



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENTRE COMPLEJOS DE Cu(II) Y BISFOSFONATOS
EN AGUA. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA/ESTRUCTURAL Y
PRUEBAS BIOLÓGICAS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA
Miguel Ángel Romero Solano



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Armando Marín Becerra

VOCAL: Profesor: Carlos Cosío Castañeda

SECRETARIO: Profesor: Alejandro Dorazco González

1er. SUPLENTE: Profesor: Victor Guzmán Barrera

2° SUPLENTE: Profesora: Sandra Tobón Cornejo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE QUÍMICA INORGÁNICA 3 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA,
UNAM. CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, ALCALDÍA COYOACÁN
C.P. 04510, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alejandro Dorazco González

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Julio Zamora Moreno

SUSTENTANTE :

Miguel Ángel Romero Solano

Agradecimientos.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, proyecto PAPIIT-UNAM IN220023.

Al proyecto CONAHCyT-PRONACES clave 160671 "Mejoramiento de las estrategias de tratamiento contra enfermedades producidas por parásitos cinetoplástidos con importancia médica (Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis): uso de nanopartículas cargadas con drogas novedosas y oligonucleótidos anti sentido y el estudio de los mecanismos de muerte celular provocados por estos." por el financiamiento proporcionado y por la beca con clave de registro IQUI073/23.

A la Dra. Bertha Espinoza, Dra. Eya Caridad Rodríguez Pupo y M. en C. Ignacio Martínez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su apoyo en el cultivo de *Trypanosoma cruzi* así como los ensayos de actividad antiparasitaria de los compuestos NaRis y CuIA/IB-Ris.

A los miembros del cuerpo técnico-académico del Instituto de Química por toda la ayuda proporcionada en sus respectivas áreas:

M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez del Laboratorio de Pruebas Biológicas.

M. en C. Lucía del Carmen Márquez, Q. Eréndira García Ríos y M. en C. Lucero Ríos Ruiz del Laboratorio de Cromatografía de Gases y Líquidos.

Dra. Adriana Romo Pérez del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría.

M. en C. Virginia Gómez Vidales del Laboratorio de Resonancia Paramagnética Electrónica.

Dr. Diego Martínez Otero del Laboratorio de Difracción de Rayos X (CCIQS-UAEM/UNAM).

A mi asesor, el Dr. Alejandro Dorazco González, por todo el apoyo dado a lo largo del tramo final de mis estudios de licenciatura.

Contenido.

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
MOLÉCULAS SINTETIZADAS EN ESTE TRABAJO	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	11
2.1 DIMENSIÓN HISTÓRICA Y DIMENSIÓN ETIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	11
2.2 PANORAMA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO	15
2.3 PRINCIPALES RETOS EN LA QUIMIOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DE CHAGAS	18
2.4 COMPLEJOS METÁLICOS CONTENIENDO LIGANTES BIOACTIVOS	18
2.5 COMPLEJOS METÁLICOS CON LIGANTES INTERCALADORES DE ADN	21
2.6 DISEÑO DE POTENCIALES METALOFÁRMACOS EN ESTE TRABAJO.....	22
2.6.1 SELECCIÓN DE LOS LIGANTES BIOACTIVOS	23
2.6.2 SELECCIÓN DEL CENTRO METÁLICO	25
2.6.3 SELECCIÓN DE LIGANTES AUXILIARES Y CONTRAÍÓN	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	27
5. PARTE EXPERIMENTAL	29
5.1 REACTIVOS E INSTRUMENTOS	29
5.2 SÍNTESIS DE PRECURSORES	31
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRECURSORES	34
5.4 TITULACIONES UV-VIS DE LOS PRECURSORES CON RIS Y ZOL	35
5.5 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD	35
5.6 ESTUDIOS EN <i>T. CRUZI</i>	36
6. RESULTADOS	37
6.1 DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y ESTRUCTURAL	37
6.2 TITULACIONES UV-VIS	50
6.3 CARACTERIZACIÓN COMPUESTOS TERNARIOS	56
6.4 CITOTOXICIDAD	68
6.5 PRUEBAS EN <i>T. CRUZI</i>	71
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS	74
ANEXOS	81

Abreviaturas.

4,4'-dmbp	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
5,5'-dmbp	5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ale	Alendronato (derivado de ácido alendrónico)
bnz	Benznidazol
CENAPRECE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
DUZP	Diagrama Unificado de Zonas de Predominio
DRX	Difracción de Rayos X de monocristal
EC	Enfermedad de Chagas
MS-ESI	Siglas en inglés para Espectrometría de Masas-Ionización por Electro spray
FPPS	Farnesil Pirofosfato Sintasa
Iba	Ibandronato (derivado de ácido ibandrónico)
IR-ATR	Siglas en inglés para Infrarrojo-Reflectancia Total Atenuada
LIT	Siglas en inglés para Infusión de hígado y triptosa
HCT-15	Línea celular de colón (cancerosa)
FGH	Línea celular de Fibroblastos Gingivales Humanos (no cancerosa)
U251	Línea celular de glía de sistema nervioso central (cancerosa)
K562	Línea celular de leucemia
MCF-7	Línea celular de mama (cancerosa)
PC-3	Línea celular de próstata (cancerosa)
SKLU-1	Línea celular de pulmón (cancerosa)
COS-7	Línea celular de riñón de mono (no cancerosa)
nfx	Nifurtimox
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pam	Pamidronato (derivado de ácido pamidrónico)
Pyr	Piridina
PyroP	Pirofosfato dibásico
PCR	Siglas en inglés para Reacción en cadena de polimerasa
RPE	Resonancia Paramagnética de Electrón
Ris	Risedronato (derivado de ácido risedrónico)
NaRis	Risedronato Sodio hemipentahidratado
PBS	Siglas en inglés para Solución salina con Buffer de Fosfatos
Fe-SOD	Superóxido Dismutasa de Hierro
DFT/QTAIM	Siglas en inglés para Teoría cuántica de átomos en moléculas/Teoría de Funcionales de Densidad
TR	Tripanotiónina Reductasa
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Zol	Zoledronato (derivado de ácido zoledrónico)

Resumen.

En este trabajo, se sintetizaron en buenos rendimientos dos isómeros derivados complejos de Cu(II) con fórmula general $[\text{Cu}_2(\text{X1-2-dmbp})_2\text{Cl}_4]$ (X1-dmbp= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, **CuIA** y X2-dmbp= 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina, **CuIB**), se caracterizaron estructuralmente por difracción de rayos-X de monocristal y se verificó su identidad molecular por diferentes técnicas espectroscópicas (IR-ATR, UV-Vis, RPE) y espectrometría de Masas. Los estudios cristalográficos muestran que **CuIA** tiene una estructura dimerica monohidratada $[\text{Cu}_2(\text{X1-dmbp})_2\text{Cl}_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$ y **CuIB** es un complejo mononuclear $[\text{Cu}(\text{X2-dmbp})\text{Cl}_2]$ donde existen contactos del tipo Cu...Cl entre dos complejos adyacentes que generan cadenas 1D en su arreglo cristalino. Estos complejos son hidroestables y solubles en agua en concentraciones mM, por lo tanto se usaron como precursores para la formación de complejos ternarios con dos fármacos comerciales derivados de bisfosfonatos Ris y Zol.

Los estudio de interacción entre los complejos de Cu(II) y los fármacos a través de titulaciones de UV-Vis en agua neutra (pH = 7) muestran que la sal disódica del fármaco Ris tiene mayor afinidad por **CuIA** y **CuIB** comparada con la sal disódica de Zol. Las constantes de asociación para los sistema **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** fueron estimada en $K_{1:1} = 4.10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $K_{1:1} = 3.82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente.

El complejo **CuIA-Ris** fue sintetizado, descrito estructuralmente por difracción de rayos-X y caracterizado por técnicas espectroscópicas/Masas. El análisis cristalográfico revela que **CuIA-Ris** es un complejo tetranuclear con fórmula general $[\text{Cu}_4(\text{X1-dmbp})(\text{HRis})_2]$ con cuatro átomos de Cu(II) cristalográficamente independientes y con los anillos de piridina protonados. Los dos grupos bisfosfonato se coordinan en forma de puente a los fragmentos de $[\text{Cu}(\text{X1-dmbp})]$ a través de los átomos de oxígeno terminales.

Respecto a los estudios de citotoxicidad en células sanas se encontró que a 10 mM los cuatro complejos ternarios inhiben el crecimiento celular en la línea COS-7 al 100%. En la línea FGH los complejos **CuIA-Ris** y **CuIA-Zol** presentan toxicidad ligeramente menores pero significativas (87% y 84% respectivamente). A concentraciones menores (1 mM) la toxicidad de los complejos disminuye significativamente, los complejos **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** inhiben FGH y COS-7 a porcentajes comparables con el fármaco libre (**CuIA-Ris**: 14% FGH, 11% COS-7; **CuIB-Ris**: 12% FGH, 14% COS-7 comparados con Ris: 14% FGH, 11% COS-7).

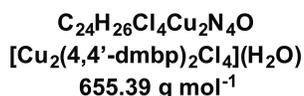
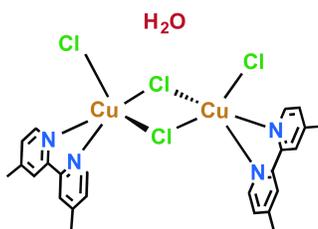
Se estudiaron los complejos ternarios en seis líneas cancerosas y en COS-7 a una concentración de 5mM y se encontró que los cuatro complejos presentan mucha mayor actividad anti tumoral que los fármacos libres, a esta concentración **CuIA-Ris** presenta la menor toxicidad a COS-7 y una alta actividad contra las líneas U251, MCF-7 y SKLU-1 (100%, 100% y 93% respectivamente).

En los estudios antiparasitarios contra *T. cruzi* cepa Querétaro se evaluaron (a tres concentraciones 0.5, 1 y 5 mM, durante 24, 48 y 72 horas) los compuestos **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** y se encontró que ambos compuestos presentan actividad mayor que Ris libre a las 24 y 48 horas (con el mayor efecto a las 48 horas para las tres concentraciones) y que a las 72h de exposición el efecto se mantiene a las concentraciones de 1 mM y 5 mM.

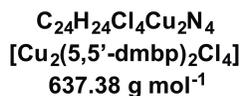
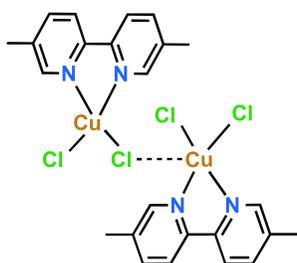
Se demuestra que complejos metálicos de Cu(II) conteniendo ligantes aromáticos neutros del tipo bipiridina metiladas y fármacos comerciales derivados de bifsosfonatos pueden ser útiles para el desarrollo de nuevos metalofármacos.

Moléculas sintetizadas en este trabajo

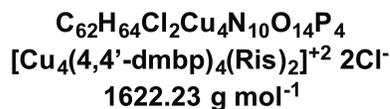
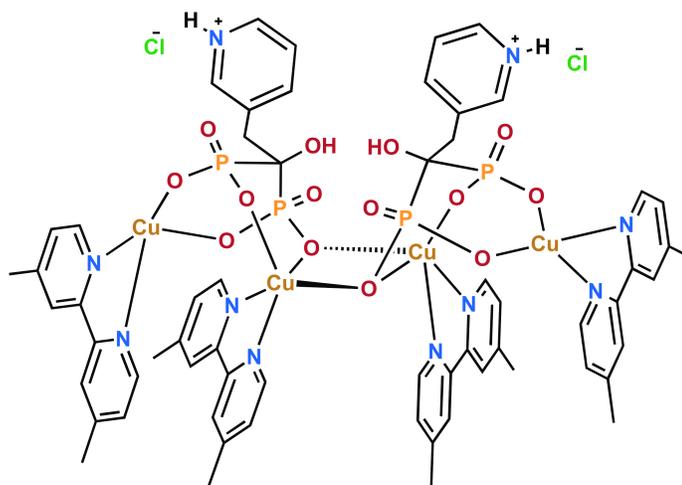
CuIA



CuIB

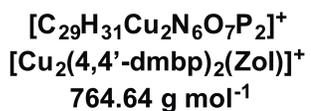
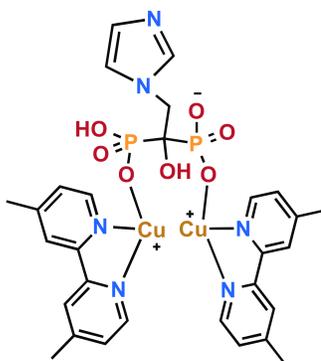


CuIA-Ris

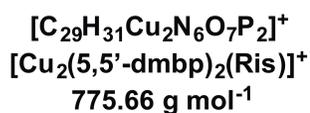
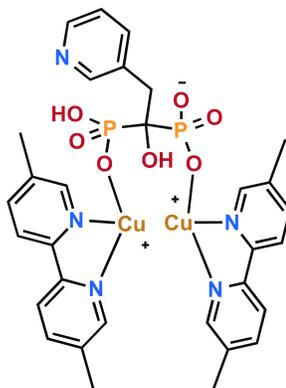


Especies detectadas mediante MS-ESI(+):

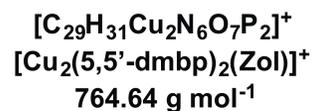
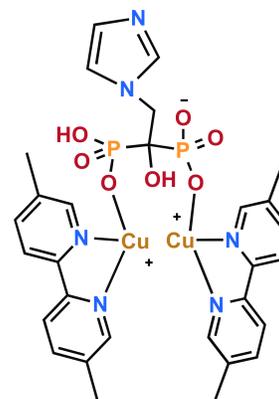
CuIA-Zol



CuIB-Ris



CuIB-Zol



1. Introducción.

La enfermedad de Chagas (EC) fue descubierta por el Dr. Carlos Chagas en 1909¹. Esta zoonosis, considerada por la OMS como una enfermedad tropical desatendida, es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) el cual pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, dentro de esta familia se encuentran otros parásitos causantes de enfermedades relacionadas al Chagas, como la Enfermedad del Sueño y la Leishmaniasis.²

A pesar de ser considerada una “enfermedad tropical”, la extensión presencial de la EC incluye zonas de la parte sur de Estados Unidos y partes de Europa. La enfermedad de Chagas consiste en una fase aguda y una fase crónica, la fase aguda es generalmente asintomática y cuando se presentan síntomas estos involucran fiebres y perturbaciones de la piel (inflamación del sitio de inoculación, signo de Romaña, etc.) mientras que en la forma grave de la fase aguda se presentan cardiopatías y meningoencefalitis. En la forma crónica se presentan afecciones cardiacas y gastrointestinales.³

El vector principal de la EC es la subfamilia de insectos *Triatominae*, conocidos popularmente como chinches besuconas en México y como vinchucas en Argentina, Bolivia, Chile y Uruguay. La ruta de propagación de la zoonosis a partir de estos insectos sucede cuando uno de estos insectos infectados se alimenta de un huésped humano y posteriormente defecan cerca de la zona de alimentación, lo que permite al parásito introducirse en el torrente sanguíneo, iniciándose el proceso de parasitación del huésped humano. Posteriormente, los parásitos se reproducen en el cuerpo humano e infestan tejidos, el ciclo se completa cuando una chinche sana se alimenta de un huésped humano infestado e ingiere los parásitos, reiniciándose el ciclo de vida del parásito. Otras formas menos comunes, pero importantes, en zonas no endémicas de transmisión incluyen las transfusiones de agentes hemáticos contaminados, la transmisión congénita y la ingestión de comida y bebida contaminadas.³

Actualmente solo hay disponibles dos fármacos comerciales para tratar la EC: el benznidazol (**bzn**) y nifurtimox (**nfx**), ver Figura 1.1. Estas sustancias solo tienen efectividad en la fase asintomática y en la fase aguda de la enfermedad y presentan efectos secundarios adversos como desordenes gastrointestinales, dolores musculares, desordenes de la médula ósea, entre otros.³⁻⁴

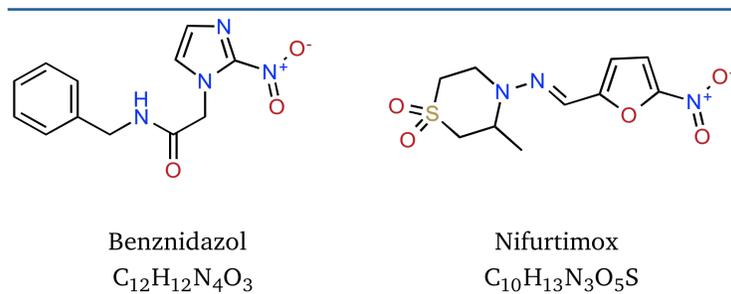


Figura 1.1. Moléculas actualmente utilizadas como fármacos para tratar la enfermedad de Chagas.

Dentro del campo de investigación asociado al desarrollo de nuevas moléculas con actividad contra el *Trypanosoma cruzi* se ha encontrado que dos enzimas presentes en el parásito pueden ser blancos para el desarrollo de moléculas tripanomicidas, la tripanotionina reductasa y la superóxido dismutasa de hierro, TR y Fe-SOD respectivamente.⁵ También se ha identificado a la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) como un objetivo potencial.⁶⁻⁷

A pesar de la efectividad que han demostrado algunos compuestos de coordinación de Pt(II), Pd(II) y Ru(III) con ligantes derivados de nitrofuranos y bzn informados en la literatura^{2, 8-9}, la investigación enfocada en la síntesis química, y la actividad antiparasitaria de los metalofármacos derivados de **bzn** y **nfx** con metales (Zn(II), Cu(II), Fe(II), Mg(II), Ca(II)) permanecen en gran medida inexploradas.

Por otro lado, existen reportes de compuestos de coordinación con otros ligantes que presentan actividad antichagásica.^{2, 8-11} Algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.2: los compuestos **1** y **2** son complejos de coordinación mononucleares neutros derivados de Pt(II) y Pd(II) con ligantes bidentados basados en 2-nitrofurano y tiosemicarbazonas² que tienen actividad tripanomicida. Los complejos de Ru con benznidazol coordinado de manera monodentada, **3** y **4** tienen actividad tripanomicida mayor al fármaco libre.⁸⁻⁹

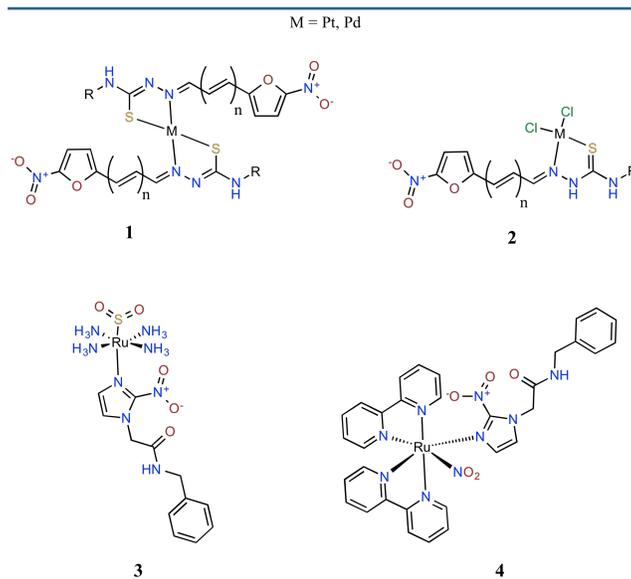


Figura 1.2. Compuestos de Pd(II) y Pt(, **1** y **2**, con ligantes derivados de tiosemicarbazonas que contienen un sustituyente 5-nitrofuril. Los compuestos de coordinación **3** y **4** contienen un centro metálico de Ru(II) y bzn como ligante, el compuesto **4** contiene un ligante NO₂.

Otras moléculas con actividad antichagásica son mostradas en la Figura 1.3 y corresponden a alopurinol¹²⁻¹³ (isómero de la purina hipoxantina) y diversos bisfosfonatos.^{6-7, 14} Los bisfosfonatos tienen conectividad P-C-P son análogos del pirofosfato (con conectividad P-O-P). Tanto los bisfosfonatos con actividad antichagásica (e.g. alendronato, ibandronato, zoledronato y risedronato) como el alopurinol son moléculas que ya fungen como principios activos para tratar distintas afecciones, el primero se utiliza para tratar la enfermedad metabólica conocida como gota mientras que los bisfosfonatos se utilizan para tratar osteoporosis, entre otras afecciones relacionadas a los huesos.

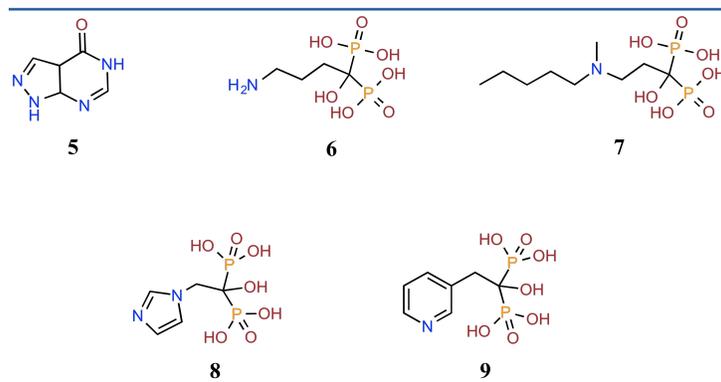


Figura 1.3. Alopurinol **5** y Ácidos alendrónico **6**, ibandrónico **7**, zoledrónico **8** y risedrónico **9** (como principios activos los bisfosfonatos se encuentran como la sal monosódica, **6** y **7** son fármacos de 2^a generación mientras que **8** y **9** son de 3^a generación).

2. Antecedentes.

2.1 Dimensión histórica y dimensión etiológica de la enfermedad de Chagas.

El vector principal y el agente causante (*T. cruzi*.) han coexistido con los humanos durante milenios. Se han encontrado restos humanos Chinchorros (civilización que habitaba la región costera del desierto de Atacama) con una antigüedad de ~9000 años en los que se han encontrado evidencias de infección por *T. cruzi*.¹⁵ También se tienen registros que identifican cuadros sintomáticos asociados a la EC durante los siglos XVII y XIX.¹⁶

En el contexto de un proyecto anti malaria Carlos Chagas descubrió (1907 en Minas Gerais, Brasil) el parásito *T. cruzi* al inspeccionar los desechos de un triatómino y posteriormente describió las manifestaciones clínicas de la EC y aisló el parásito de pacientes clínicos.¹⁶ El escepticismo al que se vio sometido el descubrimiento de C. Chagas dificultó en un inicio su atención, fue hasta las décadas de los 30s y 40s que S. Mazza y Cecilio Romaña dieron confirmación a lo ya reportado por Chagas.¹⁶⁻¹⁷

Además, varios paradigmas inmunológicos y patológicos se encontraban en desarrollo de forma paralela al descubrimiento y descripción de la EC.¹⁷ Esto contribuyó a la subestimación de su gravedad e impacto mundial. Dentro del periodo moderno de 1990-2019 se han realizado investigaciones y estudios que permitieron entender mejor el cuadro clínico asociado a la EC, algunos ejemplos incluyen:

- El descubrimiento de material genético de *T. cruzi* en los corazones de pacientes con miocarditis crónica causada por EC.¹⁸
- La utilización de **bzn** como tratamiento en pacientes que se encuentran en la fase indeterminada de la EC previene el desarrollo de miocardiopatía.¹⁹
- Estudio que mediante PCR en modelos murinos demuestra que existe relación en la presencia de parásitos en tejidos y la presencia de daños en los mismos tejidos.²⁰

En el paradigma antiguo se pensaba que la mayoría de los daños ocasionados por la EC se debían a causas auto inmunes y que el tratamiento etiológico no era una ruta viable para abordar la EC. Los ejemplos anteriores, entre otros¹⁷, cambiaron dicho paradigma, reactivando la investigación quimioterapéutica contra *T. cruzi*.

Actualmente, la OMS estima que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas globalmente²¹ y que la enfermedad tiene una presencia endémica en 21 países latinoamericanos.²² Un mapa de la distribución de la enfermedad se muestra en la Figura 2.1.

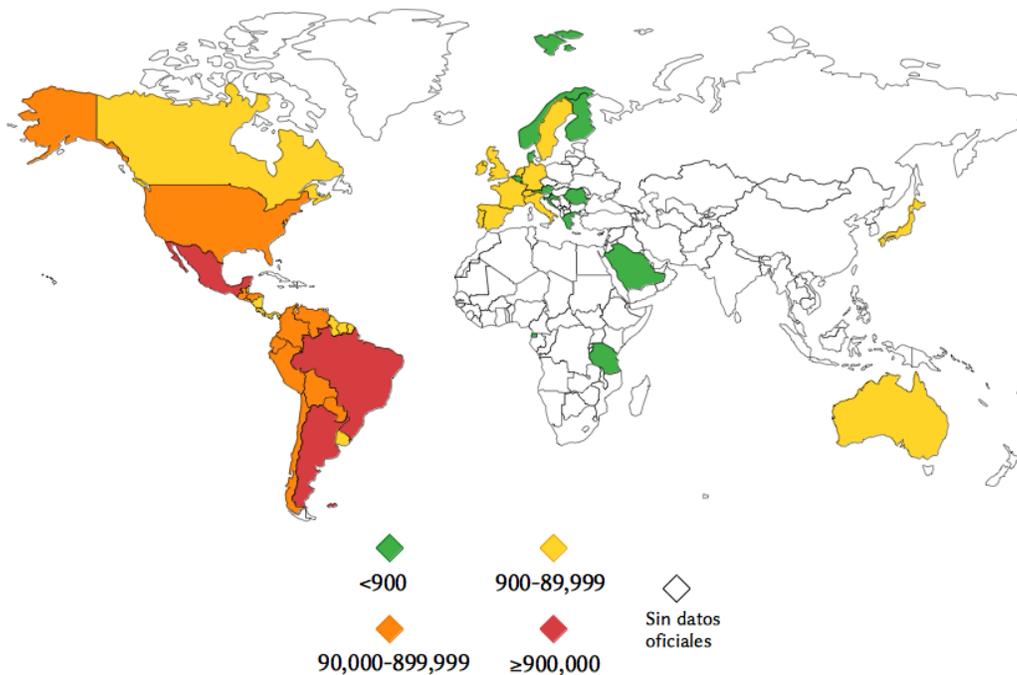


Figura 2.1. Mapa de la distribución global de personas afectadas por la EC, los datos son del año 2018, corresponden a cifras estimadas oficiales y fueron tomados de la referencia 21.

Además de la ruta de contagio a través de los vectores triatóminos, existen otras rutas de contagio importantes que han contribuido a la propagación de la EC fuera de las zonas endémicas. Las rutas de transmisión congénita y de transmisión por transfusión sanguínea se mencionan como componentes mayoritarios en la expansión de la EC a zonas no endémicas.^{3, 17, 23-24}

Respecto a la ruta que involucra trasplante de órganos donados infectados con *T. cruzi* hacia pacientes receptores sanos, se reportó en Brasil en 1981²⁵ un trasplante de

riñón contaminado con su resultante infección al receptor y en 2001 los primeros casos se reportaron en los Estados Unidos.²⁶ Recientemente (en el año 2017) se realizó un estudio cuyas conclusiones sugieren que *T. cruzi* también puede ser transmitido por la vía sexual.²⁷ La ruta oral no presenta tanto riesgo en el contexto de las zonas no endémicas pero es importante en términos de los contagios que se dan en las zonas donde el vector es endémico.²⁸⁻²⁹

La EC se manifiesta en dos fases: la fase aguda y la fase crónica, el periodo asintomático inicial de la fase crónica se identifica como la forma indeterminada. En la fase aguda, la cual sucede después de un periodo de incubación de 1 a 2 semanas, los niveles de parásitos en la sangre son altos y se pueden presentar síntomas como fiebre, dolor muscular, dolores de pecho y abdomen y sí el sitio de entrada de los parásitos es el tejido del ojo se presenta el signo de Romaña. La fase aguda tiene una duración de 4 a 12 semanas.³⁰

Si no se trata la parasitemia en la fase aguda, se progresa a la fase crónica la cual se caracteriza por estar compuesta en un principio por la forma indeterminada de la EC y posteriormente por el desarrollo de síntomas cardíacos y gastrointestinales. Los síntomas cardíacos pueden incluir aneurisma ventricular, arritmia, falla cardíaca y muerte súbita. Los síntomas digestivos pueden incluir desordenes de la motilidad, la absorción y secreción. También se pueden llegar a desarrollar megacolon, megaesófago y cardiomegalia, ya que en la fase crónica la presencia de parásitos en la sangre es mínima y estos se encuentran de forma persistente en los tejidos cardíacos y digestivos, lo que contribuye al desarrollo de estas afecciones.^{3, 30}

El componente principal en la transmisión del agente etiológico de la EC en las zonas endémicas son los insectos hemípteros hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (familia *Reduviidae*), se tienen identificadas más de 130 especies y todas tienen potencialidad de ser vectores de *T. cruzi*. Cinco especies, Figura 2.2, se consideran como los principales vectores: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*.³¹⁻³²

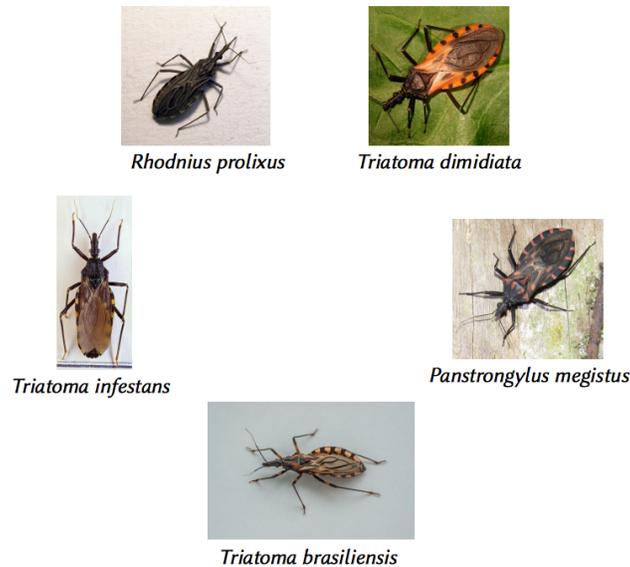
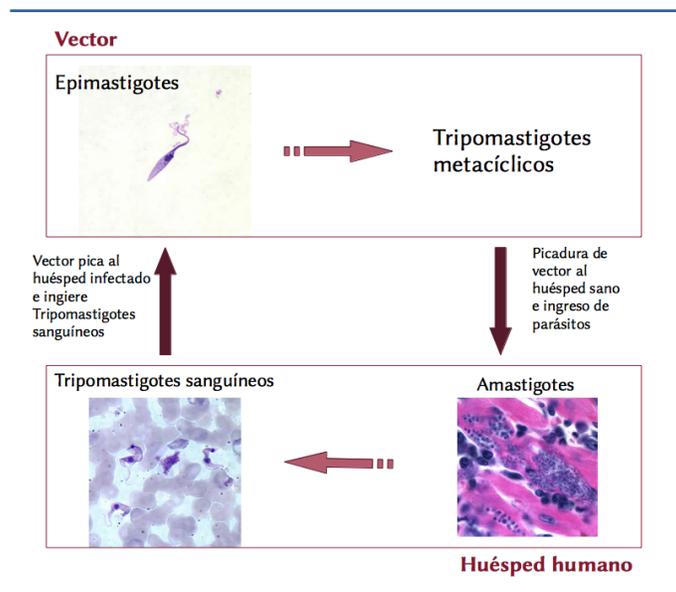


Figura 2.2. Las cinco especies que son los vectores principales de transmisión de *T. cruzi*.

El agente etiológico tiene una diversidad genética grande lo que contribuye a la variabilidad que se observa respecto a su distribución en el mundo, patología inducida y respuesta frente a la quimioterapia.³³ Actualmente se tiene clasificado al *T. cruzi* dentro de seis linajes genéticos (I-VI).³⁴

El organismo presenta cuatro formas: epimastigotes (**em**), tripomastigotes metacíclicos (**tm**), amastigotes (**am**) y tripomastigotes sanguíneos (**ts**) en su ciclo de vida como se muestra en el Esquema 2.1³⁵, dos de estas formas se encuentran en el vector y dos de ellas en el huésped humano.

Cuando un vector infectado se alimenta, este excreta el parásito en su forma **tm**, los cuales pueden (en forma activa o a través de acción mecánica humana) ingresar al huésped, posteriormente la forma **tm** es fagocitada y a través de la liberación de sustancias propias del parásito, este es liberado al citoplasma en donde se transforma a la forma **am**, la forma **am** se multiplica y, 12 horas antes de la lisis celular, la forma **am** se transforma en la forma **ts** (esta forma puede penetrar otras células del cuerpo, especialmente células nerviosas, cardíacas, musculares y esqueléticas), una vez que sucede la ruptura de la célula la forma **ts** se libera al torrente sanguíneo.



Esquema 2.1. Diagrama generalizado del ciclo de vida de *T. cruzi* en el vector y en el ser humano.

Al ser picado un huésped infectado por un vector sano, el vector ingiere la forma **ts** y esta se transforma primero en epimastigotes y finalmente en la forma **tm**, completando el ciclo.³⁶

2.2 Panorama de la enfermedad de Chagas en México.

Los primeros casos oficialmente reconocidos los reportó el Dr. Luis Mazzoti en Oaxaca en el año 1940.³⁷

En México se han encontrado al menos 31 especies de triatóminos y su extensión abarca dos tercios del territorio nacional. En 2015 se identificaron los vectores *Triatoma longipenis*, *Triatoma pallidipenis* y *Triatoma dimidiata* como vectores principales.³⁸ Las especies intradomiciliarias son *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* mientras que hay 11 especies peridomiciliarias identificadas.³⁹ *Rhodnius prolixus* (uno de los vectores principales) se consideraba erradicado sin embargo un artículo reciente reporta su resurgimiento en Oaxaca.⁴⁰

Como puntualizan Ramsey y colaboradores⁴¹, hay una notorio intervalo temporal desde la publicación en 1992 de la primera encuesta nacional epidemiológica de

seroprevalencia de *T. cruzi*⁴² (la cual arrojó una cifra del 1.5% de seroprevalencia) hasta la inclusión en el año 2010 de la enfermedad de Chagas en la Norma Oficial Mexicana, NOM-032-SSA2-2010, relacionada a la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por vectores y la inclusión de la obligatoriedad del realizado de pruebas para detectar *T. cruzi* en todos los productos sanguíneos y sus componentes en la norma NOM-253-SSA1-2012. La versión anterior publicada en 1993 solo establecía como criterio de exclusión a personas con antecedente de diagnóstico de EC y realización de pruebas solo para productos sanguíneos provenientes de zonas endémicas.⁴³⁻⁴⁴

La capacitación a los médicos es aún insuficiente (especialmente en las comunidades rurales) respecto al diagnóstico de la enfermedad así como respecto a los procedimientos necesarios para la prescripción del tratamiento antiparasitario se cuenta, en general, con infraestructura insuficiente para realizar pruebas diagnósticas.⁴⁵

Recientemente ha habido una mayor atención por parte del Estado mexicano sobre la política pública frente a la EC, en el 2013 se publicó el Programa de Acción Específico (PAE) Chagas 2013-2018 cuyo marco de trabajo se centró en el control de la transmisión vectorial (a través de acciones de control triatómino) y la eliminación de la transmisión congénita y de la transmisión vía transfusiones sanguíneas.⁴⁶

A partir del año 2019 la Secretaría de Salud tomó la decisión de unir los PAEs para cada vector en uno solo, el “PAE Programa de prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores e intoxicación por veneno de artrópodos 2020-2024” bajo la argumentación de que la estructuración individual fomentaba esquemas piramidales y la desatención de unos programas sobre otros, e.g. el PAE dedicado al dengue y al paludismo contaban con recursos en suficiencia mientras el resto de enfermedades transmitidas por vector contaban con recursos limitados.⁴⁷⁻⁴⁸

Fuentes oficiales estiman que el número de personas afectadas por la EC en el país asciende a los 1.1 millones^{21, 39, 46}, sin embargo, los autores de un meta análisis estiman una seroprevalencia del 3.38% lo que corresponde a una cifra de ~4.1 millón de casos de EC.⁴⁹

En México el tratamiento quimioterapéutico no se encuentra ampliamente disponible. El acceso al **bzn/nfx** se encuentra en función de que las unidades de salud involucradas en el diagnóstico de un caso de EC agudo o crónico generen un reporte dentro de un periodo de 7 días para que el tratamiento se solicite al Departamento de Vectores de cada Secretaria de Salud estatal que a su vez lo tienen que solicitar al CENAPRECE federal.³⁹ Adicionalmente, el benznidazol no se encuentra incluido en el cuadro básico de medicamentos del Sector Salud, cabe mencionar que la empresa argentina Laboratorios Elea contaba con un registro sanitario aprobado en el año 2017 para comercializar benznidazol en el país, este registro venció el 31 de julio del 2022.⁵¹

Adicionalmente, Ramsay et al⁴¹ han identificado otras fuentes de subestimación de casos de EC por lo que es posible que la cifra real de personas afectadas por la EC en el país sea mayor. La Figura 2.3 muestra la incidencia de casos diagnosticados de EC crónica y aguda en México para el periodo de los años 2017-2019.⁵⁰

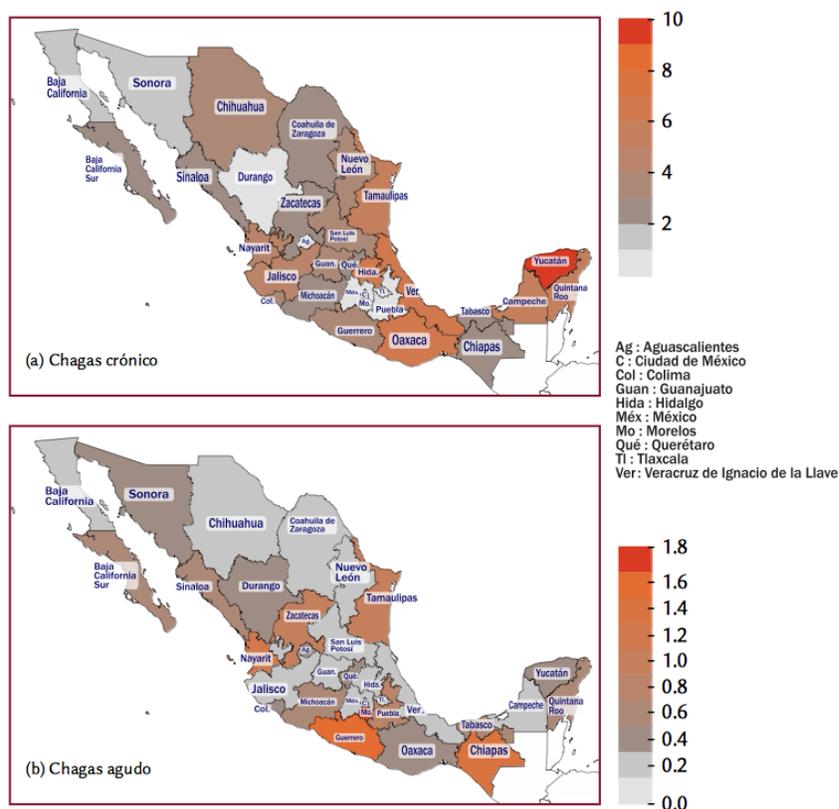


Figura 2.3. Mapas que muestran la incidencia de casos diagnosticados de EC (a) crónico y (b) agudo en México en el periodo de 2017 a 2019. La tasa de incidencia para ambos casos es por cada 100,000 habitantes.

2.3 Principales retos en la quimioterapia en el tratamiento de Chagas.

Los dos tratamientos disponibles para tratar la EC son lejanos de ser tratamientos ideales, el **bnz** se empezó a utilizar en 1971 como tratamiento para la EC mientras que el **nfx** se ha utilizado desde 1969. El **nfx** muestra mayor toxicidad que el **bnz** sin embargo debido a la falta de opciones se sigue utilizando como tratamiento de segunda línea cuando falla el tratamiento con **bnz** o cuando no hay disponibilidad de **bnz**.

La eficacia del tratamiento con ambos fármacos se encuentra en función del tiempo a partir del momento de infección con *T. cruzi* y decrece dramáticamente cuando la fase crónica de la enfermedad se encuentra establecida.⁵² En el caso del **bnz** el porcentaje de cura se encuentra entre el 60-94% para niños no mayores a los trece años y entre el 2-40% para adultos con enfermedad crónica desarrollada, mientras que para el **nfx** el porcentaje de cura alcanza hasta el 86% para infantes menores a los catorce años y 7-8% para adultos.⁵²

Se han llevado a cabo estudios clínicos utilizando la estrategia de modificación de dosis y de duración de tratamiento, también se han explorado la utilización de combinaciones de otros fármacos reposicionados y **bnz/nfx** (BENEFIT, CHAGASAZOL, STOP CHAGAS) sin embargo no han mostrado efectividad superior al **bnz**.⁵²⁻⁵³

Adicionalmente, el organismo *T. cruzi* presenta susceptibilidad variada hacia los agentes terapéuticos en función de las cepas involucradas y el parásito infecta los diferentes tejidos del organismo humano de forma específica a la cepa responsable de la infección.⁵³

2.4 Complejos metálicos conteniendo ligantes bioactivos.

Se han reportado varios compuestos de coordinación y organometálicos diseñados como posibles metalofármacos contra la enfermedad de Chagas. A continuación, se

mencionan compuestos cuyos diseños se centran en la utilización de ligantes con actividad inhibitoria sobre algún mecanismo molecular del organismo *T. cruzi*.

El grupo de Roberto Sánchez Delgado se ha centrado en el desarrollo de complejos de Ru(II), Ru(III), Au(I), Cu(II) y los ligantes Clotrimazol (**CTZ**) y Ketoconazol (**KTZ**).^{10, 54} Estos ligantes (**CTZ** y **KTZ**) son inhibidores de la biosíntesis de esteroides, particularmente del ergosterol, el cual es un compuesto que se encuentra presente en las membranas celulares de organismos tripanosomátidos y es análogo al colesterol que se encuentra en células de mamíferos.^{55, 56} La Figura 2.4 muestra la estructura química de estos compuestos.

Otros objetivos han sido la enzima escualeno sintasa, la cual funge un papel importante en la biosíntesis de ergosterol y la enzima cruzipaína, la cual es la proteasa cisteína principal presente en *T. cruzi*. El grupo de María Chao reportaron la síntesis⁵⁷ de 8 moléculas que contienen el fragmento Se-CN, análogas al compuesto llamado WC-9, el cual inhibe la acción de la escualeno sintasa. Leite reportó⁵⁸ una serie de complejos de Ru(II) con aril oxotiazolil hidrazonas (**ATZ**) que se han demostrado que presentan actividad inhibitoria sobre la cruzipaína. La Figura 2.5 muestra la estructura química de estos compuestos.

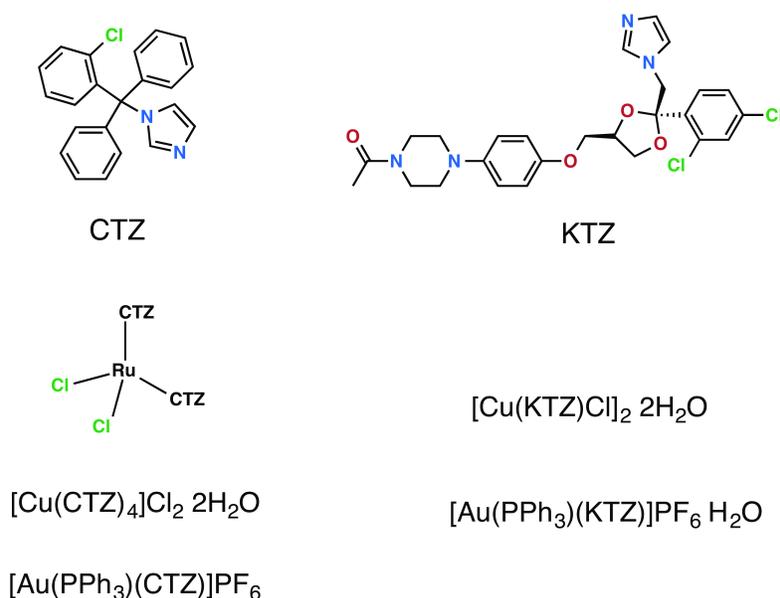


Figura 2.4. Complejos de coordinación de Ru(II), Au(I) y Cu(II) con clotrimazol (**CTZ**) y ketoconazol (**KTZ**) como ligantes.

Otra serie de complejos metálicos con actividad biológica contra *T. cruzi* son compuestos de Pt(II), Pd(II), Au(I) y VO(IV) con el ligante N-óxido de mercaptopiridina (Figura 2.6). Estos compuestos inhiben la enzima NADH-fumarato reductasa, que se encuentra en *T. cruzi*.⁵⁹⁻⁶²

En esta línea, se han sintetizado moléculas cuyo mecanismo de acción es a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos ejemplos incluyen los complejos con tiosemicarbazonas y los complejos de Ru(III) mencionados en la Figura 1.2. Otros ejemplos incluyen compuestos de vanadilo con quinoxalinas⁶³ y derivados de ferroceno y rutenoceno complejados a ligantes imina sustituidas con nitrofurilo.⁶⁴⁻⁶⁵

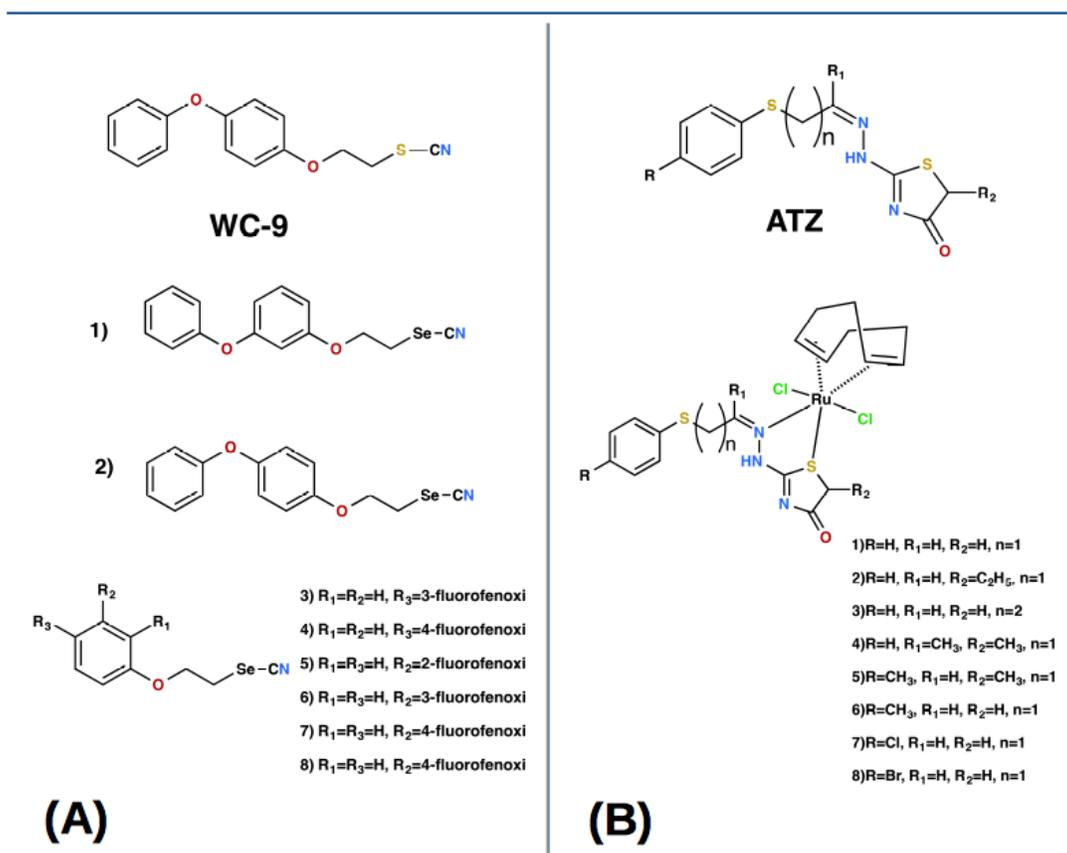


Figura 2.5. (A) Seleno compuestos inhibidores de la escualeno sintasa derivados del ligante WC-9. (B) Serie de compuestos de Ru(II) con el ligante inhibidor de la cruzipaña ATZ.

Bruno Demoro *et al* han sintetizado y evaluado en *T. cruzi* compuestos con los bisfosfonatos risedronato, alendronato, pamidronato e ibandronato, en la sección 2.6.1 se profundiza sobre estos compuestos.

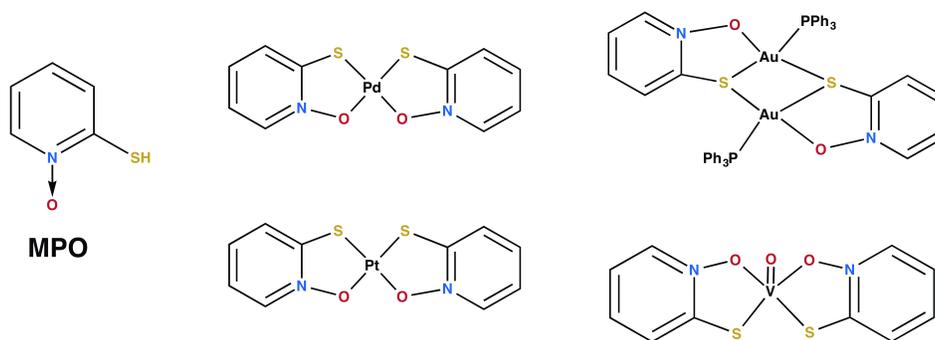


Figura 2.6. Compuestos inhibidores de la NADH-fumarato reductasa constituidos de centros de Pd(II), Pt(II), VO(IV) y Au(I) y el ligante bioactivo N-óxido de mercaptopiridina (**MPO**).

2.5 Complejos metálicos con ligantes intercaladores de ADN.

Otra estrategia utilizada involucra el uso de ligantes intercaladores de ADN y metales d^8 con afinidad hacia ADN, como Pt(II) o Pd(II). La Figura 2.7-A muestra una serie de compuestos con Pt(II) con terpiridinas sustituidas desarrollados por Lowe⁶⁶ y compuestos constituidos por un núcleo de VO(IV), bases de schiff y ligantes polipiridínicos (Figura 2.7-B) estudiados contra *T. cruzi*.⁶⁷

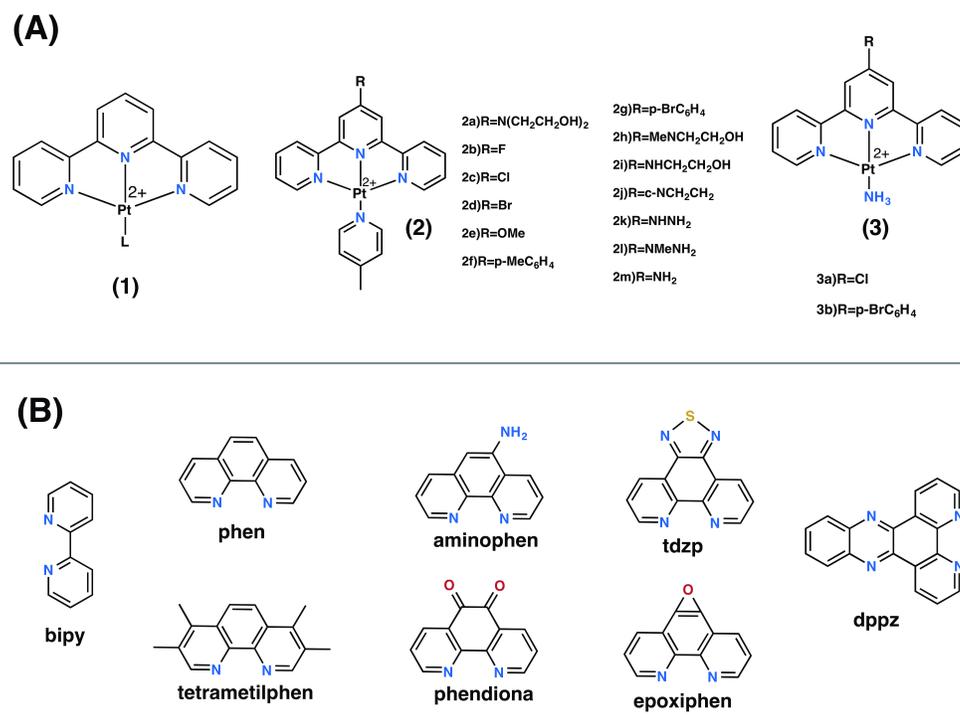


Figura 2.7. (A) Tres generaciones de complejos Pt(II)-Terpy. (B) Compuestos polipiridínicos con potencial intercalador de ADN.

2.6 Diseño de potenciales metalofármacos en este trabajo.

El diseño de compuestos metalofármacos se puede racionalizar a través de tres ejes:

- 1 El uso de ligantes que han mostrado actividad biológica tripanomicida donde la coordinación a iones metálicos pueden modular sus propiedades físico-químicas y biológicas. En el caso de Ris y Zol, su solubilidad limitada en medios acuosos (~12mg/mL y ~5mg/mL, respectivamente) y su prácticamente nula solubilidad en disolventes orgánicos motiva la coordinación para mejorar la solubilidad del fármaco y potencialmente aumentar su biodisponibilidad y su actividad tripanomicida inherente.
- 2 El uso de centros metálicos aumenta la actividad de los ligantes bioactivos *per se*, adicionalmente, los centros metálicos pueden interactuar con enzimas, nucleobases u otras biomoléculas.⁶⁸ El uso del ión Cu(II) puede modular las propiedades de los fármacos Ris y Zol aumentando su solubilidad y biodisponibilidad, así como acceder a mecanismos de acción tripanomicidas mediados por la acción del centro metálico con biomoléculas.
- 3 El uso de ligantes intercaladores capaces de interactuar con el material genético de los organismos objetivo. Se ha decidido utilizar dos derivados metilados de una molécula intercaladora ya estudiada, la 2,2'-bipiridina (bipy, Figura 2.7-B), e incorporar este ligante de manera simultánea al centro metálico junto el ligante bioactivo, esto para obtener una especie química polifuncional.

Considerando estos ejes se ha decidido estudiar las constantes de asociación (ver sección 3) entre los precursores sintetizados (**CuIA** y **CuIB**, ver sección 4 y 5) y los fármacos seleccionados (Ris y Zol), utilizando ligantes bioactivos y ligantes con potencial intercalador. A continuación se describe selección de ligantes, centro metálico y contraión.

2.6.1 Selección de los ligantes bioactivos.

Siguiendo la estrategia de reposicionamiento de fármacos se han seleccionado como ligantes bioactivos dos fármacos de tercera generación que ya se utilizan como tratamiento en enfermedades óseas y que por tanto ya tienen evaluado su perfil clínico.⁶⁹ Se ha tomado en consideración los efectos inhibitorios que ejercen los bisfosfonatos sobre la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) de *T. cruzi* para la selección de Ris y Zol como ligantes bioactivos.^{6-7, 14} y también la acción que presentan sobre los acidocalcisomas (un organelo rico en Ca(II) presente tanto en protozoarios como en mamíferos y que en el protozoario presenta enzimas diferenciadas a las versiones mamíferas) de *T. cruzi* debido a la afinidad de los bisfosfonatos a este organelo.⁷⁰

Estos fármacos son derivados de bisfosfonatos, ácido risedrónico y ácido zoledrónico, ver Figura 2.8. Ambos fármacos cuentan con dos grupos fosfonato y un heterociclo nitrogenado (piridina e imidazol) que pueden tener procesos de protonación/desprotonación en medios acuosos y fisiológicos.

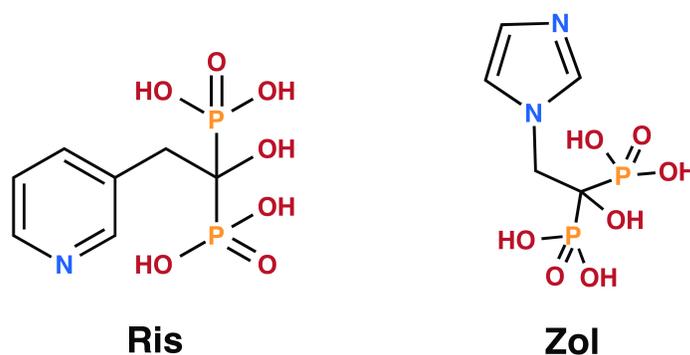


Figura 2.8. Bisfosfonatos de tercera generación utilizados como ligantes bioactivos en este trabajo: Ris = ácido risedrónico, Zol = ácido zoledrónico. Se muestran las moléculas en sus formas ácidas y sin N-protonación. Físicamente ambos son compuestos cristalinos/microcristalinos blancos con solubilidad limitada en H₂O y solubilidad prácticamente nula en disolventes orgánicos comunes. Sus puntos de fusión son: NaRis = T>245 °C y Zol H₂O = T>247 °C

En general se han realizado pocos estudios⁷¹⁻⁷³ sobre la especiación en disolución acuosa en función del pH para ambos ácidos, de estos, destacan dos publicaciones: una en donde se realizaron estudios potenciométricos y espectroscópicos para

determinar las constantes de disociación ácida (K_{a_n}) del ácido risedrónico⁷² y un estudio teórico DFT/QTAIM combinado con determinación potenciométrica realizado para elucidar la secuencia de protonación del ácido zoledrónico⁷³, la Figura 2.9 muestra los diagramas unificados de zonas de predominio (DUZP) desarrollados con los valores de $\log K_{a_n}$ reportados en estos dos estudios y las especies correspondientes a cada región.

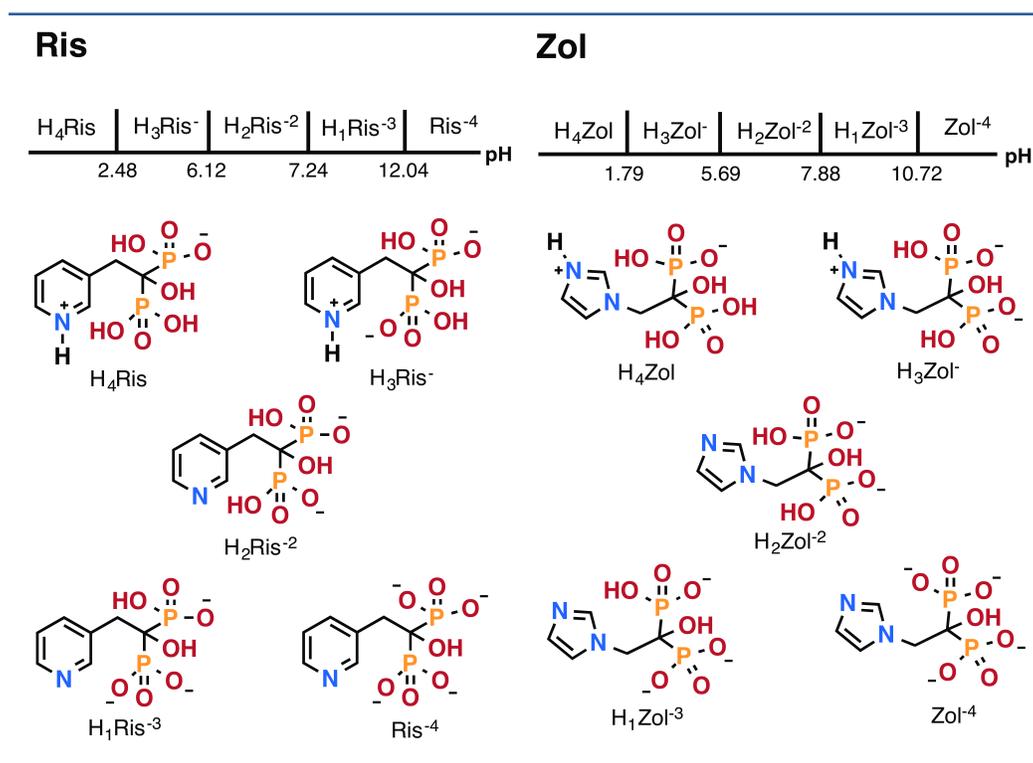


Figura 2.9. Diagramas unificados de zonas de predominio (DUZP) en función del pH para Ris y para Zol, se muestran las estructuras de las especies relevantes a cada región. Los valores sobre la recta corresponden a $pK_{a/n}$, donde $n = 1$ protón.

En cuanto a complejos de coordinación derivados de Ris^{74a-d} y Zol^{75a-d}, la literatura incluye principalmente polímeros de coordinación y complejos mono y dinucleares sintetizados por reacciones solvotérmicas. La mayoría de los reportes se encuentran en el área de materiales y sus aplicaciones en estado sólido, posiblemente por su baja solubilidad en agua y disolventes orgánicos.

Demoro reportó complejos derivados de Ris con fórmula general $[M(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ donde $M = \text{Zn(II)}, \text{Ni(II)}, \text{Cu(II)}$ y Co(II) .⁷⁶

Adicionalmente se han informado complejos con los bisfosfonatos alendronato (Ale) y pamidronato (Pam) con fórmula general $[M_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con $M = \text{Cu}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II})$ y $\text{Ni}(\text{II})$, el complejo polimérico $([\text{CuPam}] \cdot \text{H}_2\text{O})_n$ y monoméricos $[\text{M}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ donde $M = \text{Co}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II})$ y $\text{Ni}(\text{II})$.⁷⁷ También han sintetizado complejos de transición con ibandronato (Iba) y los metales $\text{Co}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II})$ y $\text{Ni}(\text{II})$.⁷⁸

Otero informó la síntesis de compuestos de $\text{Pd}(\text{II})$, Ale/Pam y los intercaladores 1,10-fenantrolina/2,2-bipiridina con fórmula general $[\text{Pd}(\text{BisF})_2(\text{NN})] \cdot 2\text{NaCl} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ donde BisF es alguno de los bisfosfonatos Ale o Pam y alguno de los ligantes intercaladores N^-N .⁷⁹

2.6.2 Selección del centro metálico.

Se utilizó $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como fuente de $\text{Cu}(\text{II})$ y Cl^- .

El $\text{Cu}(\text{II})$ es un metal que se encuentra en trazas en una gran variedad de seres vivos y por lo tanto se encuentra involucrado en múltiples procesos bioquímicos. La disponibilidad/costo de fuentes de $\text{Cu}(\text{II})$ es una ventaja sobre metales más caros como $\text{Pd}(\text{II})$ o $\text{Pt}(\text{II})$ en el desarrollo de metalofármacos.^{80, 81}

2.6.3 Selección de ligantes auxiliares y contraión.

La sal de cloruro de $\text{Cu}(\text{II})$ presenta menos toxicidad⁸¹ que otras sales de cloruro metálicas ($\text{Pd}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Pt}(\text{IV}), \text{Zn}(\text{II}),$ etc), aunado a eso el anión cloruro puede ejercer un efecto positivo respecto a la solubilidad en H_2O como lo ilustran los compuestos informados por Demoro con fórmula general $[\text{Ru}_2^{\text{II}}(\text{p-cimeno})_2(\text{TS}_2)_2]^{2+}$ con contraiones PF_6^- y Cl^- y $\text{TS}_2 =$ tiosemicarbazona, en donde el complejo con cloruro como anión mostró mayor solubilidad y una actividad 17 veces mayor al compuesto con hexafluorofosfato.^{82, 83}

Los ligantes derivados de la biperidina muestran potencial comportamiento intercalador de ADN como lo muestra la sección 2.5, en ese sentido se decidió utilizar los isómeros metilados 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina (4,4'-dmbp) y 5,5'-dimetil-2,2'-biperidina (5,5'-dmbp) como ligantes intercalantes. La Figura 2.10 muestra sus estructuras químicas. Se espera que la inclusión de los ligantes biperidina genere un efecto anti tumoral en los compuestos sintetizados.

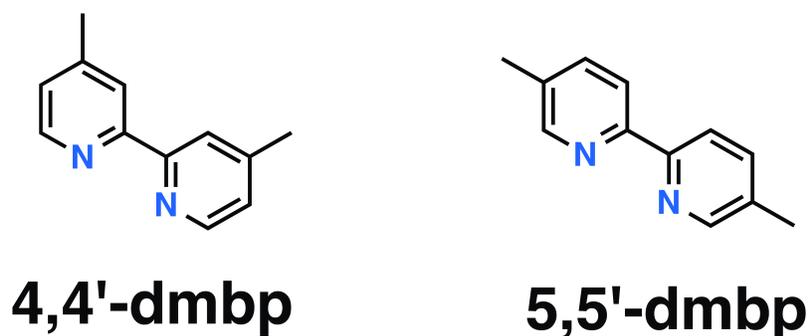


Figura 2.10. Ligantes con potencial intercalador utilizados en este trabajo: 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina (4,4'-dmbp) y 5,5'-dimetil-2,2'-biperidina (5,5'-dmbp). Ambos son sólidos cristalinos muy poco solubles en H₂O y solubles ligeramente en MeOH, EtOH. Sus puntos de fusión son: 4,4'-dmbp = (170-174) °C y 5,5'-dmbp = (114-117) °C

3. Hipótesis.

Nuevos complejos de Cu(II) solubles y estables en agua con actividad antiparasitaria y toxicidad moderada pueden ser directamente sintetizados por la reacción entre complejos del tipo $[\text{Cu}(\text{dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})\text{Cl}_2]$ con fármacos comerciales derivados de aniones bisfosfonatos (Ris y Zol).

4. Objetivos generales y particulares.

El **objetivo general** es la síntesis química de dos compuestos de coordinación con fórmula $[\text{Cu}(\text{bipy})]\text{Cl}_2$ (bipy= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina o 5,5'-dimetil-bipiridina) y la determinación de sus constantes de asociación aparentes con dos fármacos comerciales aniónicos derivados de bisfosfonato (Ris o Zol) en medios acuosos neutros. Adicionalmente, se estudiará la actividad citotóxica *in vitro* y antiparasitaria de los complejos ternarios de Cu(II) con los fármacos coordinados.

Objetivos particulares:

- La síntesis química de una serie de compuestos de coordinación de Cu(II) con bupiridinas dimetiladas de fórmula general $[\text{Cu}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$ (bipy= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina o 5,5'-dimetil-bipiridina) que serán usados como precursores para la obtención de compuestos derivados de dos fármacos con fórmula general $[\text{Cu}(\text{bipy})\text{L}]$ (L= Ris o Zol).
- La caracterización espectroscópica (IR-ATR, RPE, MS) de los precursores metálicos $[\text{Cu}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$ y estructural por difracción de rayos-X de monocristal cuando sea factible obtener cristales adecuados

- Determinar la constante de asociación entre los precursores metálicos [Cu(bipy)Cl₂] y sales disódicas de los bisfosfonatos Ris y Zol a través de titulaciones espectrofotométricas en medios acuosos.
- Realizar experimentos de cristalización de los complejos ternarios [Cu(bipy)(L)] con el propósito de obtener cristales adecuados para difracción de rayos-X de monocristal.
- Caracterizar los complejos ternarios [Cu(bipy)(L)] que presentaron la mayor constante de afinidad mediante técnicas espectroscópicas (IR-ATR, RPE) y masas.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos ternarios obtenidos en células sanas (FGH y COS-7) y células cancerígenas (U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1) humanas.
- Realizar en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas los estudios de la actividad antiparasitaria en *T. cruzi* de los nuevos compuestos de coordinación ternarios [Cu(bipy)(L)] sintetizados.

5. Parte experimental.

5.1 Reactivos e Instrumentos.

La Tabla 5.1 enlista los reactivos y disolventes utilizados, estos se utilizaron en el estado en el que fueron adquiridos sin purificación adicional.

Tabla 5.1. Especificaciones de los reactivos utilizados en este trabajo.

Reactivo	Pureza	Marca	Lote
Ácido Zoledrónico (Zol H ₂ O)	91.7 %	Supelco (Merck)	LRAC6596
Risedronato Sodio (NaRis 2.5H ₂ O)	100 %	Supelco (Merck)	LRAD0379
CuCl ₂ 2H ₂ O	99 %	Strem Chemicals	138306-5
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	99 %	Aldrich (Merck)	MKCG4049
5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina	98 %	Aldrich (Merck)	0000154547
Agua destilada	1.5 x10 ⁻⁶ Ω ⁻¹ cm ⁻¹	High Purity Reactivos Analíticos	22C30
NaOH	98.7%	Fermont	601361
Metanol RA	99.8%	Tecsiquim	MTP-03-NS-R
Pirofosfato dibásico	97%	Aldrich (Merck)	SLCF6615
Piridina	99%	Tecsiquim	PIA-01PL-R

La caracterización mediante IR-ATR, MS-ESI, RPE, las mediciones espectroscópicas, la evaluación de citotoxicidad y el trabajo experimental se llevaron a cabo en el Instituto de Química, UNAM. Las evaluaciones en el organismo *T. cruzi* se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

La adquisición de datos experimentales de difracción de rayos X y el refinamiento de estructura para todos los compuestos se llevó a cabo en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS).

Las gráficas fueron realizadas usando el software OriginLab y el conjunto de aplicaciones LibreOffice.

Espectroscopía IR-ATR.

Los espectros de infrarrojo ATR fueron obtenidos en un espectrómetro Thermo Scientific modelo Nicolet iS50 FT-IR, utilizando el periférico ATR iS50. Se utilizó la herramienta desarrollada por Jablonka, Patiny y Smit⁸⁴ como auxiliar en la interpretación de los espectros obtenidos.

Espectrometría de masas ESI +.

Los espectros de masas ESI + se obtuvieron en un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1200 acoplado con un instrumento Bruker modelo Esquire 6000. Los espectros calculados se obtuvieron mediante el software Molecular Weight Calculator.

Resonancia paramagnética de electrón.

Los espectros de RPE se obtuvieron en un espectrómetro JEOL modelo JES-TE300 con campo magnético de 1.4 T y con radiación correspondiente a la banda X. Las mediciones se realizaron a 77 K en disoluciones de H₂O.

Difracción de Rayos X.

Los datos para los cristales **CuIA**, **CuIB** y **CuIA-Ris** fueron colectados en un difractómetro Bruker APEX II CCD a 100 K usando radiación de Mo-K α ($k= 0.71073 \text{ \AA}$) de micro fuentes Incoatec ImuS y monocromador con óptica Helios. Los cristales adecuados para los análisis fueron separados y seleccionados en aceite de hidrocarburos de alto peso molecular (PARATONE) y posteriormente pegados con resina epóxica sobre una fibra de vidrio o sobre un loop de nylon y colocados en el goniómetro. Las estructuras fueron resueltas usando métodos directos (SHELXS-97) y refinadas por mínimos cuadrados en F² usando shelXle GUI. Los átomos de hidrógeno de los enlaces C-H para los cristales **CuIA** y **CuIA-Ris**

fueron colocados en posiciones idealizadas mientras que los átomos de hidrógeno de los enlaces O-H, N-H fueron localizados del mapa de densidad electrónica y sus posiciones fueron refinadas isotrópicamente U_{iso} con dependencia al átomo directamente unido usando adicionalmente restricciones de distancia. Los grupos desordenados fueron refinados usando restricciones de geometría y distancia (SAME, SADI) junto con restricciones de los valores U_{ij} (SIMU, RIGU) implementados en SHELXL. Las ocupaciones fueron restringidas a valores unitarios.. Las imágenes cristalográficas fueron creadas con Olex2 y Mercury.

Espectroscopía UV-Vis.

Las titulaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis de marca Agilent modelo Cary 100, el cual cuenta con una resolución de 2 nm con precisión de longitud de onda menor a ± 0.5 nm y precisión fotométrica menor a ± 0.005 A. Se utilizaron celdas de cuarzo con paso óptico de 1 cm y volumen máximo de 3000 μ L.

5.2 Síntesis de precursores.

El Esquema 5.1 contiene la ruta de síntesis de los complejos **CuIA** y **CuIB**.

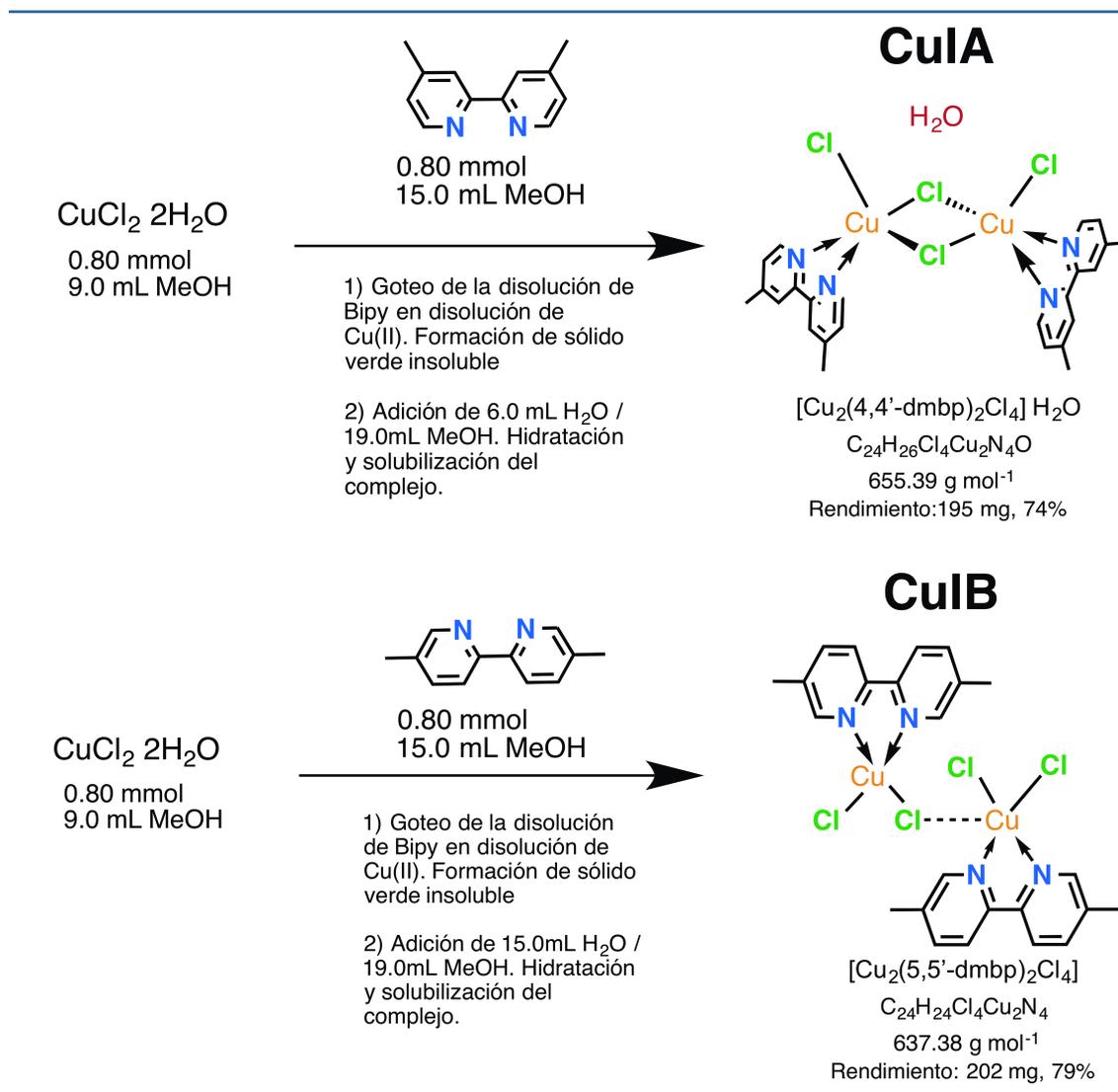
La metodología para ambos compuestos es la siguiente:

Se disolvió la sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (137.40 mg, 0.80 mmol), en 9.0 mL de MeOH dentro de un matraz bola de 50.0 mL y se dejó en agitación durante 30 min. Por separado se disuelve la bipyridina dimetilada (148.60 mg, 0.80 mmol) en 15.0 mL de MeOH y se colocó la disolución en un embudo de adición.

Se goteó la disolución de bipyridina a la disolución de CuCl_2 durante un periodo de 30 min. Inmediatamente se formó un sólido verde. Posteriormente se adicionó una disolución MeOH/ H_2O (19.0/6.0 v/v MeOH/ H_2O para **CuIA** y 19.0/15.0 v/v MeOH/ H_2O para **CuIB** hasta disolver los complejos.

La mezcla de reacción se agitó durante 60 min. Posteriormente se filtró la disolución a través de papel filtro de poro fino (Whatman) y se colectó en un vaso de precipitado. El filtrado fue evaporado a temperatura ambiente y se obtuvieron sólidos cristalinos de

color verde (ver Figura 5.1) adecuados para difracción de rayos-X (se obtuvieron cristales adecuados en aproximadamente una semana para **CuIA** y tres semanas para cristales parcialmente adecuados para **CuIB**).



Esquema 5.1. Esquemas de reacción para las síntesis de los precursores **CuIA** y **CuIB**.

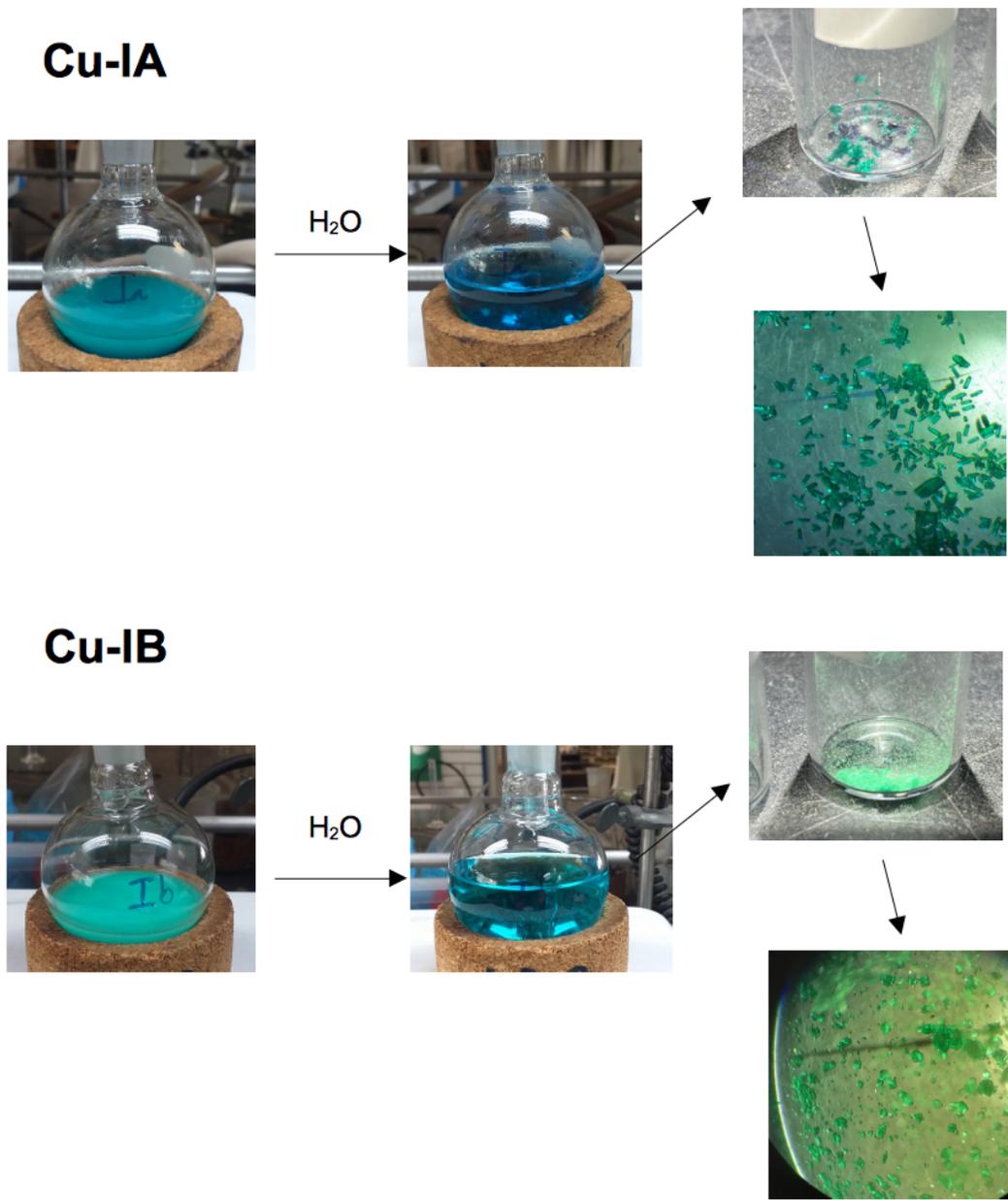


Figura 5.1. Apariencia de los precursores sintetizados. Al inicio se observa la formación de sólidos insolubles con distintas tonalidades de verde dependiendo de la bipyridina utilizada. Al agregar agua al sistema los sólidos se hidratan y se disuelven, formando disoluciones translúcidas. Las imágenes microscópicas corresponden a los cristales que se formaron mediante evaporación lenta de la mezcla de disolventes.

5.3 Caracterización de los precursores.

A continuación, se presentan las señales relevantes de las espectroscopías realizadas (IR-ATR y RPE) y espectrometría para cada precursor sintetizado y se reporta el punto de fusión experimental. Los espectros ATR-IR de las materias primas se muestran en el Anexo 1.

Compuesto CuIA

Punto de fusión. El compuesto se descompone en el intervalo $T_{des}=265-285$ °C

- IR-ATR(cm^{-1}): $\nu(\text{H}_2\text{O})$ 3537(w), $\nu(\text{H}_2\text{O})$ 3479(w), $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{C-N})$ 1612(m), $\gamma(\text{C-H})$ 835(s), $\phi(\text{C-C})$ y $\phi(\text{C-N})$ 515(m), $\nu(\text{Cu-Cl})$ 307(m), $\nu(\text{Cu-N})$ 275(m), $\nu(\text{Cu-Cl})$ 150(m)
- MS-ESI: ESI(+) calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_4]^+$ 600.9 m/z, encontrado 600.8 m/z, calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClCuN}_4]^+$ 466.1 m/z, encontrado 466.1 m/z.
- RPE (77K, H_2O): $g_{\perp}=2.096$, $g_{\parallel}=2.373$, $A_{\parallel}=177.26 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Compuesto CuIB

Punto de fusión. El compuesto muestra descomposición a partir de $T_{des} \geq 300$ °C

- IR-ATR(cm^{-1}): $\nu(\text{C-H})_{\text{CH}_3}$ y $\nu(\text{C-H})_{\text{bipy}}$ 3043(w), $\nu(\text{C-H})_{\text{CH}_3}$, $\nu(\text{C-N})_{\text{bipy}}$ y $\nu(\text{C-H})_{\text{bipy}}$ 1581(w), $\nu(\text{C-N})$ y $\nu(\text{C-H})$ 1473(m), $\gamma(\text{C-H})$ 831(s), $\nu(\text{Cu-Cl})$ 293(s), $\nu(\text{Cu-N})$ 271(s), $\nu(\text{Cu-Cl})$ 174(s)
- MS-ESI: ESI(+) calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_4]^+$ 600.9 m/z, encontrado 600.8 m/z, calculado para $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClCuN}_4]^+$ 466.1 m/z, encontrado 466.1 m/z.
- RPE (77K, H_2O): $g_{\perp}=2.070$, $g_{\parallel}=2.371$, $A_{\parallel}=174.34 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

5.4 Titulaciones UV-Vis de los precursores con Ris y Zol.

Se prepararon soluciones stock acuosas de los precursores metálicos y de los fármacos como sales de disódicas con las siguientes concentraciones: **[CuIA]**= 10.25 mM, **[CuIB]**= 10.43 mM y **[Ris]=[Zol]**= 20 mM. En todos los casos se usó agua bidestilada a pH = 7.

Para cada titulación se colocó en una celda de cuarzo 1500 uL de una concentración final 1.0 mM de los precursores. Se adicionaron 13 alícuotas de 12.5 uL cada una de la solución stock del fármaco correspondiente hasta un volumen final de 162.5 uL (relaciones molares precursor:fármaco 1:1 hasta 1:1.95) y se registró el espectro de absorción a temperatura ambiente. Después de cada adición se estabilizó la solución durante 30 segundos con agitación magnética antes de la medición del espectro.

Adicionalmente se realizaron titulaciones espectrofotométricas de los precursores metálicos **CuIA** y **CuIB** con pirofosfato dibásico (stock **[PyroP]**= 17.64) y piridina (stock **[Pyr]**= 20 mM) con el precursor **CuIA** bajo las mismas condiciones de los experimentos con fármacos para investigar el sitio de unión por comparación con los cambios de absorbancia. Esto debido a que la estructura química del fármaco Ris contiene dos potenciales sitios de unión al centro metálico, el fragmento de bisfosfonato y el anillo de piridina.

5.5 Estudios de citotoxicidad.

Se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad de los fármacos libres Ris²⁻, Zol²⁻ y los cuatro compuestos ternarios que estos forman con los precursores sintetizados: **CuIA-Ris**, **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**. Se utilizó el ensayo colorimétrico de Sulforodamina B para determinar el % de inhibición de crecimiento.⁸⁵

Estos estudios se realizaron en células humanas FGH (fibroblastos gingivales) y en seis líneas celulares (U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1) cancerosas humanas. En ambos casos también se estudió la citotoxicidad en la línea COS-7 la cual corresponde a células no cancerosas de riñón de mono. Los estudios en FGH se

realizaron a dos concentraciones de analito (1 μM y 10 μM) mientras que los estudios en líneas celulares cancerosas se realizaron a 5 μM . En todos los casos se utilizó H_2O como vehículo. Se utilizaron disoluciones stock para cada compuesto con las siguientes concentraciones: $[\text{Ris}] = 10\text{mM}$, $[\text{Zol}] = 9.5\text{mM}$, $[\text{CuIA-Ris}] = 10\text{mM}$, $[\text{CuIB-Ris}] = 7.7\text{mM}$, $[\text{CuIA-Zol}] = 9.5\text{mM}$ y $[\text{CuIB-Zol}] = 7.3\text{mM}$.

5.6 Estudios en *T. cruzi*.

Se prepararon en H_2O ultrapura (milli-Q®) (1000 μL de muestra, disoluciones stock $[\text{CuIA}] = 15\text{mM}$, $[\text{CuIB}] = 11\text{mM}$, $[\text{Ris}^2] = 30\text{mM}$ y $[\text{Zol}^2] = 30\text{mM}$) y se proporcionaron muestras de los 2 fármacos libres y de los cuatro compuestos ternarios preparados *in-situ* (muestras a 2.1mM) al laboratorio B-114 a cargo de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en donde se llevó a cabo el cultivo de *T. cruzi* y evaluación antiparasitaria.

Cultivo de Tripanosomátidos *in vitro*.

Epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa mexicana Querétaro (TBAR/0000/MX/Querétaro), fueron mantenidos en medio LIT (Becton Dickinson, USA, Cat. 226920) al 10% de suero fetal de bovino (SFB) (Gibco, USA, Cat. 15575309) y 25 mg/mL de hemina (Sigma, USA, Cat. H9039), a 28°C como se ha descrito por Rodríguez-Hernández *et al.*⁸⁶ Los parásitos fueron resemebrados semanalmente y para los ensayos se emplearon cultivos en fase logarítmica de crecimiento (5 días, 40-60x10⁶/mL).

Evaluación de CuIA-Ris y CuIB-Ris sobre el crecimiento de *T. cruzi* Qro.

Para evaluar el efecto de ambos compuestos sobre el crecimiento de *T. cruzi* Qro los parásitos fueron ajustados a 2 $\times 10^6$ parásitos en 200 mL por pozo en placas de 96 pozos. Se adicionó NaRis o **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** en concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0 μM , empleando como control positivo Benznidazol (Bz, 100 μM). Se incubaron a 28 °C durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo se contó el número de parásitos presentes en cada condición mediante una cámara de Neubauer y un microscopio Microstar IV (Reichert, USA). Cada condición se evaluó por duplicado en tres experimentos independientes.

6. Resultados.

6.1 Discusión de la caracterización espectroscópica y estructural.

Compuesto **CuIA**

IR-ATR

Se observa (Figura 6.1) que las bandas asociadas a las vibraciones de la biperidina^{87a-88} sufren desplazamientos a mayor frecuencia debido a su coordinación al centro metálico adquiriendo mayor rigidez al estabilizarse por el efecto quelato. Adicionalmente se observan dos bandas en el intervalo 3400-3600 cm^{-1} las cuales se asocian a vibraciones de la molécula de H_2O que forma parte de la red cristalina formada principalmente por el compuesto **CuIA**. La Tabla 6.1 resume estos desplazamientos.

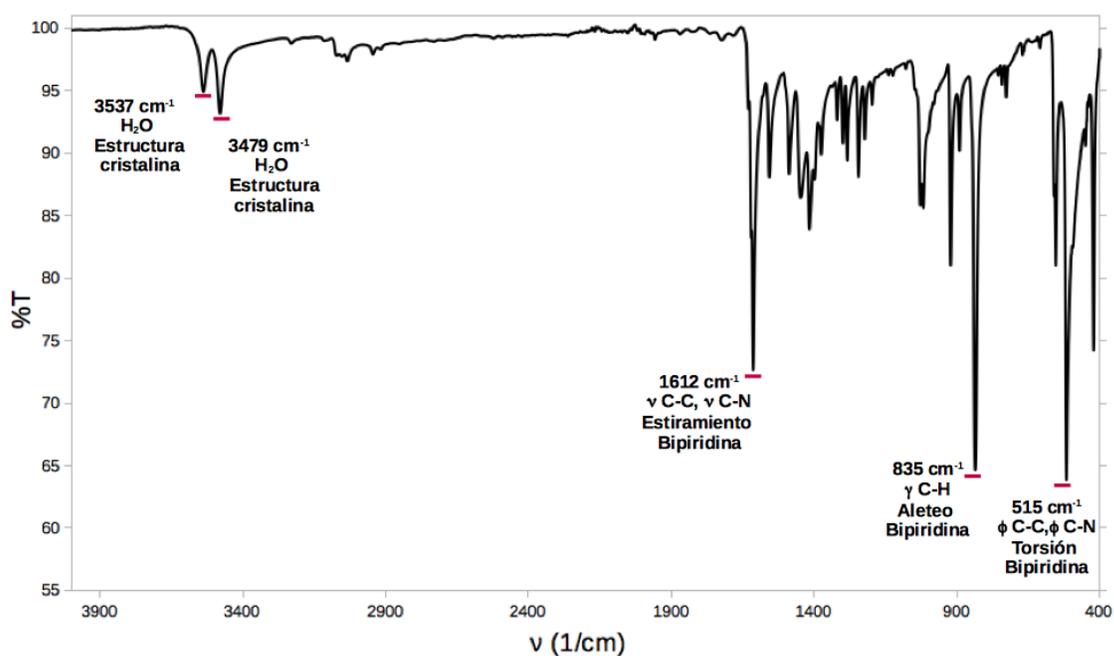


Figura 6.1. Espectro infrarrojo ATR adquirido del sólido cristalino **CuIA**.

Tabla 6.1. Desplazamientos de las bandas asociadas al ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina en el compuesto **CuIA**.

Asignación	4,4'-dmbp ν (cm^{-1})	CuIA ν (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
Estiramiento $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-N})$ núcleo bipiridina.	1590	1612	+22
Aleteo fuera de plano $\gamma(\text{C-H})$ Bipiridina	821	835	+11
Torsión $\phi(\text{C-C})$, $\phi(\text{C-N})$ núcleo bipiridina.	513	515	+3

La Figura 6.2 muestra una gráfica de los espectros ATR/IR-Lejano apilados de la materia prima $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y del compuesto **CuIA**. En el caso de la sal binaria de Cu(II) se observa una banda a 241 cm^{-1} que se atribuye a la vibración Cu-OH_2 .⁸⁹ También se observan dos bandas en 293 cm^{-1} y 171 cm^{-1} asociadas a las vibraciones $\nu(\text{Cu-Cl})$ que para **CuIA** se desplazan a 307 cm^{-1} y 150 cm^{-1} , respectivamente. Adicionalmente para **CuIA** se observa una banda, en 275 cm^{-1} que corresponde a la vibración $\nu(\text{Cu-N})$ ^{87a-88} la cual concuerda con el intervalo reportado⁹⁰ entre 240 cm^{-1} y 290 cm^{-1} para el estiramiento simétrico del enlace Cu-N .

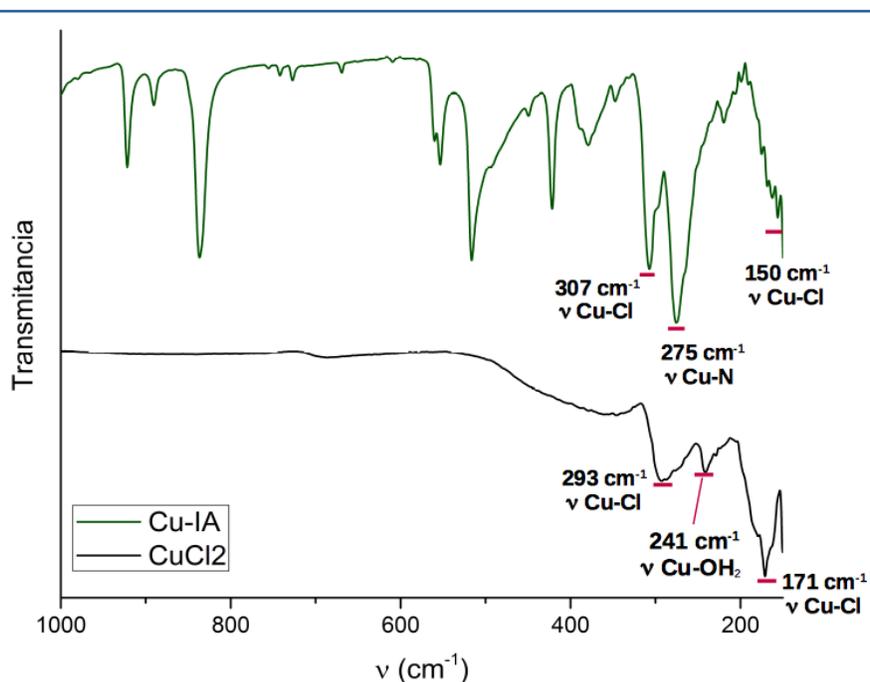


Figura 6.2. Espectros ATR apilados de la materia prima $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y del precursor **CuIA** en la región IR-Lejano

MS-ESI

En el espectro de masas-ESI(+), Figura 6.3, se observan dos picos que caracterizan el complejo **CuIA**: el ion molecular $[M-Cl]^+$ se encuentra en $m/z = 600.8$ que corresponde al catión $[Cu_2(4,4'\text{-dmbp})_2Cl_3]^+$ y el pico base que se encuentra en $m/z = 466.1$. Éste último se atribuye al catión $[C_{24}H_{24}ClCuN_4]^+$ ó $[Cu(4,4'\text{-dmbp})_2Cl]^+$ que proviene de un rearrreglo molecular que genera una especie monomérica de Cu(II) con 2 bipyridinas coordinadas y un cloruro, a juzgar por la distribución isotópica observada.

La Figura 6.4 muestra las expansiones de los picos a 600.8 m/z y 466.1 m/z comparadas con las distribuciones isotópicas calculadas para cada caso.

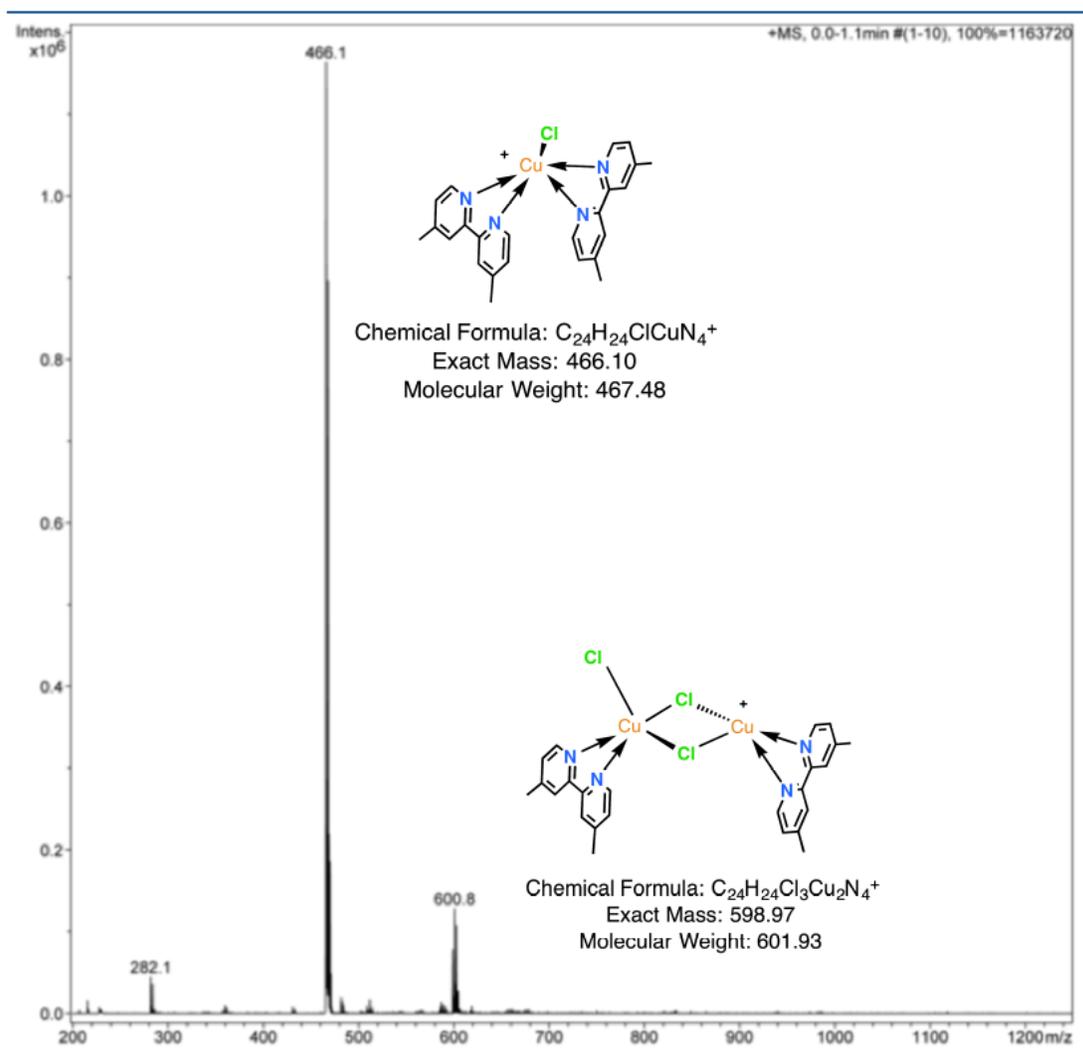


Figura 6.3. Espectro de masas ESI (escaneo positivo) del compuesto **CuIA**. Se observa el ion molecular en 600.8 m/z y el pico base en 466.1 m/z .

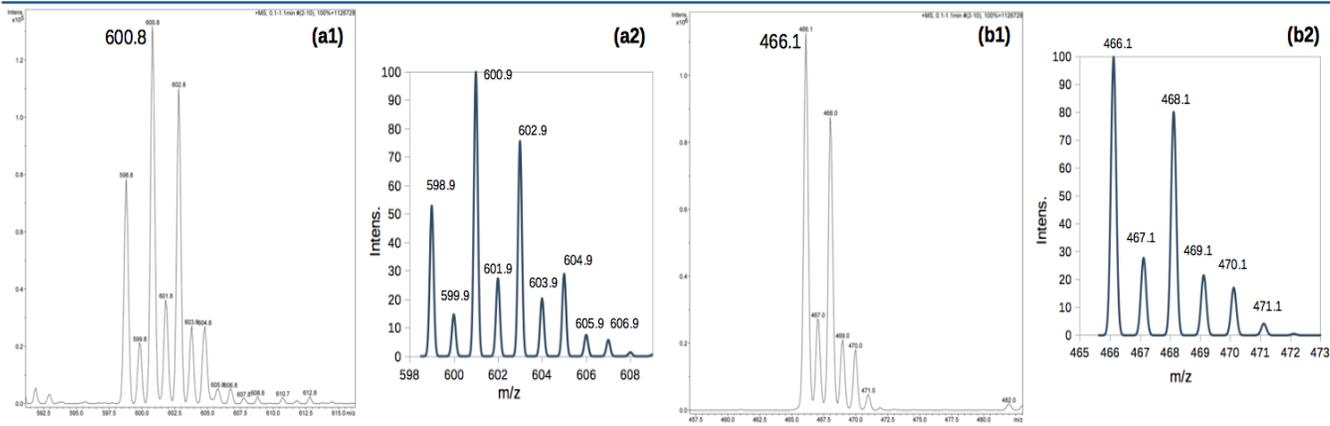


Figura 6.4. Distribuciones isotópicas experimentales **CuIA** y calculadas. Pico 601 m/z: experimental **(a1)**, calculado para $[C_{24}H_{24}Cl_3Cu_2N_4]^+$ **(a2)**. Pico 466 m/z: experimental **(b1)**, calculado para $[C_{24}H_{24}ClCuN_4]^+$ **(b2)**.

RPE

En la Figura 6.5 se observa el espectro de RPE del compuesto **CuIA** en disolución acuosa a 77K. El espectro es del tipo anisotrópico, se muestran en la gráfica los valores de g_{\perp} , g_{\parallel} y A_{\parallel} . Alineado a lo que se observa en la DRX del compuesto **CuIA**, los valores $g_{\parallel} \gg g_{\perp} > g_e$ ($2.373 \gg 2.096 > 2.0023$) concuerdan con la presencia de un electrón desapareado ocupando el orbital $d_{x^2-y^2}$ de un centro metálico de Cu(II) con una geometría de pirámide de base cuadrada.

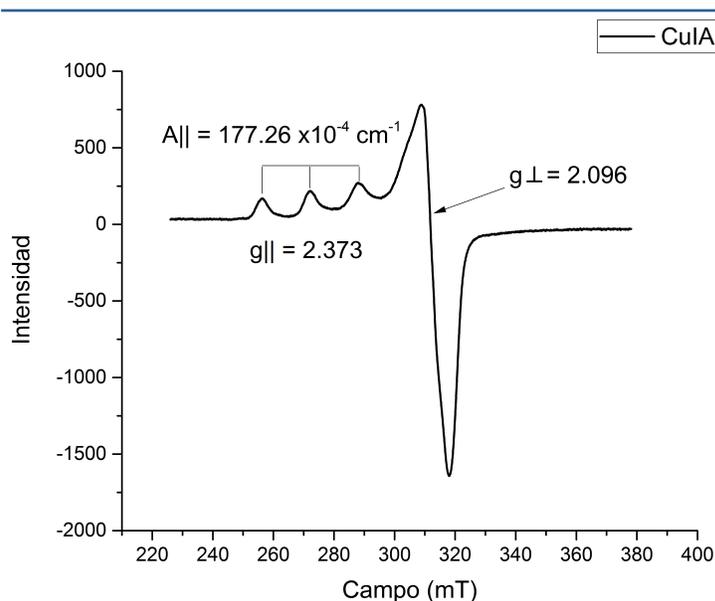


Figura 6.5. Espectro RPE (Banda X, Frecuencia 9.5 Hz) de una disolución 2 mM del compuesto **CuIA** en H_2O a 77K.

La constante de acoplamiento hiperfino que se observa tiene un valor de $177 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, el cual se encuentra dentro del intervalo de valores reportados⁹¹⁻⁹³ para especies de Cu(II) con geometría piramidal de base cuadrada, el valor alto se ve reflejado en que el compuesto está ligeramente distorsionado hacia la geometría bipiramidal trigonal. No se observan señales debidas al acoplamiento superhiperfino entre los átomos de N del ligante y el electrón desapareado del Cu(II). La distancia Cu-Cu (3.564 Å, *vide infra*) y el espectro RPE sugieren que no hay intercambio magnético entre ambos centros de Cu(II) en el arreglo dimérico del compuesto **CuIA**.

DRX

La estructura cristalina del compuesto **CuIA** ya ha sido reportada.⁹⁴ Los datos cristalográficos obtenidos de los cristales de **CuIA** fueron de la calidad adecuada para un análisis estructural para efectos prácticos de este trabajo de tesis, ver Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Datos cristalográficos y de refinamiento de estructura para el compuesto **CuIA**.

Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ Cl ₄ Cu ₂ O	Z	4
MM	655.37 g mol ⁻¹	ρ calc.	1.713 g cm ⁻³
Temperatura	100(2) K	Coefficiente de absorción (μ)	2.121 mm ⁻¹
Sistema cristalino	monoclínico	F(000)	1328.0
Grupo espacial	C2/c	Tamaño cristal	(0.433 × 0.412 × 0.406) mm ³
a	8.9913(8) Å	Intervalos índice	-11 ≤ h ≤ 11, -21 ≤ k ≤ 21, -22 ≤ l ≤ 22
b	16.7243(14) Å	Reflexiones	13783
c	17.0523(15) Å	Reflexiones independientes	2906 [R _{int} = 0.0294, R _{sigma} = 0.0225]
α	90 °	Adecuación del ajuste sobre F²	1.055
β	97.6726(17) °	Indices R finales [I ≥ 2σ (I)]	R1 = 0.0200, wR2 = 0.0527
γ	90 °	Indices R finales [todos los datos]	R1 = 0.0215, wR2 = 0.0535
Volumen	2541.3(4) Å ³		

Se puede observar en la Figura 6.6 que los cloruros terminales enlazados a los átomos de cobre forman un enlace de hidrógeno moderado con una molécula de agua con una distancia $d(\text{Cl-H})$ de 2.417 Å. La estructura consiste de una unidad asimétrica que contiene la estructura monomérica $[\text{Cu}(4,4'\text{-dmbp})\text{Cl}_2] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, las distancias y los ángulos son equivalentes para las dos unidades monoméricas (Tabla 6.3). Utilizando el parámetro τ_5 propuesto por Addison *et al.*⁹⁵ se puede establecer el grado de la geometría de un centro de Cu(II) penta-coordinado, en particular, el compuesto **CuIA** exhibe mayormente una geometría de pirámide de base cuadrada distorsionada con un carácter del 33% de bipirámide trigonal. La Tabla 6.4 muestra los datos utilizados para calcular dicho parámetro.

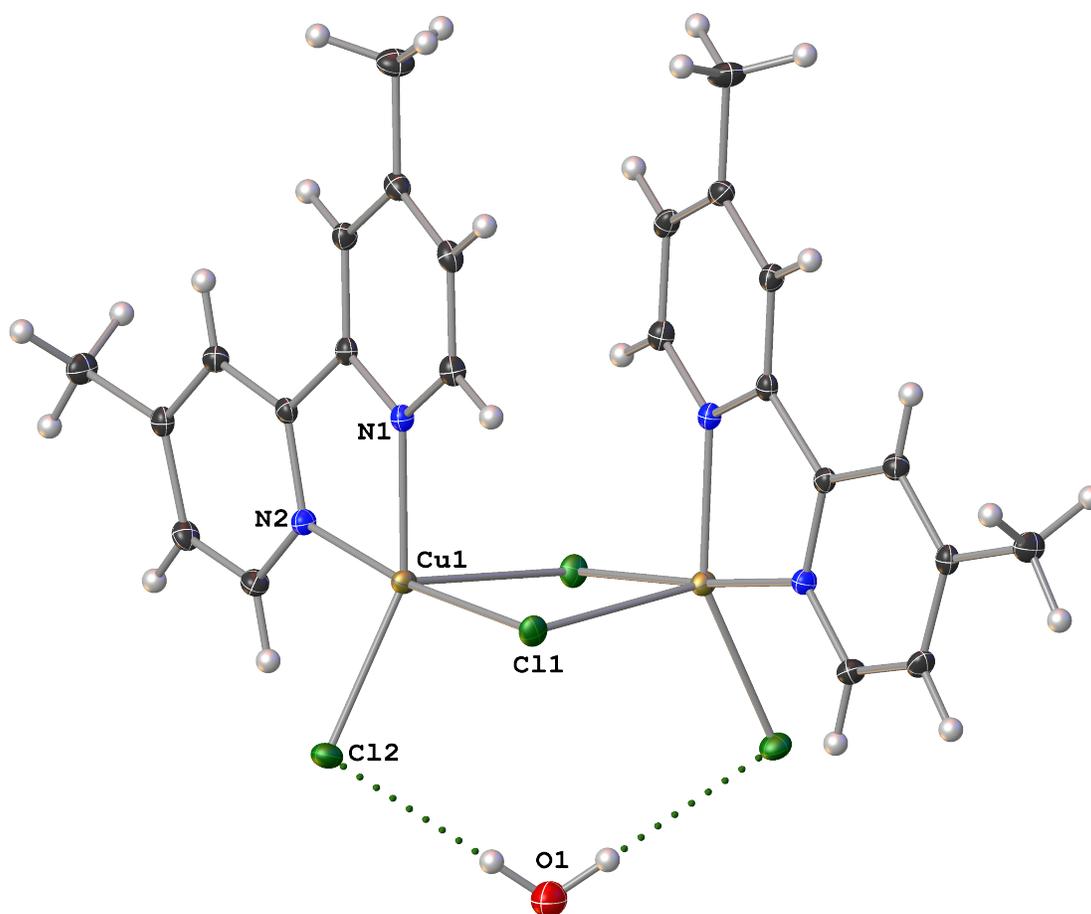
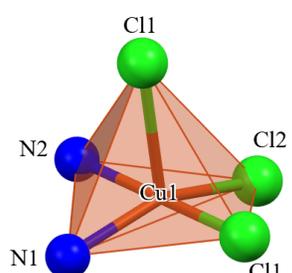


Figura 6.6. Diagrama de elipsoides térmicos correspondiente al compuesto **CuIA**. Temperatura: 100 K, probabilidad: 50%. R(%): 2.

Tabla 6.3. Distancias y ángulos relevantes para el centro metálico del compuesto **CuIA**.

Distancia / Å		Ángulo / °			
Cu1-N1	2.0328(13)	N2-Cu1-N1	80.51(5)	N1-Cu1-Cl1'	97.57(3)
Cu1-N2	2.0039(12)	N2-Cu1-Cl2	93.54(4)	N1-Cu1-Cl1	94.66(3)
Cu1-Cl1	2.2585(4)	N2-Cu1-Cl1'	87.07(4)	Cl2-Cu1-Cl1'	108.721(14)
Cu1-Cl2	2.2768(4)	N2-Cu1-Cl1	172.32(4)	Cl1-Cu1-Cl2	93.438(14)
Cu1-Cl1'	2.7032(4)	N1-Cu1-Cl2	152.76(3)	Cl1-Cu1-Cl1'	87.667(15)

Tabla 6.4. Cálculo del parámetro τ_5 para el compuesto **CuIA**. Se muestra el poliedro formado por el centro metálico y sus átomos donadores.

$\tau_5 = \frac{\beta - \alpha}{60^\circ} \quad \dots(1)$ $\beta > \alpha ;$ $\tau_5 = 0 \rightarrow \text{pirámide cuadrada,}$ $\tau_5 = 1 \rightarrow \text{bipirámide trigonal.}$	Ángulo β: N2-Cu1-Cl1	172.32 °	
	Ángulo α: N1-Cu1-Cl2	152.76 °	
	Valor calculado τ_5	0.33	

Compuesto **CuIB**

IR-ATR:

En el espectro de IR-ATR se observa que las bandas asociadas a las vibraciones de la biperidina sufren desplazamientos a mayor frecuencia y también se vuelven menos intensas, en particular las señales en 1581 cm^{-1} y 1473 cm^{-1} (Figura 6.7). Se observa que la señal en 3043 cm^{-1} , asociada a los estiramientos $\nu(\text{C-H})$ (metilo) y $\nu(\text{C}_6\text{-H})$ (biperidina), aumenta en intensidad y se desplaza a mayor frecuencia. La Tabla 6.5 resume estos desplazamientos. En comparación con **CuIA**, en el espectro del compuesto **CuIB** no se observan las dos bandas en el intervalo $(3400\text{-}3600) \text{ cm}^{-1}$ que se asocian a H_2O de naturaleza cristalina.

La Figura 6.8 muestra los espectros de ATR/IR-Lejano apilados de la materia prima $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y del compuesto **CuIB**. Para **CuIB** se observa una señal en 271 cm^{-1} que

corresponde a la vibración $\nu(\text{Cu-N})$. Mientras que las señales en 293 cm^{-1} y 171 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones $\nu(\text{Cu-Cl})$ que se vuelven más intensas en **CuIB** con respecto a la materia prima.

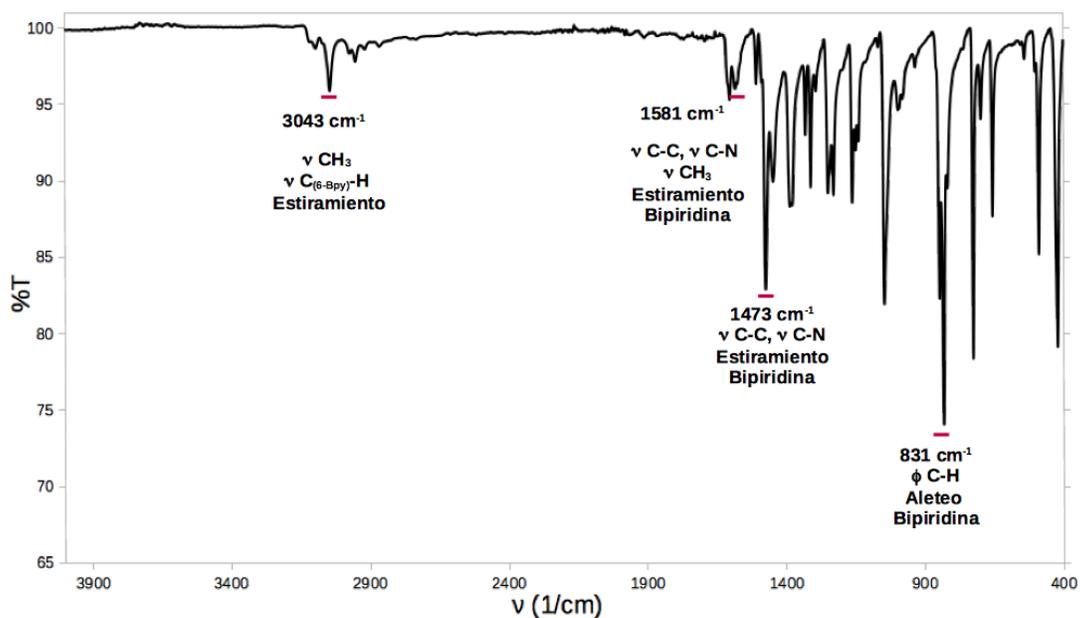


Figura 6.7. Espectro infrarrojo ATR adquirido del sólido microcristalino **CuIB**.

Tabla 6.5. Desplazamientos de las bandas asociadas al ligante 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina en el compuesto **CuIB**.

Asignación	5,5'-dmbp ν (cm^{-1})	CuIB ν (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
Estiramiento $\nu(\text{C-H})$ metilo, $\nu(\text{C-H})$ núcleo bipiridina.	3008	3043	+35
Estiramiento $\nu(\text{C-H})$ metilo, $\nu(\text{C-N})$ y $\nu(\text{C-H})$ núcleo bipiridina.	1552	1581	+29
Estiramiento $\nu(\text{C-N})$ y $\nu(\text{C-H})$ núcleo bipiridina	1466	1473	+7
Aleteo fuera de plano $\gamma(\text{C-H})$ Bipiridina	825	831	+6

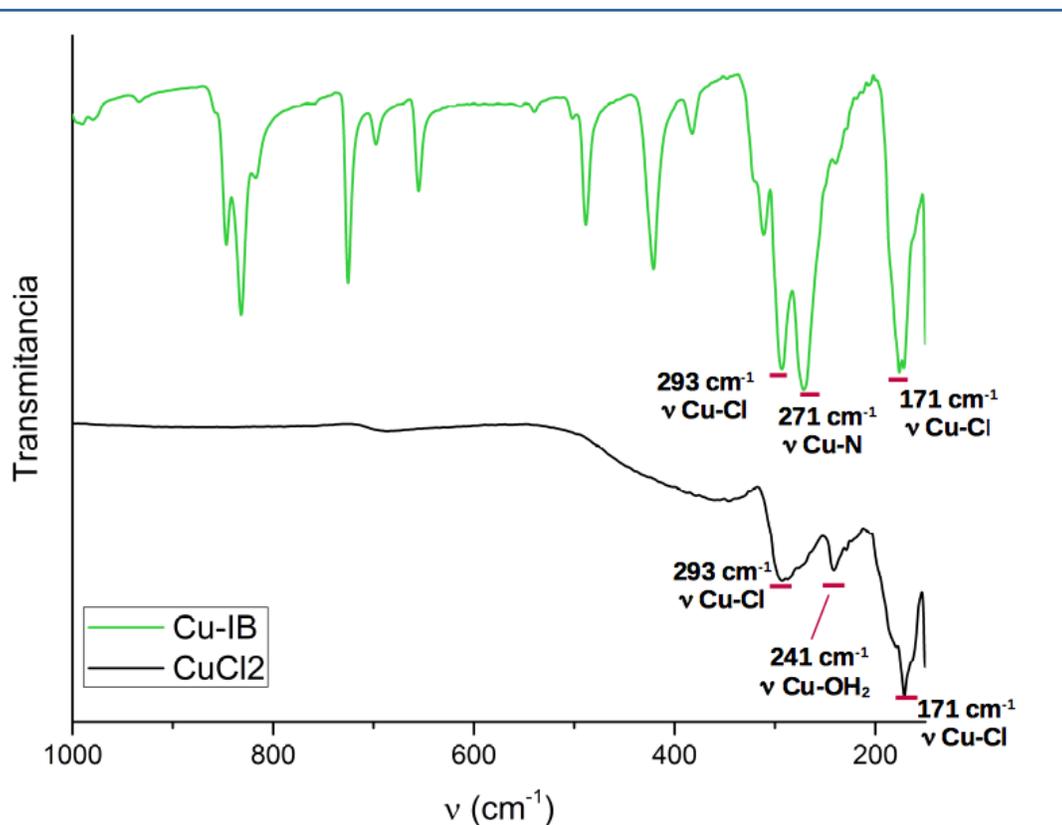


Figura 6.8. Espectros ATR apilados de la materia prima $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y del precursor **CuIB** en la región IR-Lejano.

MS-ESI +

En el espectro de masas-ESI+ para el compuesto **CuIB** (Figura 6.9) se observa un pico detectado en 600.8 m/z que corresponde al ion molecular $[\text{Cu}_2(5,5\text{'-dmbp})_2\text{Cl}_3]^+$ y 466.1 m/z que corresponde al pico base $[\text{Cu}(5,5\text{'-dmbp})_2\text{Cl}]^+$. Los patrones isotópicos experimentales obtenidos para el compuesto **CuIB** ajustan a los patrones calculados, como puede observarse en la Figura 6.10.

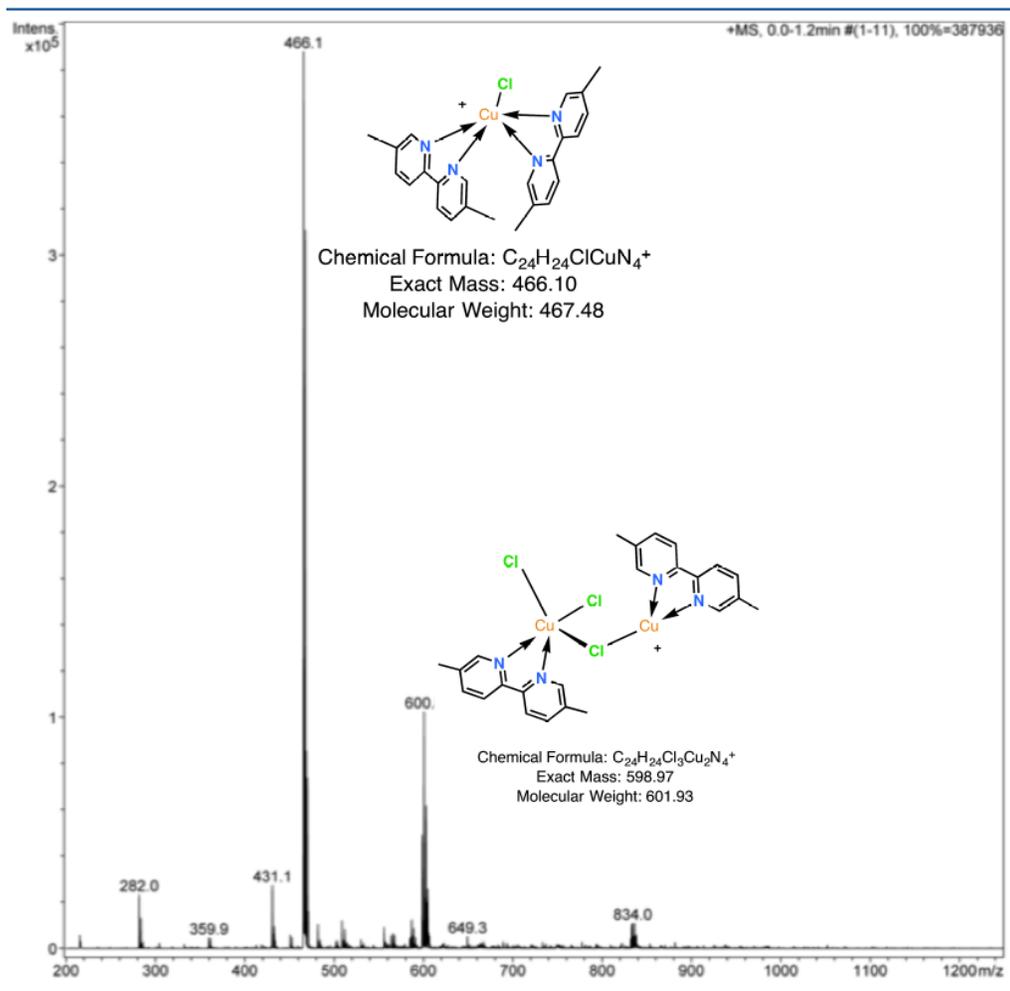


Figura 6.9. Espectro ESI en modo positivo del compuesto **CuIB**. Se observa el ión molecular en 600.8 m/z y el pico base en 466.1 m/z.

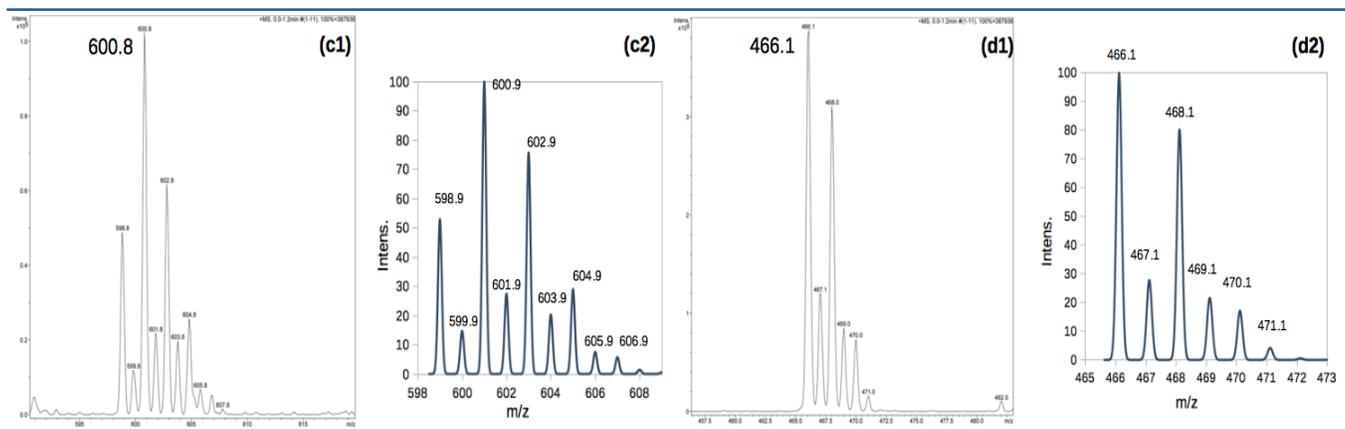


Figura 6.10. Distribuciones isotópicas experimentales **CuIB** y calculadas. Pico 601 m/z: experimental (c1), calculado para $[C_{24}H_{24}Cl_3Cu_2N_4]^+$ (c2). Pico 466 m/z: experimental (d1), calculado para $[C_{24}H_{24}ClCuN_4]^+$ (d2).

RPE

En la Figura 6.11 se observa el espectro RPE del compuesto **CuIB** en disolución acuosa a 77K. De forma análoga al compuesto **CuIA**, el centro metálico de Cu(II) en **CuIB** presenta una geometría de pirámide de base cuadrada ya que $g_{\parallel} > g_{\perp} > g_e$ ($2.371 > 2.070 > 2.0023$) con el electrón desapareado ocupando el orbital $d_{x^2-y^2}$. La constante de acoplamiento hiperfino que se observa tiene un valor de $174 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, el cual es característico para especies de Cu(II) con geometría piramidal de base cuadrada, el valor de A_{\parallel} para el compuesto **CuIB** es ligeramente menor que el valor para **CuIA**. De igual forma que en **CuIA**, no se observan señales debidas al acoplamiento superhiperfino entre los átomos de N del ligante y el electrón desapareado del Cu(II) y solo se distinguen 3 de las 4 señales esperadas para el acoplamiento hiperfino. La distancia Cu-Cu en **CuIB** (3.771 \AA) y el espectro RPE confirman que no hay intercambio magnético entre ambos centros de Cu(II) del compuesto **CuIB**.

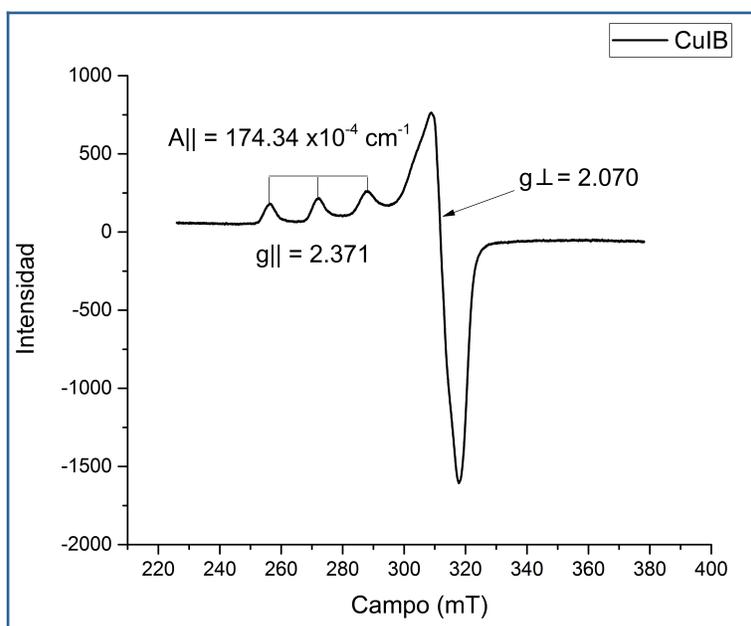


Figura 6.11. Espectro RPE (Banda X, Frecuencia 9.5 Hz) de una disolución 2 mM del compuesto **CuIB** en H_2O a 77K.

DRX

Los datos obtenidos por difracción de rayos X de los cristales de **CuIB** no fueron de la calidad suficiente para refinar una estructura con parámetros cristalográficos

adecuados, debido a que el hábito cristalino de **CuIB** no lo permitió (Tabla 6.6). Sin embargo, en las Figuras 6.12 y 6.13 se muestra el modelo de conexión desarrollado a partir de los datos cristalográficos colectados mediante esta técnica. La Tabla 6.7 muestra las distancias y ángulos relacionadas con el centro metálico Cu2.

Tabla 6.6. Datos cristalográficos obtenidos para el compuesto **CuIB**.

Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₄ Cl ₄ Cu ₂ N ₄	Z	8
MM	637.38 g mol ⁻¹	ρ calc.	1.689 g cm ⁻³
Temperatura	100(2) K	Coefficiente de absorción (μ)	6.426 mm ⁻¹
Sistema cristalino	ortorómbico	F(000)	2384.0
Grupo espacial	Aea2	Tamaño cristal	0.229 × 0.172 × 0.156 mm ³
a	17.6745(11) Å	Intervalos índice	-21 ≤ h ≤ 19, -35 ≤ k ≤ 29, -10 ≤ l ≤ 9
b	30.370(3) Å	Reflexiones	14780
c	8.9870(6) Å	Reflexiones independientes	4278 [R _{int} = 0.0968, R _{sigma} = 0.1175]
α	90 °	Adecuación del ajuste sobre F²	1.544
β	90 °	Índices R finales [I >= 2σ (I)]	R1 = 0.1081, wR2 = 0.2797
γ	90 °	Índices R finales [todos los datos]	R1 = 0.1497, wR2 = 0.3007
Volumen	4824.0(6) Å ³		

Tabla 6.7. Distancias y ángulos relevantes para el centro metálico Cu2 del compuesto **CuIB**.

Distancia / Å		Ángulo / °			
Cu2-N2	2.038(10)	N3-Cu2-N2	77.9(7)	N2-Cu2-Cl2	170.9(4)
Cu2-N3	2.018(18)	N3-Cu2-Cl3	170.7(6)	Cl2-Cu2-Cl3	92.6(2)
Cu2-Cl2	2.258(6)	N3-Cu2-Cl2	94.0(5)		
Cu1-Cl3	2.258(6)	N2-Cu2-Cl3	95.1(4)		

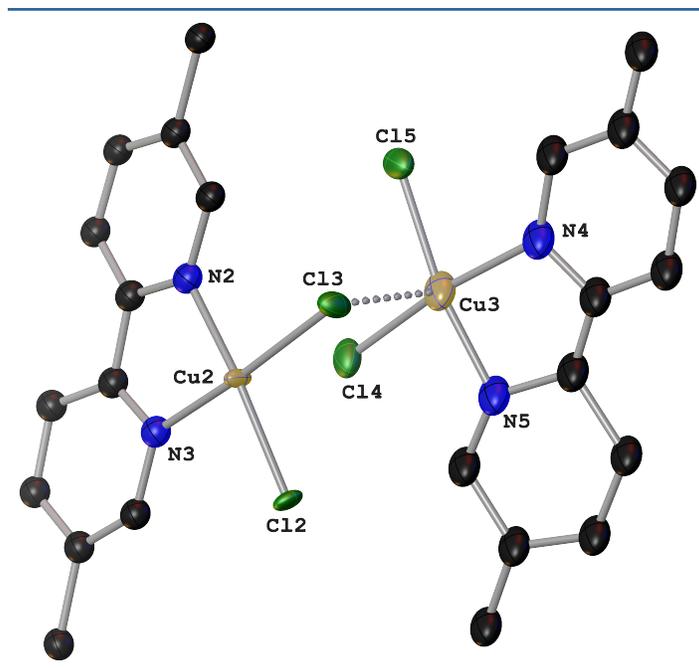


Figura 6.12. Vista simplificada y expandida del diagrama de elipsoides térmicos correspondiente al compuesto **CuIB**. Posiciones de los hidrógenos no refinadas. Temperatura: 100 K, probabilidad: 50%. R(%): 11.

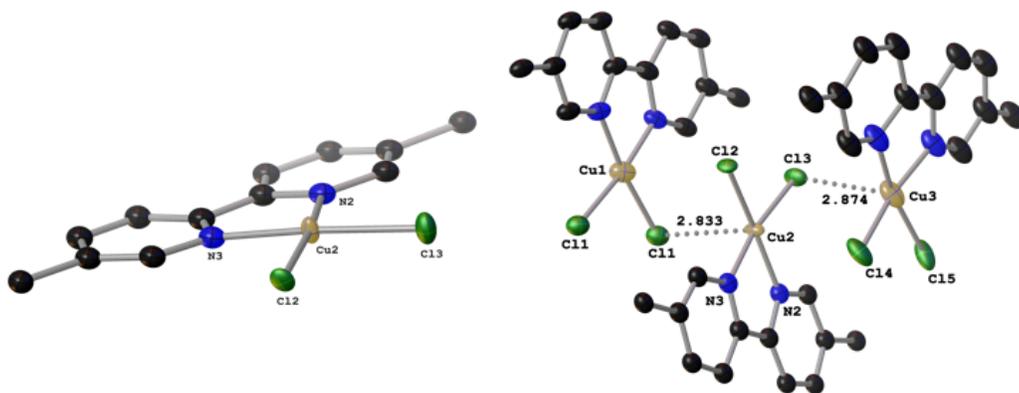


Figura 6.13. Izquierda: Modelo de la estructura del fragmento monomérico central de **CuIB**, se observa que la geometría del Cu(II) es prácticamente cuadrada plana. Derecha: Modelo de conectividad estructural donde un átomo de Cl de cada unidad monomérica interacciona con un centro de Cu(II) para generar una probable red cristalina.

En el modelo trinuclear de la Figura 6.14 se observa que $d(\text{Cu2-C11}) = 2.833\text{\AA}$ y $d(\text{Cu3-C13}) = 2.874\text{\AA}$ para **CuIB** mientras que para **CuIA** las distancias tienen los

valores $d(\text{Cu1-CI1}) = 2.2585(4)\text{\AA}$, $d(\text{Cu1-CI2}) = 2.2768(4)\text{\AA}$ y $d(\text{Cu1-CI1}') = 2.7032(4)\text{\AA}$ (*vide supra*, Figura 6.6 y Tabla 6.3).

Se utilizó el parámetro τ_4' desarrollado por Okuniewski *et al.*⁹⁶ para calcular el grado de planaridad del centro metálico en **CuIB**, la Tabla 6.8 muestra los datos utilizados para el cálculo de τ_4 únicamente para el centro de cobre Cu2. De manera preliminar y de acuerdo al cálculo de $\tau_4 = 0.13$, se deduce que los átomos enlazados al centro de Cu(II) adoptan una simetría D_{4h} en casi un 90% (Figura 6.13, imagen izquierda), sin tomar en consideración posibles interacciones intermoleculares del modelo de conectividad mostrado en las figuras 6.13 y 6.14 imagen derecha.

Tabla 6.8. Cálculo del parámetro τ_4' para el compuesto **CuIB**.

$\tau_5 = \frac{\beta - \alpha}{360^\circ - 109.5^\circ} + \frac{180^\circ - \beta}{180^\circ - 109.5^\circ} \dots (2)$ <p>$\beta > \alpha$; $\tau_4' = 0 \rightarrow$ cuadrada plana, $\tau_4' = 1 \rightarrow$ tetraedro.</p>	Ángulo β: N2-Cu2-CI2	170.9 °
	Ángulo α: N3-Cu2-CI3	170.7 °
	Valor calculado τ_4'	0.13

6.2 Titulaciones UV-Vis.

La Figura 6.14 muestra los espectros de UV-Vis de los complejos en el intervalo de 365 a 900 nm. En general, las soluciones muestran una banda ancha en el visible con máximos de 700 y 707 para **CuIA** y **CuIB**, respectivamente.

Los coeficientes de absorptividad molar fueron calculados como $\epsilon_{\text{CuIA}} = 77.67 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{\text{CuIB}} = 56.80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Estos valores de coeficientes y los máximos pueden ser asignados a transferencia de carga (TC) en combinación con transiciones d-d.

Las constantes de estabilidad entre los complejos **CuIA** y **CuIB** y los fármacos Ris y Zol fueron estimadas por titulaciones espectrofotométricas, siguiendo la banda máxima del visible para el sistema como se observa en las Figuras 6.15-6.18. Para dicha estimación se utilizó el siguiente modelo matemático⁹⁷:

$$A_{obs} = A_{Cu} + \frac{\Delta A_{\infty} \left\{ [Cu]_T + [analito]_T + \frac{1}{K_{1:1}} - \left[\left([Cu]_T + [analito]_T + \frac{1}{K_{1:1}} \right)^2 - [4][Cu]_T [analito]_T \right]^{0.5} \right\}}{2[Cu]_T} \dots(3)$$

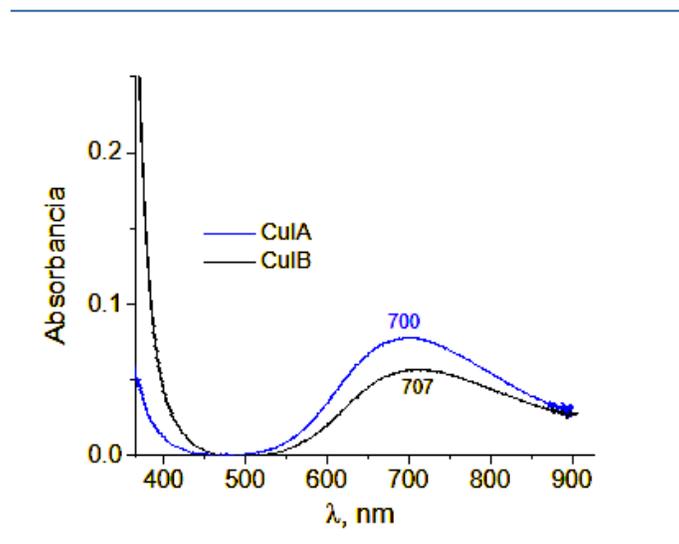


Figura 6.14. Espectros de absorción de **CuIA** y **CuIB** (1.0 mM) en agua pura

En general, la adición de los fármacos a soluciones concentradas de los complejos (1.0 mM) generan un desplazamiento hipsocrómico en un intervalo de 50-60 nm, adicionalmente se observa un aumento de la absorbancia (efecto hiperocrómico) de alrededor del 100% a saturación de los fármacos.

En todos los casos se observan puntos isobéuticos entre 804 y 809 nm, lo cual sugiere que solo dos especies se encuentran en solución (el complejo de Cu(II) libre y su forma complejada con el fármaco correspondiente). Para el caso de la titulación de **CuIA** con Ris^{2-} , el máximo cambio de absorbancia a saturación del fármaco se observó en 625 nm, por lo tanto se utilizó esta longitud de onda tras la adición de Ris^{2-} (0-1.95 mM) para graficar una isoterma de unión como se muestra en la Figura 6.15-B. Los datos de la titulación espectrofotométrica pueden ser bien ajustados a un modelo de unión 1:1 utilizando la ecuación (3): Donde $[Cu]$ es la concentración molar del complejo **CuIA** libre, $[analito]$ corresponde a la concentración del fármaco, ΔA_{∞} es el cambio de absorbancia a saturación y $K_{1:1}$ es el valor de la constante de unión (unidades: M^{-1}) del sistema ternario.

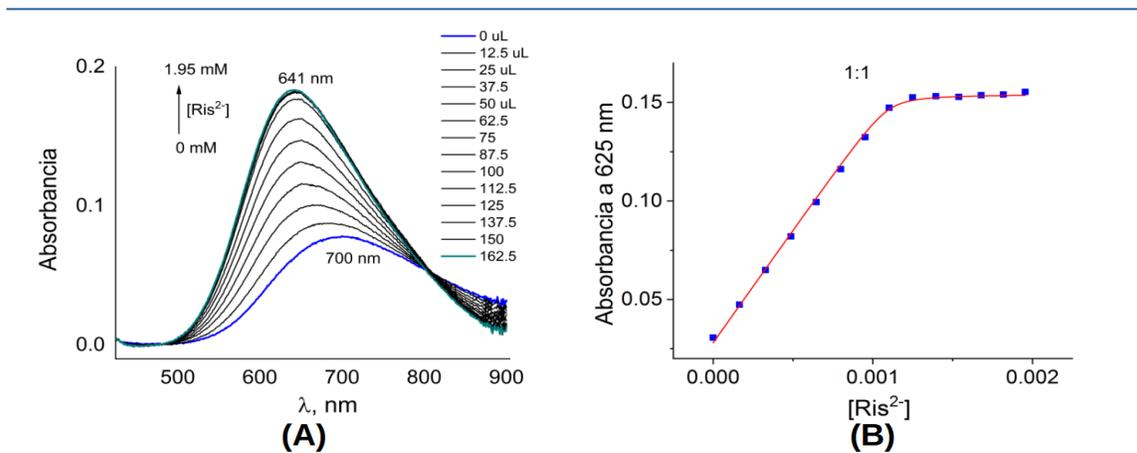


Figura 6.15. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIA** (1.0 mM) con sal disódica de risedronato en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 625 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación (3) para un modelo 1:1.

El valor determinado para el complejo ternario **CuIA-Ris** es $K_{1:1} = 41.1 \pm 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 25°C , este valor indica una estabilidad termodinámica del complejo formado **CuIA-Ris** en un medio acuoso en concentraciones micromolares, i.e. a estas concentraciones el complejo se forma.

Para conocer la afinidad de los dos complejos de Cu(II) sintetizados con los fármacos, se determinaron las constantes de asociación para los 3 sistemas restantes CuIA-Zol, CuIB-Ris y CuIB-Zol bajo las mismas condiciones. La familia de espectros de UV-Vis generados por adición de los fármacos y los perfiles de cada titulación se muestran en las Figuras 6.16-6.18.

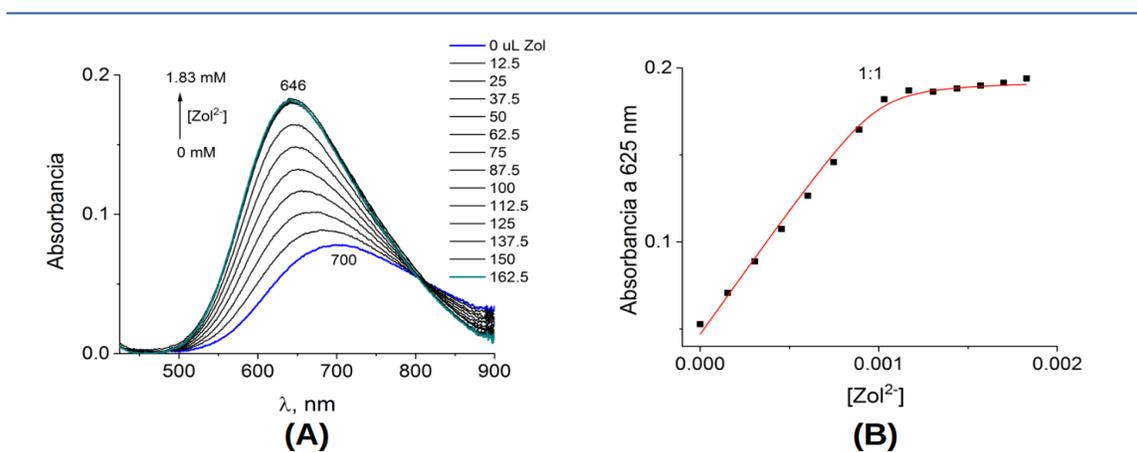


Figura 6.16. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIA** (1.0 mM) con sal disódica de zolendronato en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 625 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación (3) para un modelo 1:1.

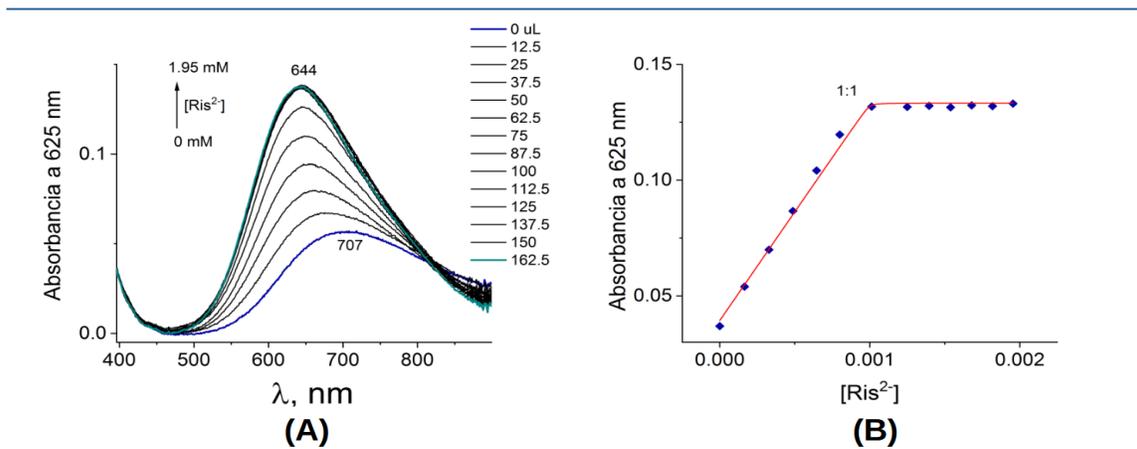


Figura 6.17. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIB** (1.0 mM) con sal disódica de risedronato en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 625 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación 3 para un modelo 1:1.

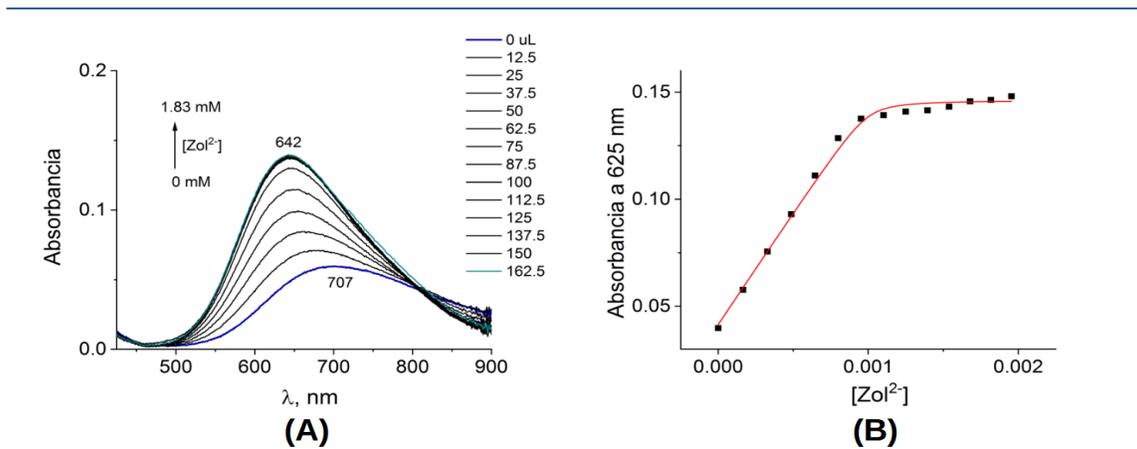


Figura 6.18. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIB** (1.0 mM) con sal disódica de zoledronato en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 625 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación (3) para un modelo 1:1.

Los perfiles ajustaron bien (error < 10%) utilizando un modelo 1:1, las constantes de unión y los cambios de absorción (A_F/A_0) son compilados en la Tabla 6.9. Para ambos complejos de Cu(II), la afinidad es mayor hacia el fármaco Ris^{2-} comparado con el Zol^{2-} . Entre los sistemas estudiados la mayor afinidad y cambio espectroscópico fue determinado para el complejo **CuIA-Ris**.

Respecto a las titulaciones con Pyr y PyroP, Figuras 6.19-6.20, se observa que entre estos dos analitos el mayor cambio de absorbancia y similar (hipsócronico e hiperacrómico) fue observado con el PyroP. Por comparación con la titulación con Ris el modo de unión es favorecido a través del bisfosfonato. En contraste, el cambio con piridina fue modesto. Adicionalmente, el PyroP es dos órdenes de magnitud mayor que la piridina como se muestra en la Tabla 6.9.

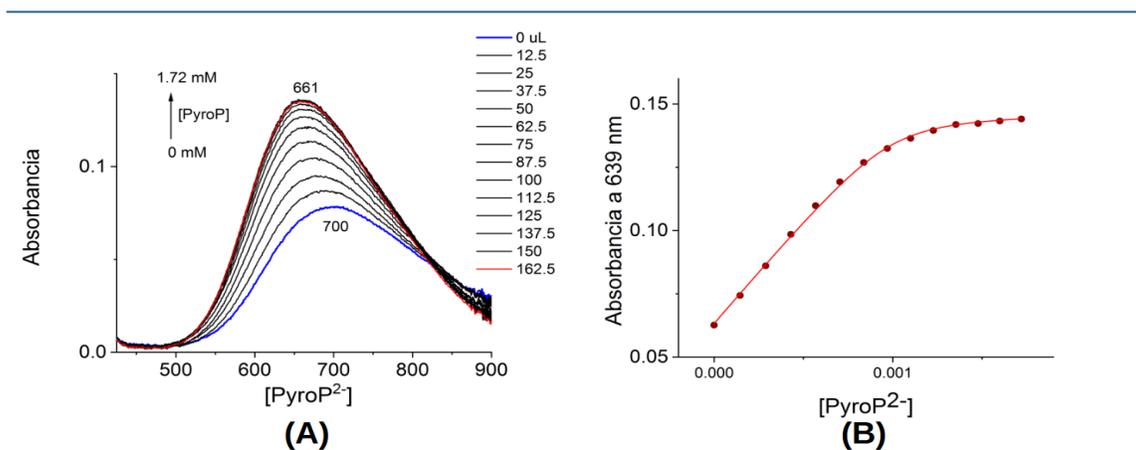


Figura 6.19. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIA** (1.0 mM) con sal disódica de pirofosfato en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 639 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación (3) para un modelo 1:1.

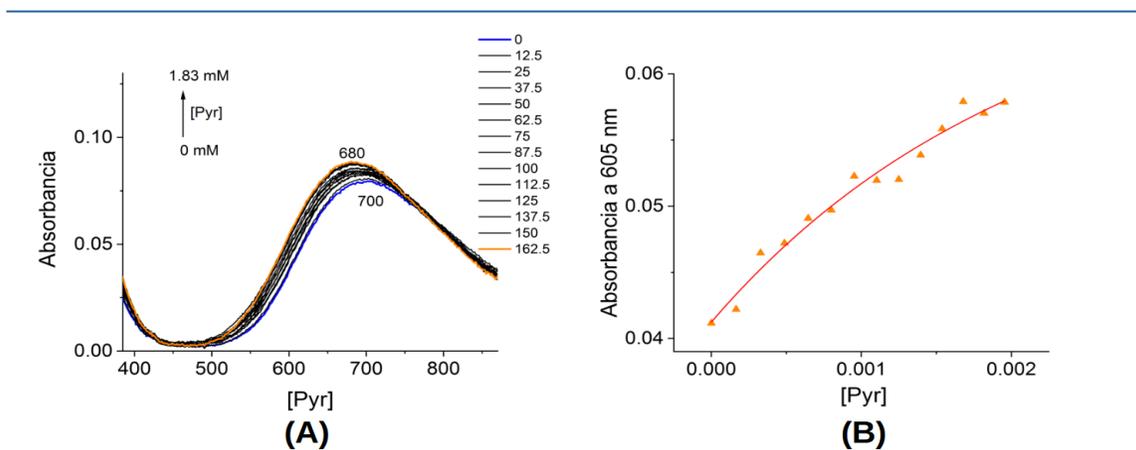


Figura 6.20. A) Titulación espectrofotométrica de **CuIA** (1.0 mM) con piridina en agua neutra. La flecha muestra la dirección del cambio espectral. B) Perfil de la titulación espectrofotométrica a 639 nm. La línea sólida corresponde al ajuste utilizando la ecuación 1 para un modelo 1:1. Se observa que no se alcanza el punto de saturación (B).

Tabla 6.9. Constantes de asociación (M^{-1}) en agua de los complejos **CuIA** y **CuIB** con los bisfosfonatos Ris y Zol, pirofosfato dibásico y con piridina. ^a Indica el parámetro de selectividad relativa en la presencia del analito donde A_F es la absorbancia a saturación y A_0 es la absorbancia inicial. ^b Datos no calculados

Fármaco	CuIA $K \times 10^4 (M^{-1})$	A_F/A_0 ^a a 625 nm	CuIB $K \times 10^4 (M^{-1})$	A_F/A_0 ^a a 625 nm
Na ₂ Ris	41.10 ± 1.00	4.58	38.20 ± 0.15	3.70
Na ₂ Zol	6.40 ± 0.30	3.32	16.10 ± 0.15	3.36
Na ₂ PyroP	3.80 ± 0.40	2.09	- ^b	- ^b
Pyr	0.06 ± 0.01	1.39	- ^b	- ^b

Los equilibrios químicos del complejo **CuIA** con Ris⁻², PyroP y Pyr se muestran en la Figura 6.21. La Figura 6.22 muestra una comparación de los espectros del sistema **[CuIA + Ris]** obtenido de la titulación y del obtenido directamente de una solución acuosa del cristal aislado **CuIA-Ris**. Estos dos espectros son prácticamente iguales, lo cual confirma que la estructura química del complejo ternario formado *in-situ* por la titulación espectrofotométrica corresponde a la estructura química observada en la estructura cristalina de complejo **CuIA-Ris**. Finalmente, se realizó una cinética de la absorción de los complejos ternarios **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** formados *in-situ* durante 210 minutos, como se puede observar en la Figura 6.22-B, ambos complejos tienen hidroestabilidad.

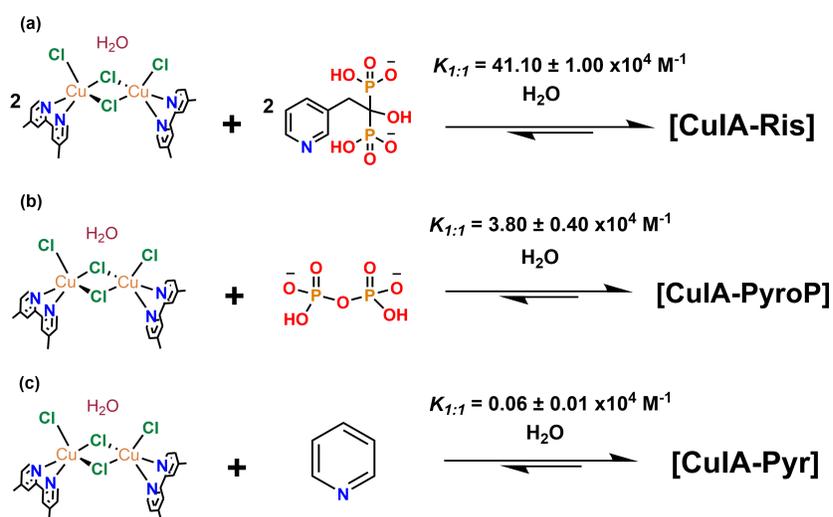


Figura 6.21. Equilibrios químicos del complejo **CuIA** con risedronato (a), pirofosfato (b) y piridina (c) en medios acuosos indicando su constante de asociación.

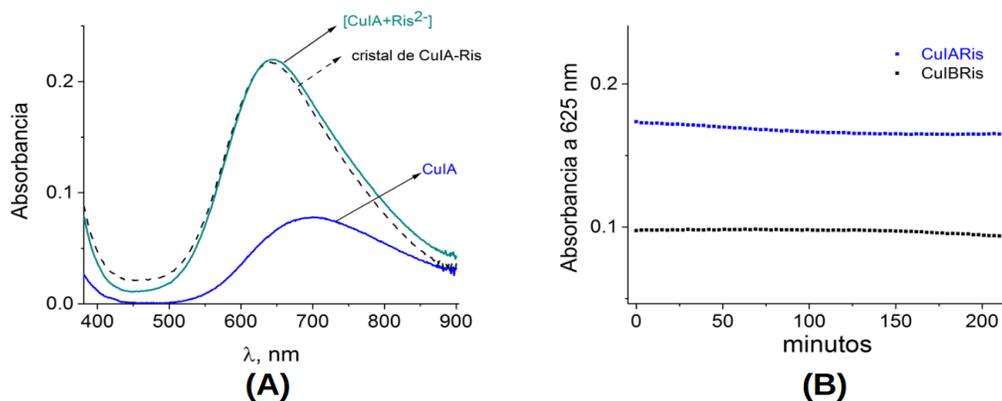


Figura 6.22. A) Espectros de UV-Vis del complejo **CuIA** libre, en presencia del fármaco Ris^{2-} y del cristal **CuIA-Ris** en agua. B) Cinética de los espectros de UV-Vis de los complejos ternarios **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** en agua.

6.3 Caracterización compuestos ternarios.

Se obtuvieron 4 compuestos ternarios, tanto formados *in-situ* en disolución acuosa (Figura 6.23-(a)) como de manera preparativa y aislados en sus formas sólidas cristalinas (Figura 6.23(b-c)). Se presenta la caracterización del compuesto ternario CuIA-Ris mediante técnicas espectroscópicas (IR-ATR, MS-ESI) y estructural (DRX). La caracterización del resto de los compuestos ternarios, la RPE de CuIA-Ris y la síntesis general, se muestran en el Anexo 2.

Los cuatro compuestos ternarios son de color azul a simple vista, con distintas tonalidades: azul rey para **CuIA-Ris**, azul turquesa para **CuIB-Ris**, azul aqua para **CuIA-Zol** y azul turquesa para **CuIB-Zol**. Se identificaron los compuestos aislados mediante punto de fusión (descomposición), ver Tabla 6.10. Se obtuvieron cristales aptos para DRX del compuesto **CuIA-Ris** por evaporación lenta. Para los otros tres compuestos, la obtención de cristales adecuados para DRX no se logró al momento de la escritura del presente documento.

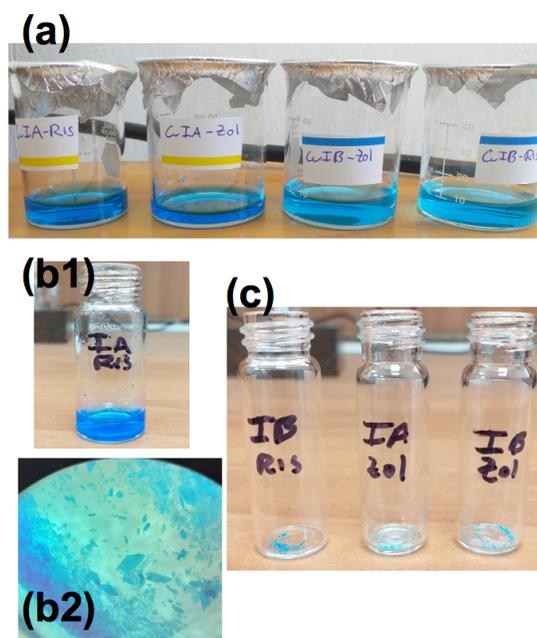


Figura 6.23. (a) Disoluciones concentradas de los cuatro complejos ternarios, de izquierda a derecha: **CuIA-Ris**, **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**. (b1) Muestra de **CuIA-Ris** con cristales aptos para DRX, (b2) Fotografía microscópica de los cristales de **CuIA-Ris**. (c) Muestras de los sólidos cristalinos correspondientes a los otros tres complejos ternarios, de izquierda a derecha: **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**.

Tabla 6.10. Puntos de fusión experimentales de los cuatro complejos ternarios obtenidos.

Compuesto	Punto de fusión
CuIA-Ris	$T_{\text{desIA-Ris}} = (230-234) \text{ } ^\circ\text{C}$
CuIB-Ris	$T_{\text{desIB-Ris}} = (210-220) \text{ } ^\circ\text{C}$
CuIA-Zol	$T_{\text{desIA-Zol}} = (221-236) \text{ } ^\circ\text{C}$
CuIB-Zol	$T_{\text{desIB-Zol}} = (210-230) \text{ } ^\circ\text{C}$

El espectro IR-ATR del compuesto **CuIA-Ris** muestra (Figura 6.24) las bandas relacionadas a la 4,4'-dmbp coordinada al centro de Cu(II), se destaca la presencia de la característica señal en 1615 cm^{-1} la cual se debe al núcleo de bipyridina $\nu(\text{C-C})$ y $\nu(\text{C-H})$ (1612 cm^{-1} en **CuIA**); la banda debida a la vibración de aleteo fuera de plano de bipyridina $\gamma(\text{C-H})$ originalmente localizada en 835 cm^{-1} en **CuIA** y que en **CuIA-Ris** se ha desdoblado en dos señales localizadas en 834 cm^{-1} y 810 cm^{-1} . La banda debida

a la vibración $\phi(\text{C-C})$ y $\phi(\text{C-N})$ del núcleo de bipyridina localizada en 513 cm^{-1} en **CuIA-Ris** (515 cm^{-1} en **CuIA**). También se observa que la señal, 3537 cm^{-1} , debida al agua de cristalización en **CuIA** ha desaparecido y en su lugar aparece la típica señal ancha relacionada a múltiples grupos $-\text{OH}$ centrada en $\sim 3370\text{ cm}^{-1}$.

La mayoría de los sobretornos que se observan en **CuIA** en la región entre 1600 cm^{-1} y 2300 cm^{-1} han desaparecido (Figura 6.24) en **CuIA-Ris** y destaca la modificación del espectro, con la aparición de una banda en 1024 cm^{-1} , en la región comprendida entre 900 cm^{-1} y 1215 cm^{-1} (Figura 6.24 y 6.25). Estos cambios se deben a la coordinación del ligante Ris al centro de Cu(II) .

El espectro IR-ATR del NaRis (Anexo 1, Figura A1.2 (c)) muestra bandas debidas al estiramiento P-OH del fragmento O=P-OH en la región comprendida entre 1600 cm^{-1} y 2700 cm^{-1} , en particular se observa una señal bien definida y de baja intensidad en 2136 cm^{-1} asignable a esta vibración. Otro intervalo de importancia en el Ris se encuentra entre 900 cm^{-1} y 1215 cm^{-1} , en donde las señales predominantes son debidas al grupo ácido fosfónico que caracteriza a los bisfosfonatos.⁹⁸

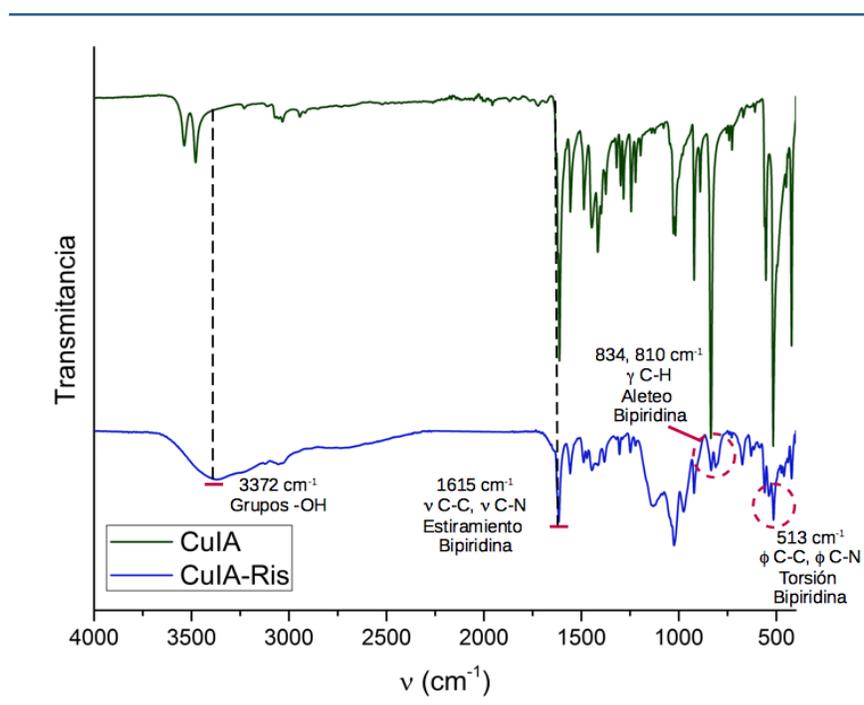


Figura 6.24. Espectros IR-ATR apilados del precursor **CuIA** y del complejo ternario **CuIA-Ris**

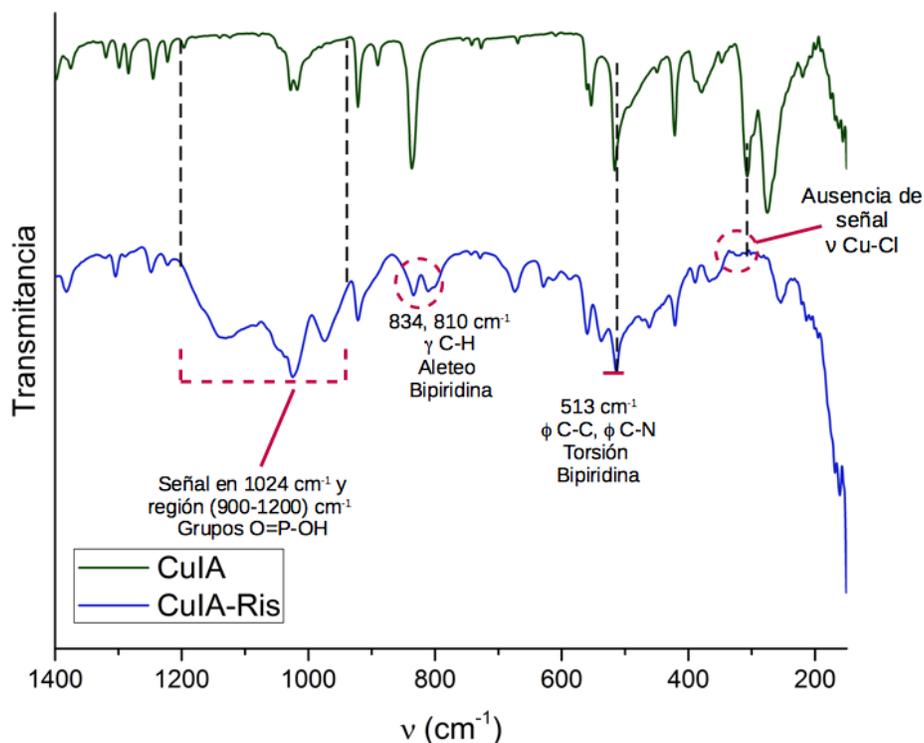


Figura 6.25. Espectros IR-ATR en la región lejana apilados del precursor **CuIA** y del complejo ternario **CuIA-Ris**

Los cambios observados en la región 1600 cm^{-1} - 2700 cm^{-1} al comparar los espectros de NaRis (Anexo 1, Figura A1.2 (c)) y **CuIA-Ris** (Figura 6.24, espectro verde) se deben a la pérdida de grados de libertad del grupo O=P-OH al efectuarse la coordinación de tipo P-O-Cu, mientras que la aparición de un grupo de señales no presentes en **CuIA** (Figura 6.25) en el intervalo 900 cm^{-1} - 1215 cm^{-1} (con la señal principal localizada en 1024 cm^{-1}) se deben a los grupos de ácido fosfónico del ligante Ris. También destaca en el espectro IR-ATR lejano de **CuIA-Ris** la desaparición de la señal asociada al enlace Cu-Cl que se define en **CuIA** en 330 cm^{-1} .

Mediante la espectrometría de masas ESI+ de la reacción *in situ* 1:1 (Figura 6.26) se han encontrado los siguientes picos de relevancia en 775.9 m/z , que se encuentra resuelto isotópicamente de forma adecuada y corresponde al ion molecular $[\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{Cu}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{P}_2]^+$, la Figura 6.27 muestra la ampliación de este pico y se compara con el patrón isotópico calculado. También se observa el pico base en 466.1 m/z asignado al fragmento $[\text{Cu}(4,4'\text{-dmbp})_2\text{Cl}]^+$.

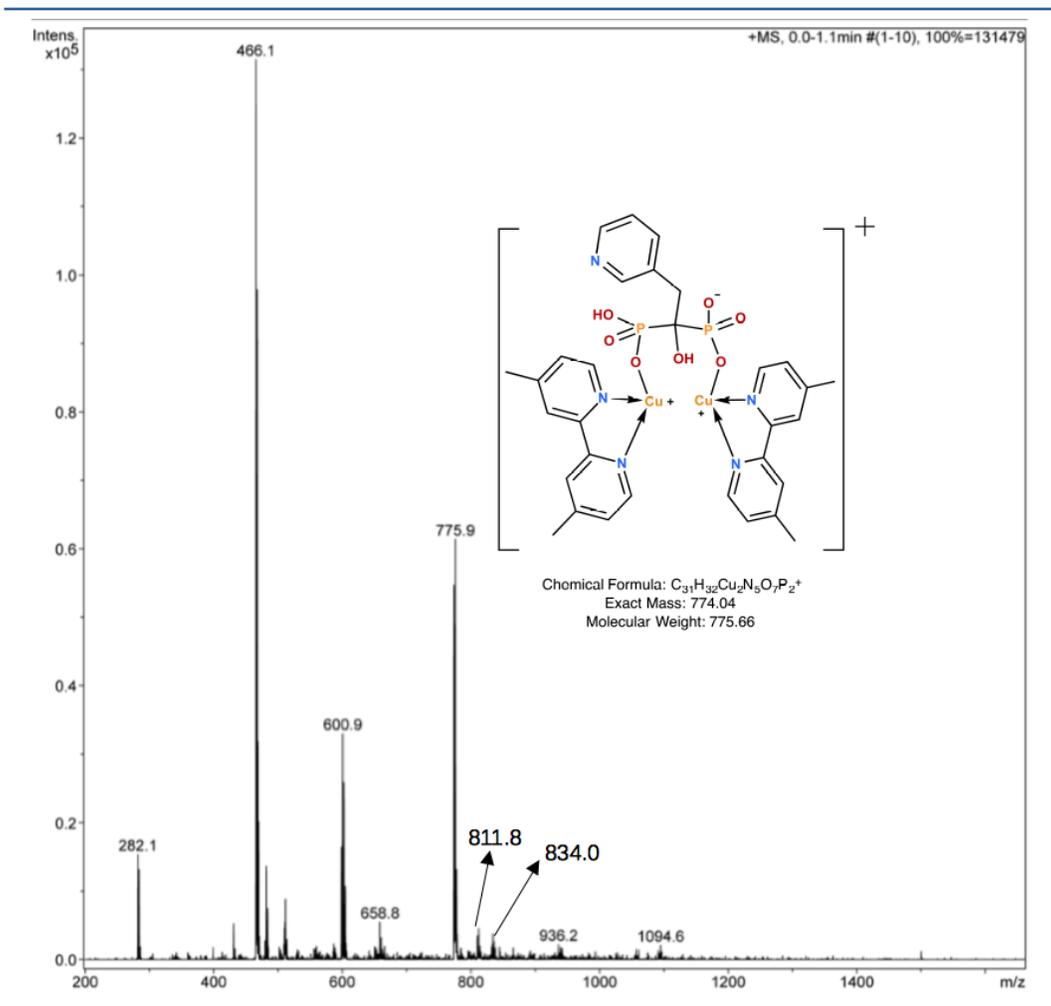


Figura 6.26. Espectro ESI en modo positivo del compuesto **CulA-Ris**. Se observa el ión molecular en 775.9 m/z y el pico base en 466.1 m/z. Los picos en 811.8 m/z y 834.0 m/z también aparecen en intensidad mucho menor

Los picos en 811.8 m/z y 834.0 m/z apuntan a iones moleculares con fórmulas $[C_{31}H_{33}ClCu_2N_5O_7P_2]^+$ y $[C_{31}H_{32}ClCu_2N_5NaO_7P_2]^+$, respectivamente. Estas especies se generan con la presencia de cloruro de sodio en el medio, formándose aductos entre la especie $[C_{31}H_{32}Cu_2N_5O_7P_2]^+$ y Na^+/Cl^- , estas señales no se encuentran totalmente resueltas isotópicamente, sin embargo, hay coincidencias entre los patrones experimentales y los teóricos calculados (Anexo 2, Figura A2.1).

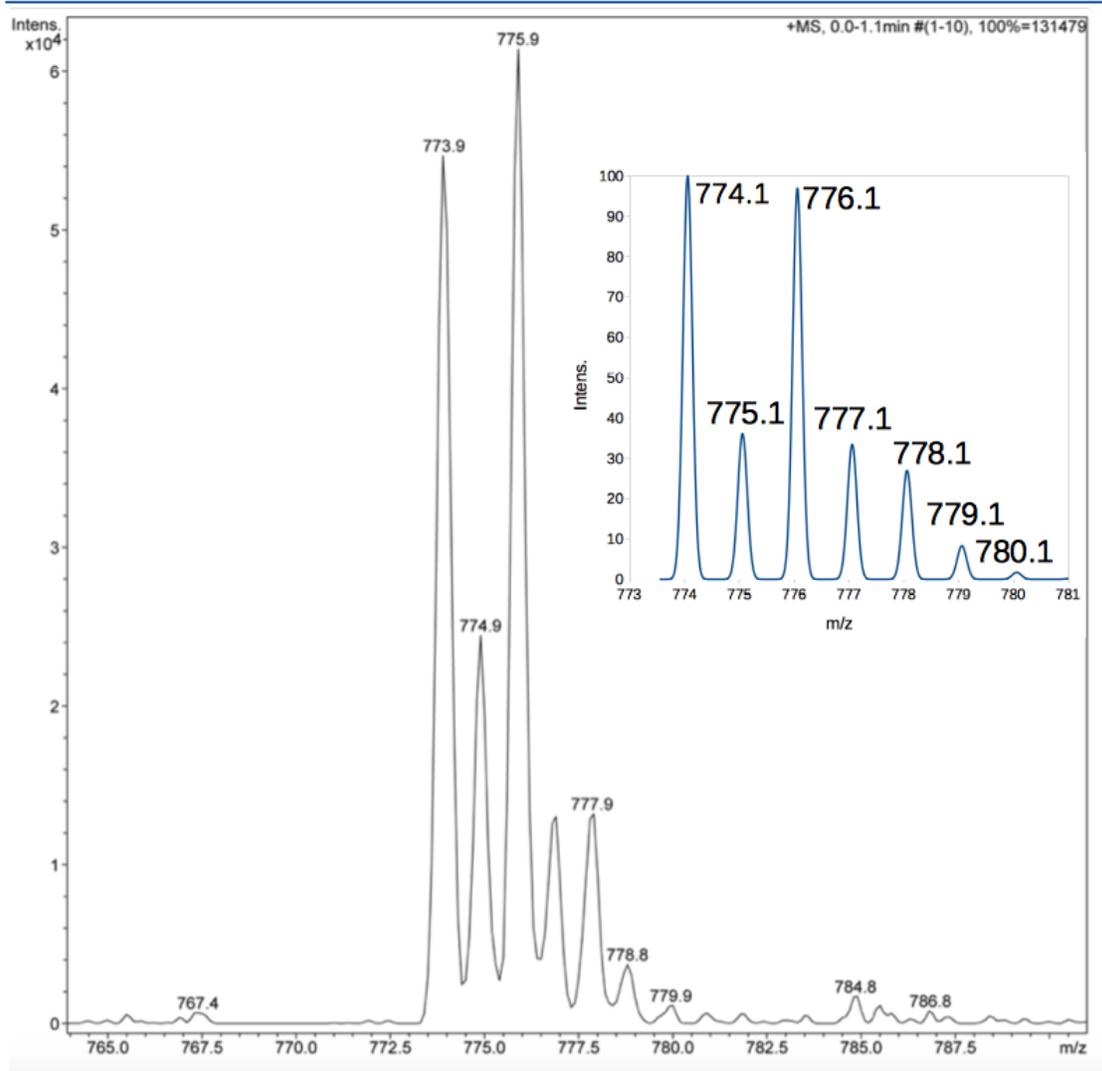


Figura 6.27. Distribución isotópica experimental ión molecular **CuIA-Ris** y en el recuadro de la esquina superior derecha la distribución calculada para $[C_{31}H_{32}Cu_2N_5O_7P_2]^+$ 775.9 m/z.

DRX

Los cristales de **CuIA-Ris** fueron adecuados para su análisis por DRX, los datos cristalográficos se muestran en la Tabla 6.11. El compuesto presentó varias moléculas de H₂O desordenadas, por lo que se utilizó el método SQUEEZE de PLATON para refinar la estructura considerando la contribución del disolvente.⁹⁹

Tabla 6.11. Datos cristalográficos obtenidos para el compuesto **CuIA-Ris**.

Fórmula empírica	C ₆₂ H ₆₄ N ₁₀ O ₁₄ P ₄ Cu ₄	Z	4
MM	1551.27 g mol ⁻¹	ρ calc.	1.041 g cm ⁻³
Temperatura	100(2) K	Coefficiente de absorción (μ)	0.960 mm ⁻¹
Sistema cristalino	monoclínico	F(000)	3176.0
Grupo espacial	P2 ₁ /n	Tamaño cristal	0.458 × 0.192 × 0.176 mm ³
a	15.5051(6) Å	Intervalos índice	-17 ≤ h ≤ 20, -41 ≤ k ≤ 41, -27 ≤ l ≤ 27
b	32.1256(13) Å	Reflexiones	91696
c	21.0381(8) Å	Reflexiones independientes	22581 [R _{int} = 0.0557, R _{sigma} = 0.0504]
α	90 °	Adecuación del ajuste sobre F²	1.084
β	109.1230(10) °	Indices R finales [I ≥ 2σ (I)]	R1 = 0.0402, wR2 = 0.1095
γ	90 °	Indices R finales [todos los datos]	R1 = 0.0593, wR2 = 0.1174
Volumen	9901.0(7) Å ³		

CuIA-Ris muestra una riqueza estructural notable, la Figura 6.28 muestra la estructura cristalina y la Tabla 6.12 muestra las distancias y ángulos de los iones Cu(II) con sus átomos donadores.

El compuesto en estado sólido se ordena a través de cuatro átomos de Cu(II) alineados en “zig-zag” sobre un plano imaginario que por debajo de dicho plano se encuentran cuatro moléculas de 4,4'-dmbp coordinada cada una a un átomo de Cu(II) y a su vez, por encima del plano, se encuentran dos moléculas de Ris coordinada cada una a dos átomos de Cu(II).

Tabla 6.12. Distancias y ángulos experimentales de los átomos de Cu(II) del compuesto **CuIA-Ris**.

Distancia / Å		Ángulo / °			
Cu1-N2	1.9577(16)	O2-Cu1-N2	90.60(7)	O9-Cu3-N7	92.39(7)
Cu1-O5	1.9312(16)	O2-Cu1-N3	159.24(8)	O9-Cu3-N8	163.67(8)
Cu1-N2	2.0006(19)	O5-Cu1-O2	95.75(6)	O12-Cu3-O3	81.84(6)
Cu1-N3	2.012(2)	O5-Cu1-N2	170.21(8)	N7-Cu3-O3	104.65(8)
Cu2-O3	1.9809(16)	O5-Cu1-N3	91.40(7)	N7-Cu3-O12	172.43(8)
Cu2-O6	1.9391(15)	N2-Cu1-N3	80.16(8)	N8-Cu3-O3	101.66(7)
Cu2-N4	1.9858(19)	O3-Cu2-N4	93.83(7)	N8-Cu3-O12	94.16(7)
Cu2-N5	1.987(2)	O3-Cu2-N5	172.96(8)	N8-Cu3-N7	80.84(8)
Cu2-O12	2.2566(17)	O3-Cu2-O12	81.85(6)	O10-Cu4-O3	94.85(7)
Cu3-O9	1.9299(15)	O6-Cu2-O3	90.75(6)	O10-Cu4-O3	90.21(8)
Cu3-O12	2.0023(16)	O6-Cu2-N4	160.69(8)	O10-Cu4-O3	167.11(9)
Cu3-N7	1.997(2)	O6-Cu2-N5	92.59(7)	O13-Cu4-O3	163.12(8)
Cu3-N8	1.9885(19)	O6-Cu2-O12	93.82(6)	O13-Cu4-O3	91.75(8)
Cu4-O10	1.9330(16)	N4-Cu2-N5	81.03(8)	N9-Cu4-N10	80.46(8)
Cu4-O13	1.9515(17)	N4-Cu2-O12	105.39(7)		
Cu4-N9	2.002(2)	N5-Cu2-O12	104.10(7)		
Cu4-N10	2.003(2)	O9-Cu3-O3	94.40(6)		
O3-Cu3	2.2387(17)	O9-Cu3-O12	90.95(6)		

En detalle, cada Ris está orientada de tal forma que es la imagen especular con rotación de 180° de la otra molécula de Ris, los bisfosfonatos de cada molécula de Ris se encuentran totalmente desprotonados y forman ciclos de 6 miembros al puentear dos átomos de Cu(II) diferentes, el N de la piridina se estabiliza como clorhidrato, generando así dos fragmentos $[\text{Cu}_2(4,4'\text{-dmbp})_2(\text{Ris})]$, en donde se mantiene la relación 1:1 ya que se partió del dímero **CuIA**.

Adicionalmente, un oxígeno de un grupo bisfosfonato de cada Ris genera una interacción puente entre cada fragmento dinuclear antes descrito. La Figura 6.29 muestra uno de estos fragmentos $[\text{Cu}_2(4,4'\text{-dmbp})_2(\text{Ris})]$ a detalle.

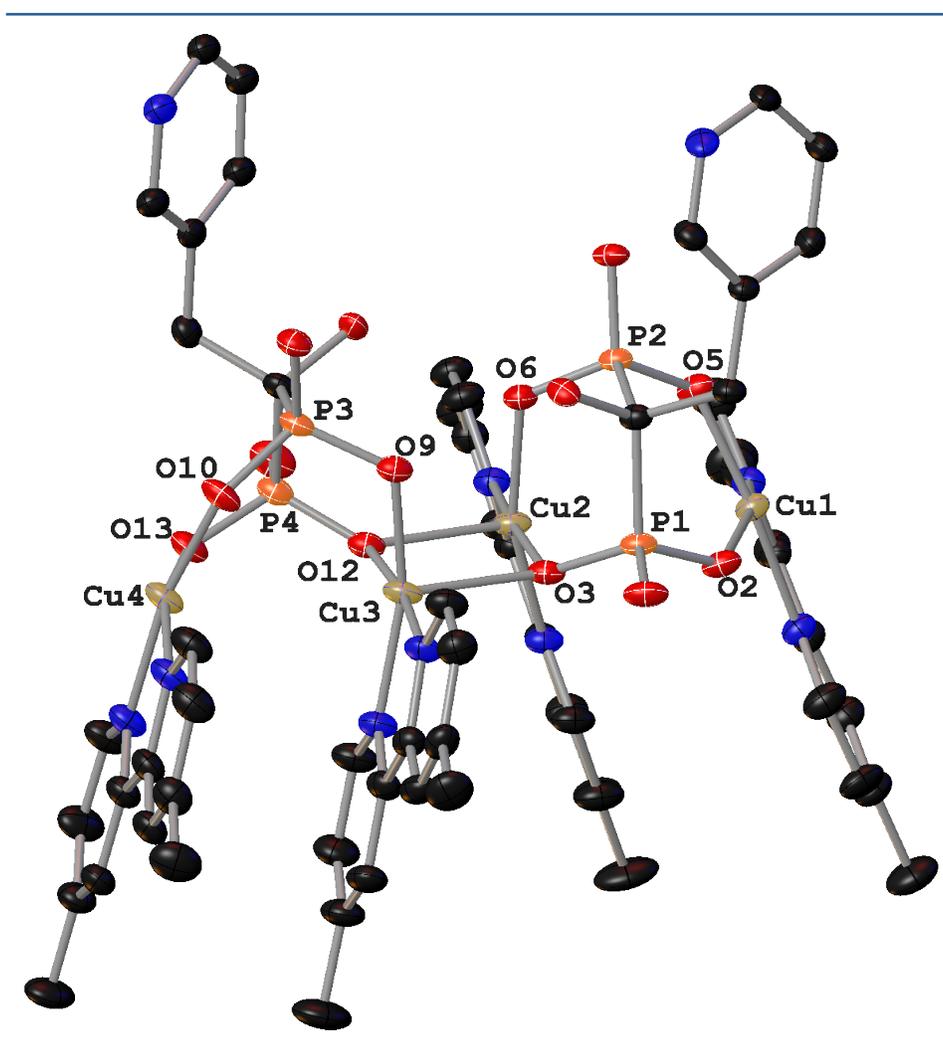


Figura 6.28. Diagrama de elipsoides térmicos correspondiente al compuesto **CuI-A-Ris**. Los hidrógenos no se muestran por claridad y se muestran enumerados los átomos de mayor relevancia, no se muestran interacciones adicionales. Temperatura: 100 K, probabilidad: 50%. R(%): 4.

Este arreglo da como resultado dos tipos diferentes de átomo de Cu(II). Los centrales, Cu2 y Cu3, Figura 6.28, que se encuentran pentacoordinados y presentan geometría piramidal de base cuadrada y los terminales, Cu1 y Cu4, que no muestran

interacciones adicionales y por tanto se encuentran tetracoordinados con sus átomos donadores distribuidos en una geometría cuadrada plana distorsionada.

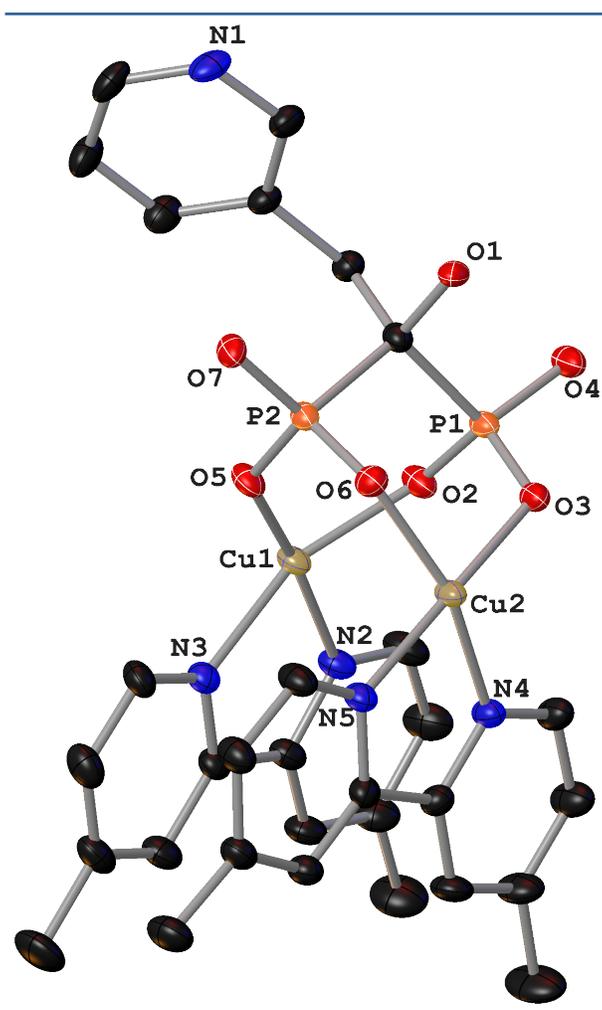


Figura 6.29. Diagrama de elipsoides térmicos (T=100 K, probabilidad=50%, R=4%) correspondiente al fragmento $[\text{Cu}_2(4,4'\text{-dmbp})_2(\text{Ris})]$. Se omiten hidrógenos por claridad. Se observan las estructuras cíclicas que se forman entre el bisfosfonato y los átomos de Cu.

El compuesto se estabiliza por una serie de interacciones supramoleculares. La orientación que adoptan los ligandos Ris hace que se generen dos interacciones de enlace de hidrógeno, Figura 6.30, entre ambos ligandos: el grupo OH del carbono cuaternario de una molécula de Ris forma dicho enlace con el oxígeno de la molécula opuesta de Ris. Se miden las distancias de 1.87(2) Å y 1.84(3) Å para estas interacciones.

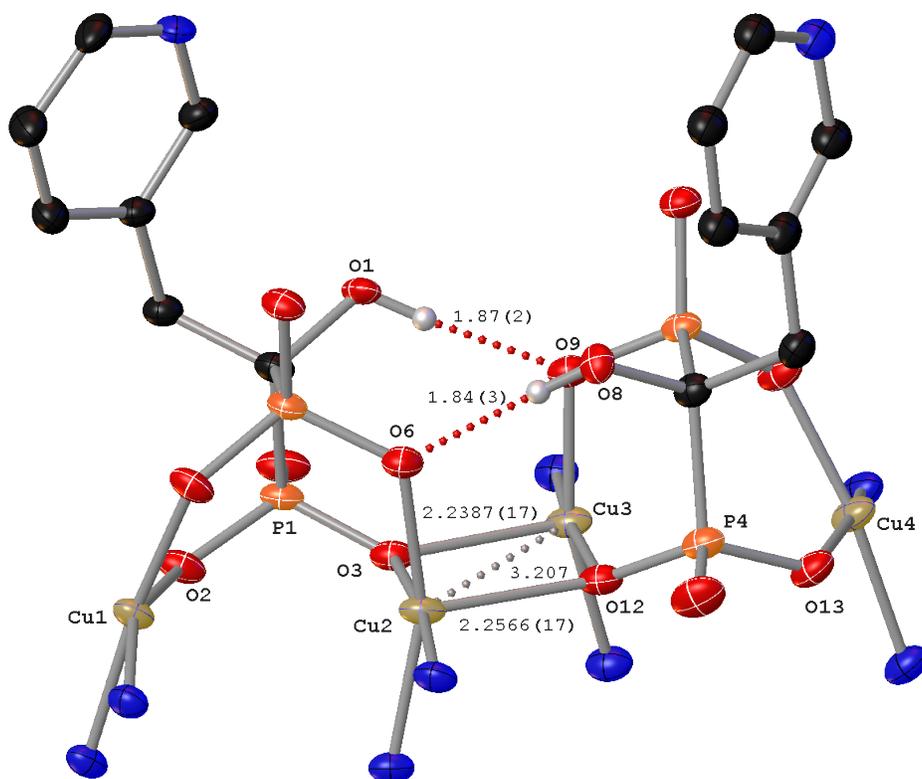


Figura 6.30. Diagrama de elipsoides térmicos correspondiente al compuesto **CuIA-Ris**. Los hidrógenos y el esqueleto de las 4,4'-dmbp no se muestran por claridad y se muestran enumerados los átomos de mayor relevancia. Se muestran las interacciones de hidrógeno, las distancias Cu-O del centro y la distancia entre los Cu centrales. Temperatura: 100 K, probabilidad: 50%. R(%): 4.

Adicionalmente, el grupo piridinio de uno de los ligantes Ris forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno correspondiente al fragmento P=O de otra molécula de **CuIA-Ris** localizada dentro de la celda unitaria (la Figura 6.31 muestra esta interacción en forma de líneas punteadas rojas). La Tabla 6.13 muestra las distancias y ángulos experimentales de estas interacciones.

Tabla 6.13. Enlaces de hidrógeno presentes en el compuesto **CuIA-Ris**. Se muestran distancias y ángulos Donador-H-Aceptor. ¹1-x, 1-y, 1-z

D	H	A	d(D-H) / Å	d(H-A) / Å	d(D-A) / Å	D-H-A / °
O1	H1A	O9	0.822(10)	1.872(11)	2.681(2)	168(3)
N1	H1	O7 ¹	0.88	1.77	2.642(2)	173.3
O8	H8A	O6	0.829(10)	1.842(11)	2.658(2)	167(3)

El grupo piridinio también forma interacciones de apilamiento π , con una distancia entre piridinos involucrados de 3.661 Å, a lo largo de toda la estructura cristalina. Este apilamiento se da de manera intercalada con grupos piridinio que presentan la interacción de enlace de hidrógeno como se muestra en la Figura 6.31.

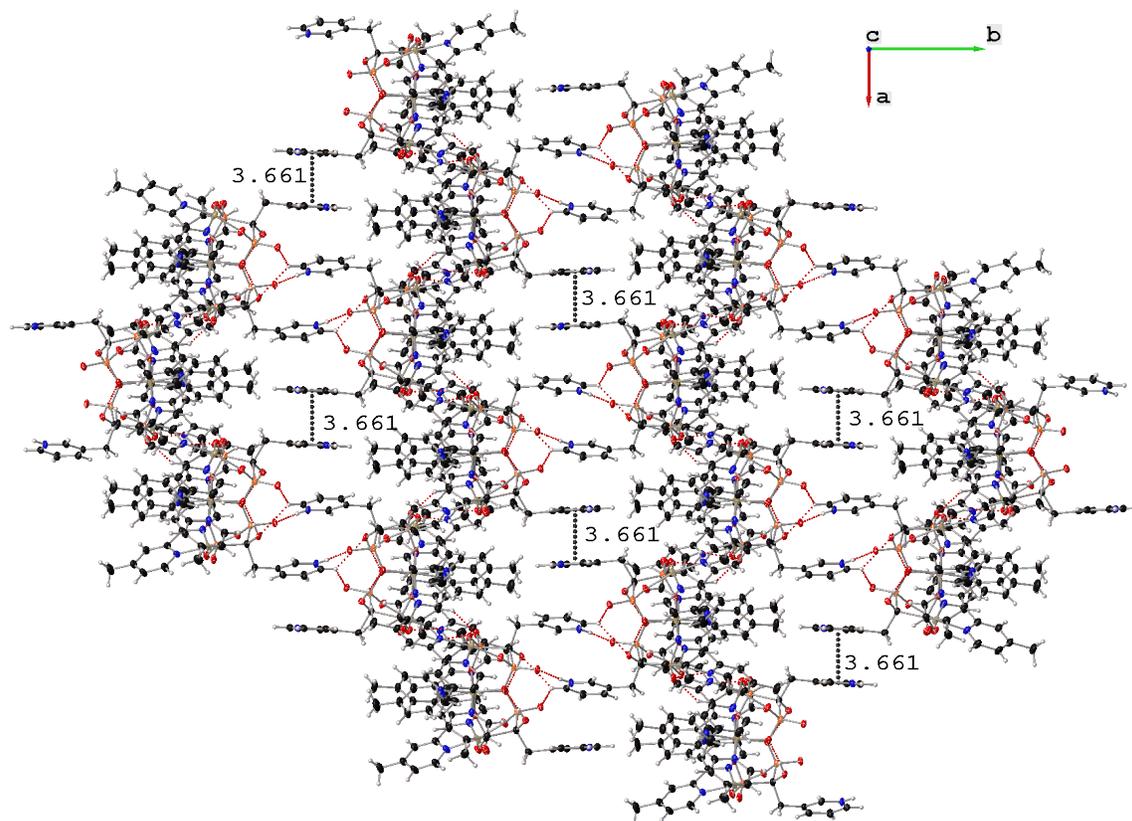


Figura 6.31. Perspectiva sobre el eje c (001) del empaquetamiento cristalino de **CuIA-Ris** en donde se distinguen las interacciones π (líneas punteada gris) y las interacciones de enlace de hidrógeno (líneas punteadas rojas).

Otra característica que muestra **CuIA-Ris** en su arreglo supramolecular es la presencia de canales en dos dimensiones, ver Figura 6.32. La distancia a lo largo del eje b es de 12.307 Å y la distancia a largo del eje c es de 17.882 Å en una vista a través del eje a (100).

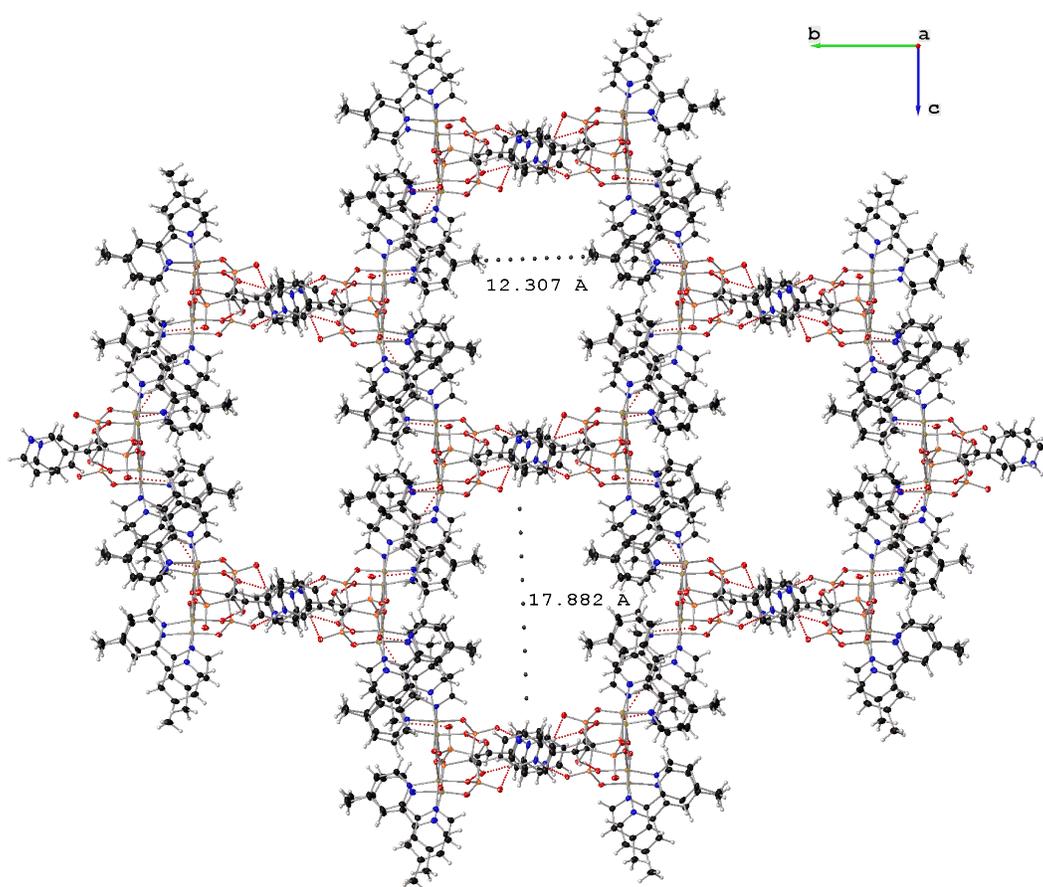


Figura 6.32. Perspectiva sobre el eje a (100) del empaquetamiento cristalino de **CuIA-Ris** en donde se distinguen las interacciones de enlace de hidrógeno (líneas punteadas rojas) entre los grupos piridinio y los átomos de oxígeno de los fragmentos P=O de Ris. También se observan los canales supramoleculares en 2D, cuyas distancias se muestran en líneas punteadas grises.

6.4 Citotoxicidad.

La tabla 6.14 muestra los valores obtenidos en los ensayos de citotoxicidad en células sanas y estos resultados se visualizan en las Figura 6.33. Se muestran los datos obtenidos a 1 μM ya que a 10 μM los compuestos resultan ser bastante citotóxicos (entre 80-100% de inhibición), una característica esperada ya que esto demuestra que la inclusión de un ión metálico y un ligante intercalador genera especies químicas más potentes en comparación con los ligantes bioactivos libres.

Tabla 6.14. Valores obtenidos en el ensayo de citotoxicidad en células no cancerosas a 1 μM y 10 μM de analito. FGH: Fibroblastos gingivales humanos, COS-7: línea celular de riñón de mono (no cancerosa), NC: no citotóxico.

Compuesto	% de inhibición de crecimiento celular			
	FGH 1 μM	FGH 10 μM	COS-7 1 μM	COS-7 10 μM
Ris	13.96	35.24	10.71	4.09
Zol	33.94	69.18	29.35	36.84
CuIA-Ris	14.16	87.21	11.50	100
CuIA-Zol	28.47	84.55	32.11	100
CuIB-Ris	12.18	100	14.01	100
CuIB-Zol	25.12	100	49.24	100

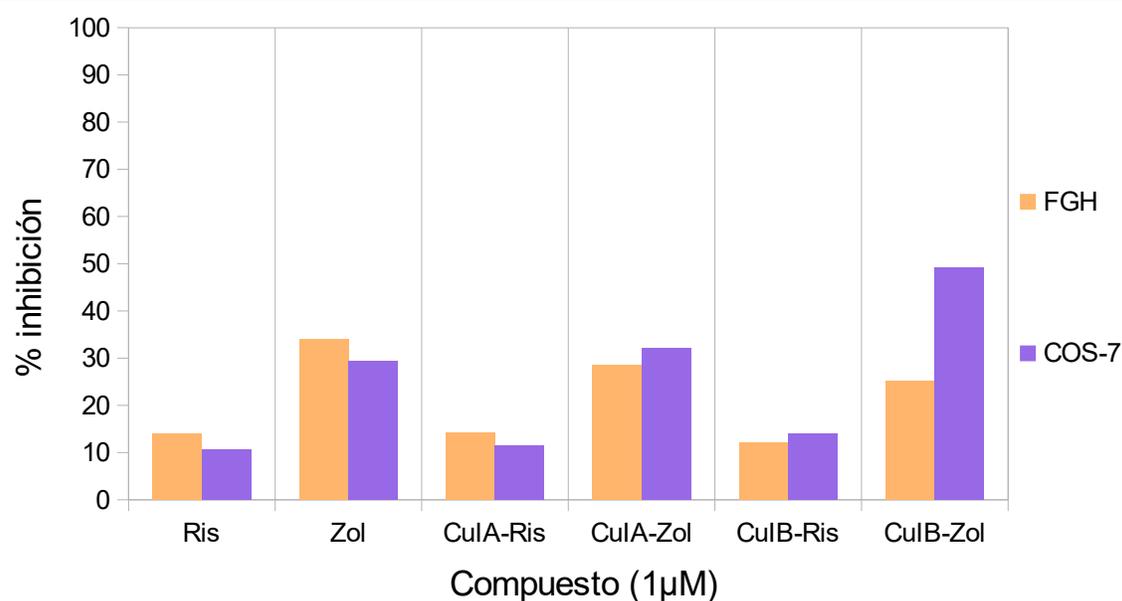


Figura 6.33. Citotoxicidad *in vitro* de los fármacos libres y los complejos ternarios sobre FGH y COS-7 a concentración de analito 1 μM .

Se puede observar que, Tabla 6.14, la inclusión de los fármacos Ris y Zol en un compuesto ternario de Cu(II) con un ligante secundario intercalador de ADN aumentó su toxicidad sobre FGH y COS-7 a una concentración de 10 μM , a esta concentración los cuatro compuestos ternarios presentaron mayor citotoxicidad que los fármacos libres. A 10 μM se observa que los derivados ternarios de **CuIA** son menos citotóxicos sobre FGH que los derivados ternarios de **CuIB** (sin embargo los cuatro son

igualmente tóxicos en COS-7). Los resultados obtenidos a 1 μM de analito son interesantes ya que se observa que, Figura 6.33, los compuestos ternarios con Ris como ligante bioactivo (**CuIA-Ris** y **CuIB-Ris**) tienen citotoxicidades similares a las del ligante Ris libre y son menos citotóxicos que los derivados de Zol (**CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**).

La Tabla 6.15 muestra los resultados de la evaluación citotóxica *in vitro* de los fármacos libres y los compuestos ternarios contra seis líneas celulares cancerosas y una línea sana a una concentración de 5 μM , estos resultados se visualizan en la Figura 6.34.

Los cuatro compuestos ternarios mostraron actividad contra las seis líneas celulares cancerosas. De estos cuatro compuestos, **CuIA-Ris** presentó la menor citotoxicidad (74% de inhibición) contra la célula sana de comparación (COS-7) mientras que presentó altos porcentajes de inhibición para las líneas U251, MCF-7 y SKLU-1, 100%, 100% y 93.55% respectivamente.

De forma notable, **CuIA-Ris** no es citotóxico para la línea PC-3 y muestra % de inhibición bajos para las líneas K562 y HCT-15 mientras que los otros tres complejos ternarios si muestran actividad para estas líneas. Sin embargo, **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol** presentan % de inhibición mayores del 90% contra COS-7.

Tabla 6.15. Valores obtenidos en el ensayo de citotoxicidad en células cancerosas a 5 μM de analito. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-15: colón, MCF-7: mama, SKLU-1: pulmón, COS-7: línea celular de riñón de mono (no cancerosa), NC: no citotóxico.

Muestra	% de inhibición de crecimiento celular						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
Ris	2.94	NC	0.73	NC	11.69	9.85	10.71
Zol	2.61	NC	0.53	NC	20.94	7.68	8.35
CuIA-Ris	100	NC	15.09	9.32	100	93.55	73.79
CuIA-Zol	100	83.0	60.5	41.04	100	88.78	93.41
CuIB-Ris	100	100	63.4	58.99	100	100	100
CuIB-Zol	100	94.35	52.0	32.19	100	100	100

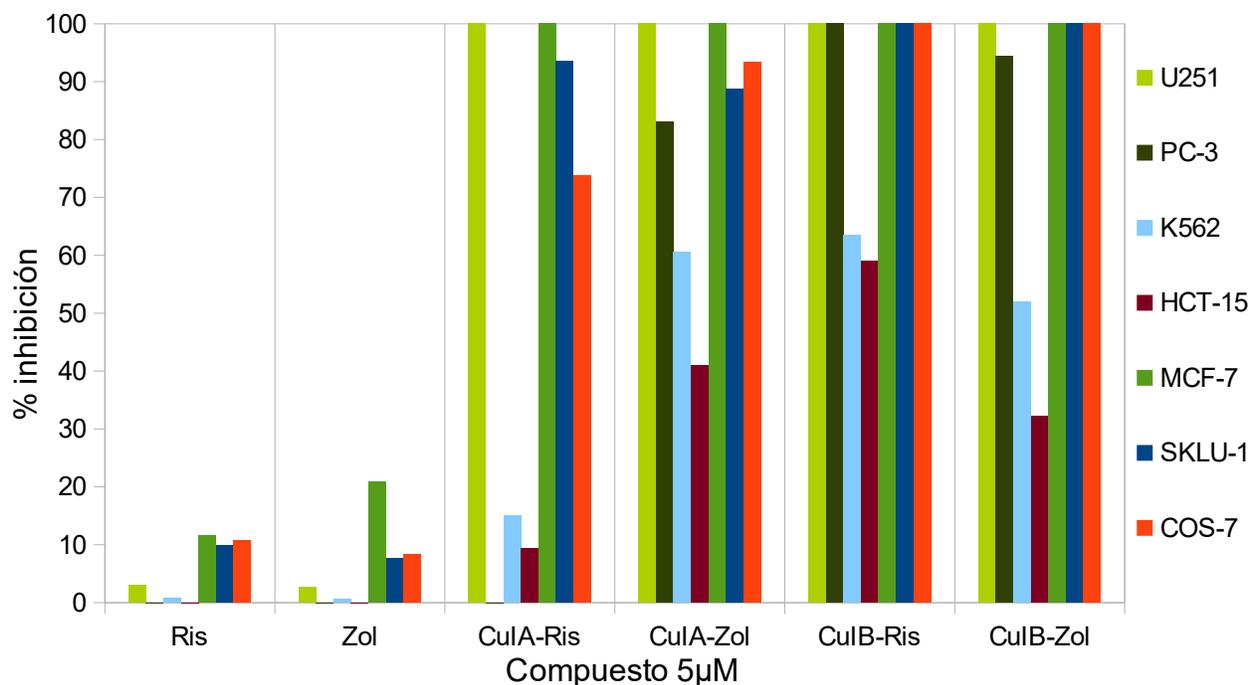


Figura 6.34. Perfil inhibitorio de los cuatro complejos ternarios y de los fármacos libres, a concentración 5 μM, sobre las seis líneas cancerígenas de estudio y la línea sana COS-7.

6.5 Pruebas en *T. cruzi*.

La Figura 6.35 muestra los resultados obtenidos de actividad antiparasitaria de **CuIA-Ris** y **CuIB-Ris** contra *T. cruzi* cepa Querétaro.

Se observó un efecto de disminución en el número de parásitos en los tratamientos con respecto al control negativo (PBS). Cabe señalar que la cepa *T. cruzi* Qro en el tiempo de las 24 horas de exposición, tuvo un efecto significativo el compuestos de **CuIA-Ris** (5 μM), con un porcentaje de inhibición de 71% mientras que con el NaRis fue solo de 39%. La inhibición con los compuestos probados fue más evidente a las 72 horas de tratamiento.

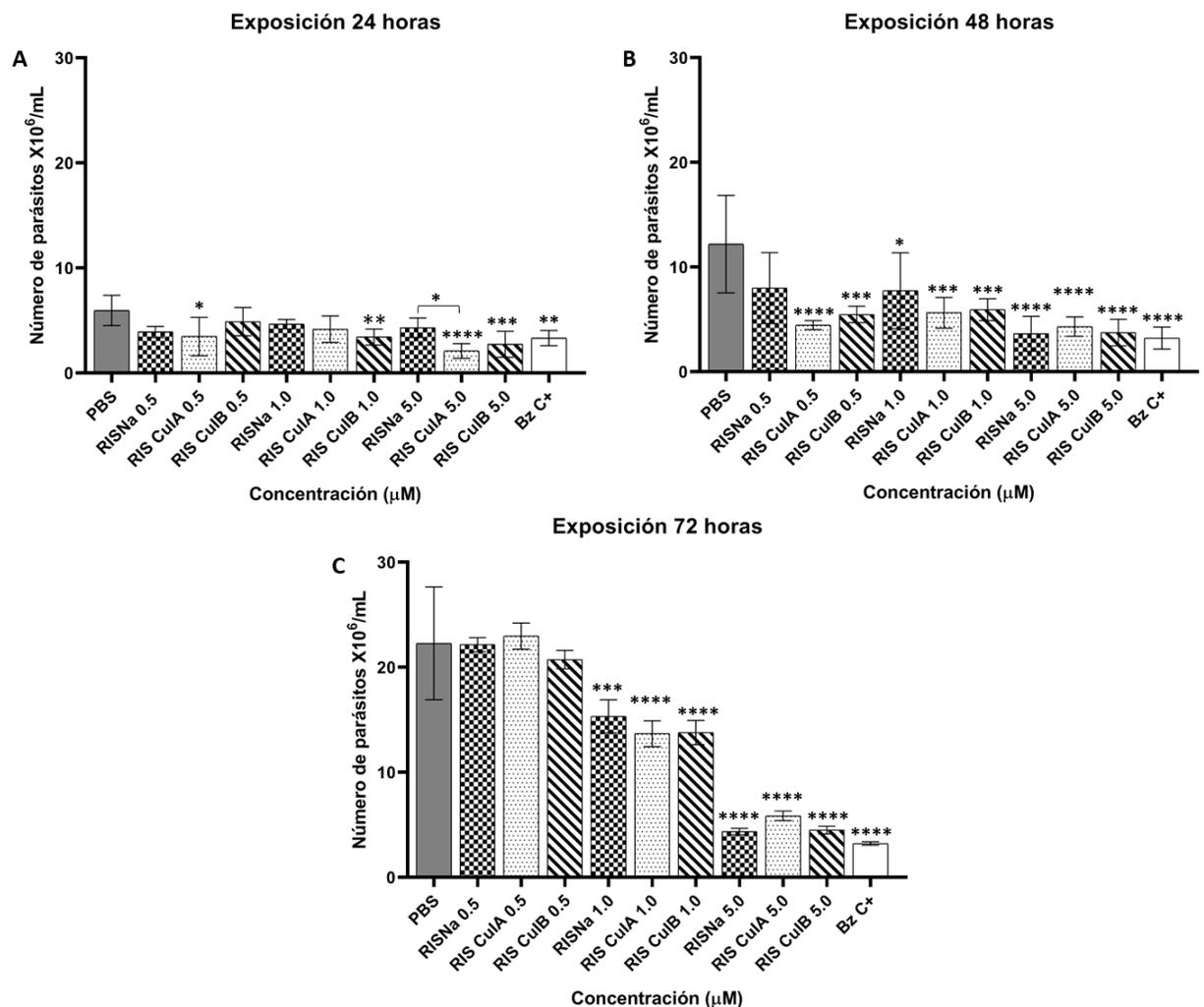


Figura 6.35. Número de parásitos de *T. cruzi* Querétaro expuestos al compuesto **CulA-Ris** y **CulB-Ris** durante 24 horas (A), 48 horas (B) y 72 horas (C). El experimento se inició con 2×10^6 parásitos/pozo. Se evaluaron a las concentraciones (0.5, 1.0 y 5.0 μM) empleando como control positivo Beznidazol (BZ 100 μM) y como control negativo PBS (Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.5 mM), además se usó un control comercial (NaRis) en las concentraciones (0.5, 1.0 y 5.0 μM).

El número de parásitos fueron graficados y analizados mediante una ANOVA de 1 vía realizando una Prueba Post Test de comparaciones múltiples de Tukey, empleando el Software GaphPad Prism 5. Los resultados fueron considerados significativos cuando $p < 0.05$.

Los resultados se presentan como el promedio +/- la desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicados. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos comparado con el control negativo (PBS) ($p < 0.05$). ANOVA ****($p < 0.0001$), ***($p = 0.0002$), **($p = 0.0021$), *($p = 0.033$).

7. Conclusiones.

En este trabajo se logró la síntesis y caracterización completa de dos compuestos de coordinación, **CuIA**: $[\text{Cu}_2(4,4'\text{-dmbp})_2\text{Cl}_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$ y **CuIB**: $[\text{Cu}_2(5,5'\text{-dmbp})_2\text{Cl}_4]$. Los complejos **CuIA** y **CuIB** fueron utilizados como precursores y se logró obtener una serie de compuestos de fórmula general $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{L})]$, donde bipy= 4,4'-dmbp/5,5'-dmbp, L= Ris/Zol y se caracterizó el complejo ternario más estable **CuIA-Ris**.

Se lograron obtener cristales de alta calidad para caracterizar estructuralmente vía DRX los compuestos **CuIA** y **CuIA-Ris** mientras que para **CuIB** se desarrolló un modelo de conectividad mediante dicha técnica.

Los cuatro complejos ternarios (**CuIA-Ris**, **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**) tienen estabilidad termodinámica. Mediante espectrofotometría UV-Vis se calcularon las constantes de asociación aparentes entre los precursores **CuIA/CuIB** y los fármacos Ris/Zol, obteniendo los siguientes valores: **CuIA-Ris** $K_{1:1} = 41.10 \pm 1.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, **CuB-Ris** $K_{1:1} = 38.20 \pm 0.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, **CuIB-Zol** $K_{1:1} = 16.10 \pm 0.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y **CuIA-Zol** $K_{1:1} = 6.40 \pm 0.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Los complejos ternarios sintetizados tienen mayor solubilidad en medios acuosos neutros que los fármacos libres (e.g. $>30\text{mg/mL}$ **CuIA-Ris** comparado con 12mg/mL NaRis) y también presentan estabilidad cinética en las mismas condiciones.

Finalmente, los cuatro complejos ternarios obtenidos presentan mayor actividad antiparasitaria contra *T. cruzi* cepa Querétaro comparados con los fármacos libres (a 24 y 48 h de exposición) y presentan actividad anti tumoral en, al menos, seis líneas celulares cancerosas humanas. Se hace énfasis en **CuIA-Ris** que presentó la menor toxicidad contra células sanas (COS-7 y FGH) de la serie de cuatro complejos ternarios.

Por lo tanto, se concluye que se pueden obtener complejos de Cu(II) estables, solubles en medios acuosos y con actividad antiparasitaria y anti tumoral a través de la síntesis directa de los precursores **CuIA** y **CuIB** con los fármacos Ris y Zol.

8. Referencias.

- 1 Chagas C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:159–218
- 2 Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L., & Gambino, D. (2010). Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug discovery today*, 15(23-24), 1070-1078.
- 3 Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94.
- 4 Salomon, C. J. (2012). First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(3), 888-894.
- 5 Beltran-Hortelano, I., Perez-Silanes, S., & Galiano, S. (2017). Trypanothione reductase and superoxide dismutase as current drug targets for *Trypanosoma cruzi*: an overview of compounds with activity against Chagas disease. *Current Medicinal Chemistry*, 24(11), 1066-1138.
- 6 Montalvetti, A., Bailey, B. N., Martin, M. B., Severin, G. W., Oldfield, E., & Docampo, R. (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33930-33937.
- 7 Martin, M. B., Grimley, J. S., Lewis, J. C., Heath, H. T., Bailey, B. N., Kendrick, H., ... & Oldfield, E. (2001). Bisphosphonates Inhibit the Growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: A Potential Route to Chemotherapy. *Journal of medicinal chemistry*, 44(6), 909-916.
- 8 Nogueira Silva, J. J., Pavanelli, W. R., Salazar Gutierrez, F. R., Alves Lima, F. C., Ferreira da Silva, A. B., Santana Silva, J., & Wagner Franco, D. (2008). Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole improves solubility and efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(14), 4104-4114.
- 9 Sesti-Costa, R., Carneiro, Z. A., Silva, M. C., Santos, M., Silva, G. K., Milanezi, C., ... & Silva, J. S. (2014). Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3207.
- 10 Ong, Y. C., Roy, S., Andrews, P. C., & Gasser, G. (2018). Metal compounds against neglected tropical diseases. *Chemical reviews*, 119(2), 730-796.
- 11 Paixao, D. A., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sousa, L. M., de Oliveira, L. P., Lopes, N. P., ... & Guerra, W. (2019). In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper (II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 157-166.
- 12 Brener, Z. (1984). Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79, 149-155.
- 13 Gallerano, R. H., Marr, J. J., & Sosa, R. R. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 43(2), 159-166..
- 14 Martin, M. B., Sanders, J. M., Kendrick, H., de Luca-Fradley, K., Lewis, J. C., Grimley, J. S., ... & Oldfield, E. (2002). Activity of bisphosphonates against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of medicinal chemistry*, 45(14), 2904-2914
- 15 Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., ... & Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2034-2039.
- 16 Miles, M. A. (2004). The discovery of Chagas disease: progress and prejudice. *Infectious Disease Clinics*, 18(2), 247-260.
- 17 Chao, C., Leone, J. L., & Vigliano, C. A. (2020). Chagas disease: Historic perspective.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1866(5), 165689.
- 19 Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., & McCurley, T. L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(3), 348-357.
 - 20 Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., & Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American heart journal*, 127(1), 151-162.
 - 21 Zhang, L., & Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *The Journal of infectious diseases*, 180(2), 480-486.
 - 22 World Health Organization. (2018). Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates. World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) . Consultado el 25-06-2022.
 - 23 World Health Organization. (2022). Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) . Consultado el 25-06-2022.
 - 24 Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., ... & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood transfusion*, 13(4), 540.
 - 25 Freitas, J. L. P., Amato, V., & Sonntag, R. (1952). First verifications of accidental transmission of Chagas disease to humans by blood transfusion. *Rev Paul Med*, 40, 36-40.
 - 26 Chocair, P. R., Sabbaga, E., Neto, V. A., Shiroma, M., & de Góes, G. M. (1981). Kidney transplantation: a new way of chagas' disease transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 23(6), 280-282.
 - 27 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002). Chagas disease after organ transplantation--United States, 2001. *MMWR*. Morbidity and mortality weekly report, 51(10), 210-212.
 - 28 Araujo, P. F., Almeida, A. B., Pimentel, C. F., Silva, A. R., Sousa, A., Valente, S. A., ... & Teixeira, A. R. (2017). Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 437-446.
 - 29 Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., ... & Noya, O. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *The Journal of infectious diseases*, 201(9), 1308-1315.
 - 30 Barreto de Albuquerque, J., Silva dos Santos, D., Stein, J. V., & de Meis, J. (2018). Oral versus intragastric inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental infection? From target tissues, parasite evasion, and immune response. *Frontiers in immunology*, 9, 1734.
 - 31 Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1(2), 92-100.
 - 32 Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, 110(2-3), 88-100.
 - 33 Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. *Advances in parasitology*, 99, 265-344.
 - 34 Buscaglia, C. A., & Di Noia, J. M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and infection*, 5(5), 419-427.
 - 35 Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., ... & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution*, 12(2), 240-253.
 - 36 CDC-Division of Parasitic Diseases and Malaria (DPDM). (2019). CDC - DPDx - American Trypanosomiasis. Centers for Disease Control and Prevention.

- <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericaindex.html>. Consultado el 30-06-2022.
- 37 Martins, A. V., Gomes, A. P., Gomes de Mendonça, E., Lopes Rangel Fietto, J., Santana, L. A., de Almeida Oliveira, M. G., ... & Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1), 45-58.
- 38 Mazzotti, L. (1940). Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac Med Mex*, 70, 417-420.
- 39 Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de chagas en México. *Gaceta Médica de México*, 154(5), 605-612.
- 40 Salazar Schettino, P., Bucio Torres, M., Rojo Medina, J., & Manuel Valencia, Y. (2019). Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. Secretaría de Salud: Mexico.
- 41 Antonio-Campos, A., Nicolás-Cruz, A., Girón-Arias, J. I., Rivas, N., & Alexandre-Aguilar, R. (2019). Presence of *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) in Oaxaca, Mexico, ten years after the certification of its elimination. *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 293-295.
- 42 Ramsey, J. M., Monreal, L. A., Ortiz-Panoso, E., Navarro, S. M., González, G. S., & Bravo-Ramírez, I. E. (2021) Enfermedad de Chagas: omisión u olvido en la salud pública de México. *Síntesis sobre políticas de salud*, 30.
- 43 Velasco-Castrejon, O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzman-Bracho, C., Magos, C., ... & Sepulveda, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México*, 34(2), 186-196.
- 44 Secretaria de Salud. (2011). NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. *Diario Oficial de la Federación: Gobierno Federal de México*.
- 45 Secretaria de Salud. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. *Diario Oficial de la Federación: Gobierno Federal de México*.
- 46 Tah, A. V. (2022). La problemática del Chagas en México: una revisión de los aspectos socioeconómicos y culturales en la literatura. *Antrópica. Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*, 8(16), 35-63.
- 47 Secretaria de Salud. (2015). Programa de Acción Específico Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018. Secretaria de Salud. <https://www.gob.mx/salud/documentos/programa-de-accion-especifico-prevencion-y-control-de-la-enfermedad-de-chagas-2013-2018>. Consultado el 10-07-2022.
- 48 Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2021). Programa de Acción Específico de Control de enfermedades transmitidas por vectores e intoxicación por veneno de artrópodos, 2020-2024. Secretaria de Salud. <https://www.gob.mx/salud/cenaprece/acciones-y-programas/programa-de-enfermedades-transmitidas-por-vectores>. Consultado el 10-07-2022.
- 49 Secretaria de Salud. (2020). Programa Sectorial de Salud 2020-2024. Secretaria de Salud. <https://www.gob.mx/salud/documentos/programa-sectorial-de-salud-2020-2024>. Consultado el 10-07-2022.
- 50 Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chavez, O., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(4), e0006859.
- 51 Velázquez-Ramírez, D. D., de León, A. A. P., & Ochoa-Díaz-López, H. (2022). Review of American Trypanosomiasis in Southern Mexico Highlights Opportunity for Surveillance Research to Advance Control Through the One Health Approach. *Frontiers in Public Health*, 10.
- 52 Comisión de Autorización Sanitaria. (2017). Registros Sanitarios de Medicamentos Alopáticos Expedidos 2017. Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/326787/Alop_ticos_2017.pdf. Consultado el 10-07-2022.
- 53 Pérez-Molina, J. A., Crespillo-Andújar, C., Bosch-Nicolau, P., & Molina, I. (2021).

- Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, 39(9), 458-470.
- 54 Martin-Escolano, J., Medina-Carmona, E., & Martin-Escolano, R. (2020). Chagas disease: Current view of an ancient and global chemotherapy challenge. *ACS Infectious Diseases*, 6(11), 2830-2843.
- 55 Sánchez-Delgado, R. A., & Anzellotti, A. (2004). Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(1), 23-30.
- 56 de Souza, W., & Rodrigues, J. C. F. (2009). Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- 57 Kessler, R. L., Soares, M. J., Probst, C. M., & Krieger, M. A. (2013). *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS one*, 8(1), e55497.
- 58 Chao, M. N., Storey, M., Li, C., Rodríguez, M. G., Di Salvo, F., Szajman, S. H., ... & Rodríguez, J. B. (2017). Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(24), 6435-6449.
- 59 Donnici, C. L., Araújo, M. H., Oliveira, H. S., Moreira, D. R. M., Pereira, V. R. A., de Assis Souza, M., ... & Leite, A. C. L. (2009). Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological characterization and structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(14), 5038-5043.
- 60 Vieites, M., Smircich, P., Parajón-Costa, B., Rodríguez, J., Galaz, V., Olea-Azar, C., ... & Gambino, D. (2008). Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13, 723-735.
- 61 Vieites, M., Smircich, P., Guggeri, L., Marchán, E., Gómez-Barrio, A., Navarro, M., ... & Gambino, D. (2009). Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol N-oxide gold (I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp.* insight into its mechanism of action. *Journal of inorganic biochemistry*, 103(10), 1300-1306.
- 62 Sakurai, H., Sano, H., Takino, T., & Yasui, H. (1999). A new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis (1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium (IV) with VO (S₂O₂) coordination mode. *Chemistry letters*, 28(9), 913-914.
- 63 Gambino, D. (2011). Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), 2193-2203.
- 64 Urquiola, C., Vieites, M., Aguirre, G., Marín, A., Solano, B., Arrambide, G., ... & Cerecetto, H. (2006). Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N1, N4-dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(16), 5503-5509.
- 65 Arancibia, R., Klahn, A. H., Buono-Core, G. E., Contreras, D., Barriga, G., Olea-Azar, C., ... & Garland, M. T. (2013). Organometallic Schiff bases derived from 5-nitrothiophene and 5-nitrofurane: synthesis, crystallographic, electrochemical, ESR and anti-*Trypanosoma cruzi* studies. *Journal of Organometallic Chemistry*, 743, 49-54.
- 66 Arancibia, R., Klahn, A. H., Buono-Core, G. E., Gutierrez-Puebla, E., Monge, A., Medina, M. E., ... & Godoy, F. (2011). Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of ferrocenyl and cyrhetrenyl imines derived from 5-nitrofurane. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696(20), 3238-3244.
- 67 Lowe, G., Droz, A. S., Vilaivan, T., Weaver, G. W., Tweedale, L., Pratt, J. M., ... & Croft, S. L. (1999). Cytotoxicity of (2, 2'-6', 2"-terpyridine) platinum (II) complexes to *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*. *Journal of medicinal chemistry*, 42(6), 999-1006.
- 68 Scalese, G., Mosquillo, M. F., Rostan, S., Castiglioni, J., Alho, I., Perez, L., ... & Gambino, D. (2017). Heteroleptic oxidovanadium (IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175, 154-166.

- 69 Renfrew, A. K. (2014). Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics*, 6(8), 1324-1335.
- 70 Widler, L., Jaeggi, K. A., Glatt, M., Müller, K., Bachmann, R., Bisping, M., ... & Green, J. R. (2002). Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *Journal of medicinal chemistry*, 45(17), 3721-3738.
- 71 Docampo, R., & Moreno, S. N. (2008). The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Current pharmaceutical design*, 14(9), 882-888.
- 72 Hounslow, A. M., Carran, J., Brown, R. J., Rejman, D., Blackburn, G. M., & Watts, D. J. (2008). Determination of the microscopic equilibrium dissociation constants for risedronate and its analogues reveals two distinct roles for the nitrogen atom in nitrogen-containing bisphosphonate drugs. *Journal of medicinal chemistry*, 51(14), 4170-4178.
- 73 Meloun, M., Ferenčíková, Z., Málková, H., & Pekárek, T. (2012). Thermodynamic dissociation constants of risedronate using spectrophotometric and potentiometric pH-titration. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 338-353.
- 74 CUKROWSKI, I., SARKAR, A., van ASWEGEN, A., & LILES, D. (2012). Protonation sequence of zoledronic acid: a DFT and QTAIM study. *Maria Amélia Santos, Editor*, 76, 120-126.
- 75 (a) Kunnas-Hiltunen, S., Laurila, E., Haukka, M., Vepsäläinen, J., & Ahlgrén, M. (2010). Organic-Inorganic Hybrid Materials: Syntheses, X-ray Diffraction Study, and Characterisations of Manganese, Cobalt, and Copper Complexes of Modified Bis (phosphonates).
- (b) Ma, K. R., Zhang, Y., Kan, Y. H., Yang, X. J., & Cong, M. H. (2013). Three M (II)-diphosphonate coordination polymers with N-heterocyclic group (M= Ni, Fe, Mg): Synthesis, characterization and magnetic properties. *Synthetic metals*, 182, 40-48.
- (c) Ma, K. R., Cao, L., Cong, M. H., Kan, Y. H., & Li, R. Q. (2017). Three pyridyl modified Cu(II)/Cd (II)-diphosphonates: Syntheses, crystal structures and properties. *Journal of Molecular Structure*, 1139, 67-77.
- (d) Thakre, D., Ali, S. R., Mehta, S., Alam, N., Ibrahim, M., Sarma, D., ... & Banerjee, A. (2021). Polyoxovanadates with ethylidene-pyridine functionalized bisphosphonate ligands: synthesis, structure, spectroscopic characterization, magnetic, and antibacterial studies. *Crystal Growth & Design*, 21(8), 4285-4298.
- 76 (a) Cao, D. K., Li, Y. Z., & Zheng, L. M. (2007). Layered cobalt (II) and nickel (II) diphosphonates showing canted antiferromagnetism and slow relaxation behavior. *Inorganic chemistry*, 46(18), 7571-7578.
- (b) Freire, E., Quintero, M., Vega, D., & Baggio, R. (2013). Crystal structure and magnetic properties of two new zoledronate complexes: A Mn dimer [Mn (II)(H3Zol) 2·(H2O) 2] and a Fe15 molecular cluster [Fe (III) 15 (HZol) 10 (H2Zol) 2 (H2O) 12 (Cl4: (H2O) 2)· Cl7·(H2O) 65](where H4Zol: C5H10N2O7P2 is zoledronic acid). *Inorganica Chimica Acta*, 394, 229-236.
- (c) Zhang, X. L., Cheng, K., Wang, F., & Zhang, J. (2014). Chiral and achiral imidazole-linked tetrahedral zinc phosphonate frameworks with photoluminescent properties. *Dalton Transactions*, 43(1), 285-289.
- (d) Yazdani, A., Janzen, N., Banevicius, L., Czorny, S., & Valliant, J. F. (2015). Imidazole-based [2+ 1] Re (I)/99mTc (I) complexes as isostructural nuclear and optical probes. *Inorganic Chemistry*, 54(4), 1728-1736.
- 77 Demoro, B., Caruso, F., Rossi, M., Benítez, D., Gonzalez, M., Cerecetto, H., ... & Gambino, D. (2010). Risedronate metal complexes potentially active against Chagas disease. *Journal of inorganic biochemistry*, 104(12), 1252-1258.
- 78 Demoro, B., Caruso, F., Rossi, M., Benítez, D., González, M., Cerecetto, H., ... & Otero, L. (2012). Bisphosphonate metal complexes as selective inhibitors of Trypanosoma cruzi farnesyl diphosphate synthase. *Dalton Transactions*, 41(21), 6468-6476.
- 79 Demoro, B., Rostán, S., Moncada, M., Li, Z. H., Docampo, R., Olea Azar, C., ... & Otero, L. (2018). Ibandronate metal complexes:

- Solution behavior and antiparasitic activity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23, 303-312.
- 80 Cipriani, M., Rostán, S., León, I., Li, Z. H., Gancheff, J. S., Kemmerling, U., ... & Otero, L. (2020). Multi-target heteroleptic palladium bisphosphonate complexes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25, 509-519.
- 81 Tisato, F., Marzano, C., Porchia, M., Pellei, M., & Santini, C. (2010). Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Medicinal research reviews*, 30(4), 708-749.
- 82 Egorova, K. S., & Ananikov, V. P. (2017). Toxicity of metal compounds: knowledge and myths. *Organometallics*, 36(21), 4071-4090.
- 83 Demoro, B., Sarniguet, C., Sánchez-Delgado, R., Rossi, M., Liebowitz, D., Caruso, F., ... & Gambino, D. (2012). New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Transactions*, 41(5), 1534-1543.
- 84 Demoro, B., Rossi, M., Caruso, F., Liebowitz, D., Olea-Azar, C., Kemmerling, U., ... & Gambino, D. (2013). Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones. *Biological trace element research*, 153, 371-381.
- 85 Jablonka, K. M., Patiny, L., & Smit, B. (2022). Making molecules vibrate: Interactive web environment for the teaching of infrared spectroscopy.
- 86 Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3), 1112-1116.
- 87 Rodríguez-Hernández, K. D., Martínez, I., Reyes-Chilpa, R., & Espinoza, B. (2020). Mamea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. *Bioorganic Chemistry*, 100, 103894.
- 88 (a) Gerasimova, T. P., & Katsyuba, S. A. (2013). Bipyridine and phenanthroline IR-spectral bands as indicators of metal spin state in hexacoordinated complexes of Fe (II), Ni (II) and Co (II). *Dalton transactions*, 42(5), 1787-1797.
- (b) Wilde, R. E., & Srinivasan, T. K. K. (1974). Far-infrared and Raman studies of mono complexes of 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 36(2), 323-328.
- 89 Saito, Y., Takemoto, J., Hutchinson, B., & Nakamoto, K. (1972). Infrared studies of coordination compounds containing low-oxidation-state metals. I. Tris (2, 2'-bipyridine) and tris (1, 10-phenanthroline) complexes. *Inorganic Chemistry*, 11(9), 2003-2011.
- 90 Adams, D. M., & Lock, P. J. (1967). Copper-halogen stretching frequencies. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 620-623.
- 91 Wong, P. T., & Brewer, D. G. (1968). Nature of the coordination bond in metal complexes of substituted pyridine derivatives. II. The far infrared spectra and metal-ligand force constants of copper complexes of 4-substituted pyridines. *Canadian Journal of Chemistry*, 46(2), 139-148.
- 92 Marlin, D. S., Olmstead, M. M., & Mascharak, P. K. (2001). Structure-spectroscopy correlation in distorted five-coordinate Cu(II) complexes: A case study with a set of closely related copper complexes of pyridine-2, 6-dicarboxamide ligands. *Inorganic Chemistry*, 40(27), 7003-7008.
- 93 Kurup, M. P., Varghese, B., Sithambaresan, M., Krishnan, S., Sheeja, S. R., & Suresh, E. (2011). Synthesis, spectral characterization and crystal structure of copper (II) complexes of 2-benzoylpyridine-N (4)-phenylsemicarbazone. *Polyhedron*, 30(1), 70-78.
- 94 Hathaway, B., & Billing, D. E. (1970). The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper (II) ion. *Coordination Chemistry Reviews*, 5(2), 143-207.
- 95 González Q, O., Atria, A. M., Spodine, E., Manzur, J., & Garland, M. T. (1993). Structure of dimeric dichloro (4, 4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine) copper (II) hemihydrate. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 49(9), 1589-1591.
- 96 Addison, A. W., Rao, T. N., Reedijk, J., van Rijn, J., & Verschoor, G. C. (1984). Synthesis,

- structure, and spectroscopic properties of copper (II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua [1, 7-bis (N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2, 6-dithiaheptane] copper (II) perchlorate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (7), 1349-1356.
- 97 Okuniewski, A., Rosiak, D., Chojnacki, J., & Becker, B. (2015). Coordination polymers and molecular structures among complexes of mercury (II) halides with selected 1-benzoylthioureas. *Polyhedron*, 90, 47-57.
- 98 Thordarson, P. (2011). Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1305-1323.
- 99 Redman-Furey, N., Dicks, M., Bigalow-Kern, A., Cambron, R. T., Lubey, G., Lester, C., & Vaughn, D. (2005). Structural and analytical characterization of three hydrates and an anhydrate form of risedronate. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(4), 893-911.
- 100 Spek, A. L. (2015). PLATON SQUEEZE: a tool for the calculation of the disordered solvent contribution to the calculated structure factors. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 71(1), 9-18.

Anexo 1. Espectros IR-ATR materias primas

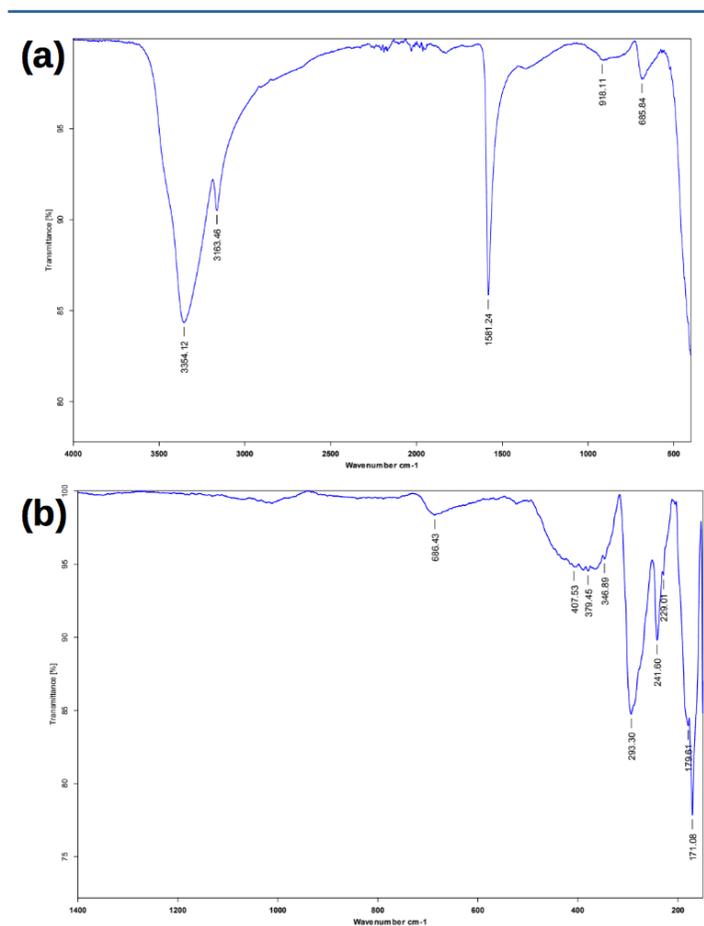


Figura A1.1 Espectros ATR del compuesto $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: (a) región completa (b) región IR-lejano

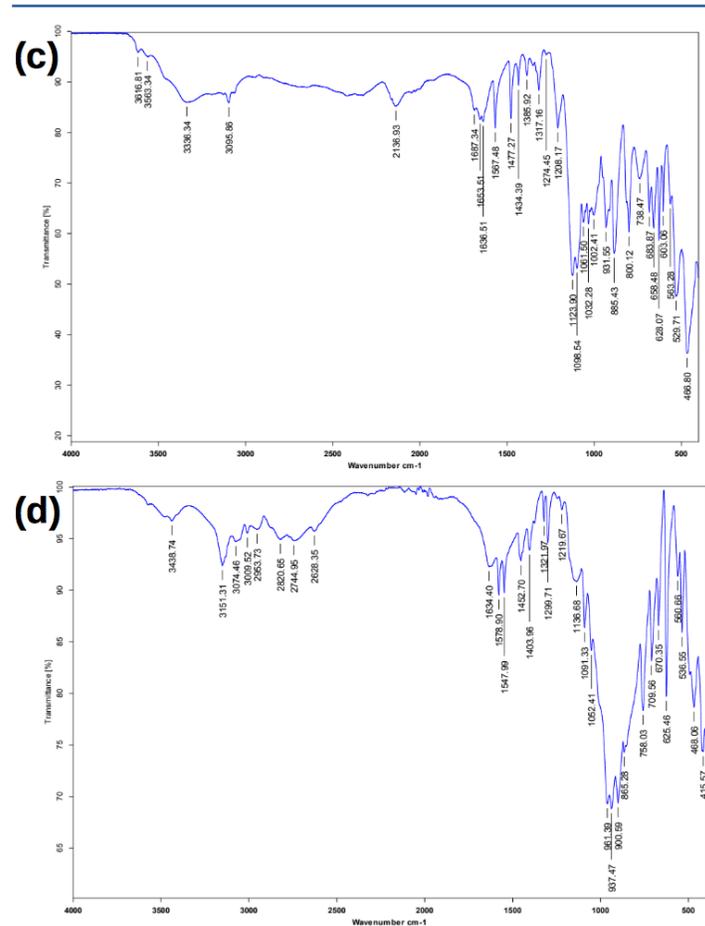


Figura A1.2 Espectros ATR de los ligandos bioactivos utilizados: (c) NaRis 2.5H₂O, (d) Ácido Zoledronico monohidratado

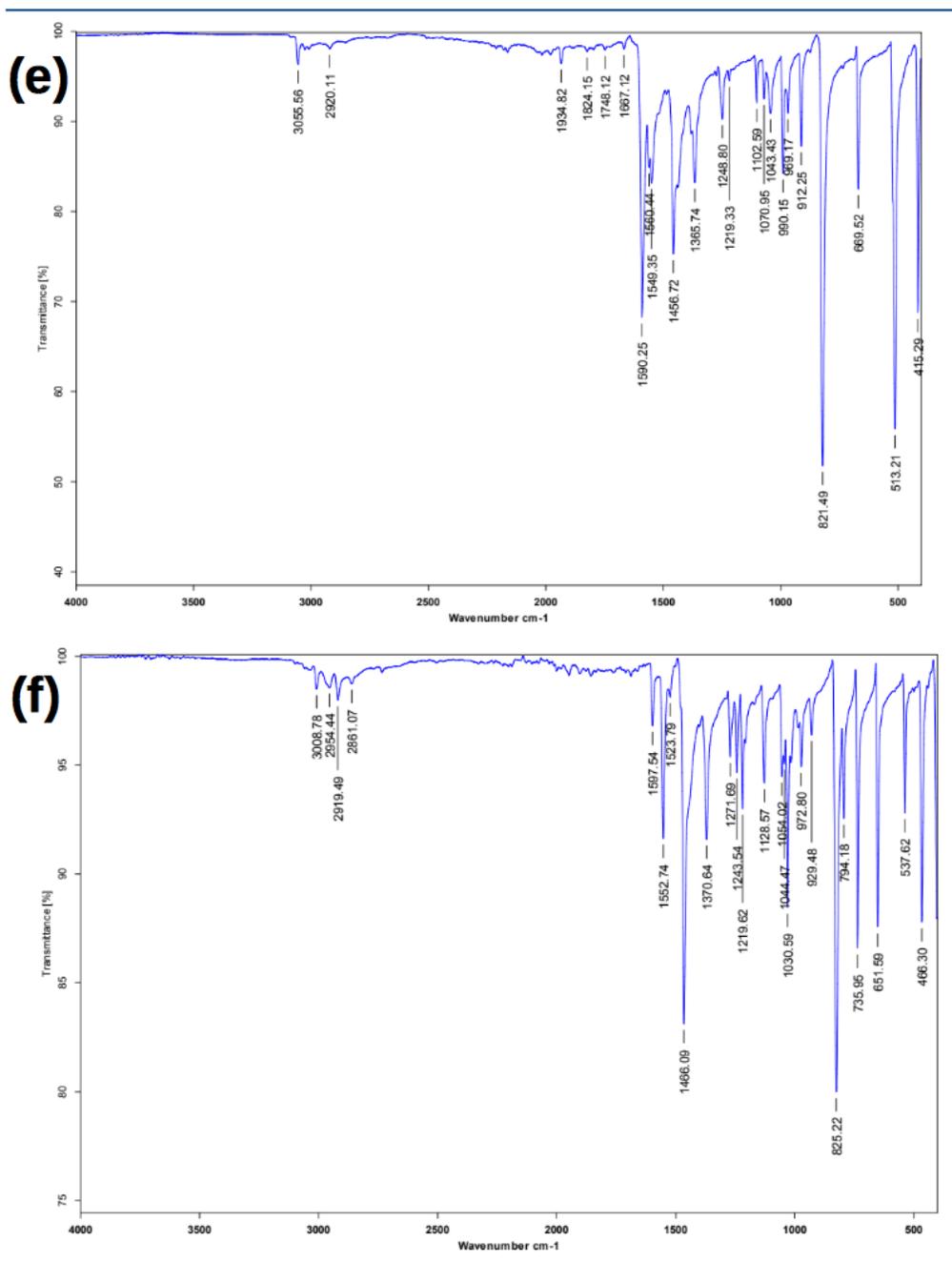


Figura A1.3 Espectros ATR de los ligandos intercaladores utilizados: (e) 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, (f) 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina

Anexo 2. Síntesis general compuestos ternarios y sus espectros IR-ATR, MS-ESI y RPE.

Síntesis general.

Se disolvió la cantidad deseada de precursor (**CuIA** o **CuIB**) en 30.0 mL de H₂O destilada en un matraz bola de 50.0mL y se dejó en agitación hasta la solubilización total del precursor, se dejó en agitación durante 30 min más después de la disolución. Por separado se disolvió en un vial con 4.0 mL de H₂O destilada el fármaco deseado y se añadió el volumen necesario de una disolución stock de NaOH (1 equivalente para RisNa 2.5H₂O y 2 equivalentes para A.Zol H₂O) para generar el fármaco dianiónico, se dejó en agitación esta disolución durante 30 min.

Manteniendo la agitación, se goteó la disolución de fármaco a la disolución de precursor en el matraz bola. Finalizada la adición de fármaco, la disolución se dejó en agitación durante 2 h, después se rotoevaporó a 1/3 del volumen original y se trasvasó la disolución resultante a un vaso de precipitado de fondo plano, se dejó en reposo la disolución.

En las síntesis llevadas a cabo en este trabajo se utilizó un stock de NaOH 0.26 M, 0.4 mmol de precursor (**CuIA** y **CuIB**) y 0.4 mmol de fármaco (Ris y Zol) para los cuatro compuestos ternarios sintetizados (**CuIA-Ris**, **CuIB-Ris**, **CuIA-Zol** y **CuIB-Zol**).

CuIA-Ris (ESI+)

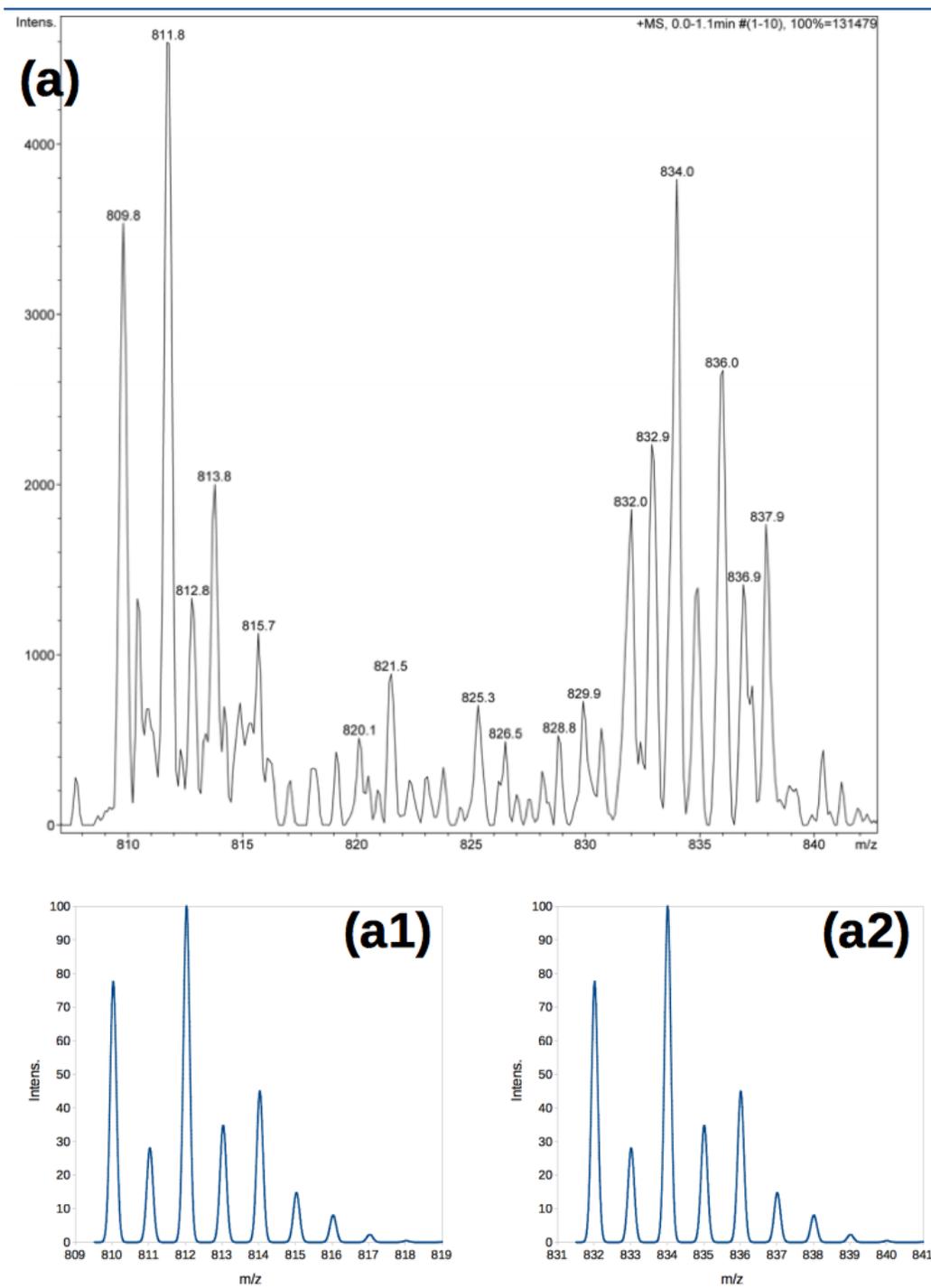


Figura A2.1 (a) Ampliación de la región 800-840 m/z del espectro ESI + experimental del compuesto **CuIA-Ris**. Se observan dos señales predominantes con su patrón isotópico: 811.8 m/z y 834.0 m/z que pueden corresponder a los iones moleculares $[C_{31}H_{33}ClCu_2N_5O_7P_2]^+$ y $[C_{31}H_{32}ClCu_2N_5NaO_7P_2]^+$ respectivamente. (a1) Patrón isotópico teórico calculado para $[C_{31}H_{33}ClCu_2N_5O_7P_2]^+$. (a2) Patrón isotópico teórico calculado para $[C_{31}H_{32}ClCu_2N_5NaO_7P_2]^+$. Se observan coincidencias, más no resolución isotópica total, entre las señales 811.8 m/z y 834.0 m/z del espectro experimental y los teóricos calculados (a1) y (a2).

CuIB-Ris (ATR y ESI+)

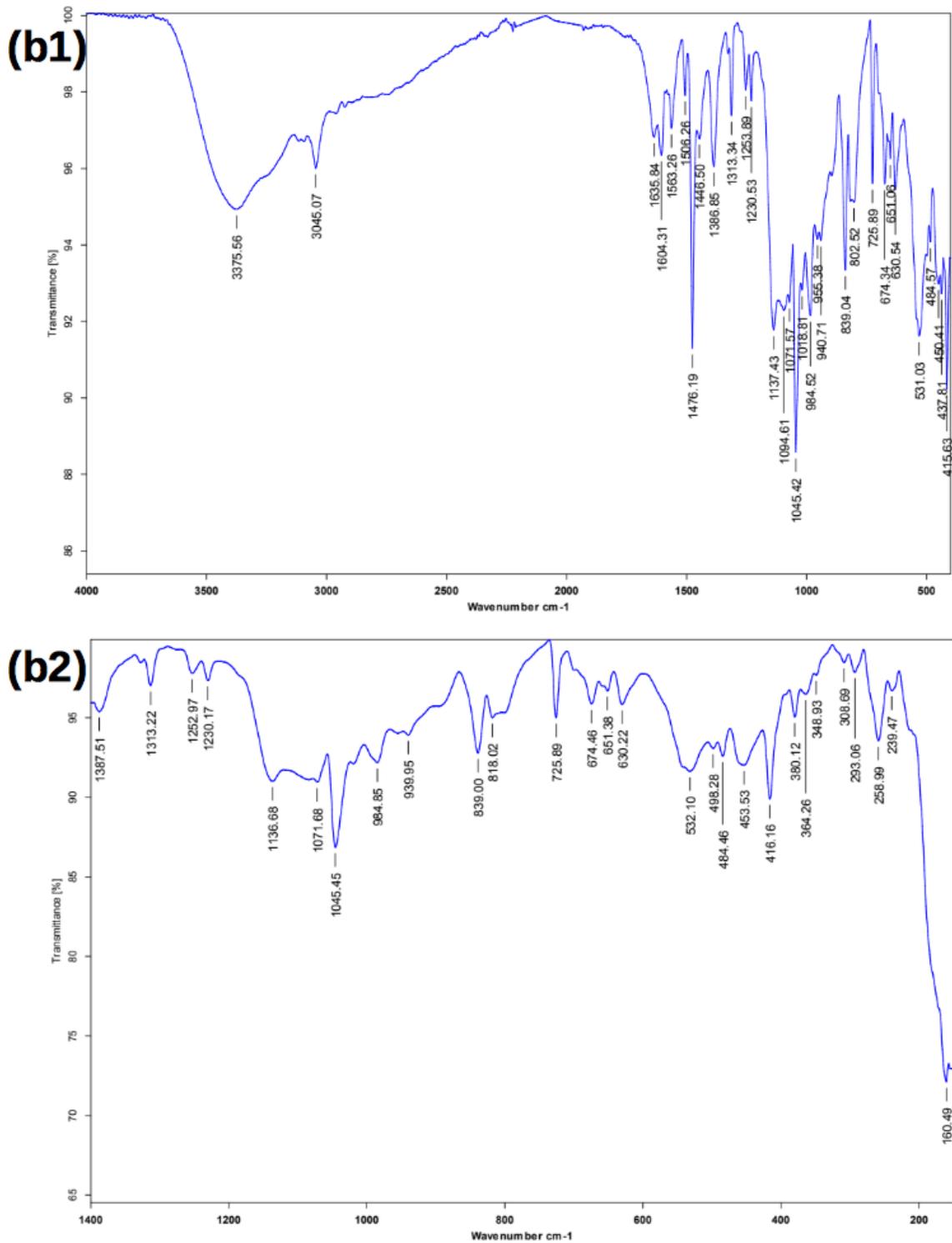


Figura A2.2 Espectros ATR del compuesto **CuIB-Ris**: (b1) región completa (b2) región IR-lejano

Sample Name CuIB-Ris Instrument esquire6000
Comment #14810

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	200 m/z	Scan End	1800 m/z
Capillary Exit	145.8 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	87.4
Accumulation Time	3344 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

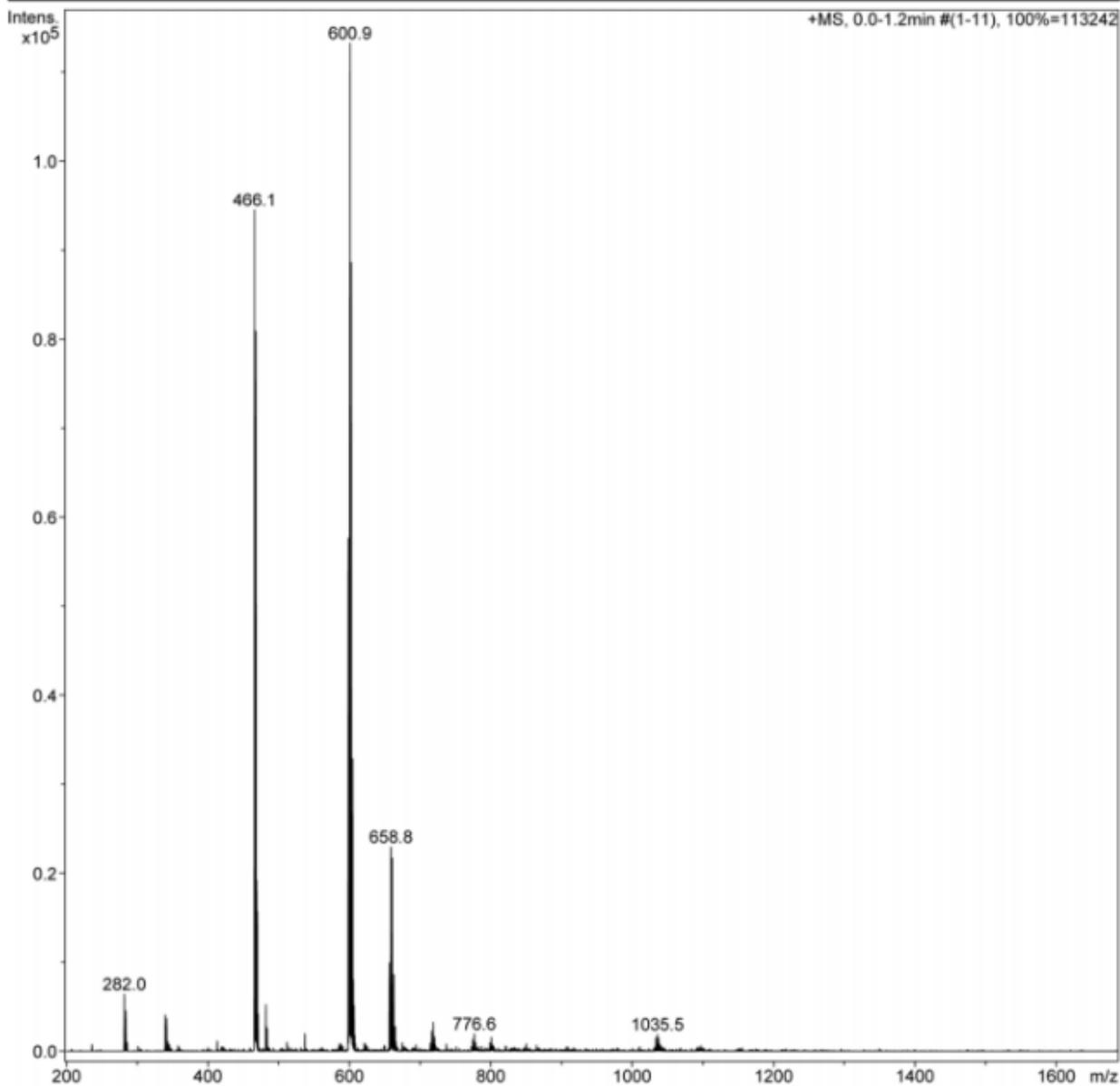


Figura A2.3 Espectro ESI + del compuesto **CuIB-Ris**, se observa el ión molecular $[C_{31}H_{32}Cu_2N_5O_7P_2]^+$ en 776.6 m/z

CuIA-Zol (ATR y ESI+)

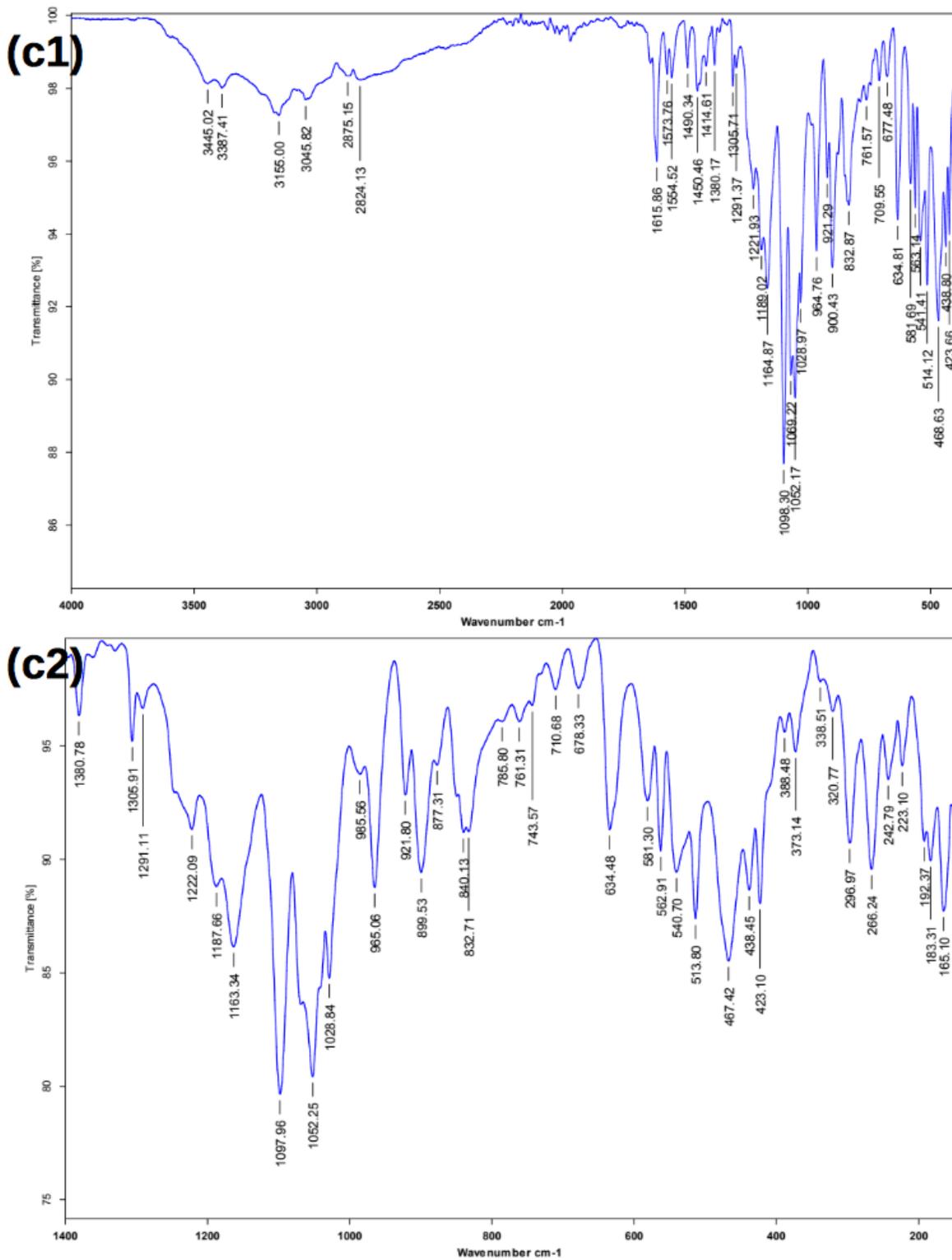


Figura A2.4 Espectros ATR del compuesto CuIA-Zol: (c1) región completa (c2) región IR-lejano

Sample Name CuIA-Zol
Comment #15315

Instrument esquire6000

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	200 m/z	Scan End	1800 m/z
Capillary Exit	145.0 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	86.5
Accumulation Time	38265 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

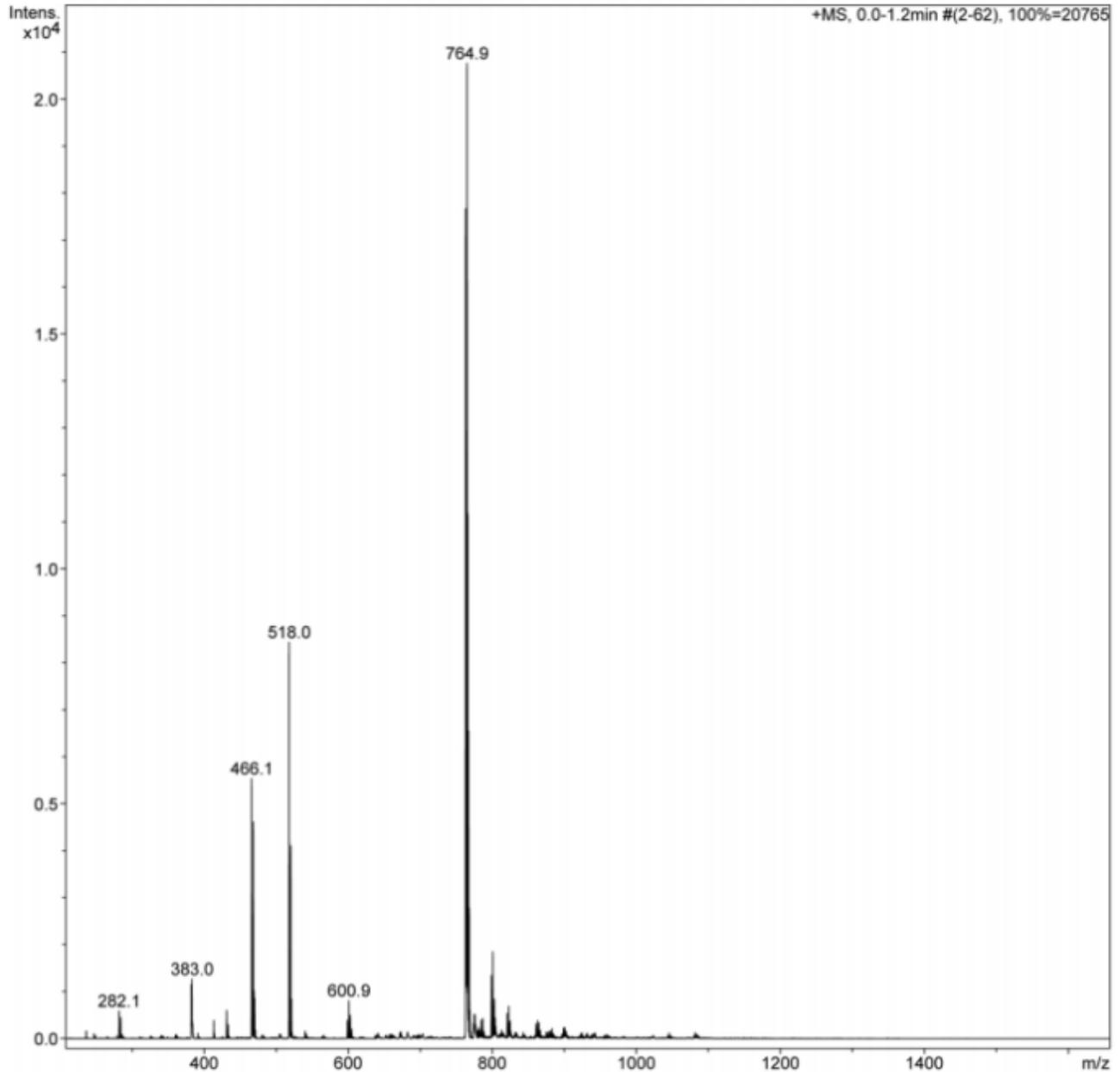


Figura A2.6 Espectro ESI + del compuesto **CuIA-Zol**, se observa el i3n molecular $[C_{29}H_{32}Cu_2N_6O_7P_2]^+$ en 764.9 m/z. Este i3n molecular es an3logo a las especies con Ris (776 m/z), en este caso se hace notar el menor peso del zoledronato comparado con el risedronato.

CuIB-Zol (ATR y ESI+)

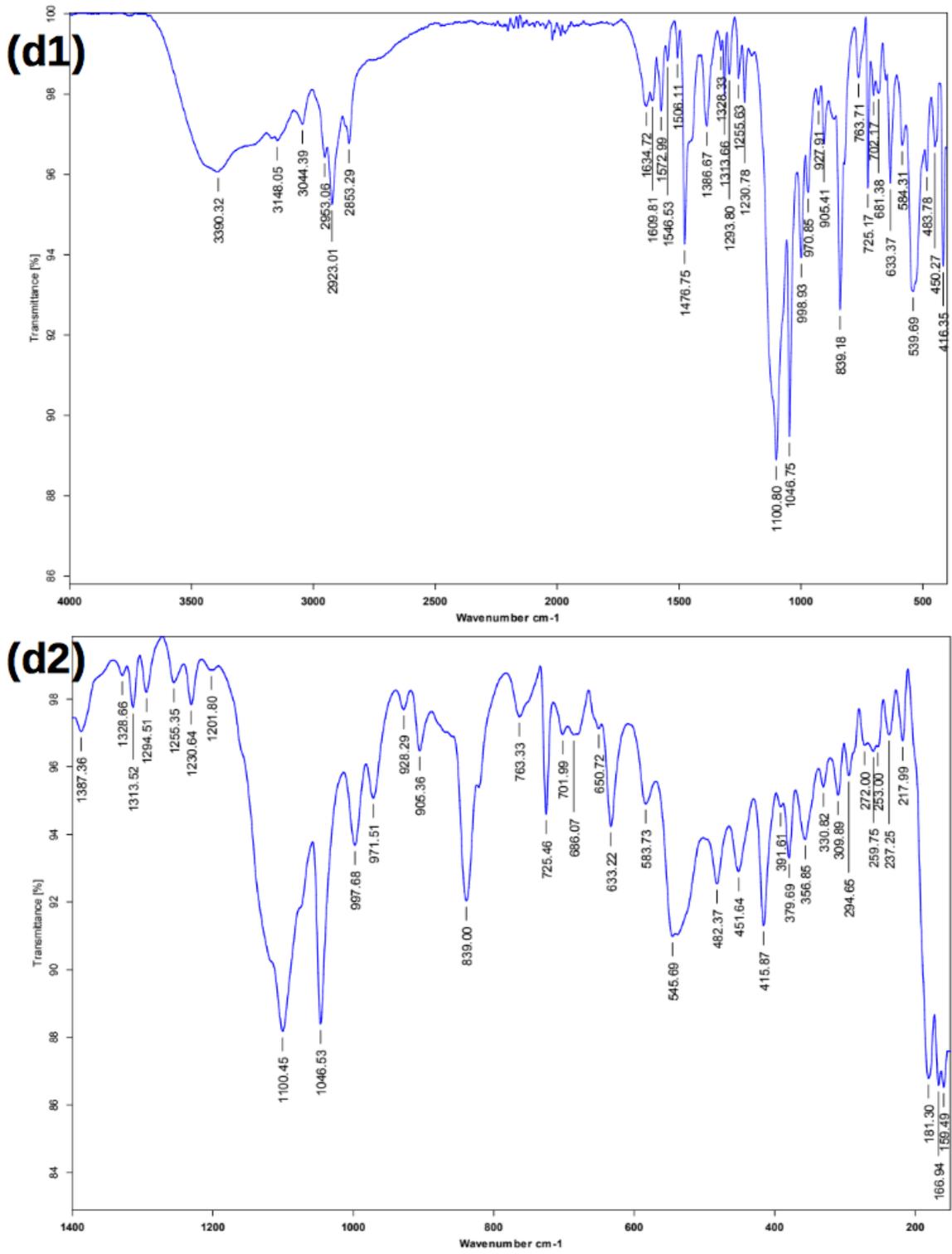


Figura A2.7 Espectros ATR del compuesto **CuIB-Zol**: (d1) región completa (d2) región IR-lejano

Sample Name	CulB-Zol	Instrument	esquire6000
Comment	#15316		

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	200 m/z	Scan End	1800 m/z
Capillary Exit	145.0 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	86.5
Accumulation Time	14137 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

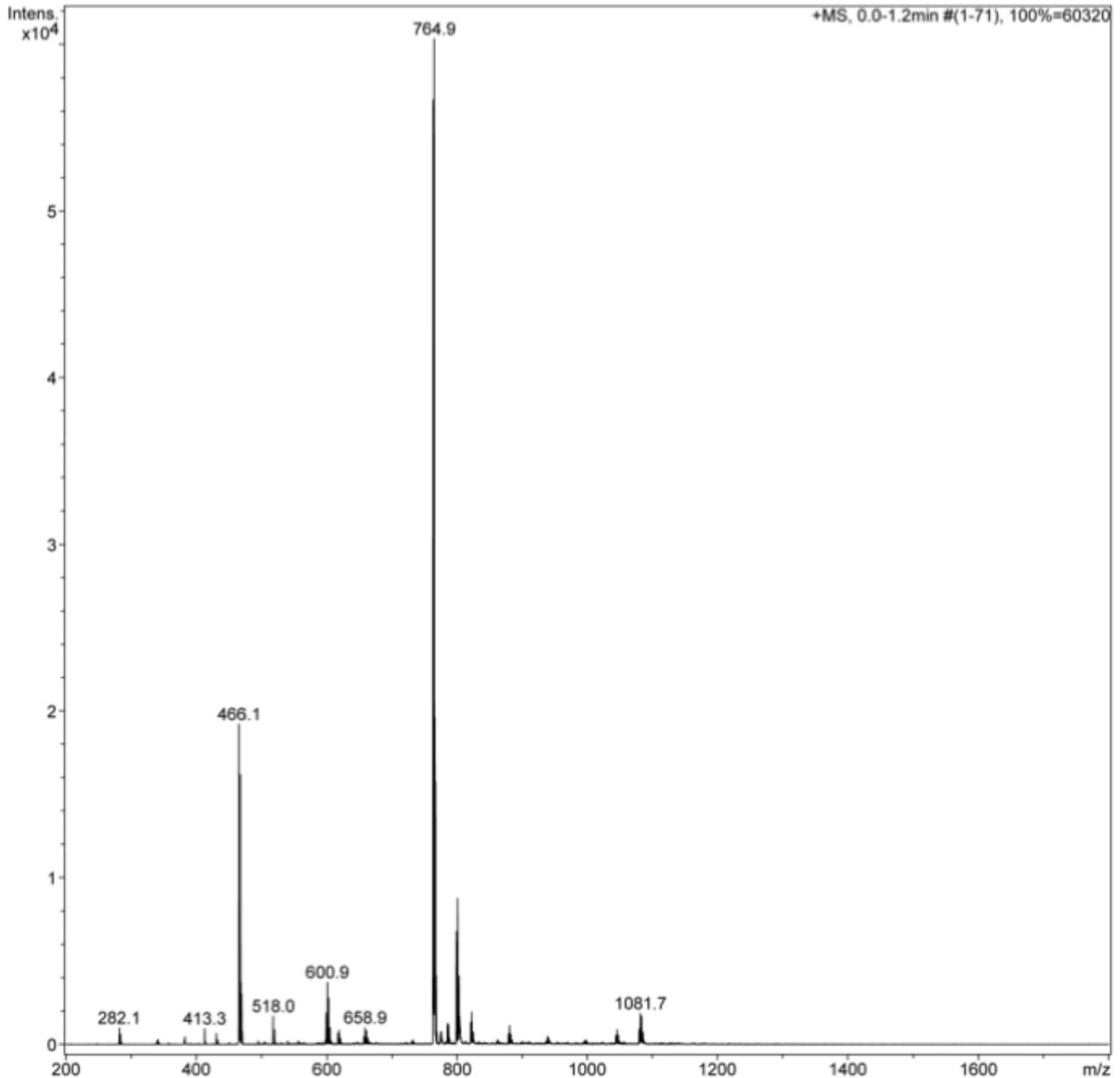


Figura A2.8 Espectro ESI + del compuesto **CulB-Zol**, se observa el ión molecular $[C_{29}H_{32}Cu_2N_6O_7P_2]^+$ en 764.9 m/z. Este ión molecular es análogo a las especies con Ris (776 m/z), en este caso se hace notar el menor peso del zoledronato comparado con el risedronato.

Espectros RPE

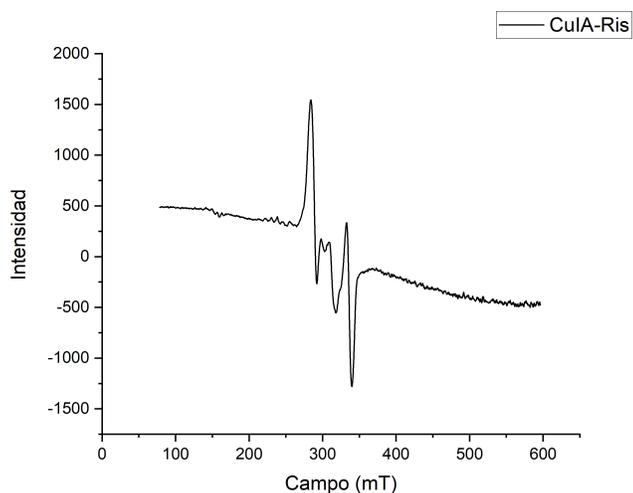


Figura A2.9 Espectro RPE (Banda X, frecuencia 9.5 GHz) del compuesto **CuIA-Ris** a una concentración 2 mM en una disolución de H₂O a 77K

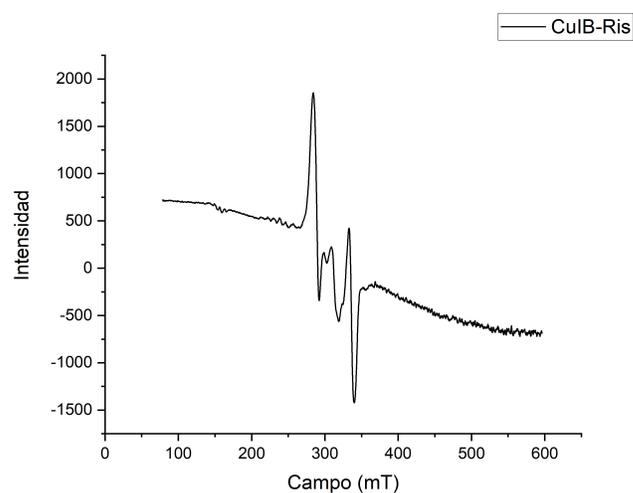


Figura A2.10 Espectro RPE (Banda X, frecuencia 9.5 GHz) del compuesto **CuIB-Ris** a una concentración 2 mM en una disolución de H₂O a 77K

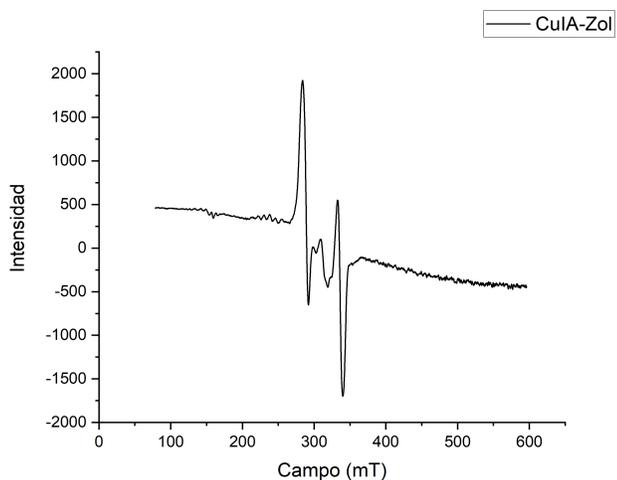


Figura A2.11 Espectro RPE (Banda X, frecuencia 9.5 GHz) del compuesto **CuIA-Zol** a una concentración 2 mM en una disolución de H₂O a 77K

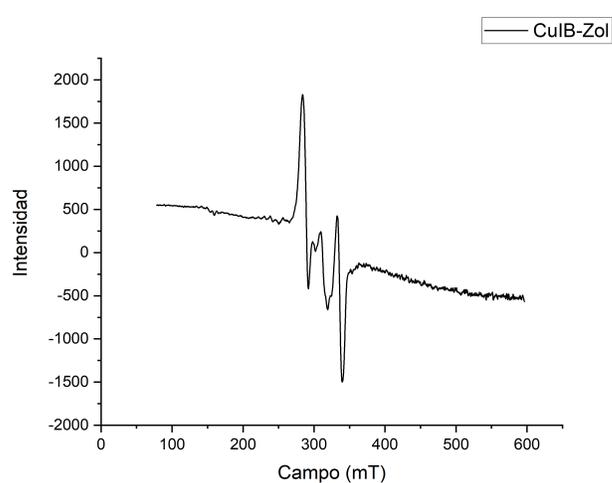


Figura A2.12 Espectro RPE (Banda X, frecuencia 9.5 GHz) del compuesto **CuIB-Zol** a una concentración 2 mM en una disolución de H₂O a 77K