



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**“DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES *IN VITRO* DE
NUEVOS COMPUESTOS CON POTENCIALES APLICACIONES BIOLÓGICAS
Y/O FARMACOLÓGICAS”**

Tesista

Farm. Graciela E. Escudero

Directoras

Dra. Evelina G. Ferrer

Dra. Patricia A.M. Williams

Año

2015

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de las Profesoras Dra. Evelina G. Ferrer y Dra. Patricia A.M. Williams

Año 2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las instituciones y personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral:

- A la Universidad Nacional de La Rioja (UNLAR) por el otorgamiento de subsidios y fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.
- Al Instituto de Bioquímica y Farmacia (IByF) del Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT) - UNLAR en el cual pude desarrollar parte del trabajo experimental.
- Al Director del CEQUINOR, Prof. Dr. Dr. Carlos O. Della Védova por permitirme desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral en el CEQUINOR.
- A la Dra Luciana Naso y la Biotec. Nancy Martini del CEQUINOR por su tiempo y por su labor en colaborar con este trabajo.
- Al personal técnico del CEQUINOR por todo su apoyo y colaboración incondicional.
- A mis directoras, la Dra. Evelina G. Ferrer y Dra. Patricia A.M. Williams, por sus importantes aportes a mi formación con toda su experiencia y por acompañarme siempre en la distancia con mucho cariño y dedicación.
- A Carlos por haberme apoyado, estimulado y colaborado constantemente durante la realización de esta tesis doctoral.
- A Carolina, que con su amor y dulzura, me dieron fuerzas en muchos momentos difíciles en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA DEPRESIÓN: DEFINICIONES Y MARCO CONCEPTUAL	1
1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADOS DEPRESIVOS: FORMAS CLÍNICAS	1
1.2. TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS	2
1.2.1. Los antidepresivos	2
1.2.2. El antidepresivo Sertralina	6
1.2.2.1. Propiedades fisicoquímicas:	6
1.2.2.2. Características farmacológicas	6
1.3. LOS METALES: El rol en la medicina	7
1.3.1 ZINC	8
1.3.1.1. Química del Zinc	8
1.3.1.2. Funciones fisiológicas del Zinc	9
1.3.1.3. El Zinc y la depresión	10
1.4. COMPLEJOS DE COORDINACIÓN	13
1.4.1. El Zinc formando parte de complejos de coordinación	15
1.5. LIGANDOS	15
1.5.1. Estrategias para modificar las propiedades fisicoquímicas de ingredientes farmacéuticos activos	15
1.5.1.1. Polimorfos y cocristales con sertralina	17
1.5.2 Ácido Cumarín-3-carboxílico (HCCA)	17
1.5.3. S-metil-L-cisteína	19
1.6. BIBLIOGRAFÍA	21

CAPÍTULO I. COMPLEJO IODO-SERTRALINA

1. 1. INTRODUCCIÓN	31
1.1.1. Objetivos	32
1.2. SÍNTESIS DE HIDROIODURO DE IODO SERTRALINA: $C_{17}H_{17}Cl_2I_2N$	32
1.3. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA	33
1.3.1. Estudio completo comparativo del espectro infrarrojo (espectro experimental vs simulaciones del espectro teórico) y geometrías moleculares.	33
1.3. 2. Caracterización por espectroscopía UV-vis	44
1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	45
1.4.1. Actividad antidepresiva. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test)	45
1.4.2. Actividad antitiroidea	47
1.4.2.1. Aspectos generales	47
1.4.2.2. Resultados	49
1.4. CONCLUSIONES	51
1.5. BIBLIOGRAFÍA	52

CAPÍTULO II. COMPLEJO DE Zn(II) CON SERTRALINA	54
2.1. INTRODUCCIÓN	57
2.1.1. Objetivos.	61
2.2. PREPARACIÓN DE (SerH₂)₂[ZnCl₄].	61
2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	62
2.3.1. Caracterización de la estructura mediante difracción de rayos X.	62
2.3.1.1. Monocristal	62
2.3.1.2. Polvo microcristalino	68
2.3.2. Estudios termogravimétricos (TGA) y de calorimetría diferencial de barrido (DSC)	73
2.3.3. Caracterización por espectroscopía FTIR y Raman	74
2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	80
2.4.1. Actividad antidepresiva.	80
2.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test)	80
2.4.1.2. Prueba de campo abierto (PCA)	82
2.4.1.3. Variación de peso	83
2.5. Actividad antimicrobiana	84
2.6. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB)	86
2.6.1. Resultados de la interacción	87
2.7. CONCLUSIONES	91
2.8. BIBLIOGRAFÍA	92
CAPÍTULO III. COMPLEJO DE Zn(II) CON S-METIL-L-CISTEÍNA	93
3.1. INTRODUCCIÓN	93
3.1.1. Objetivos	94
3.2. PREPARACIÓN DE BIS(S-METIL-L-CISTEINATO) DE ZN(II) (Zn(S-METILCISTEÍNA)₂)	95
3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	96
3.3.3. Caracterización por espectroscopía FTIR y Raman	96
3.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	99
3.4.1. Actividad antidepresiva.	99
3.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test) y Prueba de campo abierto (PCA)	99
3.4.1. Inhibición de Fosfatasas	102
3.4.2. Propiedades antioxidantes	103
3.5. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB)	105
3.6. CONCLUSIONES	107
3.7. BIBLIOGRAFÍA	109
CAPÍTULO IV. SAL SERTRALINA- CUMARÍN-3 CARBOXILATO	113
4.1 INTRODUCCIÓN	113
4.1.1. Objetivos	114
4.2. Preparación de cumarín 3-carboxilato de sertralonio, SerH₂⁺CCA⁻ (C₂₇H₂₂Cl₂NO₄)	115
4.3. Caracterización fisicoquímica	116
4.3.1. Caracterización de la estructura mediante difracción de rayos X.	116
4.3.2. Caracterización por espectroscopía FTIR	121
4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	124
4.4.1. Actividad antidepresiva.	124
4.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test)	124

4.4.1.2. Prueba de campo abierto (PCA)	126
4.5. Actividad antimicrobiana	126
4.6. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB)	129
4.7. CONCLUSIONES	132
4.8. BIBLIOGRAFÍA	134
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	137
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS	140
6.1. Caracterización fisicoquímica	140
6. 1.1 Análisis Elemental	140
6. 1.2 Análisis Termogravimétricos (TG) y Análisis Térmico Diferencial (DTA)	140
6.1.3 Espectros Infrarrojo (FTIR)	140
6.1.3.1. Métodos computacionales	141
6.1.4. Espectros Raman	142
6.1.5. Espectros Electrónicos (UV-vis)	142
6.2. Difracción de rayos X	143
6.2.1. Determinación de la estructura cristalina de $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$.	143
6.2.2. Determinación de la estructura cristalina de $(\text{SerH}_2)_2(\text{ZnCl}_4)$	144
6.2.2.1. Para el monocristal de $(\text{SerH}_2)_2(\text{ZnCl}_4)$	144
6.2.2.2. Datos de difracción de rayos-X en polvos	145
6.3. Estudios en Solución	145
6.4. Medida de la Capacidad Antioxidante	145
6.4.1. Actividad Secuestrante del Radical OH^\bullet	145
6.4.2. Ensayo de la actividad anti radical DDPH^\bullet	146
7. Fluorescencia. Interacción con albúmina sérica	146
8. Actividad Biológica	147
8.1. Determinación <i>in vitro</i> de la Inhibición de la Fosfatasa Ácida	147
8.2. Determinación de la Actividad Antimicrobiana	147
8.2.1. Cepas de bacterias y hongos	148
8.2.2. Preparación del inóculo	148
8.2.3. Preparación de soluciones	149
8.2.4. Determinación de la CIM por el método de dilución en agar	149
9. Actividad Antitiroidea	150
10. Actividad Antidepresiva	151
10.1. Animales	151
10.2. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test (FST))	151
10.3. Prueba de campo abierto (PCA) (Open Field Test)	152
10.4. Tratamientos	153
10.4.1. Complejo iodo-sertralina	153
10.4.2. Sal sertralina cumarín-3-carboxilato ($\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$)	154
10.4.3. Complejo $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$	155
10.4.4. Complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$	156
11. BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXO.	159
Publicaciones	159
Solicitud de patente	159

1. LA DEPRESION: DEFINICIONES Y MARCO CONCEPTUAL

La **depresión psíquica** puede ser definida como un cuadro clínico caracterizado por una serie de manifestaciones ideativas, de conducta y afectivas, con disminución de la autoestima, presencia de angustia y tristeza como síntomas predominantes, inhibición psicomotora y algunas manifestaciones somáticas típicas.

En forma más o menos frecuente, o insidiosamente otras veces, el paciente comienza a padecer abatimiento, tristeza, desgano, pérdida de interés por todo lo que lo rodea, e incapacidad para experimentar placer. La tristeza es habitualmente de intensidad progresiva, hasta llegar a veces a un estado de "*tristeza infinita*" como manifiestan algunos pacientes con depresión mayor. El pensamiento se vuelve lento, la ideación monotemática, con expresiones de dolor, culpa y vivencias de ruina inminente. Al mismo tiempo se comienza a descuidar las obligaciones laborales y familiares, con desaliño, falta de aseo, y manifestaciones similares, creándose un agudo problema social. También es factible observar diversos trastornos físicos y orgánicos como anorexia, pérdida de peso, trastornos funcionales digestivos y respiratorios, insomnio, falta de energía, embotamiento intelectual y franca disminución de la libido. El cuadro clínico se completa finalmente con ideas de autodestrucción, pensamientos relacionados con la muerte y el suicidio.

La depresión psíquica es una de las enfermedades psiquiátricas más frecuentes, afectando al 5-10% de la población en algún período de la vida. Se estima que es más frecuente en las mujeres¹. Por supuesto, la enfermedad depresiva debe ser diferenciada claramente del estado de decepción, tristeza o desmoralización que también frecuentemente afectan al ser humano por diferentes motivos, propios del normal transcurrir de la vida y que no constituyen una enfermedad psiquiátrica.

1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADOS DEPRESIVOS FORMAS CLÍNICAS

La depresión abarca varios trastornos relacionados con el estado de ánimo, y según el Manual de Diagnóstico y Estadística de Desórdenes Mentales en su cuarta edición revisada² publicada por la Asociación Americana de Psiquiatría, se clasifica en los siguientes tipos:

- Desorden de depresión mayor
- Desorden bipolar (I y II)
- Desorden distímico
- Desorden ciclotímico
- Desórdenes del estado de ánimo debido a condiciones médicas y/o abuso de sustancias

La depresión se diferencia de los cambios normales del estado de ánimo por su sintomatología, duración y severidad.

De acuerdo con las definiciones del DSM-IV-TR, las manifestaciones del trastorno de depresión mayor, o depresión unipolar o depresión clínica, incluyen ya sea el ánimo deprimido o la pérdida de placer por lo menos durante dos semanas seguidas, y ocurren en conjunción con cambios del apetito o de peso, cambios en los hábitos de sueño, agitación psicomotora, fatiga, sentimientos de inutilidad o culpa excesiva, dificultad para concentrarse y/o pensamientos suicidas.

1.2. TRATAMIENTOS TERAPEUTICOS

1.2.1. Los antidepresivos (ADs)

La acción común de los fármacos ADs es favorecer la neurotransmisión monoaminérgica, sin embargo sus mecanismos de acción varían de unas moléculas a otras. En base a estas formas diferentes de actuar, se puede realizar una clasificación funcional de los antidepresivos categorizándolos en tres grupos³ (Tabla 1):

- 1) AD que inhiben las enzimas que metabolizan a neurotransmisores
- 2) AD que bloquean la recaptación de uno o más neurotransmisores
- 3) AD que bloquean los receptores presinápticos inhibidores

El *primer grupo*, cuya acción es la inhibición de las enzimas que metabolizan a neurotransmisores, está representado por los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs). Su mecanismo de acción es el de interferir en el metabolismo de la noradrenalina, la serotonina y la dopamina, incrementando su disponibilidad.⁴ Los IMAOs clásicos son no selectivos e irreversibles. Los nuevos son selectivos y reversibles para la MAO A o la MAO B, siendo la moclobemida el fármaco representativo de los inhibidores selectivos de la MAO A.⁵

El *segundo grupo*, los antidepresivos que bloquean uno o más transportadores de recaptación de neurotransmisores, esta representado por: los antidepresivos tricíclicos (ADT), los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), los agentes duales, los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (IRNA) y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NA) y dopamina (DA).⁶

Los ISRS son los fármacos más utilizados actualmente. Inhiben selectivamente la recaptación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). Este efecto produce en primer lugar, un incremento de 5-HT en la región somatodendrítica, seguido de una desensibilización de los autoreceptores de serotonina 5-HT_{1A}, un incremento de la liberación de 5-HT del terminal nervioso, y finalmente la desensibilización de receptores postsinápticos serotoninérgicos.⁷ Los agentes duales son fármacos que se caracterizan por su acción mixta a nivel noradrenérgico y serotoninérgico. Están representados por la venlafaxina y la duloxetina. Ambos inhiben la recaptación de 5-HT, de NA y en menor medida de la DA, aunque con diferente intensidad. Así la duloxetina a bajas dosis ya ejerce acción dual⁸, mientras que la venlafaxina necesita dosis más altas para realizar esta acción mixta.

Los IRNA están representados por la reboxetina. Este antidepresivo ejerce un bloqueo selectivo de la recaptación de NA y presenta un buen perfil de seguridad y buena tolerancia.⁹

Los inhibidores de la recaptación de NA y DA tienen como molécula de referencia al bupropion. Su mecanismo de acción se caracteriza por incrementar el recambio de NA, y bloquear la recaptación de DA. No interacciona con receptores histamínicos, ni colinérgicos, ni alfa-adrenérgicos¹⁰. Esta molécula no se usa como un antidepresivo de amplio espectro¹¹, en cambio se utiliza para la deshabituación al tabaquismo.¹²

El *tercer grupo* es el que ejerce el bloqueo de los receptores presinápticos inhibidores. Estos ADs producen una acción antagonista a nivel de los adrenoreceptores alfa 2 presinápticos, consiguiendo un incremento de la liberación de NA y 5-HT. El antidepresivo que representa a este grupo en la actualidad es la mirtazapina, denominado en la literatura científica como “NaSSA” del ingles “*Noradrenergic and specific Serotonergic antidepressant*”¹³. La mirtazapina bloquea los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ y los alfa 2- adrenoreceptores. Gracias a este efecto farmacodinámico se minimizan los efectos secundarios de tipo gastrointestinal y de inquietud psicomotriz, característicos de los ISRS.¹⁴

Tabla 1: Clasificación funcional de los antidepresivos

<i>Función</i>	<i>ANTIDEPRESIVO</i>
Inhiben enzimas que metabolizan Neurotransmisores Inhibidor MonoAmino Oxidasa (IMAO)	ISOCARBOXAZIDA FENELZINA TRANILCIPROMINA
Bloquean la recaptación de neurotransmisores Bloqueo del transporte de noradrenalina (ISRNA) Bloqueo del transporte de serotonina (ISRS) Bloqueo del transporte de dopamina	AMOXAPINA DESIPRAMINA NORTRIPTILINA AMTRIPTILINA CITALOPRAM CLOMIPRAMINA FLUOXETINA FLUVOXAMINA IMIPRAMINA PAROXETINA SERTRALINA TRIMIPRAMINA VENLAFAXINA
Bloquean los receptores 5-HT_{2A}	MIRTAZAPINA NEFAZODONA TRAZODONA

Clasificación de los antidepresivos según su mecanismo de acción, tomado de Richelson y colaboradores.¹⁵

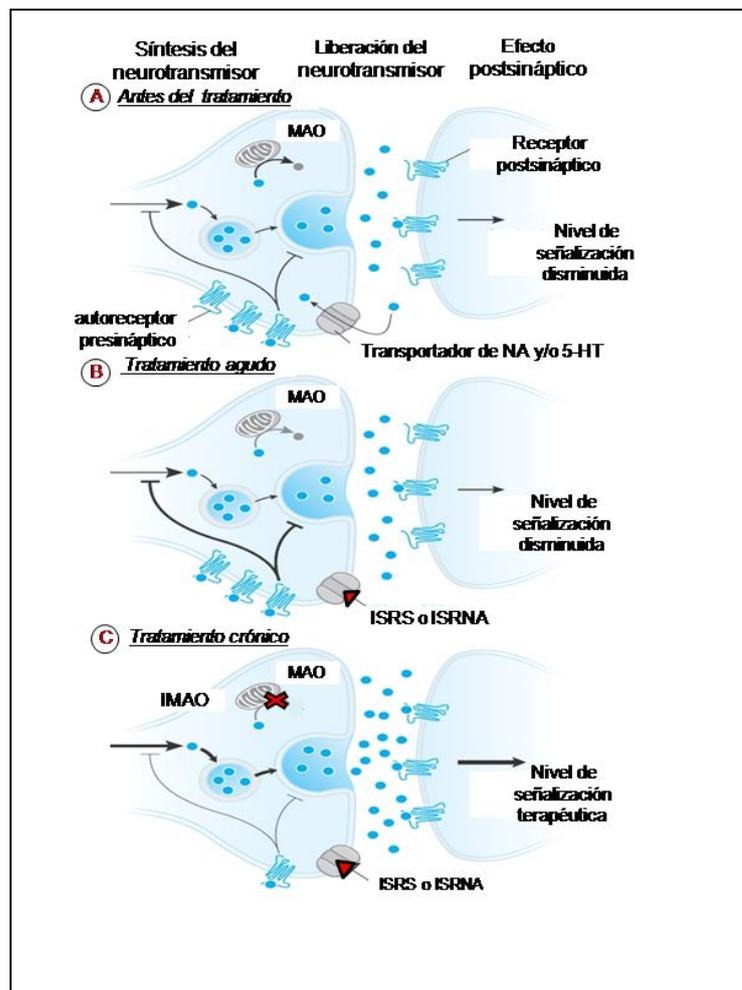


Figura: 1 En la figura se describe: 1) la *neurona presináptica*, en donde se realiza la síntesis del neurotransmisor (NT), su liberación y también su metabolización enzimática por la monoaminoxidasa (MAO), 2) la *neurona postsináptica*, sobre la cual se produce un efecto por la unión del NT con su receptor específico, y 3) el *espacio sináptico*, el cual es la distancia que existe entre ambas neuronas y por donde difunde el NT. Se describe también en la neurona presináptica los autoreceptores o receptores presinápticos y el transportador del NT (Noradrenalina o NA, serotonina o 5-HT); el cual permite la captación o ingreso del NT una vez liberado, hacia el interior de la neurona presináptica.

- (A) *Antes del tratamiento*: el paciente con depresión posee una disminución de la cantidad de NT en el espacio sináptico, y consecuentemente, una funcionalidad neuronal disminuida.
- (B) *Tratamiento agudo*: con el inicio del tratamiento con antidepresivos, se produce un bloqueo del transportador de NT (NA y 5-HT), lo cual desencadena en un inicial

aumento de NT en el espacio sináptico y consecuentemente y aumento de la transmisión nerviosa.

(C) *Tratamiento crónico*: al continuar el tratamiento con antidepresivos, se estabiliza el aumento de NT en espacio sináptico, por bloqueo del transportador de NT por los antidepresivos, produciéndose un efecto antidepresivo.

1.2.2. El antidepresivo Sertralina

1.2.2.1. Propiedades fisicoquímicas:



Figura 2.

Nombre sistemático (IUPAC): (1S,4S)-4-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenamine hydrochloride (1:1)

Nombre químico: hidrocloreuro de sertralina

Formula Molecular: $C_{17}H_{17}Cl_2N$

Peso molecular: 342,69

Punto de fusión experimental: 245 °C

Solubilidad Experimental: soluble en DMSO y en agua (3.5mg/L)

Referencia: ChemSpider (Royal Society of Chemistry)

1.2.2.2. Características farmacológicas:

La sertralina es un potente y selectivo inhibidor del mecanismo de recaptación de serotonina en la terminal presináptica, con lo que se potencia el efecto de este neurotransmisor. Su efecto es muy leve sobre la recaptación neuronal de noradrenalina y dopamina.^{16,17}

Desde el punto de vista farmacocinético, la sertralina se absorbe lentamente después de su administración por vía oral, con un pico de su concentración en plasma a las 6-8 h. Su concentración en plasma se relaciona linealmente con la dosis, con una vida media de eliminación de 24-26 h. Además, se une extensamente a las proteínas del plasma y tiene un elevado volumen de distribución.^{18,19}

Además, la acumulación más rápida de sertralina en los niveles plasmáticos en el estado estable (aproximadamente una semana de la administración diaria¹⁹ en comparación con fluoxetina, por ejemplo, sugiere un inicio del efecto antidepresivo más rápido concordante con la acción terapéutica.²⁰

En relación al metabolismo, la sertralina sufre un extenso proceso metabólico en su primer paso hepático, cuyo metabolito principal es el N-desmetil-sertralina, el cual tiene una vida media en plasma aproximadamente de 62 a 104 h.¹⁹ Este metabolito parece carecer de propiedades de inhibir la recaptación de serotonina en estudios *in vitro* e *in vivo*.²¹

La sertralina ha demostrado efectos antidepresivos en estudios preclínicos²². Estudios clínicos han demostrado su eficacia en el tratamiento de la depresión mayor y trastornos de ansiedad, como la ansiedad social, estrés post-traumático, pánico, trastorno obsesivo compulsivo y trastorno de ansiedad generalizada.^{23,24}

En relación a sus efectos adversos, los más frecuentes incluyen alteraciones gastrointestinales, como por ejemplo, náusea, dispepsia, diarrea y otras, como dolor de cabeza, temblor, sequedad de boca, mareos y somnolencia o insomnio.²⁴ Además, se ha descrito disfunción sexual.²⁵

1.3. LOS METALES: El rol en la medicina

Desde hace algunos años los metales han adquirido un interés creciente en la salud humana por cuatro grandes aspectos:

- Los requerimientos nutricionales
- Las enfermedades relacionadas con los mismos
- Los efectos tóxicos
- El uso para el diagnóstico y uso terapéutico

Los iones metálicos son necesarios para muchas funciones bioquímicas críticas en los seres humanos. La escasez de algunos iones metálicos puede conducir a la enfermedad. Por ejemplo, la anemia perniciosa resultante de la deficiencia de hierro²⁶, el retraso del crecimiento derivado de la dieta insuficiente de zinc²⁷ y enfermedades del

corazón en los lactantes debido a la deficiencia de cobre.^{28,29} La capacidad de reconocer, comprender a nivel molecular, y el tratamiento de enfermedades causadas por la función inadecuada de iones metálicos constituye un aspecto importante de química bioinorgánica medicinal.

También los iones metálicos pueden inducir toxicidad en los seres humanos, siendo como ejemplos clásicos las intoxicaciones de los metales pesados como el mercurio y el plomo.^{30,31}

Incluso los iones metálicos esenciales pueden ser tóxicos cuando están presentes en exceso, Por ejemplo, el hierro es un tóxico común en el hogar como resultado de la ingestión accidental, por lo general en los niños del suplemento dietético sulfato ferroso.³² La comprensión de la bioquímica y la biología molecular de los recursos naturales de los iones metálicos, sus mecanismos de desintoxicación, y el diseño y la aplicación de un agente quelante de iones específicos para el tratamiento de las intoxicaciones de metal, son dos componentes de un segundo aspecto importante de la nueva ciencia que se está desarrollando en la interfaz de la química bioinorgánica y la medicina.

Otro aspecto menos conocido, es el hecho de que los iones metálicos que se requieren en las funciones biológicas, pueden ser empleados como producto farmacéutico, con una función farmacológica. Dos fármacos a base de metales, sin una función biológica natural conocida, como el Pt (cisplatino) y Au (auranofina), son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer genitourinario y de cabeza y cuello, y artritis reumatoidea, respectivamente.^{33,34}

1.3.1 ZINC

1.3.1.1. Química del Zinc

Elemento químico de símbolo Zn, número atómico 30 y peso atómico 65,37. Es un metal de color gris, dúctil y maleable. Se conocen 15 isótopos, cinco de los cuales son estables y tienen masas atómicas de 64, 66, 67, 68 y 70. Cerca de la mitad del zinc común se encuentra como isótopo de masa atómica 64.

Es un metal químicamente activo. Puede encenderse con alguna dificultad produciendo una flama azul verdosa en el aire y liberando óxido de zinc en forma de humo. El zinc metálico en soluciones ácidas reacciona liberando hidrógeno para formar iones zinc, Zn^{2+} . Se disuelve también en soluciones fuertemente alcalinas para formar

iones dinegativos de tetrahidroxozincatos, $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$, escrito algunas veces como ZnO_2^{2-} en las fórmulas de los zincatos.

El zinc es siempre divalente en sus compuestos, excepto algunos cuando se une a otros metales, que se denominan aleaciones de zinc. Forma también muchos compuestos de coordinación. En la mayor parte de ellos la unidad estructural fundamental es un ion central de zinc, rodeado por cuatro grupos coordinados dispuestos espacialmente en las esquinas de un tetraedro regular.³⁵

1.3.1.2. Funciones fisiológicas del Zinc

El zinc, en su forma de catión divalente es uno de los elementos traza esenciales más abundante en el cuerpo humano, con múltiples funciones.

A comienzos de la década de 1930 mediante estudios en animales, y posteriormente en humanos, ya se habían demostrado las consecuencias de la deficiencia por Zn(II), demostrando así su esencialidad.^{36,37.}

El Zn(II) al ser un ión intracelular se encuentra en su mayoría en el citosol. Su cantidad en el individuo adulto oscila entre 1 y 2,5 g³⁸, siendo el segundo oligoelemento en relación a la cantidad total en el organismo, siendo superado tan sólo por el hierro.³⁹

Se encuentra presente en todos los órganos, tejidos, fluidos y secreciones del cuerpo humano.⁴⁰ Aproximadamente el 83% del Zn(II) en el cuerpo está en músculo y hueso, y el 95% se encuentra a nivel intracelular. No existe un lugar anatómico específico que funcione como reserva de Zn(II) y por ende no hay reservas convencionales en tejidos que puedan ser liberadas o almacenadas en respuesta a variaciones en la dieta.⁴¹

Para valorar su estatus en el organismo se usan principalmente como biomarcadores los niveles en suero, plasma y eritrocitos.^{38,42,43,44}

Las distintas funciones que cumple el Zn(II) (catalítica, estructural y de regulación) definen el papel biológico que desempeña el mismo. Actualmente se conoce que más de 100 enzimas necesitan Zn(II) para su función catalítica. A diferencia de otros elementos traza, se pueden encontrar ejemplos de enzimas que requieren Zn(II) en las seis clases (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas).⁴⁵ Por ende, participa en una gama de procesos bioquímicos relacionados con el metabolismo humano y no es extraño que múltiples funciones fisiológicas y metabólicas se vean alteradas cuando ocurre su deficiencia.

En su rol estructural el Zn(II) estabiliza la estructura terciaria de enzimas, dándoles una forma conocida como "dedos de zinc", las cuales se unen al ADN para la

transcripción y expresión génica⁴⁶. Se ha estimado que el 3 % de los genes codifican proteínas contienen dedos de Zn.⁴⁷

Finalmente, los iones de zinc intracelulares cumplen una función reguladora activando o inhibiendo ciertos factores que son responsables de regular expresión genética.⁴⁸

En el cerebro de los mamíferos, además de unirse con proteínas (95%) formando metaloproteínas en neuronas y células gliales, hay un pool de Zn probablemente en forma iónica localizado en las vesículas sinápticas.⁴⁹ Las neuronas que contienen iones Zn en las vesículas de sus terminaciones presinápticas y que se ubican en la corteza, amígdala e hipocampo son principalmente neuronas cuyo neurotransmisor es el glutamato (neuronas glutamatérgicas).^{50,51} Estas tres regiones son las que tienen mayores concentraciones de Zn en el cerebro.⁵⁰ En la médula espinal hay zonas de neuronas enriquecidas con Zn, en donde la mayoría contienen como neurotransmisor al ácido gamma-aminobutírico (GABA), algunas glutamato y algunas pocas glicina. Esta coexistencia del Zn con diferentes aminoácidos neurotransmisores indicaría la participación del Zn en procesos sensoriales y motores a nivel de la médula espinal.⁵²

El Zn llega al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica.⁵³ En el cerebro, el proceso de captación del Zn desde los líquidos extracelulares hacia las neuronas y células gliales, en parte, es regulado por la familia de transportadores Zip (**Zrt Irt-like Protein**), y su salida de las neuronas o captación de las vesículas está regulada por la familia de transportadores Zn (**ZnT**).^{53,54,55}

En las sinapsis, la liberación de Zn está relacionada con la modulación de la neurotransmisión por glutamato, GABA y glicina.^{54,56,57} El efecto mejor caracterizado del Zn en las sinapsis nerviosas, se relaciona con su efecto inhibitorio sobre los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA).^{58,59}

1.3.1.3. El Zinc y la depresión

La hipótesis que relacionaba una deficiencia de Zn con la depresión fue inicialmente sugerida en 1990 cuando McLoughlin y Hodge, Maes y cols, y Nowak^{60,61,62} encontraron niveles significativamente bajos de Zn en pacientes con depresión en relación con las observaciones en pacientes controles. Posteriormente, esta hipótesis fue confirmada en diferentes tipos de depresiones. Además, estos estudios demostraron que las concentraciones de Zn podrían diferir dependiendo de la comorbilidad, el estado del paciente o la severidad de la depresión.^{63,64,65,66}

Además un estudio clínico publicado por Hansen y colaboradores⁶⁷ indicaba la existencia de niveles bajos de Zn en sangre en pacientes en tratamiento con depresión resistente. Posteriormente, también se encontraron niveles disminuidos de Zn en pacientes con depresión y síntomas de depresión preparto y postparto.^{60,68,69}

La rápida y elevada cantidad de evidencias experimentales han determinado experimentalmente que la deficiencia de Zn induce una conducta similar a la depresión en un nuevo modelo de depresión animal. Experimentalmente, la deficiencia de Zn se alcanza por una dieta que contiene 0,5-6 mg Zn/kg por lo menos durante 2 a 4 semanas.^{70,71} Estos estudios demostraron que la dieta con disminución de Zn incrementaba el tiempo de inmovilidad en el Test de Natación Forzada (*forced swim test*) y el test de la suspensión de la cola (*tail suspension test*). Además, los estudios con deficiencia de Zn demostraron anorexia, conducta similar a la ansiedad y reducción del consumo de sucrosa en ratas, lo cual indica una aparente anhedonia (uno de los síntomas comunes observados en la depresión humana).⁷²

Otros estudios indicaron que la deficiencia con Zn podría inducir una disminución en el número de células progenitoras y neuronas inmaduras en el hipocampo animal, indicando una disminución de la neurogénesis y sinaptogénesis.^{73,74,75}

También, se realizaron trabajos para estudiar si el Zn tenía efectos antidepresivos. La mayoría de los descubrimientos de los efectos antidepresivos del Zn o su relación en el mecanismo de acción de fármacos antidepresivos provienen de los estudios preclínicos en ratas y ratones, empleando sulfato de zinc, cloruro de zinc o hidroaspartato de zinc (Figura 3).

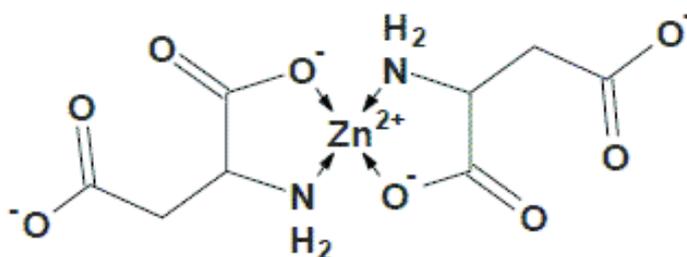


Figura: 3: Estructura química del hidroaspartato de zinc (HZnAsp), conteniendo el ion zinc (Zn^{2+}).

Un estudio en ratas y ratones demostró que combinando el Zinc ($ZnSO_4$) (30 mg/kg) con imipramina (30 mg/kg) y administrados en forma subaguda a las 24, 5, y 1 h antes de la prueba de natación forzada mostraron efectos antidepresivos en ambas especies. Además, también este estudio demostró que el tratamiento combinado con dosis inefectivas de imipramina y Zn (1 y 5 mg/kg, respectivamente) producía efectos antidepresivos.⁷⁶ Por otra parte dosis inefectivas de imipramina (15 mg/kg) combinada con dosis también inefectivas de Zn (hidroaspartato de Zn) (10 mg/kg) administradas una hora antes del test, tuvieron efectos antidepresivos en ratones en la prueba de natación forzada. Este estudio sostiene que la inhibición del receptor NMDA participaría en este efecto antidepresivo (Figura 4).⁷⁷

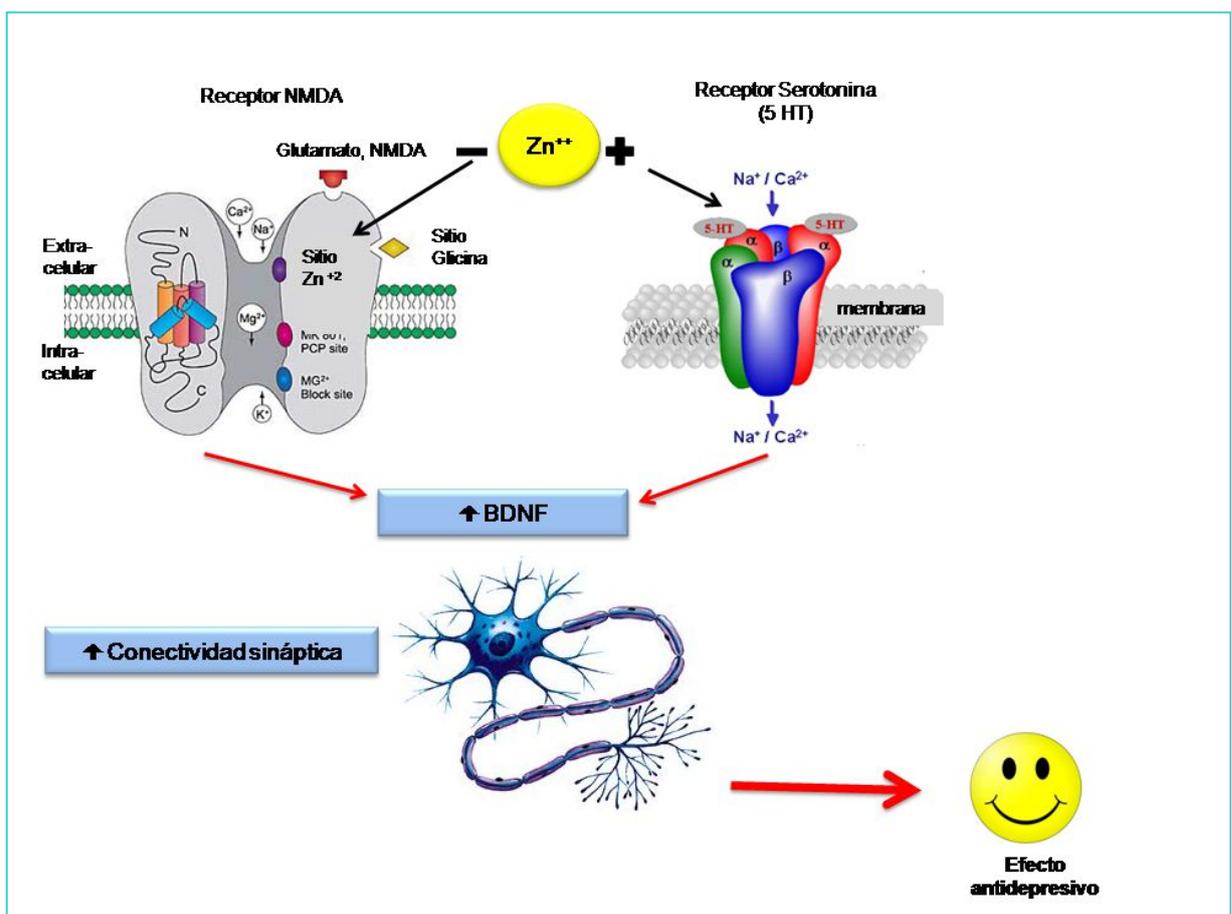


Figura 4: El Zn inhibe los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) del glutamato y aumenta la transmisión de serotonina, lo que conduce a través de diferentes mecanismos celulares a un aumento del Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y consecuentemente un aumento de la neurogénesis, sinaptogénesis y aumento de la conectividad sináptica en hipocampo. Estos efectos neuronales están asociados con el efecto antidepresivo de un medicamento.^{78,79,80}

Resultados similares se obtuvieron con otro modelo de depresión, el de Bulbectomía olfatoria, en ratas después del tratamiento agudo, subagudo (3 dosis en 24 h) y crónico (14 días) con Zinc (hidroaspartato de zinc).⁸¹

1.4. COMPLEJOS DE COORDINACION

Un compuesto de coordinación es el conjunto formado por un *átomo o ión metálico central*, rodeado por un número de iones, átomos o moléculas, que reciben el nombre de *ligandos*. (Figura 5).

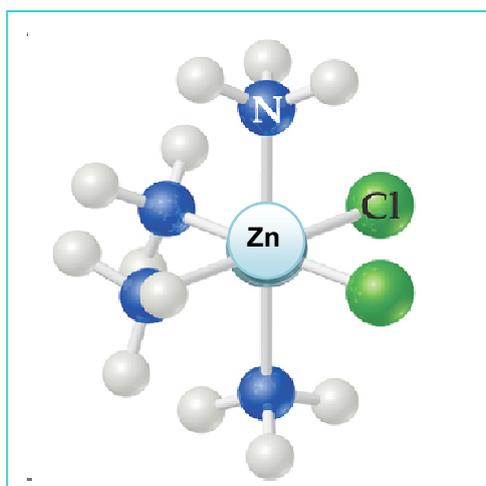
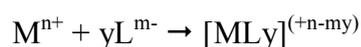


Figura 5. Ejemplo de complejo de coordinación octaédrico para Zn(II)

- Si el átomo metálico central está unido a un grupo de moléculas o iones es un complejo de coordinación.
- Si está cargado, es un complejo iónico.

La formación de un compuesto de coordinación se puede interpretar como una reacción entre un ácido de Lewis y una base de Lewis, entre los que se establece un enlace covalente coordinado o dativo:



Clasificación de los ligandos.

a) Según el número de átomos directamente unidos al átomo central. Pueden ser *monodentados*, *bidentados*, *tridentados* y en general *polidentados*.

Los ligandos *polidentados* se denominan ligandos quelatos, porque al unirse al átomo central actúan como una pinza que forma un anillo, llamado anillo “quelato”. Así ocurre por ejemplo con la etilendiamina (en): $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

b) Según el tipo de enlace que establecen con el átomo metálico:

1.- Ligandos que *no tienen disponibles electrones p* y tampoco orbitales vacantes, de tal forma que se coordinan sólo a través del enlace σ . Ejemplos son: H^- , $(\text{SO}_3)^{2-}$ y RNH_2 .

2.- Ligandos con *dos o tres pares de electrones libres* que pueden desdoblarse en un par de energía menor y formar un enlace σ , con una energía mayor. Ejemplos son: N^{3-} , O^{2-} , F^- , Cl^- , Br^- , I^- , $(\text{OH})^-$ y S^{2-} .

3.- Ligandos que tienen *pares electrónicos de enlace s y orbitales p* de antienlace vacíos de baja energía, los cuales pueden aceptar electrones de orbitales “d” del metal, que están orientados de forma adecuada. Ejemplos son: CO , R_3P , R_3As y CN^- .

4.- Ligandos que *carecen de pares de electrones libres, pero que tienen electrones p* de enlace. Ejemplos son los alquenos, alquinos y benceno.

5.- Ligandos que pueden *formar dos enlaces σ con dos átomos metálicos separados y*, en consecuencia, actúan como puentes. Ejemplos son $(\text{OH})^-$, $(\text{NH}_2)^-$, O_2^{2-} y CO .

1.4.1. El Zinc formando parte de complejos de coordinación

La función estructural del Zn, mencionada anteriormente, como constituyente de proteínas, péptidos y complejos de aminoácidos y su abundante información sobre las propiedades particulares del Zn permitió el diseño de complejos Zn-péptidos, especialmente complejos Zn-aminoácidos. Así se elaboraron complejos cuyas estructuras cristalinas fueron reportadas como el $\text{Zn}(\text{Gly})_2$ (Gly: glicina)⁸², $\text{Zn}(\text{Leu})_2$ (Leu: leucina)⁸³, $[\text{Zn}(\text{Cys})_2]^{2-}$ (Cys: cisteína)⁸⁴, $\text{Zn}(\text{Met})_2$ (Met: metionina)⁸⁵, $\text{Zn}(\text{His})_2$ (His: histidina)⁸⁶, $\text{Zn}(\text{Ser})_2$ (Ser: serina)⁸⁷, $[\text{Zn}(\text{Asp})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (Asp: aspartato)⁸⁸ y $[\text{Zn}(\text{Glu})(\text{H}_2\text{O})]$ (Glu: glutamato).⁸⁹

1.5. LIGANDOS

1.5.1. Estrategias para modificar las propiedades fisicoquímicas de ingredientes farmacéuticos activos

La selección de sales es una estrategia que comúnmente es empleada para mejorar las propiedades de un compuesto farmacéutico.⁹⁰

Las sales cristalinas pueden conferir modificaciones útiles para mejorar la solubilidad acuosa, estabilidad química, y mayor biodisponibilidad en relación a su base o ácido libre de un compuesto activo. Las opciones de distribución de fármacos, incluida las soluciones parenterales o tecnologías de liberación controlada, frecuentemente dependen de la capacidad de modular las propiedades fisicoquímicas.

La *química supramolecular* o *química entre moléculas*, se relaciona con el estudio de las interacciones no covalentes presentes entre moléculas diferentes o iguales, ya sea en estado sólido (empaquetamiento cristalino) o en solución. Estas interacciones se llevan a cabo entre los sitios de reconocimientos de moléculas (grupos funcionales) y son las responsables de las diferentes modificaciones supramoleculares.⁹¹ Un ejemplo de la química supramolecular al estado sólido son los cocristales.

Un **cocrystal** puede ser definido como un complejo cristalino formado por dos o más especies que se encuentran en la misma celda cristalina, el cual es sólido a temperatura ambiente, y que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, principalmente por enlaces de hidrógeno.⁹²

En los últimos 20 años, el número de publicaciones relacionadas con los avances en el diseño de estrategias, técnicas de cultivo y caracterización de cocristales han aumentando significativamente en el campo de la ingeniería de los cristales. Sin embargo, sólo dentro de la última década los cocristales han encontrado su lugar en la industria farmacéutica, principalmente debido a su capacidad para alterar las propiedades fisicoquímicas sin comprometer la integridad estructural del *ingrediente farmacéutico activo* (IFA) y, por lo tanto, posiblemente, mejorar la bioactividad.

La capacidad de liberación de un fármaco dentro del paciente en forma eficiente, segura y económica depende en gran medida de las características fisicoquímicas del IFA.⁹³ La mayoría de los IFAs son sólidos, por lo que se requiere que se encuentren en estado cristalino, debido a su facilidad de obtención ya que el proceso de cristalización ayuda a eliminar las impurezas presentes.

Tradicionalmente, los IFAs en estado cristalino se presentan en forma de sales, solvatos y polimorfos (Figura 6).

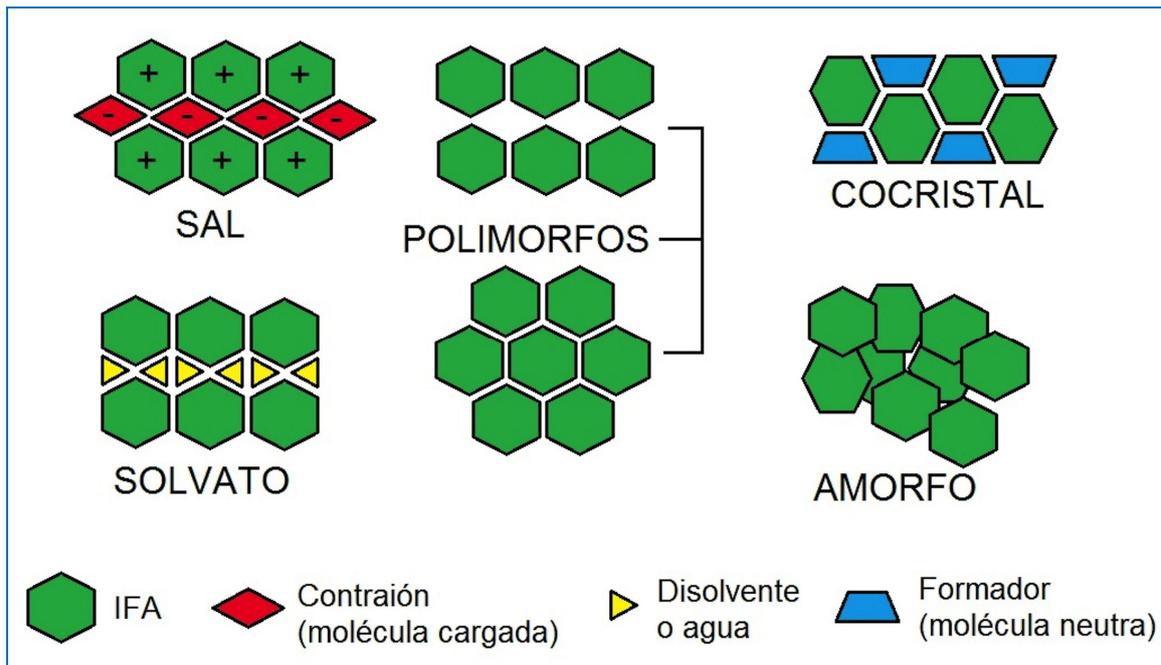


Figura 6. Sistemas cristalinos de IFAs (tomado de Saucedo-Balderas y colaboradores).⁹⁴

Los *polimorfos* son estructuras cristalinas del mismo compuesto que pueden organizarse al menos de dos formas diferentes; cada polimorfo puede presentar propiedades fisicoquímicas distintas. Los *solvatos* e *hidratos* se forman al quedar atrapadas moléculas de disolvente o de agua dentro de la red cristalina; esto puede representar un problema si durante el período de almacenamiento, las moléculas de disolvente se liberan de la red cristalina, lo que puede afectar la estabilidad de la forma farmacéutica. La formación de *sales* de los IFAs constituye el principal método para mejorar la solubilidad de los mismos; esto se logra haciendo reaccionar el IFA con un ácido o una base, lo que da como resultado el IFA en forma ionizada.⁹⁵

En algunas circunstancias estas sales no tienen las propiedades sólidas adecuadas o no pueden formarse debido a la ausencia de grupos ionizables en la estructura química del IFA⁹⁶. Los *cocristales farmacéuticos* (Figura 6) son materiales cristalinos constituidos por un IFA y uno o más agentes formadores de cocristales, los cuales son sólidos a temperatura ambiente.⁹⁷

Principales Ventajas de los cocristales

- * Es una forma cristalina más estable comparada con los sólidos amorfos.
- * Pueden aumentar la estabilidad de fármacos que son poco solubles en agua.

- * Pueden aumentar la biodisponibilidad debido a un aumento de la solubilidad.

1.5.1.1. Polimorfos y cocristales con sertralina

Sertralina HCl (Zoloft ®) es un ejemplo de una forma de sal que es altamente polimórfica y posibilita la formación de solvato. Esto ha generado, una gran cantidad de patentes de esta droga habiéndose descrito a la fecha 28 formas de HCl de sertralina.⁹⁸

Además, se describió la formación sales monoiónicas (con los ácidos acético, benzoico, hidrobromico, láctico, p-toluensulfónico, etano sulfónico), sales di y triácidas (con los ácidos cítrico, fumárico, maleico, malónico, fosfórico, succínico, sulfurónico y l-tartárico) y una estructura cristalina con la sal de sertralina-HBr. Este trabajo ha demostrado que las pequeñas diferencias aparentemente menores en la formación de estas sales de sertralina, pueden tener profundos efectos en el número de polimorfos y solvatos que se pueden encontrar en las sales correspondientes⁹⁹ y en la mejora de la actividad farmacológica de la sertralina.

Por ejemplo, el bromhidrato de sertralina contiene cuatro moléculas de la sal en la unidad en el grupo espacial *P212121* ortorrómbico no centrosimétrico siendo similar a la que presenta la sal del hidrocloreuro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) pero en oposición al ion cloruro, el ion bromuro produce efectos secundarios como sedación y problemas dermatológicos que limita su uso terapéutico.⁹⁹

1.5.2 Ácido Cumarín-3-carboxílico (HCCA)

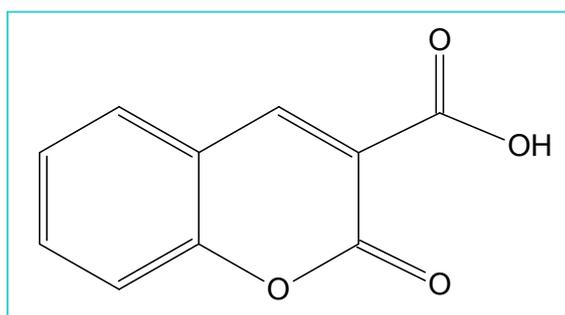


Figura 7.

Nombre sistemático (IUPAC): 2-Oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid

Formula Molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_4$

Peso molecular: 190,15

Punto de fusión experimental: 189-193 °C

Referencia: ChemSpider (Royal Society of Chemistry)

La cumarina y sus derivados poseen reconocida y amplia actividad biológica y farmacológica tales como acciones antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, antivirales y anticarcinogénicas.¹⁰⁰

El ácido cumarín 3-carboxílico, seleccionado para este estudio, posee la capacidad de actuar como ligando bidentado y formar complejos neutros.

Desde el punto de vista químico se han realizado estudios teóricos y experimentales sobre la capacidad de formar complejos entre el ligando desprotonado del ácido cumarín 3-carboxílico (CCA⁻) con La(III).¹⁰¹

También se ha preparado el complejo del ácido cumarín 3-carboxílico con Cu(II) y se ha caracterizado por diferentes tipos de análisis (básico elemental, térmico, espectroscopía IR, Raman, resonancia paramagnética electrónica (EPR), reflectancia difusa UV-vis y espectroscopía RMN de ¹H).¹⁰²

Además, se han realizado estudios de la estructura molecular y espectroscópicos de los complejos del ácido cumarín 3-carboxílico con Ni (II), Co (II), Zn (II) y Mn (II) basados en la teoría de la densidad funcional.

Desde el punto de vista farmacológico se han descrito numerosos derivados del HCCA.

En base a que algunos compuestos alcoxi-hidroxi cumarínicos han mostrado actividad hipoglucemiante y efecto atenuante de las complicaciones diabéticas, se observó un efecto sinérgico con el vanadio (Figura 8).¹⁰³

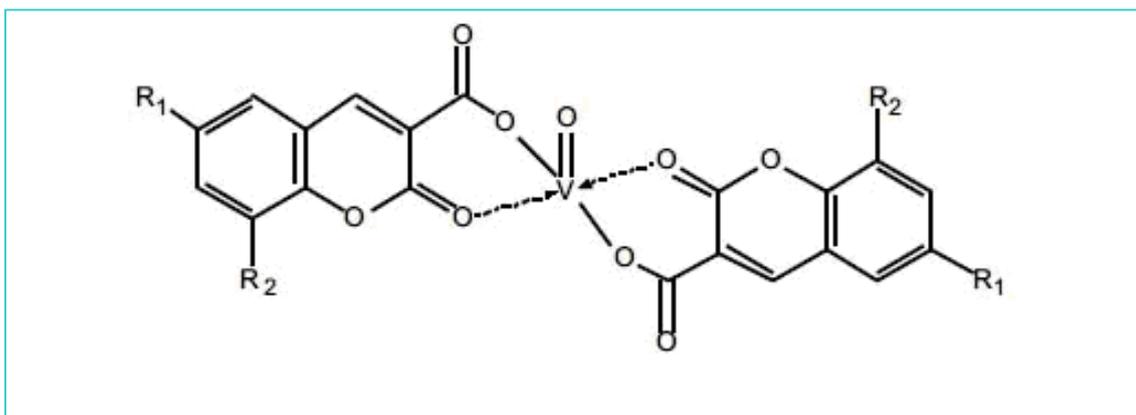


Figura 8. Estructura de los complejos de oxovanadio(IV) con ligandos cumarínicos: (1) R₁=H, R₂=H; (2) R₁=Br, R₂=H; (3) R₁=Br, R₂=OCH₃; (4) R₁=Br, R₂=NO₂; (5) R₁=Br, R₂=OH.

El complejo cumarín 3-carboxilato con Ag (I) ha demostrado efectos antibacterianos y antimicóticos (actividad anti-Candidas)¹⁰⁴ así como también resultó ser un agente cito-selectivo ya que su capacidad de inhibir la viabilidad celular de células tumorales es superior a su acción en células normales y su mecanismo de acción parece ser por inhibición de la síntesis de ADN.^{105,106}

El derivado aril-éster del ácido cumarín-3-carboxílico también ha indicado efectos anticancerígenos.¹⁰⁷

Los complejos de cumarín 3-carboxilato con Sm(III), Gd(III), y Dys(III) han demostrado actividad antiproliferativa sobre la línea celular K562 derivada de una leucemia mieloide crónica humana.¹⁰⁸

También se han sintetizado derivados del ácido cumarín 3-carboxílico con actividad inhibitoria sobre los receptores NMDA, como el 6-bromo, 6,8-dibromo y 6,8-diiodo del cumarín-3-carboxílico, los cuales pueden tener efecto terapéutico en casos de déficit cognitivos o esquizofrenia.¹⁰⁹

1.5.3. S-metil-L-cisteína

S-metil-L-cisteína (Figura 9) es un aminoácido que ofrece varios posibles sitios de coordinación para los iones metálicos: grupo carboxílico (COOH), grupo amino (NH₂) y azufre (con un poco menos de probabilidad debido al grupo metilo unido al mismo).

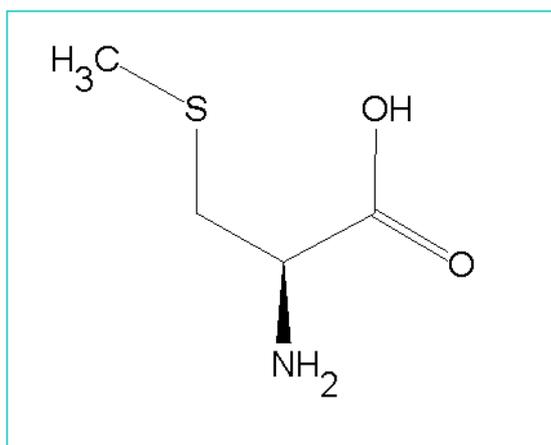


Figura 9: Estructura de S-metil-L-cisteína

Desde el punto de vista de la formación de complejos de coordinación, se conocen sus derivados con Zn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II)¹¹⁰, Pt(II)¹¹¹, Mn(II), Co(II), Ni(II) y Cu(II)¹¹², Au(III)¹¹³ sin embargo en muchos de los casos se caracterizaron de manera limitada y no desde el punto de vista de su potencial aplicación biológica.

Por su parte, el aminoácido S-metil-L-Cisteína no ha sido muy aprovechado tampoco en relación a las demostradas propiedades beneficiosas del mismo. Se sabe por ejemplo que se ha estudiado su efecto antioxidante en la oxidación de especies hidroperóxido proveniente de lípidos (LOOH) durante la formación de la lipoproteína de baja densidad humana (LDL)¹¹⁴ y también en ratones tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) donde se utilizaron para examinar los efectos neuroprotectores de la N-acetilcisteína (NAC), S-etil cisteína (SEC), s-metil-cisteína (SMC), y la cisteína s-propilo (SPC)¹¹⁵. En éste último trabajo también se encuentra estudiado el efecto anti-inflamatorio así como también fueran analizados los efectos antioxidantes y anti-inflamatorios en riñón de ratones diabéticos.¹¹⁶

Otra aspecto no menos relevante, son los ensayos realizados por Morimura y colaboradores¹¹⁷ que demostraron que S-metil-L-cisteína puede servir como agente quimiopreventivo para hepatocarcinogénesis, donde se presenta la reducción de la proliferación celular por un mecanismo que aparentemente implica la supresión del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, Insulin like Growth Factor I) y el estrés oxidativo.

Por tanto, resulta muy interesante el estudio de potenciales y nuevos efectos beneficiosos tanto para S-metil-L-cisteína, como para sus complejos de coordinación.

Por todo lo expuesto, en este trabajo de tesis doctoral nos pareció interesante combinar el ácido cumarín 3-carboxílico con sertralina y el complejo de coordinación del Zn(II), tetraclorozincato ($[ZnCl_4]^{2-}$) con sertralina de manera de formar sales y analizar sus estructuras y las ventajas que, sobre el efecto antidepresivo, tendría la terapia combinada.

Asimismo, se propone evaluar los efectos de S-metil-L-cisteína sola y complejada con Zn(II) y del fármaco antidepresivo sertralina modificando su estructura a través de su interacción con iodo: $I-SerH_2^+I$.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ R.C. Kessler, P. Berglund, O.lga Demler, R. Jin, D. Koretz, K.R. Merikangas, A. John Rush, E.E. Walters, P.S. Wang, *J. Am. Med. Assoc.* 289 (2003) 3095-105.
- ² *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV TR*, 4º edición, 2000.
- ³ E. Richelson, *Mayo Clin. Proc.* 76 (2001) 522-527.
- ⁴ S.M. Stahl, *Essential Psychopharmacology*. New York, NY: Cambridge University Press. (1996).
- ⁵ A. Sambunaris, J.K. Hesselink, ; R. Pinder, J. Panagides, S.M. Stahl. *J. Clin. Psychiatry* 58 (1997) 40-53.
- ⁶ S.M. Stahl. Part 1: Antidepressants have seven distinct Mechanisms of Action. *J. Clin. Psychiatry* 59 (1998) 5-14.
- ⁷ D.S. Charney, D.B. Menkes; G.R. Heninger. *Arch. Gen. Psychiatry* 38(1981) 1160-1180; (ii) P. Blier, C. Montigny, Y. *J. Clin. Psychopharmacol* 7 (1987) 24s-35s.
- ⁸ A.F. Schatzberg, *J. Clin. Psychiatry* 64 (2003) 30-37.
- ⁹ M. Mucci, *J. Psychopharmacol.* 11 (1997) 33S-37S.
- ¹⁰ J.P. Feighner, *J. Clin. Psychiatry* 60 (1999) 4-11.
- ¹¹ J.A. Ascher,; JO Cole, ; JN Colin, *J. Clin. Psychiatry* 56(1995) 395-401.
- ¹² M.G. Goldstein, *J. Clin. Psychiatry* 59 (1998) 66-72.
- ¹³ S.M. Stahl. *Psychiatric An.* 27(1997) 14-16.
- ¹⁴ S.H. Preskorn, Mirtazapine. *J. Clin. Psychiatry* 58 (1997) 3-8.

- ¹⁵ R. Richelson. *Mayo Clin. Proc.* 76 (2001) 511-527.
- ¹⁶ J. Heym, B.K. Koe. *J. Clin. Psychiatry* 49 (1988) 40–45.
- ¹⁷ B.K. Koe, A. Weissman, W.M. Welch, R.G. Browne. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226 (1983) 686–700.
- ¹⁸ S.K. Guthrie. *DICP.* 25 (1991) 952-956.
- ¹⁹ S.J. Warrington. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2 (1991) 11-21.
- ²⁰ PJ Goodnick, BJ.Goldstein. *J. Psychopharmacol.* 12 (1998) S5–S20.
- ²¹ J Sprouse, T Clarke, L Reynolds. *Neuropsychopharmacol.* 14 (1996) 225–231.
- ²² M.J. Detke , M. Rickels , I. Lucki *Psychopharmacol.* 121 (1995) 66-72.
- ²³ DV Sheehan , K. Kamijima. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 24 (2009) 43-60.
- ²⁴ G. MacQueen, L. Born, M. Steiner. *CNS Drug Rev.* 7 (2001) 1-24.
- ²⁵ R.M. Lane. *J Psychopharmacol* 11 (1997) 72–82.
- ²⁶ G.J. Handelman, N.W. Levin. *Heart Fail Rev.* 13 (2008) 393-404.
- ²⁷ D. A Phipps, Oxford University press, P-63: (1976); (ii) M. Hambidge. *J. Nutr.* 130 (2000) 1344S-1349S.
- ²⁸ R. Nath. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 1245-1254.

²⁹ A. Ashkenazi, S. Levin, D. Mjaldetti , E. Fishel, D. Benvenisti. *Pediatrics*. 52 (1973) 525-533.

³⁰ A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, J.S. Dooley, M.L. Schilsky. *Lancet*. 369 (2007) 397-408.

³¹ N.C. Papanikolaou, E.G. Hatzidaki, S. Belivanis, G.N. Tzanakakis, A.M. Tsatsakis. *Med. Sci. Monit*. 11 (2005) RA329-336.

³² J.W. Eaton, M.Qian. *Free Rad. Biol. Med*. 32 (2002) 833-840.

³³ T. Boulikas, M. Vougiouka, *Oncol. Reports* 10 (2003) 1663-1682.

³⁴ H.S. Youn, J.Y. Lee, S.I. Saitoh, K. Miyake, D.H. Hwang. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 350 (2006) 866-871.

³⁵ J. Emsley. *Nature's Building Blocks*. Oxford. 2011.

³⁶ W.J. Todd, C.A. Elvehjem, E.B. Hart. *Am. J. Physiol*. 107 (1934) 146-156.

³⁷ A.S. Prasad, J.A. Halsted, M.Nadimi. *Am. J. Med*. 31 (1961) 532-546.

³⁸ Merck. *Manual de diagnóstico y terapéutica*. Ed. Merck Sharp & Dohme. Research Labor, 1980.

³⁹ T. Kido, I. Tsuritani, R. Honda. *J. Trace Elem. Electroly*. 2 (1988) 101-104.

⁴⁰ M.J.Jackson. *Physiology of zinc: general aspects*. In: Milis CF, ed. *Zinc in Human Biology*. London: Springer-Verlag, 1989: pp 1-14.

⁴¹ C. Hotz, K.H. Brown. *Food Nutr Bull* 25 (2004) S94-S204.

⁴² S. Chan, B. Gerson, S.Subramaniam. *Clin. Lab. Med*. 18 (1998) 673-685.

- ⁴³ E. Mocchegiani, L. Santarelli, N. Fabris. Zinc, human diseases and aging. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*; vol 4, Eds. Ph. Collery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne, J. M. Llobet: 1996; 566-568.
- ⁴⁴ R. Cornelis, F. Borguet, J. De Kimpe. *Anal. Chim. Acta.* 283 (1993) 183-189.
- ⁴⁵ B.L. Vallee, K.H. Falchuk. *Physiol. Rev.* 73 (1993) 79-118.
- ⁴⁶ A. Klug, J.W. Schwabe. *FASEB J.* 9 (1995) 597-604.
- ⁴⁷ A. Klug. *Annu Rev Biochem.* 79 (2010) 213-231.
- ⁴⁸ R.J. Cousins. Zinc. In: E.E. Ziegler, L.J. Fuer, eds. *Present Knowledge in Nutrition*, 7th ed. Washington, DC: ILSI Press, 1996:293-306.
- ⁴⁹ A. Takeda. *Biometals.* 14 (2001) 343-51.
- ⁵⁰ C.J. Frederickson, D.W. Moncrieff. *Biol. Signals* 3 (1994)127-139.
- ⁵¹ C.J. Frederickson, S.W. Suh, D. Silva, R.B. Thompson. *J. Nutr.* 130 (2000) 1471S–1483S.
- ⁵² Z. Wang, J.Y. Li, A. Dahlstrom, G. Danscher. *Brain Res.* 921(2001)165–172.
- ⁵³ A. Takeda, H. Tamano. *Brain Res. Rev.* 62 (2009)33–44.
- ⁵⁴ W. Law, E.E. Kelland, P. Sharp, N.J. Toms. *Neurosci Lett.* 352 (2003) 113–116.
- ⁵⁵ M. Seve, F. Chimienti, S. Devergnas, A. Favier. *BMC Genomics* 5 (2004) 32-36.
- ⁵⁶ B Laube. *Eur J. Neurosci.* 16 (2002)1025–1036.

⁵⁷ E Mocchegiani, C Bertoni-Freddari, F Marcellini, M Malavolta. *Prog. Neurobiol.* 75 (2005)367–390.

⁵⁸ C.W. Christine, D.W. Choi. *J. Neurosci.* 10 (1990)108–116.

⁵⁹ P. Paoletti, A.M. Vergnano, B7 Barbour, M. Casado. *Neurosci.* 158 (2009)126–136.

⁶⁰ I. McLoughlin, J. Hodge. *Acta Psychiatr Scand* 82 (1990)451–453.

⁶¹ M. Maes, P.C. D’Haese, S. Scharpe, P. D’Hondt, P. Cosyns, M.E. De Broe. *J. Affect. Disord.* 31(1994) 135–140.

⁶² G. Nowak, A. Zieba, D. Dudek, M. Krooeniak, M. Szymaczek, M. Schlegel-Zawadzka *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 14 (1994) 83–86.

⁶³ J Wojcik, D. Dudek, M. Schlegel-Zawadzka, M. Grabowska, A. Marcinek, E. Florek, W. Piekoszewski, R.J. Nowak, W. Opoka, G. Nowak. *Pharmacol. Rep.* 58 (2006)571–576.

⁶⁴ M. Siwek, D. Dudek, M. Schlegel-Zawadzka, A. Morawska, W. Piekoszewski, W. Opoka, A Zieba Pilc, P. Popik, G. Nowak. *J. Affect. Disord.* 126 (2010)447–452.

⁶⁵ G. Irmisch, D. Schlaefke, J. Richter. *Neurochem. Res.* 35 (2010) 1376–1383.

⁶⁶ R. Narang, K. Gupta, A. Narang, R. Singh. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 35 (1991) 272–274; M. Schlegel-Zawadzka, A. Zieba, D. Dudek, M. Krosniak, M. Szymaczek, G. Nowak (2000) Effect of depression and of antidepressant therapy on serum zinc levels – a preliminary clinical study. In: A.M. Roussel, R.A. Anderson, A.E. Favrier (eds) *Trace elements in man and animals* 10. Kluwer Academic Plenum Press, New York, pp 607–610.

⁶⁷ C.R. Hansen Jr, M. Malecha, T.B. Mackenzie, J. Kroll.. *Biol Psychiatry* 18 (1983)395-401.

⁶⁸ G. Nowak, A. Zieba, D. Dudek, M. Krosniak, M. Szymaczek, M. Schlegel-Zawadzka. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 14(1999)83–86.

⁶⁹ J. Wojcik, D. Dudek, M. Schlegel-Zawadzka, M. Grabowska, A. Marcinek, E. Florek, W. Piekoszewski, R.J. Nowak, W. Opoka, G. Nowak. *Pharmacol. Rep.* 58 (2006) 571–576.

⁷⁰ Tamano H, Kan F, Kawamura M, Oku N, Takeda A. *Neurochem Int* 55(7):536–541
Behavior in the forced swim test and neurochemical changes in the hippocampus in young rats after 2-week zinc deprivation. *Neurochem Int* 55(7):536–541

⁷¹ K. Młyniec, G. Nowak. *Pharmacol Rep.* 64 (2012) 249–255.

⁷² N. Tassabehji, R. Corniola, A. Alshingiti, C. Levenson. *Physiol. Behav.* 95 (2008) 365-369.

⁷³ R.S. Corniola , N.M. Tassabehji, J. Hare, G. Sharma, C.W. Levenson. *Brain Res.* (2008) 52-61.

⁷⁴ H. Gao, W. Zheng, N. Xin, Z. Chi, Z. Wang, J. Chen, Z. Wang. *Neurotoxic Res.* 16 (2009) 416-425.

⁷⁵ H.L. Gao, H. Xu, N. Xin, W. Zheng, Z. Chi, Z. Wang. *Neurotox Res.* 19 (2011) 584-591.

⁷⁶ B. Krocicka, P. Branski, A. Palucha, A. Pilc, G. Nowak. *Brain Res. Bull.* 15 (2001) 297-300.

⁷⁷ B. Szewczyk, P. Brański, J.M. Wierońska, A. Pałucha, A. Pilc, G. Nowak. *Pol. J. Pharmacol.* 54 (2002) 681-685.

- ⁷⁸ S.A. Amico-Ruvio, S.E. Murthy, T.P. Smith, G.K. Popescu. *Biophys J.* 100 (2011) 1910-1918.
- ⁷⁹ S. Barrondo, J Sallés. *Neuropharmacol.* 56 (2009) 455-462
- ⁸⁰ J.E. Malberg. *J. Psychiatry Neurosci.* 29 (2004) 196-205.
- ⁸¹ G. Nowak, B. Szewczyk, J.M. Wieronska, P. Branski, A. Palucha, A. Pilc, K. Sadlik, W. Piekoszewski. *Brain Res. Bull.* 61 (2003) 159–164.
- ⁸² J.M. Newman, C.A. Bear, T.W. Hambley, H.C. Freemann, *Acta Crystallogr. C* 46 (1990) 44.
- ⁸³ C.A. Steren, R. Calvo, O.E. Piro, B.E. Rivero, *Inorg. Chem.* 28 (1989) 1933.
- ⁸⁴ P. Bell, W.S. Sheldrick, *Z. Naturforsch.* 39b (1984) 1732.
- ⁸⁵ R.B. Wilson, P. de Meester, D.J. Hodgson, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 1498.
- ⁸⁶ T.J. Kistenmacher, *Acta Crystallogr. B* 28 (1972) 1302.
- ⁸⁷ D. van der Helm, A.F. Nicholas, C.G. Fisher, *Acta. Crystallogr. B* 26 (1970) 1172.
- ⁸⁸ L. Kryger, S.E. Rasmussen, *Acta Chem. Scand.* 27 (1973) 2674.
- ⁸⁹ C.M. Gramaccioli, *Acta Crystallogr.* 21 (1966) 600.
- ⁹⁰ S. M.; Berge, Bighley, L. D.; D. C. Monkhouse, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19. (ii) P. L. Gould, *Int. J. Pharm.* 33 (1986) 201-217.
- ⁹¹ J.W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*; Second Ed; John Wiley & Sons, Ltd.; UK, 2009; p 27.
- ⁹² N. Schultheiss, A. Newman, *Pharmaceutical. Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 2950-2967.

- ⁹³ S. Mirza, I. Miroshnyk, J. Heinamaki, J. Yliruu, *Dosis* 24 (2008) 90-96.
- ⁹⁴ MM Saucedo-Balderas. *An. Real Acad. Farm.* 80 (2014) 265-273.
- ⁹⁵ W. Jones, W. Motherwell, A.V.D. Trask, *MRS. Bull* 31 (2006) 875-879.
- ⁹⁶ B.S.Sekhon. *ARS Pharm.* 50 (2009) 99-117.
- ⁹⁷ D.Herrera Ruiz. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*41 (2010) 55-56.
- ⁹⁸ Patent information on forms of sertraline hydrochloride was collected from the following documents: (a) (Pfizer). U.S. Patent 5,248,699. (b) (Torcan). EP 0 928 784 A1; (c) (Teva). WO 00/32551 A1. (d) (CIBA Specialty Chemicals Holding Inc.). WO 01/32601 A1. (e) (Teva). WO 01/45692 A1).
- ⁹⁹ (i) J.F. Remenar, J.M. MacPhee, B.K. Larson, V.A. Tyagi, J.H. Ho, D.A. McIlroy, M.B.Hickey, S P.B.haw, O.Almarsson, *Org. Process Res. Dev.* 7 (2003) 990-996 (ii) Patent WO 2004065348 A1.
- ¹⁰⁰ B.Halliwell,; J.M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, *Anal. Biochem.* 165 (1987) 215–219.
- ¹⁰¹ Tz. Mihaylov a, N. Trendafilova a,* , I. Kostova b, I. Georgieva a, G. Bauer. *Chem. Phys.* 327 (2006) 209-219.
- ¹⁰² A. Karaliota, O. Kretsi, C. Tzougraki. *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 33-37.
- ¹⁰³ G. Negri. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41 (2005) 121-132.
- ¹⁰⁴ S. Bernadette, B.S. Creaven, D.A. Egan, K. Kavanah, M. McCann, A. Noble, B. Thatia, M. Walsh, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 3976–3984.

- ¹⁰⁵ B. Thati, A. Noble, R. Rowan, B.S. Creaven, M. Walsh, M. McCann, D. Egan, K. Kavanagh. *Toxicol. In Vitro.* 21 (2007) 801-808. .
- ¹⁰⁶ B. Thati, A. Noble, B.S. Creaven, M. Walsh, M. McCann, K. Kavanagh, M. Devereux, D.A. Egan. *Cancer Lett.* 248 (2007) 321–331.
- ¹⁰⁷ I. Kempen, M. Hemmer, S. Counerotte, L. Pochet, P. de Tullio, J.M. Foidart, S. Blacher, A Noël, F. Frankenne, B. Pirotte. *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 2735-2750.
- ¹⁰⁸ I. Kostova, G. Momekov, P. Stancheva. *Metal-Based Drugs* 2007 D 15925.
- ¹⁰⁹ M.W. Irvine, B.M. Costa, A. Volianskis, G. Fang, L. Ceolin, G.L. Collingridge, D.T. Monaghan, D.E. Jane. *Neurochem Int.* 61 (2012) 593-600.
- ¹¹⁰ (i) H. Shindo, T.L. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1965) 1904-1909. (ii) L.E. Erickson, Y. Schneider, T.J. Takara, A.S. Wezeman, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 3560–3568.
- ¹¹¹ L.E. Erickson, Y. Schneider, T.J. Takara, A.S. Wezeman. *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 3560–3568.
- ¹¹² S. E. Livingstone, J.D. Nolan. *Inorg. Chem.* 7 (1968) 1447-1451.
- ¹¹³ M. Milovanović, A. Djeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević, Ž.D. Bugarčić. *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 944–949.
- ¹¹⁴ H. Nishimura, O. Higuchi, K. Tateshita, *BioFactors* 21 (2004) 277–280.
- ¹¹⁵ C-M Chen, M-C Yin, C-C Hsu, T-C Liu. *Nutrition* 23 (2007) 589–597.
- ¹¹⁶ M-C Yin, C-C Hsu, P-F Chiang, W-J Wu. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 572 – 579.

¹¹⁷ K. Morimura, A. Kinoshita, T. Nishikawa, S. Hayashi, Y. Yano, S. Fukushima. *Carcinog.* 27 (2005) 982–988.

CAPÍTULO I. COMPLEJO IODO-SERTRALINA

1.1. INTRODUCCIÓN

Como ya fue mencionado en la introducción de este trabajo, la sertralina se convirtió en los últimos años en una excelente medicina alternativa para el tratamiento de la depresión que tiene un gran valor comercial. Con el objetivo de producir otras formas activas utilizadas como antidepresivo en los seres humanos, diversos cristales como polimorfos, solvatos, hidratos y fases amorfas se han preparado, caracterizado y patentado. Diferentes metodologías de alto rendimiento se han utilizado con la finalidad de preparar formas cristalinas de sales utilizando la formación de sales con diferentes aniones. Entre ellos se han preparado sales con ácidos como el acético, cítrico, maleico, benzoico, etansulfónico, malónico, entre otros, buscando siempre mejorar la actividad ya demostrada por sertralina y evitar los efectos secundarios. Algunos derivados incluyen la halogenación de la molécula, así por ejemplo el bromhidrato de sertralina contiene cuatro moléculas de la sal en la celda unidad (grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$) siendo similar a la presentada por el hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$), pero en contraste al cloruro, la presencia del ion bromuro produce efectos secundarios como sedación y problemas dermatológicos por lo que limitan su uso terapéutico¹ (Figura 1).

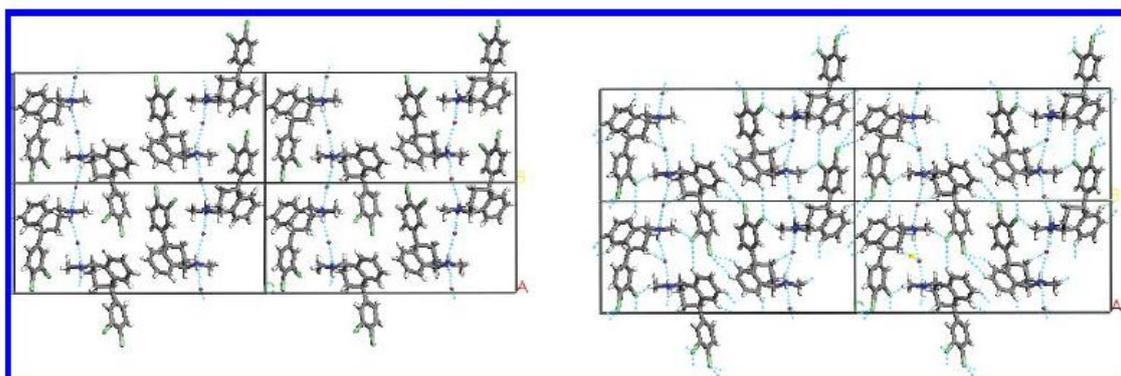


Figura 1. Vista de la estructura cristalina de $\text{SerH}_2^+\text{Br}^-$. Grupo espacial: $P2_12_12_1$. Empaquetamiento con la vista de los puentes de H. Tomado de Remenar y colaboradores.

También se ha preparado el derivado con iodo denominado hidrioduro de iodosertralina (I-SerH₂⁺I) el cual se ha caracterizado por espectrometría de masa, análisis térmico y se han realizado cálculos semi-empíricos de los OM (Orbitales Moleculares)² pero no existe información detallada en relación a su espectro infrarrojo ni a sus potenciales efectos biológicos incluyendo la determinación de su potencial actividad antidepresiva para su cotejo y comparación con la de sertralina.

Sobre la base de esta información precedente, se proponen para este capítulo los objetivos enunciados a continuación.

1.1.1. Objetivos:

Los objetivos de este capítulo fueron:

1) Caracterizar el compuesto iodo sertralina desde el punto de vista de la espectroscopía vibracional: para lo cual se realizaron cálculos de la teoría de densidad funcional con el fin de asignar los modos de las vibraciones características, especialmente aquellas relacionadas con la presencia de iodo en la estructura.

2) Comparar con el espectro experimental FTIR (Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier) de hidrocloreto de sertralina, por la razón de que este método teórico no se ha utilizado cuando se analizó su espectro vibracional.³

3) Estudiar del potencial efecto antidepresivo de este producto iodado en comparación con hidrocloreto de sertralina.

1.2. SÍNTESIS DE HIDROIODURO DE IODO SERTRALINA: C₁₇H₁₇Cl₂I₂N

La preparación se realizó de acuerdo al método reportado por Zayed y colaboradores² mediante el cual la mezcla de cantidades equimoleculares de clorhidrato de sertralina y solución de iodo en etanol-agua dan lugar a la formación de un precipitado de color marrón, que se separa por filtración y purifica por recristalización. De acuerdo al trabajo mencionado, la estructura propuesta para el derivado iodado se muestra a continuación.

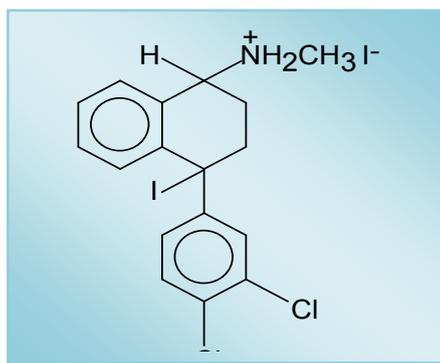


Figura 2. Derivado iodado de sertralina

1.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

1.3.1. Estudio completo comparativo del espectro infrarrojo (espectro experimental vs simulaciones del espectro teórico) y geometrías moleculares.

Durante la realización de los cálculos programados, no se encontraron conformeros de baja energía dentro de los 2 kcal mol^{-1} de hidrocloreuro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) o de hidroyoduro de sertralina iodo ($\text{I-Ser}_2^+\text{I}^-$). Por lo tanto, todas las discusiones se refirieron a las conformaciones de más baja energía de todas las especies. Los esquemas moleculares de $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ y de iodo $\text{I-Ser}_2^+\text{I}^-$ se muestran en la Figura 3.

En la misma figura se presentan las estructuras optimizadas de más baja energía, con sus correspondientes uniones a los átomos mientras que sus parámetros geométricos se enumeran en la Tabla 1.

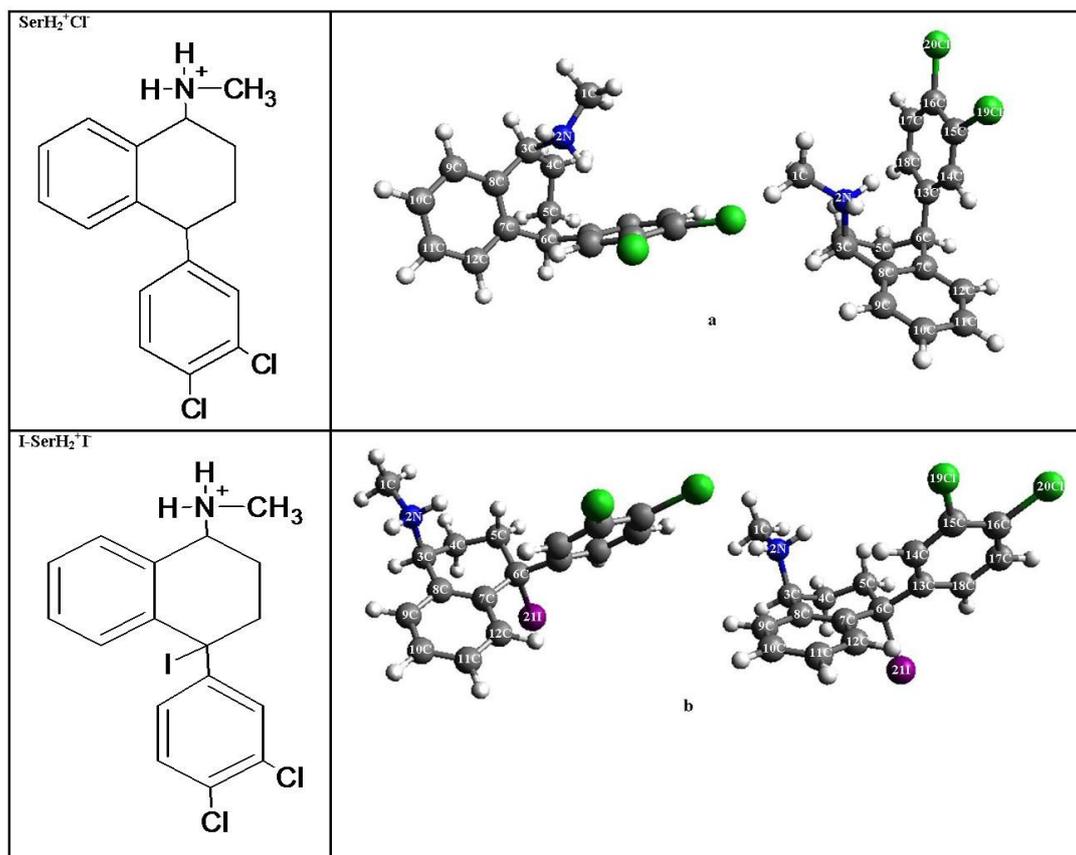


Figura 3. Esquemas moleculares de hidrocloreto de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻) y del producto iodo-sertralina (hidroyoduro de iodosertralina, I-SerH₂⁺I⁻) (izquierda) y las geometrías teóricas en equilibrio con los átomos numerados de (a) (SerH₂⁺Cl⁻) y (b) I-SerH₂⁺I⁻ (derecha).

En la Tabla 1 se observa que las dos distancias de los ángulos de enlace no fueron significativamente modificadas por la adición de iodo al C6. El ángulo de torsión (C5-C6-C13-C14), por otra parte, mostró una disminución significativa de más de 50 grados.

Tabla 1: Parámetros geométricos calculados para SerH₂⁺Cl⁻ y I-SerH₂⁺I⁻. Las distancias de enlaces están indicadas en Å. Los ángulos de enlace y torsión seleccionados están indicados en °. Los números corresponden a la denominación presente en las figuras.

Distancia de enlace (Å)	SerH ₂ ⁺ Cl ⁻	I-SerH ₂ ⁺ I ⁻
C1-N2	1,49	1,49
N2-C3	1,54	1,54
C3-C4	1,54	1,52
C4-C5	1,54	1,52
C5-C6	1,54	1,54
C6-C7	1,51	1,52
C7-C8	1,40	1,40
C8-C9	1,39	1,40
C9-C10	1,39	1,38
C10-C11	1,39	1,39
C11-C12	1,39	1,38
C12-C7	1,39	1,40
C6-C13	1,53	1,52
C13-C14	1,40	1,39
C14-C15	1,39	1,39
C15-C16	1,40	1,39
C16-C17	1,39	1,39
C17-C18	1,39	1,38
C18-C13	1,40	1,39
C6-I21	-----	2,23
C-H _{promedio}	1,09	1,09
N-H _{promedio}	1,03	1,02
C-Cl _{promedio}	1,72	1,73
Ángulos de enlaces seleccionados (°)		
C1-N2-C3	115,63	116,17
C4-C3-C8	114,86	113,09
C8-C9-C10	120,22	120,85
C7-C6-C13	112,07	113,63
C7-C6-I21	----	104,32
C14-C15-C16	119,96	120,03
C14-C15-C119	118,88	118,71
Ángulos de torsión seleccionados (°)		
C1-N2-C3-C4	71,47	67,36
C5-C6-C13-C14	149,74	93,48
C12-C7-C6-I21	----	73,71

Las moléculas examinadas constan solamente de un grupo NH₂⁺ y consecuentemente se puede predecir una vibración de estiramiento simétrico y asimétrico N-H. Como era de esperar, el modo de estiramiento asimétrico que se

extiende por el grupo NH_2^+ se presenta a mayores valores de frecuencia que el correspondiente al modo de estiramiento simétrico, como es de esperar.⁴ Generalmente, el rango en el cual los valores de frecuencia relacionadas con esos modos vibracionales aparecen se presenta entre 3420 a 3500 cm^{-1} (estiramiento asimétrico NH_2^+) y 3340-3420 cm^{-1} (estiramiento simétrico NH_2^+), respectivamente.⁵

Las frecuencias armónicas calculadas para estos modos están ubicadas a 3477 cm^{-1} y 3361 cm^{-1} en la $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, y a 3485 cm^{-1} y 3436 cm^{-1} en el $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$ (Tabla 2).

Como se indicó anteriormente, estos modos fueron asignados al estiramiento asimétrico N-H (mayor frecuencia) y estiramiento simétrico N-H (menor frecuencia) del grupo NH_2^+ , de acuerdo con el valor esperado si se considera ausencia de formación de puentes H en una molécula. En contraste, la formación de la sal (estado sólido) produjo un considerable debilitamiento de la banda normal correspondiente al modo de estiramiento NH.

Por el contrario, en el sólido aparece la formación de enlace de hidrógeno que se origina en el grupo $\text{N}^+\text{H}\cdots\text{X}^-$ (X =halógeno) y que perturba las frecuencias de estiramiento NH mediante la remoción de la densidad de electrones del enlace NH, provocando un desplazamiento hacia valores de frecuencias más bajas. Aparentemente, este efecto puede ser más marcado en los compuestos aromáticos en los que se han observado varias bandas en el rango 2800-2000 cm^{-1} . Este es un comportamiento previamente observado de las sales de amina. Varios autores han estudiado la naturaleza de los enlaces de hidrógeno, dando lugar a controversias en las asignaciones de las frecuencias de vibración del estiramiento de NH_2^+ . Existen en la bibliografía trabajos como los Chenon y Sandorfy⁶, Heacock y Marion⁷, Balwin, Amourin da Costa y colaboradores⁸, y Giffin y colaboradores⁹, entre otros, en donde se describió que las bandas de estiramiento de los grupos amino protonados pueden ser localizadas entre 2800 cm^{-1} y 2400 cm^{-1} , y algunos de estos autores llegaron a la conclusión de que los enlaces de hidrógeno de los átomos de hidrógeno amino ($\text{N}^+\text{H}\cdots\text{X}^-$) causan un cambio regular de dichas frecuencias hacia números de onda inferiores al aumentar el tamaño de aniones ($\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$).

Sobre la base de los datos provenientes del estudio teórico y teniendo en cuenta la comparación con los resultados informados anteriormente, las bandas espectrales experimentales en 2470 cm^{-1} y 2375 cm^{-1} para $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, y el doblete localizado en 2451 cm^{-1} y 2434 cm^{-1} (hacia el lado de mayor frecuencia vibracional) (Figura 4A) y la banda ubicada en 2348 cm^{-1} (del lado de menor frecuencia vibracional) para $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$,

(Figura 4B) se asignaron a los modos de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo NH_2^+ . Asimismo se pudo observar el corrimiento de los valores de las frecuencias cuando el tamaño del anión aumenta como ocurre cuando se cambia cloruro por yoduro (Figura 4).

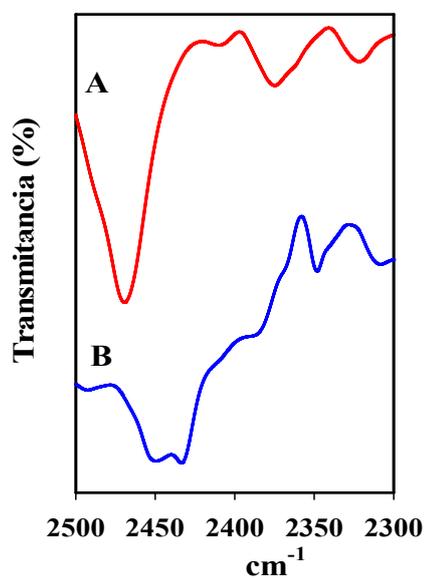
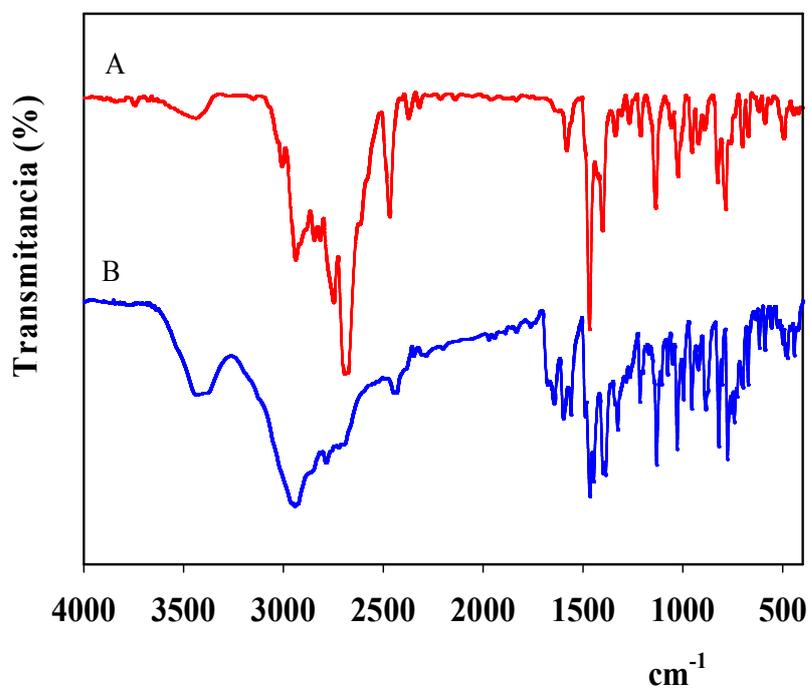


Figura 4. Espectro experimental FTIR para el hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) (A) y el producto sertralina-yodo ($\text{SerH}_2^+\text{I}^-$) (B). Región amplificada (2500-2300 cm^{-1}) para (A) y (B), respectivamente.

El dipolo vibracional inducido del grupo NH_2^+ genera un dipolo en el anión el cual es proporcional a la polarizabilidad del anión que aumenta con la densidad electrónica del cloro al yodo. El dipolo vibracional inducido del grupo del iodo luego de acoplarse con el dipolo de vibración inducido de la unidad NH_2^+ , modifica el modo de estiramiento y provoca una disminución del valor de la frecuencia. Debido a que la magnitud del acoplamiento es proporcional a la polarizabilidad del anión, el desplazamiento en el valor de la frecuencia es menor para la sal de amina que contiene iodo que para la sal de cloro.¹⁰

El modo vibracional de deformación denominado comúnmente modo “tijera” (scissors) correspondiente al grupo NH_2^+ es localizado 1650 cm^{-1} en la región de $1650\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$, posiblemente acoplado con los modos de estiramiento del anillo aromático $\nu(\text{C}=\text{C})$.^{10,11} De hecho, las frecuencias armónicas calculadas aparecen a ca. 1636 y 1647 cm^{-1} , mientras que en el espectro experimental fueron observados a 1640 y 1645 cm^{-1} para $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, y para $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$, respectivamente (Figura 3). Se puede prestar atención al corrimiento de esa banda hacia mayor frecuencia para $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$.

Este comportamiento está en concordancia con lo esperado, suponiendo que estos movimientos son debido al aumento en el carácter p cuando se produce el alargamiento del enlace XH que hace más fácil el estiramiento del enlace pero más difícil el modo de flexión del mismo.⁵ Además, también es posible observar que en el rango de menores frecuencias se pueden localizar las bandas correspondientes a los modos vibracionales de torsión NH (twisting) y de cabeceo (wagging) del grupo NH_2^+ junto a otros modos de vibración, manteniendo una buena relación entre las frecuencias experimentales y las calculadas (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias vibracionales experimentales y calculadas (en cm^{-1}) de los espectros de infrarrojo del hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) y el hidroyoduro de iodosertralina ($\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$) en conjunto con las asignaciones tentativas.

Abreviaturas: f, fuerte; m, medio; d, débil; h, hombro; md, muy débil, Ph=fenilo, ip:en el plano, op:fuera del plano.

SerH ₂ ⁺ Cl ⁻ Frecuencia observada (cm ⁻¹)	SerH ₂ ⁺ Cl ⁻ Frecuencia calculada (cm ⁻¹)	Intensidad relativa	Asignación tentativa	I-SerH ₂ ⁺ I ⁻ Frecuencia observada (cm ⁻¹)	I-SerH ₂ ⁺ I ⁻ Frecuencia calculada (cm ⁻¹)	Intensidad relativa	Asignación tentativa
	3477,588	1,645988	v _{as} (NH ₂ ⁺)		3485,630	1,637130	v _{as} NH (NH ₂ ⁺)
	3361,036	6,474864	v _s (NH ₂ ⁺)		3436,370	0,752450	v _s NH(NH ₂ ⁺)
3240 d	3235,060	0,022832	vCH (Ph-Cl)		3239,000	0,042490	vCH (PhCl)
	3220,853	0,024961	v _{as} CH (PhCl)		3222,680	0,015490	v _{as} CH (PhCl)
	3210,703	0,003422	v _{as} (CH ₃)	3201h	3202,240	0,004790	v _{as} (CH ₃)
3178 d	3189,295	0,062451	vCH (Ph)	3174 h	3172,980	0,121640	vCH (Ph-Cl)
3154 d	3148,56	0,249631	v _{as} CH(CH ₂),vCH (ciclo)				
	3134,931	0,079452	v _{as} CH(CH ₂)	3126 h	3136,180	0,188960	v _{as} CH(CH ₂),
3076 d	3080,120	0,096218	vCH(ciclo)		3113,540	0,147920	(ciclo) vCH
	3107,867	0,084723	v _s (CH ₃)		3108,760	0,008290	v _s (CH ₃)
	1680,576	0,170565	v C=C (Ph)	1676 m	1676,840	0,053340	vC=C (Ph)
	1659,382	0,038256	v C=C (Ph, PhCl)		1662,100	0,088130	vC=C (Ph, PhCl)
1640 m	1636,625	0,593778	tijera NH ₂	1645 m	1647,280	0,887930	tijera NH ₂
1626 m	1619,768	0,245849	v C=C (PhCl)		1650,800	0,072340	vC=C (PhCl),
1583 m	1539,496	0,291458	v C=C (Ph)	1599 m	1522,360	2,438240	vC=C (PhCl)
1515 d	1521,819	1,622319	v C=C (PhCl) tijera CH ₂ flexión asimétrica CH ₃	1517 m	1517,570	0,311450	vC=C (PhCl) tijera CH ₂ flexión asimétrica, CH ₃
1488 h	1509,426	0,229882	flexión asimétrica CH ₃	1489m	1504,830	0,728590	flexión asimétrica CH ₃
1467 md	1464,830	0,162601	aleteo CH ₂ , flexión simétrica CH ₃	1466 f	1461,810	0,093670	aleteo CH ₂ flexión simétrica CH ₃
1433 m	1439,840	1,046371	aleteo NH ₂ , torsión CH(ciclo) flexión simétrica CH ₃ aleteo CH ₂	1447 s	1427,470	0,622850	aleteo NH ₂ torsión CH(ciclo) flexión simétrica CH ₃ aleteo CH ₂
1423 m	1427,702	0,636848	flexión simétrica CH ₃ δ CCH ip (PhCl)	1416 h	1425,520	1,619480	flexión simétrica CH ₃ , δ CCH ip (PhCl)
1403 s	1396,279	0,142119	flexión simétrica	1400 s	1397,530	1,797810	flexión simétrica CH ₃

Capítulo I: Complejo iodo-sertralina

CH ₃ , ciclo δ CH				δCH ciclo			
				1387 s	1374,040	0,134550	CH ₃ flexión simétrica, δ CH ciclo
				1360 d	1366,360	0,172970	flexión simétrica CH ₃ ciclo δCH aleteo NH ₂
1339 m	1343,336	0,083625	Balanceo CH ₃ torsión NH ₂ δCH ciclo torsión CH ₂	1343 m	1345,620	0,274160	balanceo CH ₃ torsión NH ₂ δ CH ciclo torsión CH ₂
1310 m	1297,727	0,228282	δCCH ip (PhCl, Ph)	1285 m	1300,550	0,101220	δCCH ip (PhCl, Ph)
1270 m	1274,131	0,212599	torsión CH ₂	1267 m	1272,790	0,524880	torsión CH ₂
1250 m	1258,731	0,107284	δCCH ciclo	1251 m	1250,260	0,782840	δCCH ciclo
1248 d	1235,853	0,142985		1237 d	1233,280	0,341330	
1214 m	1217,275	0,220375	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo torsión, CH ₂ vCNC	1215 m	1224,860	0,149560	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo torsión CH ₂ vCNC
				1202 m	1204,060	0,027430	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo torsión CH ₂
				1171 w	1180,560	0,842210	δCCH ip (PhCl, Ph)
1136 f	1138,180	0,087837	δCCH ip (PhCl, Ph), ciclo δCCH torsión CH ₂ torsión NH ₂	1132 f	1134,070	0,163340	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo torsión CH ₂ torsión NH ₂
				1107 m	1106,700	0,160850	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo torsión CH ₂
1081 w	1073,615	0,014896	δCCH ip (PhCl, Ph) δCCH ciclo	1076 m	1075,450	0,041480	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo
1057 m	1058,431	0,875498	δCCH ip (PhCl, Ph) δCCH ciclo	1052 m	1052,590	0,336240	δCCH ip (PhCl, Ph), δCCH ciclo
1025 m	1036,345	0,365318	v(C-N)	1028 s	1024,100	0,223770	v(C-N)
1012 h	1019,900	0,190899	δCCH ip (Ph), δCCC				
1002 h	998,3846	0,008651	δCCH op (PhCl, Ph)	997 m	997,580	0,006180	δCCH op (PhCl, Ph)
				956 m	950,550	0,207630	δCCH op (PhCl, Ph), Balanceo CH ₃ Balanceo CH ₂ Torsión NH ₂
				924 m	917,160	0,05180	δCCH op (PhCl, Ph), balanceo CH ₃ balanceo CH ₂
				914 h	913,260	0,030380	δCCH op (PhCl, Ph) balanceo CH ₂
893 m	890,7757	0,15424	δCCH op (PhCl, Ph), respiración (Ph,PhCl) balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂	896 m	896,060	0,423680	δCCH op (PhCl, Ph), respiración (Ph,PhCl) balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂
845 md	858,5498	0,607433	δCCH op (PhCl, Ph), δCH ciclo balanceo CH ₃	876 h	871,190	0,33260	δCCH op (PhCl, Ph), balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂
826 m	824,7017	0,077872	respiración (Ph) δCH ciclo balanceo CH ₃ balanceo CH ₂	820 f	827,640	0,019180	respiración (Ph), δCH ciclo balanceo CH ₃ balanceo CH ₂

							balanceo NH ₂
796 h	814,479	0,079348	respiración (Ph), ciclo δCH balanceo CH ₃ balanceo CH ₂	804 m	811,910	0,280820	respiración (Ph), ciclo δCH balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂
785 m	796,1824	0,808563	δCCH op (PhCl, Ph) balanceo CH ₃ balanceo, CH ₂	777 f	784,260	0,177090	respiración (Ph), balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂
769 m	760,3515	0,542095	δCCH op (Ph, PhCl) balanceo, CH ₃ balanceo CH ₂	760 m	762,100	1,018710	δCCH op (Ph, PhCl), respiración (Ph), balanceo CH ₃ , balanceo CH ₂ , balanceo NH ₂
743 d	742,8886	0,072814	δCCH op (Ph, PhCl) balanceo, CH ₃ balanceo, CH ₂	743 m	731,770	0,175640	δCCH op (Ph, PhCl), respiración (PhCl)
702 m	708,3854	0,076838	respiración (Ph,PhCl) balanceo CH ₃ balanceo CH ₂	729 m	715,960	0,578870	δCCH op (Ph, PhCl), balanceo CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo NH ₂
673 m	697,7009	0,32969	respiración (Ph) balanceo CH ₂	673 m	699,090	0,367260	Respiración (PhCl)
643 d	663,4005	0,166804	respiración (Ph) balanceo CH ₃ balanceo CH ₂	634 d	633,010	0,297930	Respiración (Ph), balanceo CH ₂
620 m	634,8886	0,052174	respiración (Ph) balanceo CH ₂				
589 m	590,0904	0,059073	Torsión y	617 m	616,220	0,161890	Torsión y respiración
563 d	579,0513	0,051966	respiración (ciclo	558 d	564,980	0,018160	(ciclo Ph, PhCl)
534 d	544,8443	0,167831	Ph, PhCl)	526 d	526,300	0,369390	
514 m	511,9304	0,069119	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl)	511 d	509,720	0,200080	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl) v C-Cl
495 m	475,4928	0,016656	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl) vC-Cl	487m	474,370	0,011340	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl) v C-Cl
				476 m	468,410	0,062460	Torsión y respiración del anillo y Ph
445 d	455,8562	0,166197	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl)	442 m	446,280	0,081480	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl) v C-I
426 d	423,2416	0,010425	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl)	426 d	418,490	0,013730	Torsión y respiración (ciclo Ph, PhCl)

La identificación del modo vibracional de estiramiento $\nu(\text{C-N})$ es siempre problemático debido a la posible superposición con otras bandas en esa región. Las frecuencias calculadas para este modo $\nu(\text{C-N})$ dan lugar a los valores de 1036 y 1024 cm^{-1} , lo que permitió asignar el estiramiento experimental de las bandas $\nu(\text{C-N})$ a 1025 y 1028 cm^{-1} para $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, y para $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$, respectivamente.

Como se conoce, es posible la presencia de varios modos vibracionales para el grupo metilo. Este grupo da lugar a dos diferentes modos $\nu(\text{C-H})$, los estiramientos simétricos y asimétricos que normalmente caen en el rango 2800-3000 cm^{-1} donde generalmente el

modo asimétrico aparece a mayores frecuencias que la del modo simétrico. Las frecuencias calculadas para los modos de estiramientos simétricos y asimétricos de $\nu(\text{C-H})$ se encontraron en el rango y en el orden esperado (3211 y 3108 cm^{-1} para la $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, y 3202 y 3109 cm^{-1} para $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$ respectivamente). En los espectros experimentales sólo el modo de estiramiento asimétrico se pudo observar como un hombro en el producto de sertralina con iodo (Tabla 2).

Los enlaces CH pueden producir vibraciones de flexión las que fueron identificadas en la región de $1520\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$. Teniendo en cuenta la naturaleza del elemento al cual el grupo metilo está unido, era de esperar⁶ que el modo de deformación simétrica de este grupo apareciera a valores de frecuencia de $1470 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$. Esto se correlaciona muy bien con nuestras evaluaciones en donde aparecen a 1467 y 1466 cm^{-1} en el espectro experimental en comparación con los valores de 1465 y 1462 cm^{-1} calculados en la simulación teórica en los espectros de $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ y $\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$ respectivamente, en el cual las dos bandas aparecen con gran intensidad. El modo vibracional del CH_2 contribuye además a esa banda en menor proporción. A altas frecuencias las vibraciones de flexión de los grupos metilo y metileno se superponen pero a baja frecuencias es posible observar el modo vibracional de balanceo del grupo metilo.

Las frecuencias de flexión en el plano del grupo C-H se esperan en la región de $1000\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ mientras que los modos correspondientes a las vibraciones fuera del plano del grupo C-H en la región de $750\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ para compuestos aromáticos. En nuestros estudios las vibraciones de flexión en el plano estuvieron localizadas, como se esperaba, entre 1310 y 1050 cm^{-1} y las vibraciones fuera del plano entre 870 y 960 cm^{-1} , respectivamente. En general, las vibraciones calculadas para C-H (de estiramiento, en el plano y fuera del plano) estuvieron en muy buena concordancia con los valores experimentales aceptados (Tabla 2, Figura 5).

Como se ha indicado, estas bandas no estuvieron apreciablemente afectadas por la naturaleza del sustituyente y por esta razón no se pudo diferenciar los dos grupos fenilos de la molécula (uno de ellos con cloruro).¹² Las vibraciones de estiramiento del anillo son representativas del anillo aromático. Generalmente, para los bencenos sustituidos, las bandas observadas en la región de $1400\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ son características de los modos de estiramiento de los enlaces $\text{C}=\text{C}$. En este trabajo, esas vibraciones fueron asignadas (tanto para las frecuencias vibracionales del espectro teórico y experimental) en la región $1500\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$. Asimismo, aparte de la contribución de otros modos

vibracionales, la frecuencia de vibración del modo de estiramiento asimétrico del grupo CNC calculado teóricamente es consistente con el valor experimental (Tabla 2).

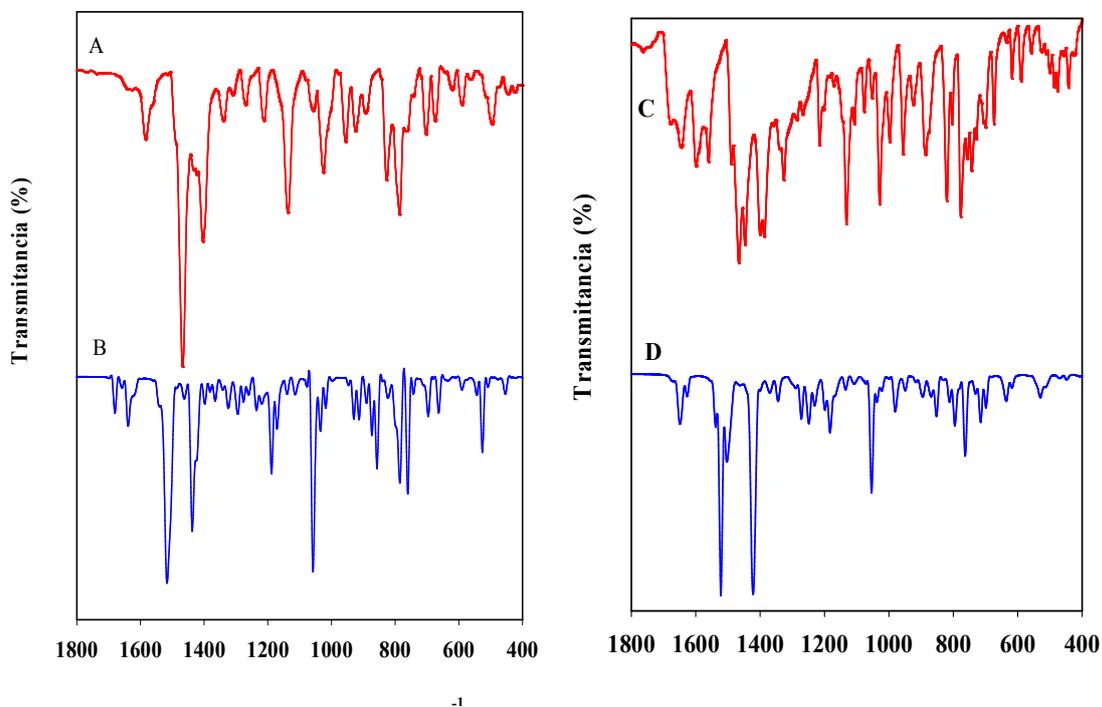


Figura 5. Izquierda: espectro experimental (A) y teórico (B) FTIR para el hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$). Derecha: espectro experimental (C) y teórico (D) FTIR del hidroyoduro de iodosertralina ($\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$)

Una de las características más relevantes del análisis computacional fue la identificación de modos de vibración de estiramiento del C-X (X=halógeno) (Tabla 2). Los valores de las frecuencias del modo de estiramiento para el enlace C-I aparecieron a valores de frecuencias más bajas que las esperadas para el enlace C-Cl. Esta tendencia está en concordancia con el mayor radio atómico del yodo en comparación con el del cloro que forma un enlace más largo C-X y por lo tanto, la banda debido al modo de estiramiento aparece en el espectro, como era de esperar, con una frecuencia menor y a menor número de onda.

Vale la pena destacar que en el estudio realizado por nosotros, en contraste con la simulación computacional de los métodos *ab initio* y de la teoría del funcional de la densidad (o DFT, por sus siglas en inglés, Density Functional Theory) realizados por Sagdinc y colaboradores³, que para el caso del hidrocloreto de sertralina, nuestros resultados reflejan una mejor concordancia entre los datos experimentales y teóricos (Tabla 2, Figura 5). En un estudio anterior, Zayed y colaboradores² realizaron un análisis simplificado del espectro de FTIR para el producto sertralina-yodo en el cual solamente describieron los rangos de vibración esperados para las principales bandas características. En el presente estudio hemos podido analizar la mayoría de las bandas vibracionales experimentales y asignarlas de acuerdo a los espectros calculados mediante simulaciones computacionales.

1.3.2. Caracterización por espectroscopía UV-vis

El hidrocloreto de sertralina tiene un espectro típico de absorción electrónica que deriva de compuestos con el grupo arilo halogenado mostrando una banda en 290 nm cuando se utiliza diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente (Figura 6). Esta banda es conocida como banda de absorción secundaria y como se esperaba, muestra un desplazamiento batocrómico respecto del benceno.¹³

Para el yoduro de sertralina esta banda fue localizada a 294 nm con un ligero desplazamiento hacia el rojo en comparación con el hidrocloreto de sertralina (Figura 6). Sorprendentemente el compuesto mostró una nueva banda a 360 nm. La disolución del $\text{I-SerH}_2^+\text{T}^-$ en CH_2Cl_2 conduce a la formación de un espectro electrónico característico de complejos de transferencia de carga del tipo: $[\text{R}_2\text{-N}^+\text{-I}]^-$.¹⁴

Dicho espectro se caracteriza por la desaparición de la banda situada en 500 nm para el yodo en solución de diclorometano y la subsecuente intensificación de las bandas

situadas en 295 y 357 nm. En la gráfica se representan dichos espectros y se incluye el de clorhidrato de sertralina con fines comparativos.

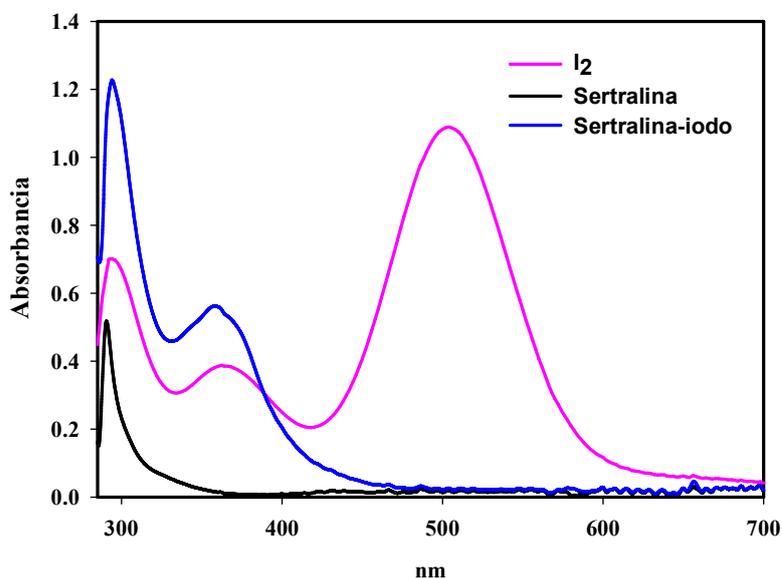


Figura 6. Espectros de absorción electrónica en la región de 200-700 nm (diclorometano) de la solución de: I₂ (línea rosa), hidrocloreto de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻, línea negra) y del hidruro de iodosertralina (I-SerH₂⁺I⁻, línea azul).

1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

1.4.1 Actividad antidepresiva. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test).

Después de realizar el pre-test de la PNF, se iniciaron los tratamientos en los tres grupos experimentales.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 3 grupos experimentales:

- Grupo 1: animales tratados con solución salina (grupo control).
- Grupo 2: animales tratados con hidrocloreto de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻).
- Grupo 3: animales tratados con el complejo iodo-sertralina (I-SerH₂⁺I⁻).

Entre el primero y segundo día de tratamiento, los animales del grupo 3 (iodo-sertralina) mostraron un claro efecto depresor del sistema nervioso central (disminución de la actividad motora y pérdida de reflejos) incluyendo una marcada disminución de

peso, un deterioro general y posteriormente, su muerte. Todos los animales (n=5) murieron entre el primer y segundo día de tratamiento, y consecuentemente los animales no completaron el tratamiento del protocolo programado. Debido a esta aparente toxicidad del tratamiento, se disminuyó la dosis (5 mg/kg). En este caso todos los animales (n=5) murieron entre el tercer y cuarto día de tratamiento.

Este breve tratamiento con hidrioduro de iodosertralina produjo una disminución de peso mayor que la inducida por hidrocloreuro de sertralina (Figura 7). Nuestros resultados demuestran que I-SerH₂⁺I⁻ produjo toxicidad la cual a su vez es dependiente de la dosis administrada.

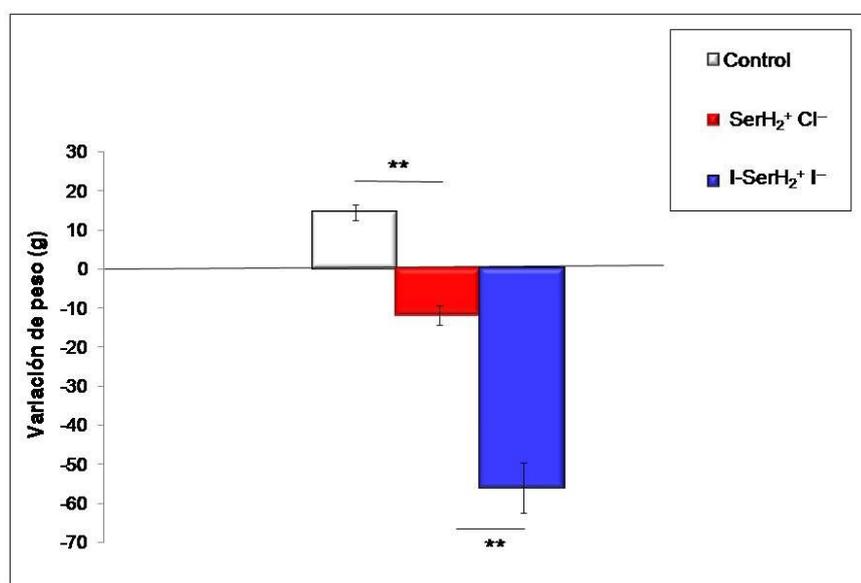


Figura 7. Efecto del hidrocloreuro de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻) y del producto sertralina-iodo (I-SerH₂⁺I⁻) sobre el peso corporal de las ratas. Los animales tratados con el producto sertralina-iodo indujeron una mayor pérdida de peso corporal que la inducida por la sertralina (SerH₂⁺Cl⁻) [P <0,01], ** P <0,01, 7-12 ratas por grupo (dosis: 5 mg / kg). Los datos se analizaron con ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Debido a que los tratamientos no fueron completados, el efecto antidepresivo no pudo ser evaluado en la PNF como consecuencia de la manifestación de severos efectos tóxicos producidos por el compuesto de I-SerH₂⁺I⁻ a las dosis evaluadas (10 y 5 mg/kg). Una posible explicación de los efectos tóxicos podría ser la consecuencia de haber

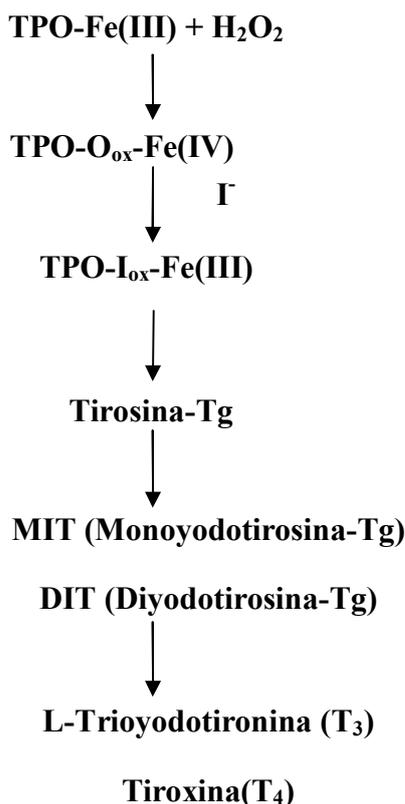
utilizado una dosis de iodo en el compuesto cercana a la dosis letal 50 (DL 50). La DL50 informada en la literatura es: (i) DL50 oral en ratas: 14 mg/kg (cristales de iodo)¹⁵ (ii) DL50 oral en ratas: 14 mg/kg (tintura de iodo)¹⁶ (III) DL50 oral en ratas: 4340 mg/kg (ioduro de sodio).¹⁷

1.4.2. Actividad anti tiroidea

1.4.2.1. Aspectos generales

Las enfermedades tiroideas se manifiestan por alteraciones cualitativas o cuantitativas de la secreción hormonal y del tamaño o forma de la glándula tiroidea. Una de las más frecuentes resulta ser el *hipertiroidismo*. El término hipertiroidismo está relacionado a las alteraciones que resultan de la sobreproducción sostenida de hormona por la glándula tiroidea, como por ejemplo en la enfermedad de Graves que es una enfermedad autoinmune en la cual se forman anticuerpos, las inmunoglobulinas tiroestimulantes (IgG), que se unen al receptor de hormona estimulante del tiroides (TSH) y lo activan. Esto conduce al bocio y a la secreción de grandes cantidades de hormonas tiroideas. Entre los pacientes con hipertiroidismo se estima que un 60 a 80% tienen enfermedad de Graves dependiendo de factores regionales, especialmente la cantidad de iodo en la dieta diaria. Los síntomas característicos son bocio difuso y tirotoxicosis, y puede asociarse con oftalmopatía y orbitopatía infiltrativa y, en ocasiones, dermatopatía infiltrativa.¹⁸

La función principal de la glándula tiroides consiste en producir la cantidad adecuada de hormonas tiroideas, tiroxina (T₄) y triiodotironina (T₃), para satisfacer las necesidades de los tejidos periféricos (Esquema 1). Básicamente el mecanismo de acción consiste en lo siguiente: en primer lugar interviene la peroxidasa tiroidea (TPO), que contiene un grupo glicoproteína del tipo hemo (Fe(III)) y se encuentra anclada dentro de la célula folicular de la membrana tiroidea. El primer paso en la síntesis de la hormona tiroidea implica la generación de una enzima en su forma oxidada promovida por peróxido de hidrógeno endógenamente producido (TPO-O_{ox}-Fe(IV)). La enzima oxidada reacciona con ioduro para formar un "intermediario iodado" (TPO-I_{ox}-Fe(III)). En ausencia de un fármaco anti tiroideo, reacciona con residuos específicos en la tiroglobulina (Tirosina-Tg) para formar monoiodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT).



Esquema 1. Representación esquemática de la formación de tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃)

Posteriormente un acoplamiento intramolecular subsiguiente de MIT y DIT forma triiodotironina (T₃), y el acoplamiento de dos moléculas de DIT forma tiroxina (T₄). En el hipertiroidismo, la sobreproducción de T₄ y T₃ puede ser controlada por el bloqueo de la biosíntesis de la hormona de la tiroides o la reducción de la conversión de T₄ a T₃.¹⁹

Los fármacos antitiroideos inhiben la síntesis de hormonas tiroideas al interferir en la incorporación de iodo en los residuos de tirosina de la tiroglobulina (organificación del iodo), catalizada por la peroxidasa tiroidea (TPO) y además tienen la capacidad de formar complejos donante-aceptor de electrones muy estables con el I₂.²⁰ Los antitiroideos más comunes pertenecen a las familias de la tiourea, de la que derivan los compuestos propiltiouracilo, metimazol (1-metil-2-mercaptoimidazol) y carbimazol. Todos ellos conforman el grupo de las tionamidas, que son moléculas relativamente simples, que contienen un grupo sulfhidrilo y un resto de tiourea dentro de una estructura heterocíclica. El origen de sus propiedades antitiroideas se relaciona con su capacidad para actuar como dadores de electrones.

En un comienzo se pensaba que la presencia del resto de azufre era fundamental para demostrar dicha actividad, principalmente sobre la base de la interacción con iodo, sin embargo, datos reportados mostraron que compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno fueron capaces de formar complejos de transferencia de carga con iodo²¹, lo

que se convirtió en un modelo *in vitro* para la prueba de actividad anti-tiroidea. Así por ejemplo una serie de compuestos antidepresivos (imipramine, desipramine, clomipramine, entre otras) demostraron ser capaces de formar complejos de transferencia de carga con el I_2 , verificando entonces su potencial uso como antitiroideos.^{22,23}

1.4.2.2. Resultados

En ese sentido y teniendo en cuenta estos antecedentes previos, se decidió probar la potencial actividad anti-tiroidea de hidrocloreto de sertralina. Para dicho fin se puso en práctica el método de interacción con I_2 (método de Lang, sección experimental). En primer lugar se verificó que $SerH_2^+Cl^-$ no mostrara bandas en el rango de 245 a 600 nm con la finalidad de evitar interferencia con el método. Cuando a una solución de $SerH_2^+Cl^-$ se agrega una solución de iodo en el mismo disolvente, se observa la formación del complejo de transferencia de carga debido a la presencia de una nueva banda de TC situada en 257 nm (Figura 8)

Como es posible observar en la Figura 8 (izquierda), la intensidad de esta banda aumenta al aumentar las concentraciones de hidrocloreto de sertralina mientras que la concentración de iodo es constante en cualquier momento en el experimento. El valor de absorbancia para la banda situada en 257 nm se registró para las diferentes concentraciones utilizadas. Para realizar la cuantificación se aplicó un procedimiento de validación: la solución del donante en forma pura a la misma concentración se utiliza como referencia, y luego se obtuvieron los espectros por sustracción de la absorción posible de iodo. El análisis de los datos se realizó de acuerdo con el método de Lang.

En la Figura 8 (derecha), se representa $[I_2] [Ser]/d_c$ vs. $[I_2]+[Ser]-d_c/\epsilon_0$. A partir de ésta gráfica es posible calcular el valor de K_c (constante de formación) para la formación del complejo de transferencia de carga, el cual da un valor de 3.277,48 $L.mol^{-1}$ siendo el coeficiente molar de $\epsilon_0 = 5.358,39 L.mol^{-1}.cm^{-1}$. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la actividad anti-tiroidea se puede esperar a partir de compuestos cuya constante de formación del complejo iodado K_c es mayor que un valor de 100 $L.mol^{-1}$. Por esta razón, es posible asumir para $SerH_2^+Cl^-$ una fuerte acción anti-tiroidea. Como indicamos en las referencias previas, valores de K_c fueron determinados para otros antidepresivos tanto en diclorometano como en tetracloruro de carbono como disolventes. Aunque las mediciones del presente trabajo se llevaron a cabo en

dicloroetano para la $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, el fármaco parece tener un efecto que puede al menos considerarse en el mismo orden de magnitud que la imipramina, desipramina, así como la clomipramina.²²

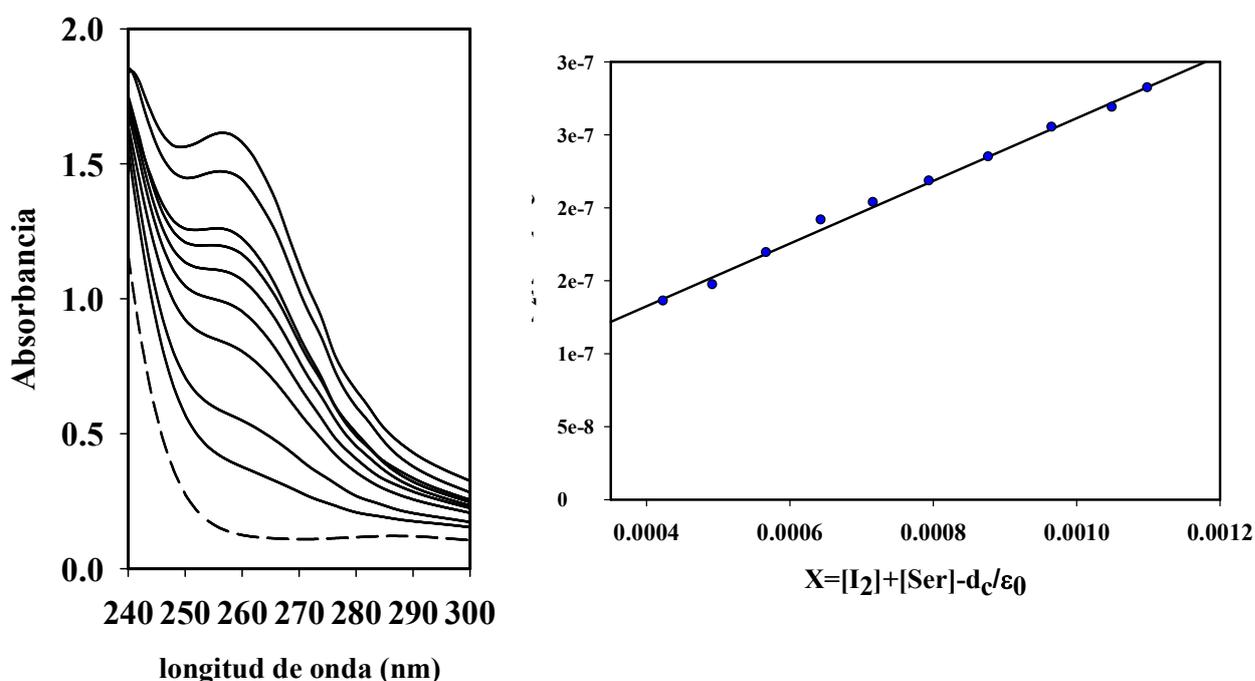


Figura 8. Método Lang. Izquierda: espectros electrónicos de absorción en la región de 240-300 nm ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, dicloroetano, $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, de 1 cm de camino óptico). La banda de TC aparece alrededor de 257 nm, cuando se procede a aumentar la concentración de hidrocóloruro de sertralina a partir de $1 \times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ hasta $1 \times 10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$. En todos los casos la concentración de yodo se mantiene constante en $4 \times 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$. La reacción se lleva a cabo directamente en la celda espectrofotométrica mediante la mezcla de soluciones 1,5 ml de cada uno de los reactivos: hidrocóloruro de sertralina (donante) e yodo (aceptor). Derecha: Relación entre $[\text{I}_2][\text{Ser}]/d_c$ vs. $[\text{I}_2] + [\text{Ser}] - d_c/\epsilon_0$ para complejo sertralina-yodo en las mismas condiciones experimentales.

1.4. CONCLUSIONES

En este trabajo nosotros medimos el espectro experimental FTIR del hidrocioruro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) y del producto iodo-sertralina ($\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$). El espacio conformacional de las moléculas fue estudiado utilizando simulaciones de dinámica molecular en el ensamble NVT. Sus propiedades geométricas, electrónicas y vibracionales fueron calculadas según la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).

Una comparación de los resultados teóricos y experimentales proporcionó una descripción completa de las propiedades geométrica y vibracional del compuesto. Uno de los resultados de mayor relevancia en este estudio ha sido la evaluación de los modos de estiramiento de C-X (X=halógeno) y de los modos vibracionales simétricos y asimétricos N-H correspondientes al grupo NH_2^+ en ambos compuestos.

Además, nuestros estudios de los espectros vibracionales basados en los cálculos teóricos mostraron una mejor concordancia con los datos vibracionales obtenidos mediante el espectro de FTIR experimental de hidrocioruro de sertralina que los datos descritos anteriormente en la literatura.

Los intentos para determinar la actividad antidepresiva del producto iodo-sertralina ($\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$) fracasaron debido al efecto tóxico que ejerce este compuesto en las ratas.

Asimismo, quedó claramente demostrado la potencialidad del uso de hidrocioruro de sertralina como agente antihipertiroideo presentando un efecto efecto en el mismo orden de magnitud que el efecto determinado para otros agentes antidepresivos como imipramina, desipramina y clomipramina.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ J.F. Remenar, J.M. MacPhee, B.K. Larson, V.A. Tyagi, J.H. Ho, D.A. McIlroy, M.B.Hickey, S P.B.haw, O.Almarsson, *Org. Process Res. Dev.* 7 (2003) 990-996.
- ² M.A. Zayed, M.F. Hawash, M.A. Fahmey, A.A. El-Habeeb. *Spectrochim. Acta Part A* 68 (2007) 970-978.
- ³ S. Sagdinc , F. Kandemirli, S.H. Bayari, *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 405-412.
- ⁴ D. Lin–Vien, N.B. Colthup, G. Fateley, J.G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston, MA, 1991.
- ⁵ L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, vol, 2, Chapman and Hall, London, 1980.
- ⁶ B. Chenon, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* 36 (1958) 1181-1209.
- ⁷ R.A. Heacock, L. Marion, *Can. J. Chem.* 34 (1956) 1782-1795.
- ⁸ A.M. Amorim da Costa, M.P.M. Marques, L.A.E. Batista de Carvalho, *J. Raman. Spectrosc.* 34 (2003) 357-366.
- ⁹ G.A. Giffin, S. Boesch, D.N. Bopege, D.R. Powell, R.A. Wheeler, R.J. Frech, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 15914-15920.
- ¹⁰ B. Smith, *Infrared Spectral Interpretation; A systematic approach*, CRC Press, Boca Raton, LLC; 1999.
- ¹¹ A. Rousseau, F. Comby, J. Buxeraud, C. Raby, *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 726-728.

- ¹² N, Sundaraganesan; Saleem,; S, Mohan, Spectrochim, Acta Part A 59 (2003) 2511-2517.
- ¹³ L. Doub, J.M. Vandenbelt, J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 2714-2723.
- ¹⁴ L.I. Bebawy, N. El-Kousy, J.K. Suddik, M. Shokry, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 133–142.
- ¹⁵ R.J. Lewis, Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 9th Ed, Van Nostrand Reinhold, New York, 1996, Vol, 1-3.
- ¹⁶ National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH); Immediately Dangerous to Life and Health (IDLH); Ibid, Publications; 1998.
- ¹⁷ W.J. Ward, N. Mathieu, Environmental Assessment Program, Washington, State Department of Ecology, 2011.
- ¹⁸ A.M. de Benoist, B. L. Rogers, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 24 (2010) 1-11.
- ¹⁹ G. Roy, D. Das, G. Mugesh, Inorg. Chim. Acta, 360, 303-316 (2007).
- ²⁰ D.S.Cooper, N. Engl. J. Med. 352 (2005) 905-917.
- ²¹ (i) R.P. Lang J. Am. Chem. Soc 84 (1962) 1185-1192. (ii) F. Ismat, M.A. Munawar, T. Affia. J. Mex. Chem. Soc, 54 (2010) 227-232.
- ²² J.F. Lagorce, F. Comby, A. Rouseau, J. Buxeraud,; C. Raby. Chem. Pharm. Bull. 41 (1993) 1258-1260.
- ²³ C.Raby; J.F. Lagorce,; A.C.Jambut-Absil, J.Buxeraud, G. Catanzano. Endocrinol. 126 (1990) 1683-1691.

CAPÍTULO II. COMPLEJO DE Zn(II) CON SERTRALINA

2.1. INTRODUCCIÓN

Si bien en la parte introductoria se mencionaron algunos aspectos relevantes del fármaco sertralina, intentaremos en este capítulo brindar información existente relativa a la misma con la finalidad de poder apreciarla con intensidad e integridad para direccionarnos en lo que se presenta en este capítulo.

Como se viene mencionando la sertralina es un antidepresivo perteneciente al grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), es generalmente prescrita principalmente para la depresión en pacientes adultos ambulatorios, como también para el trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico y fobia social en adultos y niños. Los siguientes documentos patentados se relacionan con este compuesto: US 4536518, WO92/18005, US 5130338, US 4971998, WO 92/00103, US 5061728, US 4940731 y US 4962128.

Existen numerosos documentos relacionados con la base libre de sertralina y sus sales farmacéuticamente aceptables, así como sus polimorfos. Así:

- (i) La solicitud internacional WO2004011413 se refiere a: "la base libre de sertralina, (1S,4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalen amina, en forma cristalina donde la sal es el hidrocloreuro o mandelato".
- (ii) La solicitud US20080161412 revela un proceso de preparación de clorhidrato de sertralina.
- (iii) La solicitud US2007/0054960 revela "una serie de sales de sertralina, su preparación y su uso en la preparación de hidrocloreuro de sertralina Forma-II", en donde el ácido utilizado en la formación de la sal se selecciona del grupo formado por ácido ftálico, ácido glutámico, ácido adípico, ácido salicílico, ácido 4-metil-benzoico y ácido 4-metoxi-benzoico.
- (iv) La patente CN190726 describe sales de sertralina y formas de dosificación de liberación sostenida de la misma. Además, este documento se refiere a una sal de acetato, una sal de L-lactato y una sal de L-aspartato de sertralina.
- (v) El documento US20050014829 se refiere a "una serie de sales de sertralina", en las que el ácido utilizado en la formación de las sales son: ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido maleico, ácido malónico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido L-tartárico, HBr, ácido acético, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido láctico, ácido metanosulfónico o ácido toluenosulfónico".

