2)(\mu\text{-AgOPF}_2\text{O})]$, a Triangular Rhodium-Silver Cluster With the Difluorophosphate Ion Coordinated to the Silver Atom. *Organometallics*. 1985. 4, 1098-1100.

- 68.H. Bauer, U. Nagel y W. Beck. Hydridoiridium(III)-Komplexe Mit Den Schwach Koordinierten Anionen PF_6^- und AlCl_4^- und Ihre Reaktionen Mit Wasser; Rontgenstrukturen Von $[(\text{PPh}_3)_2(\text{CO})(\text{Cl})(\text{H})\text{Ir}(\text{OH}_2)]^+$, BF_4^- und $(\text{PPh}_3)_2(\text{CO})(\text{Cl})(\text{H})\text{IrOPOF}_2$. *J. Organometallic Chemistry*. 1985. 290. 219-229.
- 69.R. Fahmy, K. King, E. Rosemberg, A. Tiripicchio y M. Tiripicchio M. *J. Am. Chem Soc.*, 1980. (102). 3626.
- 70.B. Folkensson. *Acta Chem. Scand.* 1973.(27). 287.

CAPITULO 7

APÉNDICE

Coordenadas atómicas($\times 10^4$) y coeficientes de desplazamiento isotrópico equivalente($\text{Å}^2 \times 10^3$)

Atom	X/a	Y/b	Z/c	$U(eq)$
Na(1)	3843(2)	7131(2)	5719(1)	64(1)
N(1)	3709(4)	5652(4)	4726(4)	72(4)
N(2)	3941(4)	5786(4)	6519(4)	67(3)
N(3)	4362(6)	8297(4)	4737(4)	77(4)
N(4)	5893(5)	8523(4)	6510(4)	73(4)
N(5)	3124(5)	7755(4)	6725(4)	61(3)
N(6)	1719(4)	6476(4)	4960(4)	65(3)
C(1)	3633(5)	5578(6)	3863(6)	93(5)
C(2)	3447(7)	4691(9)	3316(6)	118(7)
C(3)	3330(7)	3859(8)	3698(8)	124(7)
C(4)	3420(5)	3892(7)	4603(7)	92(6)
C(5)	3309(7)	3033(7)	5042(8)	109(6)
C(6)	3432(7)	3134(7)	5925(8)	115(7)
C(7)	3655(5)	4036(6)	6471(6)	78(5)
C(8)	3801(6)	4169(6)	7400(6)	94(6)
C(9)	3990(6)	5062(7)	7855(5)	98(5)
C(10)	4063(5)	5843(5)	7394(5)	86(5)
C(11)	3739(5)	4885(5)	6052(5)	62(4)
C(12)	3611(5)	4814(6)	5101(5)	67(4)
C(13)	3643(7)	8212(5)	3874(6)	96(6)
C(14)	3952(9)	8747(7)	3243(6)	109(8)
C(15)	5053(10)	9391(7)	3502(8)	110(9)
C(16)	5865(9)	9530(6)	4402(7)	91(7)
C(17)	7034(11)	10221(8)	4730(9)	146(11)
C(18)	7803(9)	10360(7)	5581(9)	144(9)
C(19)	7456(9)	9797(6)	6232(8)	104(7)
C(20)	8217(8)	9906(7)	7137(9)	135(8)
C(21)	7836(8)	9370(7)	7714(6)	121(7)
C(22)	6662(8)	8681(5)	7375(6)	95(6)
C(23)	6294(7)	9094(5)	5946(6)	69(5)
C(24)	5481(8)	8962(5)	5011(6)	66(5)
C(25)	3777(6)	8362(5)	7581(5)	73(5)
C(26)	3351(7)	8701(5)	8121(5)	85(5)
C(27)	2208(7)	8420(5)	7763(5)	85(6)
C(28)	1484(7)	7793(5)	6856(5)	71(5)
C(29)	279(8)	7480(6)	6428(6)	98(7)
C(30)	-397(6)	6880(6)	5566(6)	100(6)
C(31)	42(7)	6491(5)	5039(5)	71(5)

Coordenadas atómicas($\times 10^4$) y coeficientes de desplazamiento isotrópico
equivalente($\text{Å}^2 \times 10^3$)

Atom	<i>X/a</i>	<i>Y/b</i>	<i>Z/c</i>	<i>U(eq)</i>
C(32)	-646(6)	5817(6)	4156(6)	89(5)
C(33)	-161(7)	5494(5)	3690(5)	87(5)
C(34)	1028(7)	5852(5)	4125(5)	76(5)
C(35)	1230(6)	6792(4)	5426(4)	57(4)
C(36)	1973(6)	7462(4)	6358(4)	56(4)
B(1)	3083(6)	1756(5)	9182(4)	53(4)
C(37)	4430(5)	2236(4)	9329(5)	55(4)
C(38)	4780(7)	2283(5)	8607(5)	78(5)
C(39)	5929(9)	2738(6)	8766(6)	96(7)
C(40)	6778(7)	3143(5)	9656(7)	98(6)
C(41)	6493(6)	3122(5)	10401(5)	80(5)
C(42)	5336(6)	2671(4)	10223(5)	68(4)
C(43)	2223(5)	1528(4)	8073(4)	59(4)
C(44)	2036(6)	735(5)	7417(5)	105(6)
C(45)	1385(7)	545(6)	6472(5)	116(6)
C(46)	891(6)	1131(6)	6118(5)	94(5)
C(47)	1029(5)	1912(5)	6725(5)	86(5)
C(48)	1687(5)	2103(4)	7692(4)	63(4)
C(49)	2678(6)	670(4)	9527(4)	62(4)
C(50)	3427(6)	319(5)	10040(4)	75(4)
C(51)	3083(8)	-578(6)	10346(5)	105(6)
C(52)	1951(10)	-1160(6)	10152(6)	118(8)
C(53)	1166(7)	-853(6)	9639(6)	114(7)
C(54)	1530(7)	39(5)	9322(4)	87(5)
C(55)	2986(5)	2611(4)	9802(4)	53(4)
C(56)	2359(5)	2391(4)	10338(4)	79(5)
C(57)	2253(6)	3137(6)	10800(4)	96(5)
C(58)	2751(6)	4136(5)	10740(4)	83(5)
C(59)	3393(5)	4392(4)	10236(4)	67(4)
C(60)	3510(5)	3647(4)	9786(3)	59(4)
C(61)	9991(8)	6841(7)	1634(6)	175(9)
C(62)	10464(13)	6242(14)	1526(10)	193(14)
C(63)	10670(13)	4849(11)	1459(9)	309(25)
C(64)	10201(8)	3916(7)	1666(6)	176(9)
O(1)	11367(12)	6570(10)	1585(12)	402(16)
O(2)	9975(6)	5266(6)	1407(5)	169(6)

Equivalent isotropic *U* defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor