

00550
6

UNAM
POSGRADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**NUEVA EVIDENCIA EN LA REACTIVIDAD QUÍMICA Y
BIOLÓGICA DEL ROJO DE RUTENIO Y COMPUESTOS
ANÁLOGOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. ARIADNA GARZA ORTIZ

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: ARIADNA GARZA ORTIZ

FECHA:

09/09/02

FIRMA:

Ariadna Garza Ortiz

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
MEXICO, D.F.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Noráh Yolanda Barba Beherens
Vocal	Dr. Heliodoro Celis Sandoval
Secretario	Dr. Blas Lotina Hennsen
1er. suplente	Dr. José Norberto Farfán García
2do. suplente	Dra. Silvia Castillo Blum

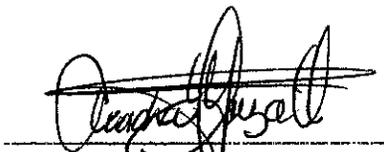
El trabajo experimental descrito en este trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio 212 de la División de Estudios de Posgrado en el área de Química Inorgánica y Nuclear en el edificio B de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

Tutor



Dra. Martha Elena Sosa Torres

Alumna



Ariadna Garza Ortiz.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

WISCONSIN
MAY 10 1964
MILWAUKEE

ÍNDICE GENERAL

Página

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES.....	3
1.1.-Rojo de rutenio como colorante en microscopía óptica y electrónica.....	3
1.2.-Actividad del rojo de rutenio en los sistemas biológicos.....	6
1.2.1.-Tipos de interacción del calcio con las proteínas.....	6
1.2.2.-Inhibición en la unión calcio-calmodulina.....	8
1.2.3.-Inhibición del transporte de calcio mitocondrial.....	13
1.2.4.-Actividad del RR sobre la secreción neuronal.....	14
1.2.5.-RR y su efecto anticancerígeno.....	15
1.2.6.-Otros efectos en la actividad biológica por RR.....	16
1.2.7.-RR en los sistemas vegetales.....	17
1.2.7.1.-La fotosíntesis y su localización.....	17
1.2.7.2.-Reacciones de la fase luminosa.....	21
1.2.7.3.-Hallazgos en reactividad de RR frente a la fase luminosa.....	28
1.3.-Caracterización y estudio de la reactividad química del RR y análogos.....	31
1.3.1.-Generalidades.....	31
1.3.2.-Síntesis del rojo de rutenio.....	32
1.3.3.-Propiedades óxido-reductoras.....	33
1.3.4.-Estudios de difracción de rayos X del rojo de rutenio y análogos.....	36
1.3.5.-Espectroscopía Mössbauer.....	38
1.3.6.-Espectroscopía electrónica.....	40

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.7. Cálculos moleculares.....	42
1.3.8.-Espectroscopía vibracional.....	44

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS.....	47
----------------	----

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL.....	48
-------------------------	----

3.1.-Reactivos para la síntesis química.....	48
--	----

3.2.-Técnicas y equipos utilizados.....	49
---	----

3.3.-Procedimientos experimentales aplicados al estudio de la actividad química y biológica de compuestos análogos al rojo de rutenio.....	50
--	----

3.3.1.- Síntesis de análogos al RR por sustitución de ligante.....	50
--	----

3.3.1.1.- Síntesis del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrisenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen2.....	51
---	----

3.3.2.- Síntesis de complejos mononucleares de rutenio.....	52
---	----

3.3.2.1 - Síntesis del <i>cis</i> -bisbipiridinadiclororutenio(II), bisbipyRu.....	52
--	----

3.3.2.2.- Síntesis del <i>cis</i> -diclorobisfenantrolinarutenio(II), bisphenRu.....	52
--	----

3.3.2.3.- Síntesis del cloruro de trisenantrolinarutenio(II), trisphenRu.....	53
---	----

3.3.3.- Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de complejos mononucleares.....	53
---	----

3.3.3.1.- Síntesis del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisfenantrolina rutenio(III))bisfenantrolinarutenio(IV),RRPhen3.....	54
--	----

3.3.3.2.- Síntesis del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisbipiridina rutenio(III))bisbipiridinarutenio(IV),RRBpy1.....	54
---	----

3.3.4.- Procedimiento de síntesis de los análogos al RR por oxidación.....	55
--	----

3.3.4.1.- Síntesis del café de rutenio, nitrato de di- μ -oxo-(pentaamminrutenio(III))pentaamminrutenio(IV))tetraamminrutenio(IV), CR.....	55
--	----

3.3.4.2.- Síntesis del violeta de rutenio, cloruro de di- μ -oxo-bis	
--	--



(pentaamminrutenio(IV))tetraamminrutenio(IV), VR.....	55
3.3.5.-Procedimiento de purificación del RR y complejos análogos.....	56
3.3.6.- Estudios bioquímicos.....	57
3.3.6.1.- Aislamiento de cloroplastos y determinación de clorofila.....	57
3.3.6.2.- Medición de la velocidad del transporte de electrones.....	58
3.3.6.3.- Medición de la síntesis de ATP.....	60
3.3.6.4.- Cálculo del logaritmo de los coeficientes de partición, log P...60	

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1.-Complejos mononucleares de rutenio.....	65
4.1.1.- Complejo <i>cis</i> -bisbipiridinadiclororutenio(II), bisbipyRu.....	65
4.1.1.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	65
4.1.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	66
4.1.1.3.- Espectroscopía de RMN ¹ H	67
4.1.1.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	71
4.1.2.- Complejo <i>cis</i> -diclorobisfenantrolináruutenio(II), bisphenRu.....	71
4.1.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	71
4.1.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	72
4.1.2.3.- Espectroscopía de RMN ¹ H	74
4.1.2.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	76
4.1.3.- Complejo cloruro de trisfenantrolináruutenio(II), trisphenRu.....	77
4.1.3.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	77
4.1.3.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	78
4.1.3.3.- Espectroscopía de RMN ¹ H	79
4.1.3.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	81
4.2.- Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de mononucleares... ..	82
4.2.1.- Síntesis y caracterización del perclorato de di- μ -oxo- bis(acuabisbipiridináruutenio(III))bisbipiridináruutenio(IV),RRBpy1	83
4.2.1.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	83

4.2.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	84
4.2.1.3.- Momento magnético	86
4.2.1.4.- Espectroscopía de RMN ¹ H.....	86
4.2.1.5.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	87
4.2.2.- Síntesis y caracterización del perclorato de di- μ -oxo-	
bis(acuabisfenantrolinarutenio(III))bisfenantrolinarutenio(IV),RRPhen3.....	89
4.2.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	89
4.2.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	91
4.2.2.3.- Momento magnético	92
4.2.2.4.- Espectroscopía de RMN ¹ H.....	92
4.2.2.5.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	93
4.3.- Síntesis, caracterización y purificación de análogos al RR por procesos redox.....	94
4.3.1.- Nueva evidencia en la caracterización y purificación del RR.....	94
4.3.1.1 - Purificación cromatográfica del RR.....	94
4.3.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo lejano.....	96
4.3.1.3.- Análisis termogravimétrico.....	96
4.3.2.- Síntesis y caracterización del CR.....	99
4.3.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	99
4.3.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	100
4.3.2.3.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	101
4.3.2.4.- Análisis termogravimétrico.....	101
4.3.3.- Síntesis y caracterización del VR.....	102
4.3.3.1.- Análisis elemental y propiedades físicas.....	103
4.3.3.2.- Espectroscopía de infrarrojo.....	104
4.3.3.3.- Espectroscopía UV-Vis en disolución.....	104
4.3.3.4.- Análisis termogravimétrico.....	105
4.4.- Nuevas evidencias en torno a la caracterización del cloruro hexafluorofosfato de	
di- μ -oxo-bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV),	
RRPhen2.....	106
4.4.1.- Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.....	108
4.4.2.- Determinación del peso molecular.....	109

4.4.2.1.- Cromatografía de permeación en gel.....	109
4.4.2.2.- Espectrometría de masas.....	111
4.4.3.- Espectrometría de infrarrojo lejano.....	112
4.4.4.- Análisis termogravimétrico.....	113
4.5.-Actividades fotosintéticas en presencia de análogos al RR.....	114
4.5.1.- Síntesis de ATP.....	117
4.5.2.- Transporte de electrones.....	119
4.5.3.- Coeficientes de partición.....	124

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES.....	125
5.1.- Complejos mononucleares de rutenio.....	125
5.2.- Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de mononucleares.....	125
5.3.- Estudio de la reactividad de análogos al RR por procesos redox.....	125
5.4.- Nuevas evidencias en el estudio de RRPhen2.....	127
5.5.- Estudios bioquímicos.....	127

CAPÍTULO 6

SUGERENCIAS PARA ACCIONES FUTURAS.....	129
6.1.- En cuanto al RR, CR y VR.....	129
6.2.- En cuanto a los análogos por sustitución de ligante.....	129
6.3.- En cuanto a la actividad biológica.....	130

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA.....	131
-------------------	-----

CAPÍTULO 8

APÉNDICE.....	138
TRABAJOS EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTA TESIS.....	198

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
RR	Rojo de rutenio, cloruro de di- μ -oxo-bis(pentamminrutenio(III) tetramminrutenio(IV))
CR	Café de rutenio, nitrato de di- μ -oxo-(pentaamminrutenio(III) pentaamminrutenio(IV) tetraamminrutenio(IV))
VR	Violeta de rutenio, cloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(IV) tetraamminrutenio(IV))
RRPhen2	Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrifenantrolinarutenio(III) diamminbisfenantrolinarutenio(IV))
bisbipyRu	<i>c/s</i> -bisbipiridinadiorutenio(II)
bisphenRu	<i>c/s</i> -diclorobisfenantrolinarutenio(II)
trisphenRu	Cloruro de trifenantrolinarutenio(II)
RRPhen3	Perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisfenantrolinarutenio(III)) bisfenantrolinarutenio(IV))
RRBpy1	Perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisbipiridinarutenio(III)) bisbipiridinarutenio(IV))
DMSO	Dimetilsulfóxido
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia magnética nuclear
HTFMS	Ácido trifluorometanosulfónico
PS I	Fotosistema I
PS II	Fotosistema II
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DCP	Difenilcarbazida
MV	Metilviológeno
SiMo	Silicomolibdato de sodio
DCBQ	Dicloro-p-benzoquinona
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
K_M	Constante de Michaelis
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
OEC	Complejo productor de oxígeno
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DBMIB	2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona
MTE	Medio de transporte de electrones
Te ⁻	Transporte de electrones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SECRET
INFORMATION REPORT

A mi fuente de energía y amor, refugio y ejemplo, mi familia, Jorge, Cristina y Cristy

AGRADECIMIENTOS

El primer y principal agradecimiento es a la **Dra. Martha E. Sosa Torres**, quien amorosamente corrigió e incremento mis conocimientos en el área, mostrándome siempre una enorme comprensión y paciencia. No esta demás decirle Dra., que agradeceré por siempre la amistad, la confianza, el respeto, la tolerancia y el apoyo incondicional a mi persona, sin los cuales mi desarrollo académico y personal no hubiera sido lo que ahora es. También debo agradecerle el nuevo, prometedor y excitante panorama que le ha dado a mi carrera académica, MUCHAS GRACIAS. Le pido a Dios que las esperanzas que puso en mi desarrollo y todo su tiempo invertido tengan grandes recompensas y que algún día pueda sentirse orgullosa de esta latosa estudiante.

También deseo hacer patente mi agradecimiento al **Dr. Blas Lotina Hennsen** y a la **Maestra en Ciencias Beatriz King**, quienes no solo dieron sentido y calidad a la investigación de la actividad biológica de los compuestos de rutenio en el proceso fotosintético sino además fueron increíblemente pacientes mostrándome las bellezas del mundo en el cual se desenvuelven. Muchas gracias por el cariño, la amistad y las atenciones.

A los miembros del Jurado, **Dra. Norah Yolanda Barba Beherens**, **Dra. Silvia Castillo Blum**, **Dr. Heliodoro Celis Sandoval**, **Dr. Blas Lotina Hennsen** y al **Dr. José Norberto Farfán García**, por las valiosas contribuciones a este trabajo, su comprensión y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría y a la **Lic. Beatriz López** a cargo de los tramites de CONACYT en la Facultad de Química, actividad desarrollada impecablemente.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM. A la **DGEP**, Dirección General de Estudios de Posgrado por la beca complementaria, durante mis estudios.

Agradezco también al **Ingeniero García León** del Instituto de Materiales de la UNAM, quien fué el encargado de la obtención de los pesos moleculares de los compuestos mediante la técnica cromatográfica de Permeación en Gel.

Agradezco a la **Química Carmen Vazquez** del Instituto de Materiales por la elaboración de los análisis termogravimétricos.

Agradezco al **Instituto de Materiales** por todas las facilidades brindadas en la realización de las determinaciones de pesos moleculares y análisis termogravimétrico.

A la **M. en C. Rosa Isela del Villar Morales** de la USAI por la determinación de los espectros de resonancia magnética nuclear y a la **Q. Marisela Gutiérrez** del área de Infrarrojo de la USAI por la determinación de los espectros de IR.

A la **Dra. Norah Barba** y a **Horacio López-Sandoval** por la incalculable ayuda, brindada para la obtención de los espectros mediante la técnica de reflectancia difusa y por su amistad. Dra. Norah, muchas gracias por el apoyo incondicional. Horacito, muchas gracias por todo.

A la **Dra. Laura Maria Gasque Silva** y al **Q. Edgar Mijangos** por la dirección en la obtención de los infrarrojos lejanos, tan importantes en este trabajo.

A la coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas, A la **Secretaría Administrativa** del Posgrado de la Facultad de Química y a la Jefa de Control Escolar, **Patricia Vargas Valencia**, por su gentileza en todo momento

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 mis profesores en los estudios de maestría: **Dra. Martha E. Sosa, Dra. Silvia Castillo Blum, Dra. Laura Gasque, Dr. Auster Valderrama, Dr. Sigfrido Escalante, Dr. Emilio Orgaz, Dr. Carlos Amador Bedolla, Dr. Juan Manuel Fernández, Dr. Ruben Toscano, Dr. Yartsimisky y Dr. Eduardo Torres**

A mis inolvidables compañeras de parranda **Carol, Florecita y Marce**, quienes hasta en los peores momentos me han hecho ver lo maravillosa que es la amistad **Mosqueteras** las amo

A la **Dra. Paola Gomez Tagle**, por todas enriquecedoras charlas y sincera amistad, te la debo pao.

A mis incansables amigos de AFG: **Gerard** sin ti y tus instrucciones esto no hubiera podido darse, a **Lupita y Tere**, por los increíbles paisajes y aventuras que juntas hemos vivido, aun nos faltan muchos kilómetros chicas así que prepárense

A mis compañeros del laboratorio 212, especialmente a **Alex y Henry**, por el respeto y amistad, mantengan ese espíritu muchachos.

A **Daya y Robert** por la amistad a lo largo de este difícil camino, vamos chicos ustedes pueden.

A mis amigos en la UAM, los flamantes ingenieros **Cheo, Eli, Gaby, Letzy, Lili, Nacho, Toño y Marquito** quienes tan desinteresadamente me ayudaron a cumplir con mis responsabilidades, sin ustedes no lo hubiera logrado a tiempo.

A mi familia, por la paciencia y el apoyo, tal vez con el cumplimiento de esta meta se me baje un poco la neurosis, aunque aun tengo muchísimas metas más, así que no bajen la guardia.

INTRODUCCIÓN

Este reporte de investigación comprende el estudio químico y biológico del rojo de rutenio y compuestos análogos y pretende hacer una contribución al conocimiento de la reactividad de este tipo de compuestos.

La inusual actividad biológica del rojo de rutenio (RR) y análogos a éste, exige el conocimiento preciso de su reactividad, el cual se ha desarrollado lentamente en los últimos 40 años, mientras que crece a gran velocidad el número de efectos nuevos descubiertos de este tipo de compuestos en sistemas biológicos.

El RR es inhibidor de sistemas reguladores de calcio, cuya trascendental importancia en casi la mayoría de los organismos vivos, hace indispensable la determinación de los mecanismos por los cuales el RR es capaz de ejercer el efecto inhibitorio.

De entre tantos procesos biológicos, podemos mencionar que el RR inhibe el proceso fotosintético, y el estudio de tal efecto es parte de este trabajo de tesis. Además, la síntesis de análogos al RR por sustitución de ligante, ha dado origen a compuestos con inusual actividad inhibitoria del proceso fotosintético que requieren de un amplio estudio.

En el desarrollo de este trabajo de investigación incluimos el estudio de compuestos simples, empleados en la síntesis de trinucleares o los productos de descomposición de éstos trinucleares, a fin contar con información basta para la comprensión de la reactividad de estructuras complejas.

Simultáneamente realizamos la investigación de las actividades fotosintéticas en presencia de los compuestos sintetizados y planteamos una relación estructura-actividad biológica.

Este trabajo de tesis consta de 8 capítulos, los cuales se describen brevemente en los párrafos siguientes:

En el **Capítulo 1** se incluyen los antecedentes de mayor trascendencia que se han logrado recabar en torno a la reactividad química y biológica del RR y compuestos análogos a éste. Hacemos una amplia descripción de las evidencias experimentales que han permitido definir la composición química del rojo de rutenio, así como su reactividad

química. También se incluye una revisión de los procesos fisiológicos en los que el RR se ha probado y ha mostrado algún tipo de actividad.

En el **Capítulo 2** presentamos los objetivos que nos propusimos alcanzar con este trabajo de investigación y que involucran a la reactividad química y biológica del rojo de rutenio y compuestos análogos.

En el **Capítulo 3** se describe detalladamente la metodología utilizada en el desarrollo de este trabajo de investigación.

En el **Capítulo 4** se presentan y discuten los resultados obtenidos sobre los nuevos compuestos sintetizados, así como los de los estudios biológicos.

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

En el **Capítulo 6** describimos algunas acciones y explicamos el objetivo de éstas, a fin de dar la continuidad a este trabajo de investigación.

En el **Capítulo 7** anexamos la bibliografía consultada que dio amplio fundamento a las actividades realizadas experimentalmente y a los análisis y conclusiones respecto de la reactividad química y biológica de los compuestos estudiados.

Finalmente el **Capítulo 8** constituye un apéndice en donde se concentran las evidencias experimentales, espectros y figuras empleadas en el análisis de los complejos estudiados.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1.- Rojo de rutenio como colorante en microscopía óptica y electrónica

El complejo de valencia mixta de rutenio comúnmente llamado rojo de rutenio (RR) ha sido empleado como colorante citológico en el campo de la microscopía desde 1893^{1, 2}, particularmente para la detección de componentes pectínicos

Desde 1961 el RR ha extendido su campo de aplicación siendo empleado para la preparación y acondicionamiento de muestras en microscopía electrónica³.

Margin¹, quien descubrió sus propiedades tintoriales, acuñó el nombre de rojo de rutenio. Además lo clasificó como un colorante básico, observando en éste muchas características en común con los colorantes básicos orgánicos conocidos en esos tiempos. Margin también reconoció la singular habilidad del RR para teñir sustancias pectínicas y su utilidad en el estudio de plantas, gomas y mucilagos.

La técnica de tinción con el RR es simple y efectiva; solamente se pone en contacto el tejido con el reactivo en solución. El disolvente es o agua destilada o solución fisiológica, con lo cual se logra la mejor conservación de los tejidos.

Con el devenir del tiempo su empleo como colorante de tejidos ha sido mejorado mediante la formulación de asociaciones de colorantes y fijadores como el tetróxido de osmio, lo cual lo ha convertido en uno de los colorantes más empleados, por su selectividad hacia ciertos tipos de sustratos².

Originalmente se empleó para la visualización de pectinas, constituyentes principales de las paredes celulares de células vegetales en el campo de la microscopía óptica y es un colorante en general de polianiones² con gran densidad de carga, como es el caso de los mucopolisacáridos y el DNA⁴, y se ha utilizado por más de 30 años como el colorante de elección para la tinción selectiva de mitocondrias y fibras musculares en el campo de la microscopía óptica y electrónica⁵

La habilidad tintorial del RR se debe a la reactividad que presenta frente a diferentes sustancias, todas polianiónicas y de alta densidad de carga. Se ha demostrado que el RR no presenta interacción ante polisacáridos y proteínas neutros. También se ha observado que la

alta densidad de carga no es suficiente para inducir la interacción con el RR, ya que el ácido 1,3,5-sulfónico no da origen a un precipitado en presencia del RR².

Se ha probado que la reacción de precipitación frente a pectinas depende principalmente del número de grupos carboxilos ionizables disponibles en la pectina, a mayor número más evidente es la precipitación. La reacción frente a estructuras proteicas se explica por la presencia de mucopolisacáridos invariablemente presentes en unión con las proteínas en las membranas de las células de los tejidos de los organismos vivos. Se cree en función de estas evidencias que el RR se une a los sustratos por medio de interacciones electrostáticas o fuerzas iónicas. De esta manera se entiende la afinidad existente por sustratos como los lípidos, polisacáridos, proteínas, todos de naturaleza polinuclear, aniónica y con grupos carboxílicos libres².

Incluso a la fecha se pueden encontrar en la literatura reportes de la aplicación del rojo de rutenio como colorante para la visualización del DNA⁶ en su separación electroforética, lo cual es considerablemente menos riesgoso que los indicadores de electroforesis de DNA que actualmente se emplean como el bromuro de etidio⁷⁻¹¹, un carcinógeno sumamente poderoso y las radiaciones ultravioleta.

El estudio de la reactividad del RR frente a polisacáridos se ha llevado a cabo con la intención de detectar cambios en los espectros de absorción electrónicos. Sin embargo, se ha determinado que el espectro de absorción del RR no presenta variación significativa, apenas es perceptible un desplazamiento de las bandas de aproximadamente 2-5 nm. Sin embargo, es posible detectar cambios más evidentes en los espectros diferenciales de tales complejos. Mientras que en unos casos es posible percibir alteraciones en los coeficientes de extinción en otros es posible la detección del desplazamiento a una longitud de onda menos energética, que involucra cambios de hasta 30 nm, sin modificación aparente de los coeficientes de extinción⁴.

Se ha detectado evidencia más significativa mediante la técnica de dicroísmo circular, pues se ha observado la generación de efecto dicroico extrínseco en presencia de ciertos polisacáridos iónicos en el RR que la molécula *per se* no presenta. Éste es atribuido a la perturbación asimétrica de los estados electrónicos después de la coordinación con matrices quirales, es decir el esqueleto del polisacárido⁴. Este estudio sugiere entonces que además de la carga un factor determinante para que se genere la coordinación es la estereoquímica de la molécula a interaccionar con el RR.

Otra rama que relaciona al RR y sus propiedades tintoriales se encuentra en la determinación fina de estructuras celulares como es el caso de la cápsula en microorganismos patógenos, pues es esta estructura la responsable de la patogenicidad y resistencia del microorganismo¹²⁻¹⁶, por lo cual es importante determinar la composición y forma de invasión del microorganismo mediante su estudio.

Así, es ahora una línea de investigación importante la determinación de la forma de interacción que se origina entre el patógeno y la célula hospedera como en el caso del estudio de la interfase entre las bacterias del género *Streptococcus*, algunos de los cuales son patógenos de hombre, y las células epiteliales, el cual ha podido ser visto mediante la tinción con RR.

En función de la química selectiva que el RR presenta por ciertos polianiones, se ha empleado para la determinación de la composición química de paredes celulares, así como para la distinción cualitativa de la distribución de los grupos carboxílicos en pectinas, aprovechando de esta forma la característica del RR de unirse a grupos carboxílicos libres de pectinas con diferentes grados de esterificación¹⁷.

También se ha empleado el RR en el estudio de la actividad de isoenzimas de las pectinesterasas en geles de poliacrilamida, aprovechando la interacción diferencial de éste con los grupos carboxílicos de las pectinas¹⁸⁻²⁰.

El rojo de rutenio se ha empleado como método de detección del centro de digestión bacterial en la boca de varias especies bovinas, al ser capaz de unirse a las mucoproteínas secretadas por estas bacterias²¹. Como también en el estudio histoquímico de la capacidad de cicatrización en la extirpación y trasplante de córneas, nuevamente aprovechando la afinidad existente entre las mucoproteínas generadas durante la cicatrización y el RR.

Existen también métodos propuestos en la literatura para la medición de polisacáridos extracelulares en cultivos bacterianos, aprovechando las características de adsorción del rojo de rutenio²². Incluso se está trabajando arduamente en el estudio de los polisacáridos extracelulares del género *Mycoplasma*, los cuáles se cree toman parte activa en el curso del incremento de la inmunodeficiencia generada por el virus del sida al actuar como cofactor de la replicación del virus²³.

Así que en general, el rojo de rutenio ha resultado sumamente útil en la tinción, caracterización y análisis de la relación estructura-actividad de diversas estructuras celulares y compuestos poliméricos de origen biológico²⁴.



1.2.- Actividad del rojo de rutenio en los sistemas biológicos

A la par de su uso en el área de la histoquímica, el rojo de rutenio ha sido motivo de extenso estudio en vista de sus peculiares características de reactividad frente a diferentes sistemas biológicos.

Primordialmente representa una área de investigación fuerte, el estudio de la interacción entre el rojo de rutenio y las proteínas de unión a calcio, en sistemas como células musculares, células cardíacas, células neuronales, líneas celulares cancerígenas y en diferentes estructuras celulares tales como mitocondria, retículo sarcoplásmico, membranas plasmáticas, por mencionar algunas

En los procesos celulares el calcio (Ca^{2+}) actúa como segundo mensajero, de forma similar al AMPc. Un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica provoca numerosas respuestas celulares, incluyendo la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, la degradación de glucógeno; además, el calcio (Ca^{2+}) es un importante activador del metabolismo oxidativo. Todos estos procesos son regulados por proteínas que emplean calcio como cofactor y sobre ellas el RR tiene un efecto característico. Antes de describir los efectos que tiene el RR en los procesos biológicos revisaremos las propiedades características y generales de estas proteínas de unión a calcio.

1.2.1.- Tipos de interacción del calcio con las proteínas²⁵

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.

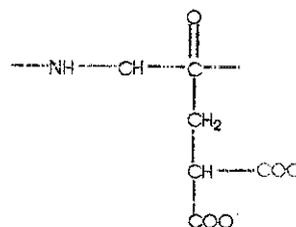
El segundo tipo de unión involucra la participación de aminoácidos localizados a posiciones distantes entre sí en la cadena proteica y depende en gran medida de la fuerza

del enlace para dar lugar a una cavidad inmóvil para el calcio. Un ejemplo de este tipo de estructura se encuentra en la fosfolipasa A₂. 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 enlaza rápidamente al calcio, generando un ajuste considerable de la estructura terciaria de la proteína.

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 gamma-carboxiglutamato, por ejemplo, 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. El grupo γ -carboxiglutamato (ESQUEMA 1.1) parece ser un excelente sitio de unión del calcio²⁶.



γ -Carboxiglutamato

ESQUEMA 1.1 Fórmula estructural del γ -carboxiglutamato presente en proteínas Gla

A la fecha se ha aislado un gran número de proteínas, las cuales necesitan interactuar con el calcio para llevar a cabo sus funciones, de fuentes tanto intracelulares como extracelulares²⁷⁻³³. 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 intervalo de procesos que involucran el transporte membranal, secreción y acciones enzimáticas. Algunas de las proteínas de este tipo más importantes se enlistan en la siguiente tabla:

TABLA 1.1. Algunas proteínas relacionadas con el calcio

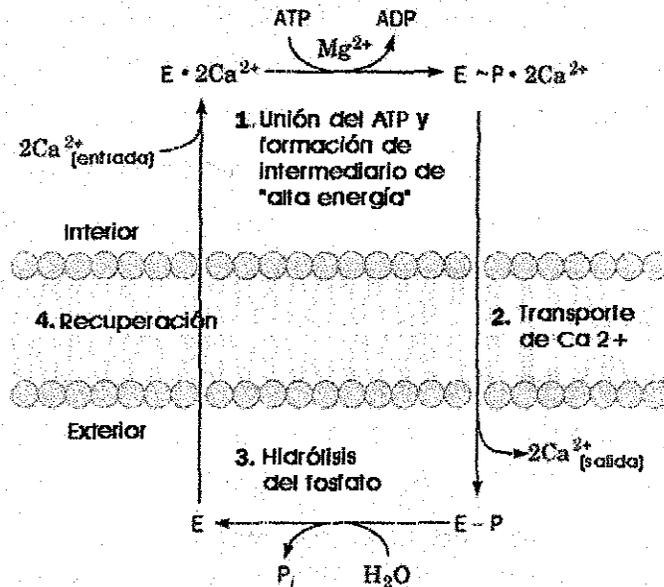
Proteína	Función
Protrombina	Disparador extracelular
Calmodulina	Disparador intracelular de enzimas y bombas
Troponina C	Disparador de sistemas de contracción
Miocina	Disparador de algunas células musculares
S100	Disparador de células nerviosas
Calcineurina	Fosfoproteínofatasas
CaBP intestinal	Transporte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

1.2.2.- Inhibición en la unión calcio-calmodulina

Una de las interacciones rojo de rutenio-proteínas de unión al calcio más estudiadas es la que se presenta en calmodulina

En espacios extracelulares, la $[Ca^{2+}]$ (aprox 1500 μM) es cuatro órdenes de magnitud superior a las concentraciones en el citosol (aprox 0.1 μM). 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 ATP⁴⁷⁻⁴⁸ (ESQUEMA 1.2). Sus mecanismos de reacción, determinados partir de estudios 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.



ESQUEMA 1.2. 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. *BIOCHEMISTRY*. 1990 USA.

La calmodulina, CaM, es una proteína de unión al calcio ubicua, que juega un papel fundamental en la regulación de muchos procesos calcio-dependientes²⁶.

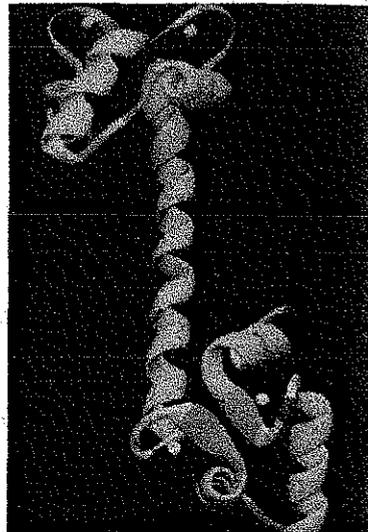
Para que una célula se mantenga en su estado fisiológico característico, debe regular las actividades de sus bombas iónicas con precisión. La regulación de la bomba de Ca^{2+} en la membrana plasmática se controla por el nivel de Ca^{2+} , mediado por calmodulina (CaM). Esta proteína eucariótica ubicua, 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, altamente 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 Bugg²⁶, 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 (ESQUEMA 1.3). 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



cadena 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 residuos 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 diana²⁶.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESQUEMA 1.3. Estructura de rayos X de la calmodulina de testículos de rata. Esta proteína monomérica de 148 aminoácidos contiene dos dominios globulares notablemente similares separados por una hélice α con 7 vueltas. Los dos sitios de fijación de calcio iónico en cada dominio se representan con esferas blancas. Voet, D. *BIOCHEMISTRY*. 1990. USA.

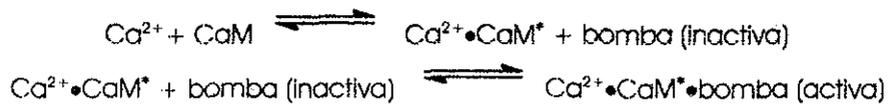
A pesar de la apariencia extendida de CaM, en su estructura de rayos-X, varios estudios recientes indican que sus dominios globulares pueden unirse simultáneamente a una única hélice diana. Evidentemente, la hélice α central de CaM sirve más como una atadura flexible que como un espaciador rígido, propiedad 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 μM . 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 μM , 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 al existente en cualquier tinaco o fosa de almacenamiento de agua que se activa automáticamente mediante una boya cuando el agua alcanza un nivel determinado.

Este esquema fue originalmente propuesto para la enzima nucleótido-fosfodiesterasa dependiente de calcio, (Ca^{2+} -PDE)³⁴, pero se considera el mecanismo general de activación de este tipo de enzimas dependientes de calcio activadas por la calmodulina, tales como la cinasa involucrada en el metabolismo de la miosina^{24, 35}.

El primer paso consiste en la unión del calcio a la calmodulina. Esta unión induce un cambio conformacional en CaM lo cual favorece la interacción de ésta con la apoenzima inactiva de la enzima dependiente de calcio, para dar origen al complejo de holoenzima, catalíticamente activo.

Una forma útil de identificación de los procesos dependientes de CaM consiste en emplear compuestos que se unen a ésta inhibiendo su función. Mediante el empleo de antagonistas para la CaM, tales como fenotiazinas y naftalenosulfonamidas, fue posible determinar su participación en procesos como la función plaquetaria³⁶, proliferación celular³⁷, contracción vascular³⁸ y la degranulación de neutrófilos³⁹.

Estos antagonistas de CaM se unen a CaM de manera dependiente de calcio^{38, 40} e inhiben la formación del complejo holoenzimático catalíticamente activo⁴¹. Se ha demostrado que estos antagonistas fortalecen la unión de calcio y CaM⁴²⁻⁴⁴.

Realizando los estudios pertinentes con el rojo de rutenio como antagonista, se demostró⁴⁵ que éste es capaz de inhibir de manera competitiva, respecto al calcio, a la

nucleótido fosfodiesterasa cíclica dependiente de calcio. Estos resultados sugieren que el RR puede tener un mecanismo inhibitorio diferente al presentado por la mayoría de los antagonistas de CaM reportados a la fecha.

El valor I_{50} del RR frente a la miosinacinasas, dependiente de CaM, es de $18.5 \mu\text{M}^{46}$ y los estudios demostraron que el RR inhibe la formación de la holoenzima de la calmodulina, es decir inhibe la unión Calcio-CaM.

El estudio cinético de la unión calcio-calmodulina y la influencia del RR demostró que este complejo de valencia mixta inhibe predominantemente la unión de las dos moles de calcio que se unen tardíamente a la proteína, sobre las primeras moles de calcio que se unen a CaM. Cada uno de los dos dominios amino y carboxilo terminal de CaM contiene dos sitios de unión para calcio, y la unión a cada dominio de dos moléculas de calcio procede de manera independiente. Se sabe que los sitios en el dominio carboxilo terminal tienen una mayor afinidad por el calcio que aquellos localizados en el dominio amino terminal. De tal forma que el calcio se une primeramente al dominio carboxilo terminal y después al amino terminal. Por lo tanto el RR inhibe predominantemente la unión al sitio amino terminal que la unión al sitio carboxilo terminal⁴⁶. Sin embargo también es claro que el calcio y el rojo de rutenio no comparten el sitio de unión en la calmodulina, pero contrariamente a lo esperado ambos sitios ejercen una influencia en la afinidad entre sí. De esta forma puede decirse que el RR puede ser capaz de formar un complejo CaM enzimáticamente inactivo mediante la alteración del sitio de unión de Calcio en la calmodulina necesario para la activación de ésta.

Dada la capacidad para entrar a las células intactas⁴⁹⁻⁵², el RR se utilizó para mejorar la producción de energía por mitocondria en miocardio de cerdo⁵³ y de esta forma inhibir la contracción activada por calcio del músculo liso⁴⁶. Una clara relación de este efecto puede describirse en la inhibición de la contracción del músculo liso. El RR inhibe la contracción del músculo activada por calcio, de manera dependiente de la concentración, por lo cual puede decirse que el efecto vasodilatador del RR es resultado de la competencia con el calcio.

También se observó que RR retarda la muerte de hepatocitos de rata inducida por la administración de *ter*-butilhidroperóxido⁵⁴.

Además, el RR bloquea el transporte de calcio en otros sistemas incluyendo los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico^{55,56}, los canales de calcio dependientes de voltaje células de leucemia sensibles a los complejos *cis*-platino y en las



resistentes a tales complejos⁵⁷. También es capaz de bloquear los mecanismos de almacenamiento y captación de calcio en el retículo sarcoplásmico⁵⁸. Otra función del RR es la de interferir en la regulación de los niveles de calcio en osteoblastos pero de manera positiva, es decir incrementando los niveles de Ca^{2+} citosólico cuando se pone en contacto con el RR extracelularmente⁵⁹.

1.2.3.- Inhibición del transporte de calcio mitocondrial

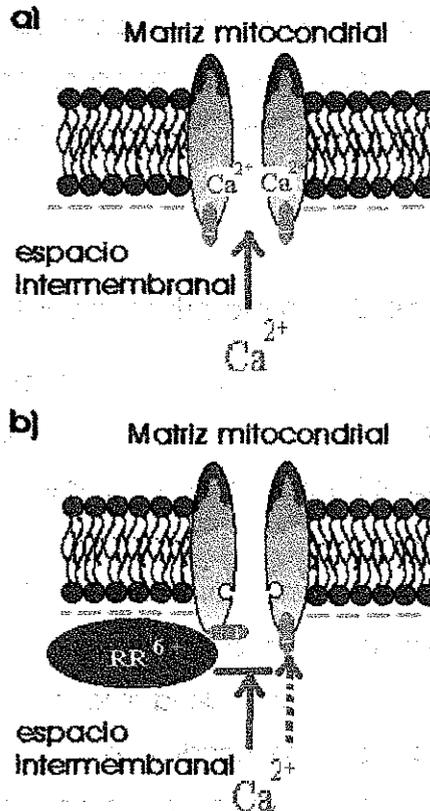
Indudablemente, la mayor aplicación del RR se ha centrado en el estudio de los mecanismos de regulación de las concentraciones de calcio en el interior de las mitocondrias, especialmente durante los procesos oxígeno-dependientes.

Vasington y sus colaboradores⁶⁰ demostraron que el RR en concentraciones que van entre 5-50 μM ejerce algún efecto en casi todas las interacciones del Ca^{2+} con la mitocondria: el proceso de transporte al interior de la mitocondria acoplado a la producción de energía, el transporte al interior de la mitocondria del Ca^{2+} mediado por el gradiente de K^+ , desactivación de los sitios de baja afinidad por calcio localizados en membrana y la desactivación de las proteínas transportadoras de calcio.

A concentraciones 10-50 nM de RR /mg de mitocondria es capaz de inhibir el transporte de calcio y la respiración mitocondrial, suponiéndose que ello es debido a la interacción del rojo de rutenio con los sitios de alta y baja afinidad al calcio en la proteína transportadora. Sin embargo, estudios más detallados han demostrado que el rojo de rutenio interactúa solamente con los sitios de baja afinidad por el calcio localizados en la proteína transportadora.

Una propuesta del mecanismo de transporte de calcio al interior de las mitocondrias y la explicación del mecanismo de inhibición de dicho transporte que genera el RR fue planteado y fundamentado por Zazueta y colaboradores⁶¹.

La explicación detallada se concentra en dicho trabajo. Aquí sólo incluiremos una descripción esquemática de dichos eventos:



ESQUEMA 1.4. Representación de la proteína transportadora de calcio embebida en la membrana mitocondrial interna. En a) se representa el mecanismo de acción de la proteína según la evidencia experimental, mientras que en b) se esquematiza el mecanismo de acción del RR, explicado detalladamente en la referencia 61 Zazueta *et al.* 1999

1.2.4.- Actividad del RR sobre la secreción neuronal

El RR incrementa la frecuencia de liberación espontánea de neurotransmisores, específicamente el neurotransmisor conocido con el nombre de quanta, en la unión neuromuscular. Este efecto se atribuye a la liberación de calcio de los sitios de almacenamiento que son las mitocondrias de las terminales sinápticas.

El Ca^{2+} intracelular libre juega un papel central en la regulación de las señales neuronales. La importancia del calcio en las funciones neuronales se detecta en los diferentes procesos neuronales mediante la medición de las concentraciones de este ion. Se ha detectado que la acción concertada de varios procesos genera el incremento de las $[Ca^{2+}]$, tal como la actividad de los canales de calcio dependientes del voltaje, la activación o desactivación de los receptores de glutamato⁶²⁻⁶⁴ en la membrana neuronal, de los receptores IP3 y de los receptores de rianodina⁶⁵⁻⁶⁷.

Así se han registrado tales cambios. Sin embargo, a la fecha muy poco se ha hecho por describir un mecanismo que explique cómo las neuronas manejan las concentraciones de calcio. Hasta ahora se conoce que el sistema homeostático de calcio en la neurona está compuesto por proteínas de unión a calcio, el retículo endoplásmico y mitocondria además de algunas moléculas de extrusión de plasma y los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la Ca^{2+} -ATPasa.

Se ha propuesto que el RR actúa mediante interacción aniónica con un sitio en el exterior de la membrana presináptica. De tal forma, se cuenta con evidencia importante ya que entonces es posible decir que el RR puede ser una herramienta de extraordinario valor para probar el mecanismo de modulación de la secreción de las neuronas⁶⁸.

Por otro lado se sabe que RR es capaz de penetrar en las fibras nerviosas del sistema periférico e inducir neurotoxicidad^{69,70}. Concentraciones en el intervalo entre 2.5-10 μM reducen el potencial sináptico a niveles subumbrales⁷¹.

La administración intracraneana de RR induce ataques epilépticos, mientras que la administración intraperitoneal produce parálisis flácida. Estos efectos pueden deberse muy probablemente al bloqueo de las interacciones con el calcio en la membrana presináptica, evitando por tanto la liberación natural del neurotransmisor⁷².

También en esta área el RR se ha empleado para el estudio *in vitro* de los cambios de permeabilidad mitocondrial generados por la actividad cerebral misma en células del sistema nervioso^{73,74}. También se emplea el rojo de rutenio como inductor de la maquinaria de liberación de neurotransmisores en la región del hipocampo, en un esfuerzo por entender los mecanismos bioquímicos involucrados⁷⁵.

1.2.5.- RR y su efecto anticancerígeno

Ciertos compuestos *cis*-platino han mostrado gran poder anticancerígeno en algunos tipos de cáncer. Debido a que las propiedades químicas de los complejos aminados de rutenio comparten algunas características con tales complejos de platino, constituyen una promesa en el campo de los agentes antitumorales y por lo tanto el rojo de rutenio no ha sido excluido de estudios en esta área.

Un estudio conducente en este sentido en complejos de rutenio fue el desarrollado por Kelman⁷⁶. En este trabajo se investigó el efecto de los complejos de rutenio sobre la síntesis de DNA y proteínas en células hepáticas de conejo en cultivo celular. Los resultados mostraron que una gran cantidad de complejos de rutenio eran capaces de inhibir la síntesis de DNA. Los trabajos realizados por Yasbin, Miel y Mathews, acerca de la actividad



mutagénica del rutenio, mostraron que muchos complejos de rutenio son marcadamente efectivos en la inducción del mecanismo de reparación del DNA⁷⁷. Se cree que el efecto de inhibición del crecimiento del tumor se debe a la habilidad que el RR tiene de inhibir el metabolismo del calcio. Este campo se encuentra en desarrollo.

1.2.6.- Otros efectos en la actividad biológica por RR

En micelas enriquecidas con la proteína membranar, porina XVIII humana, se ha podido establecer la capacidad del rojo de rutenio de disminuir la dependencia con el voltaje de este tipo de proteínas, lo cual es relevante para los estudios en procesos de estimulación de exocitosis en diferentes tipos celulares⁷⁸.

Otra evidencia importante sobre la actividad inhibitoria del rojo de rutenio se encuentra en el estudio de la inhibición de la actividad de la ATPasa dependiente de Mg y no de calcio presente en las células musculares, en donde se demostró que el colorante se une de manera selectiva a la cadena pesada de la miosina, generando un tipo de inhibición competitivo respecto a la actina y de tipo no competitivo frente al ATP, lo cual sugiere que el RR interactúa directamente con el sitio de unión de la actina F en la cadena pesada de la miosina⁷⁹.

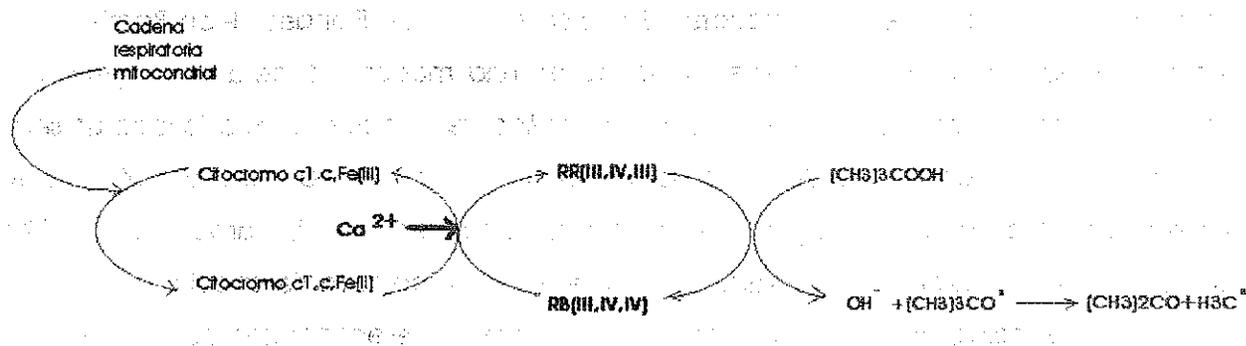
Además, existe evidencia de que el rojo de rutenio es capaz de generar fusiones entre membranas, tal como fue observado en el trabajo de Howell quien informó la fusión de membranas del retículo sarcoplásmico mediante interacciones electrostáticas con el rojo de rutenio⁸⁰. Se postula que este efecto es el responsable de la aglutinación celular inducida por el RR⁸¹.

Se ha determinado que el RR también es responsable de inhibir el transporte activo de calcio mediado por potasio⁸².

Finalmente otra área en la cual se ha empleado el RR es en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Ya que el proceso apoptótico involucra en muchas de sus actividades bioquímicas al calcio como desencadenante de diversos procesos, el RR por su actividad inhibitoria de los sistema reguladores de calcio se emplea como inhibidor de apoptosis. De los experimentos a la fecha registrados en la literatura se sabe que el RR es capaz de inducir la disminución del potencial transmembranar de las mitocondrias en células en el proceso apoptótico temprano⁸³. La muerte celular programada es un proceso fisiológico definido comúnmente por alteraciones en la morfología nuclear y /o degradación progresiva del DNA cromosomal previos a la lisis celular.

Es importante mencionar que sólo en pocos casos se ha aprovechado la capacidad óxido-reductora del RR para explicar el origen de las alteraciones en los procesos, y en la mayoría de los casos se hace mención únicamente a sus propiedades de carga, tamaño y conformación. En este sentido, la investigación se encuentra en pleno proceso de desarrollo y a la larga será mucho más frecuente el estudio de las propiedades redox del RR frente a los diferentes sistemas biológicos. Existen ya datos del poder reductor del RR sobre el *ter*-butilhidroperóxido, de tal forma que se le considera como un agente reductor tipo Fenton y es posible que lo ahora dicho sobre el RR en cuanto a las funciones en sistemas biológicos tenga que ser corregido, sobre todo en los sistemas dependientes de calcio y con formación de peróxidos, por ejemplo en los procesos mitocondriales^{84,85}.

En mitocondria se ha determinado que el RR interviene activamente en la formación de radicales metilo en el sistema constituido de *ter*-butil hidroperóxido en mitocondria y el mecanismo propuesto se presenta en el ESQUEMA 1.4, a continuación⁸⁴:



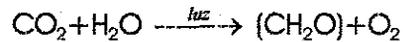
ESQUEMA 1.5. Mecanismo propuesto para la generación de los radicales metilo por el sistema *ter*-butilhidroperóxido/mitocondria inducido por el RR. Meinicke et al 1996⁸⁴

1.2.7.- RR en los sistemas vegetales²⁶

Como antes se ha mencionado, el RR posee propiedades óxido-reductoras que lo colocan como un material interesante para el estudio de las transferencias electrónicas en los sistemas biológicos. Uno de estos procesos es la fotosíntesis.

1.2.7.1.- La fotosíntesis y su localización

La vida en la tierra depende del sol. Las plantas y las cianobacterias captan químicamente la energía luminosa a través de la fotosíntesis, un proceso impulsado por la luz en el que se fija CO₂ para obtener carbohidratos (CH₂O).



Este proceso en el que tanto el CO_2 como el H_2O se reducen para formar carbohidratos y el O_2 , es esencialmente el inverso del metabolismo de oxidación de los carbohidratos.

Los carbohidratos formados en la fotosíntesis son, por lo tanto, una fuente de energía para el organismo que los produjo, así como para los organismos no fotosintéticos que directa o indirectamente consumen organismos fotosintéticos. De hecho, incluso la industria moderna depende en gran manera de productos de la fotosíntesis, ya que el carbón, el petróleo y el gas (los llamados combustibles fósiles) son los restos de antiguos organismos. Se estima que la fotosíntesis fija anualmente aproximadamente 10^{11} toneladas de carbono, lo que representa el almacenamiento de unos 10^{18} KJ de energía. Por otra parte, a lo largo de millones de años, la fotosíntesis ha producido el O_2 de la atmósfera terrestre.

La noción de que las plantas se nutrían de cosas tan insustanciales como la luz y el aire tardó casi dos siglos en comprobarse. En 1684 el físico de Flandes, Jean Baptiste von Helmont, escribió que, al hacer crecer un sauce en una maceta, la pérdida de peso del suelo en que había echado raíces el árbol era insignificante. Aunque todavía faltaba un siglo para que se enunciase la ley de la conservación de la materia, von Helmont atribuyó el aumento de peso del árbol al agua que había absorbido. Esta idea fue ampliada en 1727 por Stephen Hales al proponer que las plantas obtienen parte de su material del aire.

El primer indicio de que las plantas producen oxígeno fue encontrado por el sacerdote y pionero de la química, el inglés Joseph Priestley, quien escribió:

"Al ver que las velas arden muy bien en el aire en que las plantas han crecido durante mucho tiempo, y al tener alguna razón para pensar que había algo relacionado con la vegetación, que renovaba el aire viciado por la respiración, pensé que era posible que el mismo proceso pudiera renovar también el aire viciado por las velas ardiendo. Por consiguiente, el 17 de agosto de 1771 puse una ramita de menta en una cierta cantidad de aire en que había ardido una vela hasta apagarse, y vi que el 27 del mismo mes otra vela ardía perfectamente en él".

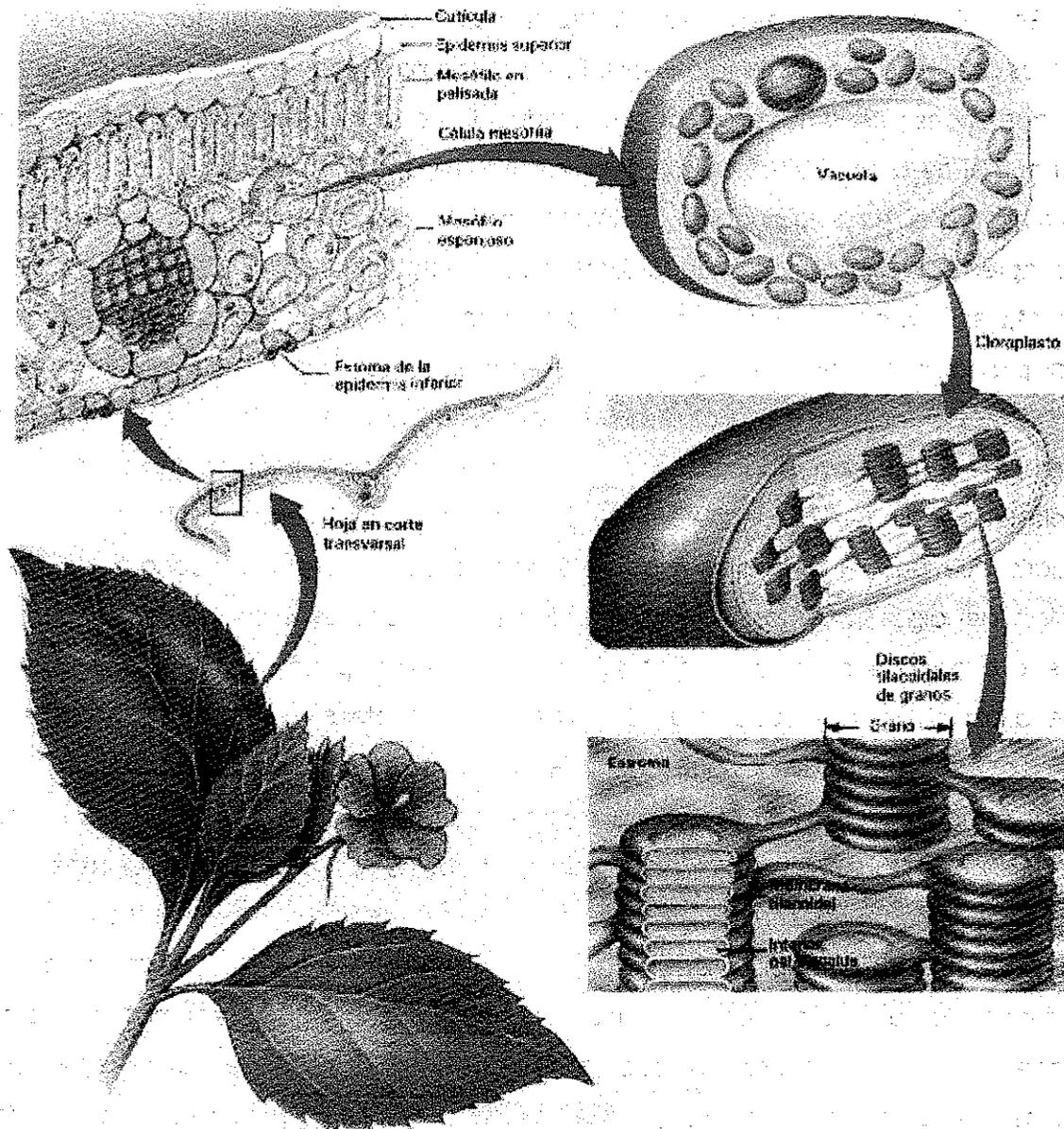
Aunque más adelante Priestley descubrió el oxígeno al que denominó "aire libre de flogisto", fue Antoine Lavoisier, quien dilucidó su papel en la combustión y en la respiración. Sin embargo, el trabajo de Priestley inspiró al físico holandés Jan Ingen-Housz, quien en 1779 demostró que el poder "purificador" de las plantas reside en la influencia de la luz solar en sus partes verdes.



En 1782 el religioso suizo Jean Senebier mostró que el CO_2 , al que denominó "aire fijado", es asimilado durante la fotosíntesis. Su compatriota Theodore de Saussure encontró en 1804 que el peso de la materia orgánica producida por las plantas y el oxígeno liberado es mayor que el peso del CO_2 consumido. Por lo tanto, llegó a la conclusión de que el agua, la única sustancia que había añadido al sistema, también era necesaria para la fotosíntesis. El último ingrediente en la receta de la fotosíntesis lo estableció en 1842 el fisiólogo alemán Robert Mayer, uno de los formuladores de la primera ley de la termodinámica, quien dedujo que las plantas convierten la energía luminosa en energía química.

En los organismos eucariotas (algas y plantas superiores), la fotosíntesis se localiza en los cloroplastos, que son organelos subcelulares membranosos. El primer indicio de que los cloroplastos actúan de esta manera fue una observación de Theodore Englemann, en 1882. Descubrió que pequeñas bacterias con capacidad para moverse se congregaban en la superficie del alga *Spirogyra*, en busca de oxígeno, situándose sobre su único cloroplasto, pero sólo cuando el cloroplasto estaba iluminado. Los cloroplastos deben ser pues el lugar donde la luz induce la producción de O_2 , es decir, la fotosíntesis.

Los cloroplastos, de los que se encuentran entre 1 y 100 por célula, poseen tamaños y formas bastante diferentes, pero normalmente son unos elipsoides de unos 5 μm de longitud (ESQUEMA 1.6). Al igual que las mitocondrias, a las que se parecen en muchos aspectos, los cloroplastos tienen una membrana externa muy permeable y una membrana interna prácticamente impermeable, separadas por un estrecho espacio intermembranal. La membrana interna incluye al estroma, una disolución concentrada de enzimas, que también contiene DNA, RNA y ribosomas que participan en la síntesis de varias proteínas del cloroplasto --muy similar a la matriz mitocondrial-. El estroma, a su vez, rodea un tercer compartimiento membranoso, el tilacoide (del griego: *thylakos*, saco o bolsa). El tilacoide es, probablemente, una única vesícula muy plegada, a pesar de que en muchos organismos parece formado por grupos apilados de sacos en forma de discos, llamados grana, interconectados por lamelas del estroma no apiladas. Normalmente, un cloroplasto contiene de 10 a 100 granas. Las membranas tilacoidales se forman a partir de invaginaciones de la membrana interior de los cloroplastos en formación y, por eso, se asemejan a las crestas mitocondriales (ESQUEMA 1.7).

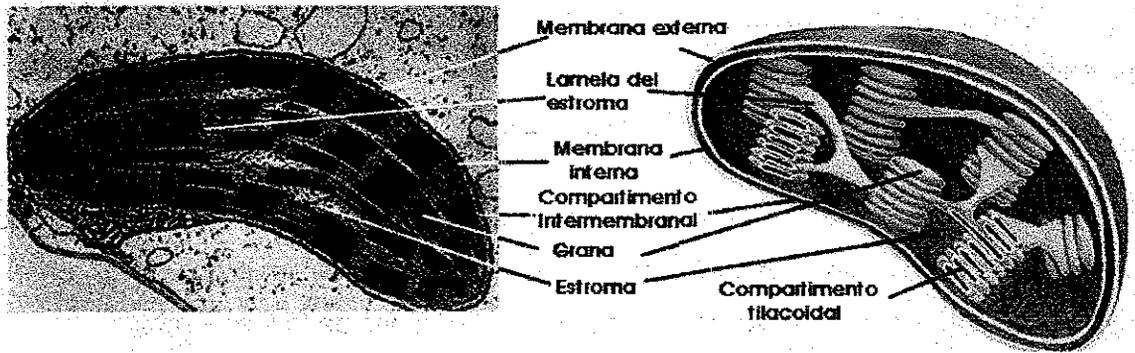


ESQUEMA 1.6. Diagrama esquemático de las estructuras principales en células vegetales y cloroplasto

Los lípidos de la membrana tilacoidal poseen una composición característica. Están formados por sólo 10% de fosfolípidos; la mayoría, aproximadamente 80%, son mono y digalactosil diacilgliceroles sin carga, y el restante 10% son los sulfolípidos sulfoquinovosil diacilgliceroles.

Las cadenas de acilo de estos lípidos poseen un elevado grado de insaturación, lo que confiere una elevada fluidez a la membrana tilacoidal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESQUEMA 1.7. Micrografía electrónica y diagrama esquemático de un cloroplasto de maíz
Voet, D BIOCHEMISTRY. 1990

La fotosíntesis se produce en dos fases:

1. Las reacciones de la fase luminosa, que utilizan la energía luminosa para generar NADPH y ATP.
2. Las reacciones de la fase oscura, en realidad reacciones independientes de la luz, que utilizan NADPH y ATP para impulsar la síntesis de carbohidratos, a partir de CO_2 y H_2O .

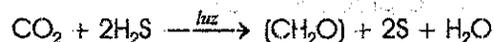
Las reacciones de la fase luminosa se localizan en la membrana tilacoidal e incluyen procesos similares al transporte electrónico y la fosforilación oxidativa mitocondriales.

En los procariontes fotosintéticos que carecen de cloroplastos, las reacciones de la fase luminosa tienen lugar en la membrana plasmática (interna) o en estructuras altamente invaginadas derivadas de ella, llamadas cromatóforos. En los eucariotas las reacciones de la fase oscura tienen lugar en el estroma, a través de un ciclo de reacciones enzimáticas.

1.2.7.2.- Reacciones de la fase luminosa

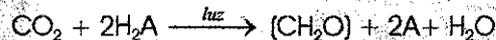
Se incluye esta descripción de la fase luminosa dado que es la única que tiene relación con los objetivos de este trabajo de tesis. Por tanto, la fase oscura no se incluye.

Durante las primeras décadas de este siglo se postuló que la luz, al ser absorbida por los pigmentos fotosintéticos, reducía directamente al CO_2 que, a su vez, se combinaba con el agua para formar los carbohidratos. Desde este punto de vista, el O_2 formado por la fotosíntesis proviene del CO_2 . Sin embargo, en 1931, Cornelis van Niel mostró que bacterias fotosintéticas verdes anaerobias, que usan H_2S durante la fotosíntesis forman azufre:

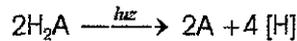




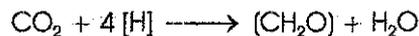
El parecido, a nivel químico, entre el H₂S y el H₂O llevó a van Niel a proponer que la reacción general de la fotosíntesis es



Donde H₂A es H₂O, en las plantas verdes y en cianobacterias, y H₂S, en sulfobacterias fotosintéticas. Ello sugiere que la fotosíntesis es un proceso que tiene dos pasos, en el que se aprovecha la energía luminosa para oxidar H₂A (reacciones de la fase luminosa):

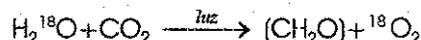


Y que, después, el agente reductor resultante [H] reduce el CO₂ (reacciones de la fase oscura):



Así, en la fotosíntesis aerobia, es el H₂O, y no el CO₂, el que se fotoliza (se rompe por acción de la luz).

La validez de la hipótesis de van Niel se demostró, sin dejar lugar a dudas, con dos experimentos. En 1937 Robert Hill descubrió que, al iluminar cloroplastos que carecen de CO₂ en presencia de un aceptor de electrones artificial, el ferricianuro [Fe(CN)₆]³⁻, se produce O₂ con la reducción concomitante del aceptor (a ferrocianuro, [Fe(CN)₆]⁴⁻, en este caso). Esta reacción, llamada reacción de Hill, demuestra que el CO₂ no participa directamente en la reacción de producción de O₂. También descubrió, más tarde, que el aceptor natural es el NADP⁺, que en su forma reducida, NADPH, se usa en las reacciones de la fase oscura para reducir el CO₂ a carbohidrato. En 1941, cuando se pudo disponer del isótopo ¹⁸O, Samuel Ruben y Martín Kamen demostraron que la fuente del O₂, que se forma en la fotosíntesis es el H₂O:



El principal fotorreceptor de la fotosíntesis es la clorofila. La luz absorbida por las clorofilas antena y los pigmentos accesorios se transfiere a los centros de reacción fotosintéticos. Las clorofilas excitadas pasan sus electrones a través de una serie de aceptores que convierten la energía electrónica en energía química.

Las plantas y cianobacterias utilizan el poder reductor generado por la oxidación del agua, impulsada por la luz para producir NADPH

Dentro de esta fase luminosa, ocurren cuatro sucesos importantes (ESQUEMA 1.8):

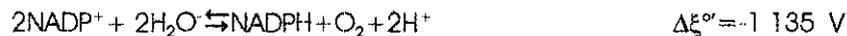


- A) Excitación fotoquímica de la clorofila. La energía luminosa altera o excita ciertos electrones de la molécula de clorofila y éstos son transferidos a moléculasceptoras de electrones. Gracias a esto, las moléculas de clorofila se oxidan.
- B) Fotooxidación del H₂O (fotólisis). La molécula de agua se rompe y libera O₂, electrones y protones (H⁺).
- C) Fotoreducción del NADP. Éste capta los electrones desprendidos de la clorofila y los protones provenientes del agua, para formar NADPH (el cual es utilizado en la etapa independiente de la luz).
- D) Fotofosforilación del ADP. Formación del ATP a partir del ADP + P + Energía Liberada en el salto de electrones de la oxidación de las moléculas de clorofila.

Las semireacciones que componen este proceso, junto con sus potenciales estándar de reducción son:



De ahí que, la reacción global de cuatro electrones y su potencial estándar redox es:



En la absorción de luz participan dos procesos. Ello se puede explicar por un modelo mecanístico, el esquema Z (ESQUEMA 1.9), que postula que la fotosíntesis que produce O₂ ocurre mediante las acciones de dos centros de reacción fotosintéticos que están conectados en serie:

1. El fotosistema I (PSI)⁸⁶, genera un reductor fuerte capaz de reducir NADP⁺ y, al mismo tiempo, un oxidante débil. El fotosistema I capta la luz, cuya longitud de onda sea menor o igual a 700 nm. Actúan moléculas de clorofila A que absorben hasta un máximo de 700 nm y se llaman P700.
2. El fotosistema II (PSII)⁸⁷, genera un oxidante fuerte capaz de oxidar el H₂O y, al mismo tiempo un reductor débil. El fotosistema II reacciona con moléculas de clorofila B que absorben en un máximo de 680 nm y son llamados P680.

El reductor débil reduce al oxidante débil, de modo que PSI y PSII forman un activador energético de electrones en dos fases. Así ambos fotosistemas actúan para que la fotosíntesis (transferencia de electrones del H₂O al NADPH) ocurra.

La luz es recibida en el PSII por la clorofila P680 que se oxida al liberar un electrón que asciende a un nivel superior de energía; ese electrón es recogido por una sustancia aceptora de electrones que se reduce, la plastoquinona (PQ) y desde ésta va pasando a lo largo de

una cadena transportadora de electrones, entre los que están varios citocromos (cyt b/f) y así llega hasta la plastocianina (PC) que se los cederá a moléculas de clorofila del PSI

En el descenso por esta cadena, con oxidación y reducción en cada paso, el electrón va liberando la energía que tenía en exceso; energía que se utiliza para bombear protones de hidrógeno desde el estroma hasta el interior de los tilacoides, generando un gradiente electroquímico de protones. Estos protones vuelven al estroma a través de la ATPasa y se originan moléculas de ATP.

El fotosistema II se reduce al recibir electrones procedentes de una molécula de H_2O , que también por acción de la luz, se descompone en hidrógeno y oxígeno, en el proceso llamado fotólisis del H_2O . De este modo, se puede mantener un flujo continuo de electrones desde el agua hacia el fotosistema II y de éste al fotosistema I.

En el fotosistema I la luz produce el mismo efecto sobre la clorofila P700, de modo que algún electrón adquiere un nivel energético superior y abandona la molécula, es recogido por otro aceptor de electrones, la ferredoxina, y pasa por una nueva cadena de transporte hasta llegar a una molécula de $NADP^+$ que es reducida a NADPH, al recibir dos electrones y un protón H^+ que también procede de la descomposición del H_2O .

Los dos fotosistemas actúan conjuntamente, proceso conocido como esquema en Z (ESQUEMA 1.9), para producir la fotofosforilación (obtención de ATP) o hacerlo solamente el fotosistema I; se diferencia entonces entre fosforilación no-cíclica o acíclica cuando actúan los dos, y fotofosforilación cíclica, cuando actúa el fotosistema I únicamente. En la fotofosforilación acíclica se obtiene ATP y se reduce el $NADP^+$ a NADPH, mientras que en la fotofosforilación cíclica únicamente se obtiene ATP y no se libera oxígeno.

Mientras la luz incide en los fotosistemas, se mantiene un flujo de electrones desde el agua al fotosistema II, de éste al fotosistema I, hasta llegar el $NADP^+$ que los recoge; esta pequeña corriente eléctrica es la que mantiene el ciclo de la vida.

Los componentes que participan en el transporte de electrones desde H_2O al NADPH están organizados en su mayor parte, en tres partículas unidas a la membrana de los tilacoides: PSII, el complejo citocromo b_6 -citocromo f y PSI. Los electrones se transfieren entre estos complejos a través de transportadores móviles de electrones. La plastoquinona (Q), con

su reducción a plastoquinol (QH_2), enlaza PSII con el complejo del citocromo b_6-f que a su vez interacciona con el PSI a través de la proteína móvil plastocianina (PC).

Retomando la idea de la descripción de los componentes de la reacción luminosa de la fotosíntesis, el primer eslabón del proceso lo constituye el fotosistema II, el cual involucra la oxidación de dos moléculas de agua para formar una molécula de O_2 , proceso que requiere de cuatro electrones. Cada molécula de O_2 es producida por un único fotosistema que sufre la transformación a cinco estadios redox diferentes. Las cinco etapas de la reacción liberan en total cuatro protones de dos moléculas de agua en el espacio interno del tilacoide de una forma gradual. Las evidencias indican que el PSI posee cuatro iones manganeso unidos a proteína. Por lo visto estos iones Mn forman un complejo con actividad catalítica, el complejo productor de oxígeno (OEC), que une dos moléculas de agua facilitando la formación de O_2 . El OEC sigue un ciclo a través de una serie de estados de oxidación (los estados S, en los cuales participan probablemente diferentes combinaciones de Mn(III), Mn(IV) y Mn(V)), al tiempo que captura protones y electrones de las moléculas de agua y finalmente libera O_2 en el espacio interno del tilacoide. El Ca^{2+} y el Cl⁻ son cofactores esenciales en la producción de O_2 ; su ausencia bloquea la oxidación de H_2O , si bien no son necesarios para la reducción del Mn.

El siguiente eslabón en la cadena de transporte electrónico de PSII es una sustancia conocida como Z, que pasa los electrones desde el complejo Mn-proteína que escinde al agua al centro de reacción de PSII. La especie que absorbe los fotones en el centro de reacción de PSII se llama P680, de acuerdo con la longitud de onda de su máximo de absorción. El $P680^+$, formado por la excitación de la luz, y que se encuentra entre uno de los más potentes oxidantes biológicos que se conocen, extrae electrones del H_2O por mediación de Z y de los estados S de OEC. La cadena de transportadores electrónicos que se encuentra del lado reductor de P680 está constituida por una molécula de feofitina a (Pheo a; Chl a con el Mg^{2+} sustituido por dos protones), a la cual $P680^+$ transfiere un electrón, probablemente a través de una molécula de clorofila a (Chl a), y después a un complejo plastoquinona-Fe(II), designado Q_A . Seguidamente, se transfieren dos electrones, de uno en uno, a una segunda molécula de plastoquinona, Q_B , que captura dos protones en la superficie estromal de la membrana del tilacoide. A continuación, el plastoquinil resultante, Q_BH_2 , intercambia con el grupo de moléculas de plastoquinona unidas a membrana. La

DCMU, así como muchos otros herbicidas usados habitualmente, compite con la plastoquinona por el sitio de fijación de Q_b en PSII, explicándose por qué inhiben la fotosíntesis.

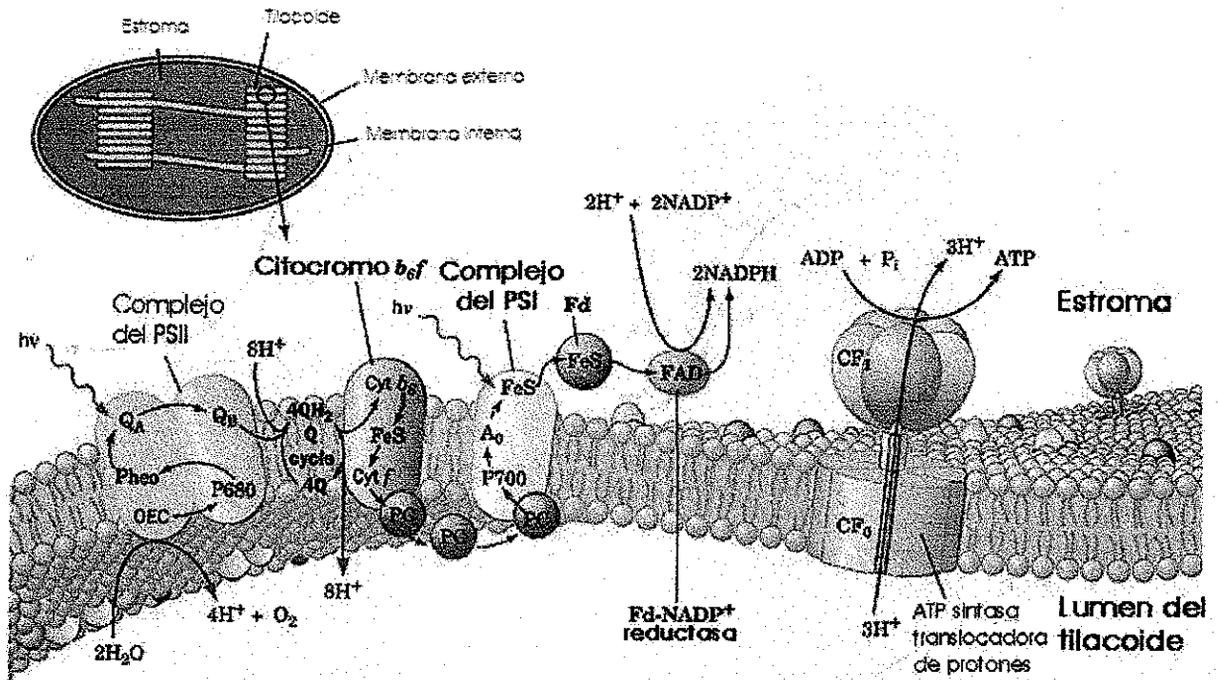
Desde el grupo de las plastoquinonas, los electrones pasan a través del complejo del citocromo b_6-f . Este complejo proteico está compuesto por un citocromo f , un citocromo b_6 con dos grupos hemo, una proteína de hierro-azufre [$2Fe-2S$] y un plastoquinol unido. El complejo de citocromo b_6 -citocromo f transporta tanto protones como electrones desde el exterior hacia el interior de la membrana tilacoidal. A la fecha se desconoce el mecanismo exacto aunque existen varias teorías al respecto. No obstante, es claro que el transporte electrónico a través del complejo de citocromo b_6 -citocromo f genera buena parte del gradiente electroquímico de protones que impulsa la síntesis de ATP.

La transferencia de electrones entre el complejo del citocromo b_6-f y PSI está mediado por la plastocianina, una proteína periférica de membrana localizada en la superficie luminal del tilacoide. El centro redox que contiene Cu, de este monómero móvil de 10.5 kD sigue un ciclo entre los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II).

El PSI, el fotosistema de potencial de reducción menor del cloroplasto, es muy diferente de PSII. El centro de absorción de fotones del PSI, P700, consta probablemente de un dímero de moléculas de clorofila a . La fotooxidación de P700 da lugar a $P700^+$, un oxidante débil que seguidamente acepta directamente un electrón de la plastocianina. En el lado reductor de P700, el análisis de cambios del EPR, inducidos por la luz, indica que el electrón pasa a través de una cadena de transportadores de electrones con un potencial de reducción creciente. El primero de estos transportadores, designado A_0 , parece que es un monómero de Chl a , mientras que el segundo transportador, A_1 , es probablemente la filoquinona (vitamina K1).

Por último, el electrón pasa a través de tres ferredoxinas unidas a membrana, las ferredoxinas X, A y B, las cuales contienen agrupaciones de [$4Fe-4S$].

Cloroplasto



ESQUEMA 1.8. Representación esquemática de la membrana tilacoide y los componentes del transporte electrónico en la fase luminosa de la fotosíntesis. Voet, D. *BIOCHEMISTRY*. 1990.

Los electrones que salen del PSI pueden seguir una de estas dos rutas alternativas:

1.- La mayor parte de los electrones siguen una ruta no cíclica, pasando a una ferredoxina soluble de 11 kD, Fd, que contiene [2Fe-2S] y que está localizada en el estroma. La Fd reducida, a su vez, reduce el NADP^+ , en una reacción mediada por la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de 37 kD, y que contiene FAD como cofactor, rindiendo el producto final de la reacción luminosa del cloroplasto, el NADPH.

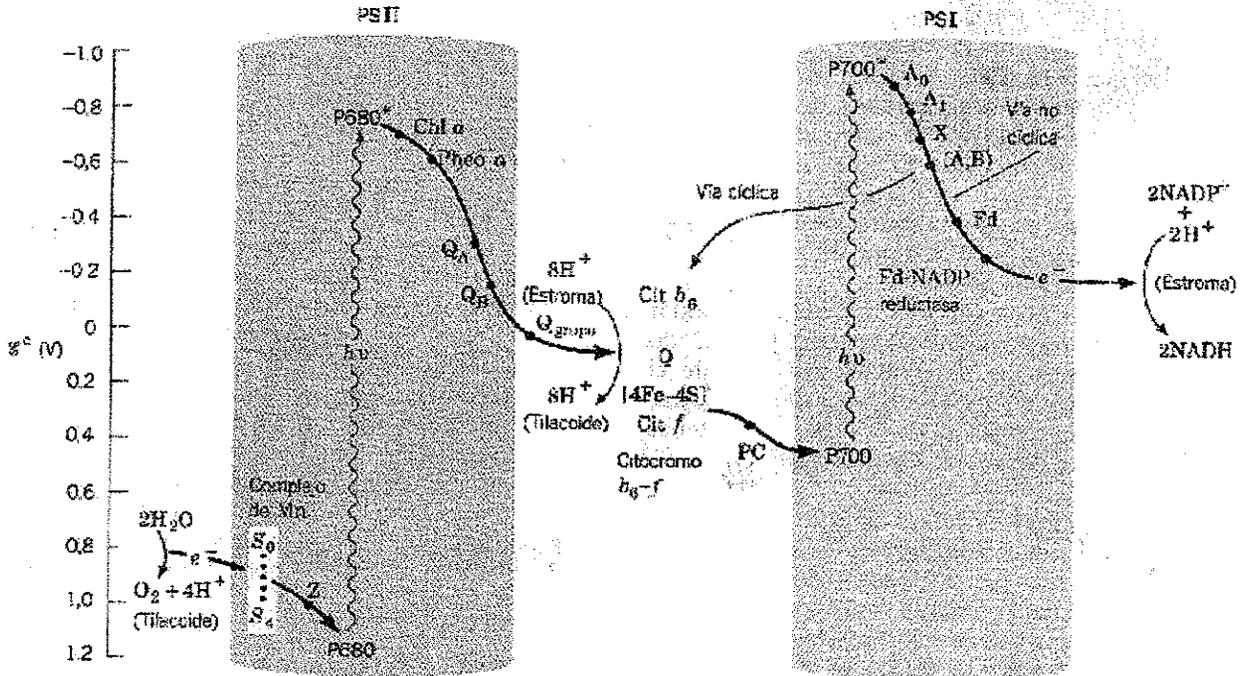
2.- Algunos electrones vuelven desde PSI, a través del citocromo b_6-f , al grupo de las plastoquinonas, recorriendo de ese modo una ruta cíclica que transloca protones a través de la membrana tilacoide. Ello explica la observación de que los cloroplastos absorben más de ocho fotones por cada molécula de O_2 producida. La ruta cíclica es independiente de la acción de PSII y, por tanto, no resulta en la producción de O_2 .

Probablemente, el flujo cíclico de electrones tiene la función de incrementar la cantidad de ATP producido en relación a la de NADPH y, de esta forma, permite que la célula regule las cantidades relativas de estas dos sustancias de acuerdo con sus necesidades. No

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



obstante se desconoce el mecanismo que reparte los electrones en las rutas cíclica y no cíclica.



ESQUEMA 1.9. Diagrama detallado del esquema Z de la fotosíntesis. Voet, D. *BIOCHEMISTRY*. 1990

1.2.7.3.- Hallazgos en reactividad de RR frente a la fase luminosa

Es importante recordar que el RR es capaz de alterar el metabolismo del calcio e independientemente del sistema en estudio esa es una de las primeras observaciones a realizar.

El calcio en las plantas también posee un papel clave en muchas de las funciones fisiológicas. Por ejemplo, es un segundo mensajero y por lo tanto es especialmente importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y en las rutas de transducción de señales^{88, 89}. Por lo tanto, las $[Ca^{2+}]$ citoplásmicas deben estar estrictamente reguladas. La captura o secuestro de Ca^{2+} dentro de compartimentos membranales está bien documentada en el retículo endoplásmico y en las vacuolas⁸⁸. En estos compartimentos submembranales se han encontrado dos mecanismos de transporte y regulación: Uno es la bomba Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPasa, que es parcialmente regulada por la calmodulina, como ocurre en muchas de las membranas plasmáticas de animales. Y el segundo mecanismo, de transporte de calcio, se genera mediante una proteína que transporta activamente calcio y protones mediante un

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

mecanismo antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Este transporte en las plantas está regulado por hormonas, por la gravedad y la luz, por lo cual es bastante sofisticado y se encuentra en estudio.

Se ha encontrado, que el cloroplasto también puede ser utilizado por la célula vegetal como un reservorio de $[\text{Ca}^{2+}]^{88-90}$. Existen imprecisiones en los experimentos debido a causas técnicas. La determinación de las concentraciones en los compartimentos subcelulares resulta muy compleja, especialmente porque las variaciones son del orden de μM^{91}

Además se ha propuesto que el cloroplasto puede jugar un papel importante en el mantenimiento de bajas concentraciones de calcio ya que el Ca^{2+} libre en el estroma regula muchas enzimas clave involucradas en la asimilación fotosintética del CO_2 , entre las que podemos mencionar a la fructosa 1,6-bisfosfatasa y a la sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa⁹², además de la NAD^+ cinasa⁹⁰

El Ca^{2+} es también esencial para la generación de O_2 por el PSII⁹³. Se sabe recientemente que el complejo OEC retiene un Ca^{2+} por PSII el cual es indispensable para la actividad de producción de O_2 . La producción de O_2 es inhibida a bajas concentraciones de calcio y se induce nuevamente, restituyendo niveles de Ca^{2+} ⁹⁴⁻⁹⁶.

Por lo cual, la consideración de que los cloroplastos tienen función de reservorio no es del todo real. En este organelo, el mecanismo principal de transporte es el antiporte $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+91}$ y ⁹⁷, por lo cual existe una interacción entre el transporte electrónico fotosintético y este mecanismo de transporte y regulación. Así, la entrada de Ca^{2+} al cloroplasto debe estar regulada por su propio metabolismo más que por instrucciones externas⁹¹. Nuevamente ha resultado difícil monitorear con precisión las entradas y salidas de los iones sobre todo porque la composición iónica y el pH en el estroma es difícil de controlar en cloroplastos intactos.

En cuanto a las investigaciones realizadas con el RR en vegetales los resultados son los siguientes. El RR ha sido empleado como aceptor electrónico en PSI⁹⁸. Los estudios preliminares indican que el RR inhibe la producción de O_2 , debido a que actúa sobre alguna de las proteínas que conforman al PSII que cuenta con sitios de unión para el calcio. Se concluye en el trabajo de Lemieux et al⁹⁹, que el sitio de inhibición en el cual incide el RR se localiza antes o muy cerca del sitio de donación de DCP (p-difenilcarbazida), que está entre P680 y Q_B ⁹⁹

También se determinó que RR induce cambios substanciales en un polipéptido de 16 KD, al cual se le involucra directamente con el transporte de calcio en el cloroplasto¹⁰⁰. Además, se determinó que la adición de RR en fracciones membranales del PSII no genera la liberación de manganeso, como se observa comúnmente cuando se ve alterada la constitución y conformación del aparato fotosintético. Se demuestra con estas observaciones que el RR



interacciona con proteínas localizadas en el lado donador de PSII, específicamente con un polipéptido extrínseco de 16KD, generando grandes perturbaciones a la superficie que da al lumen del tilacoide, inhibiendo así el transporte de calcio e impidiendo su incorporación o acceso al complejo generador de oxígeno.

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

1.3.1.- Generalidades

El rojo de rutenio es un compuesto inorgánico sintético descrito por vez primera por Joly¹⁰¹ en 1892 y desde esa fecha se ha investigado ampliamente con el fin de conocer más de sus propiedades, estableciéndose como uno de los más famosos complejos de valencia mixta de rutenio

Como ya lo hemos mencionado en las secciones anteriores, el RR ha llamado la atención de los investigadores de diversos campos de la ciencia, tales como el químico, histológico, bioquímico, por mencionar algunos.

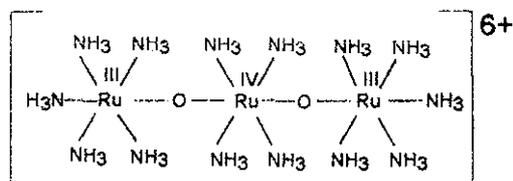
Su nombre, según las reglas de la IUPAC, es cloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III))tetraamminrutenio(IV), resultando mucho más fácil manejar el nombre rojo de rutenio (RR), como así lo llamaremos en este trabajo.

Joly¹⁰¹ determinó inicialmente la fórmula del RR como $Ru_2Cl_4(OH)_2 \cdot 7NH_3 \cdot 3H_2O$ y Morgan y Burstall¹⁰², quienes también lo prepararon, establecieron como fórmula del RR, $[Ru(OH)Cl(NH_3)_4]Cl \cdot H_2O$. Gleu y Breuel¹⁰³ mostraron discrepancias con la anterior formulación, pues la especie catiónica generada debía tener un momento magnético efectivo de 2 MB y ser además virtualmente incoloro, mientras que el RR es una especie diamagnética y además muestra una intensa coloración.

Fletcher y colaboradores¹⁰⁴ propusieron que el RR es un complejo iónico polinuclear constituido de 3 rutenios de valencia 3+ y 4+ unidos mediante puentes oxo y hexacoordinado con grupos amina, que además posee cloruros como contraiones. Fletcher y colaboradores se interesaron mucho en el RR 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 la estructura trimérica de ese compuesto no mostraba coordinados halógenos, y que al calentarlo se liberaba amoníaco, el cual fue cuantificado, encontrándose que, coordinados a los tres átomos de rutenio, se encontraban 14 átomos de nitrógeno. Con estos resultados, los autores establecieron la primera fórmula estructural del RR (ESQUEMA 1.10), en donde los átomos de rutenio se encontraban unidos mediante dos puentes oxo, satisfaciéndose así hexacoordinación de los átomos de rutenio.





ROJO DE RUTENIO

ESQUEMA 1.10 Fórmula estructural del rojo de rutenio

El coeficiente de extinción molar del RR determinado por estos investigadores fue de $21,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ con una banda de máxima absorción localizada a 532 nm . Otra evidencia para considerar a la estructura del RR como trimérica fue que su oxidación reversible en medio ácido a una especie café relacionada requería de 0.33 equivalentes de oxidante por átomo de rutenio¹⁰⁴, hecho que los llevó a proponer que el café de rutenio (CR), producto de la oxidación del RR, posee una estructura trinuclear similar.

J. M. Fletcher y colaboradores determinaron finalmente que la fórmula mínima del RR es $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]\text{Cl}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ con un peso molecular de 858.42 g/mol . También concluyeron que la valencia del complejo es $6+$, pues el número de oxidación promedio de cada uno de los tres átomos de rutenio es de $+10/3$; mientras que para el café de rutenio (CR), de estructura muy similar, el número promedio es de $11/3$, valencia confirmada por mediciones de conductividad y experimentos de cromatografía de intercambio iónico¹²⁴. 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 estudios preeliminares empleando Mössbauer¹⁰⁵, del RR, que la carga de los tres átomos de rutenio se encontraba totalmente localizada

1.3.2.- Síntesis del rojo de rutenio

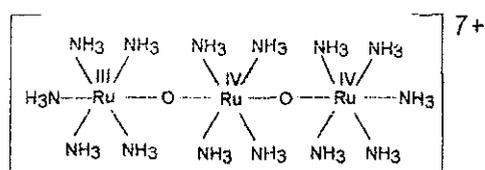
Además de realizar la caracterización química y una ruta de síntesis detallada del rojo de rutenio, Fletcher y colaboradores¹⁰⁴ dan una posible explicación del mecanismo de síntesis de este compuesto.

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 en presencia del oxígeno del aire, para formar el RR, el cual es posteriormente purificado mediante varias recristalizaciones.

Otra ruta de síntesis que se puede encontrar en la literatura, menciona la reacción de RuCl_3^{106} en etanol con ácido ascórbico a 85°C por tres horas, reducción del volumen y tratamiento con amoníaco por 1h a 90°C , que en presencia de oxígeno produce el RR

1.3.3.- Propiedades óxido-reductoras

Mucho se sabe ya sobre sus propiedades de óxido-reducción^{104 105 107 108 109 110 111}. Es conocido que el catión del RR es fácilmente oxidado a CR (ESQUEMA 1.11), el cual posee un número de oxidación promedio de cada átomo de rutenio de $+11/3$. Este CR es reducido reversiblemente al RR. De la anterior evidencia se propuso que el CR posee la misma fórmula estructural del RR, con la diferencia de que uno de los átomos de rutenio(III) en el RR cambia a un estado de oxidación de (IV) en el CR



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAFÉ DE RUTENIO
ESQUEMA 1.11. Fórmula estructural del café de rutenio

Las medidas de susceptibilidad magnética que Fletcher y colaboradores¹⁰⁴ realizaron, dieron los siguientes resultados: $\mu_{\text{ef}}=1.13$ MB por átomo de rutenio para el caso del CR, mientras que para el RR estos autores encontraron un μ_{ef} 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_{ef} 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 CR tiene respecto del RR.

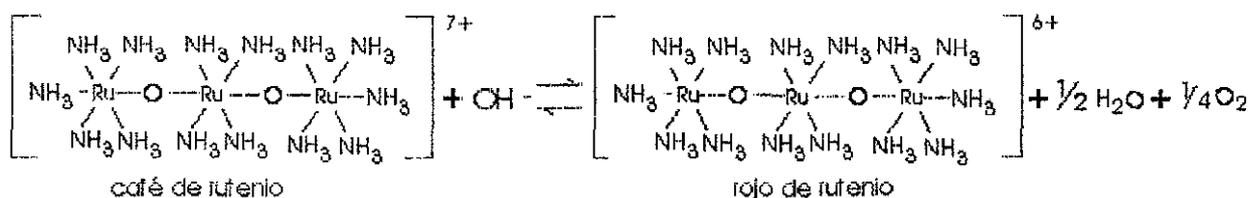
También estos autores determinaron que la oxidación por el oxígeno del aire del RR en solución de HCl 0.1N, después de 24 horas sólo era de 20%, por lo que dedujeron que es un proceso lento. Sin embargo, en solución 2N se oxida rápidamente.

Finalmente Fletcher y colaboradores¹⁰⁴ 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.

Lo anterior motivó una serie de experimentos ya que se observó que el ion OH^- era inusualmente fácil de oxidar en presencia del café de rutenio, incluso se dijo que esta inusual reactividad era producto de varias circunstancias favorecedoras. Primero que los grupos amino coordinados al átomo de rutenio tenían un carácter no ácido y una muy pobre labilidad, lo cual impedía la coordinación de los grupos hidroxilo al átomo de rutenio. Una segunda circunstancia favorecedora la constituía el hecho de que el rutenio es un metal que ha mostrado tendencia a formar especies con número de coordinación 7¹². También se estableció que la molécula de O_2 , al poseer orbitales de antienlace vacíos, era capaz de aceptar la densidad electrónica proveniente del OH^- . Incluso se consideró que la vecindad de los átomos de rutenio con el oxígeno favorecía la formación de un ligante dioxigenado e incrementar la estabilidad de las especies intermeditarias.

Estudios posteriores¹⁰⁷ realizados por Earley y Fealey describieron la evidencia experimental y del análisis de ésta se determinó que la reacción podía representarse de la siguiente manera:



ESQUEMA 1.12 Reacción de reducción del café de rutenio

Estos estudios sirvieron para confirmar que la reducción del CR al RR 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 (ligante dioxigenado) 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. Incluso se encontró que la oxidación del rojo al café no se veía modificada por la presencia de iones H^+ .

Mucha de la evidencia experimental apoya el hecho de que la reacción de reducción sigue un mecanismo especial, que involucra la formación de un intermediario muy similar al RR¹⁰⁵ (de un grupo μ -peroxo por un grupo μ -oxo) lo cual lo hace muy difícilmente detectable tanto en los bandas de máxima absorción como los picos de relativamente baja absorción del espectro UV-Vis. Para que esta reacción de reducción se lleve a cabo se supone el ataque nucleofílico del hidroxilo al átomo de rutenio central del CR. Este

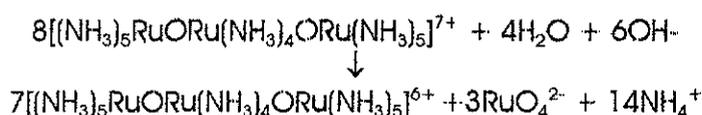
Intermediario puede ser un peróxido del rojo de rutenio o una especie con un átomo de rutenio heptacoordinado

En tal publicación se determinó que especies como el $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ o el $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ catalizaban la reducción del CR al RR.

En un estudio posterior realizado por Earley, Bignetti y Chalilpoyi¹⁰⁸ 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 e informando la evidencia de especies poliméricas y diméricas de rutenio como subproductos, regenerables a CR o RR. Se menciona también la suposición de la formación de una especie trimérica relacionada al RR y al CR cuyos tres rutenios tiene estado de oxidación de 4.

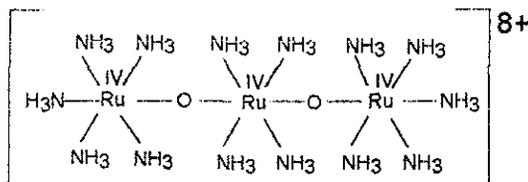
Los resultados experimentales llevaron a Bignetti y colaboradores a proponer que las posibles especies formadas durante la reducción del CR podrían ser RuO_4^{2-} o RuO_4 . Se proporciona incluso evidencia del espectro Infrarrojo de la formación de derivados oxidados del nitrógeno coordinado al metal, como son los derivados nitrosilados.

La propuesta establecida en ese momento está acorde a la siguiente estequiometría de la reacción de reducción,



Incluso mencionan que el mecanismo de reacción comprende el ataque del grupo hidroxilo al RR y la formación de intermediarios altamente relacionados al CR que involucra hidroxilamina coordinada, Intermediarios propuestos en sistemas relacionados¹¹³.

En el trabajo de Fletcher y colaboradores se menciona brevemente la existencia, en las muestras aún sin purificar (del rojo de rutenio sintetizado por ellos), de una pequeña impureza que presentaba un máximo de absorción en 725 nm, el cual actualmente se conoce como violeta de rutenio¹⁰⁴ dado que presenta una composición similar a la del RR con la diferencia de que el estado de oxidación de cada uno de los núcleos de rutenio es de (IV). Este compuesto tampoco ha podido ser caracterizado cristalográficamente, pero se sabe que la fórmula estructural puede ser como se muestra a continuación:

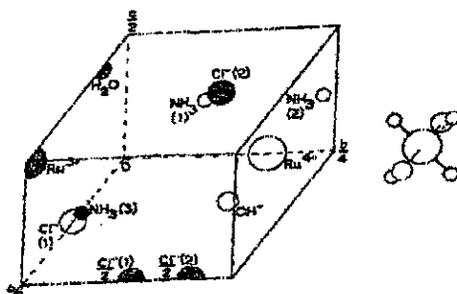


VIOLETA DE RUTENIO
ESQUEMA 1.13. Fórmula estructural del violeta de rutenio

1.3.4.- Estudios de difracción de rayos-X del rojo de rutenio y análogos

La primera estructura de rayos-X del rojo de rutenio fue publicada por Sterling¹¹⁴ en 1970, con serias discrepancias entre los resultados químicos experimentales y las conclusiones a las que este investigador llegó (ESQUEMA 1.14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESQUEMA 1.14. Estructura propuesta para el rojo de rutenio por Sterling. *Amer. J. Bot.* 57(2):172-175.1970

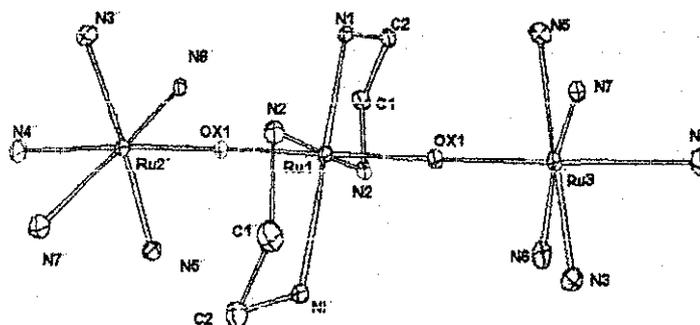
Posteriormente P. Smith y colaboradores determinaron la estructura de rayos-X de un análogo del rojo de rutenio¹¹⁵

En dicho trabajo establecen la estructura cristalina de un análogo del RR con etilendiamina coordinada, además de determinar todos los parámetros, confirmando de esta manera las aseveraciones hechas por Fletcher y colaboradores sobre la estructura lineal del RR.

Este derivado altamente relacionado al RR 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 celda unitaria contiene tres unidades triméricas. 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 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) Å 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 propuesta de dicho compuesto se presenta a continuación:



ESQUEMA 1.15 Estructura molecular del catión $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{etilendiamina})_2\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$
Smith, P. M., Fealey, T., Earley, J. E. y Silverton, J. V. *Inorganic Chemistry*, 10(9), 1971

La geometría de coordinación de cada uno de los átomos de rutenio en la estructura es octaédrica. Muestra además un pequeño desplazamiento de ejes entre el rutenio terminal y central de aproximadamente 44 grados. Se presenta la mayor distancia de enlace Ru-N con Ru-N(4), que puede atribuirse a un pequeño efecto *trans* ejercido por el oxígeno.

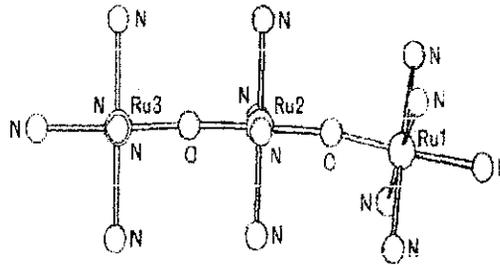
Años más tarde, en 1980, se reportó la estructura cristalina del cation RR y tiosulfato como contraion (ESQUEMA 1.16). En dicho trabajo desarrollado por C.T. Carrondo, W. P. Griffith, J. P. Hall y A. C. Skapski¹¹⁶ se concluyó por segunda vez la existencia del esqueleto lineal N-Ru-O-Ru-O-Ru-N formado a partir de tres átomos de rutenio hexacoordinados. Estos autores plantearon que el RR, con cloruro como contraion, no puede cristalizar debido al pequeño tamaño de los cloruros respecto al tamaño del catión y por esta razón ellos cambiaron el contraion favoreciendo la cristalización de tal compuesto. El hecho a resaltar es que experimentalmente la cristalización del RR y de los análogos, ya sea resultado de oxidación o producto de sustitución de ligantes, es un proceso bastante complicado que se ve influenciado por muchos factores.

En dicho trabajo se concluye que el RR con tiosulfato como contraion presenta una estructura cristalina monoclinica con dimensiones de la celda unitaria de $a=15.128(4)$, $b=16.588(2)$, $c=16.057(2)$ Å; $\beta=121.72(2)$ a 13 °C, y un grupo espacial $P2_1/c$. El compuesto presentó dimensiones de la celda variables, aparentemente reversibles por exposición a los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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 resultaron inservibles para los propósitos del análisis, con $R=0.095$.

La estructura, mostrada al final del párrafo en el ESQUEMA 1.16, presenta varios puntos en común con las anteriores determinaciones por rayos-X. Una estructura prácticamente lineal, aun cuando el giro de los enlaces Ru-N ecuatoriales se presenta sobre el átomo de rutenio terminal, prácticamente de la misma magnitud, 45 grados.



ESQUEMA 1.16. Estructura molecular del catión RR, $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ Carrondo C T., Griffith W P., Hall J P. & Skapski A.C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 627, 1980:332-334

1.3.5.- Espectroscopía Mössbauer¹¹⁷⁻¹¹⁸

Esta espectroscopía difiere del resto de las espectroscopías en varios sentidos. Las transiciones que se generan se efectúan en el núcleo y por tanto implica emisión y absorción de radiaciones gamma y los problemas asociados en el trabajo con radiación de ionización.

Básicamente, se trata de una absorción resonante de rayos γ , provenientes de núcleos excitados, con vidas medias del orden de 10^{-6} a 10^{-10} segundos. Las principales aplicaciones a la química se basan en la interacción hiperfina entre los niveles nucleares y los electrones extranucleares. Es decir, se obtiene información relacionada a la estructura electrónica, midiendo cambios en la estructura nuclear.

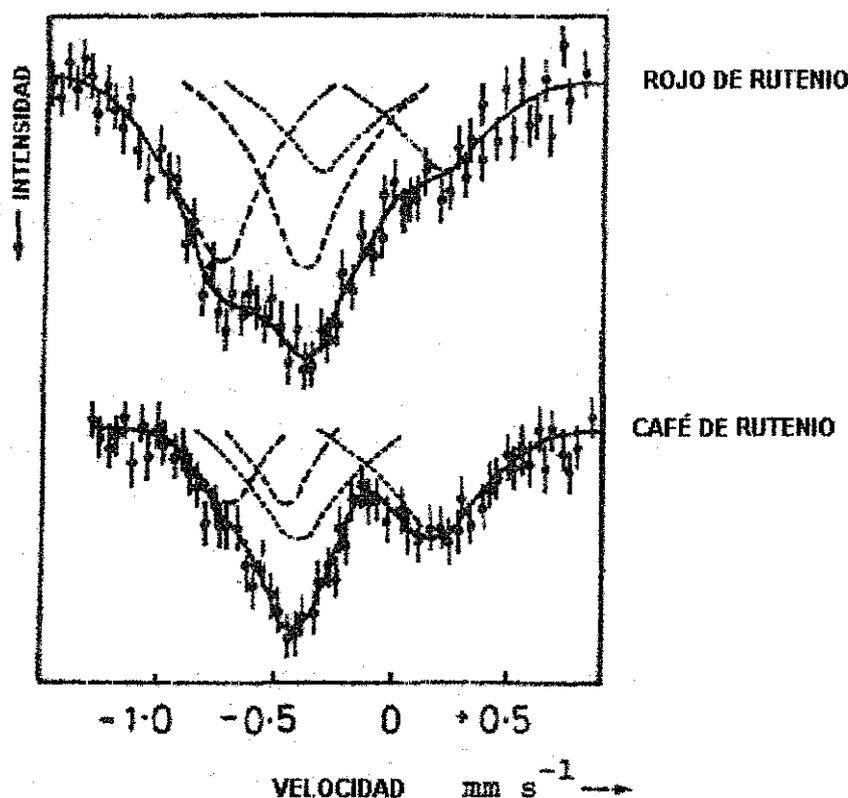
Tres son los parámetros que suelen medirse y que aportan información de tipo estructural: 1) el desplazamiento químico o isomérico, δ ; 2) el desdoblamiento cuadrupolar (ΔQ) y 3) los desdoblamientos magnéticos hiperfinos (ΔH). El desplazamiento químico depende del hecho de que los espaciados entre los niveles energéticos del núcleo dependen de su entorno químico (en realidad, sólo los electrones s tienen una densidad finita sobre el núcleo, y el valor de δ nos proporciona información acerca de ese valor o, eventualmente, acerca del efecto que los otros electrones del átomo tienen sobre la densidad de electrones s). Es decir, la magnitud δ contiene información en torno a la



estructura electrónica y el estado de oxidación del elemento así como sobre la capacidad deslocalizadora de los electrones de los ligantes.

Como el núcleo no es necesariamente esférico, posee un momento cuadrupolar Q , el que puede alinearse con respecto al gradiente de campo eléctrico. Tanto la asimetría en la distribución electrónica, como las distorsiones en la esfera de coordinación del núcleo, afectan a la magnitud de ΔQ , la que, por lo tanto, comprende también una importante cantidad de información estructural. Las interacciones magnéticas hiperfinas, se pueden detectar cuando los niveles nucleares son desdoblados por un campo magnético (efecto Zeeman nuclear).

El espectro Mössbauer del RR y del CR (ESQUEMA 1.17) muestra dos dobletes en las posiciones esperadas para Ru(III) y Ru(IV), con relación 2:1 y 1:2, respectivamente¹¹⁹ y se muestra a continuación:



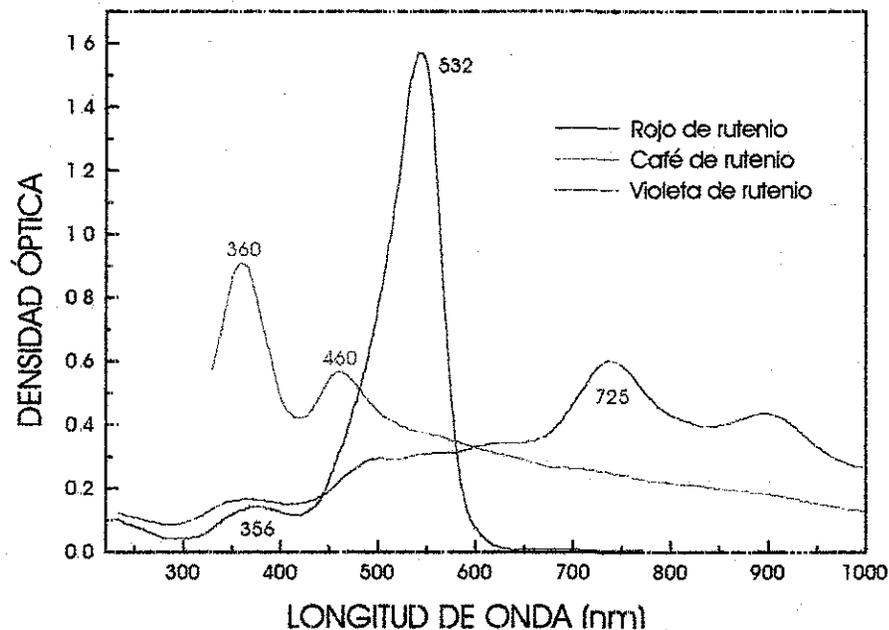
ESQUEMA 1.17. Espectros Mössbauer del RR y CR. Seddon, E. A. y Seddon, K. R. *The Chemistry of Ruthenium*. 1984. Elsevier Science Publishers. The Netherlands

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.6.- Espectroscopía electrónica

La solución acuosa del RR es roja intensa, perceptible a concentraciones incluso menores de 1 ppm. Las soluciones del CR y VR son un poco menos intensas. Los espectros UV-Vis se muestran a continuación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESQUEMA 1.18. Espectro electrónico del rojo de rutenio y sus análogos por oxidación^{104,119 2}

Los detalles de los espectros de estos compuestos se resumen en la TABLA 2:^{2 119}

TABLA 2. Bandas principales en CR y RR

$[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_6]^{6+}$	$[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_6]^{7+}$
532 nm ($\epsilon=21000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	460 nm ($\epsilon=23800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
356 nm ($\epsilon=6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	360 nm ($\epsilon=14100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

También existen datos del complejo de etilendiamina (en) sustituida en el RR, que se concentran en la TABLA 3:

TABLA 3. Bandas principales del espectro electrónico de un análogo por sustitución de ligante en RR

$[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{en})_2\text{ORu}(\text{NH}_3)_6]^{6+}$	$[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{en})_2\text{ORu}(\text{NH}_3)_6]^{7+}$
	1370 nm ($\epsilon=1700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
800 nm ($\epsilon=700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	900 nm ($\epsilon=1800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
538 nm ($\epsilon=81800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	467 nm ($\epsilon=46100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
380 nm ($\epsilon=6400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	369 nm ($\epsilon=14000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
240 nm ($\epsilon=3400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	250 nm ($\epsilon=2800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Solución básica	Solución ácida

Los espectros de los tres compuestos tienen diferencias importantes entre sí, lo cual ha permitido emplear esta técnica para su estudio e identificación. Ya que el RR y sus análogos

son intensamente coloridos la medición espectrofotométrica en la región visible y UV, arroja importantes datos sobre la estructura, pureza y reactividad química de estos compuestos.

De los datos anteriores es importante resaltar los altos coeficientes de extinción, atribuidos principalmente a su peculiar naturaleza polinuclear¹⁰⁴.

En la literatura² se informa que las soluciones acuosas del rojo de rutenio y sus análogos, son 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, al cual el rojo de rutenio y sus análogos se mantienen estables por largo tiempo. Sin embargo, nuestra experiencia nos indica que en agua a pH=6 son estables durante días (descomposición del 12% al cabo de 72 h), incrementándose la vida media si se mantienen las soluciones a bajas temperaturas (descomposición del 1% al cabo de 72 h a 5°C). Por el contrario, se sabe que soluciones más alcalinas a las de amoniaco provocan la descomposición del rojo de rutenio.

Se ha determinado² 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.

Fletcher y colaboradores¹⁰⁴, 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.

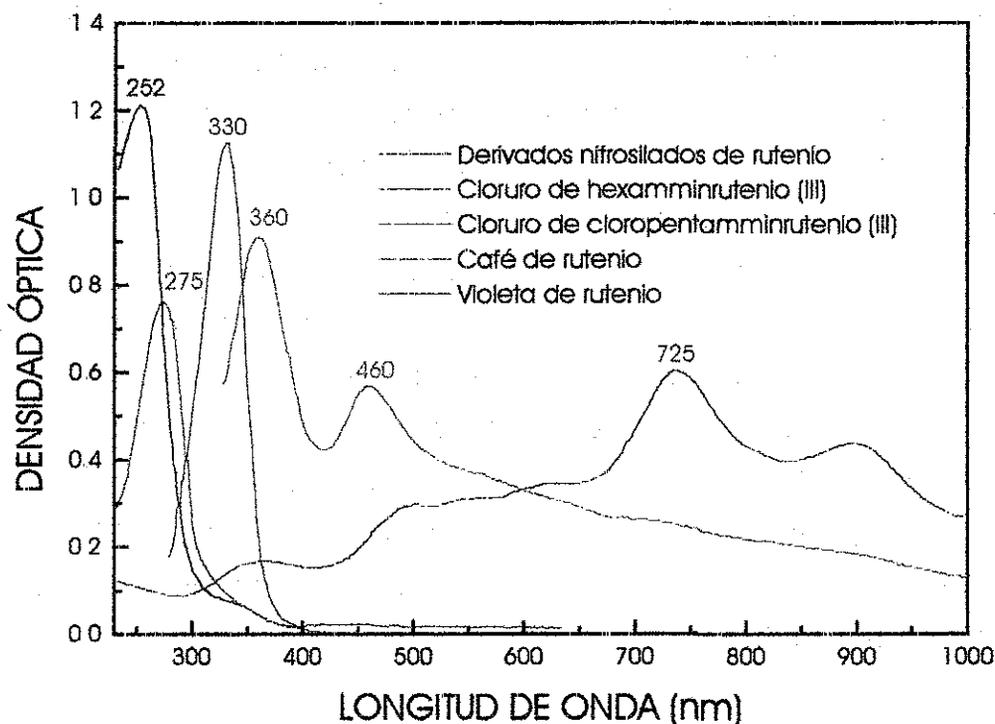
Luft² detectó una serie de impurezas y subproductos en las muestras comerciales de rojo de rutenio y realizó una completa caracterización, mediante espectroscopia de absorción electrónica, de éstas. Por ello líneas antes, le atribuimos a esta técnica, potencial capacidad de identificación de pureza.

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 | d) cloruro de nitrosirutenio(III) |
| b) cloruro de hexaamminrutenio(III) | e) violeta de rutenio |
| c) cloruro de cloropentaamminrutenio(III) | |

Los espectros electrónicos de las impurezas se presentan en el ESQUEMA 1.19:

TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN



ESQUEMA 1.19. Espectro electrónico de las principales impurezas presentes en muestras de rojo de rutenio comercial

1.3.7.- Cálculos moleculares

Se han calculado los orbitales moleculares para el RR y el CR que son similares a los orbitales moleculares de la especie dinuclear $[Ru_2OCl_{10}]^{4-}$. Las bandas más intensas del RR y CR, localizadas en 532 nm y 460 nm, son producto de la transición electrónica asignada como $n \rightarrow \pi^*$ ($e_u \rightarrow e_g$), que involucra a los orbitales moleculares metal-oxígeno deslocalizados^{109, 119, 120}

El esquema de orbitales moleculares original fue establecido para el CR por Jørgensen y Orgel¹²⁰ (ESQUEMA 1.20).

Para la determinación del esquema de orbitales moleculares se consideró que el CR y RR poseen simetría D_{4h} . Dada la estructura lineal del esqueleto completo, los átomos de oxígeno puentes tienen una hibridación sp. Los dos pares de electrones no compartidos de cada átomo de oxígeno ocupan un grupo de orbitales e.

En el grupo espacial D_{4h} , los cinco orbitales del átomo de rutenio central se degeneran en los orbitales a_{1g} (d_z^2), b_{1g} (d_{xy}), b_{2g} ($d_{x^2-y^2}$) y e_g (d_{xz} , d_{yz}). Por otra parte, los átomos de rutenio terminales tienen una simetría local C_{4v} , y por tanto los cinco orbitales d se desdoblan en los grupos a_1 (d_z^2), b_2 ($d_{x^2-y^2}$), b_1 (d_{xy}) y e (d_{xz} , d_{yz}).

El sistema de enlaces σ de la molécula, hace uso de los orbitales sp de ambos átomos de oxígeno, de los orbitales $d_{x^2-y^2}$ y d_z^2 de los dos átomos de rutenio terminal, de los orbitales d_z^2 y d_{xy} del átomo de rutenio central y obviamente de los orbitales σ de cada uno de los 14 átomos de nitrógeno y los orbitales s y p de los tres átomos de rutenio.

El traslape de los orbitales e del oxígeno y los orbitales $e(d_{xz}$ y $d_{xy})$ de los átomos de terminales da origen a dos orbitales a cada lado de la molécula, que son:

$$\begin{aligned}\epsilon' &= e(\text{Ru}) + e(\text{O}) \\ \epsilon &= e(\text{Ru}) - e(\text{O})\end{aligned}$$

en donde ϵ corresponde al orbital de enlace del enlace $\text{Ru}-\text{O}$ y ϵ' corresponde al orbital de antienlace.

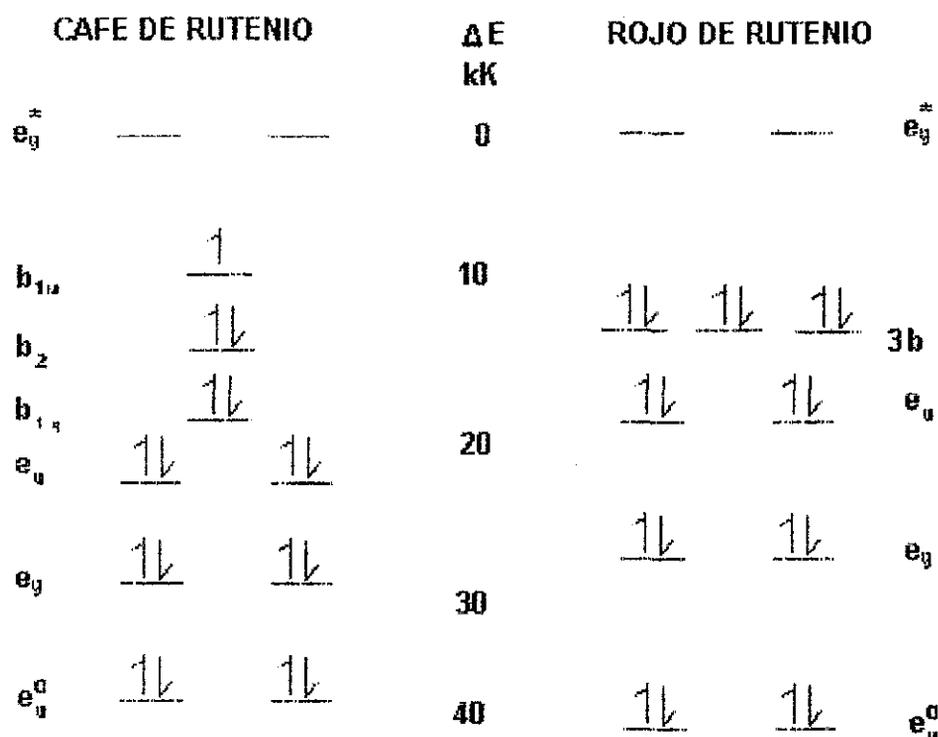
Los orbitales ϵ de cada extremo de la molécula pueden combinarse a través de los orbitales $e(d_{xz}$ y $d_{xy})$ del átomo de rutenio central o con los orbitales p de enlace σ del mismo átomo. Debido a que los orbitales ϵ del átomo de rutenio central son de tipo g con respecto al centro de inversión, solamente las combinaciones g entre estos orbitales son factibles. De tal forma las tres posibles combinaciones g son:

$$e_g^* = \epsilon' - e - \epsilon' \text{ (antienlace)}$$

$$e_g = \begin{cases} \epsilon' + e - \epsilon' \\ \epsilon + e - \epsilon \end{cases}$$

$$e_g = \epsilon - e - \epsilon \text{ (enlace)}$$

La formación de los orbitales moleculares u respecto del centro de inversión del catión requiere el uso del sistema de orbitales p del átomo de rutenio central; estos orbitales p se encuentran además involucrados en el sistema de enlace σ , $\text{Ru}(\text{central})-\text{N}$. De esta forma los orbitales ϵ pueden combinarse de manera similar para dar origen a los orbitales moleculares de enlace $e_u = \epsilon' + \epsilon'$ y $e_u^o = \epsilon + \epsilon$ (enlace). Los orbitales b_1 de los átomos de rutenio terminales se encuentran en el mismo plano de los orbitales σ del enlace $\text{Ru}(\text{central})-\text{N}$ (xy, z) y se combinan para formar los orbitales moleculares $b_{1g} = b_1 + b_1$ y $b_{1u} = b_1 - b_1$. El orbital b_2 del átomo de rutenio central, se encuentra a lo largo de los ejes xy y no hay traslape con el grupo de los orbitales b_1 , de tal forma que por sí mismo constituye un orbital molecular. El esquema generado tanto para el RR como el CR se presenta a continuación:



ESQUEMA 1.20. Esquema de orbitales moleculares para los cationes triméricos RR y CR. Los orbitales llenos se han omitido. La escala energética es consistente con los espectros.

La banda principal en la región visible del espectro de RR se asigna a la transición $e_g^* \leftarrow e_u$. El esquema explica también el carácter diamagnético del RR.

También Jørgensen y Orgen¹²⁰ fundamentan que la estabilidad del esqueleto mayoritariamente lineal se debe a enlaces de tipo π entre los orbitales t_{2g} de los átomos de rutenio y los orbitales π , de naturaleza 2p pertenecientes a los átomos de oxígeno.

1.3.8.- Espectroscopía vibracional

En cuanto al espectro infrarrojo del rojo de rutenio es importante notar que se observan claramente todas las bandas de vibración de los grupos aminos¹²¹, a decir, la de elongación asimétrica del enlace N-H, que se localiza a $3,230 \text{ cm}^{-1}$; la banda de deformación asimétrica del enlace N-H, en $1,620 \text{ cm}^{-1}$; la banda de deformación simétrica localizada aproximadamente a los $1,300 \text{ cm}^{-1}$; y finalmente la banda de deformación tipo "rocking" a los 800 cm^{-1} .

También mediante la espectroscopía de infrarrojo se establecieron las diferencias 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 simétrica y "rocking" de los grupos amino en el rojo de rutenio presentan sobretonos a bajas frecuencias las cuales sufren desplazamiento luego de deuteración¹⁰⁴, de $1,295$ a $1,056$ y de $1,276$ a 976 cm^{-1} ¹⁰⁴ no detectables en el CR con nitrato o sulfato como contraion. También es importante anotar las bandas características de vibración del enlace Ru-O, que se muestran en el RR a 805 cm^{-1} aproximadamente y en 820 cm^{-1} para el CR.

Se ha informado el estudio mediante espectroscopía Raman¹²² de la aparente utilidad que el RR 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 RR 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, ya que 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 Breuel¹⁰³ informaron que el rojo de rutenio es una molécula diamagnética. En cambio las pequeñas impurezas de derivados del rojo de rutenio nitrosilado^{123, 124}, que se encuentran en el RR comercial, generan el paramagnetismo observado en las muestras y que inicialmente se consideraba propio del RR.

Además, se determinó que esta molécula de RR 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 estudiado al RR como posible compuesto "sonda" en los estudios con resonancia magnética nuclear. Es decir, combinando las propiedades tintoriales del RR 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 espacio¹²⁵. De estos estudios finalmente se concluyó que era posible observar la preferencia de unión del RR a estructuras como polisacáridos y fosfolípidos, especialmente la fosfatidiletanolamina, la cardiolipina y el fosfatidilinositol. Así, el RR mostró ser particularmente útil como sonda de sitios de unión de poliaminas en los diferentes compartimentos celulares.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Objetivo General

Afinar la caracterización de los compuestos análogos al rojo de rutenio y aportar nueva evidencia respecto a la reactividad química y biológica de este tipo de compuestos

Objetivos Particulares

- 1) Purificar y caracterizar a los análogos café de rutenio y violeta de rutenio.
- 2) Purificar a los análogos del RR producto de la sustitución del ligante.
- 3) Obtener una estructura cristalina.
- 4) Sintetizar compuestos trinucleares de rutenio empleando una nueva metodología.
- 5) Caracterizar a los productos de esta síntesis.
- 6) Sintetizar y caracterizar compuestos mononucleares de rutenio trisustituidos con fenantrolina y bipyridina para emplearlos como herramienta de análisis de los trinucleares de rutenio.
- 7) Probar la actividad biológica de los compuestos sintetizados y purificados en cloroplastos de espinaca (*Spinacea oleracea*).
- 8) Establecer la relación estructura-actividad biológica

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Reactivos para la síntesis química

Para la síntesis de los análogos al RR, producto de la sustitución del ligante, se emplearon como materias primas los siguientes reactivos: rojo de rutenio (cloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III))tetraamminrutenio(IV)), 1,10-fenantrolina monohidratada, hexafluorofosfato de amonio y sulfato de calcio obtenidos de Aldrich Chem. Co. Un lote de fenantrolina se obtuvo también de Mallinckrodt. En lo que respecta a los disolventes el metanol anhidro grado reactivo (>99%), éter etílico (>97%) y el etanol anhidro grado reactivo (>99%) se obtuvieron de Merck o Aldrich Chem. Co.

Para la síntesis alterna de los análogos de RR a partir de mononucleares, los reactivos empleados fueron: complejos de rutenio sintetizados durante este trabajo de tesis, nitrato de plata (USP), ácido nítrico (>99.5%), solución de peróxido de hidrógeno al 30% (p/p) y perclorato de sodio (98-102%), todos ellos de Aldrich Chem. Co.

Para la síntesis de los análogos al RR, producto de oxidación, los reactivos empleados son: amoníaco (26% NH₃), cloruro de amonio y ácido nítrico (>99.5%) que se obtuvieron de Aldrich Chem. Co. 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. El éter etílico (>97%) se obtuvo de Merck o Aldrich Chem. Co.

Para la purificación cromatográfica del RR y análogos se emplearon RR, formiato de amonio (>98%), cloruro de amonio (>98%) y la resina intercambiadora aniónica DEAE-cellulose de Aldrich Chem. Co., análogos al RR sintetizados como parte de este trabajo de tesis y la resina intercambiadora catiónica CM-52-cellulose de Whatman.

Finalmente en la síntesis de los mononucleares disustituidos de rutenio se empleó cloruro de rutenio(III), 1,10-fenantrolina monohidratada, 2,2'-bipiridina (99+%), acuapentaclororutenato(II) de potasio y cloruro de litio, todos ellos de Aldrich Chem. Co. Se emplearon también dimetilformamida (99.8%), éter etílico (>97%) y acetona (>99.5%) de Merck.

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 del "University College London" de la Universidad de Londres, Inglaterra. También se empleó un microanalizador Fisons Instruments Modelo EA 1108 de la USAI, en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Espectroscopía infrarroja: Medio: Los espectros de infrarrojo de los compuestos, en pastillas de KBr, en el intervalo de $4,000-450\text{ cm}^{-1}$, se obtuvieron con el espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 599 B en la USAI en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. **Lejano:** Los espectros de infrarrojo de los compuestos en el intervalo de $650-45\text{ cm}^{-1}$, se obtuvieron en pastillas de KBr, con el espectrofotómetro Nicolet 740 FT-IR del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resonancia magnética nuclear: Los espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$, $\text{RMN-}^{13}\text{C}$, $\text{RMN-}^{19}\text{F}$ y $\text{RMN-}^{31}\text{P}$ 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. Para los espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ y $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ se empleó TMS como estándar de referencia interna. Para la $\text{RMN-}^{19}\text{F}$ se utilizó como referencia el ácido trifluoroacético. Finalmente en la $\text{RMN-}^{31}\text{P}$ se usó ácido fosfórico como estándar de referencia.

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.

Determinación de pesos moleculares mediante la técnica de cromatografía de permeación en gel: Este estudio fue realizado en el Instituto de Materiales de la UNAM, bajo la dirección del Ingeniero García León. Las determinaciones se hicieron a 308.7 K en un equipo Millipore Waters Associates con columnas de Ultrastayragel de 500 \AA y una columna lineal de

10^2 a 10^6 Å, empleando N-dimetilformamida como eluyente y un estándar de poliestireno. El equipo cromatográfico está acoplado a un refractómetro diferencial Millipore Waters 410 y a un módulo de registro de datos marca Waters. La curva de calibración se obtuvo con 11 estándares, 500, 2000, 4000, 9000, 35000, 110000, 200000, 400000, 900000, $2 \cdot 10^6$ y $2.7 \cdot 10^6$ Da.

Análisis termogravimétrico: Los análisis por TGA fueron obtenidos en el equipo Universal V3 0G TA Instruments, del Instituto de Materiales, por la Química Carmen Vázquez Ramos, a las velocidades de calentamiento de 5, 10 y 50 °C/min desde 25°C hasta 325 °C, en atmósfera de nitrógeno

Espectrometría de masas: Los espectros de masa FAB, se obtuvieron utilizando una matriz de alcohol 3-nitrobencílico, en el modo ion positivo en un instrumento JEOL JMS-SX102A operando con un voltaje de aceleración de 10 KV, en la USAI de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.3.- Procedimientos experimentales aplicados al estudio de la actividad química y biológica de compuestos análogos al rojo de rutenio

Para el cumplimiento de los objetivos planteados fue necesario llevar a cabo diversos trabajos experimentales, los cuales se dividieron en función de tales objetivos. A continuación se describen los procedimientos generales, junto con la explicación del objetivo particular a cumplir que obliga a la realización de tales actividades.

3.3.1.- Síntesis de análogos al RR por sustitución de ligante

La síntesis de los análogos por sustitución de ligante se ha reportado ampliamente en un trabajo previo¹²⁵.

Del trabajo antes mencionado, se determinó que se obtenían mejores resultados con la síntesis de los derivados análogos al RR por sustitución de ligante empleando fenantrolina. Aun cuando se probaron potentes ligantes como la bipyridina y cianuro, bajo las condiciones de reacción consideradas, la fenantrolina presentó mayor poder coordinante¹²⁵.

La literatura cita que individualmente el rutenio (III) y (IV) presentan gran afinidad por los ligantes nitrogenados tal como amoníaco, etilendiamina, fenantrolina, bipyridina y aminas secundarias en general¹²⁶; sin embargo, el RR presenta una reactividad selectiva, bajo las condiciones de reacción previamente señaladas, frente a la fenantrolina, aun cuando se podría pensar que la bipyridina presentaría el mismo resultado por tener una estructura similar,

tal como se observa frecuentemente en la química del rutenio¹²⁷. Dado que la fenantrolina es una estructura más rígida que la bipyridina, la reactividad estará entonces modificada substancialmente en función de las habilidades del quelato para sufrir distorsiones en la generación del complejo de coordinación, en la búsqueda de reducción de efectos estéricos en el complejo.

3.3.1.1. Síntesis del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(amminitrisfenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen2¹²⁵

El nombre sistemático de este compuesto es cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(amminitrisfenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV), al cual llamaremos simplemente RRPhen2.

Así, se disolvió el rojo de rutenio (0.6 g ó 0.76 mmol) en la mínima cantidad de agua (aprox. 25 mL), bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente se filtró la solución en atmósfera inerte.

Esta solución se adiciona a un matraz bola que contiene a la fenantrolina (4.5396 g ó 22.9 mmoles) previamente disuelta en metanol (60 mL). Esta mezcla de reacción se sometió a agitación constante durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno.

En esta síntesis decidimos adicionar la fenantrolina en relación 30:1 respecto al rojo de rutenio, con el fin de sustituir todas las posiciones de coordinación en la estructura metálica. Posteriormente la mezcla de reacción es sometida a un calentamiento suave a 45°C en un baño a temperatura constante aun bajo atmósfera de N₂, por 6 horas más.

Al cabo de ese tiempo, se agregó el hexafluorofosfato de amonio (0.7462 g ó 4.57 mmoles) previamente disuelto en metanol, para promover la precipitación.

Al eliminar el exceso de disolvente mediante vacío pudimos observar la formación de un precipitado oscuro que al secarse por completo adquirió una coloración gris oscura.

Finalmente el sólido se lavó exhaustivamente con etanol, hasta la total eliminación del exceso de fenantrolina y otras sustancias coloridas y se secó perfectamente a fin de pesar la cantidad de producto obtenido, encontrándose 1.6112 g (0.6752 mmol).

Los resultados del análisis elemental de este compuesto arrojaron, C:48.41%, N:13.64%, Cl:3.04%, P:4.70% y H:3.33%, mientras que de la fórmula mínima Ru₃O₂(C₁₂H₈N₂)₈(NH₃)₄(PF₆)₃Cl₃, los porcentajes calculados son C:48.32, N:11.74, Cl:3.89, P:4.46 y H:3.21%.

Se sintetizó este complejo para afinar la caracterización mediante el empleo de nuevas técnicas, dado que su aplicación biológica ha resultado sumamente prometedora en el campo de la fotosíntesis.

3.3.2.- Síntesis de complejos mononucleares de rutenio

Describiremos a continuación la síntesis del *cis*-bisbipiridinadiclorororutenio(II), del *cis*-diclorobisfenantrolinarutenio(II) y la síntesis del cloruro de trisfenantrolinarutenio(II).

3.3.2.1.- Síntesis del *cis*-bisbipiridinadiclororutenio(II), bisbipyRu

El nombre sistemático de este compuesto es, *cis*-bisbipiridinadiclorororutenio(II) al cual llamaremos simplemente bisbipyRu.

La síntesis, tomada de la literatura¹²⁸, puede iniciarse tomando como materia prima RuCl_3 ó $\text{K}_2[\text{RuCl}_5\text{H}_2\text{O}]$; considerando como materia prima al $\text{K}_2[\text{RuCl}_5\text{H}_2\text{O}]$, se disolvió el complejo de rutenio (3g, 8 0096 mmol) en 12 mL de dimetilformamida. Una vez disuelto se adicionó el ligante, en este caso 2,2'-bipiridina (2.559g, 16 37 mmol). Se adicionó posteriormente a la mezcla de reacción cloruro de litio (0 0851 g ó 2mmol) Una vez hecha esta adición se puso a reflujo la mezcla durante 8 h, con agitación constante. Una vez terminado el tiempo de reflujo, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se adicionaron 60 mL de acetona, mezcla que se mantiene en refrigeración durante 10 h a 4°C. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró obteniéndose un polvo microcristalino verde oscuro y una solución rojiza. El sólido finalmente se lavó tres veces con porciones de 15 mL de agua y tres porciones de 15 mL de éter etílico. Se obtuvieron 3.94g, lo cual corresponde a un 94.64% de rendimiento. La síntesis a partir de RuCl_3 , registra rendimientos del 60 al 75%.

Los resultados del análisis elemental de este compuesto indicaron, C:46.05%, N:10 99% y H:3.54%, mientras que de la fórmula mínima $\text{Ru}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_2\text{Cl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, los porcentajes calculados son C:46.16, N:10 77 y H:3 87%.

3.3.2.2.- Síntesis del *cis*-diclorobisfenantrolinarutenio(II), bisphenRu

El nombre sistemático de este compuesto es, *cis*-diclorobisfenantrolinarutenio(II) al cual llamaremos simplemente bisphenRu

La síntesis es esencialmente igual a la síntesis anterior. La única diferencia radica en el ligante a agregar, que en este caso es la 1,10-fenantrolina. Se pesaron 2 g (5.3397 mmol) de $\text{K}_2[\text{RuCl}_5\text{H}_2\text{O}]$, y se disolvió en 12 mL de dimetilformamida. Una vez disuelto el complejo de rutenio, se adicionó el ligante, (2.196 g, 11.08 mmol). Se agregó, por último, a la mezcla de reacción cloruro de litio (0.0151 g ó 0.356 mmol) y se puso a reflujo durante 8 h, con

agitación constante. Al término del reflujo, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se adicionaron 60 mL de acetona, mezcla que se mantiene en refrigeración durante 10 h a 4°C. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró. Una vez filtrada la mezcla de reacción se obtuvo un producto verde oscuro menos intenso que el anterior y una solución café. El sólido finalmente se lavó tres veces con porciones de 15 mL de agua y tres porciones de 15 mL de éter etílico. Se obtuvieron 2.7107g, lo cual corresponde a un 89.5% de rendimiento.

Los resultados del análisis elemental de este compuesto son, C:49.49%, N:9.76% y H:3.54%, mientras que de la fórmula mínima $Ru(C_{12}H_8N_2)_2Cl_2 \cdot 2H_2O$, los porcentajes calculados son C:50.71, N:9.86 y H:3.55%.

3.3.2.3.- Síntesis del cloruro de trisfenantrolinarutenio(II), trisphenRu

El nombre sistemático de este compuesto es cloruro de trisfenantrolinarutenio(II), al cual llamaremos simplemente trisphenRu.

Se pesó 1 g (2.67mmol) de $K_2[RuCl_5H_2O]$. El complejo se disolvió completamente en 10 mL de dimetilformamida. Una vez disuelto el complejo de rutenio, se adicionó el ligante, a decir, 1,10-fenantrolina, 2.121g (10.7mmol) previamente disueltos en la mínima cantidad de dimetilformamida. Además, se adicionaron 0.0080g (0.178mmol) de cloruro de litio. Esta mezcla se dejó en reflujo durante 8 h al cabo de las cuales era posible observar un cambio drástico de la coloración de la mezcla de reacción de café pardo a un anaranjado intenso, propio del trisquelato. Finalmente se filtró la mezcla de reacción, obteniéndose un precipitado cristalino anaranjado intenso característico¹²⁶. El sólido finalmente se lava con porciones de 15 mL de agua fría tres veces y tres porciones de 15 mL de éter etílico. De la síntesis bajo estas condiciones se obtuvieron 2.0215g de producto, lo cual correspondió a un 90.44% de rendimiento.

Los resultados del análisis elemental de este compuesto arrojaron, C:51.21%, N:10.37% y H:4.34%, como promedio de dos determinaciones, mientras que de la fórmula mínima $Ru(C_{12}H_8N_2)_3Cl_2 \cdot 7H_2O$, que incluye además del complejo trisquelato 7 moléculas de agua de hidratación, los porcentajes calculados son C:51.55, N:10.02 y H:4.57%.

3.3.3.- Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de mononucleares

Consultando la información en la literatura, encontramos un trabajo desarrollado por Meyer, Geselowitz y Kutner¹²⁹, en donde se describe la síntesis y caracterización de un

análogo al RR por sustitución de ligante, en donde se emplea bipyridina, del cual se parte para el desarrollo de los siguientes procedimientos:

3.3.3.1.- Síntesis del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisfenantrolinarutenio(III)) bisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen3

En esta síntesis se partió de una solución de 1.1 g (1.94 mmol) de bisphenRu en 30 mL de agua, la cual se sometió a ebullición con agitación constante. Posteriormente se adicionó una solución de nitrato de plata preparada con 0.34 g (2.34 mmol) de AgNO_3 en la mínima cantidad de agua. Una vez combinadas ambas soluciones se sometió a reflujo la mezcla de reacción por 50 minutos. Al cabo de este tiempo la solución se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Al filtrado remanente se le adicionaron 0.5 mL de peróxido de hidrógeno al 10%. Una vez completada la adición del peróxido de hidrógeno se sometió a calentamiento a fin de eliminar la mayor cantidad de disolvente, a fin de tener 20 mL de la mezcla de reacción. Nuevamente se filtró y finalmente se adicionó perclorato de sodio (7g, 57.17 mmol). La mezcla de reacción se conservó en el refrigerador por 10 horas. Se filtró la solución fría recuperándose el producto en el papel filtro. Éste se recristalizó dos veces más con una solución de perclorato de sodio al 1%, generándose microcristales de color café rojizo oscuro. Se obtuvieron 0.78g (0.3416 mmol) de producto al final de la recristalización (48.8% de rendimiento). El análisis elemental encontrado experimentalmente generó los siguientes resultados: C, 38.52%; H, 3.66%; N, 7.0%, mientras que la composición porcentual calculada para la fórmula mínima $\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_6(\text{H}_2\text{O})_9(\text{ClO}_4)_6$ es: C, 39.76%; H, 3.06% y N, 7.73%.

3.3.3.2.- Síntesis del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisbipiridinarutenio(III)) bisbipiridinarutenio(IV), RRBpy1

Se preparó una solución con 1.1 g (2.1 mmol) de bisbipyRu en 40 mL de agua, la cual se calentó a ebullición con agitación constante. Se adicionó una solución de nitrato de plata preparada con 0.6257 g (3.68 mmol) de AgNO_3 en la mínima cantidad de agua (9 mL). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción anterior por 50 minutos. Posteriormente la solución se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Al filtrado remanente se le adicionaron 0.5 mL de peróxido de hidrógeno al 10%. Tras la adición del peróxido de hidrógeno se sometió a calentamiento para reducir el volumen de la mezcla de reacción a aproximadamente 20 mL. Ésta se filtró nuevamente y finalmente se adicionó el perclorato de sodio (7.58 g, 61.91

mmol), tras lo cual se mantuvo en el refrigerador por 10 h. Al cabo de este tiempo, la solución una vez a 10 °C aproximadamente, se filtró, recuperándose el producto en el papel filtro. Éste se recrystalizó dos veces más con una solución de perclorato de sodio al 1%, generándose microcristales de color café rojizo oscuro. Se obtuvieron 0.60 g (0.30 mmol) de producto al final de la recrystalización (42.19% de rendimiento).

Los resultados del análisis elemental de este compuesto fueron C:35.07%, N:8.13% y H:3.16%, mientras que de la fórmula mínima, $Ru_3O_2(C_{10}H_8N_2)_6(H_2O)_9(ClO_4)_6$, los porcentajes calculados son C:35.48, N:8.28 y H:3.28%.

3.3.4.- Procedimiento de síntesis de los análogos al RR por oxidación

3.3.4.1.- Síntesis del café de rutenio, nitrato de di- μ -oxo-(pentaamminrutenio(III) pentaamminrutenio (IV))tetraamminrutenio(IV), CR

La siguiente ruta sintética fue extraída del trabajo de Fletcher y colaboradores¹⁰⁴. Se tomaron 0.5216 g (0.66mmol) de RR previamente purificado^{2 y 125}, los cuales se colocaron en una caja petri a la cual se le adicionaron 10 mL HNO_3 0.5M. El ácido nítrico cataliza la oxidación del RR al CR. Se sometió a un calentamiento a no más de 45 °C durante 30 minutos. Este proceso generó la reducción del volumen de la mezcla de reacción a 5 mL. Al cabo de este tiempo se enfrió y se dejó en un desecador hasta la eliminación de todo el líquido mediante la aplicación de vacío. El sólido obtenido, de color café oscuro, se redisolvió en 5 mL HNO_3 0.2N, se sometió a calentamiento nuevamente y se filtró. El sólido obtenido se lavó con HNO_3 0.01N, etanol y éter etílico. Se dejó secar en condiciones normales de temperatura y presión, obteniéndose un sólido microcristalino, de color café oscuro.

El producto se caracterizó mediante análisis elemental y experimentalmente la composición porcentual fue: N, 26.03% y H, 4.53%. Ésta se compara con la composición porcentual estimada a partir de la siguiente fórmula mínima: $Ru_3O_2(NH_3)_{14}(NO_3)_7 \cdot 5H_2O$, que corresponde a N=26.79% y H=4.77%. Se obtuvieron 0.6312 g (0.575mmol) de CR, que constituye un 87.12% de rendimiento.

3.3.4.2.- Síntesis del violeta de rutenio, cloruro de di- μ -oxo-bis (pentaammin rutenio(IV))tetraamminrutenio(IV), VR

Para la obtención del violeta de rutenio, VR, se disolvieron 0.6 g (0.76 mmol) de RR purificado, para de esta forma eliminar las impurezas indeseables presentes en el RR

comercial, en la mínima cantidad de agua destilada y se oxidó mediante la adición de agua oxigenada (5 mL) al 30 %. La selección de este agente oxidante dependió del hecho de no generar contaminación extra de la muestra. Al cabo de 2 días se obtuvo un cambio de color de la mezcla de reacción a morada o azul muy oscura. Filtramos el sólido. Se obtuvieron 0.26 g (0.30 mmol) de VR, el cual mostró experimentalmente del análisis elemental los porcentajes de H:5.04%, N:19.10% mientras que los porcentajes calculados son H:5.74% y N:19.94% , para la fórmula mínima: $Ru_3O_2(NH_3)_{14}Cl_8 \cdot 7 H_2O$.

3.3.5.- Procedimiento de purificación del RR y complejos análogos

La literatura contiene información suficiente sobre purificación mediante la cromatografía de intercambio iónico y decidimos recurrir a ella en función de los buenos resultados obtenidos en un estudio similar en el compuesto dinuclear de rutenio conocido como Ru_{360} . En este trabajo desarrollado por Emerson y colaboradores^{130 y 131} se propone el aislamiento de un subproducto generado en la síntesis del RR, de naturaleza dinuclear conocido como Ru_{360} de las muestras comerciales de RR y por ende la purificación del RR.

La preparación de la resina intercambiadora catiónica CM-52 implicó su hidratación y saturación en una solución 1M de formiato de amonio, compuesto empleado como fase móvil de esta separación cromatográfica, durante 45 minutos. La selección se fundamenta en que actúa como amortiguador de pH, importante para la estabilización de los estados de oxidación en los compuestos de rutenio. El pH de trabajo fue 5.5 para RR y análogos por sustitución de ligante y pH de 5 al trabajar con muestras de VR y CR. Al cabo de este tiempo se cargó la suspensión generada en la columna cromatográfica, permitiendo la sedimentación y drenado de ésta. Se trabajó en todos los casos con una columna de carboximetilcelulosa (CM-52), de dimensiones de 15 cm de longitud y un diámetro de dos centímetros.

Posteriormente se adicionó solución 0.1M de formiato de amonio, a la que previamente se le ajustó el pH según el caso. Se eluyeron 200 mL de solución 0.1 M de formiato de amonio, a fin de lavar perfectamente la columna y equilibrarla. Una vez establecidas estas condiciones se preparó la muestra. Se pesaron 0.5g del sólido a purificar y se disolvió perfectamente en la mínima cantidad de solución de formiato de amonio 0.1 M. La elución de la columna se efectuó con un gradiente lineal de formiato, desde 0.1M hasta 0.9 M. La velocidad de circulación de la solución fue de 3.5mL/min. Una vez recuperadas

las fracciones de interés se procedió a la liofilización de la muestra para reducir al mínimo alguna oxidación o reducción especialmente en el caso del RR y CR.

3.3.6.- Estudios bioquímicos

Los estudios bioquímicos fueron realizados por la M. en C. Beatriz King-Díaz, del grupo de Investigación del Dr. Blas Lotina Henssen, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo su dirección.

En función de la evidencia previa respecto a la actividad del RR en el proceso fotosintético y de la potente actividad inhibitoria de la reacción de Hill detectada por uno de los análogos por sustitución de ligante de éste, resultaba bastante interesante completar los estudios pertinentes.

El objetivo principal en este campo reside en el establecimiento de una relación estructura-actividad de los compuestos trinucleares de rutenio, así como obtener mayor información sobre el mecanismo de inhibición del proceso fotosintético.

3.3.6.1.- Aislamiento de cloroplastos y determinación de clorofila

Los cloroplastos intactos fueron aislados de espinaca (*Spinacea oleracea*) obtenida en el mercado. El procedimiento de obtención descrito y modificado^{132 133 134 135 136} se describe a continuación:

40 gramos de hojas de espinaca turgentes y en buen estado se lavaron con agua de la llave. Se les quitó la nervadura central y el ápice para eliminar los cloroplastos viejos y jóvenes; después se cortaron en pedazos y se colocaron en un vaso de licuadora (enfriado previamente a una temperatura de 4 °C) con 180 ml. de medio de aislamiento que contenía sacarosa 400 mM, MgCl₂ 5mM y KCl 10 mM. Este medio de aislamiento fue amortiguado con tricina de sodio 30 mM a pH=8.0.

Se homogenizaron las hojas y el medio de aislamiento en una licuadora Osterizer Custom Mod. L-21 durante 5 segundos a velocidad máxima. El homogenizado se filtró a través de cuatro capas de gasa. El filtrado resultante se centrifugó a 3,500 rpm durante 3 minutos en una centrífuga MSE Mod. LR-6 a 4 °C. Estos pasos se realizaron de manera que se sometiera a la mínima cantidad de luz al homogenizado. El sobrenadante se desechó y la pastilla que contenía a los cloroplastos se resuspendió en un volumen de 3 a 5 ml. en el medio de aislamiento. Finalmente la suspensión se guardó en un tubo de ensayo frío, cubierto

con un manto oscuro para protegerlo de la luz durante 1 hora. Es importante mencionar que todos los pasos de aislamiento deben efectuarse a una temperatura aproximada de 4°C.

Posteriormente los cloroplastos fueron lisados con la finalidad de generar tilacoides libres a partir de la incubación de los organelos intactos en un medio de transporte de electrones hipotónico cuya composición fue: solución de sorbitol 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de triclna 30 mM (pH 8.0, por la adición de KOH).

Para la determinación de la concentración de clorofila en los cloroplastos se tomaron 5 mL de solución de acetona al 80% (temperatura ambiente) en tres tubos. A dos de ellos se les agregó 20 µL de cloroplastos aislados y resuspendidos, se agitaron y taparon vigorosamente en un Vortex Genis Mod. K-550-G y se centrifugaron durante 5 minutos a velocidad máxima a fin de sedimentar los residuos de cloroplastos. Se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro Pye Unicam Mod SP6-550 contra solución de acetona al 80% como blanco a 663 y 645 nm. La cantidad de clorofila se obtuvo aplicando la ecuación siguiente¹³⁷:

$$\text{Clorofila } a/b = (\text{g/mL}) = 8.05 * (\text{Abs}_{663}) + 20.29 (\text{Abs}_{645})$$

3.3.6.2 Medición de la velocidad del transporte de electrones

Se midió la reacción de Hill en sus dos fases separadas fotosistema I y fotosistema II, así como la reacción completa.

Para la medición de este proceso se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark^{138, 139, 140} que mide cambios de concentración de oxígeno a partir de la fotólisis del agua. El electrodo está conectado a un oxímetro, el que a su vez está conectado a un registrador Beckman Recorder. Para obtener la relación cuantitativa de los registros anteriores con la velocidad del transporte de electrones se compara el sistema en estudio con uno ya conocido, por ejemplo, con el que incluye al ferricianuro de potasio como aceptor de electrones.

El dispositivo en el cual se mide la actividad de transporte de electrones consta de un proyector (GAF 2660) que incide su luz sobre una lente de Izawa, que está formada por una solución de sulfato de cobre (1%) contenida en un recipiente cristalino, de 5 cm de espesor, que elimina el calor y hace las funciones de filtro, concentrando la luz en la cámara de reacción que está soportada por una base de agitación magnética Spin Master con plato térmico Mod. 4003, que mantiene homogénea la suspensión de cloroplastos, contenida en dicha cámara. Esta cámara cuenta con una camisa de circulación de agua para el mantenimiento de la temperatura.

El transporte de electrones en condiciones basal, acíclico e inducido por la luz, de toda la cadena transportadora de electrones, o sea, la reacción de Hill, se midió utilizando como medio de suspensión el mismo medio de transporte de electrones antes descrito (sorbitol 100 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 30 mM ajustado a pH 8.0, por la adición de KOH), cuidando que la concentración de clorofila fuera de 20 $\mu g/mL$. La muestra fue iluminada durante 1 minuto.

El transporte electrónico acíclico fosforilante se midió como el transporte electrónico basal con la única diferencia en cuanto a la composición del medio, al cual además del medio de transporte de electrones se le adicionó ADP 1 mM y KH_2PO_4 3 mM.

El transporte electrónico desacoplado se cuantificó en el mismo medio de transporte de electrones empleado en el transporte de electrones basal acíclico pero con la adición de NH_4Cl 6 mM.

Para la determinación de la velocidad del transporte de electrones en el fotosistema I se trabajó con un procedimiento similar al anterior, empleando el mismo medio de transporte de electrones aunque se adicionaron los siguientes reactivos: DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) 10 μM , DCPIP(diclorofenolindofenol) 100 μM , MV (metilviológeno) 50 μM , ascorbato 300 μM y NH_4Cl 6 mM.

La determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II de agua a DCPIP se efectuó mediante la determinación de la reducción de DCPIP, a través de la generación de O_2 monitoreada polarográficamente.

El medio de reacción fundamentalmente similar al medio de transporte de electrones, contenía a diferencia, los reactivos siguientes: DBMIB 1 μM , DCPIP 100 μM , $K_3[Fe(CN)_6]$ 500 μM y NH_4Cl 6 mM, sin adición de metilviológeno.

La determinación de la velocidad del transporte de electrones desacoplado en el fotosistema II desde agua a silicomolibdato de sodio (SiMo) se realizó como la medición anterior con la única diferencia de que al medio de transporte de electrones se le adicionaron los siguientes reactivos: SiMo 200 μM y DCMU 10 μM .

Para la determinación del transporte de electrones desacoplado de DPC a DCPIP se emplearon cloroplastos intactos, los cuales se sometieron a calentamiento con tris 0.8 M a pH=8 y se incubaron posteriormente a 4 °C durante 30 minutos. Después de este tratamiento, se adicionaron 40 mL del medio de transporte de electrones y la suspensión se centrifugó a 5,000 G durante dos minutos. Se determinó la concentración de clorofila según la técnica descrita en los párrafos anteriores. A la mezcla final únicamente se le adicionó DPC 200 μM .

En todos los casos anteriores las sustancias a estudio se adicionaron en concentraciones que fueron desde 5 μM hasta 100 mM como última adición antes de los registros de la actividad biológica. Para la preparación de las soluciones el disolvente empleado fue el mismo medio de transporte.

El valor I_{50} para las mediciones de actividad se determinó por interpolación del gráfico de porcentaje de actividad contra concentración del compuesto a prueba. I_{50} es la concentración de compuesto prueba capaz de inhibir el 50% de la actividad en la fotosíntesis.

Además se probaron tanto especies mononucleares como trinucleares, de las cuales se estudió el efecto de la carga, el tamaño y la hidrofobicidad sobre su actividad inhibidora.

Todas las mediciones anteriores fueron registradas con un aparato YS I (yellow springs instrument) modelo 2300 oxygen monitor y un electrodo Clark

3.3.6.3 Medición de la síntesis de ATP

Para la determinación de la síntesis de ATP se empleó el medio de transporte de electrones previamente descrito (sorbitol 100 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 30 mM ajustado a pH 8.0, por la adición de KOH), con la diferencia del buffer empleado que fue tricina en concentración 1 mM (pH=8.0) y se le adicionó además MV (metilviologeno) 50 μM , como aceptor de electrones. La síntesis de ATP fue cuantificada con uso de un microelectrodo Orion modelo 8103 Ross conectado a un potenciómetro Corning modelo 12 de escala expandida, según el procedimiento de Dille¹⁴¹. Los cambios de pH se registraron por medio de un registrador Gilson. Nuevamente se emplearon los compuestos a prueba en concentraciones que fueron desde 5 μM hasta 60 μM .

3.3.6.4 Cálculo del logaritmo de los coeficientes de partición, log P

El principal interés de los estudios biológicos de estos compuestos radica en establecer alguna relación estructura-actividad. En vista de esto, requerimos información más precisa. Una de las propiedades fisicoquímicas que puede brindar información importante son los coeficientes de partición. Para el cálculo de los coeficientes de partición es necesario determinar experimentalmente los coeficientes de extinción de los compuestos en estudio. Los coeficientes de extinción del RR y de los compuestos análogos se determinaron empleando la técnica de absorción espectroscópica¹⁴²⁻¹⁴³.

Los coeficientes de partición experimentalmente se determinaron en un sistema 1-octanol-buffer de fosfatos-H₂O. Se obtuvieron mediante agitación durante 15 minutos en 25 mL de 1-octanol y 25 mL de buffer. Después del periodo de agitación se dejaron en equilibrio durante 20 minutos, al cabo de los cuales se realizó un análisis espectrofotométrico de ambas fases para la determinación de la concentración del compuesto en estudio en cada una de ellas.

Finalmente log P es el logaritmo del cociente de los coeficientes de partición en cada fase

$$\text{Log}P = \log \left[\frac{\text{Concentración}(fase \text{ -- acuosa})}{\text{concentración}(fase \text{ -- octanol})} \right]$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El interés principal de este trabajo de investigación, como ya se mencionó anteriormente, radica en afinar la caracterización de compuestos análogos al RR con fenantrolina sustituida, aportar nueva evidencia sobre la reactividad química de los análogos al RR por sustitución de ligante y por procesos redox y estudiar a profundidad el efecto tan poderoso de inhibición sobre la cadena transportadora de electrones en la fotosíntesis que este tipo de compuestos presenta. Una de las actividades inhibitorias más potentes hasta ahora evaluadas.

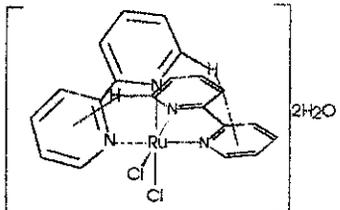
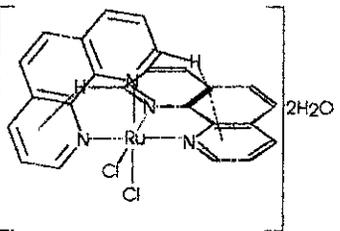
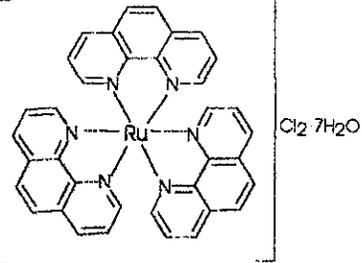
Del trabajo previo de tesis, ya mencionado¹²⁵, se determinó que se obtenían mejores resultados con la síntesis de los derivados análogos al RR por sustitución de ligante empleando fenantrolina. Aun cuando se probaron potentes ligantes como la bipyridina y cianuro, bajo las condiciones de reacción consideradas, la fenantrolina presentó el mayor poder coordinante¹²⁵.

La literatura cita que individualmente el rutenio (III) y (IV) muestran gran afinidad por los ligantes nitrogenados tal como el amoníaco, etilendiamina, fenantrolina, bipyridina y aminas secundarias en general; sin embargo, el RR presenta una reactividad selectiva, bajo las condiciones de reacción previamente señaladas, frente a la fenantrolina, aun cuando se podría prever que la bipyridina debería presentar el mismo comportamiento químico por tratarse de estructuras similares, tal como se observa frecuentemente en la química del rutenio. Dado que la fenantrolina es una estructura más rígida que la bipyridina, la reactividad estará entonces modificada substancialmente en función de las habilidades del quelato para sufrir distorsiones en la generación del complejo de coordinación, en la búsqueda de reducción de efectos estéricos en el complejo.

Así, ya que bajo las condiciones de reacción propuestas para la síntesis de RRPhen2 no es posible obtener el derivado con bipyridina, decidimos emplear otras condiciones de reacción a fin de obtener tal derivado, condiciones que parten de la síntesis de complejos mononucleares de rutenio. Debido a esto y a que era importante determinar la actividad inhibitoria de los mononucleares, un producto de descomposición factible del RR y sus

derivados por sustitución de ligante, decidimos sintetizar y caracterizar tres complejos mononucleares. Además, se llevó a cabo la síntesis de estos complejos de rutenio debido a que la caracterización de los trinucleares presentó complicaciones, las cuales podrían resolverse parcialmente analizando primero estructuras más sencillas, como es el caso de los mononucleares, y finalmente era importante descartar la posibilidad de descomposición de los trinucleares en unidades monoméricas, que requerirían por tanto conocerse químicamente. En las TABLAS 4.1 y 4.2 se muestra un resumen de los compuestos sintetizados y caracterizados mediante las diferentes técnicas de análisis:

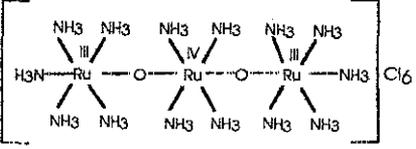
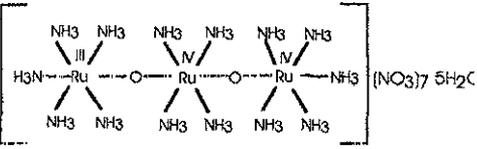
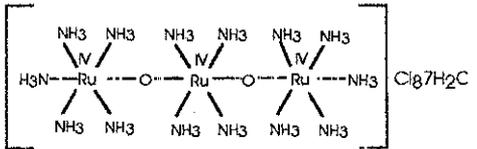
TABLA 4.1. Representación de los compuestos sintetizados y caracterizados en este trabajo

MONONUCLEARES		
Complejo	Clave en este trabajo	Fórmula estructural propuesta
<i>cis</i> -bisbipiridinadichlororutenio(III)	bisbipyRu	
<i>cis</i> -dichlorobisfenantrolinarutenio(II)	bisphenRu	
cloruro de trisfenantrolinarutenio(II)	trisphenRu	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NOO 2007
MAYO 10 2007

TABLA 4.2. Representación de los compuestos sintetizados y caracterizados en este trabajo

TRINUCLEARES		
ANÁLOGOS AL RR POR SUSTITUCIÓN DE LIGANTE		
A) Síntesis a partir de mononucleares		
Complejo	Clave	Fórmula propuesta
Perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisbipiridinrutenio(III))bisbipiridinrutenio(IV)	RRBpy1	$[H_2ORu(Bpy)_2ORu(Bpy)_2ORu(Bpy)_2O H_2](ClO_4)_6 \cdot 7H_2O$ Bpy=2,2'-bipiridina
Perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisfenantrolinarutenio(III))bisfenantrolinarutenio(IV)	RRPhen3	$[H_2ORu(phen)_2ORu(phen)_2ORu(phen)_2O H_2](ClO_4)_6 \cdot 7H_2O$ phen=1,10-fenantrolina
B) Síntesis a partir del RR		
Complejo	Clave	Fórmula propuesta
Cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(ammintrisfenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV)	RRPhen2	$[H_2NRu(phen)_3ORu(phen)_2(NH_3)_2ORu(phen)_3NH_3](PF_6)_3Cl_3$ phen=1,10-fenantrolina
ANÁLOGOS AL RR POR REACCIONES REDOX		
Complejo	Clave	Fórmula propuesta
cloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(III))tetraamminrutenio(IV)	RR	
nitrato de di- μ -oxo-(pentaamminrutenio(III))pentaamminrutenio(IV)tetraamminrutenio(IV)	CR	
cloruro de di- μ -oxo-bis(pentaamminrutenio(IV))tetraamminrutenio(IV)	VR	

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la síntesis y caracterización de los mononucleares de rutenio.

Las Figuras a las que se hará referencia a lo largo de este capítulo se concentran en el Capítulo 8, al final de este trabajo de tesis.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.1.- Complejos mononucleares de rutenio

4.1.1.- Complejo *cis*-bisbipiridinadiclororutenio(II), bisbipyRu

El producto obtenido se caracterizó por medio de análisis elemental, espectroscopía de Infrarrojo, espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica y espectroscopía UV-Vis

La descripción de la síntesis completa se detalla en la parte experimental en el apartado 3.3.2.1

La primera sugerencia de la formación de este compuesto se relaciona a la propuesta en la cual se maneja como intermediario en la síntesis del trisquelato de bipyridina y rutenio¹⁴⁴, que se remite a 1955

La síntesis de bisbipyRu está descrita en la literatura¹²⁸ y emplea $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como materia de partida, con lo cual los rendimientos son del 65-70% aproximadamente, rendimiento bastante bueno en ese tiempo, pues los rendimientos normales bajo otros métodos de síntesis en solución eran del 35%¹¹⁸. Decidimos realizar el cambio de la materia prima que fue suficiente para incrementar el rendimiento hasta un 94%.

La decisión de la síntesis de este compuesto mononuclear (y la del derivado con fenantrolina) estribó en que es un compuesto particularmente reactivo, gracias a los cloruros lábiles coordinados al metal, que lo habilita como materia prima en la síntesis alterna de compuestos trinucleares¹²⁹ (sección 3.3.3 de esta tesis)

4.1.1.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El producto obtenido es de color verde oscuro, de apariencia microcristalina. El rendimiento calculado para la reacción fue del 94.64% y es un compuesto soluble DMF, agua, etanol, metanol y DMSO.

En la TABLA 4.3 se da la fórmula mínima calculada a partir de los resultados del análisis elemental y en la TABLA 4.4 se incluyen algunas de sus propiedades físicas

TABLA 4.3 Análisis Elemental de bisbipyRu

Elemento	C	N	H
% Experimental	46.05	10.99	3.54
% Teórico	46.16	10.77	3.87

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula mínima $\text{Ru}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2)_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, que cuenta con un peso molecular de 520.38 g/mol considerando la presencia de dos moléculas de agua fuera de la esfera de coordinación.

TABLA 4.4. Propiedades físicas de bisbipyRu

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
Ru(C ₁₀ H ₈ N ₂) ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O	520.38	Verde oscuro microcristalino	DMF	+++
			Metanol	+++
			Agua	++
			Acetona	++
			Etanol	++
			Éter etílico	+

+ insoluble ++ parcialmente soluble y +++ soluble

4.1.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo

En las Figuras 1, 2 y 3 se presentan los espectros IR medio tanto de las materias primas como del producto bisbipyRu. Del espectro de IR de bisbipyRu (Figura 3), es posible detectar que la sustitución de los cloruros por la bipyridina es exitosa. La complejidad del espectro se incrementa como consecuencia de la coordinación del ligante. A continuación se resume en la TABLA 4.5, la asignación de las señales.

 TABLA 4.5 Principales bandas en Infrarrojo de bisbipyRu^{145, 146, 147}

BANDAS	K ₂ [RuCl ₅ H ₂ O] cm ⁻¹	2,2'-bipyridina cm ⁻¹	bisbipyRu cm ⁻¹
v _s O-H	3500-3200		3442
v _{as} O-H	3500-3200		3442
δ _s H ₂ O	1560.34		1636
ρ _t H ₂ O	814		-
ρ _w H ₂ O	570		-
v Ru-O	430		424
v =C-H		3100-3000	3096-3038
δ =C-H fuera del plano		1970-1610	1600-1522
v Ar-H		1600-1400	1459-1418
v N=C		1578	1636
		1556.22	1599.83
v C=C		1452.22	1458.26
		1414.71	1418.07
δ =C-H en plano		1250-990	1261
			1017.86
δ =C-H fuera del plano		757.01	763.52

En términos generales, las bandas atribuidas a vibraciones típicas de bipyridina, presentan un corrimiento de su posición a la región de alta frecuencia al coordinarse al metal. También está documentada la evidencia en complejos mononucleares, que los ligantes bidentados de tipo α-dilimina, como la fenantrolina y bipyridina se encuentran

coordinados por las dos posiciones posibles si y sólo si presentan la banda atribuida a la vibración de elongación Ar-H entre $1590-1604\text{cm}^{-1}$, mientras que si se hallan coordinados sólo por una de sus posiciones de coordinación, la banda se localiza entre $1615-1624\text{cm}^{-1}$ ¹⁴⁸. En el caso de bisbipyRu esta banda se localiza en 1600cm^{-1} , lo cual nos permite creer que el ligante está coordinado al metal por ambos nitrógenos, empleando sus dos posiciones de coordinación. Información extra, concerniente a la geometría del complejo no es posible de registrar con ayuda de esta técnica experimental

Existe literatura¹⁴⁹ que indica la importancia de dos bandas, como indicativos de la coordinación de la 2,2'-bipiridina al metal. La primera es aquella que se encuentra a aproximadamente 992cm^{-1} en el ligante libre, la cual invariablemente se desplaza a la zona de mayor frecuencia a alrededor de los 1018cm^{-1} , una vez que se coordina al metal. Otra banda de diagnóstico importante es la banda intensa localizada a 757cm^{-1} , frecuentemente con un desplazamiento de $10-20\text{cm}^{-1}$ e incluso la aparición de una banda más pequeña satélite, a aproximadamente 741cm^{-1} . En bisbipyRu esa banda se localiza a los 763cm^{-1} y es apreciable la formación de la banda satélite en 727cm^{-1}

4.1.1.3.- Espectroscopía de RMN ¹H

Los espectros de RMN ¹H, tanto de la 2,2'-bipiridina, como del complejo de coordinación se presentan en las Figuras 4, 5, 6, y 7.

El espectro de RMN ¹H de la 2,2'-bipiridina ha sido descrito a detalle en la literatura¹⁵⁰¹⁵¹. Con este dato en mente, aquí solamente se indicará la descripción general del espectro, con la asignación de cada señal y finalmente se incluirán algunos detalles importantes.

Dicho espectro de RMN ¹H de la 2,2'-bipiridina consta de dos dobletes de dobletes a campo bajo y dos multipletes localizados a mayor campo, esto considerando un espectro de baja resolución (Figura 4)

Para la asignación de las señales analizaremos el espectro de la 2,2'-bipiridina y la estructura de la molécula:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESQUEMA 4 1. Fórmula estructural en conformación *trans*-planar de la 2,2'-bipiridina

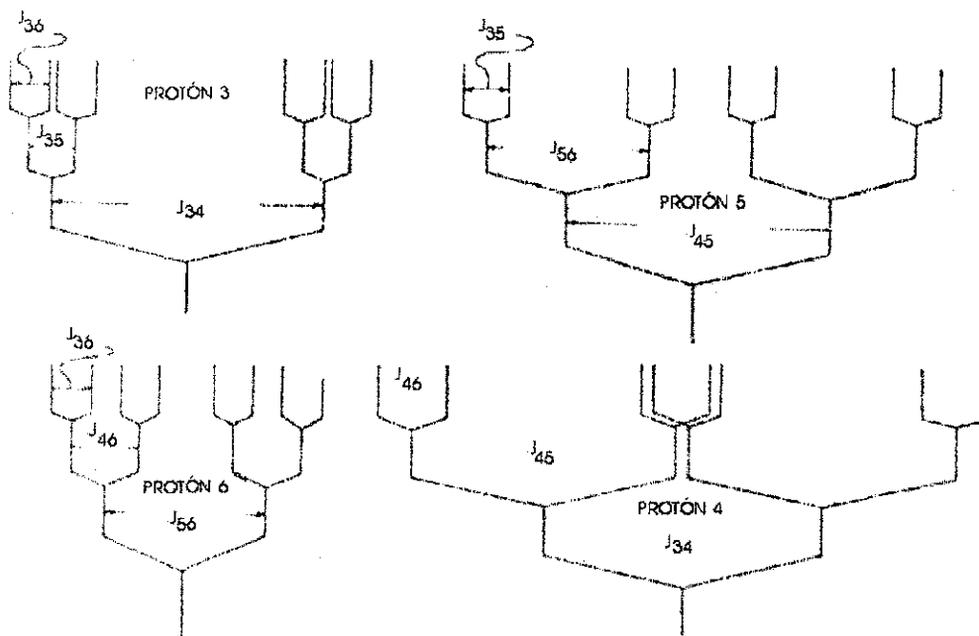
Para poder determinar la asignación de las señales en el espectro, es conveniente mencionar que la 2,2'-bipiridina posee 8 hidrógenos, los cuales por pares son equivalentes. Los hidrógenos en posición orto (6, 6') al N del anillo heterocíclico son los que se encuentran más desprotegidos por encontrarse más cerca del nitrógeno, y por tanto las señales de éstos se encontrarán a campo más bajo. Los hidrógenos en posición meta (3, 3') son los que en segundo lugar sienten la desprotección, debido a la configuración transplanar que adopta la 2,2'-bipiridina, por estar espacialmente orientados cerca de los átomos de nitrógeno, de los anillos opuestos, como es posible visualizarlo de la representación gráfica de la molécula de 2,2'-bipiridina presentada renglones antes¹⁵². Los hidrógenos localizados en posición para (4,4') respecto del heteroátomo son los que sigue en desprotección, generada por la atracción que el átomo de nitrógeno ejerce sobre los electrones de los átomos de hidrógeno, esta última fundamentada en las estructuras resonantes propias de la molécula. El átomo de hidrógeno sobre el cual el nitrógeno ejerce menos influencia de todos los existentes en la bipiridina se encuentra en la restante posición meta (5,5'), por lo cual su banda de resonancia se presentan a campo más alto.

La multiplicidad de las señales aun cuando pudiera considerarse complicada responde perfectamente a un análisis por medio de un patrón ABCD mediante la teoría de acoplamiento espín-espín de primer orden.

Dado que el acoplamiento mayor se da entre átomos de hidrógeno en protones adyacentes es de esperarse dobletes para los protones 3 y 6 (equivalentes a 3' y 6') y tripletes para los protones 4 y 5.

Los tripletes de los protones 4 y 5 se muestran como una señal de mayor multiplicidad. Los tripletes en realidad son tripletes de dobletes. La generación de los dobletes es producto del acoplamiento del protón 4 con el protón 6 a más de un enlace; mientras que en el caso del protón 5, el acoplamiento a más de un enlace con el protón 3 genera el desdoblamiento de la señal.

Por otro lado el doblete de cuartetos del protón 6 y el doblete de tripletes del protón 3 se pueden explicar considerando el mismo argumento de un acoplamiento a más de un enlace, gracias al sistema conjugado existente en la 2,2'-bipiridina. En el caso del protón 6 se debe considerar el acoplamiento principal y más importante con el protón 5 que da origen al doblete y el acoplamiento a dos enlaces con el protón 4, pero además existe el acoplamiento del protón 6 a más tres enlaces con el protón 3. En el ESQUEMA 4.2 se incluyen los diagramas de los patrones de desdoblamiento en la 2,2'-bipiridina.



ESQUEMA 4.2 Diagrama de patrones de desdoblamiento de señales en RMN ¹H de 2,2'-bipiridina¹⁵¹

El resumen de las observaciones anteriores se tiene en la TABLA 4.6.

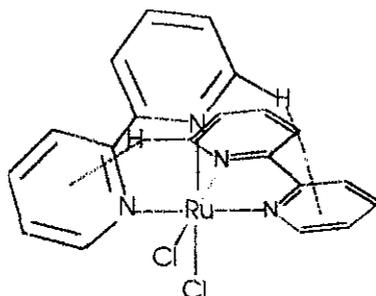
TABLA 4.6 Datos de RMN ¹H en ppm de la 2,2'-bipiridina

	H 6,6'	H 5,5'	H 4,4'	H 3,3'
2,2'-bipiridina	8.716-8.691m	7.490-7.445m	7.990-7.932m	8.422-8.388m
m=multiplete, s=singulete, d=dobleto, t=tripleto				

En el espectro de bisbipyRu (Figura 5) observamos un espectro de resonancia más complicado que la bipiridina sin coordinar, lo cual era de esperarse.

De esta técnica experimental es posible obtener claras evidencias del arreglo espacial de la molécula. La conformación *cis* que adopta el complejo de coordinación (ESQUEMA 4.3) hace que el ambiente químico que rodea a los hidrógenos de la bipiridina coordinada sea diferente, por lo cual estos hidrógenos no son magnéticamente equivalentes y por ello la complejidad del espectro aumenta con relación al espectro del ligante puro. Al contrario de lo anterior, el espectro del complejo *trans* de rutenio(II) presenta el mismo patrón de bandas que el ligante puro ya que los hidrógenos son magnéticamente equivalentes¹⁵³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESQUEMA 4.3. Representación gráfica de organización espacial en el complejo bisbipyRu

En la TABLA 4.7 se presentan los datos de RMN ¹H de bisbipyRu y se comparan con los datos de 2,2'-bipiridina.

TABLA 4.7. Datos de RMN ¹H en ppm de bisbipyRu y 2,2'-bipiridina

	H 6'	H 5'	H 4'	H 3'	H 6	H 5	H 4	H 3
bisbipyRu	9.95 d	7.75 †	8.05 †	8.65 d	7.5 d	7.1 †	7.68 †	8.48 d
2,2'-bipiridina	8.716-8.691m	7.490-7.445 m	7.990-7.932m	8.422-8.388 m				
m=multiplete, s=singulete, d=doblete, †=triplete								

Es posible observar del espectro de bisbipyRu, el desplazamiento de todas las señales.

El desplazamiento más importante es el que presenta el átomo de hidrógeno en el anillo de bipiridina en posición 6, que se encuentra espacialmente próximo al ambiente magnético generado por el segundo anillo aromático. El efecto anisotrópico diamagnético del anillo aromático es causante del desplazamiento de la señal a mayor frecuencia. Este efecto se ha observado en otros complejos bipiridínicos disustituidos¹⁵⁰.

La multiplicidad de las señales se simplifica considerablemente.

Para la correcta asignación de cada una de las señales de resonancia, recurrimos a un experimento bidimensional COSY, por medio del cual fue posible observar los acoplamientos y la asignación de las señales se completó satisfactoriamente (Figuras 6 y 7) considerando que el átomo de hidrógeno en el C6' de la estructura aromática de la bipiridina es el más desprotegido (TABLA 4.7) debido a que se encuentra espacialmente cercano al halogenuro y lejos de la influencia de la anisotropía magnética del anillo aromático.

4.1.1.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

Las Figuras 8, 9 y 10 corresponden a los espectros electrónicos UV-Vis de la 2,2'-bipiridina, el $K_2[RuCl_6 \cdot H_2O]$ y el bisbipyRu respectivamente

Del espectro electrónico de bisbipyRu podemos observar bandas en la región UV que corresponden a transiciones electrónicas, específicamente transferencias de carga de la bipiridina coordinada asignadas como transiciones $\pi^* \leftarrow \pi$. Comparando las longitudes de onda en el complejo y las longitudes de onda de los máximos de absorción en la bipiridina libre es posible observar el desplazamiento de éstas hacia la región de menor energía. Así la coordinación del ligante resulta en el desplazamiento de las energías de transición en aproximadamente 15 nm.

El pico de absorción localizado en 360 nm se asigna a la transferencia $Ru(e_g^*) \leftarrow$ bipiridina (π). La banda localizada en 496 nm se asigna a la transición bipiridina (π^*) \leftarrow $Ru(t_{2g})$. El máximo de absorción localizado en 292 nm constituye la primera transición del ligante coordinado, $\pi^*(bipiridina) \leftarrow \pi(bipiridina)$. La teoría desarrollada en la asignación de las bandas de la bipiridina indica que la banda localizada a 244 nm se asigna a una transición interna del ligante $\pi^* \leftarrow \pi(bipiridina)$ ^{118 128}.

En la Figura 11 se presenta el espectro de bisbipyRu en metanol y agua, de donde es posible apreciar el desplazamiento de los máximos de absorción propios de bisbipyRu. Lo cual confirma las observaciones hechas en el sentido de que tales bandas son dependientes del disolvente¹¹⁸ empleado, por lo cual la posibilidad de una solvólisis no puede descartarse.

4.1.2.- Complejo *cis*-diclorobisfenantrolinarutenio(II), bisphenRu

Este producto se caracterizó empleando las mismas técnicas que se utilizaron para el estudio y establecimiento de la composición de bisbipyRu.

La descripción de la síntesis detallada se presenta en la parte experimental en el apartado 3.3.2.2.

4.1.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El producto obtenido es de color verde pasto, de apariencia microcristalina. El rendimiento de la reacción es del 89.5%. Se trata de un compuesto soluble en la mayoría de los disolventes.

La TABLA 4.8 contiene algunas de las propiedades físicas de este compuesto, mientras que en la TABLA 4.9 se resumen los resultados de la composición porcentual tanto experimental como teórica

TABLA 4.8. Propiedades físicas de bisphenRu

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
Ru(C ₁₂ H ₈ N ₂) ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O	568.42	Verde pasto microcristalino	DMF	+++
			Metanol	+++
			Acetona	+++
			Agua	++
			Etanol	++
			Éter etílico	+

+ Insoluble. ++ parcialmente soluble y +++ soluble

TABLA 4.9. Análisis Elemental de bisphenRu

Elemento	C	N	H
% Experimental	49.49	9.76	3.54
% Teórico	50.71	9.86	3.55

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula mínima Ru(C₁₂H₈N₂)₂Cl₂·2H₂O, que tiene un peso molecular de 568.42 g/mol, generado por la coordinación de dos moléculas de fenantrolina, dos cloruros y dos moléculas de agua de hidratación.

4.1.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo

En la Figura 12 se presenta el espectro IR de la fenantrolina en la región de 4,000 a 450 cm⁻¹, mientras que en la Figura 13 se incluye el espectro de bisphenRu. Nuevamente el espectro muestra una mayor complejidad comparándolo con el espectro del complejo de rutenio de partida. Podemos ver en el espectro bandas características de la fenantrolina. Se puede detectar el desplazamiento de algunas de señales típicas de la fenantrolina en el complejo de coordinación. Esta evidencia nos lleva a sugerir que la coordinación de la fenantrolina se llevó a cabo. La TABLA 4.10 contiene un resumen de la asignación de las señales.

TABLA 4 10. Principales bandas en Infrarrojo de bisphenRu^{145, 146, 147}

BANDAS	$K_2[RuCl_3H_2O]$ cm^{-1}	1,10-fenantrolina cm^{-1}	bisphenRu cm^{-1}
$\nu_{s} O-H$	3500-3200	3382	3412
$\nu_{as} O-H$	3500-3200		
$\delta_s H_2O$	1560	1642	1625
$\rho_r H_2O$	814		
$\rho_w H_2O$	570		
$\nu Ru-O$	430		
$\nu =C-H$		3058	3030
$\delta =C-H$ fuera del plano		1900-1700	1970-1700
$\nu Ar-H$		1600-1400	1600-1400
$\nu N=C$		1616 1586	1592 1564
$\nu C=C$		1560 1502 1422	1498 1444 1423 1406
$\delta =C-H$ en plano		1216-998	1285-912
$\delta =C-H$ fuera del plano		854 778 738	842 770 716

De la tabla anterior hay dos hechos importantes de recalcar. Primero, las bandas atribuidas a la vibración del enlace $N=C$ aromático, presentan un pequeño desplazamiento hacia la región de menor frecuencia, contrario a lo esperado, pues se sabe que al coordinarse el ligante el orden de enlace se incrementa por lo cual, la fuerza del enlace $C=N$ es mayor, esta evidencia se ha confirmado en complejos hierro-fenantrolina¹⁵⁴, sin embargo, el rutenio (II) tiene un comportamiento diferente.

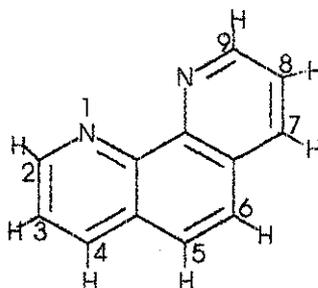
También es importante mencionar que las bandas de vibración del enlace $C=C$ se desplazaron a bajas frecuencias.

Nuevamente estudiando con mayor detalle las bandas "diagnóstico" de la coordinación de la fenantrolina, como en el caso de la 2,2'-bipiridina, observamos que la banda en $1,048\text{ cm}^{-1}$ en el ligante libre se desplaza a una frecuencia mayor, $1,090$ al coordinarse. Por otro lado la banda intensa a 854 cm^{-1} (ligante libre), se desplaza a una menor frecuencia una vez coordinada, 842 cm^{-1} . Además es posible ver la formación de la banda satélite en 770 cm^{-1} .

4.1.2.3.- Espectroscopía de RMN ¹H

El espectro de RMN ¹H de la 1,10-fenantrolina está descrito en la literatura^{155 156 157 158 159} A continuación se describen brevemente los detalles considerados para la asignación de cada una de las señales presentes en su espectro de RMN ¹H

En términos generales el espectro de resonancia consta de cuatro señales atribuidas a los cuatro hidrógenos magnéticamente diferentes, aun cuando en realidad son 8 los átomos de hidrógeno presentes en el ligante, y por la simetría de la molécula solamente 4 son diferentes en la RMN ¹H, los cuales se representan de la siguiente manera:



Esquema 4.4 Representación de la molécula 1,10-fenantrolina

En la Figura 14 mostramos el espectro de RMN ¹H de la fenantrolina pura con la correspondiente asignación de las bandas a los hidrógenos en la fenantrolina. Dicha asignación se fundamenta en el efecto de desprotección sobre los hidrógenos más próximos al átomo de nitrógeno, especialmente hablando, por las interacciones transmitidas a través de la resonancia propia de la molécula y a través del desarrollo de las teorías de resonancia que consideran a la fenantrolina como dos sistemas independientes, un sistema ABC (constituido por los átomos de hidrógeno 2, 3 y 4; 9, 8, 7) y un sistema AB (protones 5 y 6). Los datos del espectro de este ligante se muestran en la TABLA 4.11.

TABLA 4.11. Datos de RMN ¹H en ppm de la 1,10-fenantrolina

	H 2,9	H 3,8	H 4,7	H 5,6
1,10-fenantrolina	9.096-9.084 m	7.766-7.742 m	8.482-8.462 m	7.971 s
m=multiplete, s=singulete, d=doblete, t=triplete				

Cuando este ligante se encuentra coordinado a un metal, en complejos tipo $[M(\text{phen})_2X_2]^{n+}$, en conformación *trans* no se presentan grandes desplazamientos de las señales. En especial, las señales asignadas a los protones 2(9) y 3(8), son las que muestran mayor desplazamiento a frecuencia alta y baja, respectivamente, que se han atribuido a interacciones de tipo no enlazante entre los protones y el ion metálico.

Por otra parte en complejos con dos moléculas de fenantrolina en conformación *c/s*, el espectro se vuelve mucho más complejo. Analizando los espectros de bisphenRu (Figuras 15, 16, 17 y 18), podemos observar que la complejidad se incrementa considerablemente, sin embargo, también es posible detectar que la muestra no es pura, pues existen algunas señales que no pueden considerarse como parte del espectro de este complejo debido a que no presentan acoplamiento con otras señales y a que las integraciones son aproximadamente del 10% de las que si se considera pertenecen a bisphenRu.

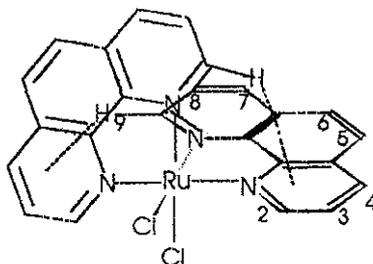
Es posible detectar la presencia del complejo en conformación *c/s* por el doblete localizado por arriba de 10.1 ppm que se atribuye al protón 2, que sufre un efecto de desplazamiento a mayor frecuencia, como se esperaba, debido a la mayor proximidad espacial con el cloro coordinado al metal y el doblete de dobletes localizado a aproximadamente 7.3 ppm, del protón 9, comportamiento atribuido a un efecto de desplazamiento a menor frecuencia producto de la interacción con la anisotropía magnética del anillo aromático vecino.

Por la presencia del singulete en 8.386 ppm, en el cual no se presenta acoplamiento, podemos considerar que se tiene una impureza del ligante puro, aunque es posible también que el producto sea una mezcla del complejo en configuración *trans*¹⁵³. En la TABLA 4.12 se resumen las características del espectro de RMN ¹H del bisphenRu y se compara con el ligante libre. Para la correcta asignación de las señales se llevó a cabo un experimento COSY de bisphenRu, el cual además de ayudarnos en la asignación sugiere claramente la presencia de las impurezas ya que no es posible detectar acoplamiento entre algunas de las señales además de que las intensidades son del 10% de las intensidades de los picos asignados al complejo bisphenRu. En la Figura 18, se indica la asignación de los protones, en función del análisis de la evidencia mostrada en el COSY.

TABLA 4.12. Datos de RMN ¹H en ppm de bisphenRu y 1,10-fenantrolina

	H 2	H 3	H 4	H 5	H 6	H 7	H 8	H 9
bisphenRu	10 289-10 273 m	8 784-8 704 m	8 253-8 212 m	8 159-8 109 m	8 087-8 070 d	7 760-7 742 m	7 358-7 314 m	
1,10-fenantrolina	9 096-9 084 m	7 766-7 742 m	8 482-8 462 m	7 971 s	8 482-8 462 m	7 766-7 742 m	9 096-9 084 m	

m=multiplete, s=singulete, d=doblete, f=triplete



4.1.2.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

Las Figuras 19 y 20 corresponden respectivamente a los espectros UV-Vis de la 1,10-fenantrolina y bisphenRu. El espectro del complejo de rutenio empleado como reactivo en la síntesis de bisphenRu, se encuentra en la Figura 9.

El espectro electrónico de bisphenRu presenta bandas en la región UV que corresponden a transferencias de carga de la fenantrolina tipo $\pi^* \leftarrow \pi$. Puede observarse la generación de un pequeño desplazamiento en la longitud de onda de transiciones electrónicas comparando aquellas en el ligante libre y en el ligante una vez coordinado.

Así la coordinación del ligante resulta en el desplazamiento hacia la región de mayor energía de las transiciones en aproximadamente de 5 nm

Como en el caso de bisbipyRu, bisphenRu presenta dos bandas en la región del visible, en 418 y 444 (agua), bastante próximas entre sí lo cual hace difícil la identificación de cada una. La banda localizada en 418 nm se asigna a la transferencia de carga, $Ru(e_g^*) \leftarrow \text{fenantrolina}(\pi)$. La banda localizada en 444 nm se asigna a la transición fenantrolina $(\pi^*) \leftarrow Ru(t_{2g})$.

En la misma Figura 20 se presentan los espectros de bisphenRu en metanol y agua, de donde es posible apreciar el desplazamiento de los máximos de absorción, lo cual claramente muestra que las bandas en el espectro electrónico de bisphenRu son dependientes del disolvente¹¹⁸ empleado y es posible que se este llevando a cabo una reacción de solvólisis.

4.1.3.- Complejo cloruro de trisfenantrolinarutenio(II), trisphenRu

trisphenRu se caracterizó por medio de análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica y espectroscopía UV-Vis en solución. El procedimiento de síntesis se describe ampliamente en la parte experimental

La necesidad de llevar a cabo esta síntesis surgió de la posibilidad de que compuestos trinucleares de rutenio, análogos al RR¹²⁵, pudieran presentar procesos de descomposición y cuyo producto fueran los mononucleares ya que nos percatamos que, después de grandes periodos de tiempo en solución acuosa, estos análogos al RR se descomponen, pues la coloración de estas soluciones, de magenta oscuro pasa a soluciones de color anaranjado. Consultando la literatura nos encontramos que los compuestos de rutenio(II) que poseen tres moléculas de fenantrolina o bipyridina coordinadas, tienen colores anaranjados característicos, por lo cual nos resultaba útil contar con este compuesto para análisis posteriores. Incluso fue conveniente probar su actividad biológica y de esta forma descartar, si se llevaba a cabo un proceso de descomposición del complejo durante la medición de la actividad biológica de los análogos al RR, que estuviéramos cuantificando la actividad inhibitoria generada por el trisquelato de rutenio.

Se cuenta con vasta literatura respecto a la caracterización y estudio de la reactividad de los complejos [Ru(bipyridina)₃]³⁺ y [Ru(bipyridina)₃]²⁺. Sin embargo, la información existente sobre la reactividad de análogos con fenantrolina es bastante escasa.

A continuación se describen los resultados obtenidos de la caracterización de este complejo:

4.1.3.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El producto obtenido, trisphenRu es un compuesto de color anaranjado brillante microcristalino. El rendimiento de la reacción fue del 90.4%. En la TABLA 4.13 se registran las composiciones porcentuales tanto calculada como la experimental y en la TABLA 4.14 se incluyen algunas de sus propiedades físicas.

TABLA 4.13 Análisis Elemental de trisphenRu

Elemento	C	N	H
% Experimental	51.21	10.37	4.34
% Teórico	51.55	10.02	4.57

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula mínima Ru(C₁₂H₈N₂)₃Cl₂·7H₂O, que tiene un peso molecular de 838.71 g/mol, y considera la

coordinación de las 3 moléculas de fenantrolina y la presencia de siete moléculas de agua de cristalización.

TABLA 4 14. Propiedades físicas de trisphenRu

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
Ru(C ₁₂ H ₈ N ₂) ₃ Cl ₂ ·7H ₂ O	837.71	Anaranjado brillante Microcristalino	DMF	+++
			Acetona	+++
			Etanol	+++
			Metanol	+++
			Éter	++
			Agua	+

+ insoluble. ++ parcialmente soluble y +++ soluble

4.1.3.2.- Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de IR medio de trisphenRu se puede consultar en la Figura 21, mientras que en la TABLA 4 15 se resumen las principales bandas de vibración y sus asignaciones del trisphenRu y de los reactivos empleados en su síntesis.

En el caso de trisphenRu nuevamente la complejidad del espectro se ve incrementada, comparándolo con el complejo de rutenio de partida. Sin embargo, un análisis detallado de las señales nos permite detectar que hay desplazamiento de las señales a frecuencias menores, similar al comportamiento obtenido en el caso de bisphenRu

Las bandas atribuidas a las vibraciones de elongación del enlace C=N muestran desplazamientos a bajas frecuencias, de poca magnitud en todos los casos pero perceptibles¹⁴⁹, evidencia reproducida en muchos complejos de coordinación con este ligante. De hecho, este es el comportamiento más divergente que se presenta en la 1,10-fenantrolina en comparación con compuestos aromáticos más simples como la piridina¹⁵⁴.

Como en el caso de la bipyridina, las bandas en frecuencias de 854 y 738, típicas y de fuerte intensidad presentan los desplazamientos más significativos; en trisphenRu estas bandas se desplazan a 845 y 721 cm⁻¹.

También es posible del espectro identificar la presencia de agua de hidratación, gracias a la banda muy intensa localizada en 3405 cm⁻¹.

TABLA 4 15. Principales bandas en Infrarrojo de trisphenRu^{145, 146, 147}

BANDAS	K ₂ [RuCl ₅ H ₂ O] cm ⁻¹	1,10-fenantrolina cm ⁻¹	trisphenRu cm ⁻¹
v _s O-H	3500-3200	3382	3405
v _{as} O-H	3500-3200		3405
δ _s H ₂ O	1560	1642	1628
ρ _r H ₂ O	814		
ρ _w H ₂ O	570		
v Ru-O	430		
v =C-H		3058	3041
δ =C-H fuera del plano		1900-1700	1900-1700
v Ar-H		1600-1400	1600-1400
v N=C		1616 1586	1598 1577
v C=C		1560 1502 1422	1508 1492
δ =C-H en plano		1216-998	1222-1000
δ =C-H fuera del plano		854 778 738	845 774 722

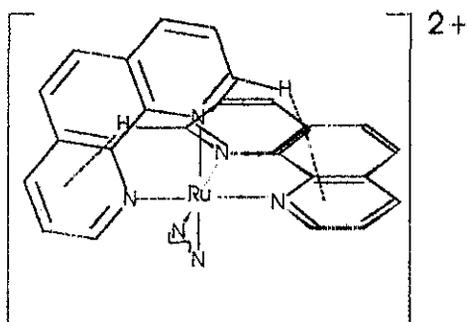
4.1.3.3.- Espectroscopía de RMN ¹H

Los espectros de RMN ¹H, tanto de la 1,10-fenantrolina, como de trisphenRu se incluyen en las Figuras 14, 22 y 23

El espectro de trisphenRu es bastante sencillo, según lo esperado y no refleja la presencia de alguna impureza. Es posible ver de esta manera que las tres fenantrolinas coordinadas al metal se encuentran de forma tal que son magnética y químicamente equivalentes, pues mediante resonancia sólo se obtienen 4 señales, como en el caso de la fenantrolina no coordinada, y no ocho como el caso de bisphenRu. Existe, sin embargo, una diferencia considerable en el patrón de señales comparándolo con la fenantrolina, lo cual representa en este caso una evidencia de que este ligante se encuentra coordinado. Esta evidencia la constituye el movimiento del doblete de dobletes asignado a los protones en posición 2 y 9 a la región de frecuencia baja o campo alto. Este desplazamiento es el de mayor magnitud de todas las señales del espectro

Los protones en las posiciones 2 y 9 se encuentran influenciados solamente por el metal y el átomo de carbono al cual se encuentra enlazado dicho protón, afirmación sustentada en el estudio de las distancias entre los átomos en el complejo, obtenidas mediante análisis de rayos-X^{160, 161}. Por lo tanto este desplazamiento a campo alto puede

explicarse considerando que como producto de la interacción del campo eléctrico del ion metálico, en el enlace C-H, la densidad electrónica se desplaza hacia el átomo de hidrógeno o estimando la formación de una interacción Metal-H, como la que se presenta en los hidruros de metales de transición^{162 y 163}. También puede atribuirse una interacción con las moléculas de agua existentes que le proporcionan densidad electrónica a los átomos de hidrógeno. Puede considerarse además, como en el caso de los complejos bisustituidos, la interacción con el efecto anisotrópico magnético del anillo aromático (ESQUEMA 4.4), que provea de densidad de carga, desplazando la resonancia a campo fuerte¹⁶⁰.



ESQUEMA 4.4. Representación gráfica de organización espacial en el complejo trisphenRu (N-N = 1,10-fenantrolina)

En la TABLA 4.16 se resumen los datos principales de los espectros de trisphenRu y el ligante libre obtenidos mediante esta técnica:

TABLA 4.16. Datos de RMN ¹H en ppm de trisphenRu y 1,10-fenantrolina

	H 2,9	H 3,8	H 4,7	H 5,6
trisphenRu	8.099-8.077 m	7.798-7.753 m	8.806-8.774 m	8.402 s
1,10-fenantrolina	9.096-9.084 m	7.766-7.742 m	8.482-8.462 m	7.971 s
m=multiplete, s=singulete, d=doblete, t=triplete				

Es importante mencionar que estudios previos¹⁶¹ demuestran que el desplazamiento a campo alto de los protones en las posiciones 2 y 9 de la fenantrolina no son dependientes del disolvente. Este hecho puede explicarse por la incapacidad de las moléculas de disolvente

para penetrar dentro del ion complejo lo suficiente como para modificar las interacciones existentes en el catión.

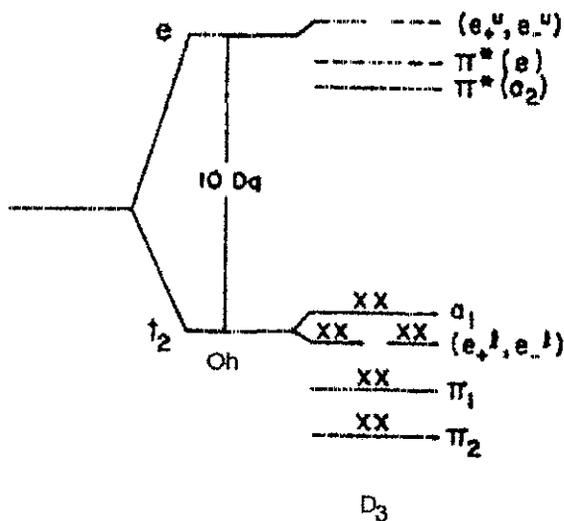
4.1.3.4.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

Existen ya en la literatura numerosos estudios en la asignación de bandas y transiciones electrónicas en los espectros UV-vis de este tipo de compuestos^{164, 165, 166, 167, 168}

En la Figura 24 se presenta el espectro electrónico de trisphenRu, en disolución etanólica.

Para la asignación de las bandas se consideró que el campo ligante alrededor del ion rutenio(II) tienen una simetría prácticamente octaédrica. El ión rutenio(II) tiene una configuración electrónica $4d^6$. Tres de los orbitales d se encuentran ocupados (xz, yz, y xy) mientras que los dos restantes están desocupados (x^2-y^2 y z^2).

En un campo ligante octaédrico perfecto, los orbitales d ocupados son degenerados y tienen una simetría t_{2g} , y los orbitales desocupados, también degenerados cuentan con una simetría e_g . Una vez que la simetría de la estructura es modificada por la presencia del ligante, la degeneración de los orbitales se destruye y por tanto se diferencian energéticamente entre sí. Los complejos de rutenio(II) coordinados a ligantes con N como sitio de coordinación al metal se asumen con configuración d^6 de bajo espín, ya que se sabe que los grupos amino y los heterociclos nitrogenados generan este campo fuerte. Dado que la nueva simetría del complejo trisustituido es D_3 , puede establecerse con bastante precisión que el ordenamiento de los orbitales muestra una estructura como la descrita en el ESQUEMA 4.5:



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ESQUEMA 4.5 Diagrama de orbitales moleculares en complejos con configuración d^6 y simetría D_3

En el esquema anterior se registran además de los orbitales del núcleo metálico, los orbitales de la fenantrolina (válido para bipyridina también), los dos orbitales π (de enlace) y los dos orbitales π^* (antienlace) del ligante conjugado. En este caso se asume que los electrones se encuentran apareados, lo cual se confirma con el diamagnetismo observado en el complejo. Las configuraciones excitadas se generan mediante la promoción de los electrones en los orbitales d a los orbitales $\pi^*(a_2)$ ó $\pi^*(e)$.

Del espectro electrónico podemos por tanto concluir que los máximos de absorción en la región UV corresponden a las transferencias de carga internas en la fenantrolina ($\pi^* \leftarrow \pi$). Comparando con el espectro del ligante libre es posible detectar el desplazamiento de las señales. Por otro lado, las bandas en 422 y 446 se asignan a transiciones electrónicas permitidas por Laporte del tipo $\pi^* \leftarrow t_{2g}$, a las cuales se les atribuye el color anaranjado oscuro intenso característico de este tipo de compuestos.

A últimas fechas se están realizando múltiples investigaciones en el sentido de determinar el origen de la luminiscencia típica de este tipo de compuestos, especialmente en el caso de los derivados de bipyridina. Gracias a la propiedad de luminiscencia en estos compuestos se ha establecido una reactividad interesante. Teóricamente existe la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis de la molécula de agua mediante la excitación y reacciones fotoquímicas acopladas de estos compuestos. Estas relaciones pueden dar resultados particularmente útiles en el entendimiento de procesos biológicos más complejos, como lo es la fotólisis de agua en la fotosíntesis de las plantas superiores.

4.2. - Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de mononucleares

La síntesis alterna descrita en este trabajo de tesis se retomó del artículo cuyos autores son Meyer, Geselowitz y Kutner¹²⁹.

La necesidad de evaluar otra ruta sintética surge de la intención de obtener una serie de compuestos análogos al RR con diferentes ligantes, bastante difícil partiendo de la síntesis descrita en nuestro trabajo previo¹²⁵. De ese trabajo podemos concluir que las condiciones de reacción favorecen exclusivamente la coordinación de fenantrolina a la estructura metálica, pues los resultados empleando ligantes como el cianuro, aminas secundarias (como el picdien), aminas primarias (como la etilendiamina) e inclusive una estructura similar a la fenantrolina, como lo es la bipyridina, no fueron satisfactorios.

En el trabajo de Meyer se describe la síntesis y caracterización de un análogo al RR con bipyridina sustituida a la estructura metálica trinuclear. Decidimos entonces sintetizar dicho

complejo y llevar a cabo la síntesis del análogo con fenantrolina, para de esta manera contar con mayor evidencia de la reactividad de estos complejos análogos al RR.

4.2.1.- Síntesis y caracterización del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisbipiridinarutenio(III))bisbipiridinarutenio(IV), RRBpy1

Como ya se mencionó, la síntesis alterna tiene una lógica de construcción diferente a la síntesis diseñada en nuestro grupo de investigación. Meyer parte de compuestos mononucleares disustituidos previamente con el ligante de interés (en este caso bipiridina y fenantrolina) y un sitio lábil que pueda dar finalmente origen a las especies trinucleares; por otra parte, la síntesis diseñada en nuestro grupo parte de la especie trinuclear y se induce la sustitución del ligante amino por fenantrolina. También es importante mencionar que esta síntesis es reproducible.

A continuación se registran los resultados obtenidos de la caracterización de este compuesto:

4.2.1.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El sólido obtenido al final de las recristalizaciones y lavados, RRBpy1, es café rojizo oscuro microcristalino, características propias del complejo descrito por Meyer. El rendimiento de la reacción indica un porcentaje del 42.19%. En la TABLA 4.17 concentramos la composición tanto calculada como experimental a partir de una fórmula propuesta y en la TABLA 4.18 se anexan algunas propiedades físicas.

Es importante mencionar que en DMSO, etanol, metanol y acetona, las disoluciones de RRBpy1, primero rojizas oscuras se tornan con el tiempo verde esmeralda. Sin embargo, los colores de las disoluciones frescas, muestran bastante similitud a las disoluciones del RR, además de ser muy intensas.

TABLA 4.17. Análisis Elemental de RRBpy1

Elemento	C	N	H
% Experimental	35.07	8.13	3.16
% Teórico	35.48	8.28	3.28

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula mínima $\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{C}_{10}\text{N}_2\text{H}_8)_6(\text{H}_2\text{O})_9(\text{ClO}_4)_6$, que tiene un peso molecular de 2031.17 g/mol, lo cual implica

como está descrito en la fórmula anterior que hay seis moléculas de bipyridina coordinadas, dos de agua y como contraion se tiene al perclorato además de 7 moléculas de agua de hidratación.

TABLA 4.18. Propiedades físicas de RRBpy1

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
$Ru_3O_2(C_{10}N_2H_8)_6(H_2O)_2(ClO_4)_6 \cdot 7H_2O$	2031.17	rojo oscuro Microcristalino	DMF	+++
			DMSO	+++
			Acetona	++
			Agua	++
			Etanol	+
			Metanol	+
			Éter	+

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

La precipitación de este compuesto es difícil, inicialmente se obtiene una sustancia de consistencia de gel, que tras múltiples lavados y recristalizaciones con solución de perclorato de sodio al 1% es posible recuperarlo

4.2.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo

La caracterización de este compuesto mediante espectroscopía infrarroja en la región media se realizó a partir del espectro contenido en la Figura 25. Los espectros de infrarrojo de las materias primas, es decir, 2,2'-bipyridina y el mononuclear bisbipyRu, se encuentran en las Figuras 2 y 3; finalmente, la TABLA 4.19 presenta las bandas principales y su asignación.

El espectro de IR de RRBpy1 muestra un comportamiento similar a bisbipyRu, con algunas diferencias que denotan cambios en la estructura química del compuesto, las cuales son expuestas claramente en la TABLA 4.19. Un análisis detallado de las señales nos permite detectar que en RRBpy1 hay una menor definición de las señales debidas a las vibraciones de los enlaces en las estructuras aromáticas. También es posible detectar el desplazamiento de algunas señales, en algunos casos a frecuencias altas y en otros a frecuencias bajas

TABLA 4.19. Principales bandas en Infrarrojo de RRBpy1

BANDAS	2,2'-bipiridina cm ⁻¹	bisbipyRu cm ⁻¹	NaClO ₄	RRBpy1
$\nu_{\text{O-H}}$		3442		3425
$\nu_{\text{as O-H}}$		3442		
$\delta_{\text{s H}_2\text{O}}$		1636		1634
$\rho_{\text{r H}_2\text{O}}$		-		-
$\rho_{\text{w H}_2\text{O}}$		-		-
$\nu \text{ Ru-O}$		424		422
$\nu =\text{C-H}$	3100-3000	3096-3038		3107-3060
$\delta =\text{C-H}$ fuera del plano	1970-1610	1600-1522		1900-1603
$\nu \text{ Ar-H}$	1600-1400	1459-1418		1600-1422
$\nu \text{ N=C}$	1578 1556	1636 1600		1634 1603
$\nu \text{ C=C}$	1452 1415	1458,26 1418,07		1467 1422
$\delta =\text{C-H}$ en plano	1250-990	1261-1018		1145-1086 cubiertas por contraión
$\delta =\text{C-H}$ fuera del plano	757	763,727 657, 648		770 637,626
$\nu_3 \text{ Cl-O}$			1170-1050 banda ancha e intensa	1145, 1115 y 1086
$\nu_4 \text{ Cl-O}$			635-615	636 y 626

Es importante recalcar que del espectro es posible detectar la presencia de agua de cristalización, como queda de manifiesto por las señales a 3,400 y 1,633 cm⁻¹. Puede además observarse la banda de elongación del enlace Ru-O en 422 cm⁻¹, que se sugiere es debido a la presencia de enlaces μ -oxo.

Las bandas atribuidas a las vibraciones de elongación del enlace C=N aromático, muestran desplazamientos a frecuencias ligeramente mayores, que se atribuyen en principio y según la teoría vibracional al incremento en la masa reducida debido al aumento de complejidad del nuevo compuesto, aunque también deben estar involucrados efectos de localización de la carga en las estructuras aromáticas producto de la coordinación.

También las vibraciones de elongación del enlace N=C aromático se muestran ligeramente corridas a mayor frecuencia y en el caso de la banda en 1603 es posible detectar un incremento de su intensidad.

La coordinación de los percloratos a metales de transición se observa predominantemente cuando se trabaja con disolventes no acuosos, que no es el caso. El espectro IR medio del perclorato de sodio muestra solamente dos bandas atribuidas a las vibraciones de elongación del enlace Cl-O, una intensa en el intervalo de 1,170-1,050 cm⁻¹ y

otra débil en $635-615\text{ cm}^{-1}$. La simetría del ion perclorato, T_d , presenta nueve grados de libertad vibracional, los cuales se distribuyen entre 4 modos de vibración. De las 4 vibraciones solamente ν_3 y ν_4 son activas por infrarrojo, y la banda ν_3 es bastante intensa y ancha

En RRBpy1, el multiplete localizado en el intervalo de los $1,145-1,085\text{ cm}^{-1}$ denota la disminución de la simetría del perclorato, y en tal caso puede atribuirse a la coordinación del perclorato al metal o a efectos de red cristalina o a acoplamientos entre vibraciones de iones perclorato. Si bien el ambiente químico generado por la red de cristalización puede ser responsable de una disminución de la simetría y, por ende, al incremento de los modos de vibración, la contribución normalmente es mínima¹⁴⁵⁻¹⁶⁹, aun cuando si se han detectado desdoblamientos de la banda por efectos de la red. En la Figura 26 se presenta el espectro de infrarrojo lejano de RRBpy1 en donde es posible identificar esta banda en 335 cm^{-1} . Este hecho podría implicar que el perclorato se encuentre coordinado al rutenio. Sin embargo es necesario realizar otras pruebas con la finalidad de corroborar esta evidencia vibracional

4.2.1.3.- Momento magnético

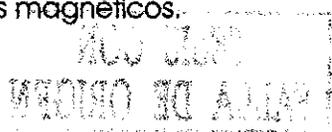
Se determinó experimentalmente la susceptibilidad magnética, la cual nos permitió calcular el momento magnético de RRBpy1 a $20\text{ }^\circ\text{C}$, el cual fue de 2.80 MB . Es ya sabido que el RR, complejo de valencia mixta con Ru(III) y Ru(IV), es un compuesto diamagnético, sin embargo, RRBpy1 no lo es, lo cual sugiere la posibilidad de la presencia de alguna impureza o que simplemente RRBpy1 sea un compuesto paramagnético.

4.2.1.4.- Espectroscopía de RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H tanto de la 2,2'-bipiridina como de bisbipyRu, se han discutido ampliamente en la sección 4.1.1.3. Los espectros de RRBpy1 se presentan en las Figuras 27, 28, 29 y 30. Se realizaron en DMSO con TMS como estándar interno. Es importante recalcar la complejidad de los espectros (Figura 27), aun después del intercambio con agua deuterada (Figuras 28 y 29).

Del espectro en la Figura 28, podemos observar la presencia de señales a campo alto, que no se esperaban, señales que aparecen 2 ppm . También es importante enfatizar que se generan señales en el espectro hasta 16 ppm , obviamente inesperado considerando la especie sintetizada.

En su trabajo, Meyer y colaboradores no describen el estudio mediante RMN ^1H ni se registran los momentos magnéticos.



El espectro es bastante complejo en la región aromática, el cual puede explicarse en función de la existencia de diferentes ambientes magnéticos para las bipyridinas y aún cuando la adición de agua deuterada simplifica algunas señales, no es suficiente para hacer un análisis completo. Es posible además observar que las señales en la región aromática no están en una línea base recta, lo cual se puede deber a la presencia de especies paramagnéticas.

Al dejar pasar algún tiempo (2 días) nos percatamos que la disolución adquirió una coloración verde botella intenso, casi negra. Se determinó el espectro de RMN ^1H (Figura 30), obteniéndose resultados aun más inesperados. Es posible detectar la presencia de señales hasta -30 ppm en la RMN ^1H , y señales hasta 25 ppm.

Esta evidencia muestra claramente que se están llevando a cabo reacciones en disolución ya que no es posible proponer que se debe a reacciones de desplazamiento de ligante, por el DMSO, las cuales no generarían desplazamientos tan pronunciados.

Los espectros de RMN ^{13}C , que no se incluyen, tienen un comportamiento muy similar, son bastante complejos y con señales no esperadas.

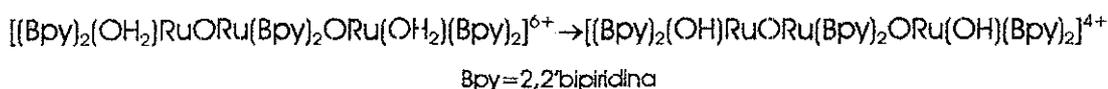
De este análisis observamos que el compuesto obtenido no es el esperado aun cuando el análisis elemental dio buenos resultados.

4.2.1.5.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

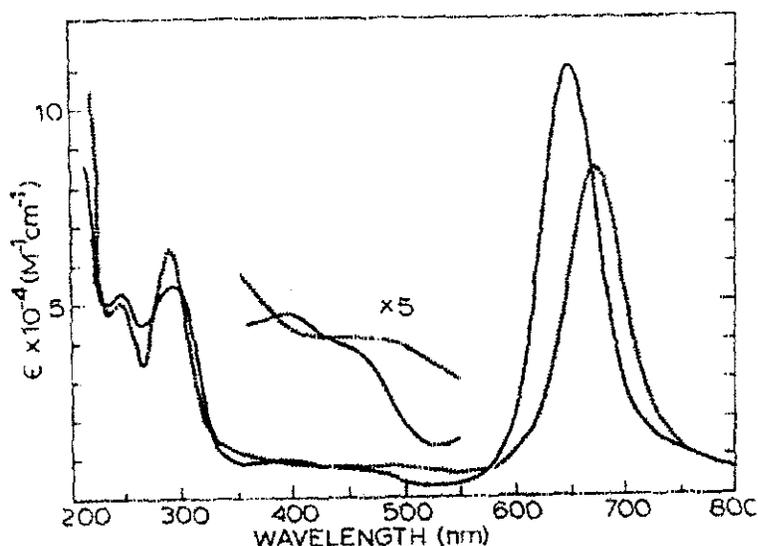
Meyer y colaboradores determinan el espectro electrónico de RRBpy1, el cual se muestra en el ESQUEMA 4.6. En la Figura 31 se presenta el espectro UV-Vis obtenido por nosotros para RRBpy1, tanto en agua como en solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M.

Es importante hacer notar la diferencia de los espectros en ambas condiciones.

Los autores sostienen que en medio básico, el complejo trinuclear pierde un protón de cada una de las moléculas de agua coordinadas al metal. Aun cuando podría pensarse que esa es la razón de la diferencia de los espectros, y por las demás evidencias experimentales que hemos encontrado creemos que existe una reactividad mucho más compleja que la descrita por Meyer. Éste no registran en su artículo el espectro electrónico del trinuclear en agua, ni mencionan las razones por las que no lo hacen.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 4.6 Espectro UV-vis de RRBpy1. El espectro en línea punteada se realizó empleando como disolvente NaOH, 0.1 M. El espectro en línea continua, empleó ácido tetrafluorometanosulfónico (HTFMS) 0.1 M. Geselowitz et al. *Inorg. Chem.* 1986;25:2015-2023

Por otra parte, el espectro en medio básico de RRBpy1 es muy similar al espectro electrónico del trinuclear descrito por Meyer, lo cual nos lleva a suponer que obtuvimos el mismo compuesto. Sin embargo, se presentan diferencias en los coeficientes de extinción molares obtenidos. Meyer informa que sus máximos en 673 nm y 475 nm tienen coeficientes de extinción molar de 80400 y 7800 $M^{-1}cm^{-1}$ respectivamente, mientras que RRBpy1 presenta en sus máximos de absorción en 660 nm y 468 nm coeficientes de extinción de 78429 y 45684 $M^{-1}cm^{-1}$ respectivamente. Se sugiere de estos resultados que RRBpy1 contiene una impureza capaz de generar esta diferencia, y el efecto perceptible en RMN 1H . Sin embargo, con el tiempo la solución en medio básico presenta un cambio importante de coloración de rojo oscuro a violeta o azul marino, cuyo espectro indica desplazamiento e incremento en la intensidad del máximo en 668 nm y la desaparición del máximo en 468 nm (espectro no reportado). Por lo tanto RRBpy1 puede en realidad consistir en una mezcla del trinuclear descrito por Meyer y uno de los intermediarios de la reacción.

También se determinó el espectro electrónico de RRBpy1 en ácido trifluorometanosulfónico (HTFMS) 0.1 M (Figura 32). Nuevamente existe gran similitud entre este espectro y el descrito por Meyer, pero también diferencias. Los máximos de absorción de RRBpy1, localizados en 398, 469 y 651 nm presentan coeficientes de extinción molar de 57,979, 44,042 y 139,362 $M^{-1}cm^{-1}$, respectivamente. Meyer, por su parte, encontró que los

máximos de absorción del trinuclear en medio ácido están en 653, 462 y 393nm con coeficientes de extinción del orden de 105,000, 7,200 y 9,990 M⁻¹cm⁻¹. Estos resultados son consistentes con los resultados en medio básico, pues nuevamente los coeficientes de extinción de RRBpy1 son mayores a lo esperado, por lo cual podemos suponer la presencia de alguna impureza, que creemos es un intermediario de la reacción.

El espectro electrónico de RRBpy1 es bastante diferente del espectro del RR, pues además de presentarse una banda adicional en una longitud de onda de 660 nm, los coeficientes de extinción son aproximadamente 6 veces mayores que los típicos coeficientes de extinción molar del RR. Por lo anterior tenemos serias dudas sobre la identidad ó caracterización realizada por Meyer, sin embargo se requiere de más investigación

Además, en su artículo, Meyer describe el espectro electrónico del RR con bandas que en realidad no pertenecen al RR sino a algunas impurezas, las cuales presentan sus máximos de absorción en 758 nm y 245 nm, que corresponden al violeta de rutenio y derivados nitrosilados de rutenio (ver ESQUEMA 1.19 del CAPÍTULO 1).

Finalmente, la reactividad observada en este compuesto es totalmente diferente a la reactividad de análogos por sustitución de ligante estudiados por nosotros, por ejemplo RRPhen2, que retomaremos al final de esta sección.

4.2.2.- Síntesis y caracterización del perclorato de di- μ -oxo-bis(acuabisfenantrolinarutenio(III))bisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen3

Esta síntesis, una modificación de la síntesis del análogo al RR con bipyridina descrita por Meyer y colaboradores, es reproducible

Enseguida expondremos la evidencia química obtenida en la caracterización de RRPhen3:

4.2.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

La recuperación de este producto resultó más sencilla que en el caso de RRBpy1, pues tras los lavados con éter, la consistencia era la de un sólido fácilmente recuperable del papel filtro, no gel.

El sólido final, después de las recristalizaciones con solución de NaClO₄, es de color café oscuro microcristalino, muy similar a RRBpy1. Finalmente después de secar el compuesto previamente recristalizado, se obtiene un rendimiento de 48.8%

La composición porcentual, tanto calculada como experimental a partir de la fórmula propuesta, se muestra en la TABLA 4.20 y en la TABLA 4.21 se resumen algunas propiedades físicas.

TABLA 4.20. Análisis Elemental de RRPhen3

Elemento	C	N	H
% Experimental	38.52	7.0	3.66
% Teórico	39.76	7.73	3.06

TABLA 4.21. Propiedades físicas de RRPhen3

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
$Ru_3O_2(C_{12}N_2H_8)_6(H_2O)_2(ClO_4)_6 \cdot 7H_2O$	2055.17	Café rojizo oscuro Microcristalino	DMF	+++
			DMSO	+++
			Acetona	++
			Agua	++
			Etanol	+
			Metanol	+
Éter	+			

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

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula $Ru_3O_2(C_{12}N_2H_8)_6(H_2O)_9(ClO_4)_6$, que cuenta con un peso molecular de 2055.17 g/mol, según lo cual RRPhen3 tiene seis moléculas de 1,10-fenantrolina coordinadas, dos de agua y como contraion se tiene al perclorato además de 7 moléculas de agua de hidratación.

Las disoluciones de RRPhen3 en DMSO, acetona, acetonitrilo y agua con el tiempo cambian su color de vino oscuro a verde, sin embargo es importante mencionar que los tiempos son del orden de segundos, mucho menores que los tiempos en los cuales se detecta este cambio en RRBpy1. Este incremento de reactividad puede explicarse gracias a las propiedades que la fenantrolina aporta. Por ejemplo, se puede recordar que en los complejos mononucleares de rutenio se estudia la velocidad de la reacción de reducción de Ru(III) a Ru(II), trisustituido con bipyridina, que es rápida, pero que puede detectarse mediante la técnica de stopped flow. Sin embargo, la misma reacción con complejos de fenantrolina no se puede estudiar debido a que dicha conversión se lleva a cabo de manera instantánea.

Los cambios físicos de la mezcla de reacción durante la síntesis son muy similares a los cambios registrados por RRBpy1

4.2.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojo medio de este compuesto se muestra en la Figura 33. Los espectros de infrarrojo de las materias primas, es decir, 1,10-fenantrolina y bisphenRu se concentran en las Figuras 12 y 13 respectivamente; finalmente, en la TABLA 4.22 se resume la asignación de las señales del espectro.

TABLA 4.22. Principales bandas en Infrarrojo de RRPhen3

BANDAS	1,10-fenantrolina cm ⁻¹	bisphenRu cm ⁻¹	NaClO ₄	RRPhen3
ν_s O-H	3382	3412		3426
ν_{as} O-H				
δ_s H ₂ O	1642	1625		1629
ρ_r H ₂ O		-		-
ρ_w H ₂ O		-		-
ν Ru-O		-		-
ν =C-H	3058	3029.92		3050
δ =C-H fuera del plano	1900-1700	1970-1700		1921
ν Ar-H	1600-1400	1600-1400		1629-1340
ν N=C	1616 1586	1592 1564		1608 1517
ν C=C	1560 1502 1422	1497.86 1444.33 1422.65 1405.66		1428 1385 1341
δ =C-H en plano	1216-998	1285-912		cubiertas por contraion
δ =C-H fuera del plano	854 778 738	842 770 716		846 777 718
ν_3 Cl-O			1170-1050 banda ancha e intensa	1143 1114 1084
ν_4 Cl-O			635-615	628

Es posible detectar del espectro, el agua de hidratación presente en este complejo. La mayoría de las señales presentan un desplazamiento a mayor frecuencia, aún cuando la intensidad de las señales se ve disminuida por la presencia de la señal intensa del perclorato. El espectro de RRPhen3 no es muy similar al de bisphenRu, aunque las bandas más intensas en el espectro de bisphenRu aún pueden detectarse en el de RRPhen3. El espectro se simplifica considerablemente.

En este caso, nuevamente es posible ver que la banda asignada a la vibración de elongación Cl-O del perclorato de sodio, se desdobra, lo cual pone de manifiesto la disminución de la simetría del ion perclorato.

En el caso del perclorato, como hemos mencionado antes, el ambiente químico generado por la red de cristalización en el complejo puede ser responsable de una disminución de la simetría del perclorato, y por ende del incremento de los modos de vibración, la contribución es mínima^{145, 169}, sin embargo, se han detectado desdoblamientos de la banda por efectos de la red.

En este caso también nos valimos de la espectroscopía de infrarrojo lejano, ya que se ha documentado una banda en 330 cm^{-1} aproximadamente, en complejos del ion perclorato, de intensidad más bien débil, atribuida a la vibración de elongación del enlace M-O. En la Figura 34 se encuentra el espectro de infrarrojo lejano de RRPhen3 en donde es difícil establecer la asignación de la banda. Así, es posible que el perclorato no esté coordinado al rutenio y sea la red cristalina la causante de la reducción de simetría e incremento en modos de vibración.

4.2.2.3.- Momento magnético

Se determinó experimentalmente la susceptibilidad magnética de RRPhen3, la cual nos permitió calcular el momento magnético a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el cual fue de 2.94 MB. Nuevamente es conocido que el RR es un compuesto diamagnético, por lo cual si RRPhen3 es un compuesto análogo al RR, éste debe contener alguna impureza paramagnética que da origen a este valor.

4.2.2.4.- Espectroscopía de RMN ^1H

Los espectros de RMN ^1H de los reactivos empleados en la síntesis de RRPhen3, tanto de la 1,10-fenantrolina como de bisphenRu, se discutieron en la sección 4.1.2.3. En las Figuras 35, 36 y 37 se incluyen los espectros de resonancia de RRPhen3, en los que se empleó DMSO (dimetilsulfóxido) como medio disolvente y TMS como referencia interna.

Al momento de preparar las disoluciones y colocarlas en el tubo de resonancia nos percatamos de la transformación de la disolución de color rojo intenso a verde. Debido a la rapidez con la que se efectúa esta conversión fue imposible detectar el espectro de la especie roja, por lo cual los espectros corresponden a la especie en solución de color verde.

De estos espectros lo que salta a la vista es la complejidad de señales generadas en la muestra principalmente en los alrededores de la región aromática entre 7 y 10 ppm. Este fenómeno sin duda se debe a la existencia en la muestra de fenantrolina en ambientes magnéticos diferentes, por lo cual sus señales son diferentes. Esto puede también atribuirse a una cantidad importante de impurezas. También se observan en el espectro señales en campo fuerte y débil no esperadas, sobre todo por tratarse de una resonancia protónica en donde normalmente la escala es de 1 a 11 ppm. Por ejemplo, es posible ver señales de fenantrolina hasta 20 ppm y -24ppm. Tampoco esperadas, se observan las señales a 2ppm.

Este comportamiento anormal también se presenta en RRBpy1, que nos lleva a pensar que es el mismo tipo de impureza o el mismo tipo de reactividad que le dio origen.

Finalmente aunque parecía que por los análisis elementales, RRPhen3 es de naturaleza trinuclear, análoga al RR, la resonancia magnética nuclear no es consistente con tal afirmación.

4.2.2.5.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

La espectroscopia electrónica ha sido una herramienta útil en la caracterización e identificación del RR y sus análogos por reacciones redox. Sin embargo, en lo que respecta a los compuestos sintetizados mediante la técnica de Meyer, los espectros son substancialmente diferentes al RR, aun cuando es de esperarse un comportamiento parecido. Sin embargo, existe consistencia en cuanto a la intensidad de las bandas atribuidas a transferencias de carga ligante-metal que por su naturaleza poseen altos coeficientes de extinción molar.

En la Figura 38 se presenta el espectro UV-Vis obtenido para RRPhen3, en solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M y en HTFMS 0.1M. Es importante anotar que en solución acuosa es posible percibir que la coloración inicial de la disolución es roja oscura, pero casi de inmediato cambia a verde intenso. Por otro lado, en medio básico y ácido la disolución adquiere el color verde intenso de inmediato.

Ambos espectros muestran diferencias en la región de los 350-500 nm, que en el caso de RRBpy1 se atribuyó a la desprotonación de las moléculas de agua coordinadas a rutenio.

Nuestra opinión es que se está llevado a cabo algo más que una desprotonación, creemos que están procediendo reacciones redox importantes, sin embargo esta propuesta requiere de estudios, y finalmente éstos salen de los objetivos de este trabajo de tesis.

Los coeficientes de extinción de RRPhen3 en medio ácido y básico son menores a los observados en RRBpy1. Además, en medio básico era de esperarse el desplazamiento de la señal, que aparece a 653 nm en medio ácido, a aproximadamente 673 nm, como Meyer describió en su trinuclear, pero nosotros no detectamos corrimientos de esa señal en función del pH del medio. En el caso de RRBpy1 este desplazamiento es muy pequeño.

4.3.- Síntesis, caracterización y purificación de análogos al RR por procesos redox

Para poder completar el estudio de los análogos al RR era conveniente realizar la síntesis de los análogos por oxidación de éste. Estos compuestos además eran requeridos en el estudio del efecto inhibitor del proceso fotosintético, que pretende determinar la influencia de la conformación, el tamaño, la aromaticidad y la carga en la actividad biológica de los análogos al RR.

En este apartado se presenta la evidencia obtenida del estudio de la reactividad del mismo rojo de rutenio (RR), café de rutenio (CR) y violeta de rutenio (VR). Así como los hallazgos en los procesos de purificación de estos compuestos.

4.3.1.- Nueva evidencia en la caracterización y purificación del RR

4.3.1.1.- Purificación cromatográfica del RR

Del estudio previo de este tipo de compuestos¹²⁵ determinamos que la obtención de estructuras cristalinas es un ejercicio complejo. En un intento por favorecer la cristalización de estos compuestos decidimos emplear la cromatografía de intercambio iónico, con la finalidad de afinar la purificación de las muestras empleadas en los ejercicios de cristalización, pues prevalecía la posibilidad de que cualquier tipo de contaminación impidiera la cristalización de los análogos.

También era importante contar con muestras purificadas de RR, CR y VR para los estudios biológicos, lo cual nos exigía el empleo de técnicas de purificación especializadas. Este apartado es particularmente importante en el caso del CR, pues está bien documentada la presencia de una impureza identificada en las muestras comerciales del RR, que es detectable por un máximo en el espectro UV-Vis, a 360 nm, señal que podría traslaparse con las señales típicas de CR. Tal impureza de naturaleza dinuclear (Ru_{360}) ha mostrado una considerable actividad inhibitoria del transporte de calcio mitocondrial.

Existen en la literatura descripciones de procedimientos de purificación, pues ha resultado muy importante sobre todo en el campo de las aplicaciones biológicas, en donde es necesario contar con muestras puras a las cuales pueda correctamente atribuírsele un efecto biológico dado evitando de esta forma cometer errores en la asignación de una actividad biológica, tal como sucedió en el estudio del efecto inhibitor del transporte de calcio mitocondrial en mamíferos por RR, que posteriores experimentos determinaron que dicho efecto inhibitor era generado por una impureza dinuclear presente en las muestras comerciales de RR^{125 y 130}.

La literatura contiene información suficiente sobre la cromatografía de intercambio iónico y decidimos recurrir a ella en función de los buenos resultados obtenidos en un estudio químico del complejo dinuclear de rutenio. La técnica de purificación desarrollada en este trabajo de tesis fue tomada del trabajo hecho por Ying y colaboradores¹³⁰.

Experimentalmente los resultados obtenidos en nuestro trabajo son comparables a los resultados obtenidos por el grupo de Ying¹³⁰.

La separación del RR en columna nos permitió detectar por lo menos cuatro fracciones definidas por coloraciones diferentes. Con este método la fracción que eluyó con la solución 0.6M de formiato de amonio contenía al RR, tal como lo informa Ying. Una vez obtenida la fracción se liofilizó de inmediato con la finalidad de evitar al máximo la descomposición del RR. Finalmente se disolvió nuevamente en una solución de cloruro de amonio 0.1 M y se paso por la columna intercambiadora de aniones (previamente saturada de cloruros mediante adición de una solución 2N de ácido clorhídrico, lavada y estabilizada a pH=6) con la finalidad de recuperar al RR con cloruro como contraion.

El seguimiento de esta separación se llevó a cabo mediante espectroscopía electrónica, del que los resultados más importantes se concentran en la Figura 39. En la Figura 40 se presenta el espectro electrónico en disolución acuosa del RR purificado mediante intercambio iónico. El coeficiente de extinción molar del RR purificado por métodos químicos¹²⁵, fue de $17,035 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que el coeficiente de extinción de RR purificado por cromatografía de intercambio iónico fue de $18,091 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Como se mencionó en los antecedentes, se han propuesto diagramas de orbitales moleculares para el RR, que son similares al diagrama propuesto para el complejo $[\text{Ru}_2\text{OCl}_{10}]^{4-}$, de tal forma que la banda más intensa, localizada a 532 nm se asigna a la transición $\pi^* \leftarrow n$ ($e_g^* \leftarrow e_u$), en donde se ven involucrados los orbitales moleculares deslocalizados metal-oxígeno.

4.3.1.2.- Espectroscopía de infrarrojo lejano

La espectroscopía de Infrarrojo medio ha sido empleada en la caracterización del RR y compuestos análogos, como queda de manifiesto en este trabajo y en el trabajo de tesis antecedente de éste. Sin embargo, la espectroscopía de infrarrojo lejano no ha sido empleada en la caracterización de estos complejos μ -oxo. Es sabido¹¹⁶ que existe una vibración característica de elongación asimétrica Ru-O-Ru, presente en complejos como $[\text{Ru}_2\text{OCl}_{10}]^{4-}$ en 805 cm^{-1} , que además refleja la naturaleza lineal del enlace Ru-O-Ru. Desafortunadamente en complejos aminados esta banda de vibración es imposible de detectar ya que los grupos amino cuentan con una vibración del enlace N-H tipo "rocking" en esa frecuencia. Este tipo de enlaces M-O-M, cuentan con otro modo de vibración, una elongación simétrica que se genera a frecuencias de aproximadamente $215\text{-}260\text{ cm}^{-1}$, ésta debido a la estructura lineal o prácticamente lineal^{170,171}.

El espectro en la región del Infrarrojo medio se encuentra en la Figura 41. En éste, la banda intensa y ancha de vibración simétrica se localiza a 250 cm^{-1} . La presencia de esta señal permite inferir que es una estructura Ru-O-Ru-O-Ru lineal.

Retomando el estudio en la región de Infrarrojo lejano de RRBpy1 y RRPhen3 (secciones 4.2.1.2 y 4.2.2.2, Figuras 26 y 34) observamos que ambos espectros carecen de esta banda, de lo cual se sugiere que en estos compuestos no existe el enlace M-O-M, ni lineal, ni angular. Además, una estructura del tipo M_2O_2 , presenta una banda M-O-M entre $500\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, la cual tampoco existe en estos compuestos.

4.3.1.3.- Análisis termogravimétrico

Como complemento de la información que se tiene sobre el RR, carente en la literatura, decidimos hacer un análisis termogravimétrico, para identificar la temperatura de descomposición del RR, la forma de descomposición y la cantidad de moléculas de agua y su naturaleza (de coordinación o hidratación).

Para este estudio empleamos el RR purificado mediante cromatografía de Intercambio Iónico. El análisis elemental de este compuesto determinó la composición porcentual que se reúne en la TABLA 4.23, en donde también se concentra la composición porcentual teórica.

TABLA 4.23 Análisis Elemental del RR

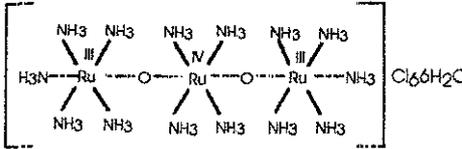
$Ru_3O_2(NH_3)_{14}Cl_6 \cdot 6H_2O$		
PM=903.36g/mol		
Elemento	N	H
% Experimental	21.73	6.07
% Teórico	21.93	6.04

De este análisis se determinó que el RR cuenta con seis moléculas de agua de cristalización. Este hecho es compatible con la fórmula mínima determinada por Fletcher, quien lo sintetizó y caracterizó¹⁰⁴, pues se determinó que contenía 4 moléculas de agua y para el CR propuso 5 moléculas de agua de cristalización.

La curva termogravimétrica de RR (Figura 42) se realizó bajo condiciones de atmósfera de N₂ y una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Los porcentajes de descomposición más significativos, así como los intervalos de temperatura correspondientes se muestran en la

TABLA 4.24

TABLA 4.24. Porcentajes de descomposición con respecto a la temperatura para RR purificado

				
Compuesto Inicial	% de masa perdida acumulada			Temperatura (°C)
	Especie perdida	% calculado	% experimental	
RR	6H ₂ O 5NH ₃ 6NH ₄ Cl, 3/2N ₂	12.95 22.36 61.5	13 22.62 61	50-173.59 173.59-231.24 240-271
Compuesto final	Especies residuales	% calculado	% experimental	Temperatura (°C)
residuo	2Ru RuO ₂	38.3	39	271-350

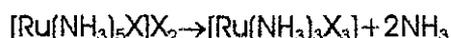
Las moléculas de agua se pierden cuando la muestra se calienta hasta 173.59 °C, lo cual probablemente indica que se trata de moléculas de agua de cristalización, ya que el agua coordinada se pierde hasta 300-320 °C. El porcentaje de pérdida de masa corresponde a 6 moléculas de agua y se concluye que son de hidratación. Este dato confirma los resultados del análisis elemental para el RR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

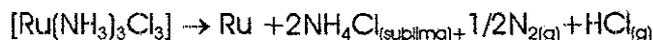
El compuesto empieza su descomposición aproximadamente a los 240 °C. Al calentar hasta 231.24 °C, se pierden cinco moléculas de amoniaco, lo cual se fundamenta en la reactividad térmica típica de los complejos amoniacaes de rutenio ya que es el patrón de descomposición común de éstos, específicamente en complejos mononucleares. Por ejemplo, el análisis termogravimétrico del complejo mononuclear de rutenio, halogenuro de hexaamminrutenio(III) muestra una descomposición de primer orden que procede de la siguiente manera y se inicia a 230°C¹¹⁸:



De este comportamiento salta a la vista que no se coordinan todos los cloruros, pues para eso se requiere de mayor cantidad de energía. Como ejemplo se tiene el caso del cloruro de cloropentaamminrutenio(III), cuya descomposición se inicia aproximadamente a 246 °C y procede de la siguiente forma¹¹⁸:



En el caso de RR, la siguiente pérdida de masa, bien corresponde a la pérdida de 5 moléculas de amoniaco. Finalmente en el intervalo entre 240°C y 271°C procede la última etapa, propiamente de descomposición del RR. Aquí proponemos que el 39% que permanece tras el calentamiento corresponde a la presencia de rutenio metálico y óxido de rutenio(IV), mientras que el 38.38% que se pierde en este último paso está compuesto de nitrógeno y cloruro de amonio, ambos liberados, uno por tratarse de un gas y el cloruro de amonio perdido por procesos de sublimación. El cloruro de amonio a condiciones atmosféricas tiene una temperatura de sublimación de 290°C puro. Esta propuesta se sustenta en otra descomposición de un mononuclear que procede de la siguiente manera a 255°C¹¹⁸:



De este análisis proponemos que la descomposición del RR procede de la siguiente forma:



Finalmente se obtuvo un compuesto de alta pureza, el cual fue cristalizado mediante la técnica de evaporación lenta de disolvente pudiéndose observar la formación de estructuras cristalinas, pero demasiado pequeñas para el análisis de difracción. Sugerimos realizar un cambio de contraion o emplear otra técnica de cristalización más conveniente.

300 2021
 INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CALABAZAR DE LA PEÑA

Por otra parte, dada la alta pureza del compuesto obtenido pueden iniciarse los estudios mediante electroquímica técnica que requiere de reactivos puros.

4.3.2.- Síntesis y caracterización del CR

La síntesis del café de rutenio, cloruro de di- μ -oxo-(pentaamminrutenio(III))pentaamminrutenio (IV)tetraamminrutenio(IV), CR, procedió según lo expuesto por Fletcher¹⁰⁴. Al momento de adicionar el ácido nítrico, la solución adquirió una tonalidad amarillenta y finalmente se obtuvo un precipitado oscuro. Los resultados de la caracterización se resumen a continuación:

4.3.2.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El sólido obtenido tiene un color café tabaco intenso, casi negro. Al microscopio es posible observar un sólido microcristalino. El rendimiento de la reacción fue del 87.12%. En la TABLA 4.25 concentramos la composición tanto calculada como experimental a partir de una fórmula propuesta y en la TABLA 4.26 se anexan algunas propiedades físicas importantes.

TABLA 4.25. Análisis Elemental del CR

Elemento	N	H
% Experimental	26.03	4.53
% Teórico	26.79	4.77

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula mínima $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}][\text{NO}_3]_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con un peso molecular de 903.1g/mol, lo cual implica como está descrito en la fórmula anterior, que el CR cuenta con cinco moléculas de agua de hidratación.

TABLA 4.26. Propiedades físicas de CR

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
$[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}][\text{NO}_3]_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1097.75	Café oscuro Microcristalino	DMF	+++
			DMSO	+++
			Agua	+++
			Acetona	++
			Etanol	+
Metanol	+			

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

Este compuesto se disuelve en agua con gradual transformación al RR. Se determinó la conductancia molar dando un valor de 730 Λ_m , sin embargo es importante anotar que

durante la determinación se detectó la reducción al RR, por lo tanto es necesario buscar condiciones en las cuales esto no suceda para obtener el valor correcto de conductancia molar.

La medición de la susceptibilidad magnética a 25°C nos permitió calcular un momento magnético de 1.85 MB, mientras que Fletcher reporta un momento magnético de 1.13 MB por átomo de rutenio.

La purificación mediante cromatografía de Intercambio Iónico no dio buenos resultados en el caso de este complejo, ya que durante el proceso una parte del CR se transforma en RR. Es necesario modificar las condiciones de trabajo para favorecer la estabilización de esta especie. En pruebas preeliminares, las condiciones favorables son de un medio ácido, específicamente soluciones de ácido nítrico 0.01M

4.3.2.2.- Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de Infrarrojo del CR se presenta en la Figura 43. Estos resultados son muy similares a los reportados por Fletcher. La asignación de las señales más importantes y la comparación con el RR se resume en la TABLA 4.27:

TABLA 4.27. Principales bandas en Infrarrojo del CR

BANDAS	RR	CR	KNO ₃
$\nu_{\text{O-H}}$	3382	3442	
$\delta_{\text{H}_2\text{O}}$	1642	1626 cubierta	
νNH_3	3228, 3144	3226, 3146	
$\delta_{\alpha} \text{NH}_3$	1616	1626	
$\delta_{\beta} \text{NH}_3$	1299	1293 cubierta	
$\rho_{\text{r}} \text{NH}_3$	805	826	
$\nu_{\alpha} \text{NO}_2$		1384	1390
$\nu_{\beta} \text{NO}_2$		1352	1355

Inicialmente podemos decir que los espectros de RR y CR son muy similares entre sí, que es lo esperado. Sin embargo, es posible detectar diferencias en las frecuencias de vibración de los mismos enlaces. En el CR, el mayor desplazamiento se presenta en la vibración de deformación asimétrica del grupo amino. También muestra un desplazamiento considerable a frecuencia mayor la banda generada por la vibración tipo "rocking" del enlace N-H.

Otra diferencia importante se puede detectar de las señales generadas por la vibración de elongación del enlace N-H, que aparece a aproximadamente 3,200 cm^{-1} . En el caso del RR, la intensidad de la banda a 3,228 cm^{-1} es mayor que la intensidad de la banda

vecina ($3,144\text{ cm}^{-1}$). Por el contrario, en CR, la banda primera localizada a $3,226\text{ cm}^{-1}$ es de menor intensidad que la banda vecina. Esto puede explicarse en función de la proporción de grupos amino coordinados al metal. En el caso del RR, 10 grupos amino están coordinados a Ru(III), mientras que sólo 4 están coordinados a Ru(IV). El CR presenta, por el contrario, 9 aminos coordinados a Ru(IV) y sólo 5 a Ru(III).

Otra evidencia importante que da información de la estructura de este compuesto se tiene mediante la espectroscopía de infrarrojo lejano. Como hemos mencionado la vibración de elongación Ru-O-Ru, lineal, genera una señal en el intervalo de $215\text{-}260\text{ cm}^{-1}$. El espectro de infrarrojo lejano del CR presenta una banda en 250 cm^{-1} , tal como el RR. De donde se confirma la estructura lineal del RR (Figura 44).

4.3.2.3.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

Otra técnica ampliamente utilizada en la identificación de este tipo de compuestos es la espectroscopía UV-Vis en disolución. El espectro electrónico en disolución del CR sintetizado como parte de este trabajo de tesis se encuentra en la Figura 45.

Dado que en solución acuosa el CR se transforma espontáneamente en RR, decidimos preparar las disoluciones ácidas, en las cuales es más estable el CR, preparadas a partir de una disolución de ácido nítrico 0.01N .

La identificación de CR mediante esta técnica es positiva dada la existencia de registros del espectro electrónico del CR. El espectro muestra dos bandas atribuidas a transferencias de carga. Hay coincidencia tanto en los máximos de absorción como en el coeficiente de extinción molar, pues para nuestro CR es de $33,332\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y el coeficiente consultado en la literatura es de $44,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El diagrama de orbitales moleculares de este compuesto ya se ha calculado (ESQUEMA 1.20 del CAPÍTULO 1), en el cual se incluye la asignación de las transiciones electrónicas generadoras de los máximos de absorción característicos de este compuesto.

4.3.2.4.- Análisis termogravimétrico

Dicha curva termogravimétrica se encuentra en la Figura 46, para el caso de CR. Esta curva se realizó bajo las siguientes condiciones: atmósfera con flujo de gas N_2 y una velocidad de calentamiento de $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Los porcentajes de pérdidas de masa más significativos, así como los intervalos de temperatura en que éstos ocurren se muestran en la TABLA 4.28

TABLA 4.28. Porcentajes de descomposición con respecto a la temperatura para CR

Compuesto inicial	% de masa perdida acumulada			Temperatura (°C)
	Especie perdida	% calculado	% experimental	
CR	5H ₂ O	8.20	8.19	50-115

$$\left[\begin{array}{c} \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{H}_3\text{N}-\text{Ru} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Ru} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Ru}-\text{NH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \quad \text{NH}_3 \end{array} \right] (\text{NO}_3)_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

El CR se descompone en el intervalo de 85-322 81 °C. Esta descomposición se inicia a una temperatura relativamente baja si se compara con el intervalo de temperatura en el que procede la descomposición del RR (173.59-231.24°C). Las pérdidas de masa que se verifican al calentar la muestra hasta 115°C se atribuyen a la pérdida de 5 moléculas de agua de cristalización. Proponemos que después de esta pérdida se presenta la pérdida de moléculas de amoníaco y su sustitución en la estructura metálica por los grupos nitrato. Se sabe que los complejos de rutenio con nitratos coordinados son sumamente inestables, aun a temperatura ambiente¹¹⁸, por lo cual sometidos a calentamiento, lo son aún más. De esto es muy probable que el CR se destruya dando origen a óxido de rutenio(IV) y complejos intermedarios con moléculas del tipo NO y NO₂ coordinadas, que son normalmente producto de la descomposición del ion nitrato. El seguimiento de las pérdidas resulta complicado debido a que no existen reportes del comportamiento térmico de complejos con nitrato

Entonces, podemos concluir, que el RR es más estable térmicamente que el CR en estas condiciones

4.3.3.- Síntesis y caracterización del VR

El nombre según la IUPAC del violeta de rutenio es cloruro de di-μ-oxo-bis(pentaamminrutenio(IV))tetraamminrutenio(IV), que en este trabajo simplemente llamaremos VR. Aún cuando se ha discutido la caracterización y reactividad química de este compuesto en un par de artículos no es completa y de hecho los autores manifiestan que el VR no es un análogo al RR. La síntesis propuesta en este trabajo fue diseñada por nuestro grupo de investigación. Existe una técnica² descrita en la literatura que más que una síntesis, es la purificación de las muestras comerciales del RR, con VR como impureza, el cual se puede recuperar y aislar. A continuación se muestra la evidencia química en el estudio del VR.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.3.3.1.- Análisis elemental y propiedades físicas

El sólido obtenido tiene un color muy oscuro que se asemeja al negro. Las disoluciones acuosas tienen un color violeta oscuro o azul marino. En la TABLA 4.29 concentramos la composición tanto calculada como experimental a partir de una fórmula propuesta y en la TABLA 4.30 se anexan algunas propiedades físicas importantes.

TABLA 4.29. Análisis Elemental del VR

Elemento	N	H
% Experimental	19.10	5.04
% Teórico	19.94	5.74

La composición porcentual teórica se calculó a partir de la fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]\text{Cl}_8\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, que tiene un peso molecular de 983.37g/mol, lo cual implica como está descrito en la fórmula anterior que VR cuenta con 7 moléculas de agua de hidratación, y los núcleos metálicos están coordinados a grupos amino.

TABLA 4.30. Propiedades físicas de VR

Fórmula	PM(g/mol)	Color	Solubilidad	
$[\text{Ru}_3\text{O}_2(\text{NH}_3)_{14}]\text{Cl}_8\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	983.37	negro	DMSO	+++
			Agua	+++
			Acetona	+
			Etanol	+
			Metanol	+
			Éter	+

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

A diferencia del CR, este compuesto en disolución acuosa (pH=6) no muestra cambios de coloración. La separación cromatográfica en este caso fue exitosa, pudiéndose eliminar las impurezas presentes en el RR comercial, la materia prima empleada para la síntesis del VR. De esta separación se determinó que éste eluye cuando en la columna se tiene solución de formiato de amonio 1M. Esta evidencia pone de manifiesto que la carga del VR es mayor a la del RR, como se esperaba.

Al adicionar a una muestra acuosa de VR, solución de amoníaco 0.5M, se activa la transformación del VR a RR, que es perceptible por el cambio de coloración de violeta o azul oscuro a rosada. No existen estudios cinéticos de esta transformación, en estas condiciones, en la literatura.

4.3.3.2.- Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojo medio del VR se presenta en la Figura 47. La asignación de las señales más importantes y la comparación con el RR y el CR se resume en la siguiente Tabla:

TABLA 4.31 Principales bandas en infrarrojo del VR

BANDAS	RR	CR	VR
ν_s O-H	3382	3442	3424
δ_s H ₂ O	1642	1626 cubierta	1607
ν NH ₃	3228,3144	3226, 3146	3130
δ_a NH ₃	1616	1626	1607
δ_s NH ₃	1299	1293 cubierta	1286
ν_r NH ₃	805	826	799
ν_a NO ₂	-	1384	-
ν_s NO ₂	-	1352	-

Nuevamente observamos un patrón similar en el espectro de VR y respecto a los espectros del CR y RR. Del espectro se confirma la presencia de moléculas de agua de cristalización. La señal asignada a una vibración de elongación N-H, en el VR, es diferente de las bandas en RR y CR. Mientras que esta señal en el RR y CR es doble, en el VR aparece afinada. Esto probablemente sea producto de la simetría incrementada en el caso del VR, pues los tres átomos de rutenio tienen un estado de oxidación 4+. Al aumentar la simetría, disminuyen los modos de vibración, así que podemos confirmar que la estructura del VR es altamente relacionada a la del RR y CR.

Las demás señales tienen el mismo comportamiento, se presentan más afinadas con desplazamientos de hasta 20 cm⁻¹ a la región de menor frecuencia, en todos los casos.

Como en el caso del RR y CR es conveniente recurrir al estudio de infrarrojo lejano, para determinar si el VR muestra una estructura lineal Ru-O-Ru, que se puede inferir a partir de la señal generada entre 215 y 260 cm⁻¹.

4.3.3.3.- Espectroscopía UV-Vis en disolución

Nuevamente en la identificación del VR se ha empleado esta técnica². El espectro electrónico en disolución del VR se encuentra en la Figura 48.

La determinación del espectro se realizó preparando una solución acuosa del VR a 25°C. La identificación de este compuesto se llevó a cabo por comparación del espectro asentado en la literatura con el obtenido por nosotros.

El espectro de la literatura se puede consultar en el apartado de antecedentes de este trabajo de tesis, ESQUEMA 1.18.

Después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico es posible detectar que el máximo a 734 nm, muestra mayor valor de absorbancia y por tanto un coeficiente de extinción mayor, de donde para el VR purificado es de $382.79 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Éste es 87 veces más pequeño si se compara con el coeficiente de extinción molar del CR y casi 48 veces más pequeño que el coeficiente del RR.

4.3.3.4.- Análisis termogravimétrico

La curva termogravimétrica del VR se encuentra en la Figura 49. Ésta se realizó bajo atmósfera de N_2 y a una velocidad de calentamiento de $50^\circ\text{C}/\text{min}$. En la TABLA 4.32 se reúnen los porcentajes de pérdida de masa más significativos así como las temperaturas en que éstos ocurren. La descomposición del VR se inicia aproximadamente a los 250°C , comprendiendo el intervalo de temperatura de $250\text{-}280^\circ\text{C}$

TABLA 4.32. Descomposición térmica del VR

Compuesto inicial	% de masa perdida acumulada			Temperatura ($^\circ\text{C}$)
	Especie perdida	% calculado	% experimental	
VR	$7\text{H}_2\text{O}$	12.81	12.81	25-102
	5NH_3	22.48	22.17	102-239.15
	$6\text{NH}_4\text{Cl}, \text{N}_2, \text{HCl}$	57.38	57.19	239.15-296.81
Compuesto final	Especies residuales	% calculado	% experimental	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
residuo	Ru RuO_2 $\text{Ru}(\text{NH}_2)\text{HCl}$	42.49	42.81	296.81-350

Comenzamos el análisis del termograma considerando que las pérdidas de masa hasta 102°C corresponden a la pérdida de 7 moléculas de agua. El comportamiento del VR es muy similar al comportamiento térmico del RR, por lo que el análisis de la reactividad térmica es similar. Regresando al termograma, la pérdida de masa al calentar hasta 239.15°C , se atribuye a la pérdida de 5 moléculas de amoníaco y sustitución de éstos por los

cloruros inicialmente como contraindicaciones. Es en este punto donde se genera la ruptura del trinuclear, para dar origen al óxido de rutenio(IV). Como en el caso del RR, la pérdida de moléculas de amoníaco se produce simultáneamente a la coordinación de los cloruros, reactividad fundamentada en el apartado del análisis termogravimétrico del RR. La pérdida de masa generada al calentar la muestra hasta 296.81°C supone la formación de rutenio metálico, óxido de rutenio(IV) y un halogenuro de rutenio.

El VR es el complejo análogo al RR más estable térmicamente, pues su descomposición se detecta en el intervalo de 239.15-296.81°C, mientras que el del CR es de 85-322.81 °C y para el RR es de 173.59-231.24°C

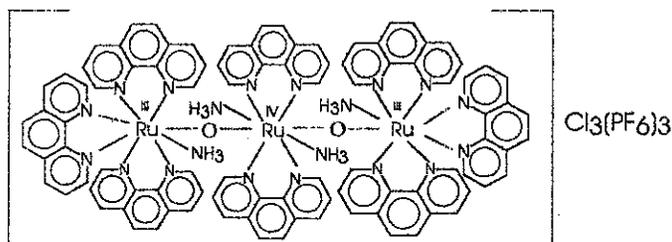
Estudios para la comprobación de esta propuesta, son obligados, sin embargo, los análisis hasta ahora muestran que aun cuando la reactividad de los complejos trinucleares es en muchos sentidos inusual, muestra también algunas semejanzas con los mononucleares.

La similar reactividad térmica del VR, RR y CR puede interpretarse considerando una estructura química similar. La evidencia mostrada refleja la naturaleza trinuclear del VR, semejante al RR, hasta ahora no plenamente demostrada. El comportamiento térmico reflejado en los termogramas al ser similar es consistente sólo si se cuenta con compuestos puros, pues las mezclas presentarían un comportamiento diferente y más complejo.

4.4.- Nuevas evidencias en torno a la caracterización del cloruro hexafluorofosfato de di- μ -oxo-bis(amminitrisfenantrolinarutenio(III))diamminbisfenantrolinarutenio(IV), RRPhen2

Como se mencionó antes, la síntesis y caracterización de este compuesto se realizó y discutió en un trabajo de tesis previo¹²⁵. Debido al interés que su actividad biológica ha causado al mostrar una de las actividades inhibitorias más poderosas en el proceso fotosintético es que se desarrolló este nuevo trabajo de tesis para completar su caracterización y establecer la relación estructura-actividad biológica.

En el estudio previo propusimos que la fórmula estructural de RRPhen2 es:



la cual es consistente con la evidencia química generada de las siguientes técnicas:

- 1) Análisis elemental,
- 2) RMN ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P
- 3) Espectroscopía UV-vis
- 4) Medidas de conductividad eléctrica y
- 5) Espectroscopía de Infrarrojo

El peso fórmula de RRPhen2, $\text{C}_{96}\text{N}_{20}\text{H}_{76}\text{Ru}_3\text{O}_2\text{Cl}_3\text{P}_3\text{F}_{18}$, es de 2,386.16 g/mol

La estructura propuesta considera un aumento en el número de coordinación, que explicamos es promovido por la fenantrolina, gracias a su poder coordinante, permitiendo así estabilizar altos números de coordinación. También se buscó en la literatura evidencia de compuestos octacoordinados de rutenio, encontrando que existen muy pocos casos para rutenio III y IV^{118,172,173,174}. Por el contrario, no existe ningún registro de número de coordinación 8 en Ru(II). Una de las evidencias en este sentido fue la observación de que al cabo de días, las soluciones acuosas de RRPhen2 se descomponen, y del análisis mediante UV-vis se comprobó la formación del trisquelato de rutenio(II), trisphenRu

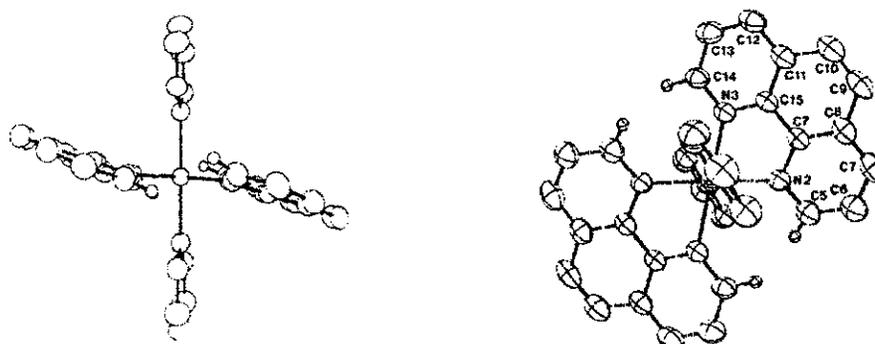
Para descartar la posibilidad de mezclas en RRphen2 se hicieron estudios empleando técnicas como la espectroscopía de UV-vis, IR, RMN ^1H y conductancia molar, los cuales reflejaron comportamientos completamente diferentes tanto para los complejos mononucleares disustituidos, bisbipyRu y bisphenRu, como para trisphenRu y RRPhen2. En la Figura 50, se presentan los espectros de RRPhen2 obtenidos del estudio de este compuesto con las técnicas antes descritas. Un análisis detallado se encuentra en la cita 125.

Una objeción importante que surge tras la propuesta de incremento en el número de coordinación, es que estos compuestos no se estabilicen por efectos estéricos entre las moléculas de fenantrolina coordinadas al metal. La existencia de compuestos de rutenio disustituidos en conformación *trans* permite dar cierta apertura a la propuesta¹²⁷ (ESQUEMA 4.7). Está documentado que el rutenio y las moléculas de fenantrolina permiten el arreglo *trans* de dos moléculas de ligante, que hasta hace 10 años se consideraba imposible de formar, mediante una modificación sutil de su arreglo espacial. Este arreglo *trans* se refleja en un espectro de resonancia que es idéntico al espectro de la fenantrolina no coordinada y difiere solamente en los desplazamientos de las señales, los cuales son pequeños de aproximadamente 0.3-0.1 ppm. Además la existencia de complejos como el $[\text{Ca}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^{2+}$ y el $[\text{Mg}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^{2+}$, tetracoordinados, en donde no es considerable el efecto estérico generado por la cercanía de las cuatro estructuras aromáticas dado que



los compuestos son estables, permite cimentar nuestra propuesta. El espectro de RMN ^1H de estos compuestos muestra el mismo patrón de bandas que la 1,10-fenantrolina y estas se presentan casi las mismas frecuencias¹⁵⁵.

Por otro lado, el análisis elemental de RRPhen2 no permite proponer que se trata de una especie disustituida *trans*, lo cual es confirmado por otras técnicas de las cuales hablaremos más adelante.



ESQUEMA 4.7 Diagramas de la estructura cristalina del complejo *trans*-[Ru(1,10-fenantrolina)₂(piridina)₂]²⁺ mediante difracción de rayos-X *Inorg. Chem.* 1983. 22 12 1761-1765

Con la finalidad de aportar más evidencia para completar la caracterización de RRPhen2 decidimos valernos de algunas técnicas como son el infrarrojo lejano, la espectrometría de masas, el análisis termogravimétrico y la determinación de pesos moleculares mediante cromatografía de permeación en gel, de las que a continuación se exponen los resultados:

4.4.1.- Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico

Dado que las muestras comerciales de RR contienen impurezas, era lógico pensar que al emplear este material, como materia prima para la obtención del RRPhen2, podría contener tales impurezas, por lo cual decidimos someterlo a purificación mediante cromatografía de Intercambio Iónico. De esta manera descartamos la posibilidad de que al realizar los estudios biológicos la actividad se asignara incorrectamente a RRPhen2 y mejoramos las condiciones que de alguna manera pudieran estar afectando los procesos de cristalización que dificultan la obtención de una estructura cristalina.

De la separación y purificación cromatográfica de RRPhen2 se obtuvieron tres fracciones distinguibles por el color de las soluciones. Primero se detectó una fracción amarilla, la cual se analizó espectrofotométricamente y se identificó como cloruro de hexaamminrutenio(III). La segunda fracción fue rosa intenso, por lo cual se asignó al análogo y finalmente la tercera fracción, de color violeta se identificó como VR, que posee un máximo a 745 nm. Los espectros de UV-Vis (técnica empleada para el seguimiento del proceso de purificación), de las tres fracciones se incluyen en la Figura 51. Finalmente en la misma figura se presenta el espectro de RRPhen2 sin purificar.

Así RRPhen2 contiene menos impurezas de las encontradas en el RR.

La disolución con RRPhen2 puro se sometió a liofilizado con la finalidad de evitar su descomposición. Posteriormente una fracción del sólido liofilizado se empleó para intercambiar el formiato por cloruros mediante cromatografía de intercambio aniónico. La disolución final, se utilizó en un ejercicio de cristalización del cual fue posible obtener pequeños cristales de color rojizo, que por su pequeño tamaño no fue posible resolverlos por rayos-X.

4.4.2.- Determinación del peso molecular

Debido a que este compuesto no cristalizó convenientemente se trató de determinar el peso molecular. Para esto se recurrió a dos técnicas: la cromatografía de permeación en gel y la espectrometría de masas.

A continuación se resumen los resultados obtenidos del empleo de ambas técnicas en la determinación del peso molecular de RRPhen2:

4.4.2.1.- Cromatografía de permeación en gel¹⁷⁵

En esta técnica se prepara una solución del compuesto a estudiar en el disolvente que constituye la fase móvil de esta cromatografía y se inyecta en el cromatógrafo, el cual cuenta con una columna polimérica que separa las moléculas en función del peso molecular o el tamaño.

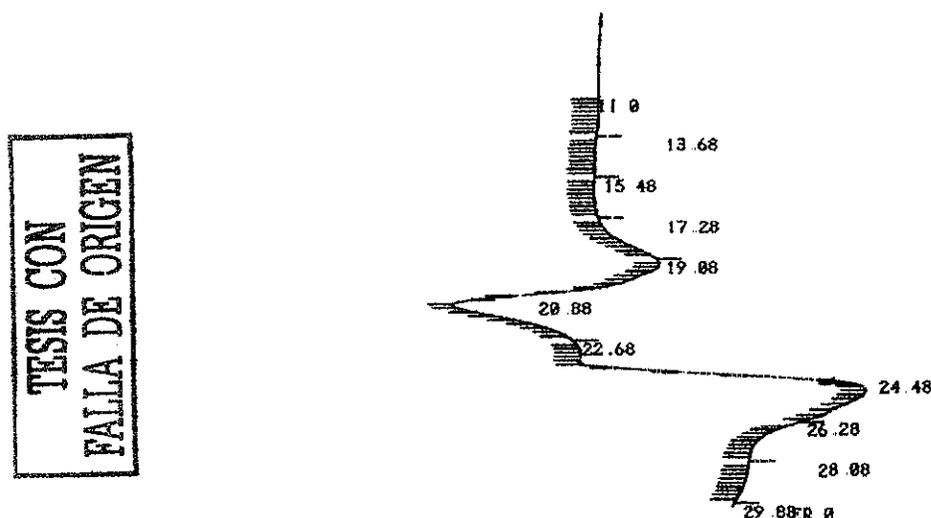
La fase móvil empleada fue dimetilformamida, debido a que los estudios de estabilidad mostraron que RRPhen2 permanece sin cambios en disolución por más de 24 horas. De hecho, se detecta descomposición de RRPhen2 hasta pasadas 28 horas. Este tiempo es importante ya que la elución de la muestra puede llevarse a cabo incluso en un

periodo de 5 horas, y de esta forma aseguramos la estabilidad del compuesto. Además, la solubilidad en DMF (dimetilformamida) fue conveniente para el estudio.

La curva de calibración se construyó con estándares de peso molecular desde 500 hasta 2.7×10^6 g/mol, cuyo gráfico se localiza en la Figura 52, de la cual se consideró un ajuste logarítmico. Es conveniente notar que a pesos moleculares menores a mil, el modelo tiene una dispersión mayor.

Una vez estabilizado y calibrado el sistema se procedió a la inyección de las muestras. El peso molecular de RRPhen2 obtenido mediante esta técnica fue de 4,456 g/mol. El peso molecular calculado a partir de la fórmula propuesta es de 2,386.16 g/mol, que está comprendido dentro del intervalo de la curva de calibración. A pesar de esto, el resultado es completamente diferente.

El cromatograma de permeación en gel de RRPhen2 se muestra a continuación:



ESQUEMA 4.8. Cromatograma de permeación en gel de RRPhen2

Para estimar la confiabilidad de esta determinación, a la par se corrieron muestras como trisphenRu, bisphenRu y bisbipyRu que dieron pesos moleculares de 4,071, 3,931 y 3,389 respectivamente, que obviamente no corresponden a su fórmula mínima, comprobada mediante diversas técnicas expuestas anteriormente.

De esta manera detectamos que el peso molecular obtenido mediante esta técnica no fue correcto y el error se atribuye a que la columna polimérica empleada para la separación no permite la resolución fina de la muestra y genera datos erróneos en compuestos con pesos moleculares menores a 5,000, aun cuando los estándares mostraron buenos resultados. Es necesario repetir este experimento pero empleando una columna de mejor resolución para muestras de pesos moleculares menores a 5,000 g/mol.

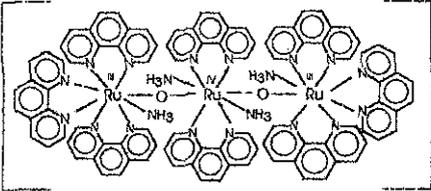
4.4.2.2.- Espectrometría de masas

En vista de los resultados obtenidos con la anterior técnica decidimos emplear la espectrometría de masa^{176 y 177} a fin de determinar el peso molecular de RRPhen2

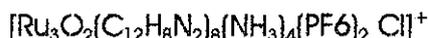
Dado que los procedimientos de ionización habitualmente empleados en esta técnica no son aplicables a muestras no volátiles o térmicamente inestables, como es el caso de RRPhen2, se prefirió el uso de métodos de ionización por desorción, específicamente el bombardeo por átomos rápidos^{178 179 180}, FAB⁺. La matriz empleada fue alcohol 3-nitrobencílico. Los espectros de masas de RRPhen2 se concentran en las Figuras 53 y 54.

Los fragmentos más importantes de RRPhen2 obtenidos por esta técnica se resumen en la TABLA 4.33, en donde se listan los valores de la relación masa/e correspondientes a los calculados para los isótopos más estables.

TABLA 4.33. Fragmentos característicos importantes de RRPhen2 por masas, FAB⁺

Compuesto	Fragmento	m/e
 <p style="text-align: center;">RRPhen2</p>	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_4(PF_6)_2 Cl]^+$	2171
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_4(PF_6) Cl_2]^+$	2061
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_4]Cl_3^+$	1954
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_4]^+$	1845
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_3]^+$	1828
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_2]^+$	1811
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_8(NH_3)_1]^+$	1794
	$[Ru_3O_2(C_{12}H_8N_2)_6(NH_3)_4]^+$	1484
	$[Ru_2O_2(C_{12}H_8N_2)_5(NH_3)_2]^+$	1170
	$[Ru(C_{12}H_8N_2)_3]^+$	643
	$[RuO_2(C_{12}H_8N_2)_2(NH_3)_2]^+$	527
	$[C_{12}H_8N_2]^+$	181

De los resultados anteriores lo primero que podemos concluir es que no se observa el ion molecular para el peso fórmula propuesto. Sin embargo, es posible detectar el pico a 2,171 g/mol, el cual puede interpretarse como el peso fórmula del siguiente catión:



en el cual algunos de los aniones se han liberado. Esta pérdida, sobre todo en el caso del cloro, se explica en función de la formación de una molécula de cloro gas^{181 182}.

Además es posible detectar una señal que comprende al esqueleto metálico trinuclear, las 8 moléculas de fenantrolina y las cuatro moléculas de amoníaco, que cuenta con una relación m/e=1845, el cual sí concuerda con el peso molecular propuesto.

De este análisis también fue posible detectar las pérdidas consecutivas de grupos amino de la estructura metálica, a partir de señales cuyas relaciones m/e presentaron una disminución de 17 unidades, o una multiplicidad de 17 unidades.

Este análisis podría completarse convenientemente, por ejemplo, modificando la energía de los átomos acelerados y analizando el comportamiento isotópico de la muestra.

Así a partir de la información obtenida en el espectro de masas de RRPhen2, es posible proponer un patrón de fragmentación que es compatible con la estructura octacoordinada del rutenio en el complejo, pues los monómeros formados tienen pesos moleculares compatibles con algunas de las señales. Por ejemplo, se puede detectar la formación del catión $[\text{Ru}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^+$, del cual podría considerarse que es formado al destruirse el complejo trinuclear, ya que éste es el fragmento que se genera a partir de cualquiera de los metales en los extremos del complejo RRPhen2.

También se detecta en el espectro la señal del ligante libre y el patrón de fragmentación característico de los compuestos aromáticos, la formación del catión fenilo con relación m/e= 77 y el fragmento típico generado al perder el anillo de seis miembros aromático acetileno (m/e=51)

4.4.3.- Espectroscopía de infrarrojo lejano

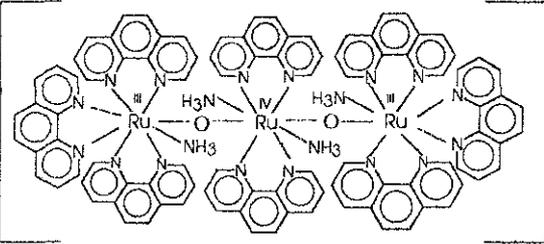
Debido a la utilidad encontrada en el infrarrojo lejano para demostrar la presencia del enlace Ru-O-Ru lineal es que se empleó esta técnica para aportar nueva evidencia en la caracterización de RRPhen2. El espectro de infrarrojo lejano de RRPhen2 se reporta junto al espectro de RR puro en la Figura 55. En el caso de RRPhen2 es posible detectar la presencia de esta banda atribuida a la vibración simétrica del enlace Ru-O-Ru aproximadamente en 240 cm^{-1} , mientras que en el RR se encuentra a una frecuencia de 250 cm^{-1} . Además de este desplazamiento, es posible detectar que la señal es más fina, lo que puede reflejar un aumento de la simetría en la estructura del complejo con fenantrolina en comparación con el RR.

De esta evidencia podemos entonces asegurar que RRPhen2 posee la banda característica de la vibración simétrica ν Ru-O-Ru.

4.4.4.-Análisis termogravimétrico

La curva termogravimétrica se presenta en la Figura 56. Ésta se realizó bajo las siguientes condiciones: atmósfera de N_2 y una velocidad de calentamiento de $50^\circ C/min$. En la TABLA 4.34 se reúnen los porcentajes de pérdidas de masa más significativos así como las temperaturas en que éstas ocurren. La descomposición de RRPhe2 procede en el intervalo de temperatura que va de $161.72-223.89^\circ C$, y se puede observar una pequeña pérdida de masa del 2% cuando se calienta la muestra hasta $150^\circ C$. Comparando con los resultados obtenidos para el RR ($173.59-231.24^\circ C$, descomposición) podemos concluir que el RR es más estable térmicamente hablando.

TABLA 4.34. Porcentajes de descomposición con respecto a la temperatura para RRPhe2

				
Compuesto inicial	% de masa perdida acumulada			Temperatura ($^\circ C$)
	Especie perdida	% calculado	% experimental	
RRPhe2	$4NH_3$	2.88	2.86	25-161.72
	8 fenantrolinas, $2F_2$	63.30 66.48	.. 67.42	161.72-223.89
Compuesto final	Especies residuales	% calculado	% experimental	Temperatura ($^\circ C$)
residuo	RuO_2 $RuCl_3$ $Ru(PF_6)_2$ (PF_2)	33.29	32.58	223.89-300

Como en el caso de RR, VR y CR, en donde la pérdida inicial es de agua de hidratación y amoniacos y dado que la fórmula propuesta de RRPhe2 no contiene moléculas de agua, proponemos que son los grupos amino los que se pierden como amoniaco. El análisis de la estructura trinuclear nos hace pensar que el siguiente paso es la descomposición del complejo para dar origen a RuO_2 y los complejos mononucleares con fenantrolina coordinada a los átomos de rutenio(III) y simultáneamente la coordinación de los contraiones. Este análisis hubiera resultado más complicado sin el estudio previo de

mononucleares y trinucleares. El análisis de la pérdida de la muestra del 28.6% detectada a los 161.72°C, implica la pérdida de 68.2 g/mol que corresponde a la pérdida de 4 grupos amino, que concuerda con los grupos amino presentes en la fórmula propuesta. Finalmente se da una pérdida del 67.42% que puede explicarse como la eliminación de 8 fenantrolinas y dos moléculas de flúor de donde como residuos permanece el RuO₂, y sales de rutenio con cloruros y hexafluorofosfato, el cual es parcialmente destruido, al liberarse el flúor.

Es necesario corroborar estas aseveraciones a partir de más estudios. Sin embargo, salta a la vista que la reactividad de estos complejos trinucleares muestra algunas semejanzas con los complejos mononucleares,

Esta evidencia experimental del comportamiento térmico de RRPhen2 reafirma la propuesta composición de RRPhen2 establecida originalmente, la cual involucra átomos de rutenio con número de coordinación de 8, debido a la coordinación de 8 moléculas de fenantrolina y cuatro grupos amino.

Como antes mencionamos, el interés de afinar y aportar más evidencia sobre la caracterización y reactividad química de RRPhen2 se debe a que en los estudios biológicos en plantas se determinó que este compuesto es uno de los inhibidores del proceso fotosintético más poderoso, actividad que no se ha podido encontrar en otros compuestos relacionados como es RR, CR, VR, la fenantrolina o cualquier mononuclear de rutenio.

A continuación describimos los resultados obtenidos del estudio de la actividad del RR y compuestos análogos en la fotosíntesis.

4.5.-Actividades fotosintéticas en presencia de análogos al RR

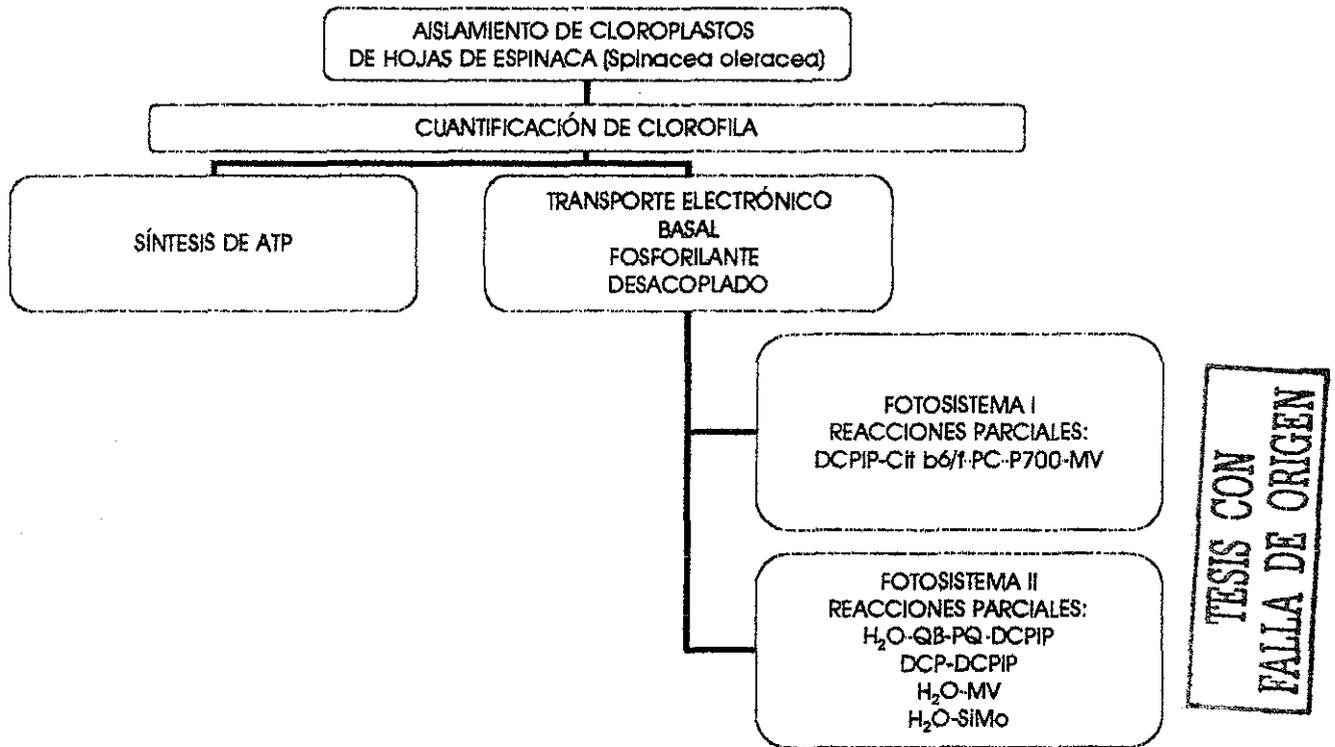
En este apartado se abordan los resultados obtenidos del estudio del poder inhibitor del RR y compuestos análogos, particularmente el efecto inhibitor de RRPhen2.

El estudio de la actividad biológica de estos compuestos se llevó a cabo en cloroplastos de hojas de espinacas, los cuales fueron previamente estandarizados para una concentración de clorofila de 20 µg/mL.

Debido a que varios procesos biológicos se llevan a cabo en los cloroplastos fue necesario realizar experimentos simultáneos que dieran información de la influencia del RR y análogos en el proceso fotosintético general.

De esta forma se realizaron estudios de la influencia del RR y análogos en la síntesis de ATP en cloroplastos, del efecto de estos complejos en el transporte de electrones, en

condiciones de transporte basal, fosforilante y desacoplado y finalmente se afinó el estudio mediante el análisis de reacciones parciales del fotosistema I y II. Las actividades realizadas se concentran en el ESQUEMA 4.9:



ESQUEMA 4.9 Resumen de las actividades experimentales empleadas en el estudio de la actividad inhibidora del proceso fotosintético

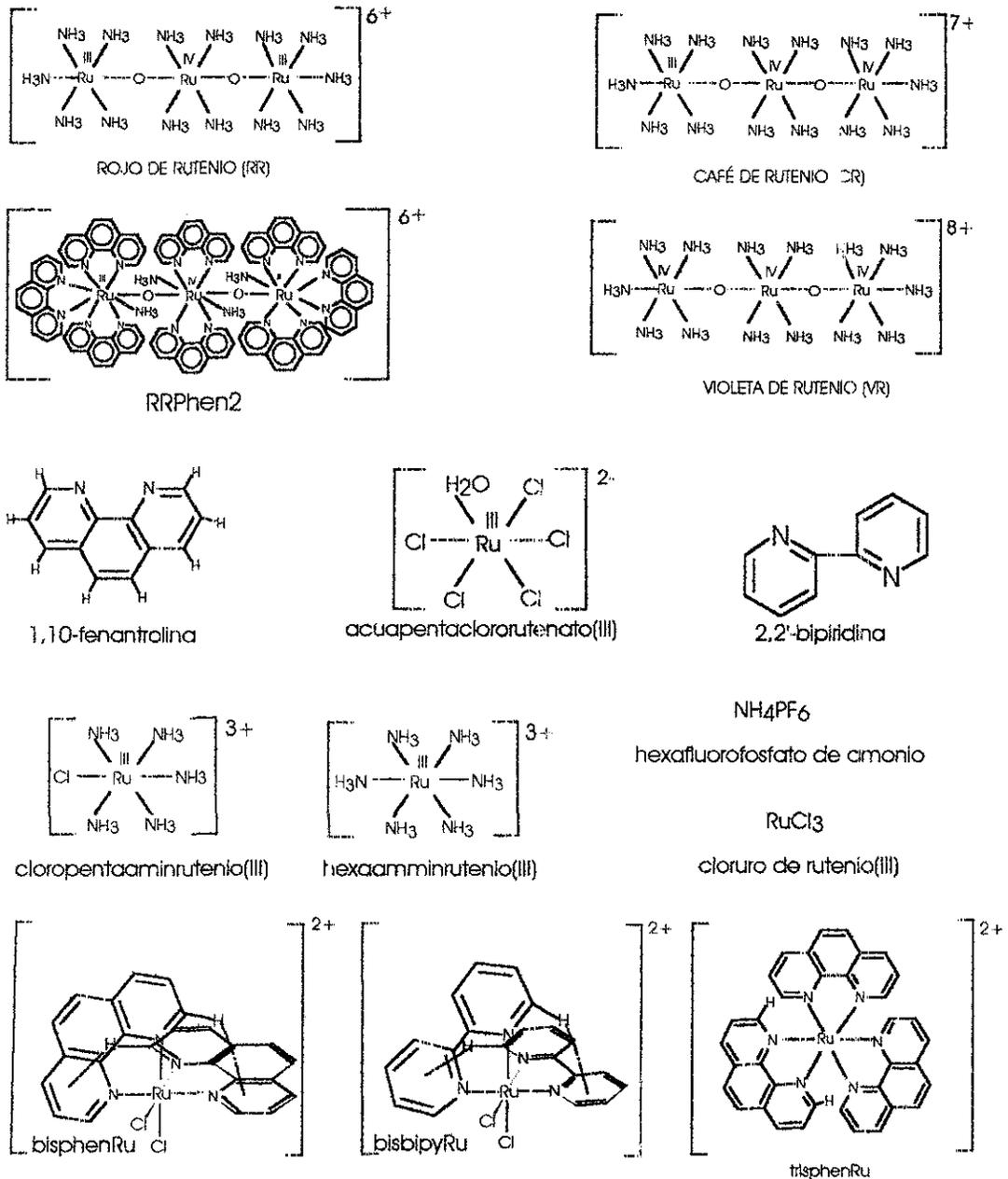
Se probó toda la gama de compuestos relacionados de alguna manera al RR, desde materias primas, productos obtenidos tanto a partir de reacciones redox como a partir de reacciones de sustitución de ligante, productos de descomposición, ligantes libres, compuestos empleados como contraindicaciones e impurezas presentes en muestras comerciales. Además se realizaron pruebas de estabilidad de las especies en estudio en los medios acuosos en los cuales se llevaron a cabo las pruebas en la fotosíntesis.

El ESQUEMA 4.10 contiene las fórmulas estructurales de los compuestos probados.

En este trabajo se mostrará gráficamente los resultados exclusivamente de aquellas especies que presentaron fuerte actividad inhibitoria del proceso fotosintético.

Las pruebas de estabilidad, se llevaron a cabo mediante espectroscopía electrónica en todos los medios de transporte empleados para las diferentes determinaciones bioquímicas. De estos experimentos comprobamos que la mayoría de las especies son estables por lo menos en el tiempo en el que se realiza la prueba biológica.

Las excepciones son: el CR, que en la mayoría de los medios de transporte empleados en las pruebas bioquímicas y aún en medio de transporte de electrones con pH=5.5, presenta procesos de conversión al RR, por lo cual al probar la actividad del CR, en realidad se registra la actividad del RR; también detectamos que el SIMo actúa como agente precipitante del RR en las condiciones de trabajo (medio de transporte de electrones compuesto por sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 30 mM ajustado a un pH=8).



ESQUEMA 4 10 Fórm. las estructurales de los comp. estos probados

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

En la Figura 57 se presenta el estudio de estabilidad del RR en medio de transporte de electrones con tricina como buffer y como se aprecia en el gráfico, al cabo de 8 minutos de monitoreo, los cambios en el espectro son casi imperceptibles, pues corresponde a la descomposición del 0.05% de la muestra. El tiempo de seguimiento en las pruebas de estabilidad se estableció en función del tiempo que toma hacer la mayoría de las pruebas bioquímicas, que es de 4 minutos. Con respecto a la estabilidad de los demás compuestos probados en este medio se encontró que son estables en dicho intervalo de tiempo, a excepción del CR como ya se mencionó.

En el caso del medio de transporte de electrones con buffer de tricina y SiMo, ajustado a pH=8, se detectan variaciones atribuidas a la precipitación del RR por este compuesto (Figura 58). Durante los primeros 8 minutos la reducción de la concentración de RR en solución es del 9.3%, considerando los resultados de absorbancia de la banda en 555 nm. También es importante mencionar que en presencia de SiMo la banda característica del RR en 532 nm se desplaza a mayor longitud de onda.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.5.1 Síntesis de ATP

Los experimentos conducentes a detectar algún efecto inhibitorio en la fotofosforilación, mostraron que solamente el RR, el VR, la fenantrolina, NH_4PF_6 y RRPhe2 lo presentan.

Antes de presentar los resultados es conveniente mencionar la importancia que tiene trabajar con sustancias de probada pureza, con la finalidad de evitar interpretaciones incorrectas. De los artículos publicados a la fecha sobre la actividad biológica del RR en vegetales ninguno menciona medidas conducentes a probar la pureza del compuesto. Como parte de este trabajo de investigación se determinó la inhibición de la actividad (síntesis de ATP) tanto del RR comercial como del RR purificado. Los resultados muestran que el RR puro es más efectivo inhibidor (4 veces más activo) que el comercial, como es posible constatarlo a partir de los valores I_{50} de ambos grados de pureza de los compuestos.

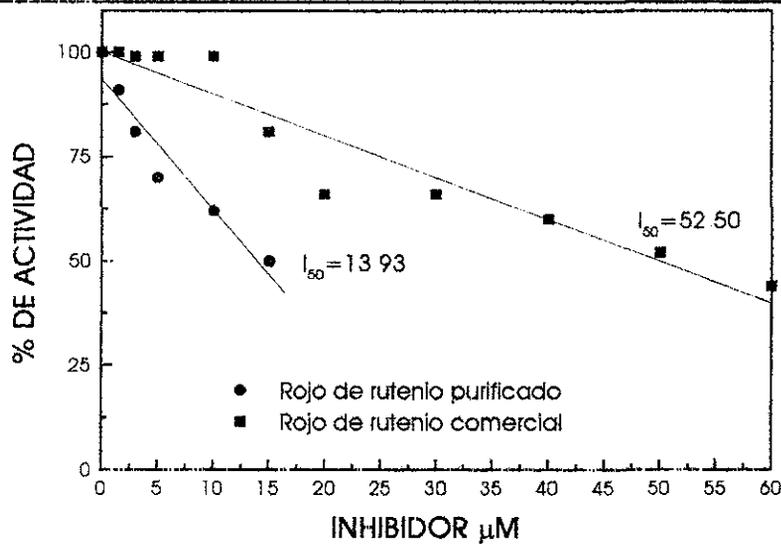


Figura 59. Efecto inhibitorio sobre la síntesis de ATP del RR comercial y purificado. Medio de transporte de electrones: sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 μM

De este experimento podemos sugerir que las impurezas presentes normalmente en las muestras comerciales del RR no tienen actividad inhibitoria. También es importante recalcar que los registros del efecto inhibitorio de síntesis de ATP y de las otras actividades fotosintéticas de la aquí en adelante se obtiene a partir de muestra purificadas

En el siguiente gráfico se muestra la respuesta obtenida del estudio del efecto inhibitorio de la síntesis de ATP, de RRPhen2, RR y 1,10-fenantrolina, los más sobresalientes por el poder inhibitorio:

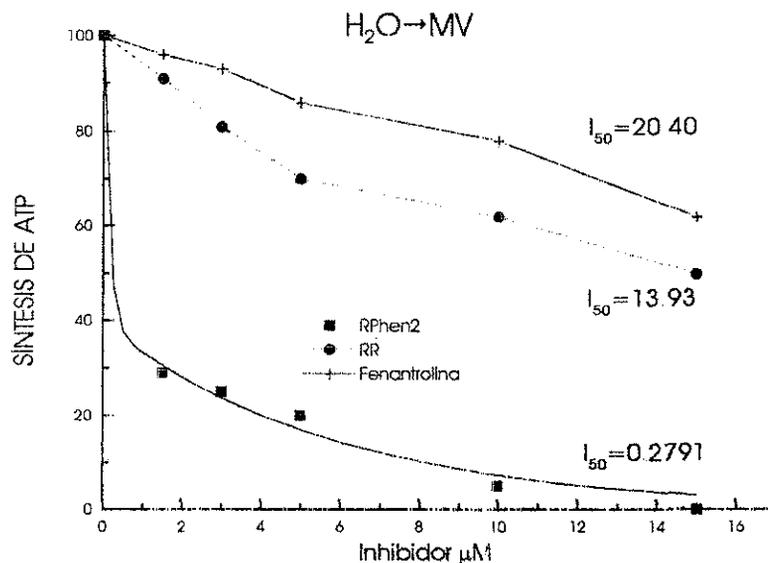


Figura 60 Efecto inhibitorio del RR, 1,10-fenantrolina y RRPhen2 sobre la síntesis de ATP Medio de transporte de electrones: sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 μM

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Así, podemos observar que la síntesis de ATP es inhibida por RRPhen2, RR y fenantrolina de manera dependiente de la concentración. De este gráfico resalta el I_{50} de RRPhen2, aproximadamente 50 veces más pequeño que el I_{50} del RR o 73 veces más pequeño que el del ligante libre, por tanto la naturaleza química de los tres compuestos necesariamente debe ser diferente para generar esta respuesta, siendo RRPhen2 el más potente inhibidor.

Se encontró que el NH_4PF_6 (hexafluorofosfato de amonio) inhibe la síntesis de ATP en un grado menor, como se puede observar en el gráfico siguiente (Figura 61)

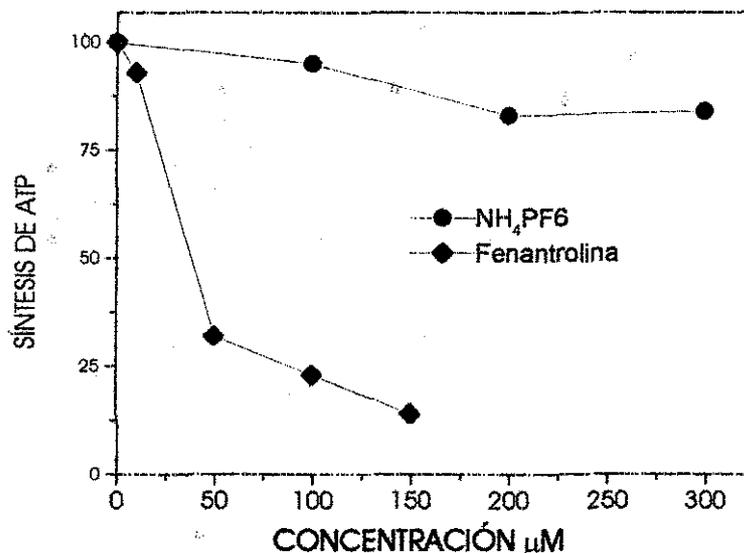


Figura 61. Efecto inhibitorio en la síntesis de ATP de agua a metilviológico. Medio de transporte de electrones: sorbitol 100mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 μM

El VR inhibe la síntesis de ATP de manera similar al NH_4PF_6 (dato no ilustrado).

De estos resultados podemos sugerir que la estructura del RRPhen2 es la responsable en la inhibición y no sus componentes estructurales por separado.

4.5.2.- Transporte de electrones

El transporte electrónico se midió en condiciones basal, fosforilante y desacoplado. Se emplearon diferentes aceptores y donadores sintéticos para segmentar el estudio de toda la cadena de transporte electrónico en el cloroplasto y de esta forma determinar el sitio y mecanismo de acción del RR y compuestos análogos.

En las Figuras 62, 63 y 64, se muestra los resultados del estudio de inhibición del transporte electrónico en sus tres modalidades por el RR, la fenantrolina y RRPhen2, los cuales inhiben el transporte electrónico basal, fosforilante y desacoplado. Estos resultados indican

que tales compuestos actúan como inhibidores de la cadena redox en cloroplasto o inhibidores de la reacción de Hill.

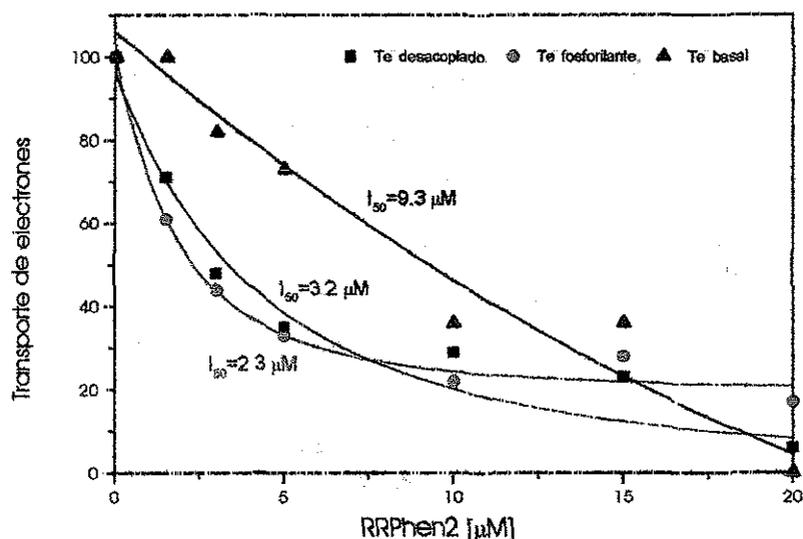


Figura 62. Efecto de RRPhen2 en el transporte de electrones de las reacciones luminosas de la fotosíntesis en tilacoides. Medio de transporte de electrones (MTE): sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 µM. Te⁻ fosforilante: MTE y ADP 1mM y KH₂PO₄ 3 mM. Te-desacoplado: MTE y NH₄Cl 6mM. Te-basal: MTE

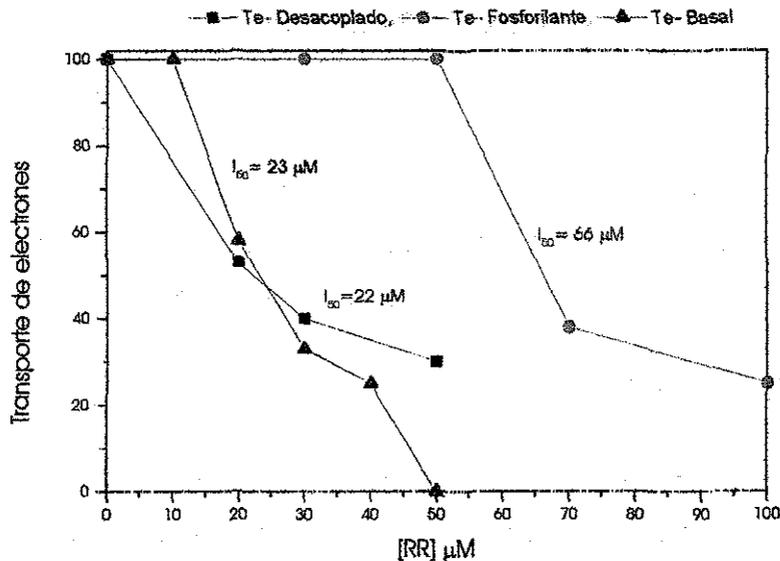


Figura 63. Efecto de RR en el transporte de electrones de las reacciones luminosas de la fotosíntesis en tilacoides. Medio de transporte de electrones (MTE): sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 µM. Te⁻ fosforilante: MTE y ADP 1mM y KH₂PO₄ 3 mM. Te-desacoplado: MTE y NH₄Cl 6mM. Te-basal: MTE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

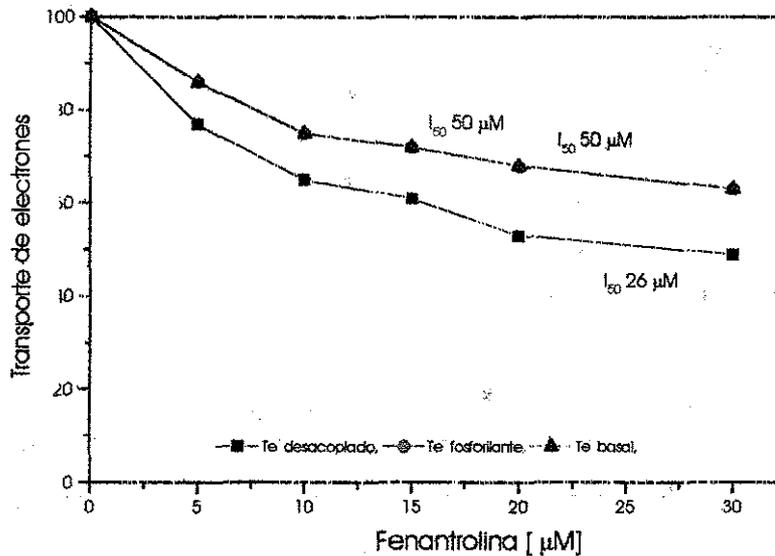


Figura 64. Efecto de fenantrolina en el transporte de electrones de las reacciones luminosas de la fotosíntesis en tilacoides. Medio de transporte de electrones (MTE): sorbitol 100mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, KCN 0.5 mM y buffer de tricina 1mM ajustado a pH=8 y MV 50 µM. Te fosforilante: MTE y ADP 1mM y KH₂PO₄ 3 mM Te-desacoplado: MTE y NH₄Cl 6mM. Te basal: MTE

Dado que RRPhen2 inhibió tanto el flujo de electrones como la síntesis de ATP, concluimos que se comporta como un inhibidor de la reacción de Hill.

Con la finalidad de localizar el sitio de inhibición del RR y compuestos análogos en el proceso de transporte electrónico se realizaron reacciones parciales (fotosistemas I y II) empleando donadores y aceptores de electrones artificiales. Los experimentos mostraron que ninguna de las especies probadas tiene efecto en el segmento de la cadena transportadora de electrones conocido como fotosistema I (PS I), por lo cual el efecto inhibitor del proceso fotosintético del RR y compuestos análogos se localiza a nivel de fotosistema II (PS II).

Para el estudio del fotosistema II (PS II) y la localización del sitio de acción se llevaron a cabo tres experimentos en los cuales se analizaron segmentos de este fotosistema, a decir:

- 1) H₂O a DCPIP
- 2) 2) DCP a DCPIP
- 3) 3)H₂O a SIMO
- 4) 4) H₂O a DCBQ

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

A continuación mostramos los resultados del estudio del segmento de agua a DCPIP:

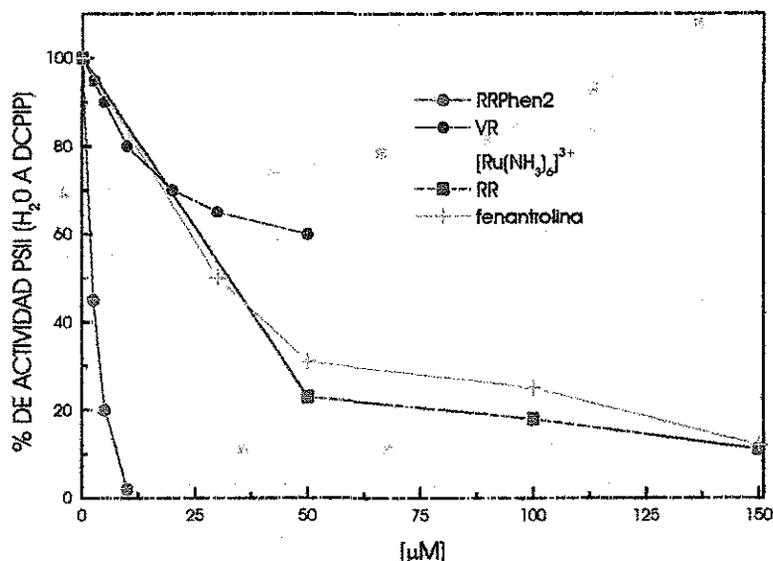


Figura 65. Actividad inhibitoria de los compuestos en el segmento H₂O a DCPIP

Nuevamente en los gráficos de las Figuras 65 y 66 (A y B) destaca el mayor poder inhibitorio en el fotosistema II del RRPhen2, en comparación con el ligante libre y el RR. También se incluyen algunos compuestos que podrían generarse de la descomposición de RR y el VR que mostraron efecto inhibitorio. En este sentido una comparación interesante de actividades es la registrada por el VR y el RR, de los cuales el RR presenta mayor actividad inhibitoria del fotosistema II. La principal diferencia entre ambos compuestos es la carga, pues mientras que VR tiene una carga 8+, el RR tiene una carga de 6+. Aquí tal parece que la carga tiene un efecto adverso en la inhibición del transporte electrónico. El hecho de que RRPhen2 posea una mayor actividad que el RR podría estar relacionado con su polaridad influyendo en efectos hidrofóbicos e hidrofílicos del ambiente predominante en estos sistemas biológicos.

Posteriormente se procedió al estudio del efecto inhibitorio de los compuestos en el tramo redox de la cadena del fotosistema II, de DCP a DCPIP, con la finalidad de determinar si el efecto del RR y análogos se ejerce entre el complejo enzimático de fotólisis del agua del PS II o antes del complejo citocromo b₆/f.

De los resultados mostrados en la Figura 66 (A y B) concluimos que la actividad del RR y análogos se limitará al segmento del PS II de P680 hasta antes de cit b₆/f.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

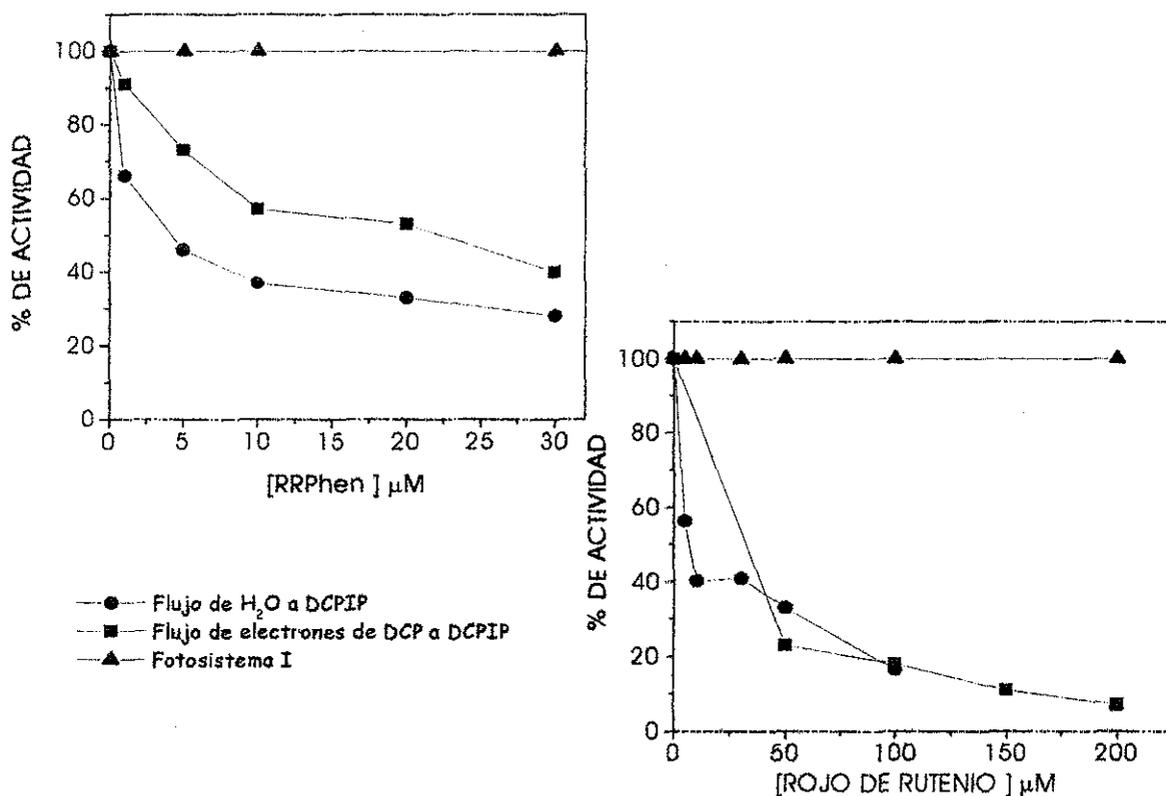


Figura 66. Actividad fotosintética de RRPhen2 (A) y RR (B) en fotosistema I y II

Finalmente se estudio el efecto inhibitor del RR y RRPhen2 en el transporte electrónico de H₂O a DCBQ (Figura 67), en el cual es evidente la inhibición dependiente de la concentración de compuesto. Este experimento limita el estudio del transporte electrónico de P680 a Q_A.

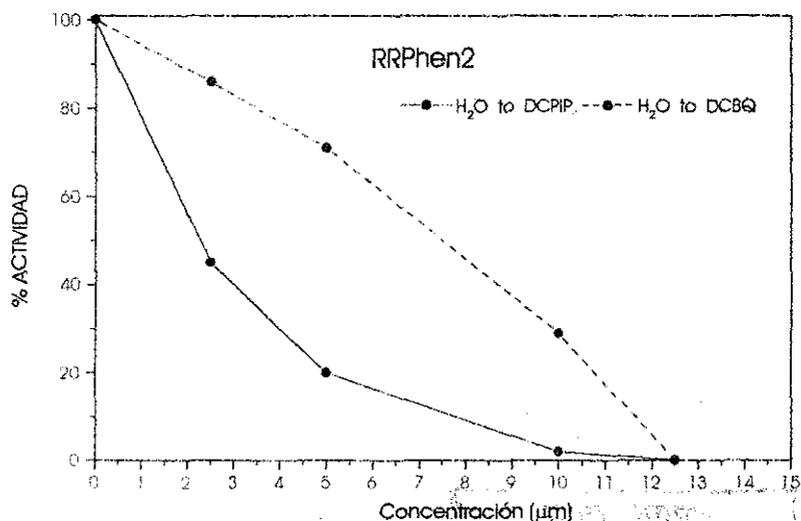


Figura 67 Actividad fotosintética de RRPhen2 en fotosistema II

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Así podemos concluir que el RR y análogos a éste poseen sitio diana de inhibición en el tramo que va de la cadena de P680 a Q_A , ya que inhibe el PS II y la reacción parcial de P680 a Q_A en aproximadamente el mismo porcentaje y no se ve afectado el fotosistema I.

4.5.3.- Coeficientes de partición

De los resultados anteriores se pudo mostrar que la carga tiene un efecto adverso en la inhibición del transporte de electrones, por lo cual procedimos a determinar los coeficientes de partición de RRPhen2, fenantrolina, RR y VR y de esta forma determinar si existe alguna influencia en este sentido. A continuación se muestran los resultados obtenidos de esta determinación:

TABLA 4.35 Coeficientes de partición de los principales compuestos con actividad inhibitoria de PS II

Compuesto	Log P	I_{50} PS II
Fenantrolina	2.29	29.97
RRPhen2	-0.32	2.27
RR	-1.06	32.2
VR	-1.11	No inhibe

Los compuestos se ordenaron en función de una hidrofilia creciente o una hidrofobia decreciente en la TABLA 4.35. En ese sentido, la fenantrolina es la molécula más hidrofóbica. Sin embargo, no es la que presenta el mayor efecto inhibitor del fotosistema II. El VR cuyo coeficiente de partición indica que es la especie más hidrofílica tampoco muestra el mayor efecto inhibitor. Es el RRPhen2 quien posee el mayor efecto inhibitor cuenta con un coeficiente de partición intermedio. De estos resultados podemos concluir que la carga efectivamente tiene un efecto adverso en la actividad biológica. Esto hace suponer que el sitio de acción debe tener naturaleza hidrofóbica por lo cual es alcanzado por RRPhen2, pero bastante específico como para sólo reconocer a RRPhen2 y no a cualquier sustancia hidrofóbica como la fenantrolina.

Se están realizando en este momento estudios de luminiscencia para dar mayor cimiento a las propuestas vertidas en cuanto a la actividad del RR y análogos y los resultados preliminares no contradicen lo antes dicho.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo consistió en sintetizar y caracterizar compuestos análogos al rojo de rutenio y aportar nueva evidencia respecto a la reactividad química y biológica de este tipo de compuestos.

Este material constituye un fundamento en los estudios sistemáticos de compuestos análogos al RR, hasta ahora poco estudiados. En base a los resultados obtenidos y a la discusión de los mismos es posible establecer las siguientes conclusiones:

5.1.- Complejos mononucleares de rutenio

- 1) La síntesis de los complejos bisbipyRu, bisphenRu y trisphenRu fue imprescindible para el entendimiento de la reactividad de los complejos trinucleares de rutenio, ya que nos permitió establecer claras diferencias de éstos frente a los trinucleares, tanto físicas como químicas. Las técnicas de RMN, UV-Vis, IR lejano y las determinaciones de conductancia molar, proporcionan evidencias indiscutibles sobre la naturaleza mononuclear y polinuclear de los complejos de rutenio.
- 2) Con los conocimientos adquiridos a partir de este estudio descartamos completamente que RRPhen2 tenga naturaleza mononuclear.

5.2.- Síntesis alterna de complejos análogos al RR a partir de mononucleares

- 1) Bajo las condiciones de reacción planteadas no se ve favorecida la síntesis de compuestos trinucleares análogos al rojo de rutenio. Los resultados indican que se trata de mezclas de productos. Sin embargo, la evidencia obtenida proporciona bases para el estudio de los trinucleares de rutenio.

5.3.- Estudio de la reactividad de análogos al RR por procesos redox

- 1) El RR es un complejo de valencia mixta, cuya cristalización es un ejercicio complicado, tal como se refleja en la literatura especializada. La presencia de

impurezas no constituye el principal efecto limitante de este proceso, ya que de la purificación cromatográfica fue posible la obtención de cristales que debido a su pequeño tamaño no pudieron resolverse por rayos-X. Es necesario establecer condiciones en las cuales no se favorezca la oxidación a CR o la destrucción de complejo, seleccionar un contraion conveniente y emplear una técnica de cristalización más efectiva y eficiente.

- 2) La cromatografía de intercambio iónico como técnica de purificación de compuestos trinucleares altamente cargados es la más eficiente hasta ahora probada. En este proceso de purificación el liofilizado de las muestras es la herramienta fundamental para reducir al mínimo la descomposición de los compuestos trinucleares.
- 3) Este trabajo de tesis fundamenta la caracterización y diferenciación del RR y sus análogos por procesos redox (CR y VR) mediante la espectroscopía de infrarrojo medio. A la par espectroscopía de IR lejano proporciona evidencia indiscutible de la naturaleza trinuclear y es una nueva herramienta para la identificación de estas especies.
- 4) La síntesis y caracterización del CR y VR aportó información sobre la reactividad de estos sistemas. El comportamiento térmico de los análogos al RR es similar al comportamiento de las especies mononucleares y determinamos que la descomposición de los compuestos trinucleares tiene como una de sus etapas la formación de complejos mononucleares. Además, el VR es la especie más estable térmicamente de los tres análogos por oxidación estudiados (RR, CR y VR).
- 5) La síntesis y caracterización del VR generó datos valiosos. De este trabajo concluimos que el VR es una especie trinuclear similar al RR a partir de los estudios de IR medio y lejano, TGA y espectroscopía electrónica. Los estudios cinéticos de la conversión de VR a RR, en medio amoniacal, son el siguiente paso en esta caracterización.
- 6) Los procedimientos de purificación del CR se ven obstaculizados por la naturaleza química de este compuesto que tiende invariablemente a transformarse al RR en medios acuosos. El medio ácido impide eficientemente la reacción de reducción.
- 7) El RR muestra una reactividad preferencial frente a la fenantrolina, bajo las condiciones de reacción empleadas para la síntesis de RRPhen2, aun cuando se experimentó con ligantes estructuralmente similares a la fenantrolina, como es la

bipiridina, aminas primarias, aminas secundarias e inclusive ligantes tan fuertes como el ion cianuro. Esta reactividad se explica en términos de la rigidez de la fenantrolina y su gran poder coordinante.

5.4.- Nuevas evidencias en el estudio de RRPhen2

- 1) La inusual actividad inhibitoria de RRPhen2 en el transporte de electrones en el proceso fotosintético exigía la caracterización detallada de este compuesto.
- 2) La purificación mediante cromatografía de intercambio iónico es eficiente para este compuesto. Siempre y cuando este acoplada al liofilizado de la muestra.
- 3) En la propuesta hecha sobre la composición de RRPhen2 se consideró un aumento en el número de coordinación, que explicamos es promovido por la fenantrolina, gracias a su poder coordinante, permitiendo así estabilizar altos números de coordinación.
- 4) Los estudios mediante espectrometría de masas, análisis termogravimétrico e infrarrojo lejano dan evidencia que sustenta la propuesta inicial de octacoordinación.
- 5) El análisis termogravimétrico de RRPhen2 demostró que este complejo es térmicamente más estable que el CR pero menos que el RR o el VR. El patrón de pérdidas de masa en TGA es compatible con la coordinación al RR de 8 moléculas de fenantrolina y 4 moléculas de amoníaco y sugiere que RRPhen2 no es una mezcla de compuestos ya que en este caso, el TGA sería bastante complejo.
- 6) La existencia de compuestos mononucleares con dos moléculas de fenantrolina coordinadas en conformación *trans* y compuestos tetracoordinados de fenantrolina y magnesio o calcio manifiesta la capacidad de adaptación ante efectos estéricos importantes de este ligante, lo cual da apertura a nuestra propuesta de composición de RRPhen2.

5.5.- Estudios bioquímicos

- 1) El estudio bioquímico descrito en este trabajo consideró todas las variables involucradas en la actividad inhibitoria del proceso fotosintético.
- 2) El poder inhibitorio de RRPhen2 sobre la fotosíntesis es uno de los más eficientes hasta ahora conocidos. Ni el RR ni la fenantrolina tiene una actividad inhibitoria en

la fotosíntesis tan potente como RRPhen2, como tampoco la actividad simultánea de ambas especies.

- 3) Demostramos que la mayoría de los compuestos probados, especialmente RRPhen2 es estable en el tiempo en el que las pruebas biológicas se llevan a cabo, por lo cual descartamos que el efecto inhibitor sea ejercido por algún producto de descomposición
- 4) La síntesis de ATP es inhibida de manera dependiente de la concentración por RRPhen2, RR y la fenantrolina. El poder inhibitor, cuantificado a través de I_{50} muestra que RRPhen2 es 50 veces más potente que el RR y 73 veces más que la fenantrolina, por lo que la naturaleza química de los tres compuestos necesariamente debe ser diferente. Así RRPhen2 es uno de los compuestos más potentes que inhiben este tramo de la cadena redox
- 5) RR, 1-10-fenantrolina, VR y RRPhen2 inhiben la síntesis de ATP y los transportes electrónicos basal, fosforilante y desacoplado, por lo cual se dice que son inhibidores de la reacción de Hill.
- 6) El RRPhen2, RR y análogos a éste tienen un sitio blanco de inhibición en el tramo de la cadena fotosintética que va de la de P680 a Q_A , ya que inhibe el transporte electrónico de P680 hasta antes del complejo citocromo b_6/f y la reacción parcial de P680 a Q_A .
- 7) A mayor carácter hidrofílico, menor es el efecto biológico que desencadena un determinado compuesto. De estos resultados podemos proponer que la carga tiene un efecto adverso en la actividad biológica. Esto hace suponer que el sitio de acción debe tener naturaleza hidrofóbica, de tal forma que la interacción de éste y RRPhen2 es favorecida, pero también debe ser bastante específico como para sólo reconocer a RRPhen2 y no a cualquier sustancia hidrofóbica como la fenantrolina.
- 8) La precipitación del RR es eficientemente inducida por el silicomolibdato de sodio.

CAPÍTULO 6

SUGERENCIAS PARA ACCIONES FUTURAS

En este trabajo de investigación hemos dado respuesta a varias de las preguntas generadas, pero como en toda investigación, entre más se avanza más preguntas surgen.

La inquietud de completar este trabajo nos lleva a proponer algunas acciones para completar el estudio de la reactividad química y biológica general de los complejos de valencia mixta análogos al RR

A continuación proponemos las acciones más importantes cuyo seguimiento puede dar continuidad a este trabajo de investigación:

6.1.- En cuanto al RR, CR y VR

- 1) Estudiar la reactividad del RR, CR y VR frente a la sustitución de ligandos incluyendo aminoácidos y bases nitrogenadas
- 2) Completar los estudios de la estabilidad térmica del RR, CR y VR.
- 3) Llevar a cabo estudios electroquímicos de RR, CR y VR.
Determinar condiciones y técnicas más convenientes para la obtención de monocristales para el estudio por difracción de rayos-X
- 4) Estudiar el comportamiento de RR, CR y VR mediante espectrometría de masas.

6.2.- En cuanto a los análogos por sustitución de ligante

En cuanto al estudio de los análogos por sustitución de ligante algunas actividades sugeridas son:

- 1) Repetir la determinación del peso molecular mediante cromatografía de permeación en gel empleando una columna de separación adecuada para el peso molecular que se propone entre 3000-500 g/mol
- 2) Sintetizar análogos al RR con fenantrolinas modificadas, por ejemplo la 5-nitrofenantrolina, la 4,7-difenilfenantrolina, etc

- 3) Los procedimientos de purificación desarrollados en este trabajo permiten obtener compuestos de alta pureza, que pueden ser empleados para los estudios electroquímicos, necesarios en las propuestas de reactividad, química y biológica.

6.3.- En cuanto a la actividad biológica

- 1) Evaluar la actividad inhibitoria del transporte electrónico en fotosistema II, empleando técnicas de luminiscencia para comprobar las propuestas generadas en el estudio bioquímico realizado durante estos estudios de maestría.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

1. Mangin, L. Sur les Réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane. *C. R. Acad. Sci.* 1890: 111 120-123
2. 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.
3. Reimann, B. *Mikroskopie.* 1961:16.224-226.
4. Murano, E. *Anal. Biochem.* 1990: 187, 120-124
5. Hirabayashi, Y. *Acta Histochem. Cytochem.* 1990: 23, 165-175.
6. Adkins, S. *Anal Biochem.* 1996: 240, 17-23.
7. Cerutti, P. A. *Science* 1985: 227 375-381
8. Keshava, C. *Mutat. Res* 1995: 328, 63-71
9. Marks, R. *Cancer.* 1995: 75, 607-612.
10. Tronnier, M. *Am. J. Dermatopathol.* 1995:17, 1-6.
11. Sambrook, J. *Molecular Cloning,* 1989:6 15-6.16.
12. Iyo, S. *Japanese J. Dermatol.* 1966:76. 65-85.
13. Kwon-Chung, K. J. *J. Bacteriol.* 1982:150. 1212-1220.
14. Kwon-Chung, K. J. *Infect. Immun.* 1986:51.218-233.
15. Mochizuki, T. *J. Med. Vet. Mycol.* 1987:25 223-233.
16. Sugar, A. M. *Mycopathology.* 1991:114 153-157
17. Hou, W-C. *Bot Bull. Acad. Sin.* 1999:40.115-119.
18. Alonso, J. *Electrophoresis.* 1995:16.39-42.
19. Cruickshank, R. H. *Anal. Biochem.* 1980:107 177-181
20. Jlang, C. M. *Food Sci.* 1998:25. 46-58.
21. Cernian, J. *Gastroenteritis.* 1981:27 4.390-399
22. Figueroa, I. A. *Biotechnology and Bioengineering.* 1989:33. 941-947.
23. Brenner, C. *Bioscience.* 1996:12. 3 120-130.
24. Klee, C. B. *Adv. Protein Chem.* 1982: 35. 213-321.

25. Hugues, M. N. *Comprehensive Coordination Chemistry Coordination Compounds in Biology*. 1ª ed. Edit. Pergamon Press. London England. 1990: 562-597.
26. Voet, D. y Voet, J. G. *Biochemistry*. 1ª ed. Edit. John Wiley & Sons. 1990. New York, U.S.A.
27. Drabikowski, W., Strezelecka-Golaszewska, H. y Carafoli, E. *Calcium Binding Proteins*. Elsevier Amsterdam Holland. 1974.
28. Wasserman, R. H., Corradino, R. A., Carafoli, E., Kretsinger, R. H., MacLennan, D. H. y Siegel, F. L. *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*. North Holland, New York. 1977.
29. Siegel, F. L., Carafoli, E. R., Kretsinger, H., MacLennan, D. H. y Wasserman, R. H. *Calcium Binding Proteins: Structure and Function*. Elsevier. North Holland, New York. 1980.
30. Carafoli, E. *Membrane Transport of Calcium*. Academic London. 1982.
31. Heung, W. Y. *Calcium and Cell Function*. Academic London. 1980.
32. Dalgarno, D., Klevit, R. E., Levine, B. A. y Williams, R. J. P. *Trends Pharm. Sci.* 1984;5: 266.
33. Levine, B. A., y Williams, R. J. P. *Calcium and Cell Function*. Academic. New York. 1982.
34. Teo, T. S. *J Biol. Chem.* 1973: 248. 5950-5955.
35. Cheung, W. Y. *Science*. 1980: 207. 19-26.
36. Nishikawa, M. *Nature*. 1980: 287. 863-865.
37. Hidaka, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981: 78. 4354-4357.
38. Hidaka, H. *Mol. Pharmacol.* 1980: 17. 66-72.
39. Naccache, P. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980: 97. 62-68.
40. Levin, R. M. y Weiss, B. *Mol. Pharmacol.* 1977:13. 690-697.
41. Tanaka, T., Ohmura, T., y Hidaka, H. *Pharmacology(Basel)* 1983:26. 249-257.
42. Inagaki, M., Tanaka, T., y Hidaka, H. *Pharmacology(Basel)* 1983:27. 125-129.
43. Anderson, A., Drakenberg, T., Thulin, E., y Forsén, S. *Eur. J. Biochem.* 1983:134. 459-465.
44. Vogel, H., Anderson, T., Braunlin, W. H., Drakenberg, T., y Forsén, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984:122. 1350-1356.
45. Masuoka, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990.169. 315-322.
46. Sasaki, S., Naka, M., Nakamura, F., y Tanaka, T. *J. Biol. Chem.* 1992:267. 30. 21518-21523.
47. Hinkle C.P., McCarty E.R. How Cells Make ATP. *Sci Amer.* 1978 :238(3), 104-123.
48. Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. *Bioenergetics 2*. 1ª ed. Edit. Academic Press. Great Britain. England. 1982: 207-233.
49. Forbes, M. S., y Sperelakis, N. *Cell Tissue Res.* 1979: 200. 367-382.
50. McCormack, J. G., y England, R. J. *Biochem J.* 1983:214. 581-585.
51. Hansford, R. G. *Biochem J.* 1987:241. 145-151.
52. Gupta, M.P., Dixon, I. M., Zgao, D., y Dhalla, N. S. *Can. J. Cardiol* 1989:5. 55-63.

53. Peng, C. F., Kane, J. J., Straub, K. D., y Murphy, M. L. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1980;25:179-183
54. Groskreutz, J. L., Bronk, S. F., y Gores, G. *J. Gastroenterology.* 1992;102:1030-1038.
55. Antoniu, B. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985: 816,9-17
56. Chlesi, M. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1988: 154 1-8
57. Vassilev, P.M. *Cancer Res.* 1987: 47 519-522.
58. Hurley, T.W. *Am. J. Physiol.* 1988: 23,621-627.
59. Simon, B. *J. Am. J. Physiol.* 1995: 2,167-169.
60. Vasington, F. D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. y Carafoli, E. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972:256 43-54.
61. Zazueta, C., Sosa-Torres, M. E., Correa, F., y Garza-Ortiz, A. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 1999;31:6:551-557
62. Miller, R. *J. Science* 1987: 235 46-52.
63. Mayer, M.L. y Miller, R. *J. Trends Pharmacol. Sci.* 1990;11 254-260
64. Bertolino, M. y Llinas, R. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1992;32:399-421.
65. Brorson, J. R., Bleakman, D., Gobbons, S. J. y Miller, R. J. *J. Neurosci.* 1991;11:4024-4043.
66. Friel, D. D. y Tsien, R. W. *Neuron.* 1992;8:1109-1125
67. Henzi, V. y MacDermott, A. B. *Neuroscience.* 1992;46 251-273.
68. Trudeau, L. E., Doyle, R.T., y Haydon, P.G. *Neuroscience* 1998: 5 20-27.
69. Bondareff, W. *J. Neurosurg.* 1970: 32, 145.
70. Singer, M. *Anat. Rec.* 1972: 173, 375
71. Rahamimoff, R. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1973: 70, 3613.
72. Tapia, R. *Brain Res.* 1976: 116 101.
73. Mathews, C. *J. Neurochem.* 1997: 69 524.
74. White, H. *J. Neurosci.* 1995: 15 2 1318.
75. Trudeau, L. E. *Neurosci.* 1995: 3,112.
76. Kelman, A.D. *J Clin Hematol Oncol.* 1977: 7 274
77. Yasbin, R. *Chem. Biol. Interact.* 1980: 13 1720.
78. Siadat S. *Molecular Genetics & Metabolism.* 1998: 65 3 246-249.
79. Nakamura, F. *FEBS Lett.* 1992: 7 314, 1 93-96.
80. Howell, J. N. *J. Cell Biol.* 1974: 62 242
81. Utsumi, K. *Symp. Cell Biol.* 1973: 24 19.
82. Moore, C. L. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1971: 42 298.
83. Zamzami, N. *J. Biol. Chem.* 1999: 256 135

84. A. R. Meinicke, S. S. Zavan, A. M. C. Ferreira A. E. Vercesi y E. J. H. Bechara. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1996: 328(2). 239-244
85. A. R. Meinicke, E. J. H. Bechara y A. E. Vercesi. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1998: 349(2) 275-280.
86. Ke, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1973:301.1.
87. Butler, W. L. *Accounts Chem. Res.* 1973:6.177.
88. Evans, D E., Briars, S. A., y Williams, L E.J. *Exp Bot.* 1991:42 285-303.
89. Pineros, M., y Tester, M. J. *Exp. Bot.* 1997:48.551-557.
90. Brand, J. J., y Becker, D. W. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1984:16 239-249.
91. Kaus, H. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1987:38.47-72
92. Kreimer, G., Melkonian, M., Hoffum, J.A.M., y Latzko, E. *Plant Physiol.* 1988:86.423-428.
93. Grove, G. N., y Brudvig, G. W. *Biochemistry* 1998:37.1532-1539.
94. Debus, R. J. *Biochim. Biophys Acta.* 1992: 1102.269-352.
95. Bricker, T. M. *The light reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht* 1996:113-136.
96. Renger, G. *Physiologia Plantarum.* 1997:10.828-841
97. Roh, M.H., Shingles, R., Cleveland, M. J., y McCarty, R. E. *Plant Physiol.* 1998:118 1447-1454
98. Barr, R., Crane, F. L., y Clarke, M. J. *Indiana Acad. Sci. Proc* 1982: 91.114-119.
99. Lemieux, S. y Carpentier, R. *Progress in Photosynthesis Research.* 1987:1.5 633-636.
100. Jursinic, P., Millar, N., y Carpentier, R. *Photochemistry and Photobiology.* 1991:51(5) 705-712.
101. Joly, A. C. *R. Acad. Sci.* 1892: 115. 1299-1301.
102. Morgan, G. T y Burstall, F. H. J. *Chem. Soc.* 1936: 41-45.
103. Gleu J. R. y Breuel, A. Z. *Anorg. Chem.* 1938: 237-350
104. Fletcher, J. M., Greenfield, B. F., Hardy, C. J., Scargill, D., y Woodhead, J. L. *J. Chem. Soc.* 1961: 2000-2006.
105. Clausen, C. A., Prados, R. A., y Good, M. L. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* 1971: 7.485.
106. Mc Whinnie, W.R., Miller, J. B., Watts, J. B. y Waddan, D. Y. *Chem. Commun.* 1971:629; *Inorg. Chim. Acta.* 1973:7 461
107. Earley E.J., Fealey T. *Chemical Communications.* 1971: 331.
108. Earley E.J., Razavi H. J. *Inorg. Nucl. Chem.* 1973: 9. 331-335.
109. Earley E.J., Fealey T. *Inorganic Chemistry.* 1973:12(2) 323-327.
110. Earley E. J. y cols. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1973:36 2385.
111. Earley E.J., Chalilpoyil P., Bignetti P.L. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1981:43. 190.
112. Armor, J. N. y Taube, H. *Inorg. Chem.* 10. 1570.1971.
113. Sterling, C. *Am. J. Botany.* 1970: 57(2). 172-175.

114. Smith, P. M., Fealey, T., Earley, J. E., y Silverton, J. V. *Inorg. Chem.* 1971;10(9) 1943-1947.
115. Carrondo, C.T., Griffith, W. P., Hall, J. P. y Skapski, A. C. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1980: 627-332-334.
116. Baran, J. E. *Química Bioinorgánica.* 1995 Mc Graw Hill. Barcelona España.
117. Ebsworth, E. A. V., Rankin, D. W. H., Craddock, S. *Structural Methods in Inorganic Chemistry.* 2a ed. 1991. CRC Pres Great Britain.
118. Seddon, E. A. y Seddon, K. R. *The Chemistry of Ruthenium.* 1984. Elsevier Science Publishers. The Netherlands
119. Jorgensen, C. K. y Orgel, L. E. *Mol. Phys.* 1961; 4. 215.
120. 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.
121. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.* 3ª ed. Edit. Wiley-Interscience. 1978
122. F. Bottomley. Nitrosyl Complexes of Ruthenium. *Coordination Chemistry Reviews.* 1978; 26.7-32.
123. R. D. Felham *Inorgánica Chemistry.* 1978: 1-41.
124. C. Slater y R. J. P. Williams. Ruthenium Red as a Paramagnetic Probe in NMR Spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 1979;10 179-182.
125. Garza-Ortiz Ariadna *Tesis de Licenciatura.* 1999. Facultad de Química UNAM. México, D.F.
126. Wilkinson, G., editor. *Comprehensive Coordination Chemistry. The Synthesis, Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds Vol. 4. Middle Transition Elements.* Pergamon. 1987
127. Bonneson, P., Walsh, J.L., Pennington, W. T., Cordes, A. W., y Durham, B. *Inorg. Chem.* 1983 22 1761-1765.
128. Sullivan, B.P., Salmon, D. J. y Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* 1978;17.12.3334-3341
129. Geselowitz, D. A., Kutner, W., y Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* 1986 25,2015-2023.
130. Ying, W. L., Emerson, J., Clarke, M.J., y Rao Sanadi, D. *Biochemistry.* 1991;30.4949-4952.
131. Emerson, J., Clarke, M.J., Ying, W. L., y Rao Sanadi, D. *J. Am. Chem. Soc.* 1993;115.11799-11805
132. Saha, S., Ouitrakul, R., Izawa, S., y Good, N. E. *J. Biol. Chem.* 1971;246 3204-3209.
133. Mills, J. D., Mitchell, P., y Schurmann, P. *FEBS Lett.* 1980;112.173-177.
134. King- Díaz, B. *Tesis de Licenciatura.* 1987. Facultad de Química UNAM. México, D.F.
135. Macías, L. M., Rojas I. S., Mata, R., Lotina, B. *J. Agric. Food. Chem.* 1999;4.5 2137-2140.
136. Lotina-Hennsen, B., Roque-Resendiz, J. L., Jiménez, M. Y Aguilar, M. Z. *Naturforsch.* 1991 :46c.777-780.
137. Mackinnon, G. *J. Biol. Chem.* 1940: 315-140.

138. Clark, L. C., Wolf, R., Granjer, D., y Taylor, Z. *J. Appl. Physiol.* 1953:6:189.
139. Malmsta, T. *Electronic Analog Measurement and Transducer*, ES W. A. Benjamin Inc. U.S.A. 1973.
140. William Bryan, L. Wilson, K. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. New York, N.Y. 1975.
141. Dilley, R. A. In *Methods of Enzymology*. San Pietro, A. Ed. Academic Press. New York, N.Y. Vol. 23. 1971:452-466.
142. Fujita, T., Iwasa, J. y Hansch, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1964:86:5175-5180.
143. Hansch, C. A., Muir, R. M., Fujita, T., Maloney, P. P., Geiger, F., y Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1963:85:2817-2824.
144. Miller, R. R., Brandt, W. W., y Puke, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1955:77:3178.
145. Nakamoto *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 3ª ed. Edit. Wiley-Interscience. 1978.
146. R. M. Silvestein, G. C. Bassler y T. C. Morrill. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 1ª ed. Edit. John Wiley & Sons. USA. 1980.
147. Nakanishi, K. *Infrared Absorption Spectroscopy* 2ª ed. Edit. Holden-Day. USA. 1977.
148. Van der Poet, H., van Koten, G. y Vrieze, K. *Inorg. Chem.* 1980:19:1145.
149. Whinnie, W. R., y Miller, J. D. *Adv. Inorg. Chem & Radiochem.* 1969. Vol. 12. 135-215.
150. Castellano, S., Gunther, H., y Ebersole, S. *J. Phys. Chem.* 1965:69:12.4166-4176.
151. Kramer, F. A., y West, R. *J. Phys. Chem.* 1965:69:2.673-674.
152. Brügel, W. Z. *Electrochem.* 1962:66:159-162.
153. Bonneson, P., Walsh, J. L., Pennington, W. T., Cordes, A. W., y Durham, B. *Inorg. Chem.* 1983:22:1761-1765.
154. Busch, D. H., y Ballar, J. C. *J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales.* 1956:78:1137-1142.
155. Miller, J. D., y Prince, R. H. *J. Chem. Soc. (A)*. 1969:519-520.
156. Blears, D. J., y Danyluk, S. S. *Tetrahedron*. 1967:23:2927-2940.
157. Varder-Donckt, E., Martín, R. H., y Geerts-Evrard, F. *Tetrahedron*. 1964:20:1495-1503.
158. Kulasingham, G. C., McWhinnie, W. R., y Miller, J. D. *J. Chem. Soc. (A)*. 1969:521-524.
159. Gunther, H. *NMR Spectroscopy*. 1ª ed. Edit. John Wiley & Sons. USA. 1980.
160. Miller, J. D., y Prince, R. H. *J. Chem. Soc. (A)*. 1965:3185-3194.
161. Miller, J. D., y Prince, R. H. *J. Chem. Soc. (A)*. 1965:4706-4709.
162. Chatt, J., y Hayter, R. G. *J. Chem. Soc. (A)*. 1963:6017-6021.
163. Buckingham, A. D., y Stephens, P. J. *J. Chem. Soc. (A)*. 1964:2747-2752.
164. Crosby, G. A., Perkins, W. G., y Klassen, D. M. *J. Chem. Phys.* 1963:45:5.1498-1503.
165. Fergusson, J. E., y Harris, G. M. *J. Chem. Soc. (A)*. 1966:1293-1296.
166. Klassen, D. M., y Crosby, G. A. *J. Chem. Phys.* 1968:45:5.1853-1858.

167. Lytle, F., y Hercules, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1969:91 2.253-257
168. Broo, A., y Lincoln, P. *Inorg. Chem.* 1997:36.2544-2553.
169. Gowda, N. M. N., Naikar, S. B., y Reddy, K. N. *Adv. Inorg. Chem. & Radiochem* 1984. 28 255-299
170. Wing, R., y Callahan, K. P. *Inorg. Chem.* 1969:8 4.871-874.
171. Clark, R. J. H., Franks, M. L., y Turtle, P. C. *J. Am. Chem Soc* 1977:99 8.2473-2479.
172. Bennett, M., Matheson, T. W., Robertson, G. B., Steffen, W. L. y Turney, T. W. *J. C. S. Chem. Comm* 1979. 32-33.
173. Fahmy, R., King, K., Rosemberg, E., Tiripicchio, A. y Tiripicchio, M. *J. Am. Chem Soc*, 1980 (102) 3626.
174. Folkensson, M. *Acta Chem. Scand.* 1973 (27). 287.
175. Cazes, J. J. *Chem Ed.* 1966:43.7.A567-A582.
176. Skoog, M. *Análisis Instrumental* 1992. Edit. Mc Graw-Hill. México, D.F.
177. Frearson, M. *Anal. Chem. Open Learn. D3. Mass Spectrometry* 1987. Edit. John Wiley & Sons. Gran Bretaña, Inglaterra.
178. Rinehart, K. L. *Science* 1982:218. 254
179. Barber, M., Bordoli, R. S., Elliot, G. J. Sedgwick, R. D., y Tyler, A. N.
180. Biemann, K. B. *Anal. Chem.* 1986:58 1228^a.
181. De Hoffman, E., y Charette, J. *Mass Spectrometry*. 1996 Edit. John Wiley & Sons. USA.
182. Seibl, J. *Espectrometría de masas*. 1974. Edit. Alhambra. Barcelona, España

CAPITULO 8

APÉNDICE

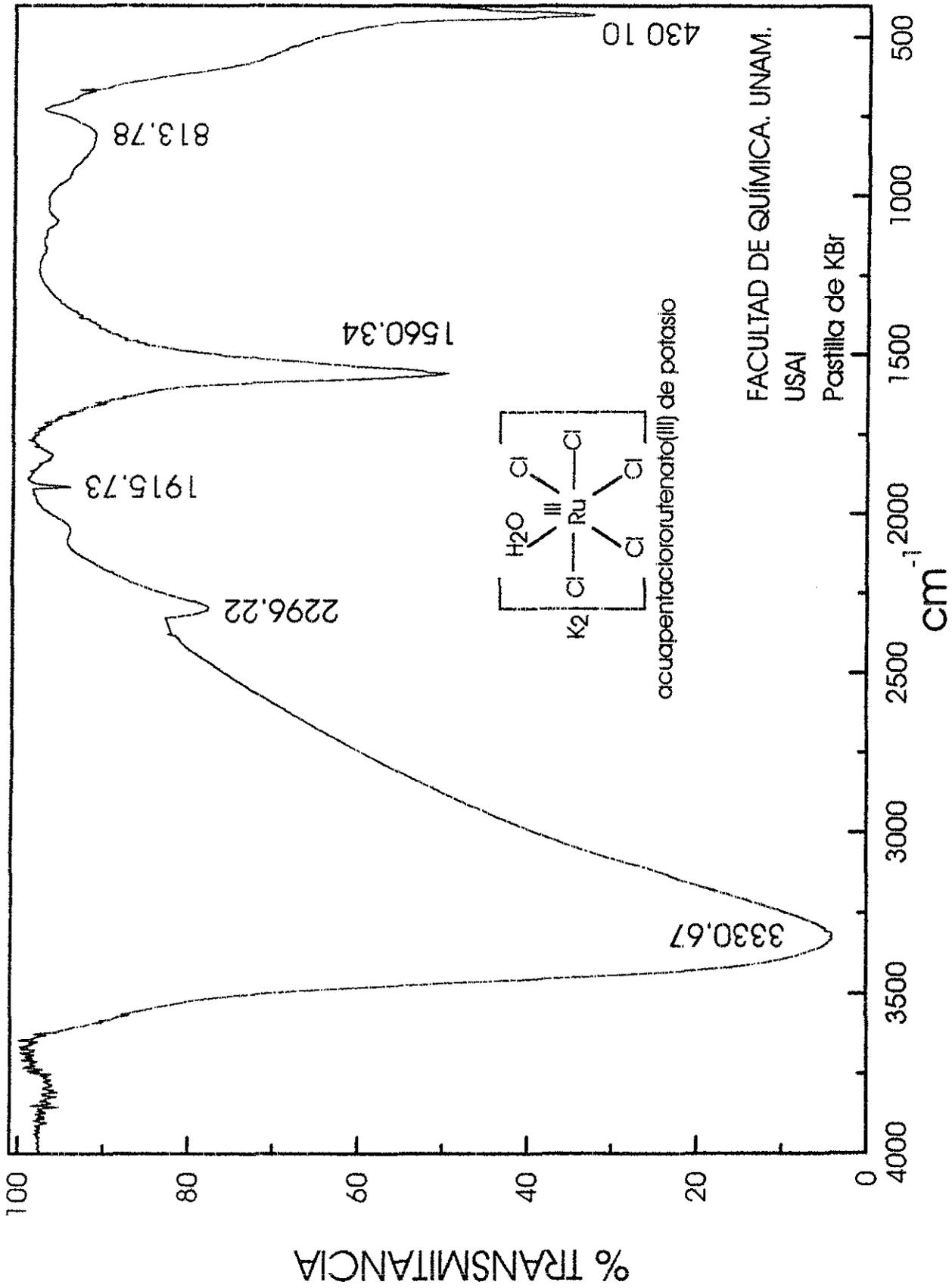


Figura 1. Espectro de infrarrojo medio de K₂[RuCl₅H₂O] en pastilla de KBr

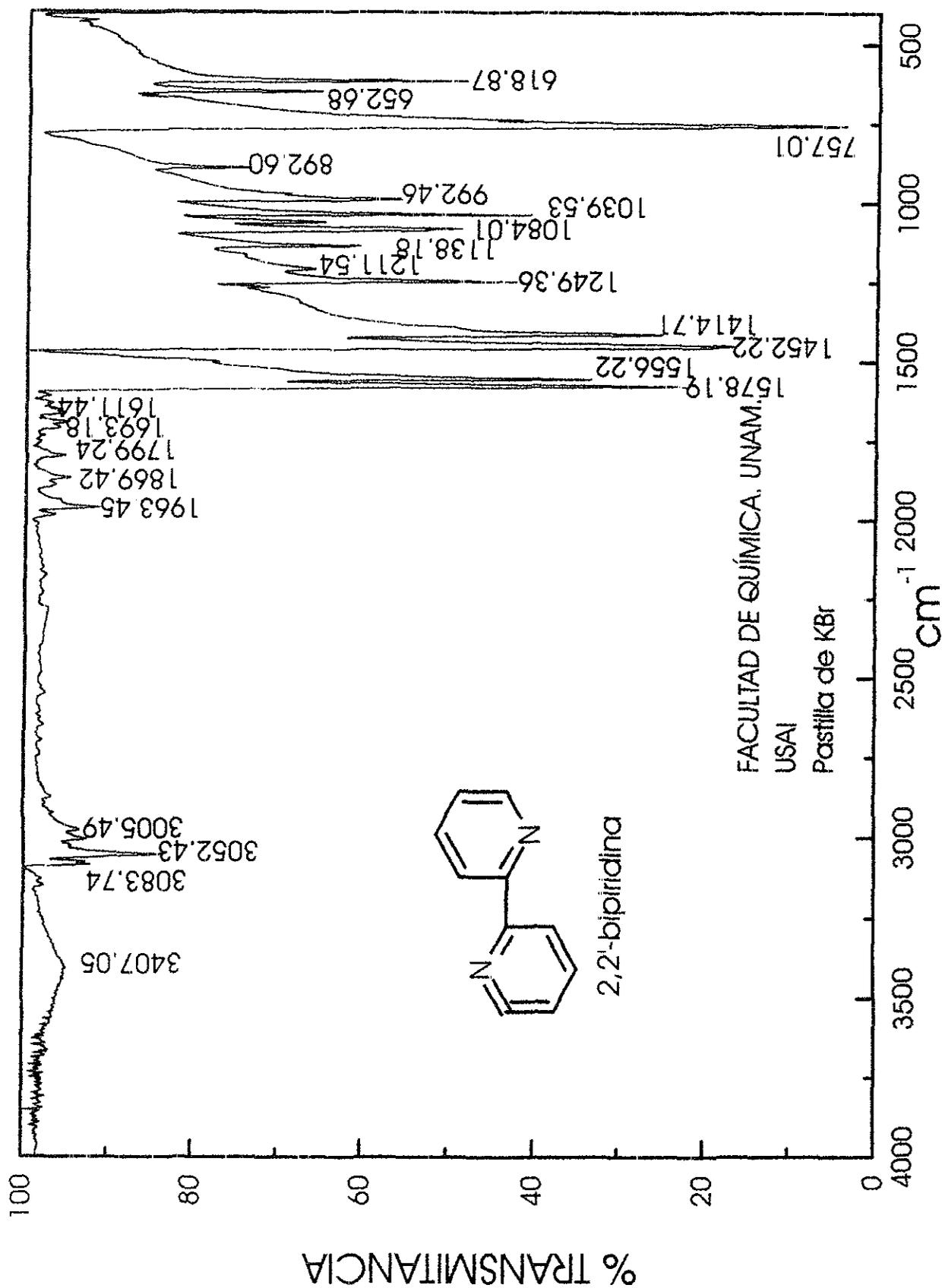


Figura 2. Espectro de infrarrojo medio de 2,2'-bipiridina en pastilla de KBr

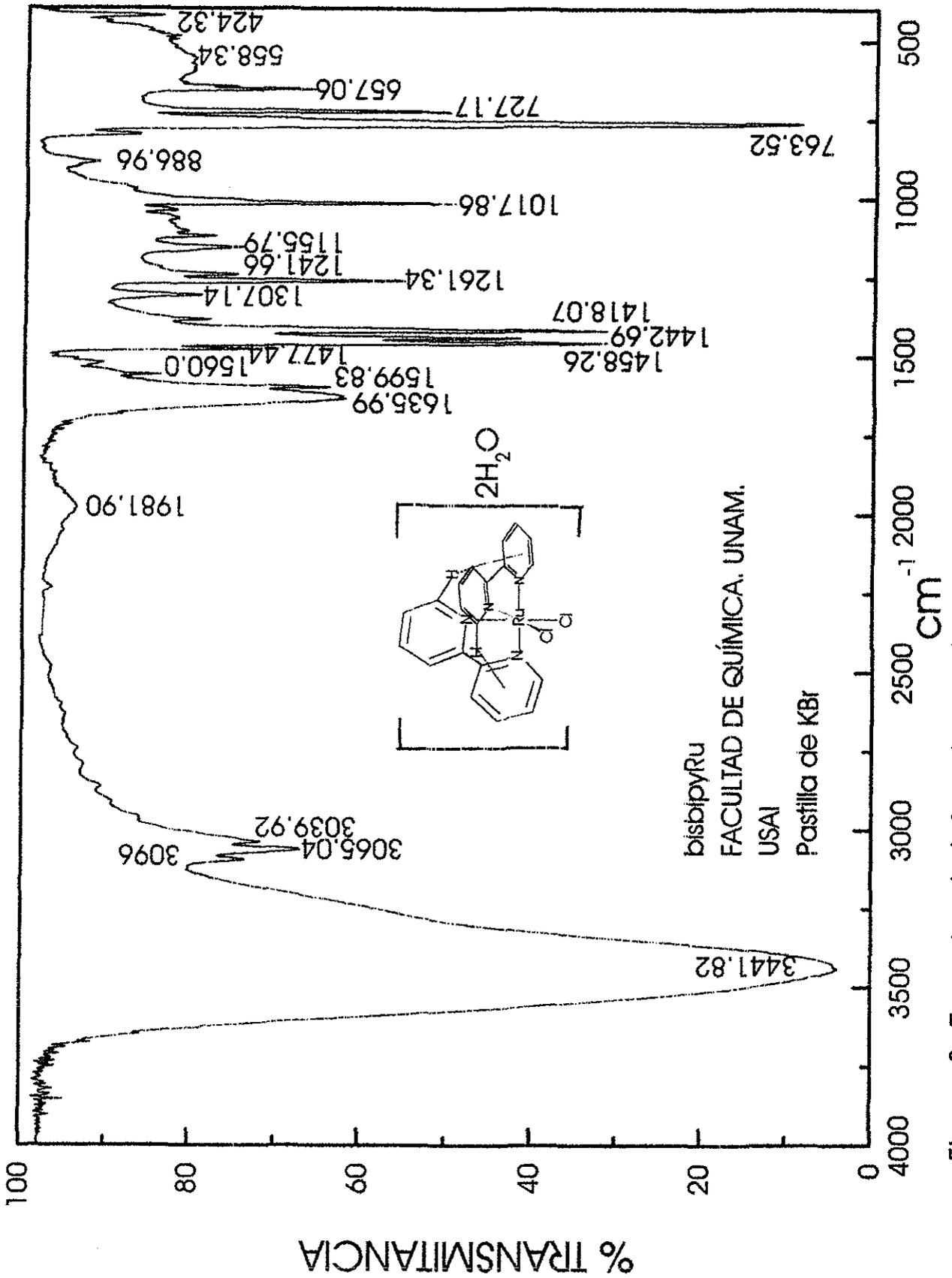


Figura 3. Espectro de infrarrojo medio de bisbipyRu en pastilla de KBr

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

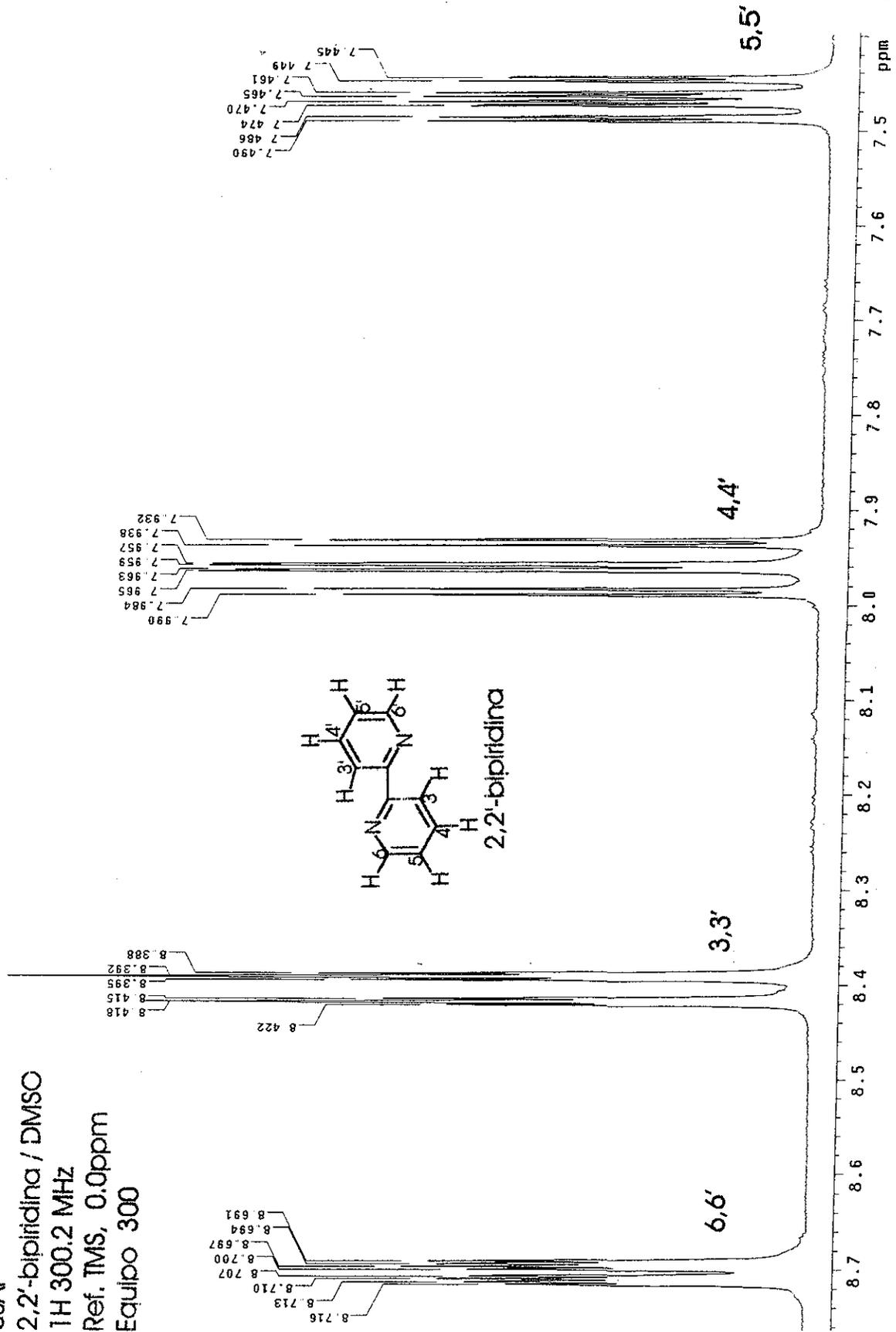
USAI

2,2'-bipiridina / DMSO

1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Espectro de RMN ¹H de 2,2'-bipiridina en DMSO-d₆. Ampliación región aromática

400 21281
MORNING STAR

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

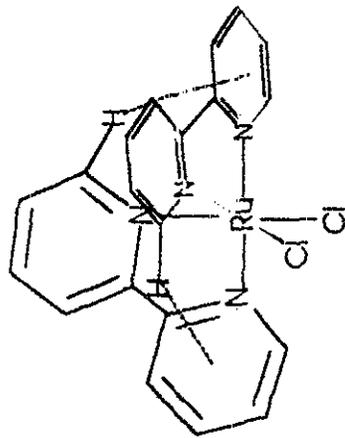
USAI

bisbipyRu / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

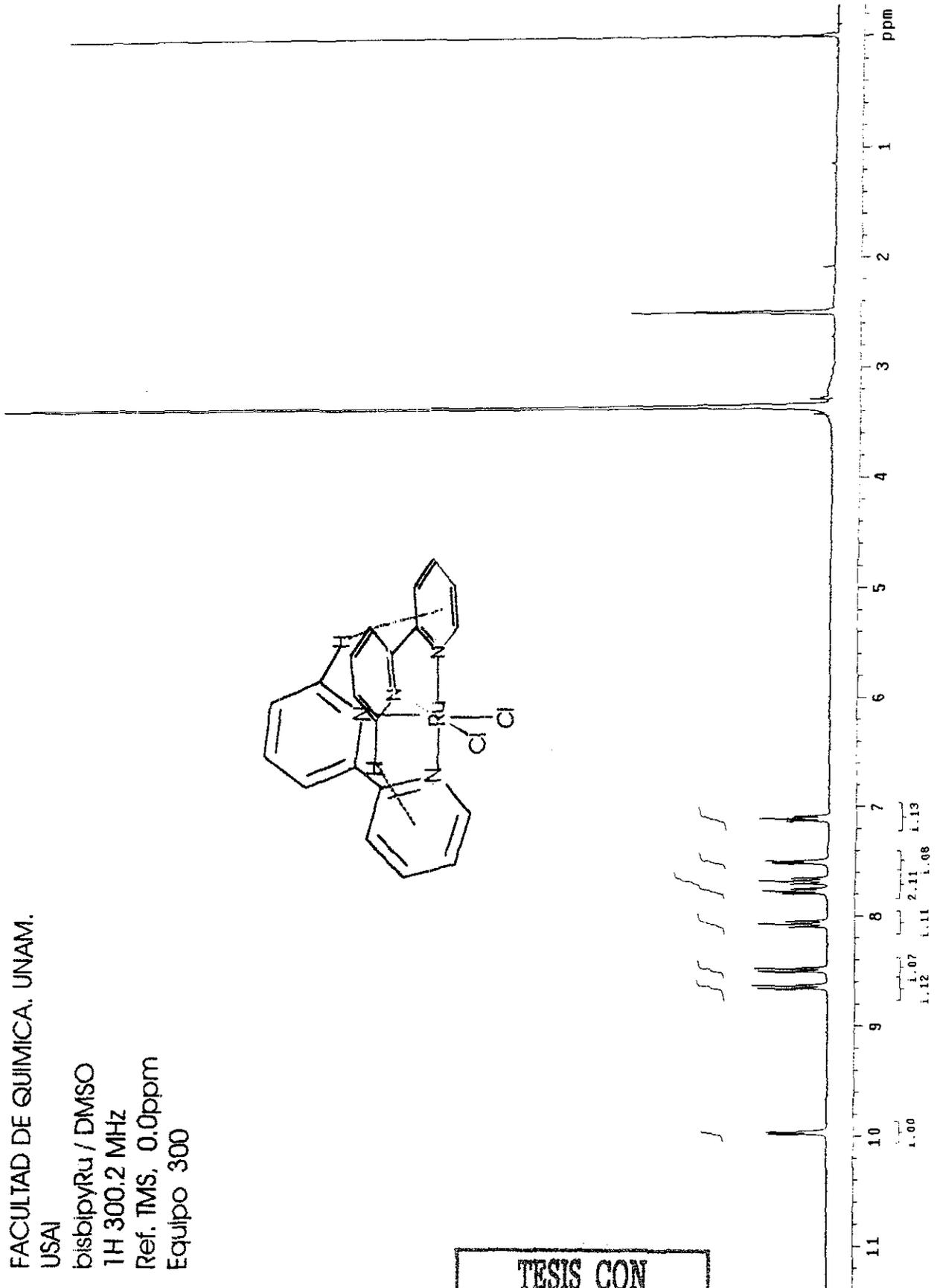
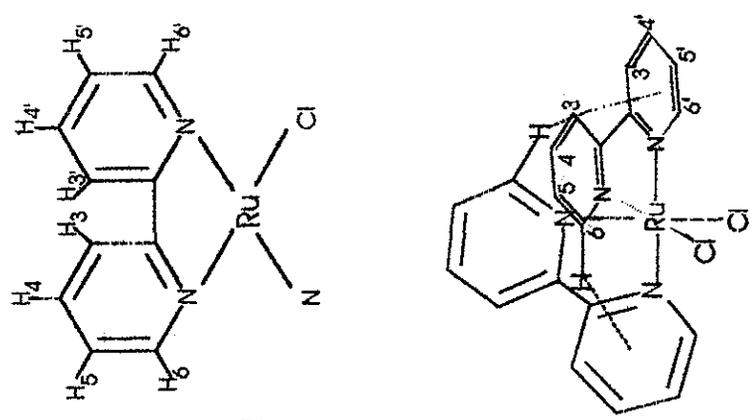


Figura 5. Espectro de RMN ¹H de bisbipyRu en DMSO-d₆

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
 USAI
 bisbipyRu / DMSO
 COSY 90-90 300.2 MHz
 Ref. TMS, 0.0ppm
 Equipo 300



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

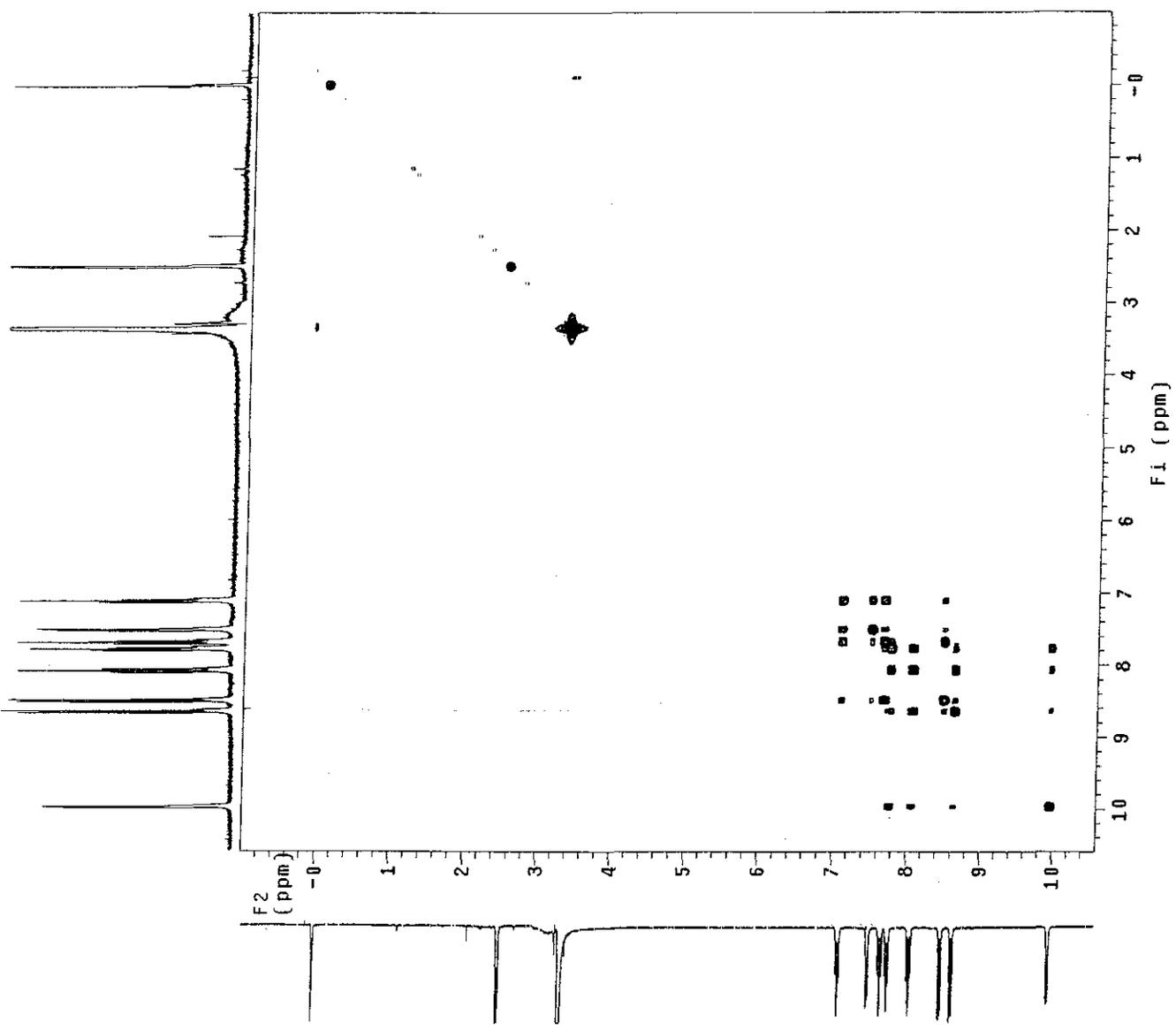
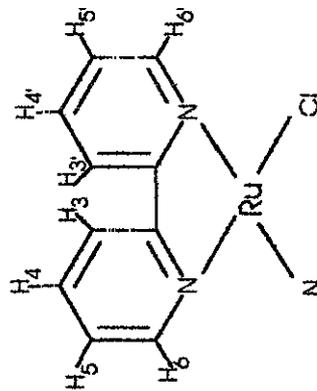
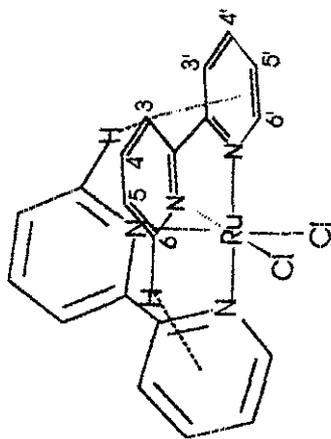
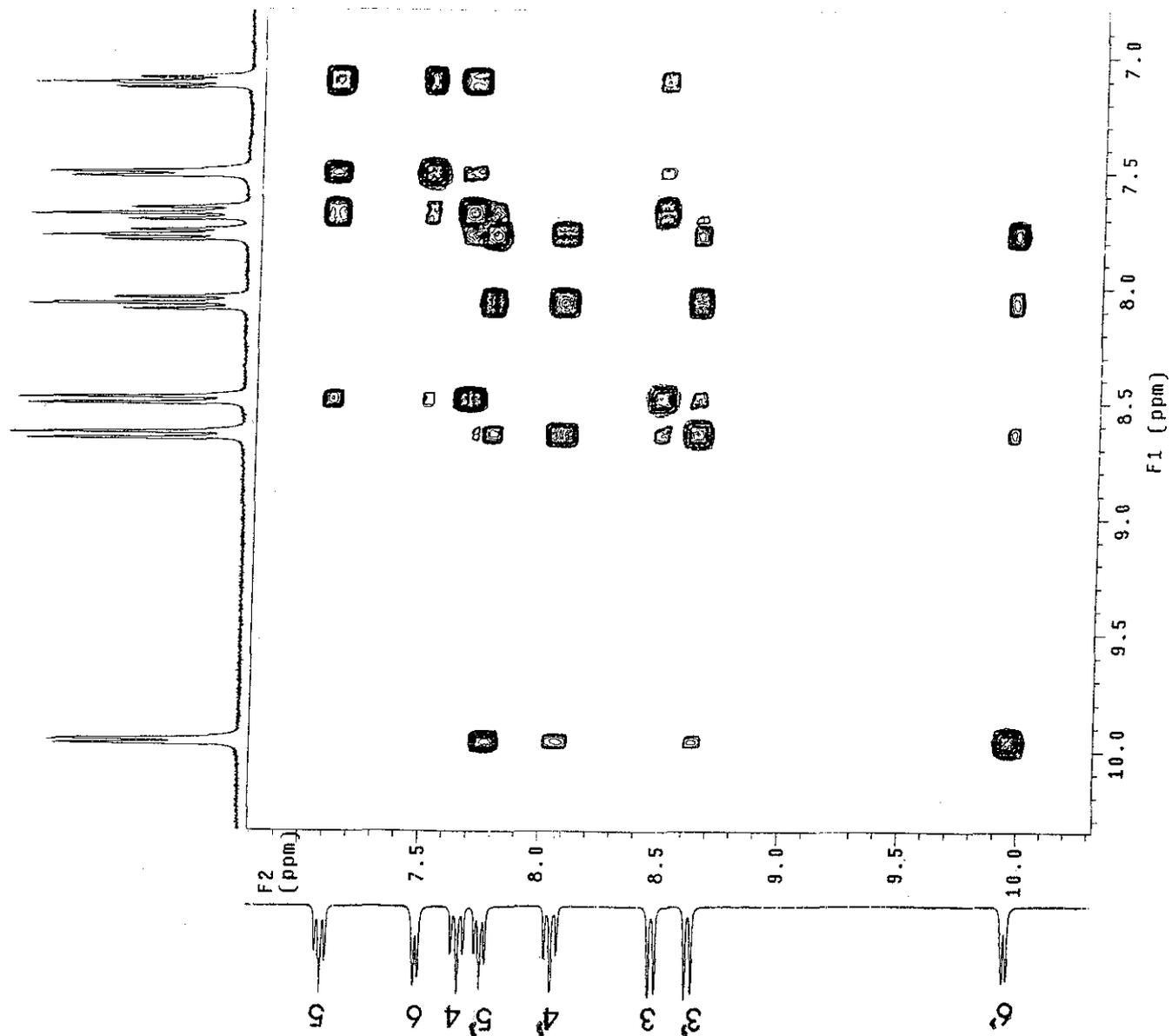


Figura 6. Experimento COSY de bisbipyRu en DMSO-d₆

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
 USAI
 bisbipyRu / DMSO
 COSY 90-90 300.2 MHz
 Ref. TMS, 0.0ppm
 Equipo 300



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Experimento COSY de bisbipyRu en DMSO-d₆. Ampliación de la región aromática

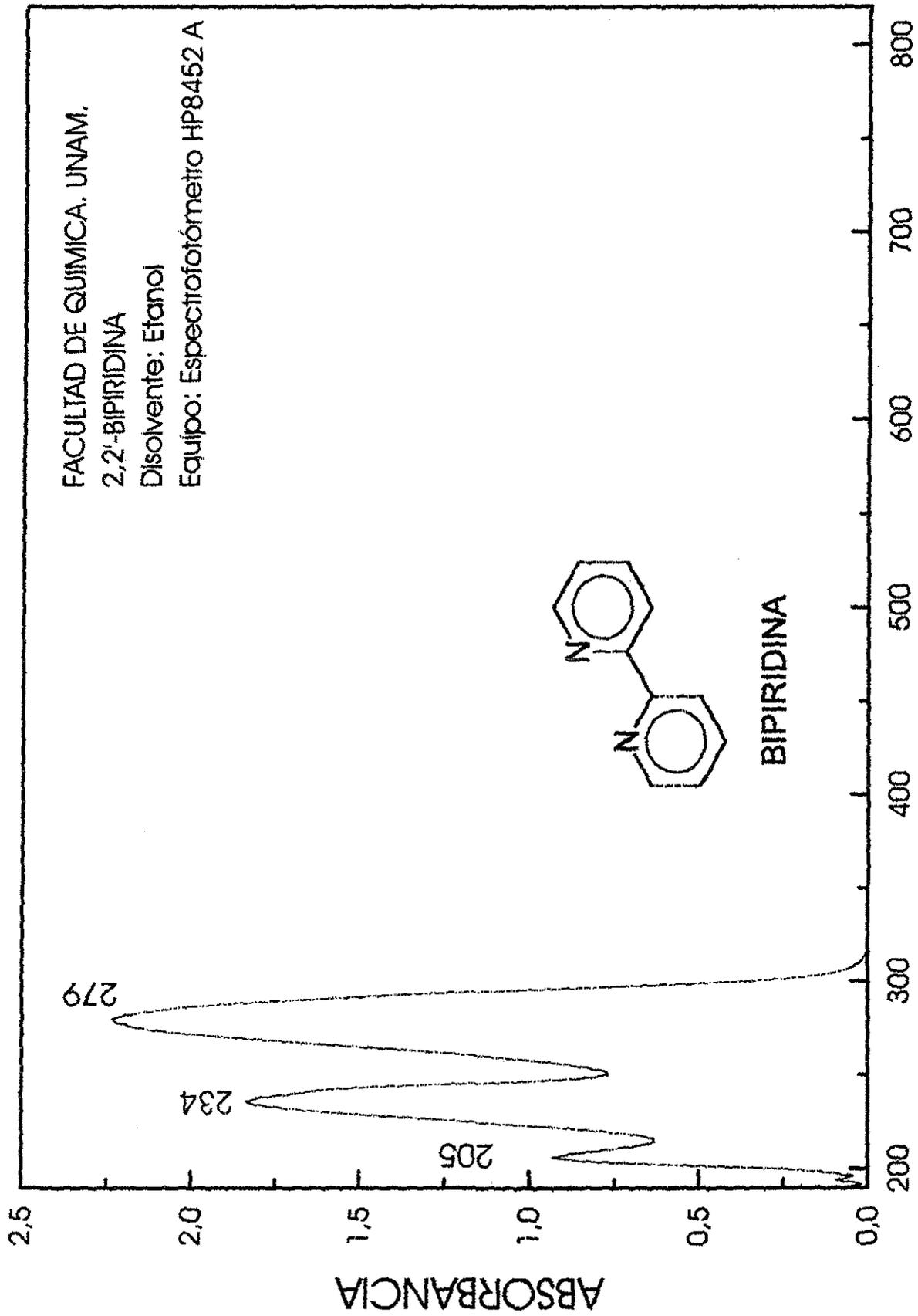


Figura 8. Espectro UV-Vis de 2,2'-bipiridina en etanol

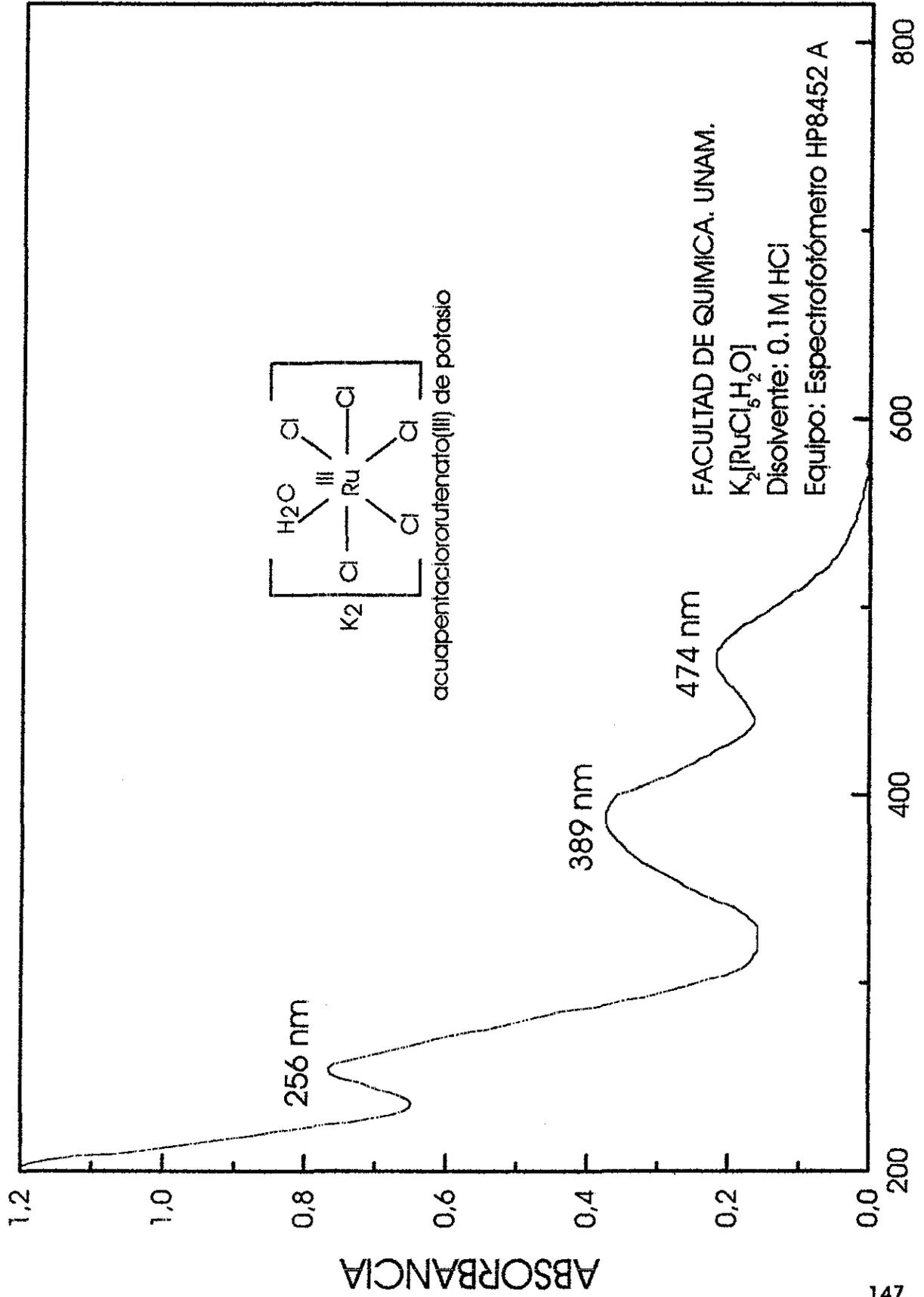


Figura 9. Espectro electrónico de la región UV-Vis de $K_2[RuCl_5H_2O]$

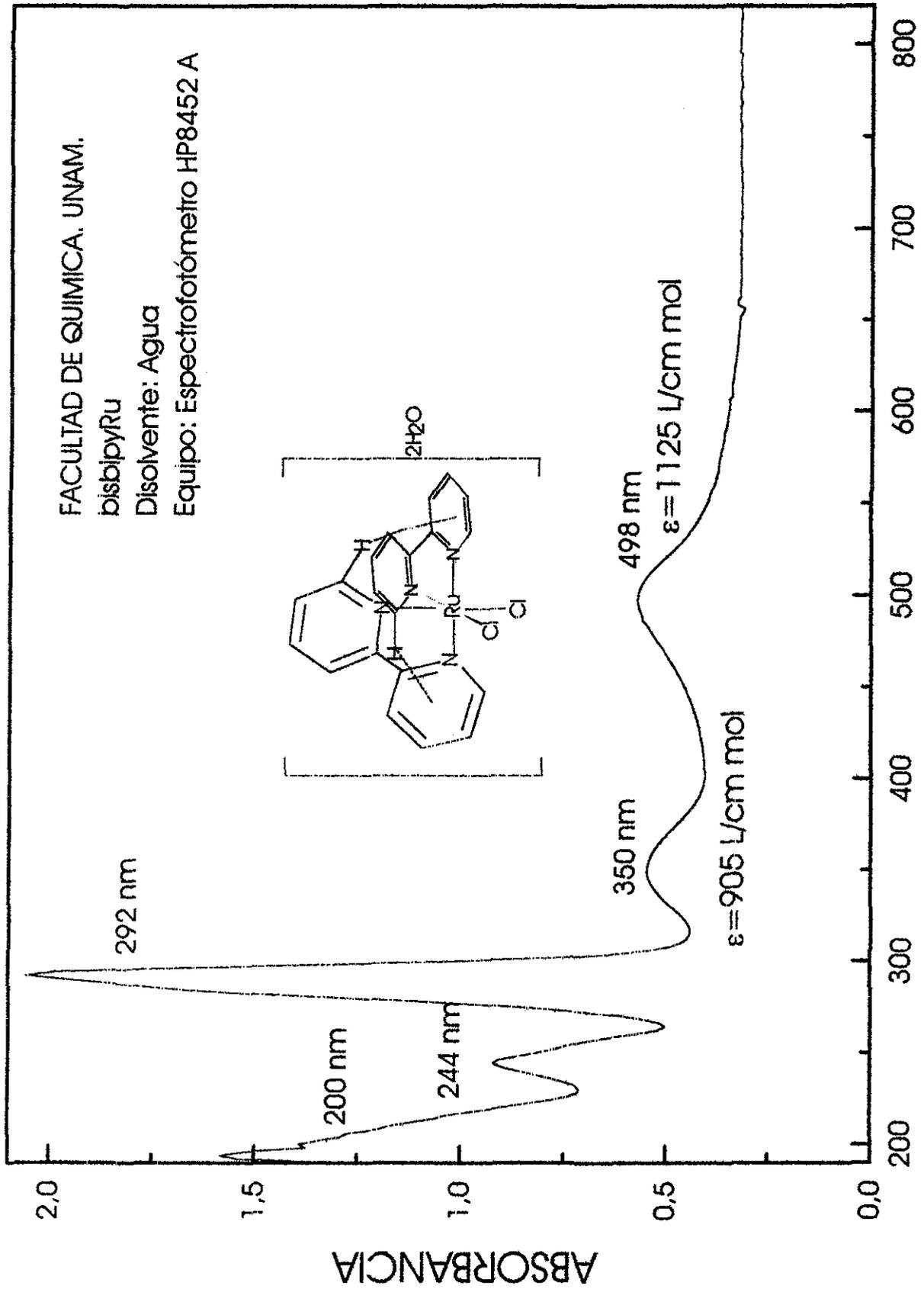


Figura 10. Espectro electrónico UV-Vis de bisbipyRu en agua

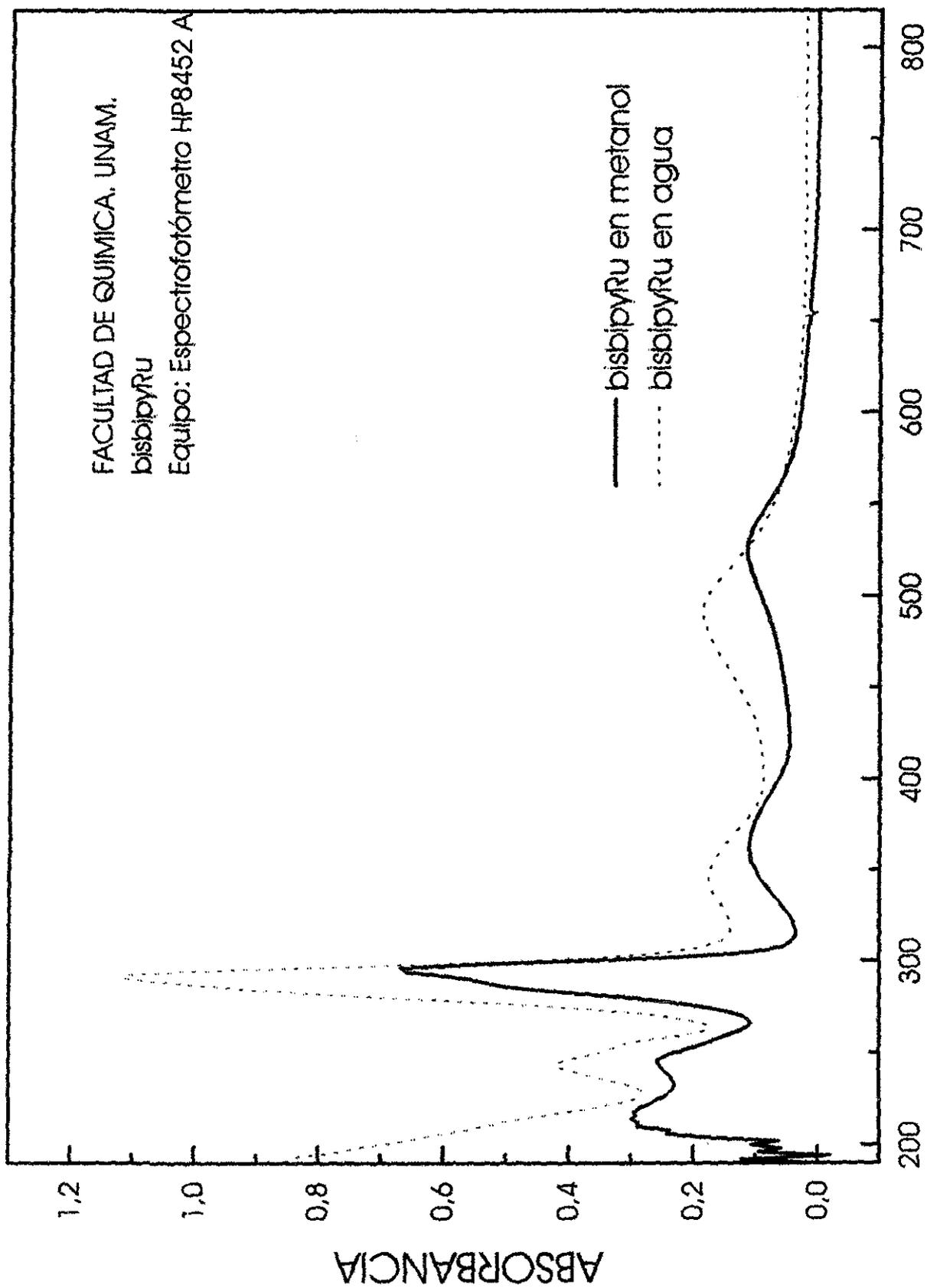


Figura 11. Espectro electrónico UV-Vis de bisbipyRu en agua y metanol

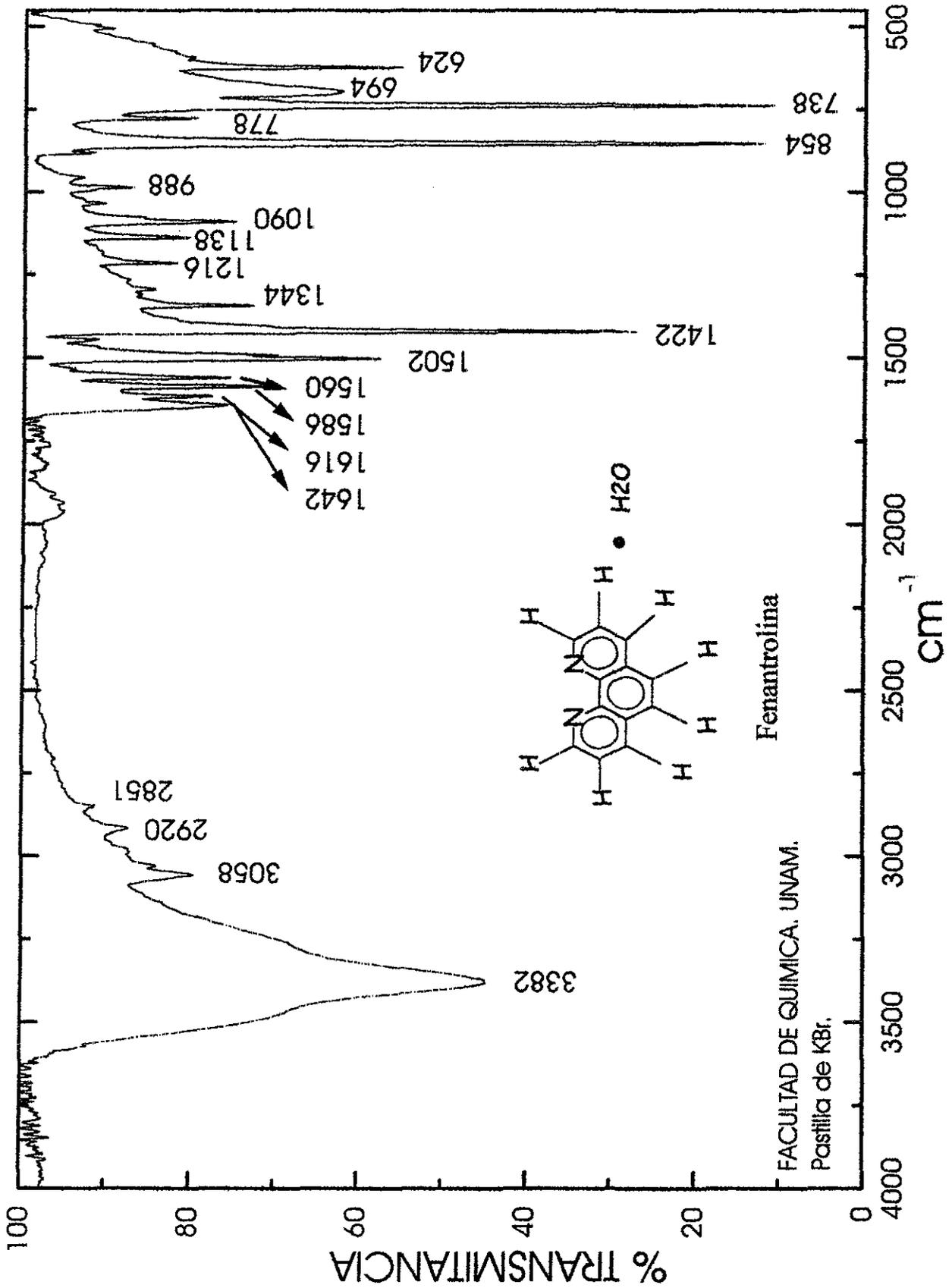


Figura 12. Espectro IR en la región media de 1,10-fenantrolina en pastilla de KBr

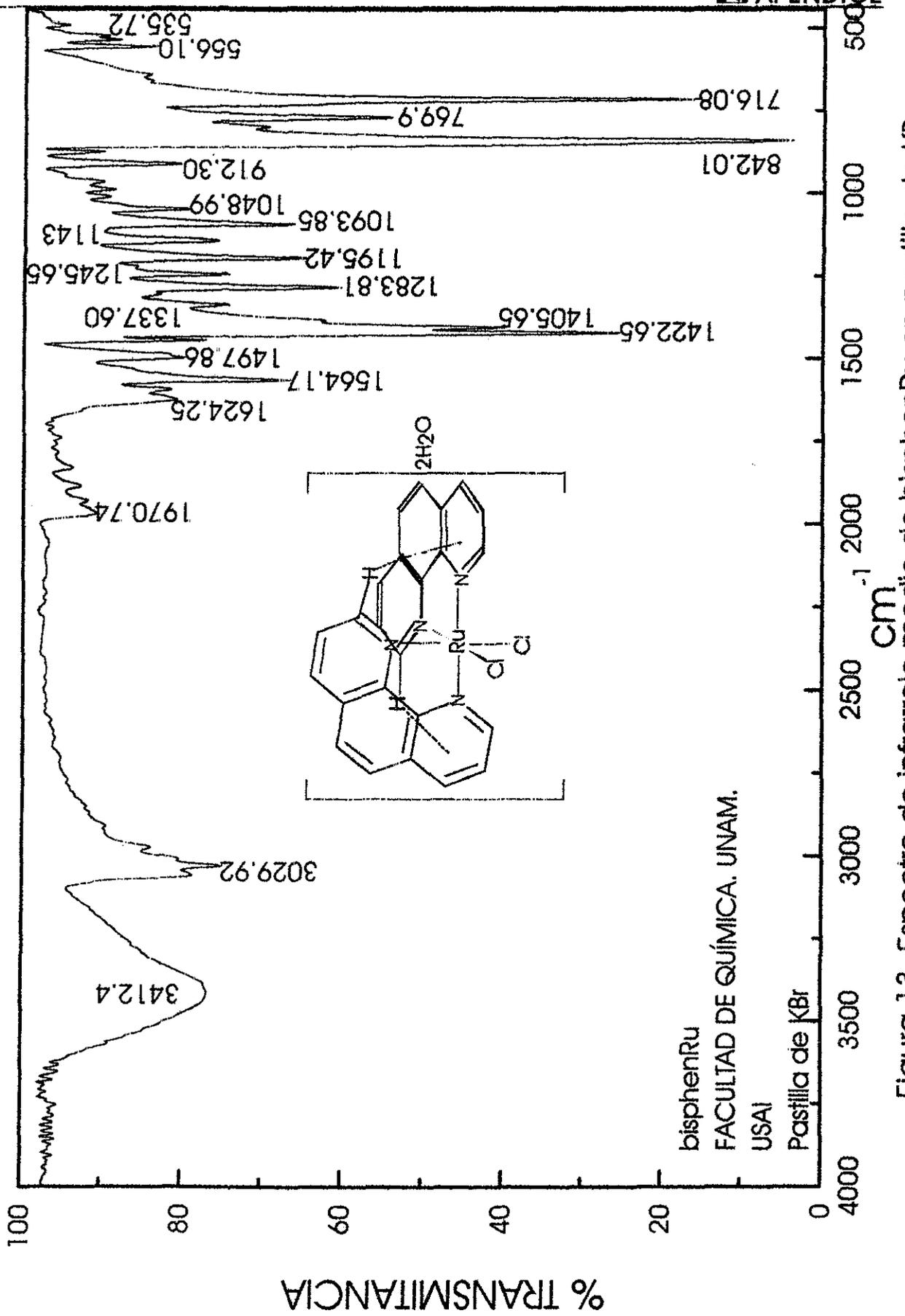


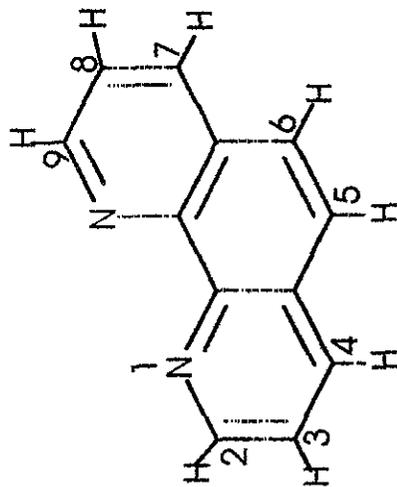
Figura 13. Espectro de infrarrojo medio de bisphenRu en pastilla de KBr

Fenantrolina / DMSO

H1

Ref. DMSO

Equipo 500



1,10-fenantrolina

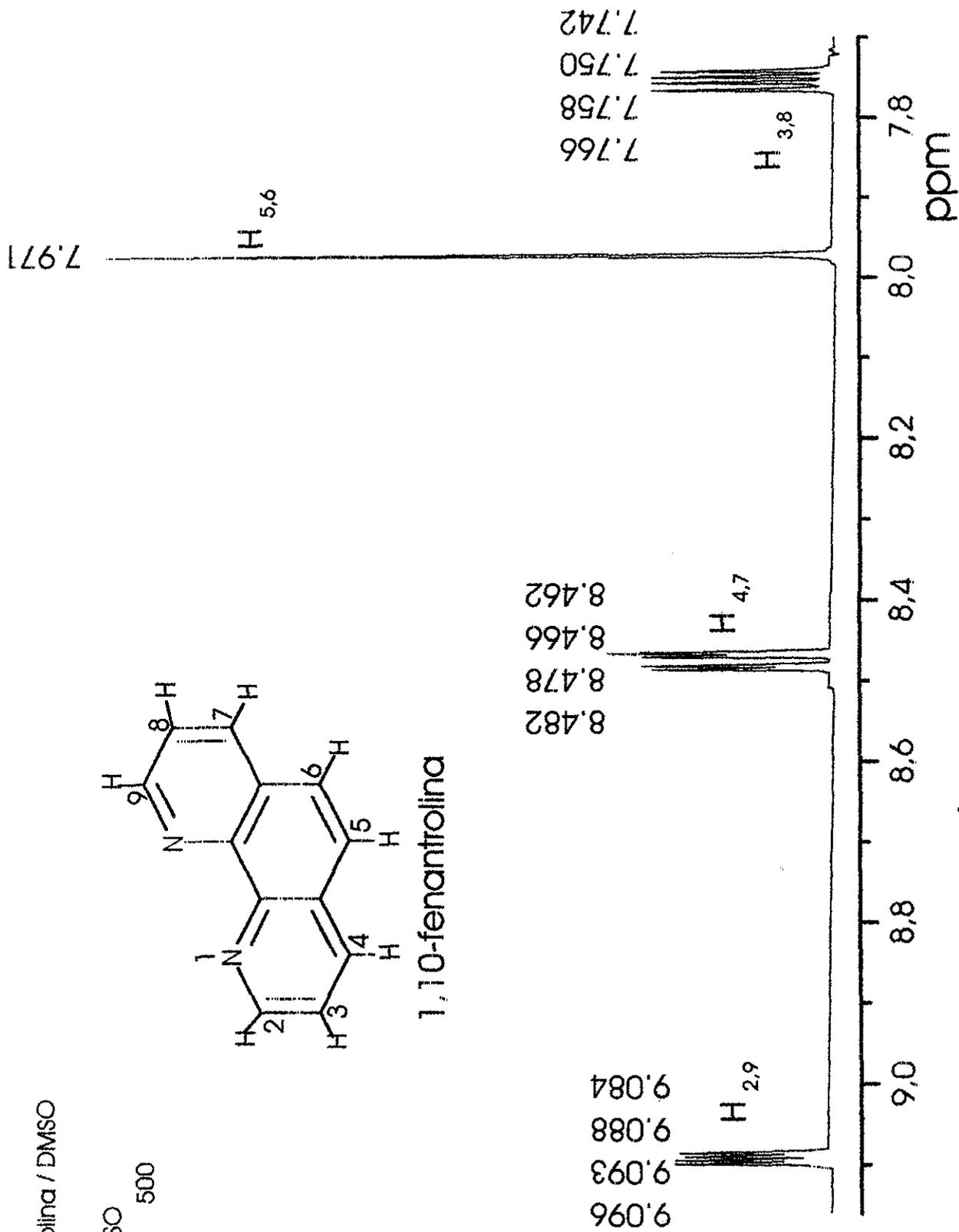
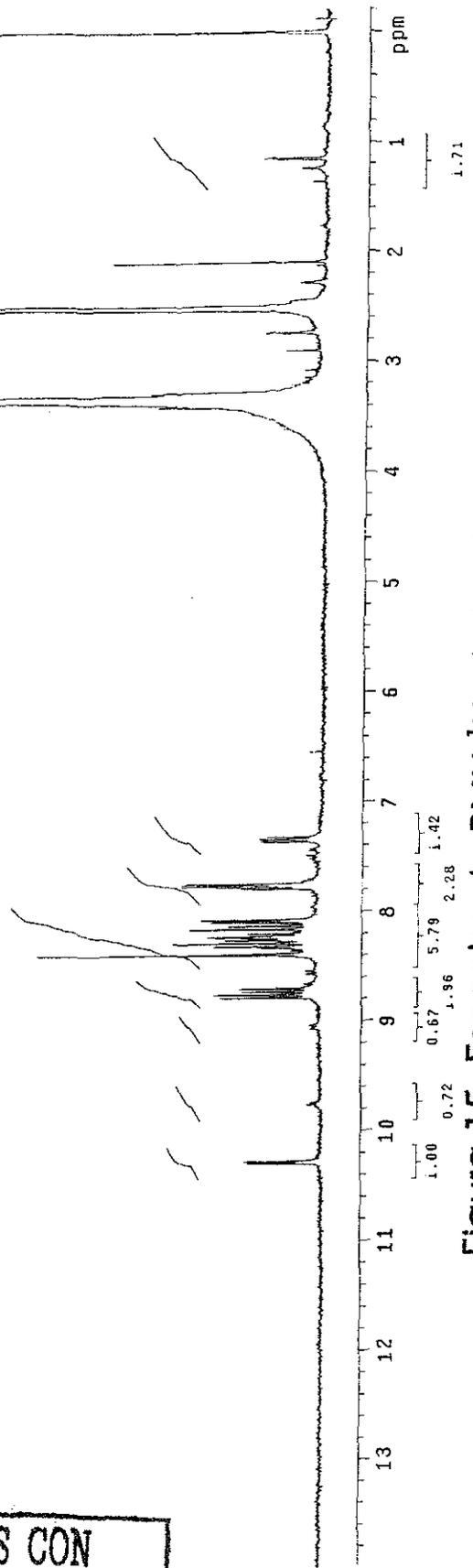
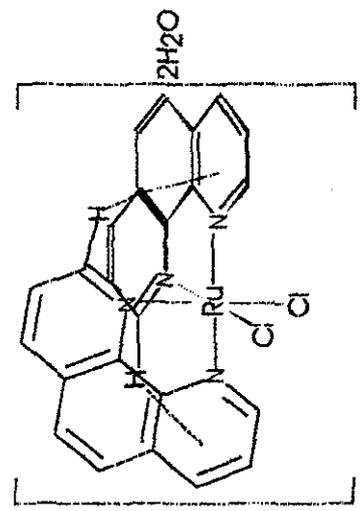


Figura 14. Espectro RMN ¹H de la 1,10-fenantrolina en DMSO

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USAI
bisphenRu / DMSO
1H 300.2 MHz
Ref. TMS, 0.0ppm
Equipo 300



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 15. Espectro de RMN ¹H de bisphenRu en DMSO-d₆

NO. 1000
1910

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

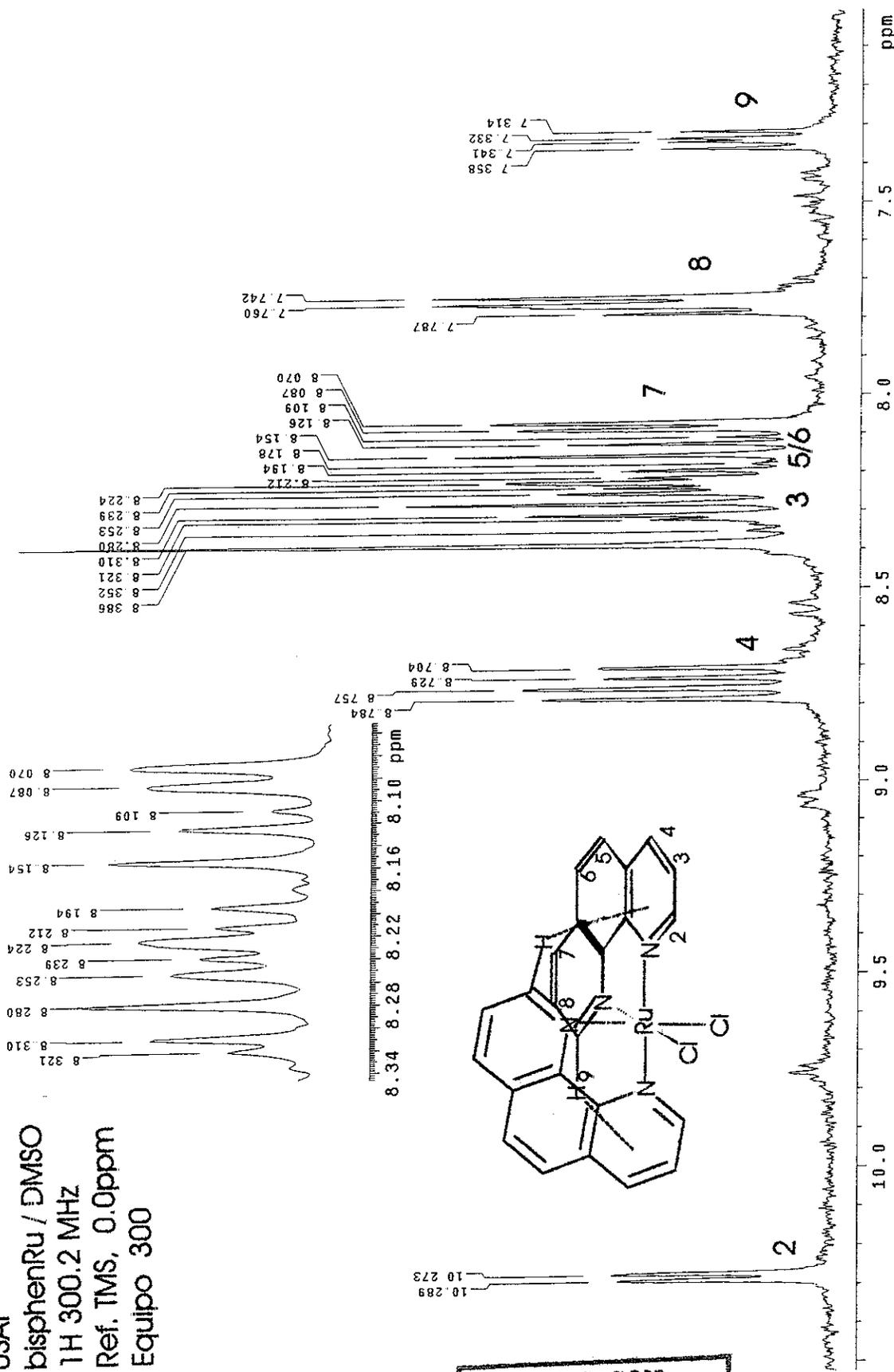
USAI

bisphenRu / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 16. Espectro de RMN ¹H de bisphenRu en DMSO-d₆. Ampliación región aromática

GO HERE
FOR MORE

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

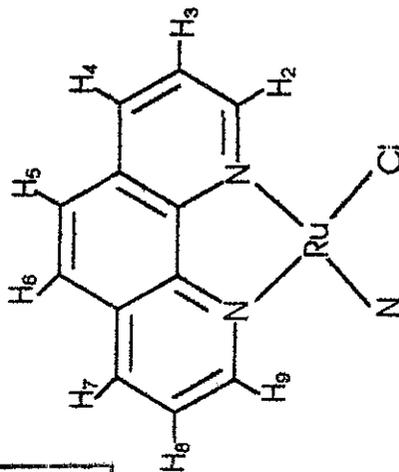
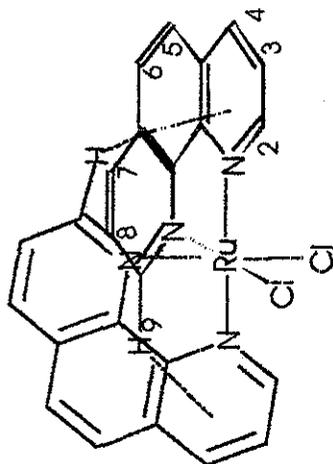
USAI

bisphenRu / DMSO

COSY 90-90 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

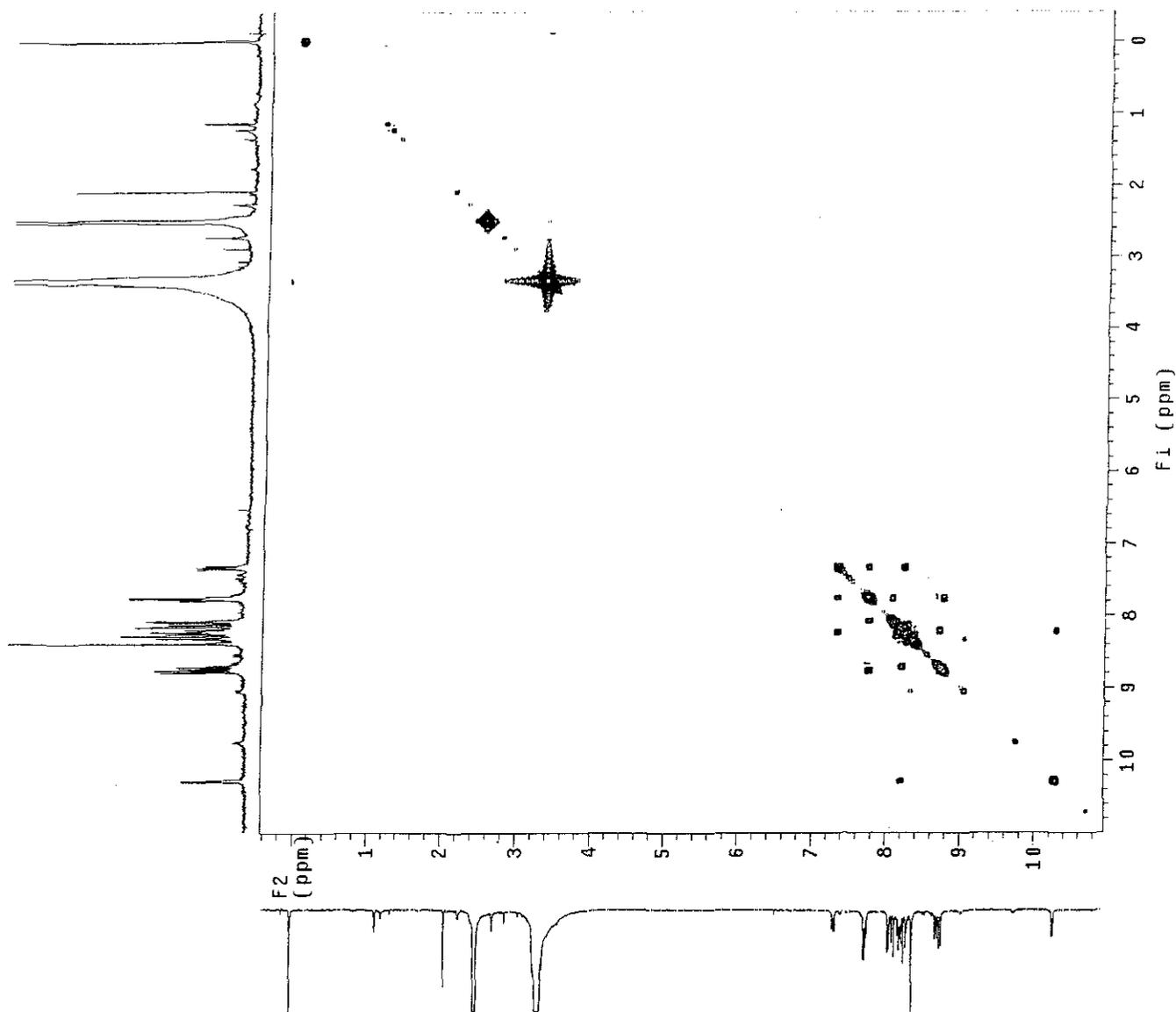


Figura 17. Experimento COSY de bisphenRu en DMSO-d₆



FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.
USAI

bisphenRu / DMSO
COSY 90-90 300.2 MHz
Ref. TMS, 0.0ppm
Equipo 300

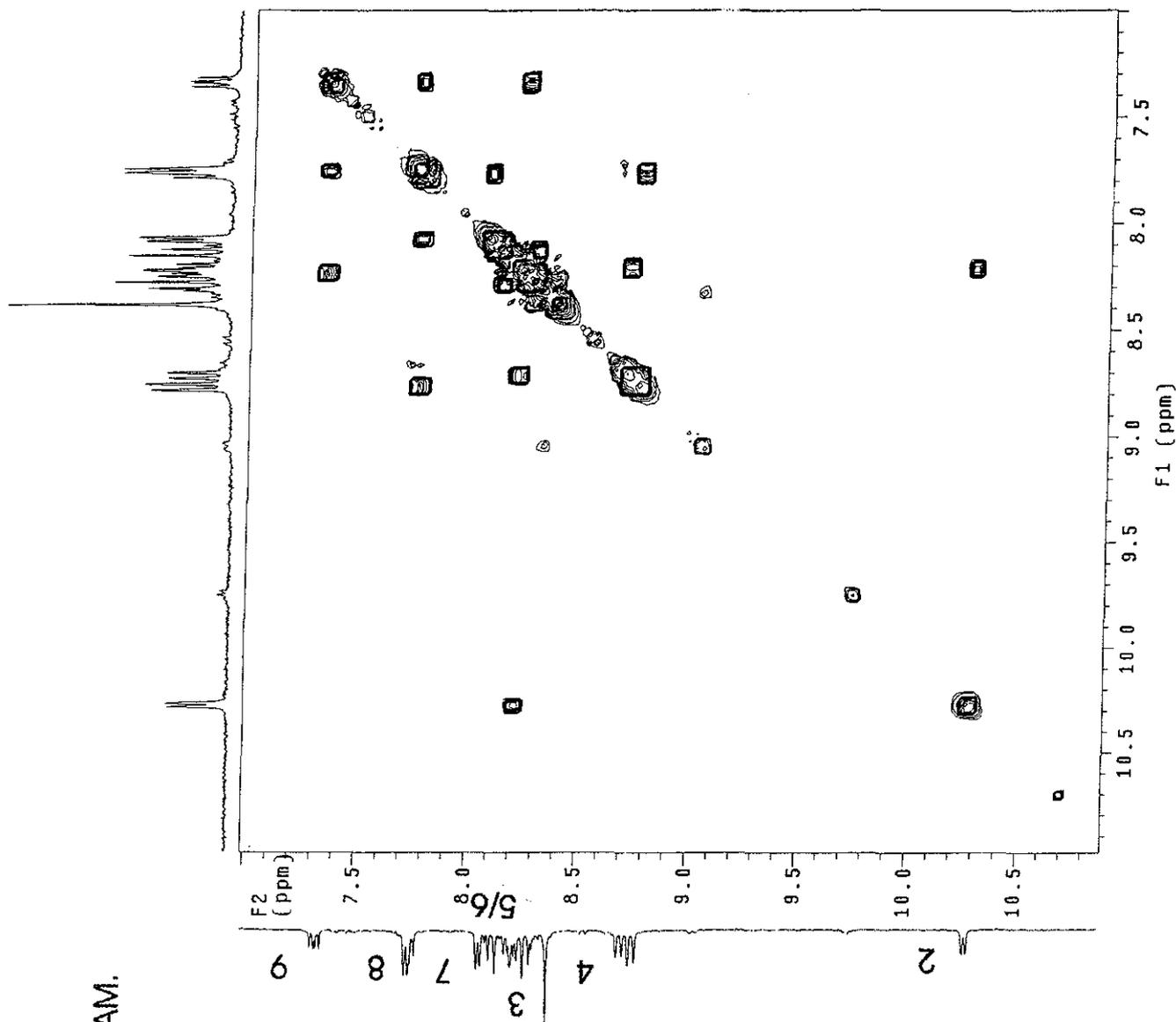
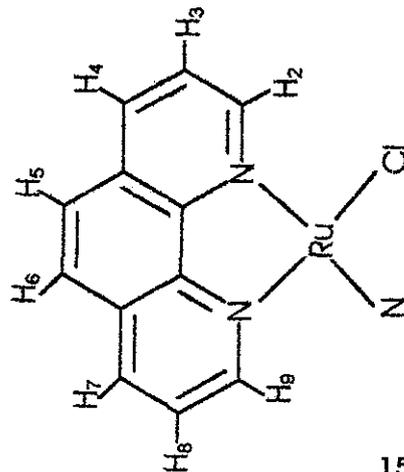
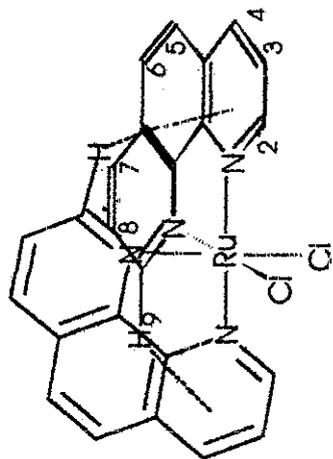


Figura 18. Experimento COSY de bisphenRu en DMSO-d₆. Ampliación de la región aromática

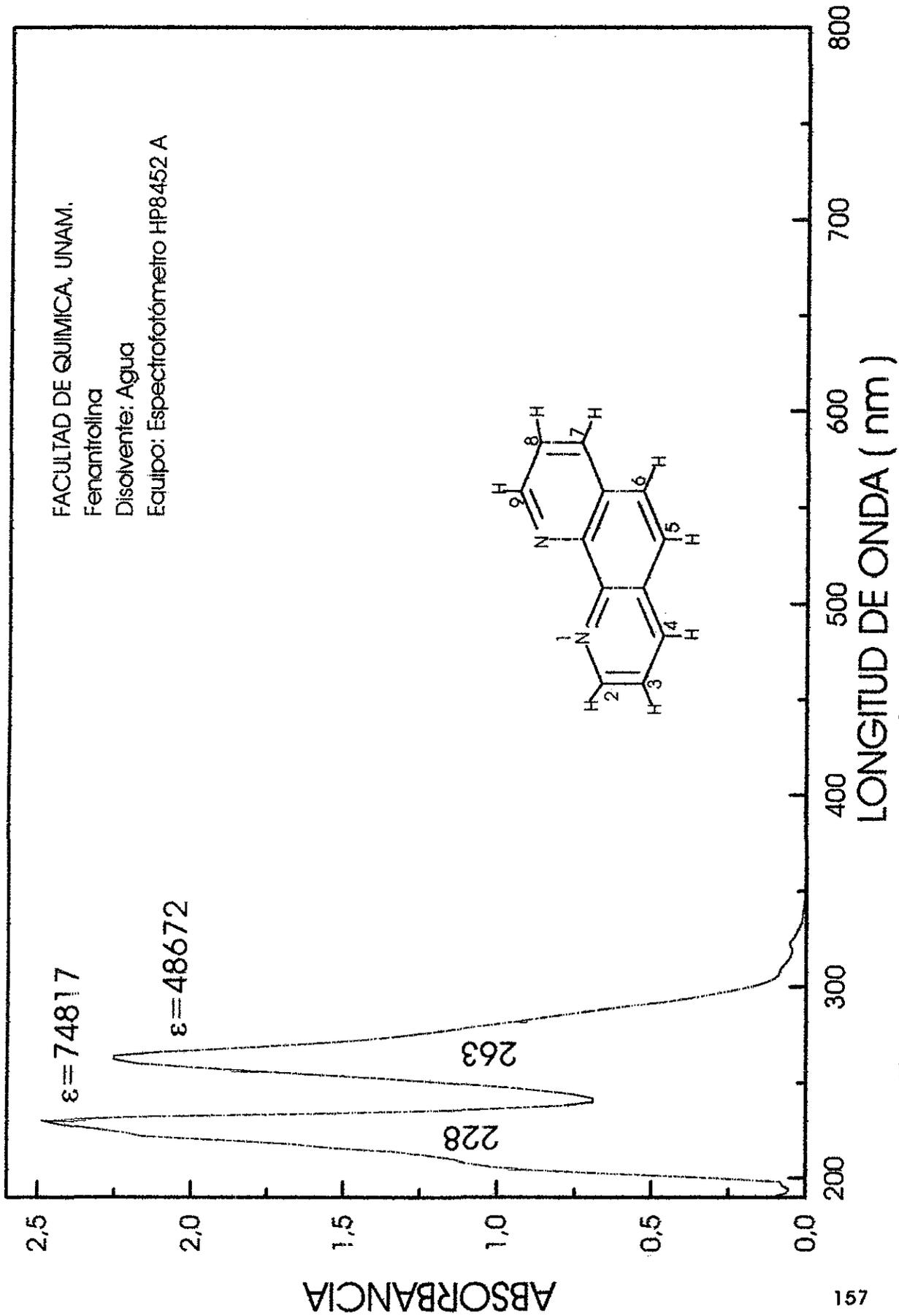


Figura 19. Espectro electrónico de la 1,10-fenantrolina

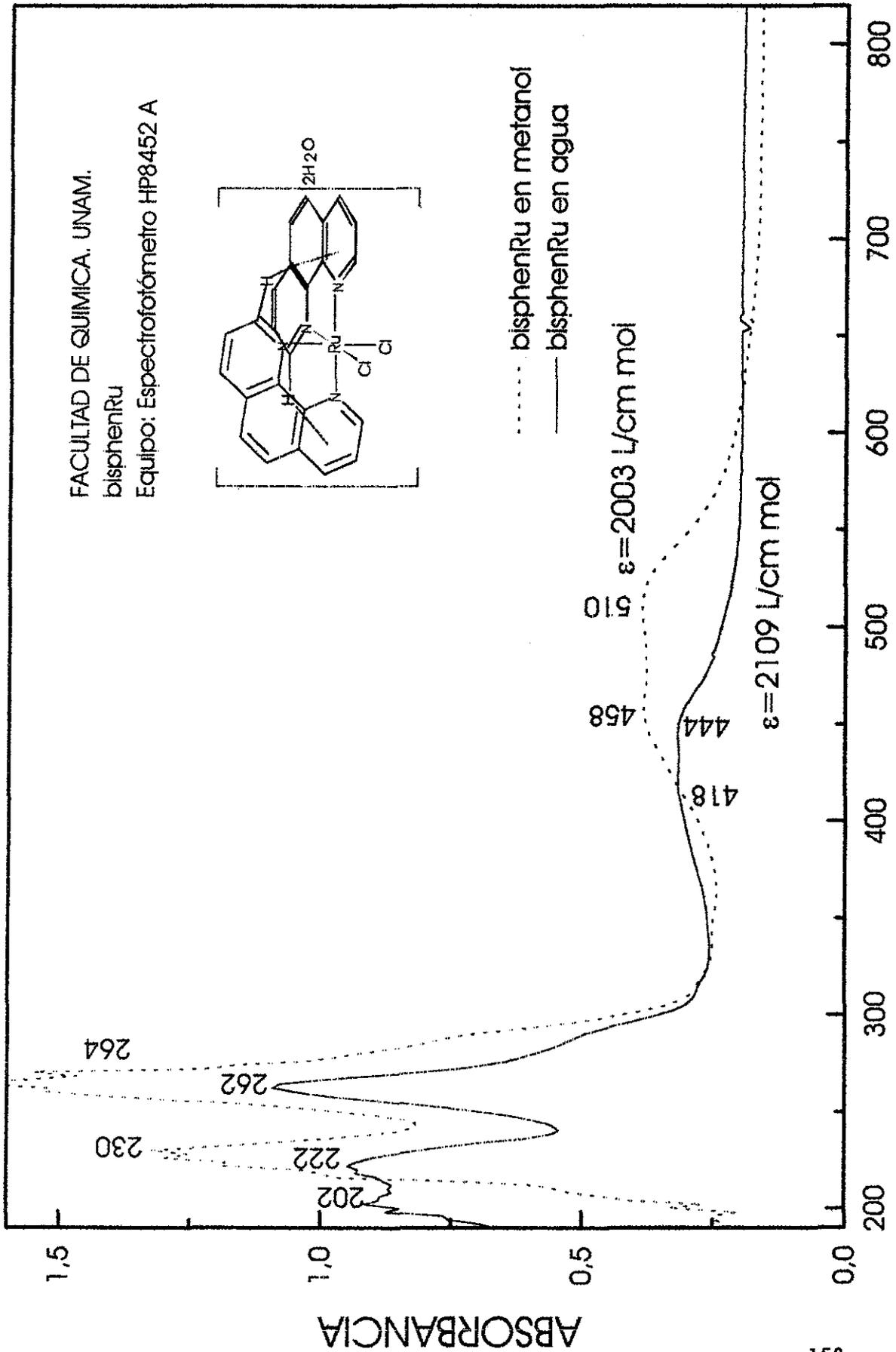


Figura 20. Espectro electrónico de bisphenRu en dos disolventes

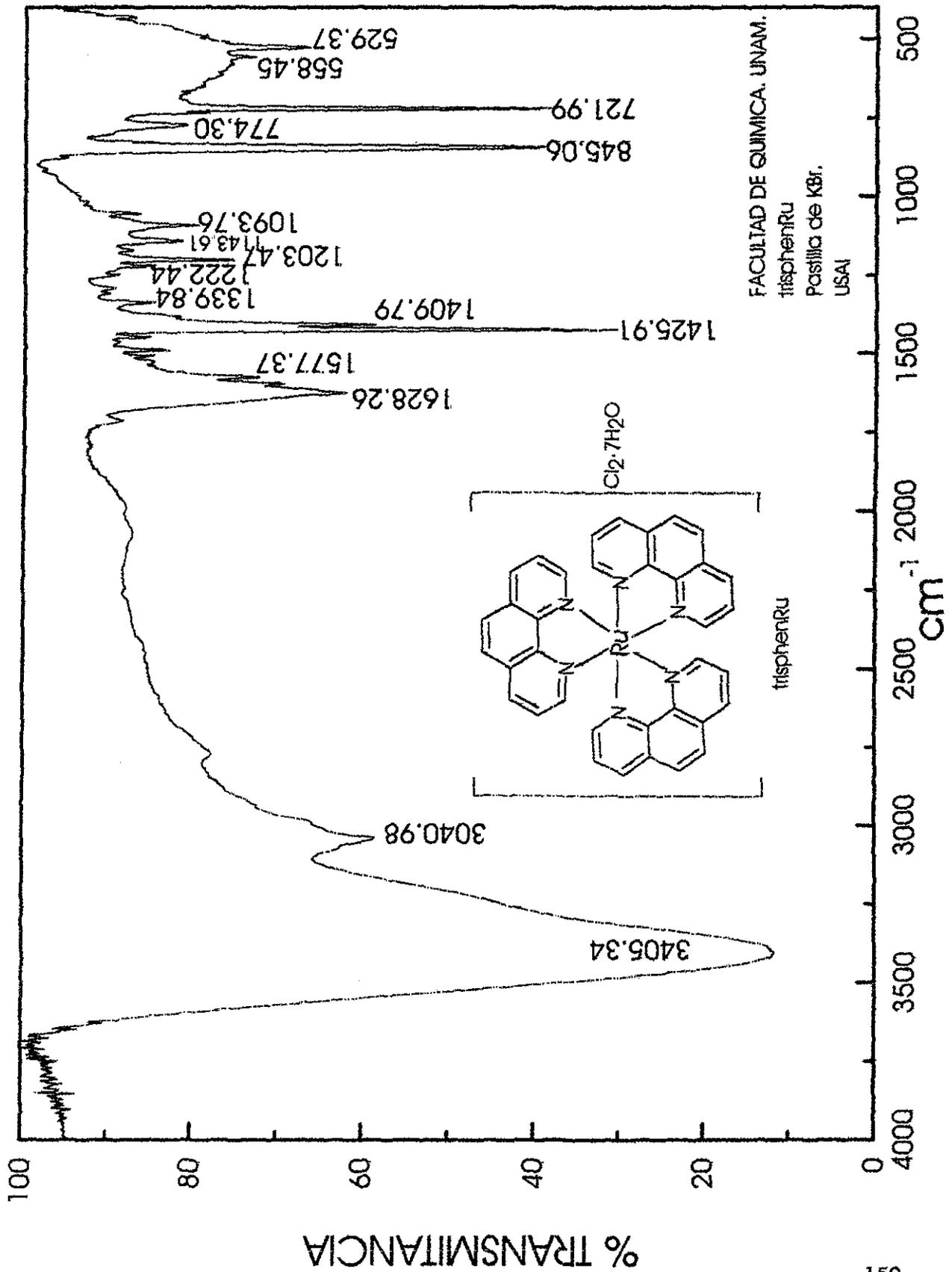


Figura 21. Espectro IR en la región media de trisphenRu en pastilla de KBr

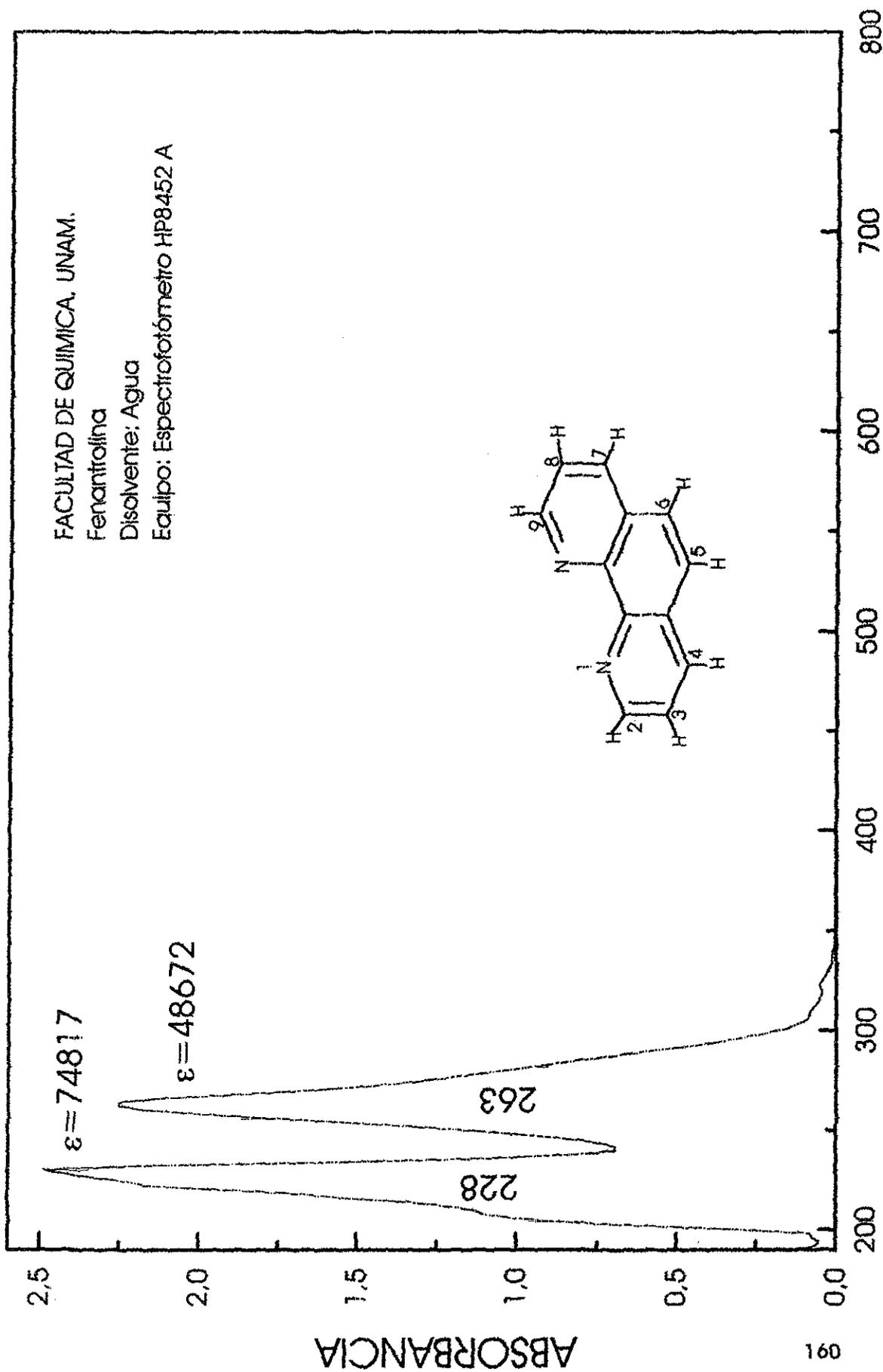


Figura 19. Espectro electrónico de la 1,10-fenantrolina

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

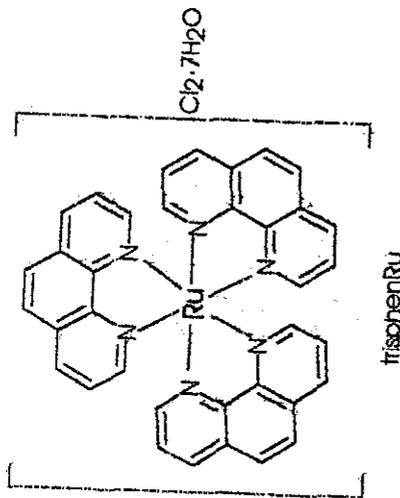
USAI

trisphenRu / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5,6

4,7 2,93,8



Figura 22. Espectro de RMN ¹H de trisphenRu en DMSO-d₆

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

trisphenRu / DMSO

^1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0ppm

Equipo 300

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

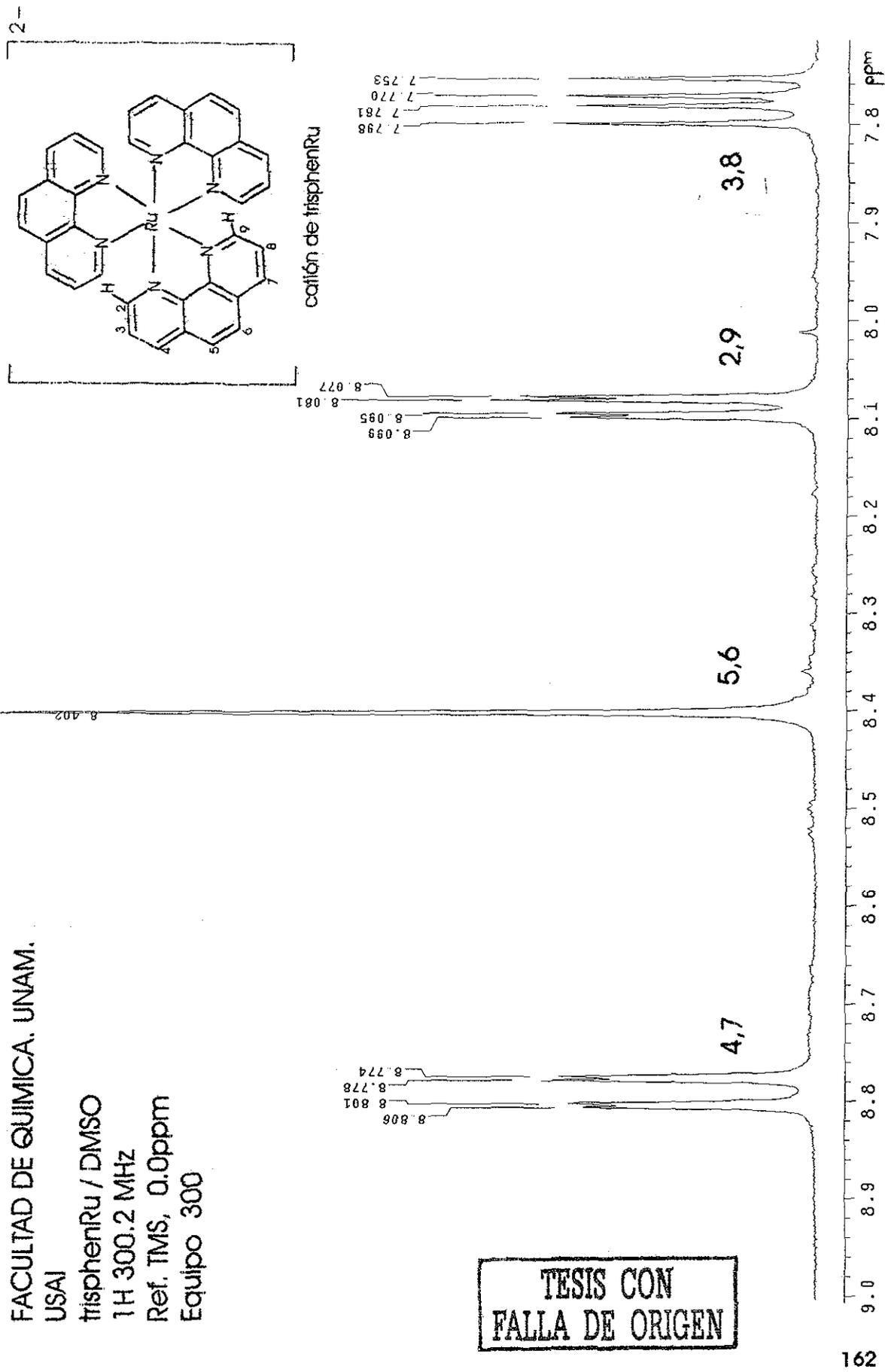


Figura 23. Espectro de RMN ^1H de trisphenRu en DMSO- d_6 , Ampliación de la región aromática

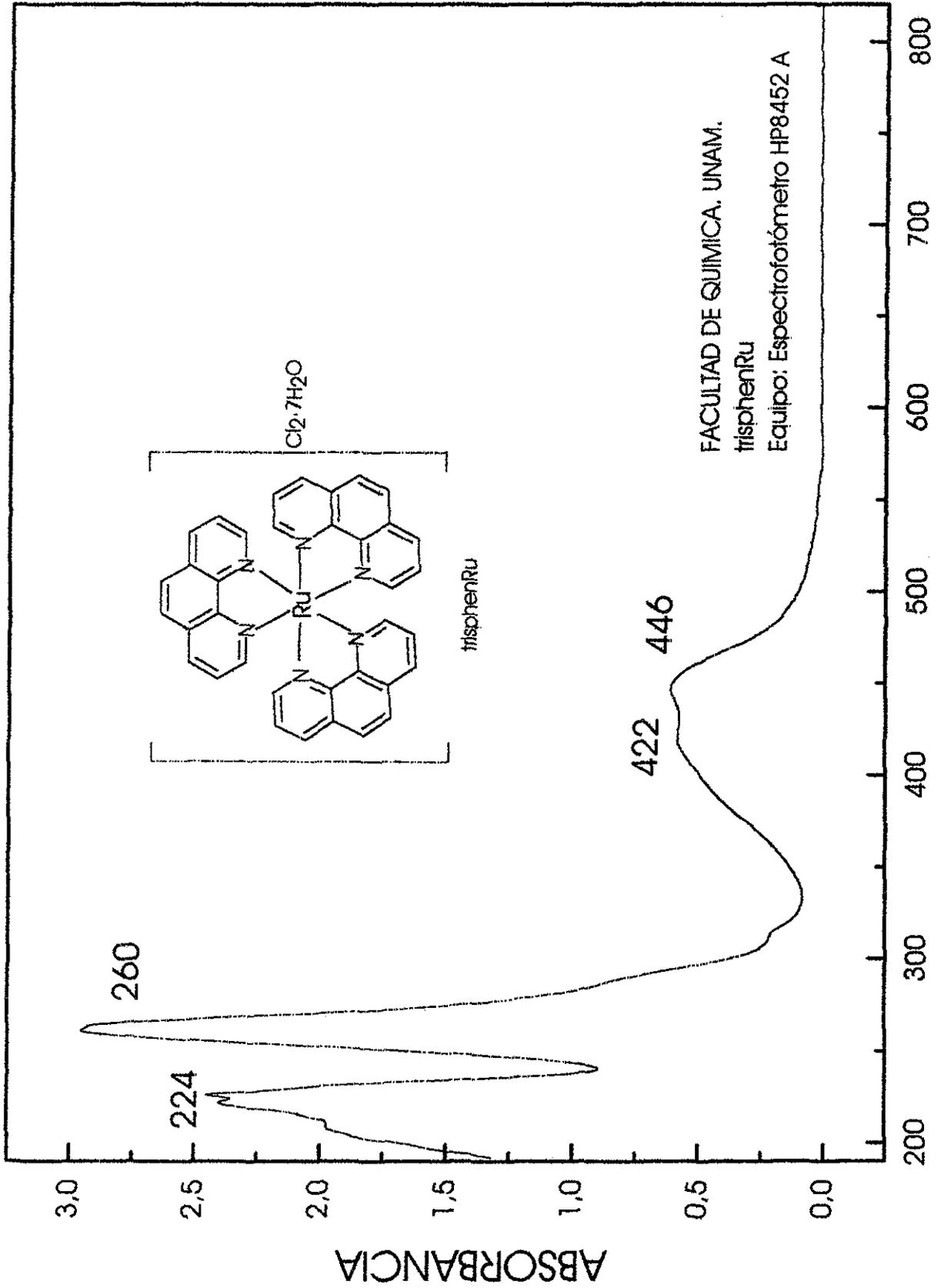


Figura 24. Espectro electrónico de trisphenRu en metanol

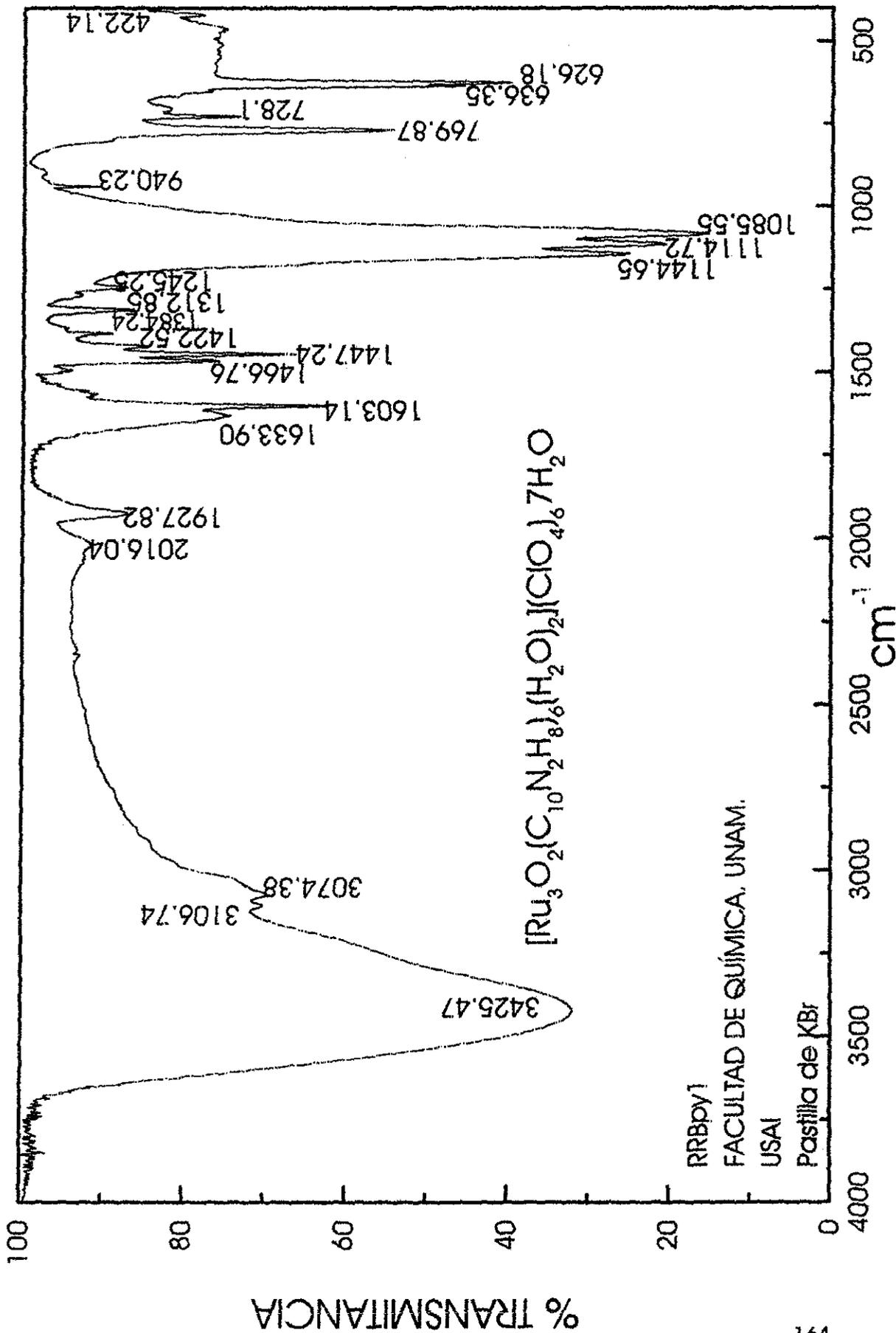


Figura 25. Espectro de infrarrojo medio de RRBpy1 en pastilla de KBr

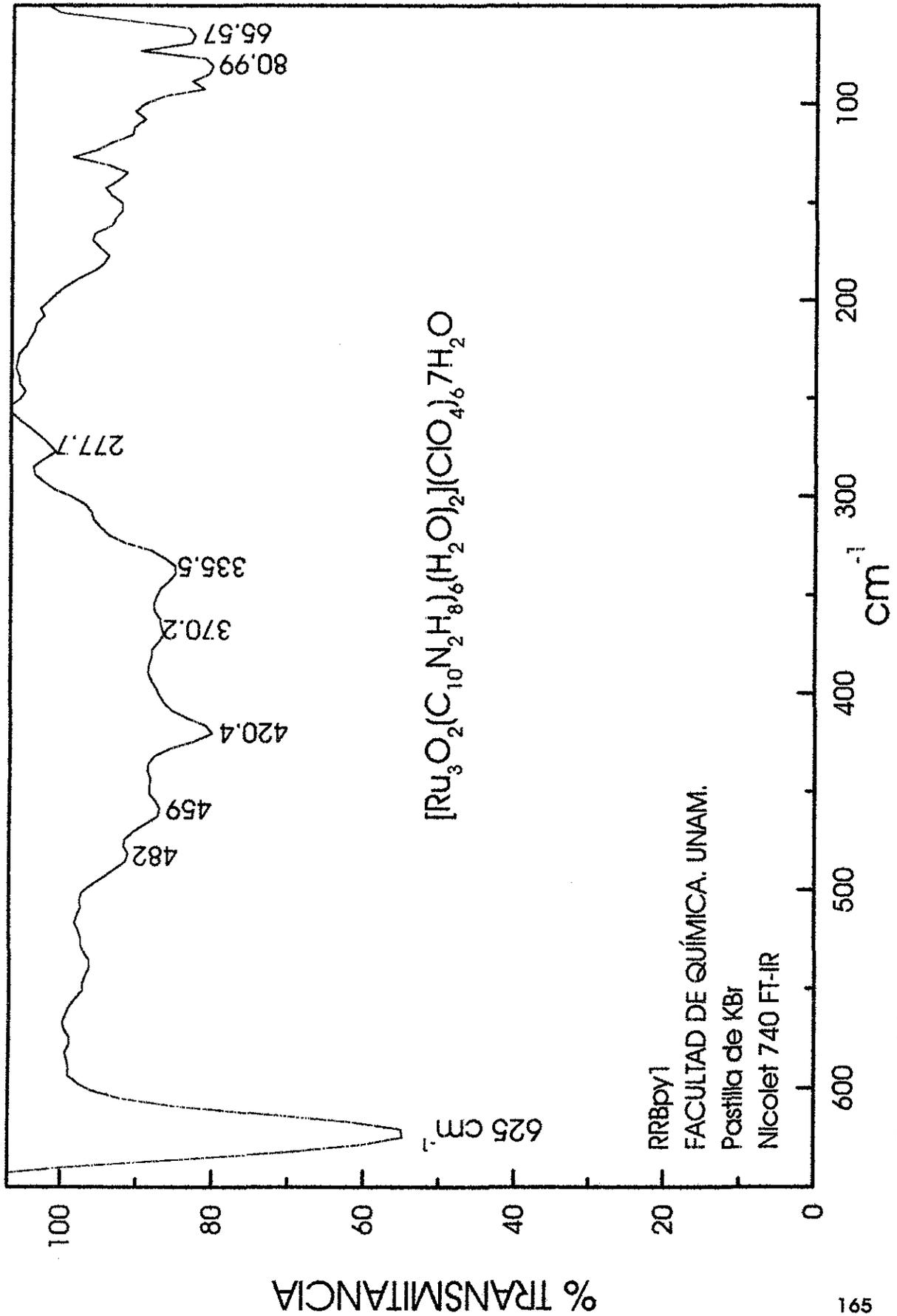


Figura 26. Espectro de infrarrojo lejano de RRBpy1 en pastilla de KBr

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

RRBpy1 / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

+D₂O

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

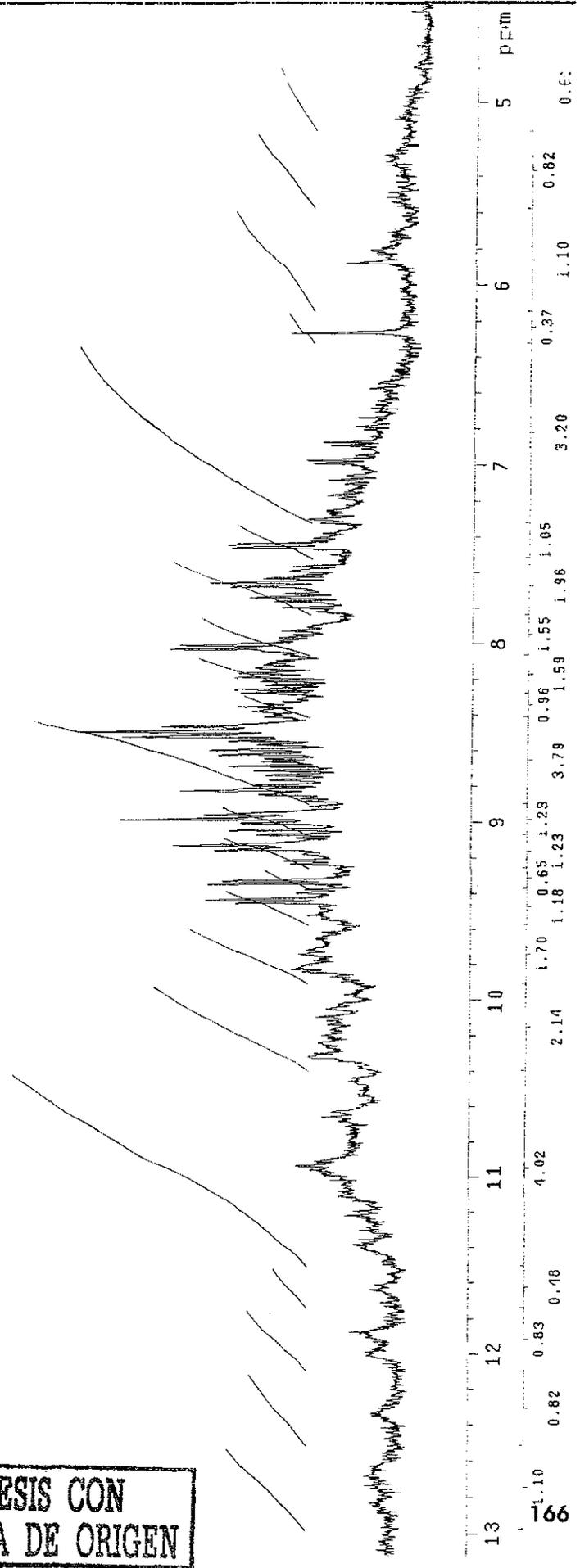
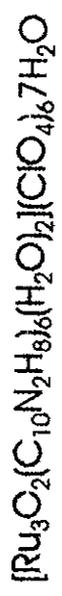


Figura 27. Espectro de RMN ¹H de RRBpy1 en DMSO-d₆. Ampliación región aromática

1. The first part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice" and "The Hon. Mr. Justice".

2. The second part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice" and "The Hon. Mr. Justice".

3. The third part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice" and "The Hon. Mr. Justice".

4. The fourth part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice" and "The Hon. Mr. Justice".

5. The fifth part of the document is a list of names and titles, including "The Hon. Mr. Justice" and "The Hon. Mr. Justice".

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

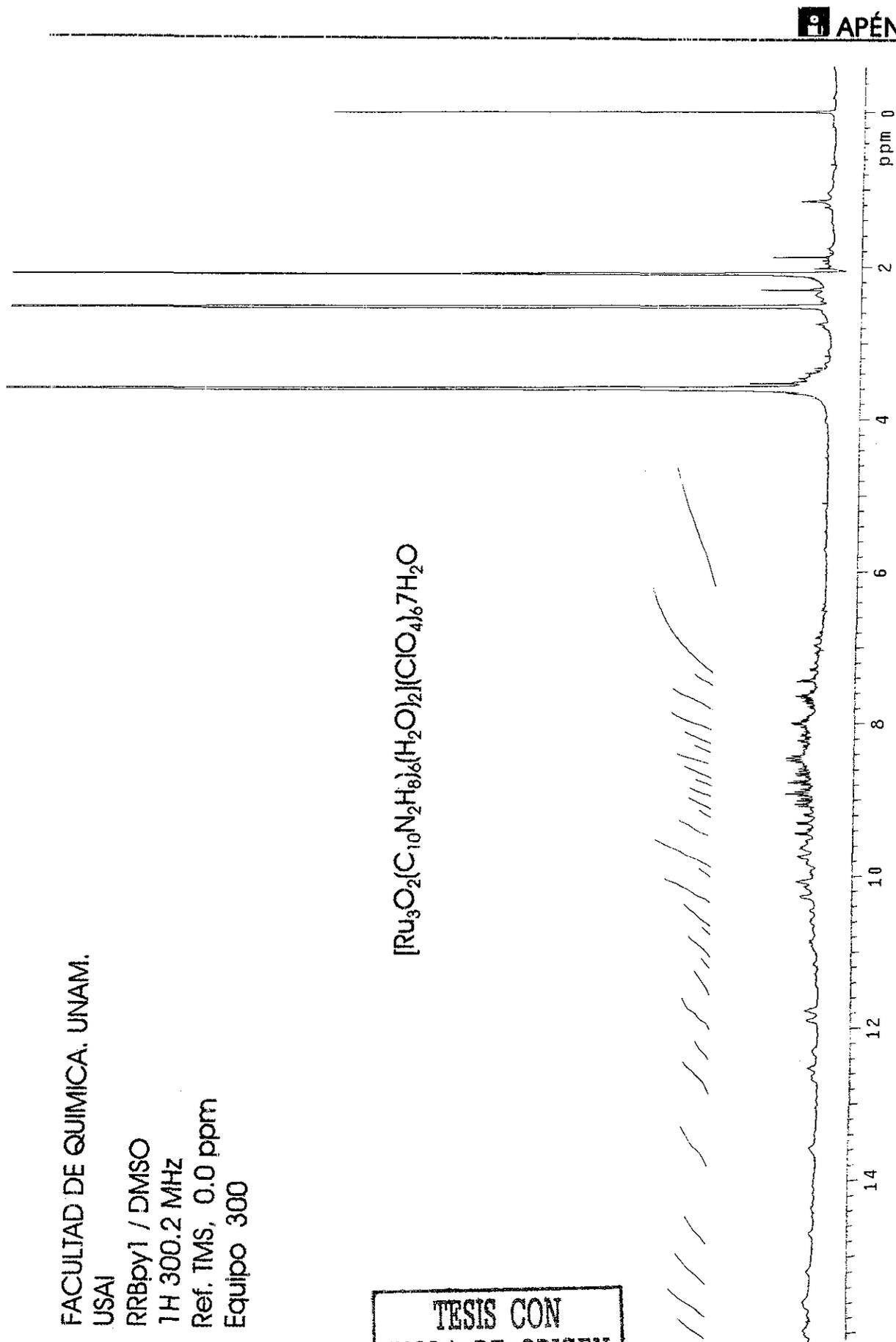
RRBpy1 / DMSO

1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



167 Figura 28. Espectro de RMN ¹H de RRBpy1 en DMSO-d₆. Intercambio con agua deuterada.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY
540 EAST 57TH STREET
CHICAGO, ILL. 60637

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

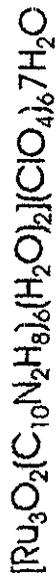
RRBpy1 / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

+D₂O



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

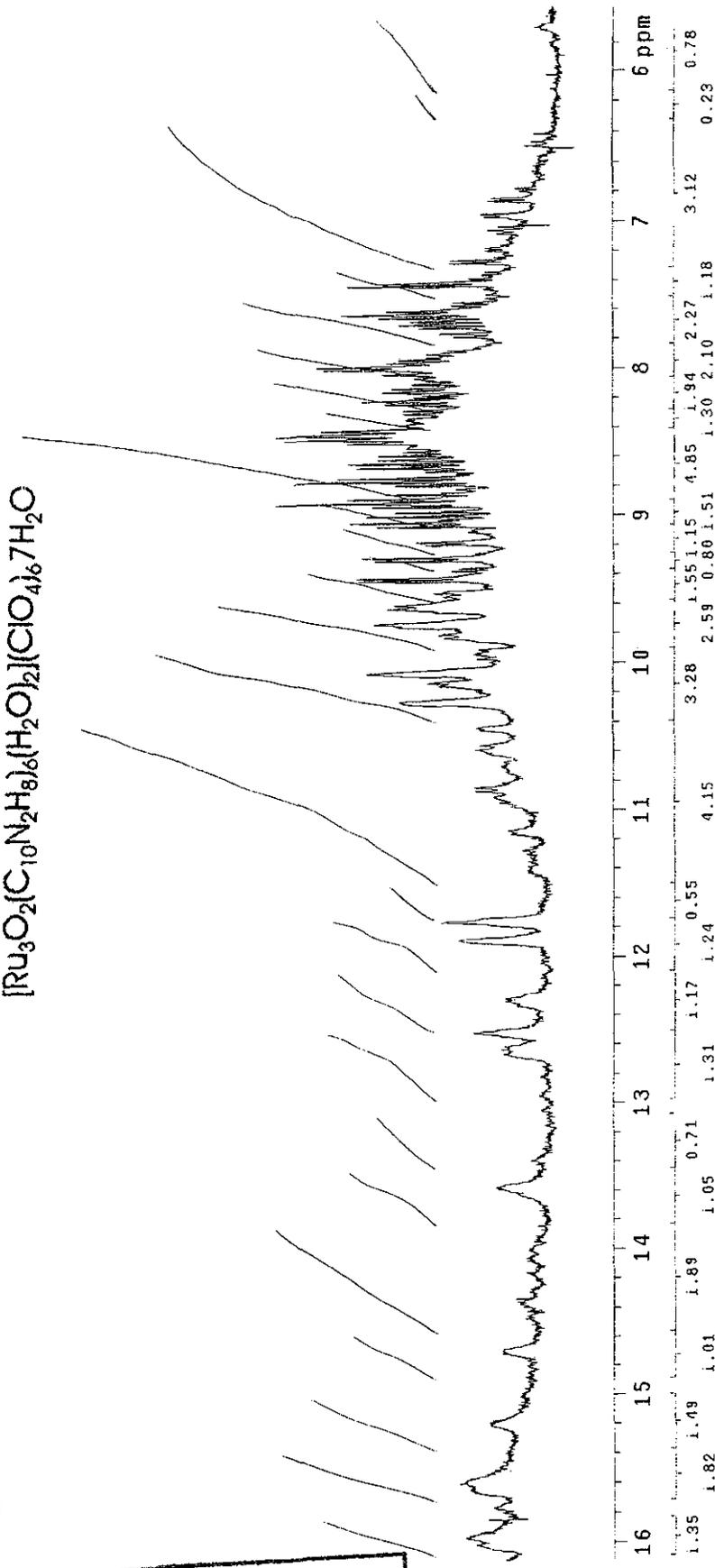


Figura 29. Espectro de RMN ¹H de RRBpy1 en DMSO-d₆. Intercambio con D₂O. Ampliación región aromática

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

USAI

RRBpy1 / DMSO

¹H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

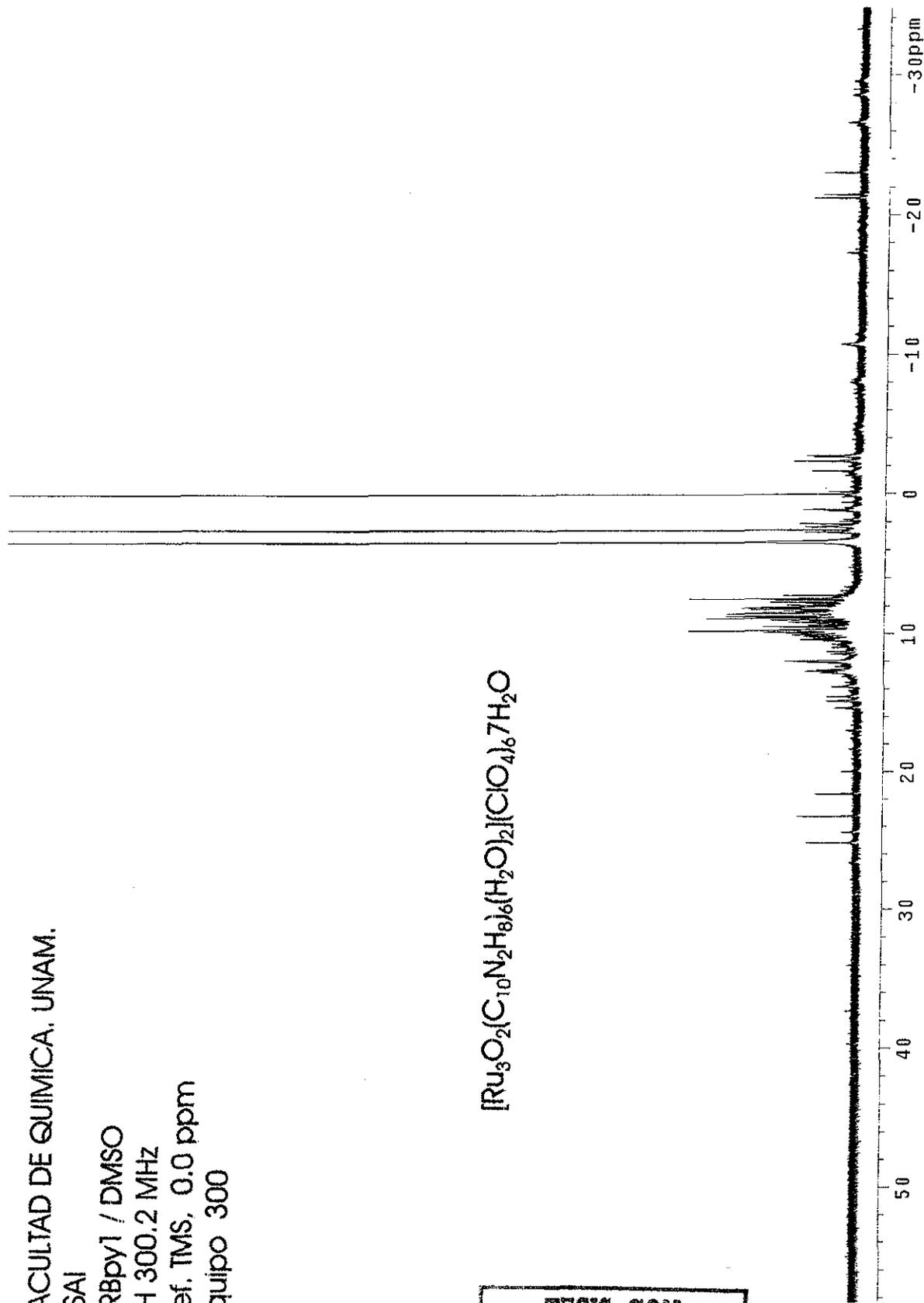
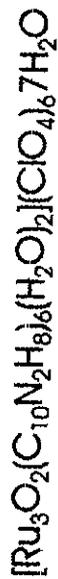


Figura 30. Espectro de RMN ¹H de RRBpy1 en DMSO-d₆. Solución después de dos días de preparada

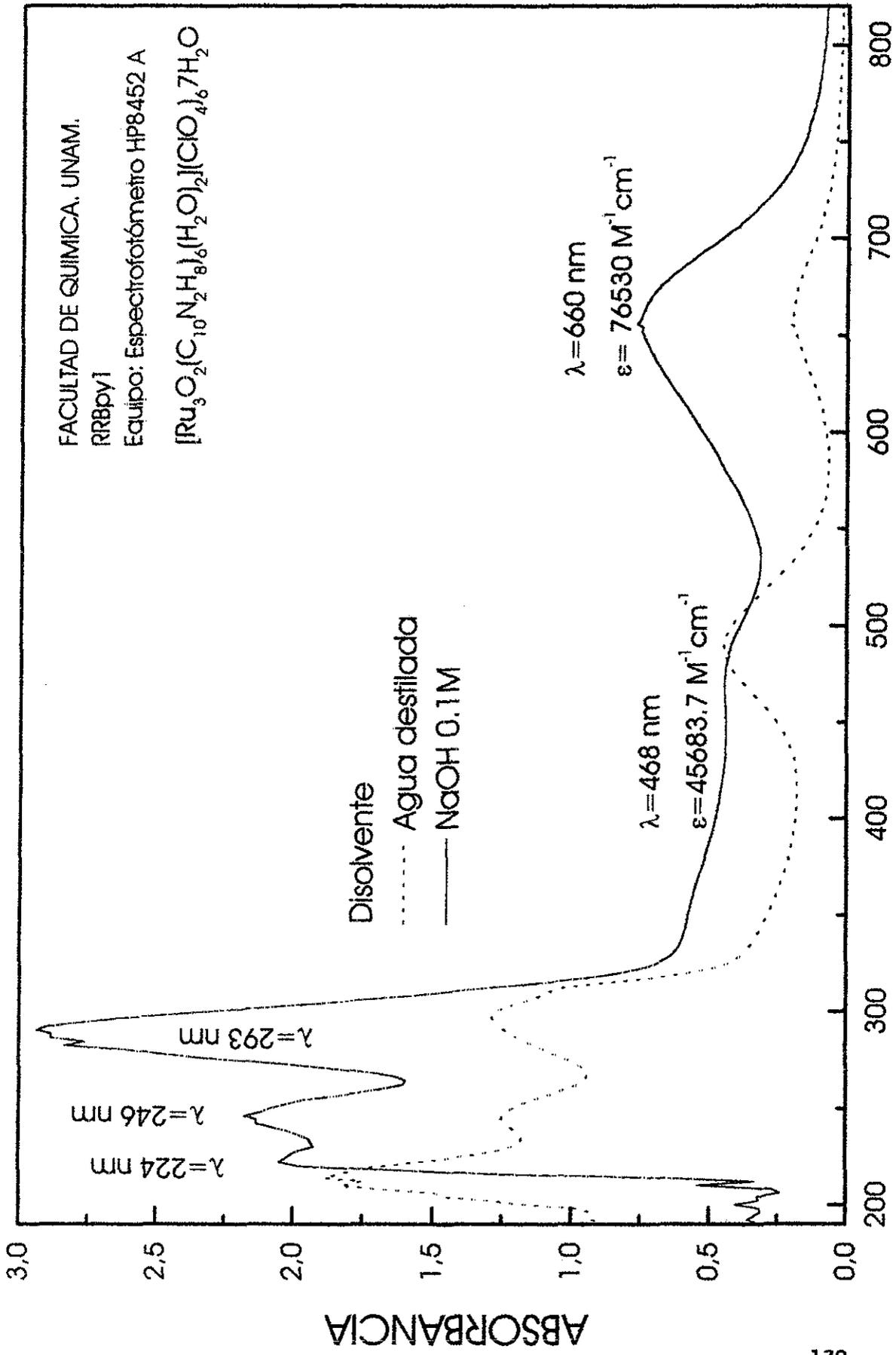


Figura 31. Espectro electrónico de RRBpy1 en agua y NaOH 0.1 M

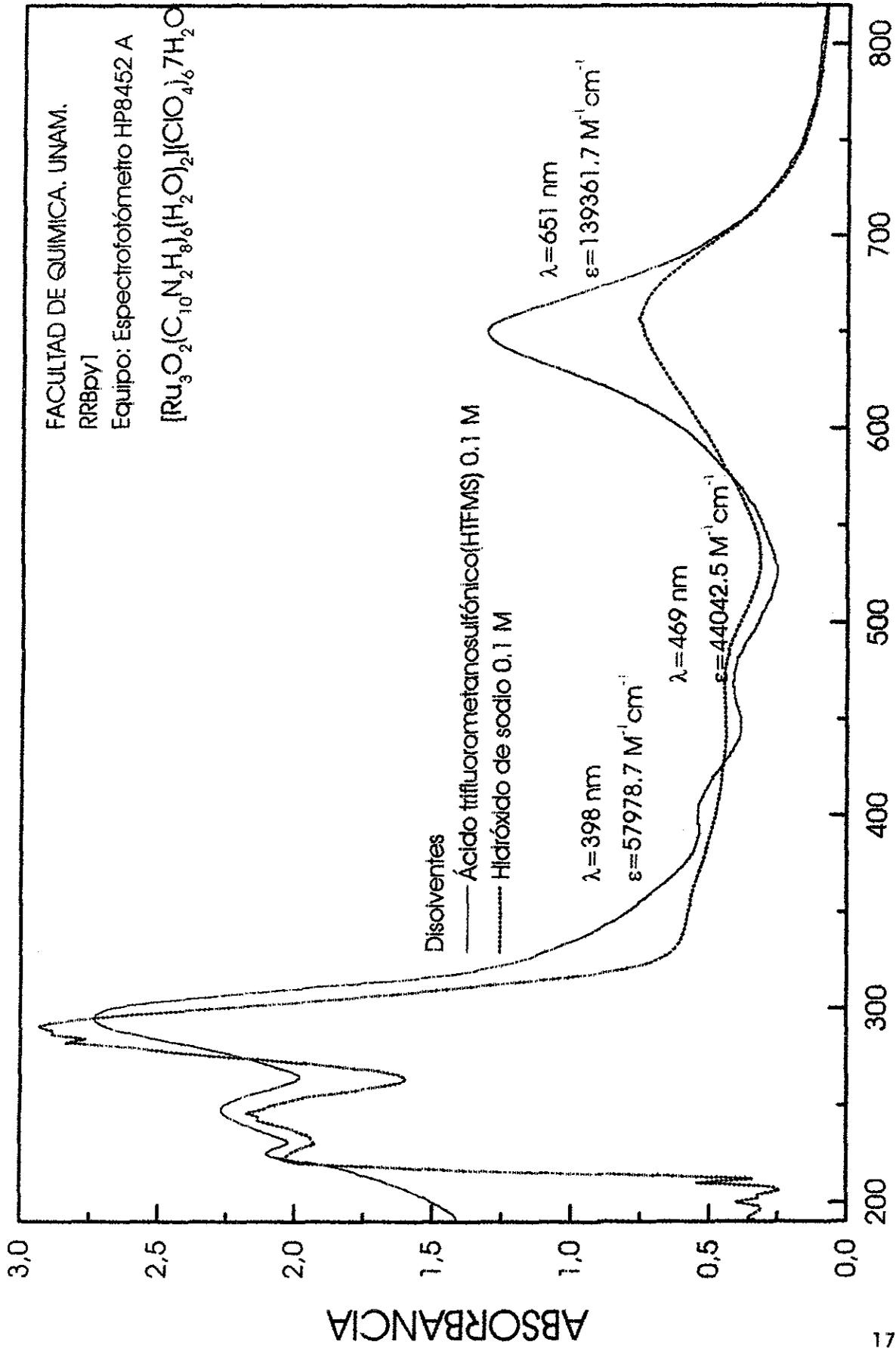


Figura 32. Espectro electrónico de RRBpy1 en HTFMS y NaOH 0.1 M

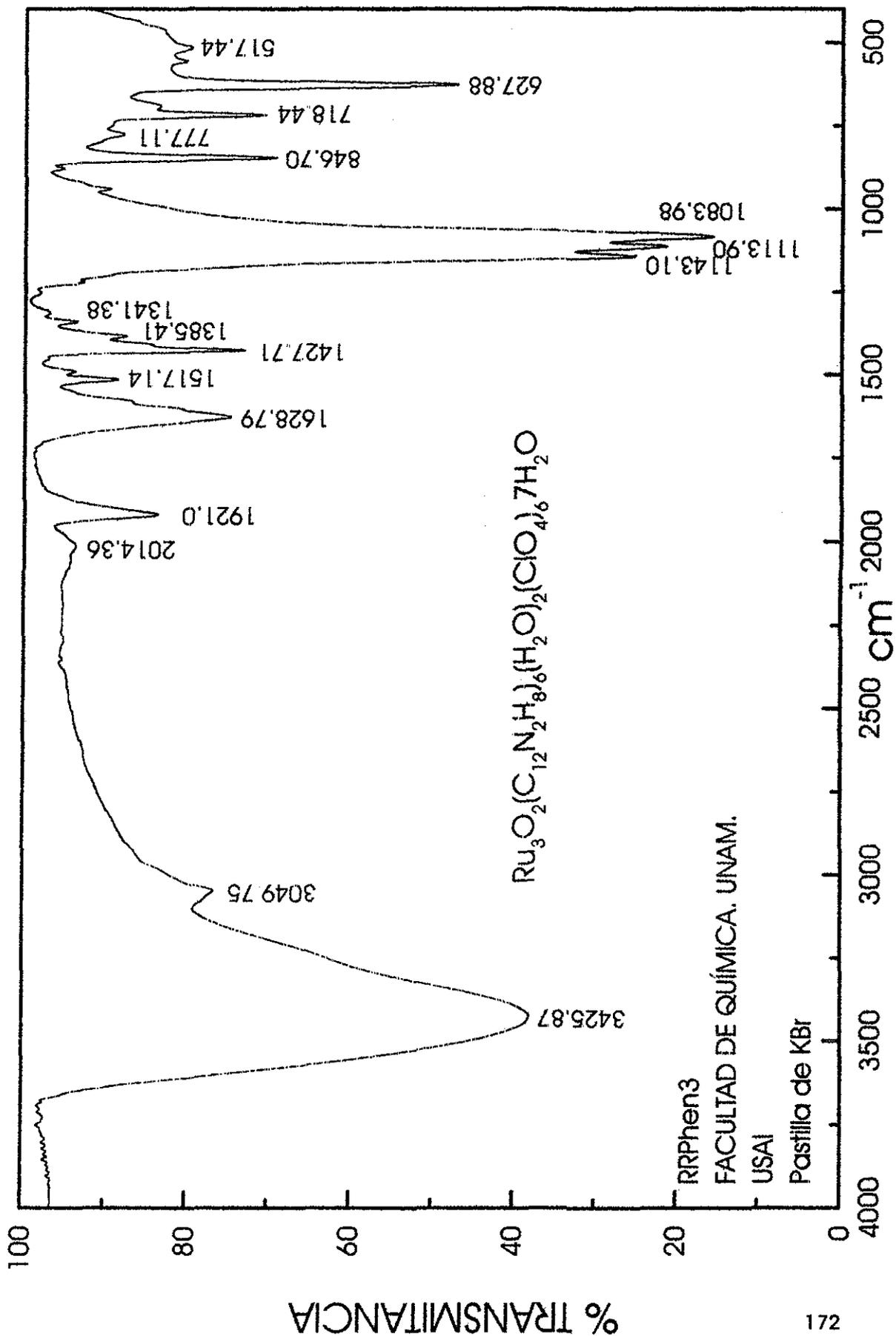


Figura 33. Espectro de infrarrojo medio de RRPhen3 en pastilla de KBr

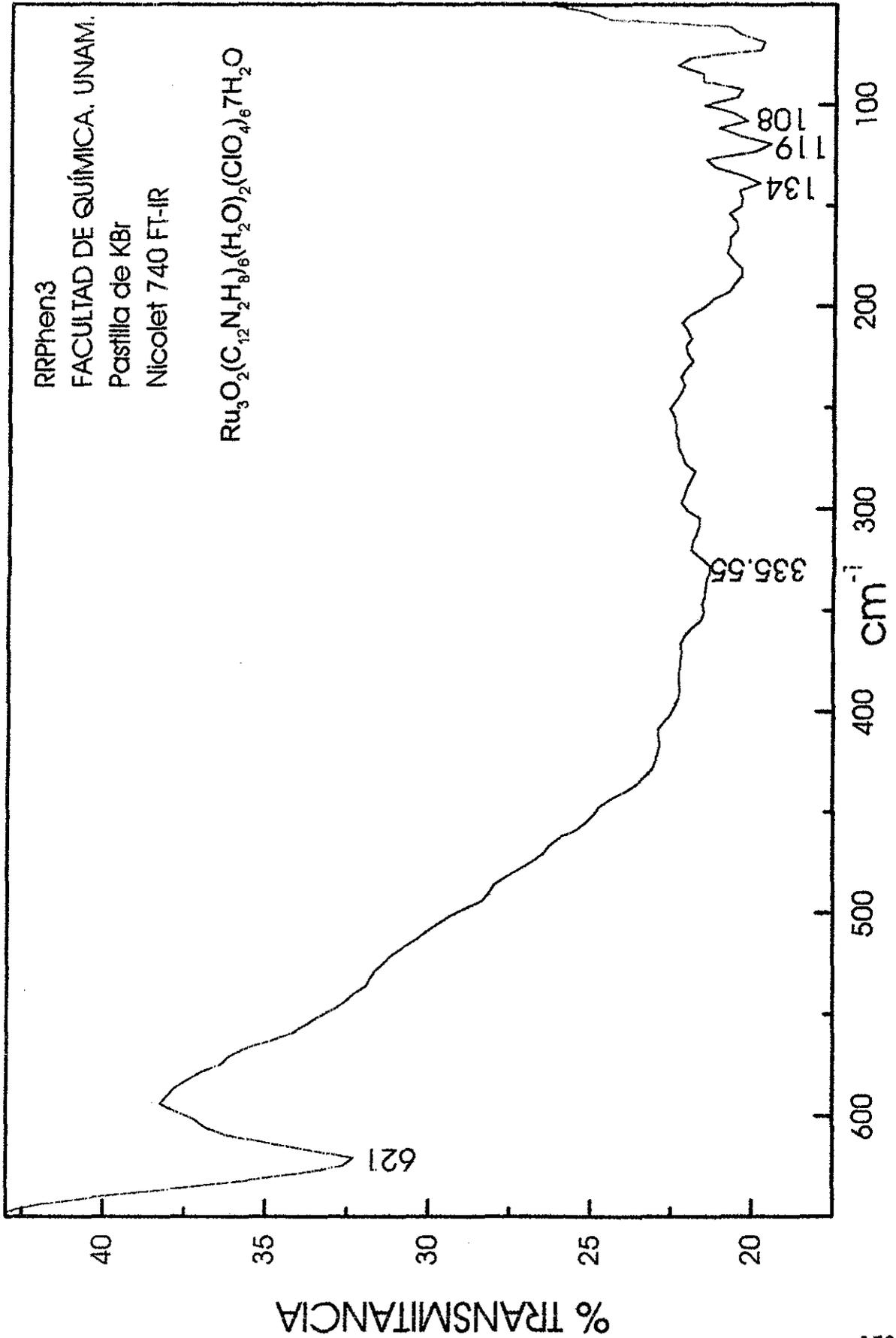


Figura 34. Espectro de infrarrojo lejano de RRPhen3 en pastilla de KBr

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

RRPhen3 / DMSO

^1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

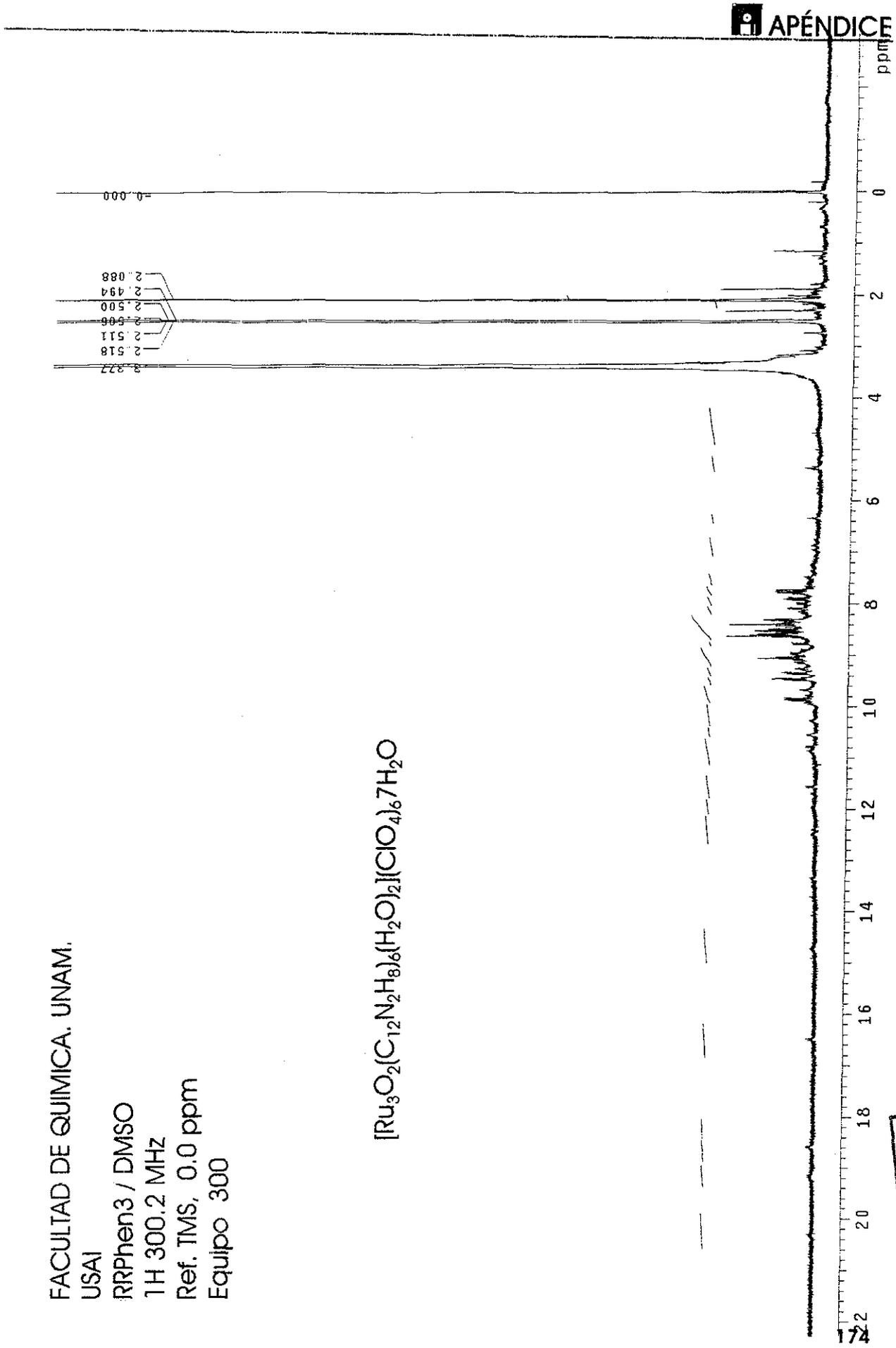
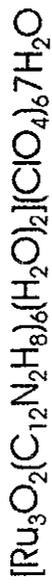


Figura 35. Espectro de RMN ^1H de RRPhen3 en DMSO- d_6 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

RRPhen3 / DMSO

1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

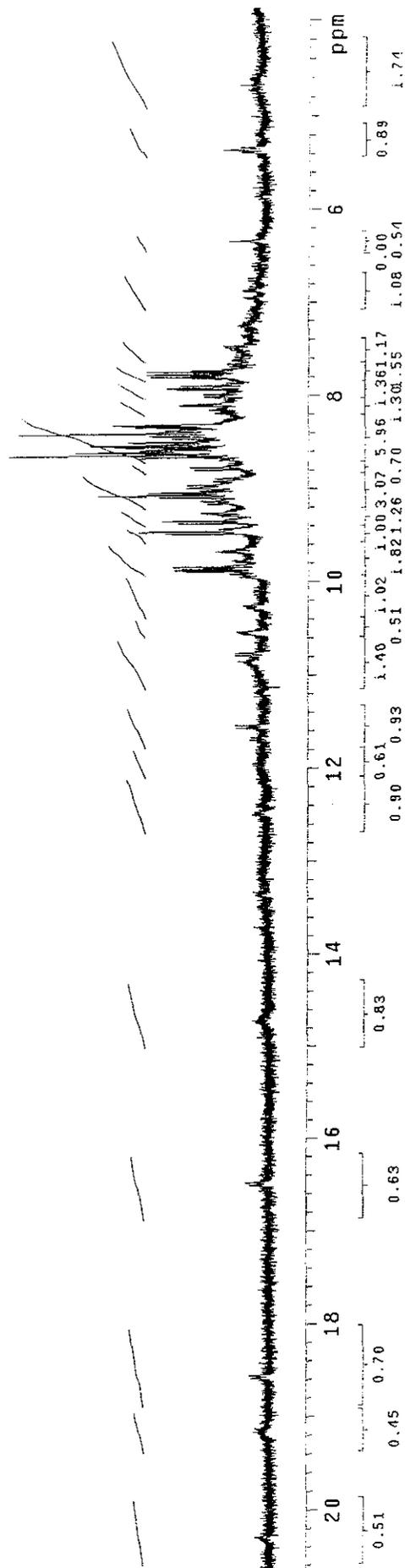
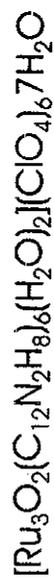


Figura 36. Espectro de RMN ^1H de RRPhen3 en DMSO- d_6 . Expansión campo bajo

TESIS CON
FALJA DE ORIGEN

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

USAI

RRPhen3 / DMSO

1H 300.2 MHz

Ref. TMS, 0.0 ppm

Equipo 300

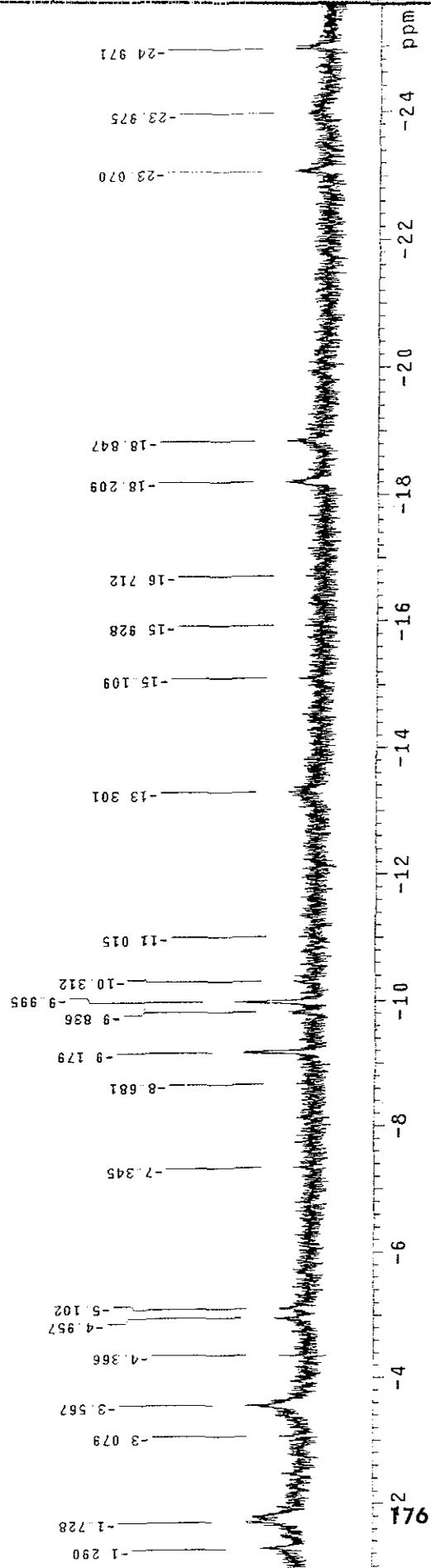
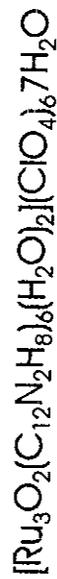


Figura 37. Espectro de RMN ^1H de RRPhen3 en DMSO- d_6 . Expansión campo alto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

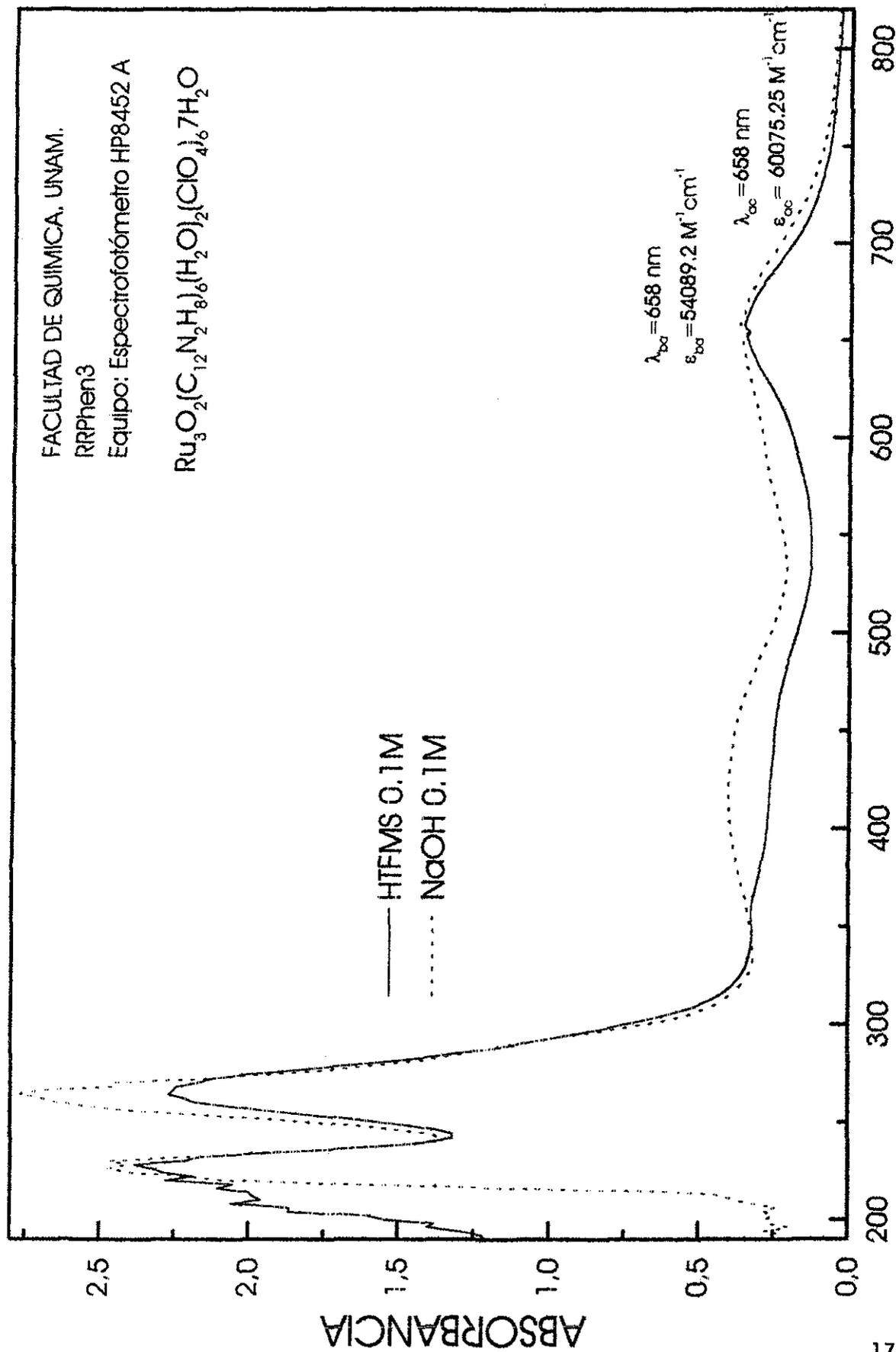


Figura 38. Espectro electrónico en disolución de RRPhen3 en HTFMS y NaOH 0.1 M

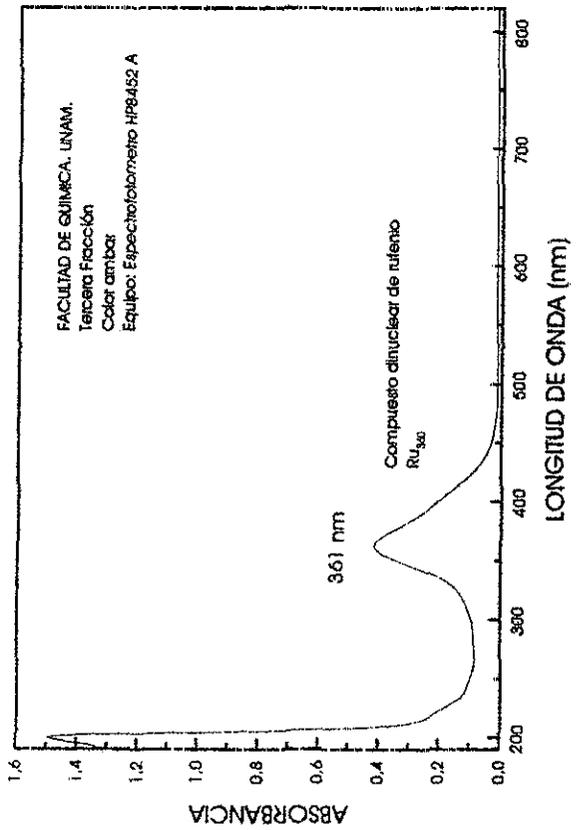
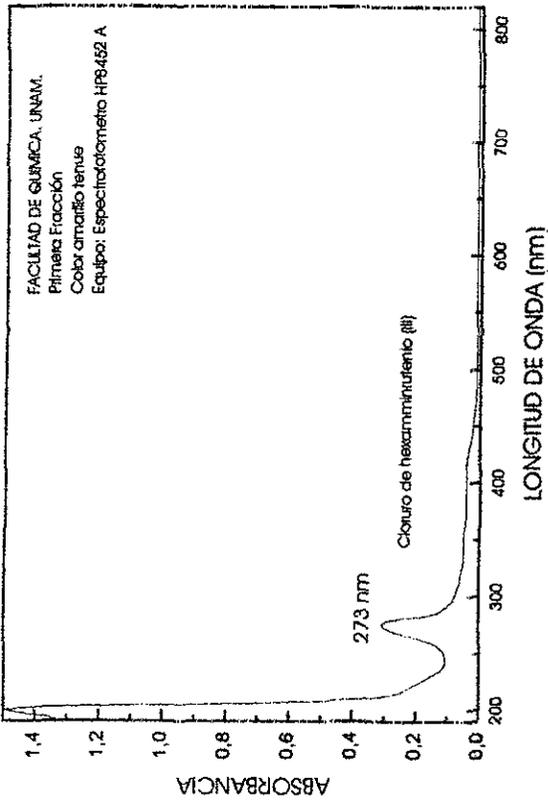
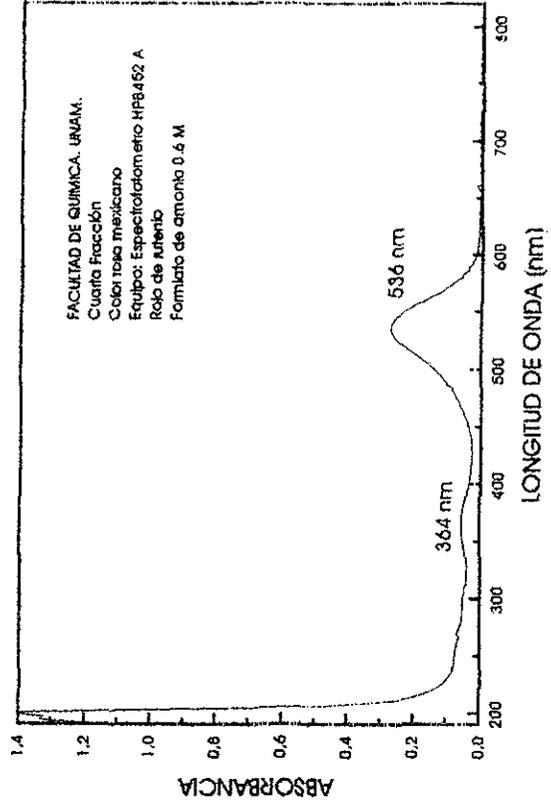
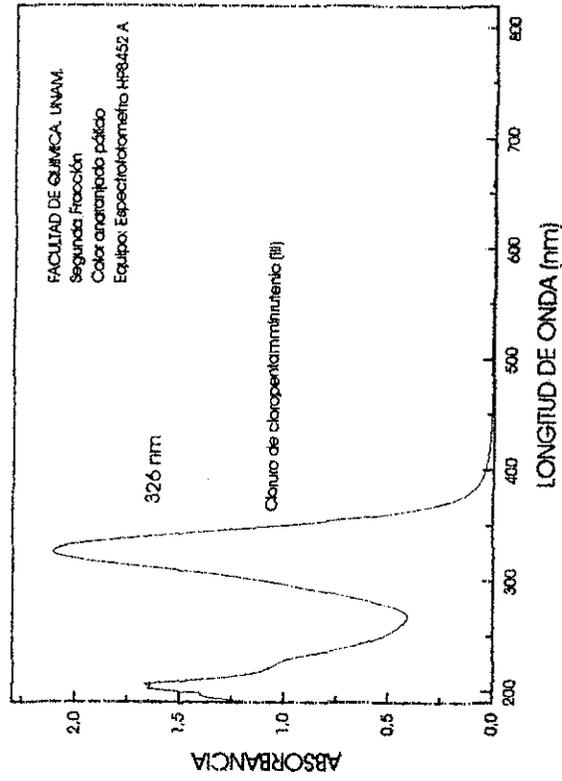


Figura 39. Seguimiento espectrofotométrico de la separación cromatográfica del RR

WEST BERT
WIND ST ACRYL

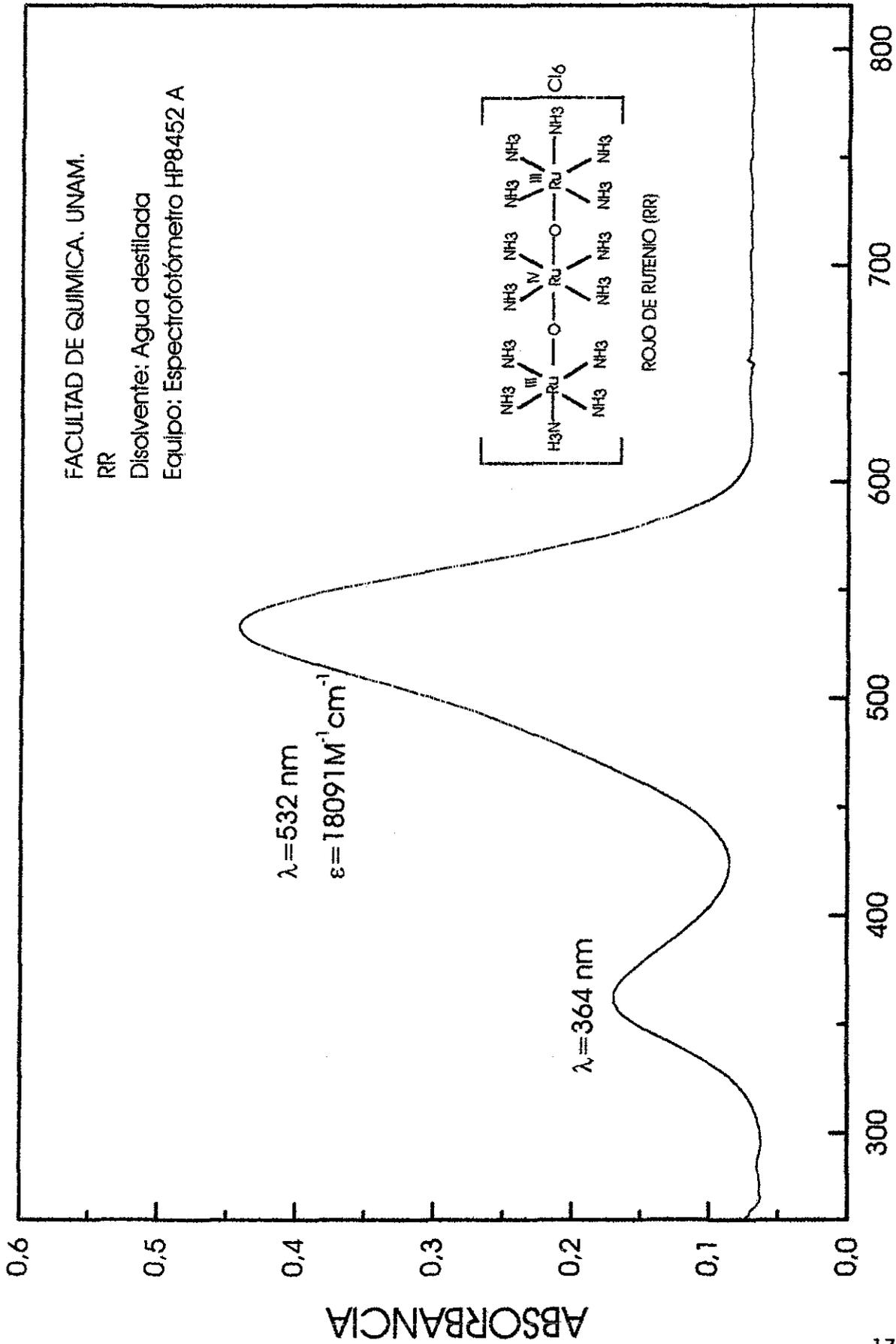


Figura 40. Espectro electrónico en disolución del RR

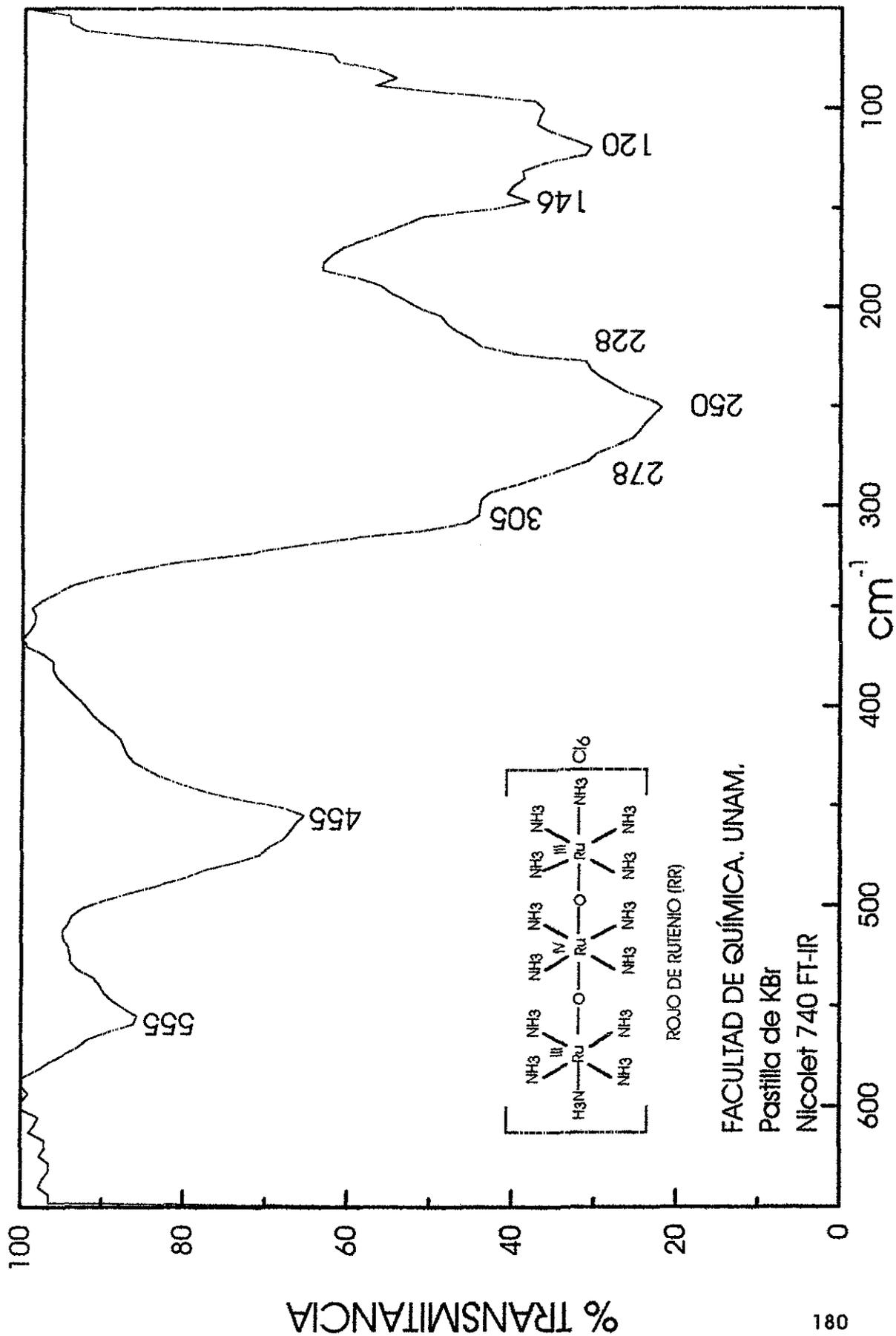


Figura 41. Espectro de infrarrojo lejano de RR en pastilla de KBr

TGA

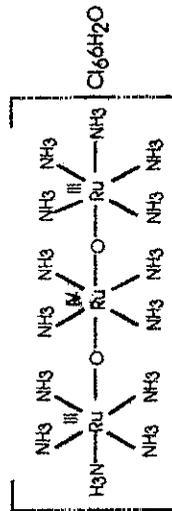
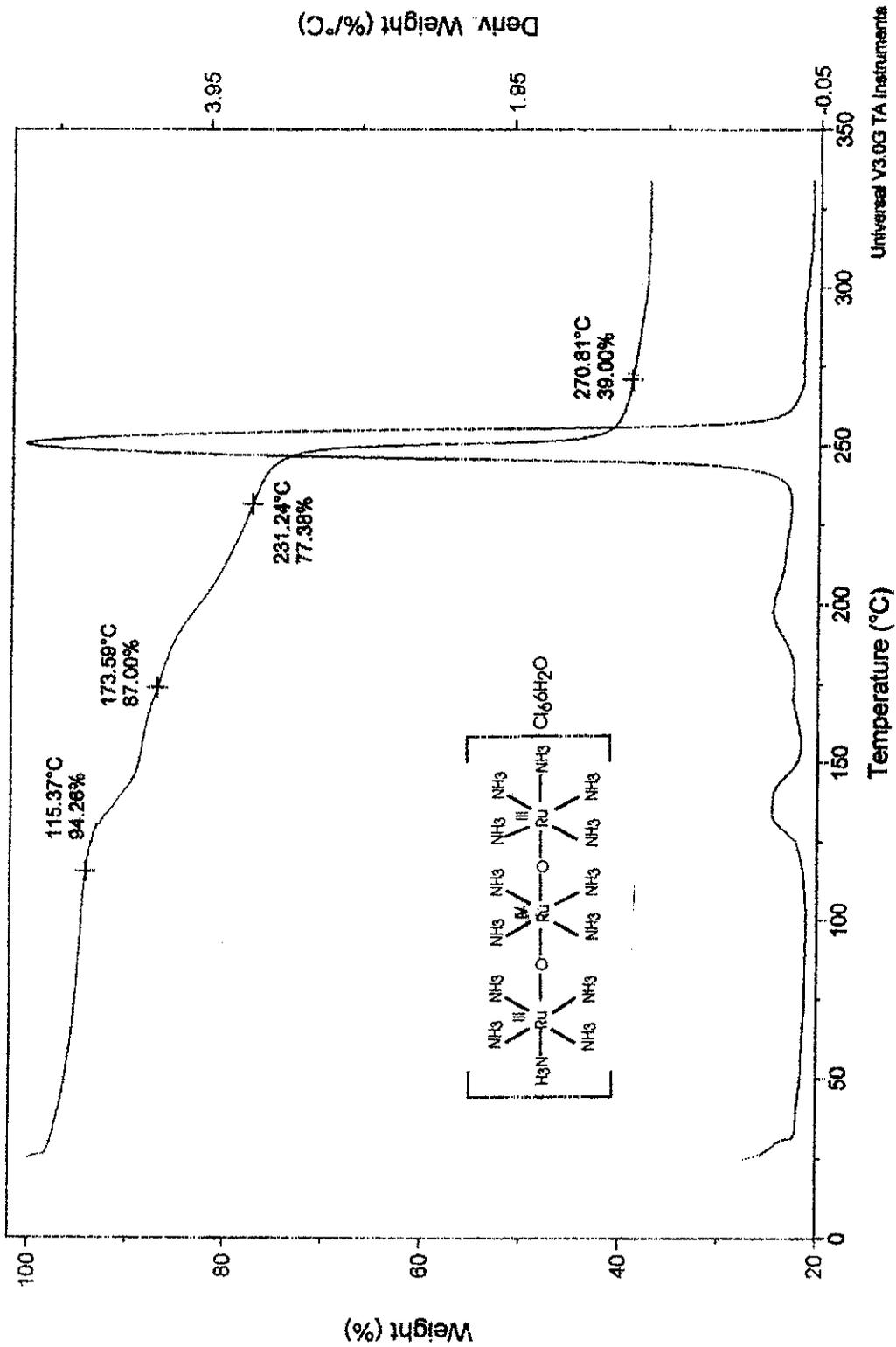


Figura 42. Análisis termogravimétrico del rojo de rutenio

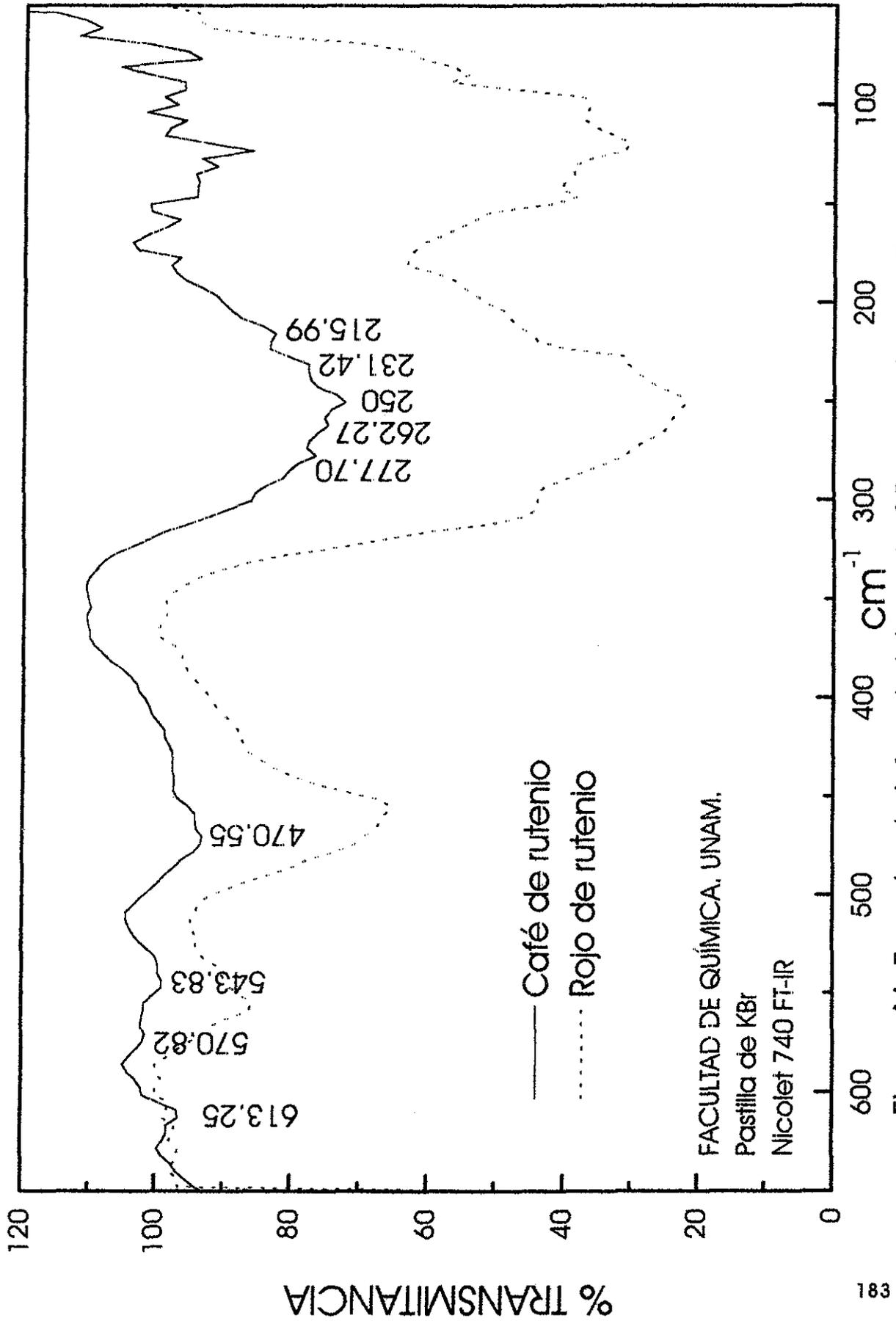


Figura 44. Espectro de infrarrojo lejano de CR en pastilla de KBr

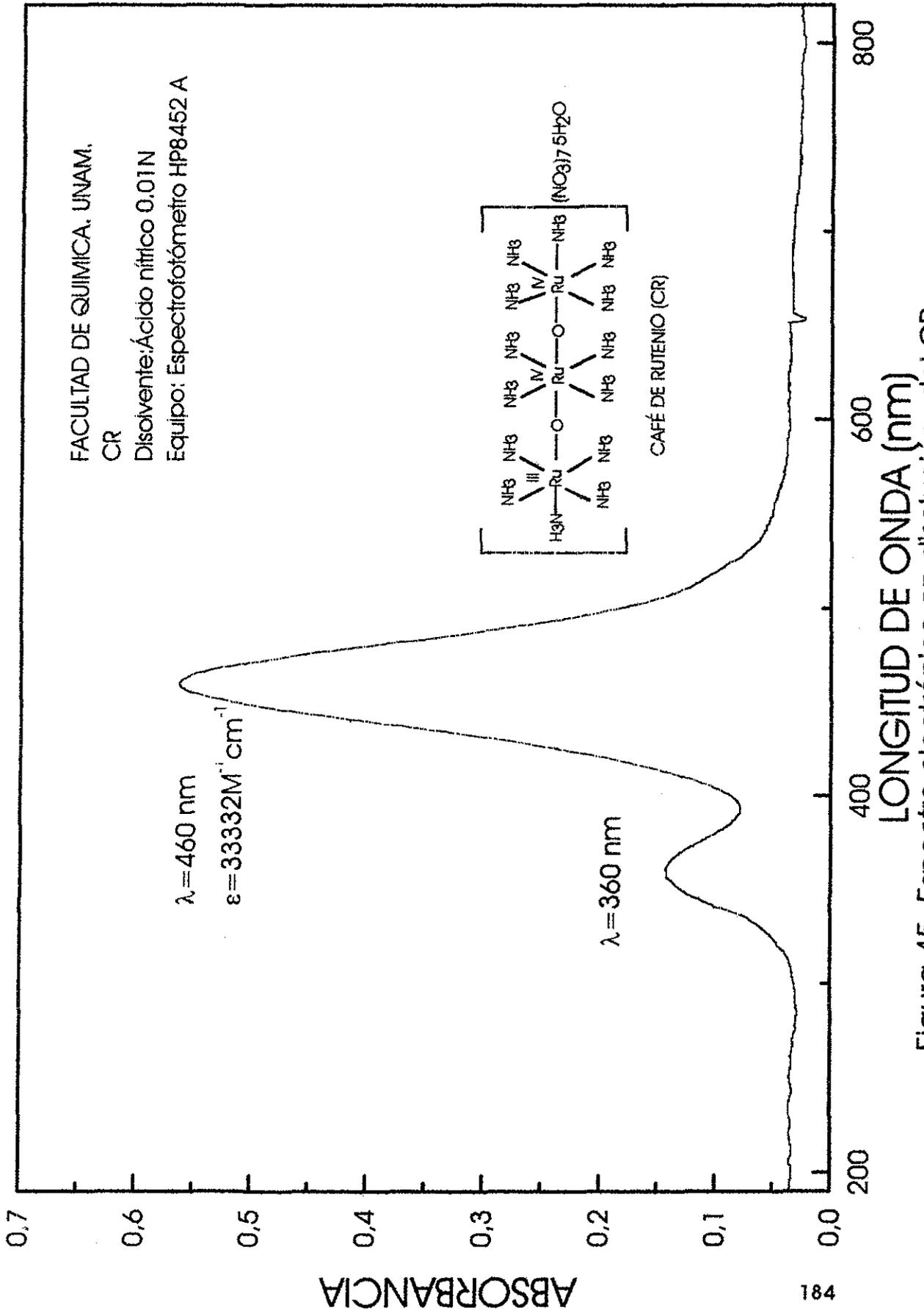


Figura 45. Espectro electrónico en disolución del CR

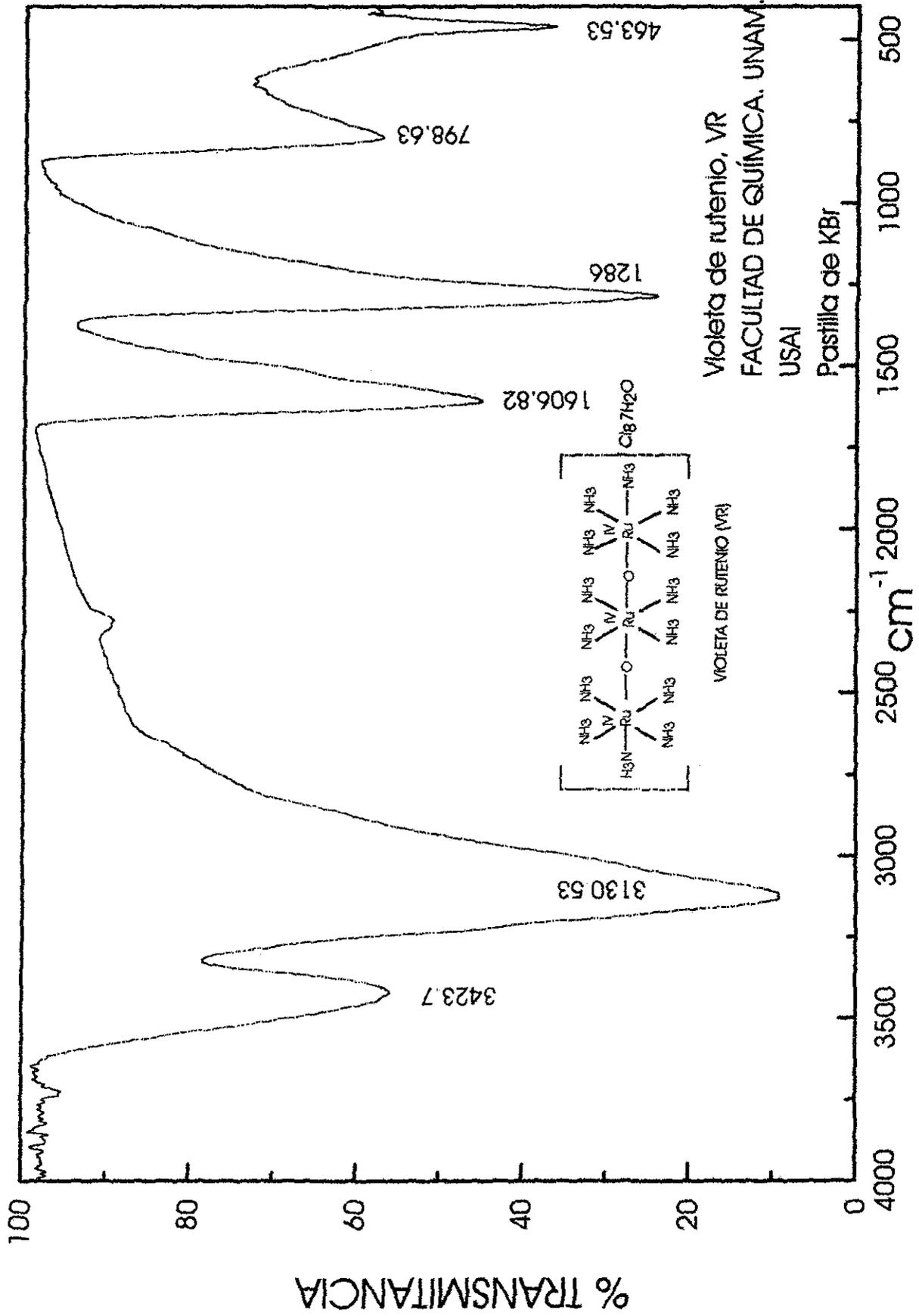


Figura 47. Espectro de infrarrojo medio de VR en pastilla de KBr

TGA

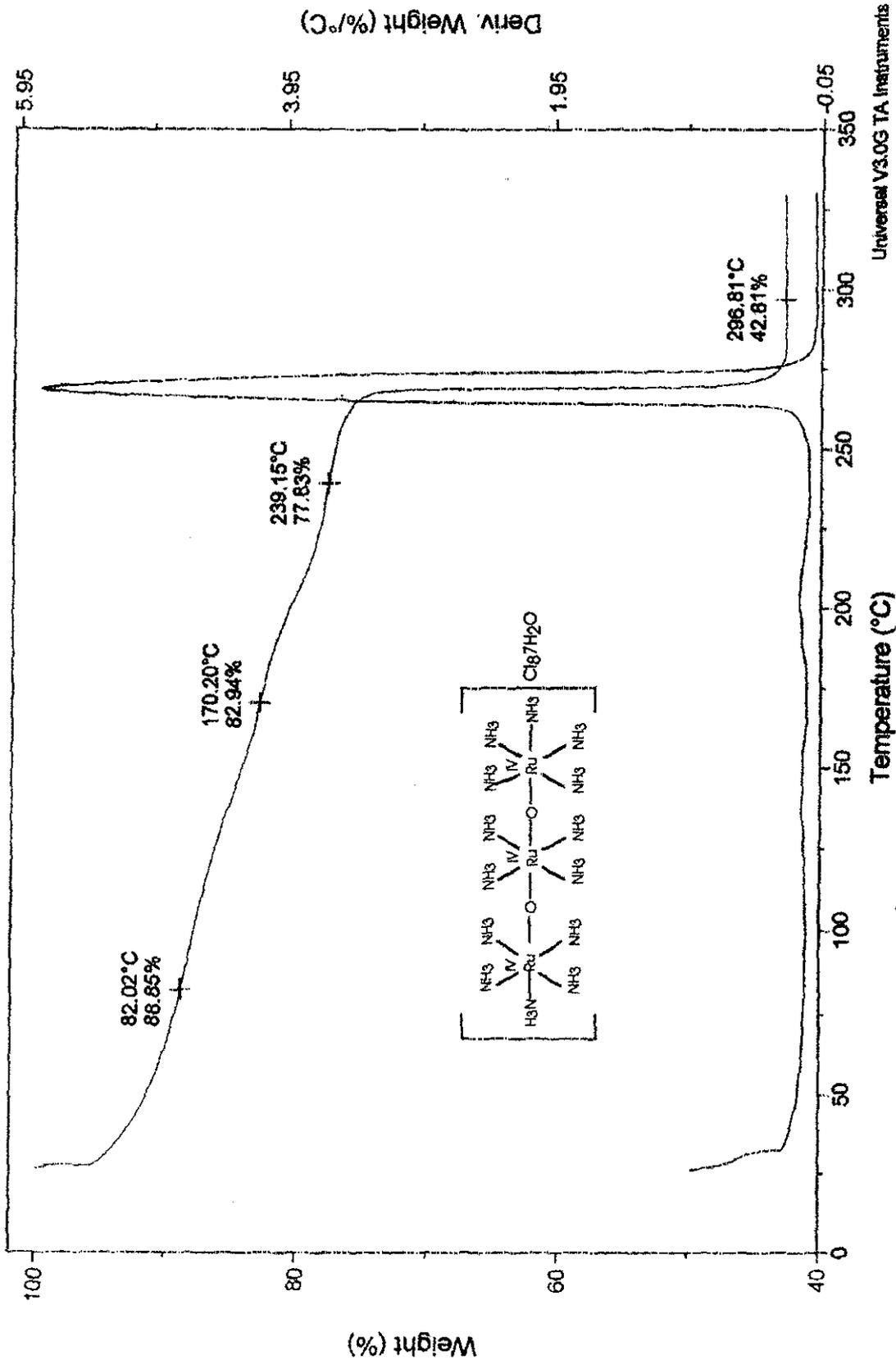


Figura 49. Análisis termogravimétrico del violeta de rutenio

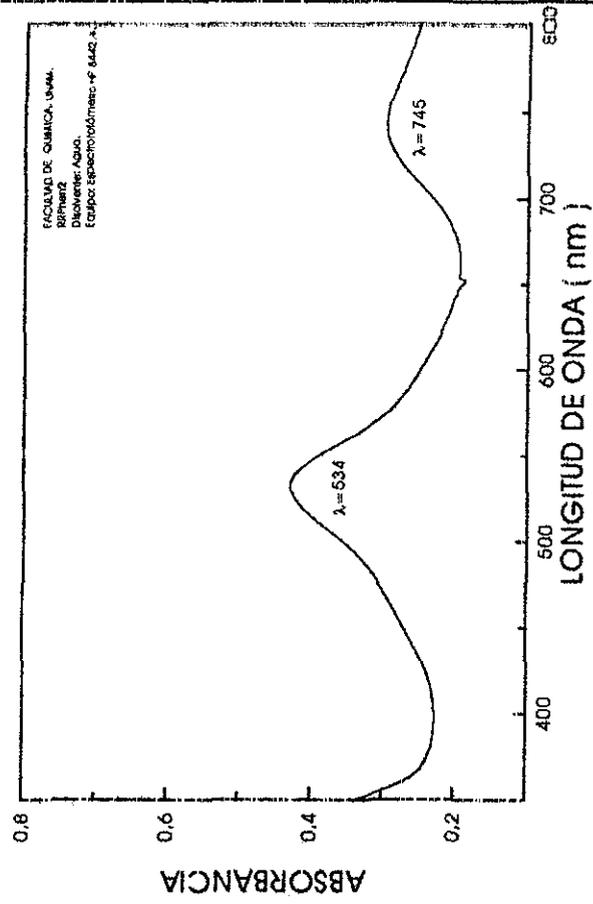
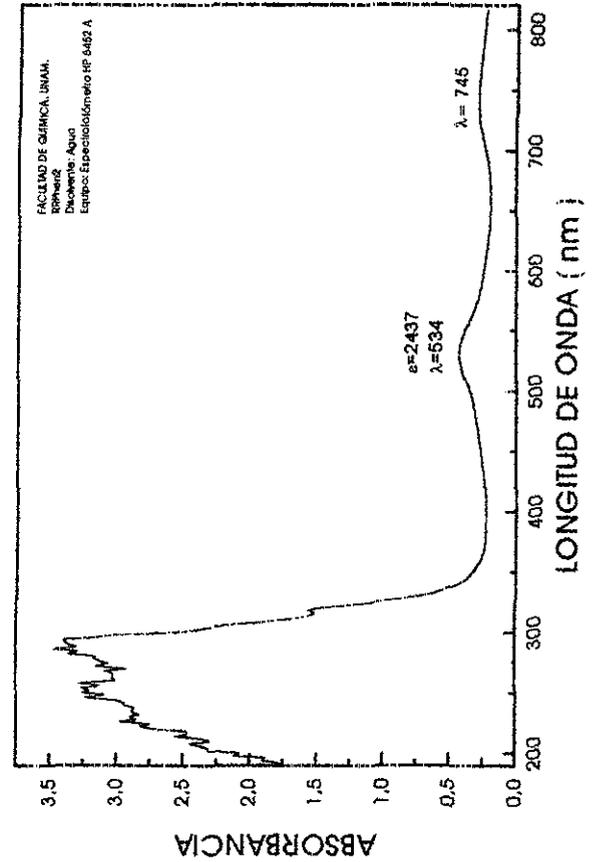
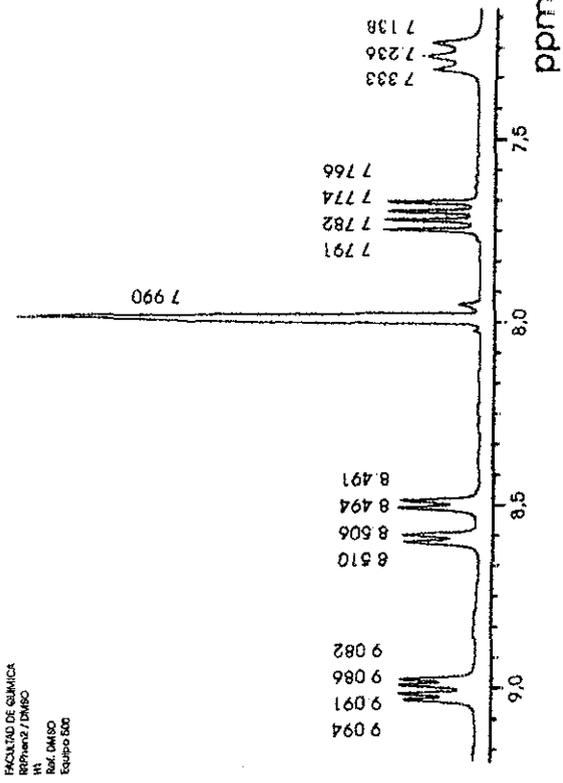
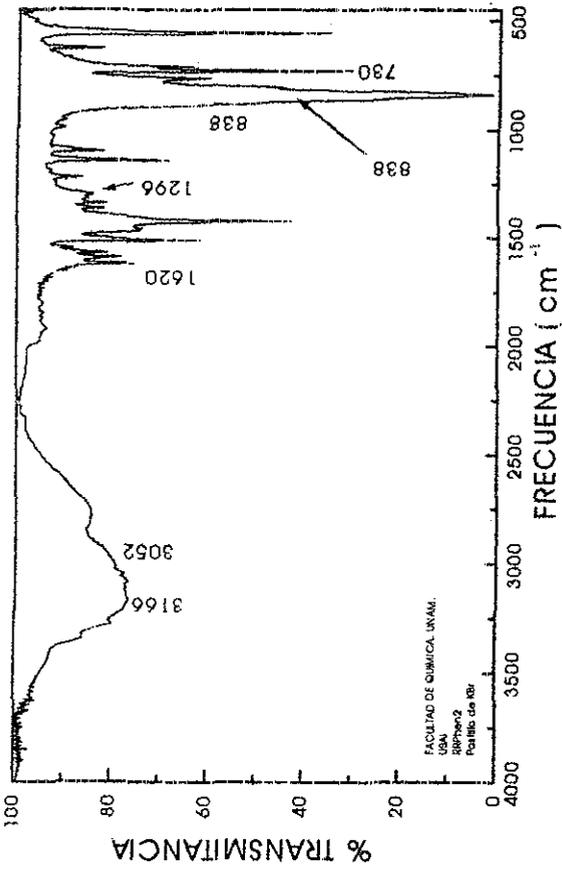


Figura 50. Diferentes evidencias en la caracterización de RRPhen2

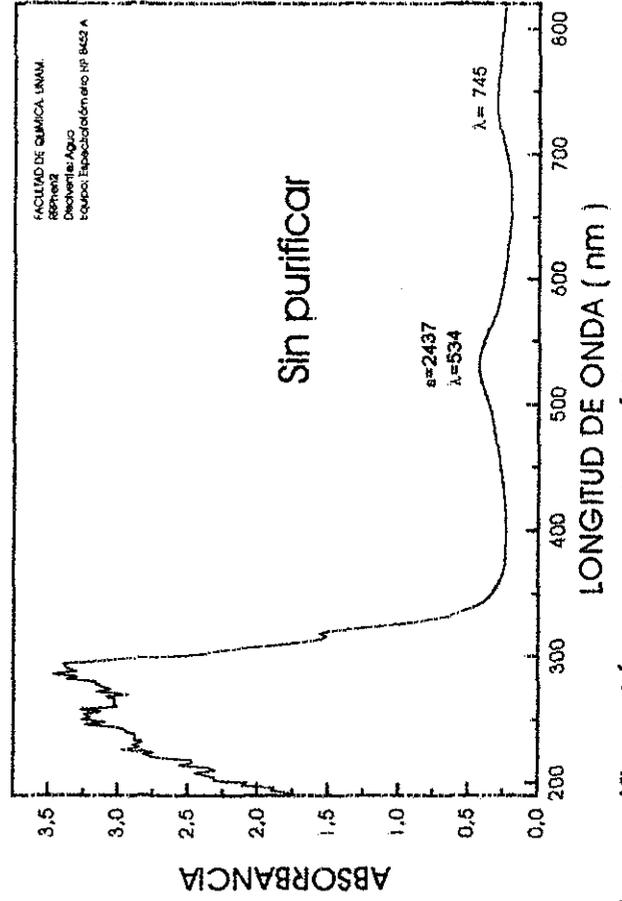
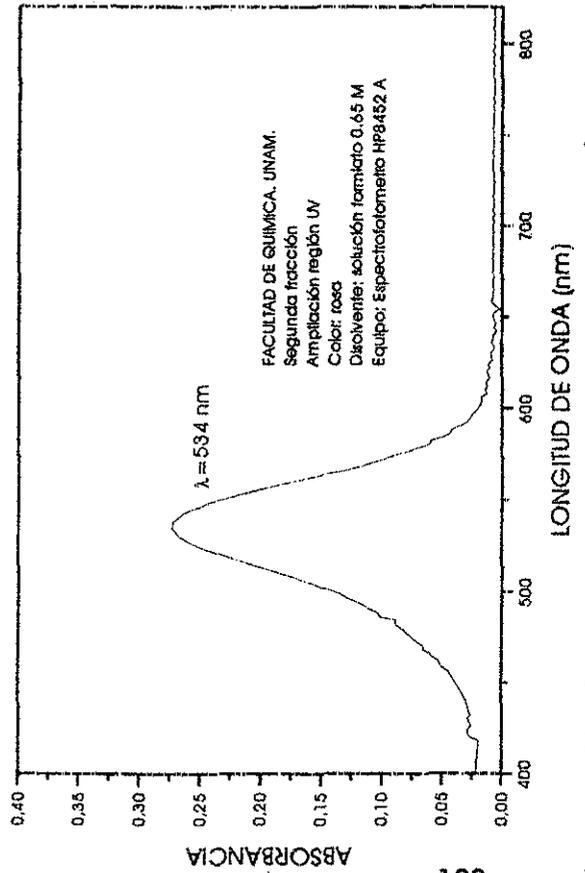
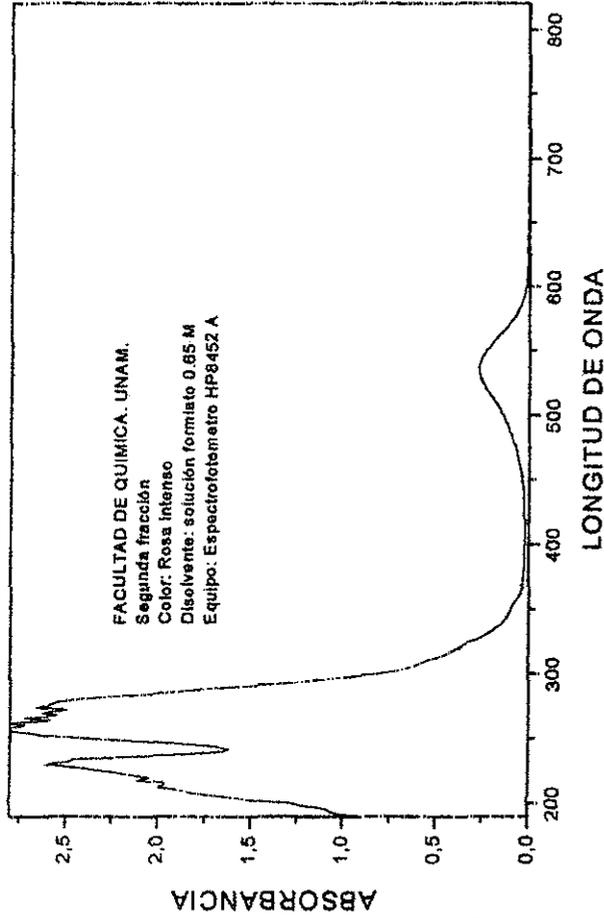
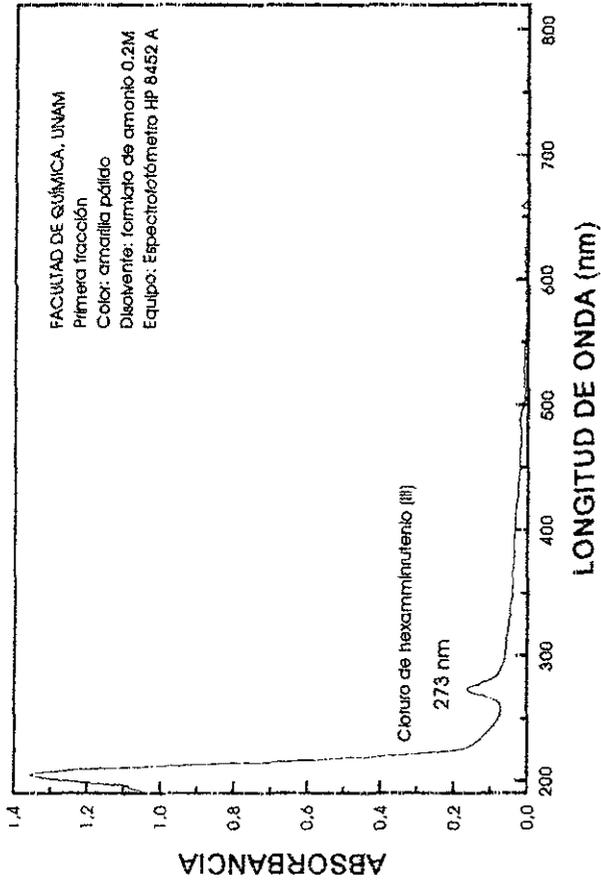


Figura 51. Seguimiento espectrofotométrico de la purificación cromatográfica de RRPhen2

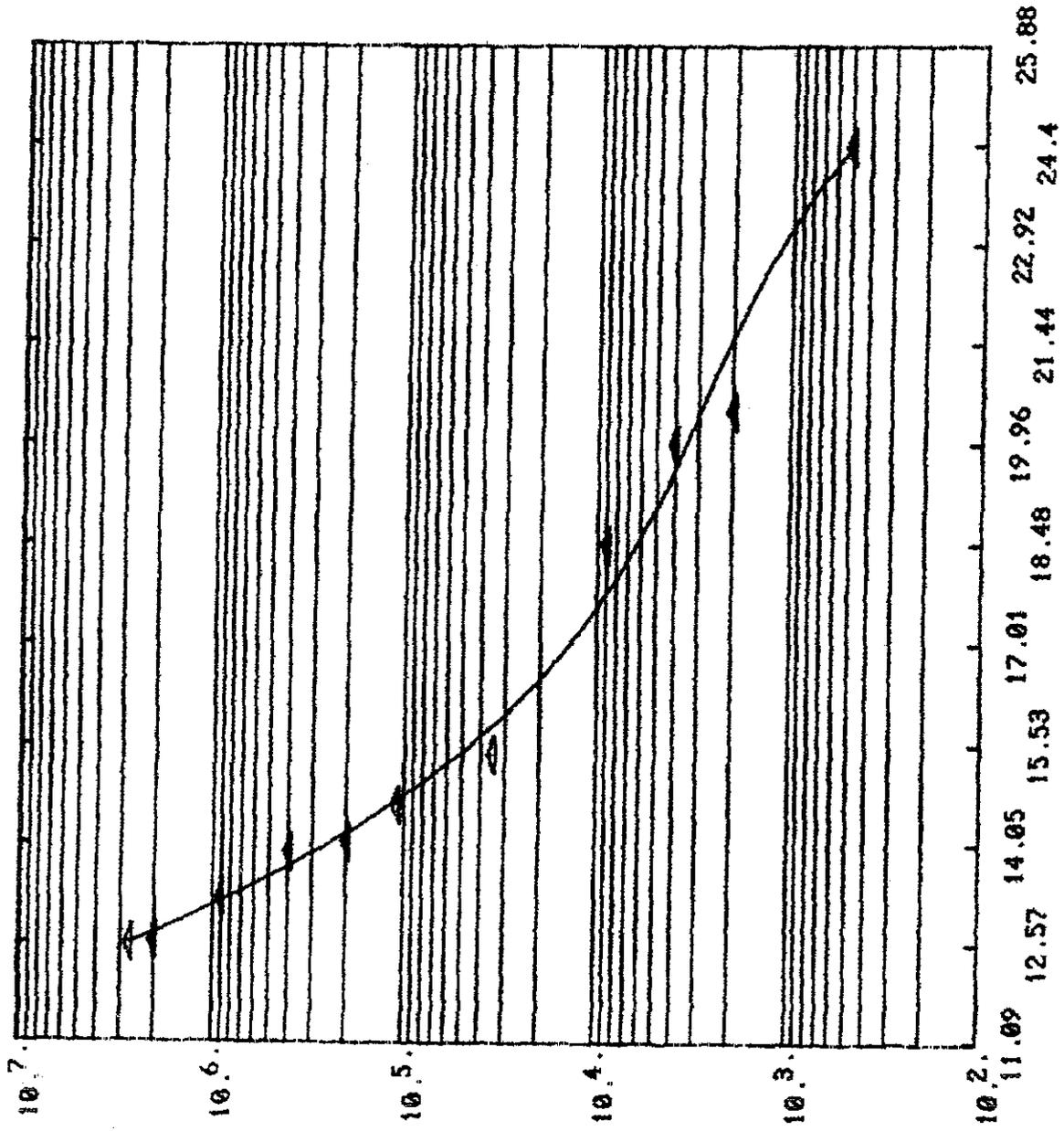


Figura 52. Curva de calibración elaborada para la determinación de pesos moleculares mediante cromatografía de permeación en gel

[TIC]
 Date : 20100808 09:17:00 Run : 17_08_08
 Name : 170808_091700_17_08_08
 Name : Unidad de Resoluci3n de Picos a la Inyecci3n (L2011) 7.0 (L2011)
 Inlet : Direct Ion Mode : FAP+
 Scan Range : m/z 8 to 2000 Output RI Range : d 0.01, 2.83 min

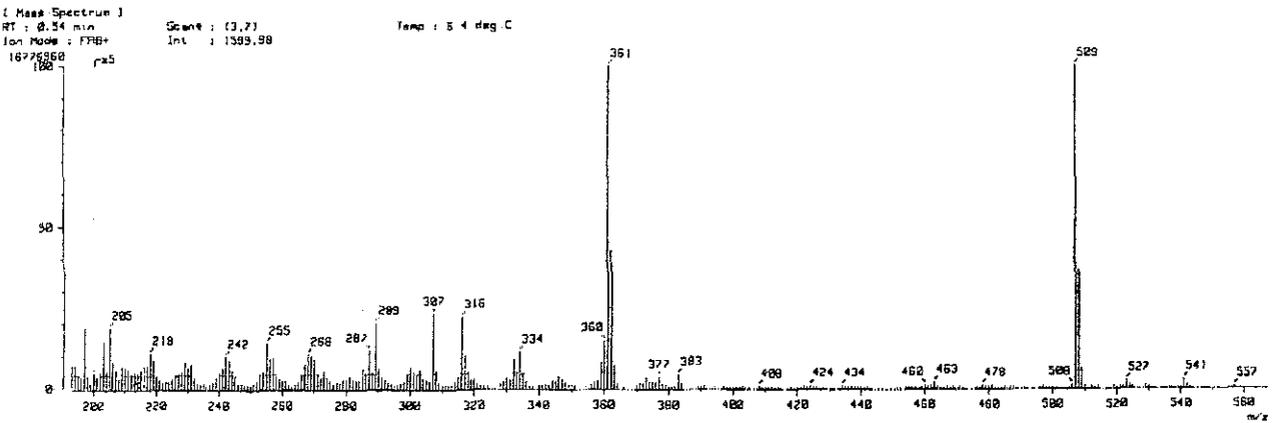
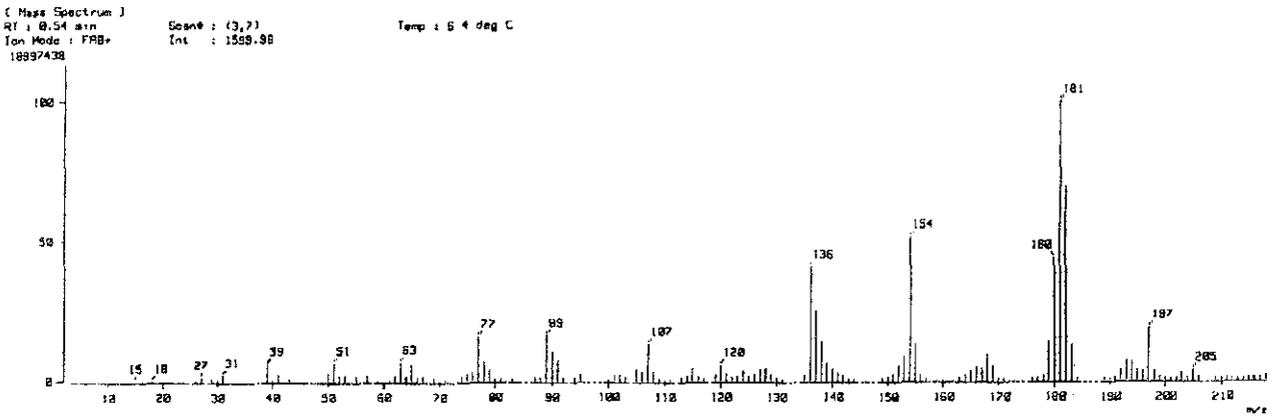
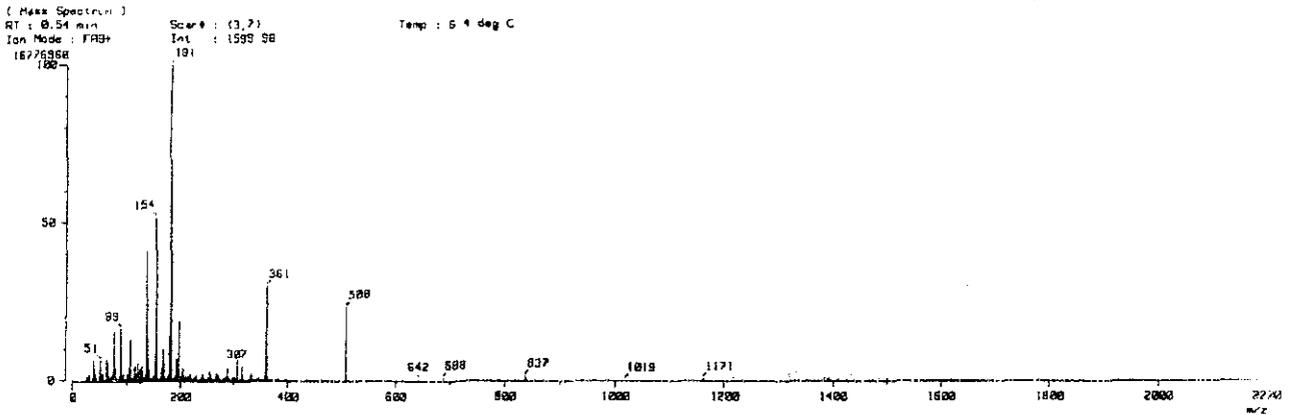
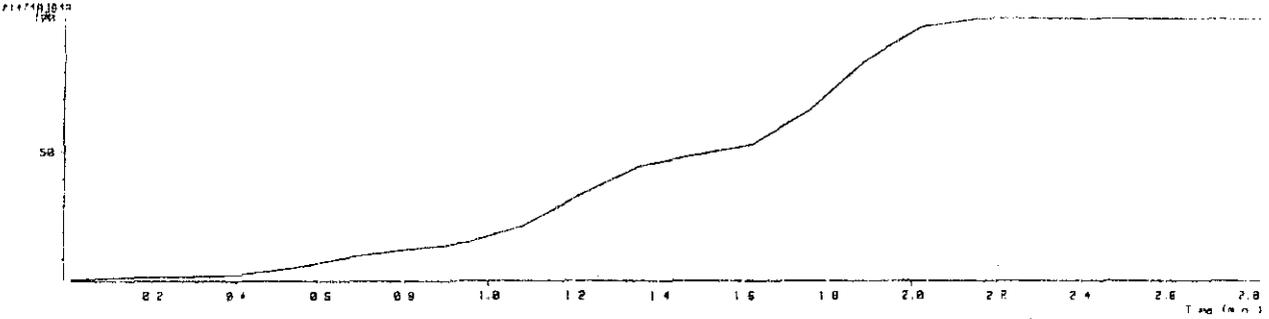


Figura 53. Espectro de masas, FAB⁺, de RRPhen2 en matriz de alcohol 3-nitrobencílico

192

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960

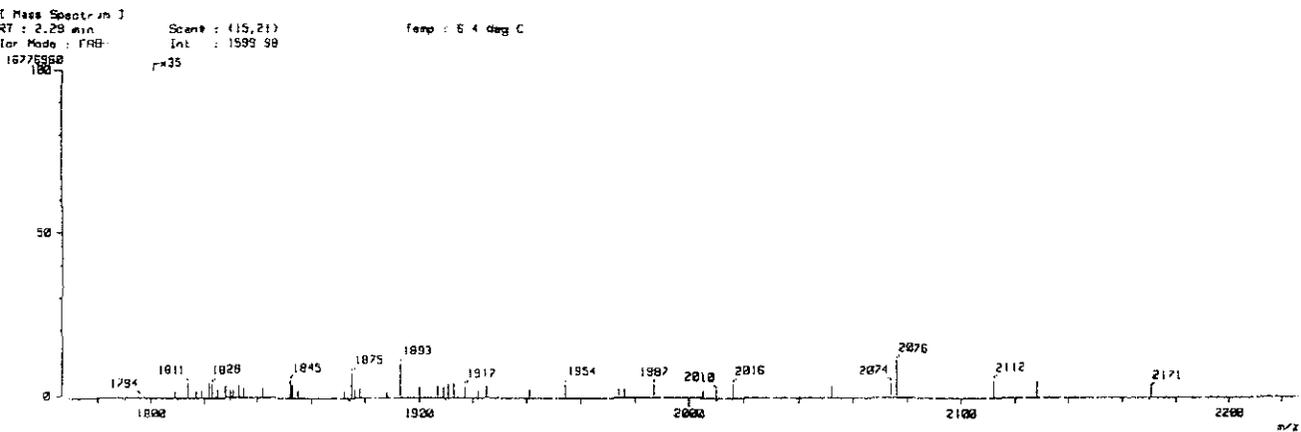
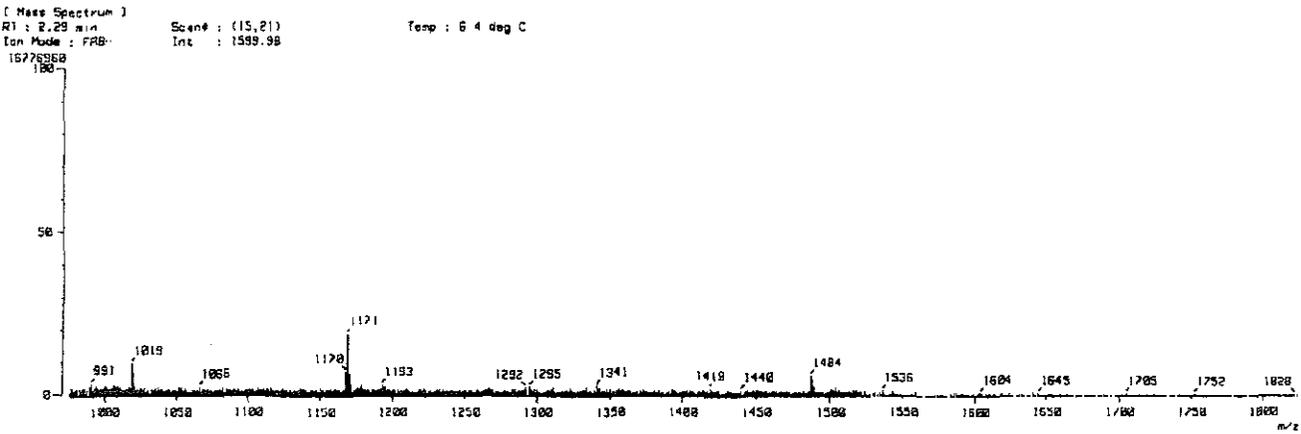
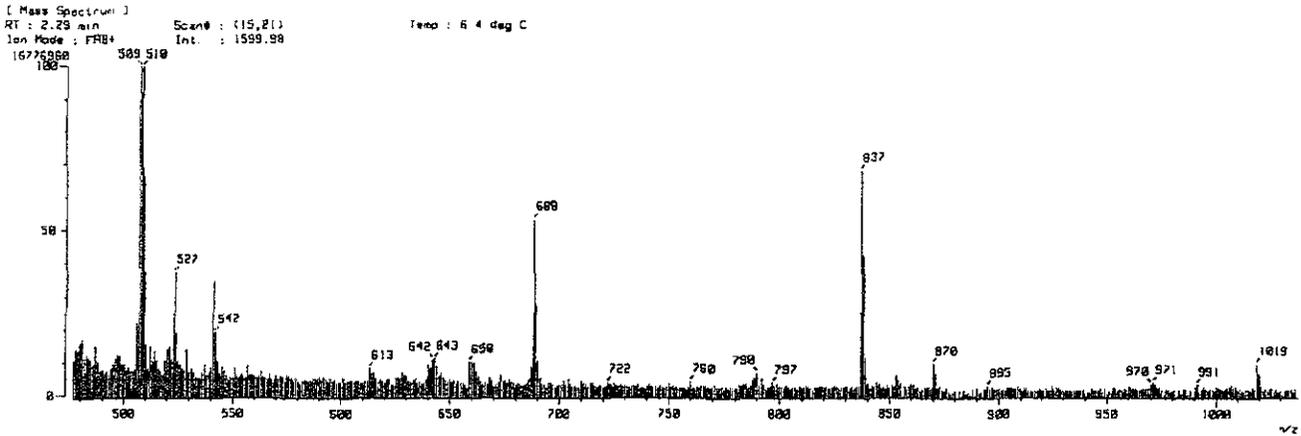


Figura 54. Espectro de masas, FAB⁺, de RRPhen2 en matriz de alcohol 3-nitrobencílico, continuación.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

RECEIVED
MAY 12 1964
U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
WASHINGTON, D.C.

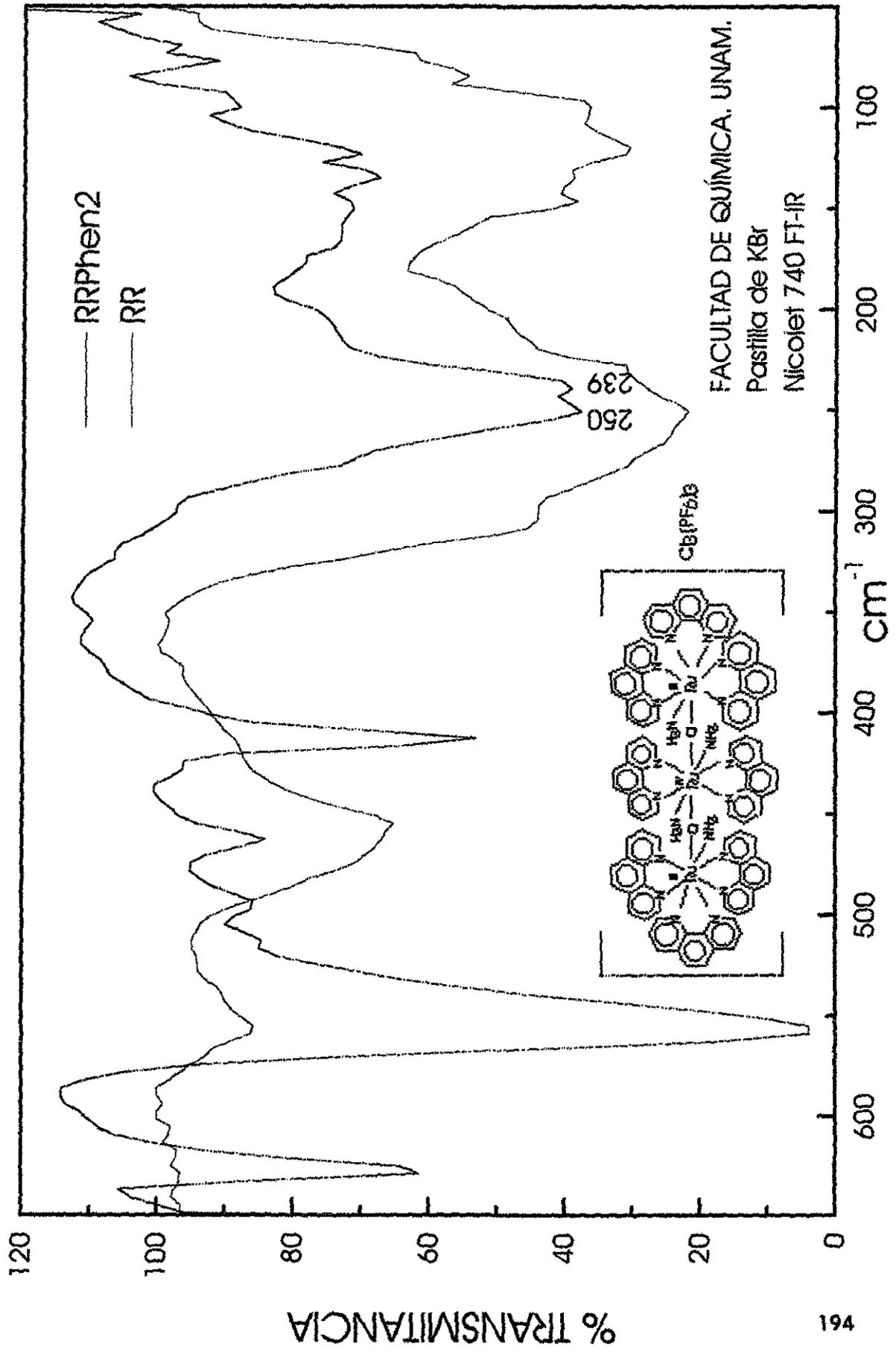


Figura 55. Espectro de infrarrojo lejano de RRPhen2 en pastilla de KBr

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

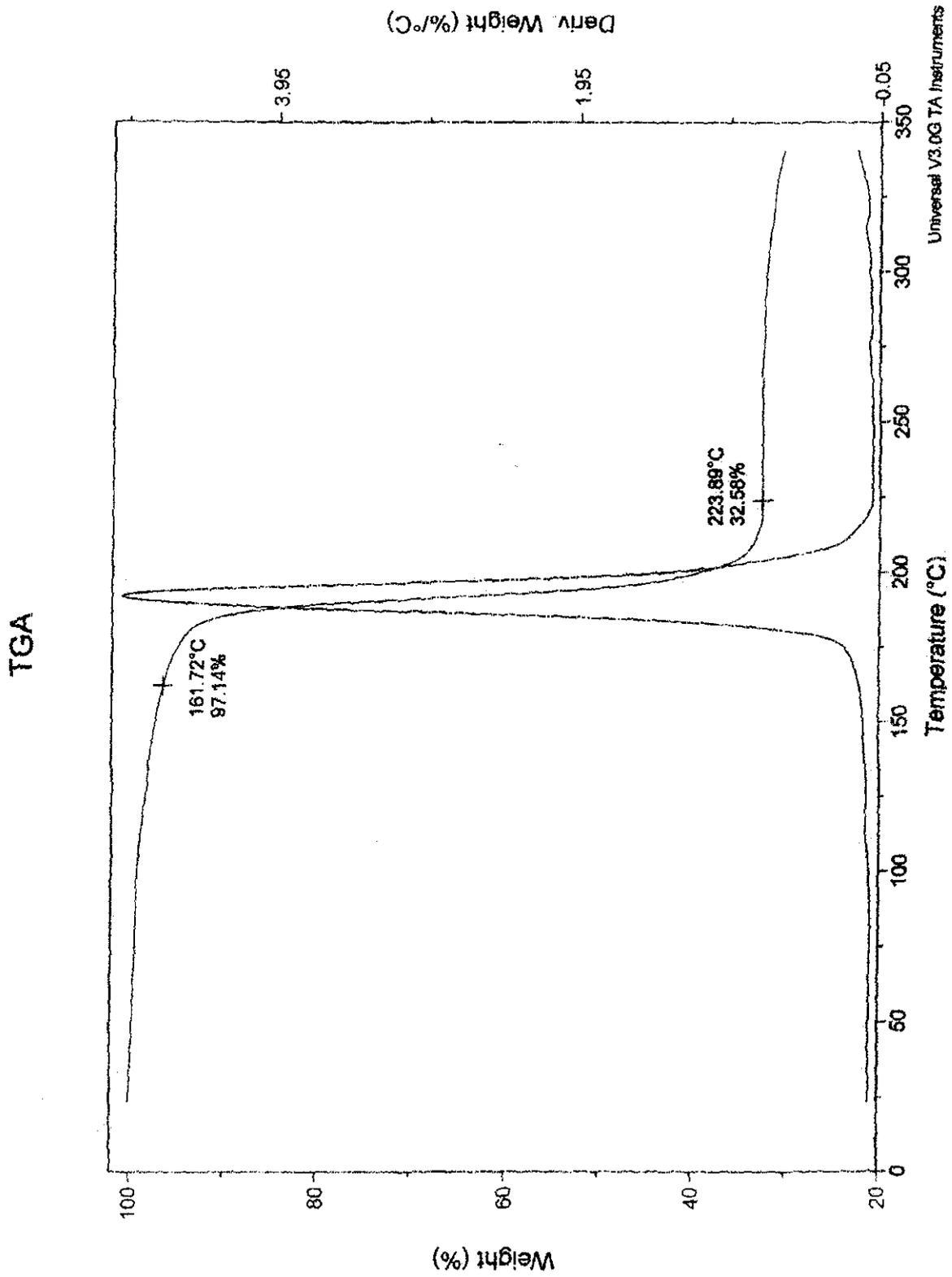


Figura 56. Análisis termogravimétrico de RRPhen2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



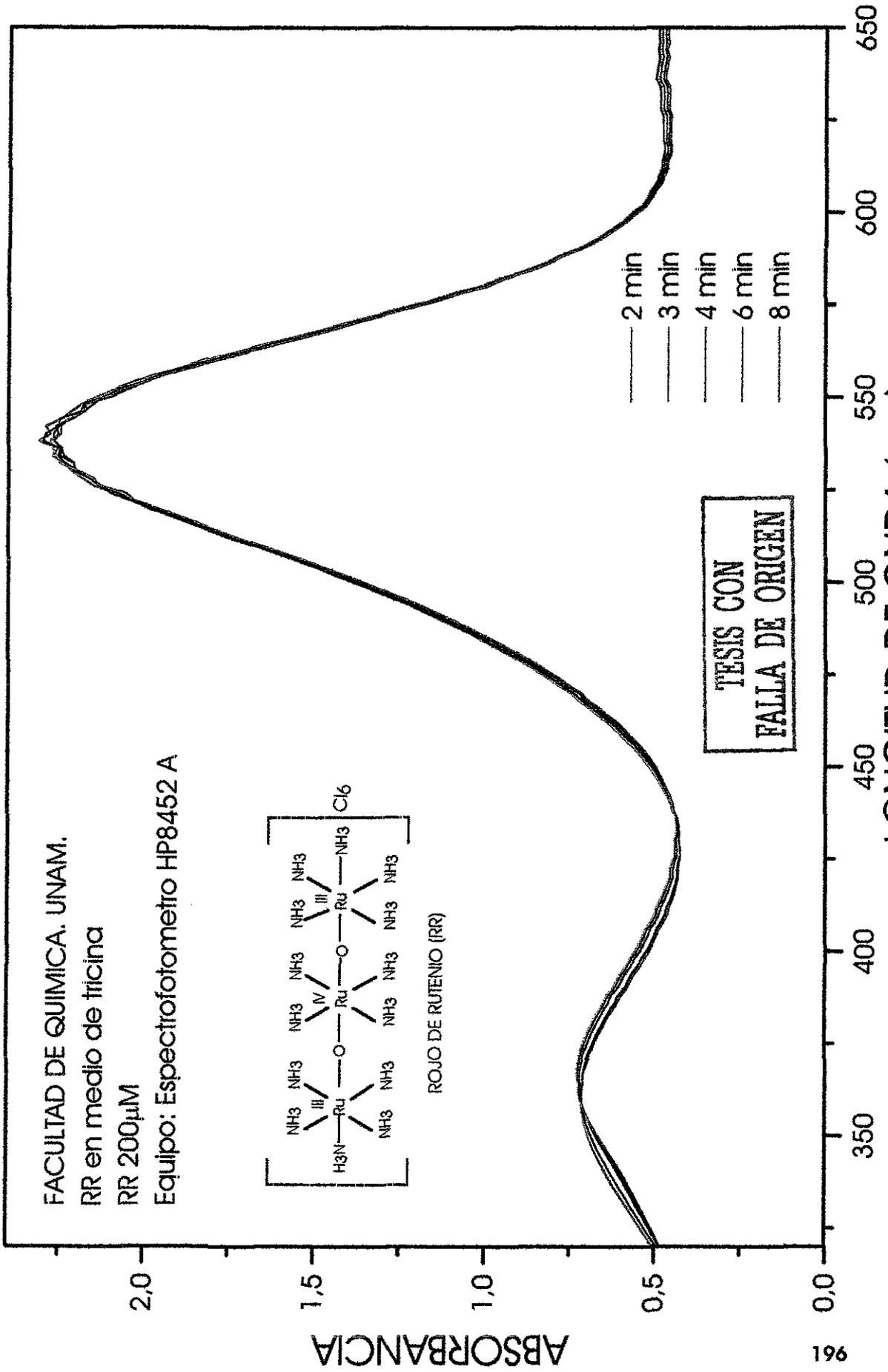


Figura 57. Prueba de estabilidad del RR en medio de transporte de electrones

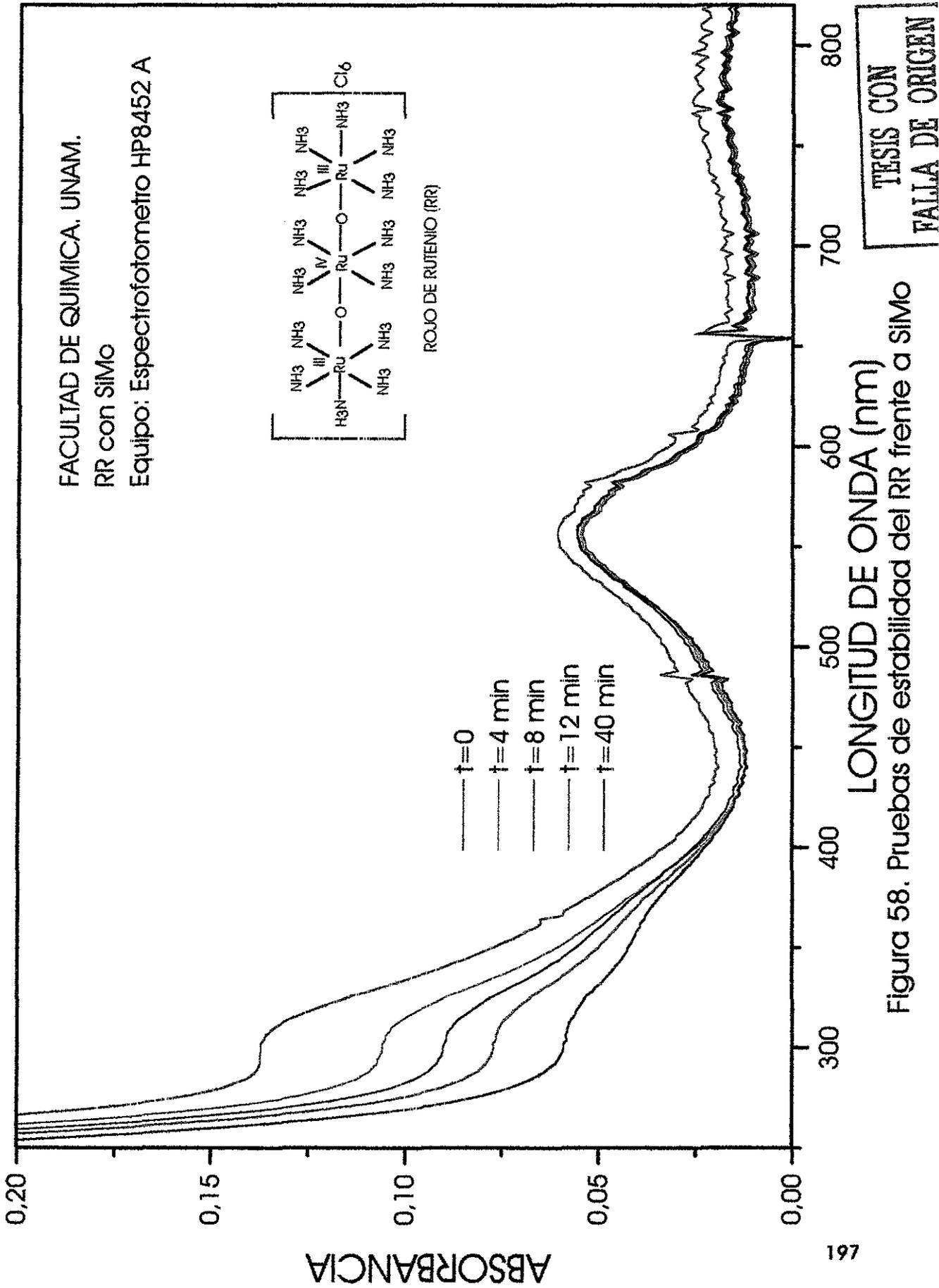
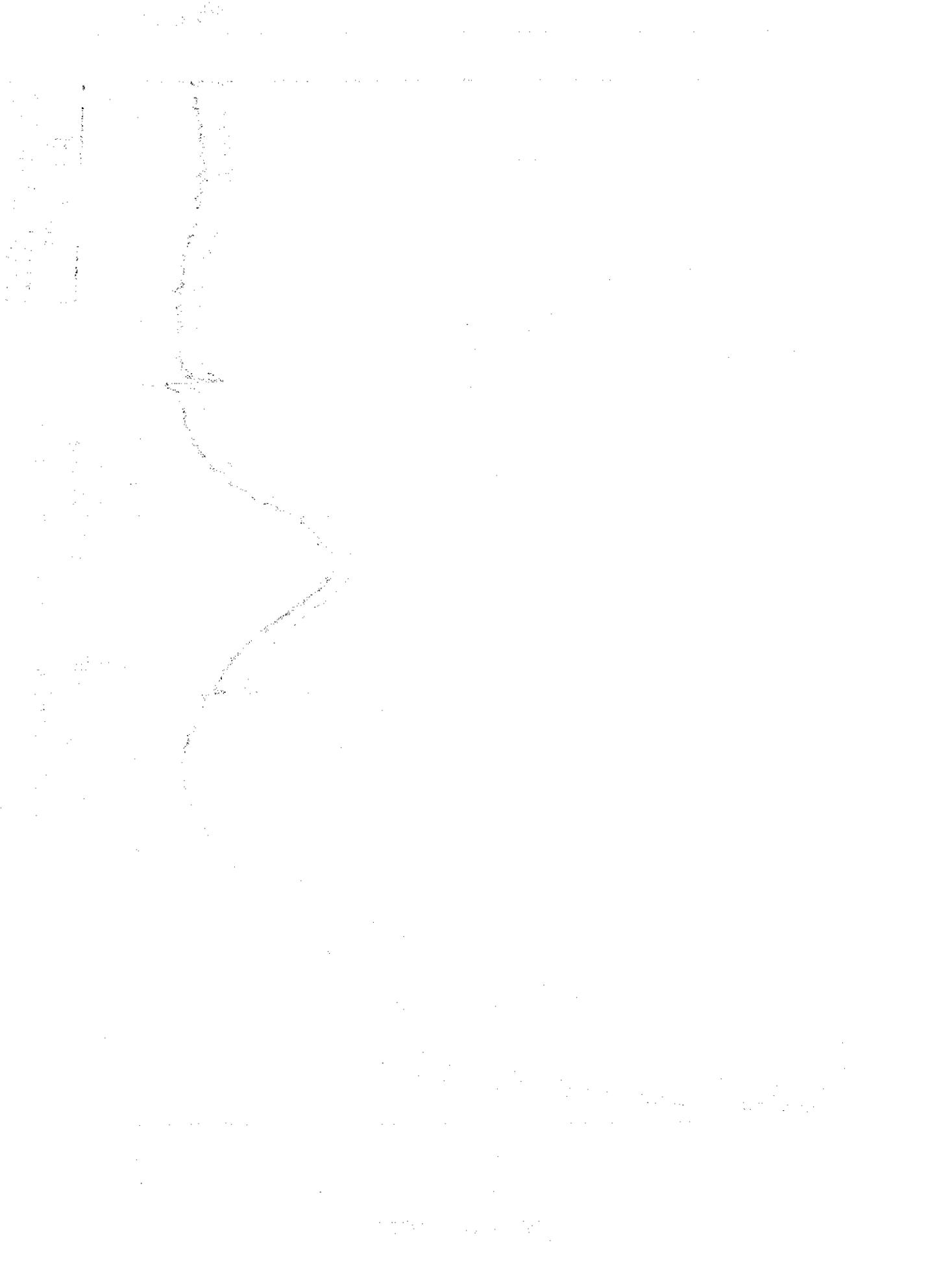


Figura 58. Pruebas de estabilidad del RR frente a SIMO



TRABAJOS EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES GENERADAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REPORTADO EN ESTA TESIS

CONGRESOS

- 1) "The 9th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, ICBC", Minneapolis, Minnesota, USA Julio, 11-16, 1999. "Mitochondrial Calcium Inhibition by a New Ruthenium Red Analogue". Garza-Ortiz, A. Sosa-Torres, M. E., y Zazueta, C.
- 2) "XXXV Congreso Mexicano de Química" organizado por la Sociedad Química de México San Luis Potosí, S.L.P., México. Septiembre 24-28, 2000. "La versátil reactividad química de compuestos trinucleares de rutenio y su influencia en el proceso fotosintético". Garza-Ortiz, A. Sosa-Torres, M. E., Lotina-Hennsen, B., King-Díaz, B., y Reyes-Martínez, S.
- 3) "XI Reunión de la Rama de Bioenergética y Biomembranas" organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica. San José de Vista Hermosa, Morelos. Noviembre 7-11, 1999. "Un análogo al rojo de rutenio que es un potente inhibidor de la enzima que fotolisa el agua en tilacoides". Garza-Ortiz, A. Sosa-Torres, M. E., Lotina-Hennsen, B., King-Díaz, B., y Reyes-Martínez, S.
- 4) "The 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry", Florencia, Italia. Agosto 26-31, 2001. "Capturing the biological activity of ruthenium red and its analogues in photosystem II". Garza-Ortiz, A. Sosa-Torres, M. E., Lotina-Hennsen, B., y King-Díaz, B.

PUBLICACIONES

- 1) Cecilia Zazueta, Martha E. Sosa-Torres, Francisco Correa y Ariadna Garza-Ortiz. Inhibitory Properties of Ruthenium Amine Complexes on Mitochondrial Calcium Uptake. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. Vol 31, No 6. 1999.
- 2) Ariadna Garza-Ortiz, Beatriz King-Díaz, Martha E. Sosa-Torres y Blas Lotina-Hennsen. Interferences at OEC Complex of Spinach Thylakoids by ruthenium red analogues. En preparación. 2002