(vi) La solicitud internacional WO9901121 revela "formas de dosificación de liberación sostenida de sertralina y una sal de acetato, una sal de L-lactato y una sal de L-aspartato de sertralina, composiciones farmacéuticas de los mismos y métodos de uso de dicha sal para el tratamiento de diversas afecciones y trastornos". Esta solicitud también está dirigida a procedimientos para preparar acetato de sertralina, L-lactato de sertralina y L-aspartato de sertralina.

(vii) El documento US2004/198818 revela "ciertas sales farmacéuticamente aceptables del potente inhibidor terapéuticamente selectivo de la recaptación de serotonina, sertralina, y composiciones farmacéuticas de las mismas. Dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en la sal de ácido p-toluenosulfónico, la sal de ácido fumárico, la sal del ácido bencenosulfónico, la sal de ácido benzoico, la sal de ácido L-tartárico entre otras.

Todos estos documentos nos revelan el interés científico en el logro de modificaciones y/o derivados de la misma con la intención de conseguir un producto de igual actividad pero que mejore todas las propiedades químicas y fisicoquímicas del mismo.

Por otro lado, son conocidos los efectos benéficos de los oligoelementos esenciales tales como el zinc. El zinc es uno de los elementos esenciales más abundantes en el cuerpo humano y al ser un ión intracelular se encuentra en su mayoría en el citosol. Su cantidad en el individuo adulto oscila entre 1 y 2,5 g, siendo el segundo oligoelemento en relación a la cantidad total en el organismo, superado tan sólo por el hierro. Las concentraciones más elevadas aparecen en el hígado, páncreas, riñones, huesos y músculos voluntarios, existiendo también concentraciones importantes en el ojo, próstata, espermatozoides, piel, pelo y uñas. Para valorar su estatus en el organismo se usan principalmente como biomarcadores los niveles en suero, plasma y eritrocitos.

Tanto el Zn, como el Cu y el Se intervienen en procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida. Entre estos cabe destacar la respiración celular, la utilización de oxígeno por parte de la célula, la síntesis tanto de ADN como de ARN, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y la eliminación de radicales libres, proceso que se hace a través de una cascada de sistemas enzimáticos. El Zn actúa como cofactor y como integrante de al menos 200 enzimas, como aldolasas, deshidrogenasas, esterasas, peptidasas, fosfatasa alcalina, anhidrasa carbónica, superóxido-dismutasa y ADN y ARN polimerasas, implicadas en el metabolismo energético y de los hidratos de carbono, en las reacciones de biosíntesis y degradación

de proteínas, en procesos biosintéticos de ácidos nucleicos y compuestos hemo, en el transporte de CO₂, entre otras.

La bibliografía también describe numerosas patologías asociadas con deficiencias en las concentraciones de zinc en el cuerpo, tales como el retraso en el crecimiento corporal, las alteraciones esqueléticas, anorexia, alteraciones en la madurez sexual y la capacidad reproductiva, depresión de la función inmune, entre otras.¹

En particular el disparador principal de este trabajo de tesis y en especial de este capítulo ha sido la bibliografía concerniente al hecho por el cual pacientes depresivos mostraron deficiencias de Zinc, por lo que en tales casos, una terapia con suplementos de Zinc podría ser beneficiosa para combatir la depresión. Así se pueden describir los siguientes documentos relacionados a esta funcionalidad:

(i) El documento UA64383 (U) revela "Un método para reducir el estado depresivo que comprende la administración de un sustancia antidepresiva de acetilsalicilato de zinc que se administra por vía intraperitoneal al cuerpo del animal.

(ii) Existe en la bibliografía información que indica que se han relacionado niveles de zinc bajos en suero con la depresión mayor.² Además, se ha demostrado el tratamiento con zinc parece tener un efecto antidepresivo. Con la esperanza de entender el papel del zinc en los trastornos del estado de ánimo, existen trabajos recientes que han comenzado a explorar posibles mecanismos de acción de zinc en la captación de serotonina en el cerebro.

(iii) El documento "efectos de la suplementación con Zinc sobre la Eficacia de la terapia antidepresiva, citoquinas inflamatorias, y el factor derivado del cerebro-neurotrófico en pacientes con depresión mayor"³ revela que la depresión en pacientes podría deberse a una disminución en el consumo de fuentes de alimentos ricos en zinc, y que el consumo de suplementos de zinc podría tener una influencia potencial en los síntomas depresivos. Sin embargo, los ensayos clínicos sobre el efecto de los suplementos de zinc en la depresión son limitados. El estudio busca determinar el efecto de la suplementación de zinc en la eficacia de la terapia antidepresiva. Además, en este documento se evaluó el efecto del zinc sobre los niveles plasmáticos de interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF- α), y factor derivado del cerebro neurotrófico-a (BDNF-a).

(iv) En el documento "Essential elements in depression and anxiety. Part I"⁴, se revelan importantes resultados de los estudios preclínicos y clínicos que muestran la participación de los elementos esenciales tales como el zinc, el magnesio, el litio, el

hierro, el calcio y el cromo en la depresión y la ansiedad. A partir de estos estudios, es evidente que los diferentes tipos de depresión y ansiedad responden al tratamiento de diferentes receptores que indican que los mecanismos subyacentes son ligeramente diferentes. Además, la administración de dosis bajas de antidepresivos suplementadas con estos elementos esenciales es eficaz y puede reducir los efectos secundarios no deseados en diferentes tipos de depresión y/o ansiedad.

Por lo tanto, a partir del conocimiento de los efectos beneficiosos antidepresivos de los inhibidores de la recaptación de serotonina, como la sertralina y de los elementos esenciales como el zinc, tuvo forma durante este trabajo de tesis la formulación de una nueva estrategia para el tratamiento de la depresión y otros desórdenes psiquiátricos (depresión bipolar, depresión resistente, depresión postparto, depresión infantil, trastorno obsesivo compulsivo y el trastorno del estrés postraumático) a partir del diseño de un nuevo compuesto que es capaz de exhibir los beneficios combinados de la sertralina y de un elemento esencial, tal como el zinc para el tratamiento de desórdenes psiquiátricos.

Los trabajos realizados consiguieron dar lugar a la formación de una sal formada por un complejo de coordinación aniónico de zinc y el catión sertralina que exhibe el efecto sinérgico esperado a través de nuestra hipótesis enunciada más arriba de la actividad antidepresiva.

El compuesto diseñado y que se presenta a continuación presenta una estructura que no ha sido descrita ni sugerida previamente así como tampoco ha sido descrita o sugerida su inesperada actividad antidepresiva potenciada.

Aunque existen numerosas publicaciones relativas a sales de sertralina con actividad antidepresiva y las formas cristalinas de las mismas, ninguna de estas referencias enseña o sugiere la estructura de los complejos metálicos con sales de sertralina, particularmente complejos de aniones que contienen zinc y clorhidrato de sertralina como contra-catión. Tampoco el arte previo enseña o sugiere que tales complejos de coordinación puedan exhibir actividad antidepresiva potenciada.

Por lo tanto, a continuación se presenta la invención que se da a conocer por primera vez, un complejo de coordinación con actividad antidepresiva y un método de preparación de dicho compuesto, así como también la caracterización fisicoquímica del mismo, la resolución de su estructura cristalina y sus efectos antidepresivos probados en un reconocido modelo animal de depresión en ratas.

2.1.1. Objetivos:

Los objetivos de este capítulo fueron:

- 1) Obtención de un compuesto en forma de sal formado entre el anión $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ (tetraclorozincato) y el contracatió sertralonio (reconocido antidepresivo, en su forma de cloruro de sertralonio o clorhidrato de sertralina).
- 2) La caracterización fisicoquímica mediante las técnicas de difracción de rayos X, desde el punto de vista de la espectroscopía vibracional y el análisis térmico.
- 3) La validación que la modificación estructural producida por la formación de la sal produzca variaciones en su actividad antidepresiva.
- 4) La determinación de su actividad antimicrobiana.

2.2. PREPARACIÓN DE $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$.

Método 1

1 milimol de clorhidrato de sertralina se disolvió con agitación continua en una mezcla de 50 mL de acetato de etilo y 25 mL de etanol 96% y se calentó a ebullición hasta disolución. A continuación se preparó una solución que contiene 0,5 milimoles de ZnCl_2 disueltos en 2 mL de HCl 37% y se agregó lentamente gota a gota sobre la solución de clorhidrato de sertralina. La solución se dejó evaporar hasta reducir el volumen a la mitad. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (25°C) y luego se colocó en la heladera a 5 °C durante una semana permitiendo de ese modo la formación de cristales adecuados para estudios estructurales por difracción de rayos X. Los cristales obtenidos fueron filtrados y lavados con etanol 96%.

Método 2.

Se preparó tetraclorozincato(II) de amonio ($(\text{NH}_4)_2[\text{ZnCl}_4]$) de acuerdo a la técnica reportada por Brauer⁵

Para obtener los cristales de la sal de sertralina se procedió de la siguiente manera. 1 milimol de clorhidrato de sertralina se disolvió con agitación continua en 50 mL de etanol 90%. Sobre la misma se agregó lentamente y con agitación, una solución preparada disolviendo 0,5 milimoles de $(\text{NH}_4)_2[\text{ZnCl}_4]$ en la mínima cantidad de agua destilada. A continuación se acidificó la solución a pH=4 empleando HCl 0,1M. Se calentó a ebullición hasta reducir el volumen de la solución a la mitad y con la finalidad de asegurar la eliminación de NH_3 . Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y luego

se colocó en la heladera a 5 °C durante al menos tres semanas. Los cristales obtenidos fueron filtrados y lavados con etanol 96%.

Este nuevo compuesto cristalino fue obtenido con un rendimiento del 70-80 %, presentó un punto de fusión de 235 °C, estable al aire, soluble en dimetilsulfóxido y en mezcla de 50% agua:alcohol (0,05g/500μl).

La identidad del compuesto fue determinada mediante la resolución de su estructura cristalina por difracción de rayos X: $C_{34}H_{36}N_2Cl_8Zn = (SerH_2)_2[ZnCl_4]$.

2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

2.3.1. Caracterización de la estructura mediante difracción de rayos X.

2.3.1.1 Monocristal

La caracterización estructural mediante difracción de rayos X dio lugar a los resultados que se muestran a continuación.

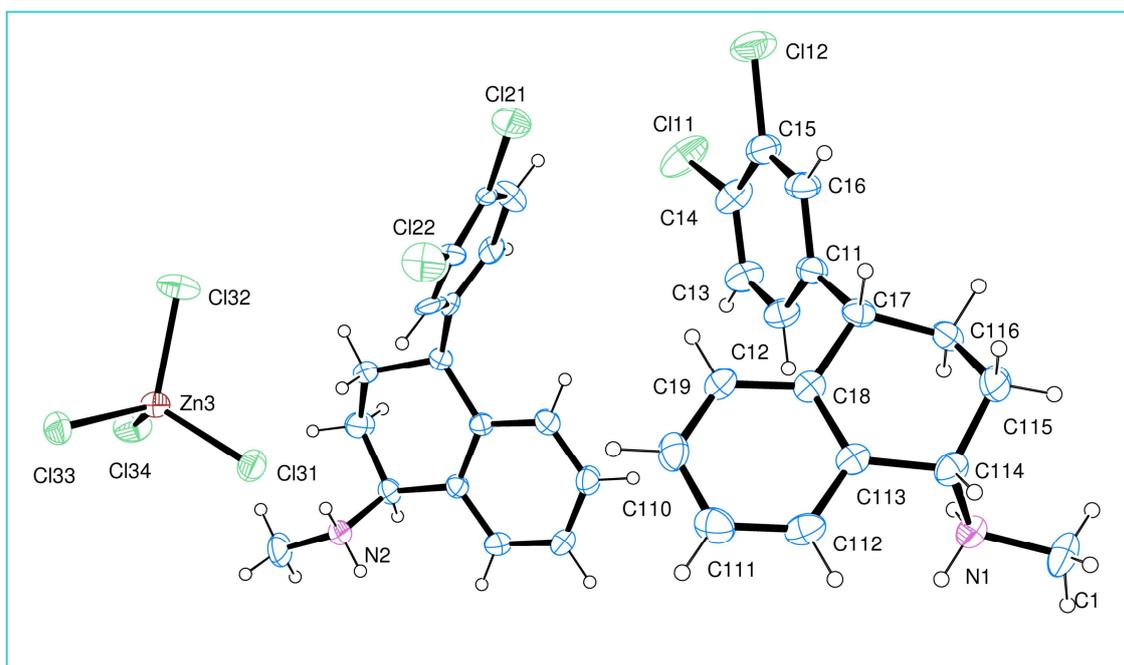


Figura 1. Dibujo de $(SerH_2)_2[ZnCl_4]$ en estado sólido mostrando el rotulado de los átomos no-H y sus elipsoides de desplazamiento al nivel del 30% de probabilidad. Por razones de claridad sólo se ha rotulado completamente la molécula de $SerH_2^+$ ordenada y el ión tetraclorzincato. La otra molécula de $SerH_2^+$ muestra la conformación rotacional con la mayor ocupación [52,2(4)%] de las dos que modelan el grupo $-PhCl_2$ desordenado (Ph=fenilo); sólo se han rotulado unos pocos átomos representativos de esta molécula con el objeto de indicar el esquema de numerado.

La Figura 1 muestra un dibujo ORTEP⁶ de la sal. Los datos del cristal, del procedimiento de colección de datos de difracción y del refinamiento de la estructura se encuentran compendiados en la Tabla 1 mientras que las distancias y ángulos de enlaces intra-moleculares correspondientes se encuentran en la Tabla 2. El par de moléculas del fármaco SerH₂⁺ (#1 y #2), se encuentran en el sólido en su forma catiónica, protonada en el grupo amino, esto es (1*S*,4*S*)-4-(3,4-diclorofenil)-*N*-metil-1,2,3,4-tetrahidro naftalen-1-amonio.

Tabla 1. Datos del cristal y resultados del refinamiento estructural de (SerH₂)₂[ZnCl₄].

Formula empírica	C ₃₄ H ₃₅ Cl ₈ N ₂ Zn
Peso molecular	820,61
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Dimensiones de celda unidad	a = 7,3869(2) Å b = 13,2888(4) Å c = 19,3541(6) Å β = 96,596(3)°
Volumen	1887,3(1) Å ³
Z, densidad (calculada)	2, 1,444 mg/m ³
Coefficiente de Absorción	1,244 mm ⁻¹
F(000)	838
Dimensiones del cristal	0,142 x 0,241 x 0,398 mm ³
Forma/color del cristal	Fragmento / incoloro
Rango de theta Θ para recolección de datos	3,07 a 26,00°.
Rangos de índices de Miller	-8 ≤ h ≤ 9, -16 ≤ k ≤ 15, -23 ≤ l ≤ 23
Reflexiones recolectadas	10242
Reflexiones independientes	6529 [R(int) = 0.0281]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	5677
Compleitud hasta Θ = 26.00°	99,8 %
Método de refinamiento	Cuadrados mínimos, matriz completa en F ²
Datos / restricciones / parámetros	6529 / 3 / 445
Bondad de ajuste en F ²	1,024
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0546, wR2 = 0,1386
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0644, wR2 = 0,1476
Parámetro de estructura absoluta	-0,003(16)
Mayor diferencia pico y hueco	0,758 y -0,744 e.Å ⁻³

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

Tabla 2. Longitudes [Å] y ángulos [°] de enlace en (SerH₂)₂[ZnCl₄].^a

C(1)-N(1)	1,476(7)
C(11)-C(12)	1,376(8)
C(11)-C(16)	1,390(8)
C(11)-C(17)	1,530(8)
C(12)-C(13)	1,369(8)
C(13)-C(14)	1,383(9)
C(14)-C(15)	1,383(9)
C(14)-Cl(11)	1,740(6)
C(15)-C(16)	1,385(9)
C(15)-Cl(12)	1,721(6)
C(17)-C(116)	1,508(8)
C(17)-C(18)	1,516(7)
C(18)-C(19)	1,387(8)
C(18)-C(113)	1,399(7)
C(19)-C(110)	1,385(8)
C(110)-C(111)	1,383(9)
C(111)-C(112)	1,380(9)
C(112)-C(113)	1,409(8)
C(113)-C(114)	1,510(8)
C(114)-N(1)	1,516(7)
C(114)-C(115)	1,527(9)
C(115)-C(116)	1,510(1)
C(2)-N(2)	1,510(5)
C(21)-C(22)	1,383
C(21)-C(27)	1,418(5)
C(21)-C(26)	1,432
C(22)-C(23)	1,364
C(23)-C(24)	1,365
C(24)-C(25)	1,367
C(24)-Cl(21)	1,762
C(25)-C(26)	1,342
C(25)-Cl(22)	1,750
C(21')-C(22')	1,371
C(21')-C(26')	1,456
C(21')-C(27)	1,597(5)
C(22')-C(23')	1,323
C(23')-C(24')	1,409
C(24')-C(25')	1,317
C(24')-Cl(1')	1,754
C(25')-C(26')	1,428
C(25')-Cl(2')	1,766
C(27)-C(217)	1,512(7)
C(27)-C(28)	1,521(7)
C(28)-C(210)	1,390(7)
C(28)-C(214)	1,398(7)
C(210)-C(211)	1,383(8)
C(211)-C(212)	1,385(8)
C(212)-C(213)	1,384(8)
C(213)-C(214)	1,390(7)
C(214)-C(215)	1,517(7)
C(215)-N(2)	1,511(7)
C(215)-C(216)	1,514(8)
C(216)-C(217)	1,524(8)

Cl(31)-Zn(3)	2,282(2)
Cl(32)-Zn(3)	2,279(1)
Cl(33)-Zn(3)	2,282(2)
Cl(34)-Zn(3)	2,251(2)
C(12)-C(11)-C(16)	118,6(5)
C(12)-C(11)-C(17)	121,4(5)
C(16)-C(11)-C(17)	119,9(5)
C(13)-C(12)-C(11)	121,2(5)
C(12)-C(13)-C(14)	120,1(5)
C(15)-C(14)-C(13)	120,0(6)
C(15)-C(14)-Cl(11)	121,3(5)
C(13)-C(14)-Cl(11)	118,7(5)
C(14)-C(15)-C(16)	119,2(6)
C(14)-C(15)-Cl(12)	121,6(5)
C(16)-C(15)-Cl(12)	119,2(5)
C(15)-C(16)-C(11)	120,9(6)
C(116)-C(17)-C(18)	112,9(5)
C(116)-C(17)-C(11)	111,5(5)
C(18)-C(17)-C(11)	112,9(4)
C(19)-C(18)-C(113)	118,5(5)
C(19)-C(18)-C(17)	121,1(5)
C(113)-C(18)-C(17)	120,4(5)
C(110)-C(19)-C(18)	121,3(5)
C(19)-C(110)-C(111)	120,7(5)
C(112)-C(111)-C(110)	119,0(6)
C(111)-C(112)-C(113)	121,0(6)
C(18)-C(113)-C(112)	119,6(5)
C(18)-C(113)-C(114)	123,3(5)
C(112)-C(113)-C(114)	117,1(5)
C(113)-C(114)-N(1)	109,0(4)
C(113)-C(114)-C(115)	111,6(5)
N(1)-C(114)-C(115)	110,3(5)
C(116)-C(115)-C(114)	112,2(4)
C(17)-C(116)-C(115)	110,1(5)
C(1)-N(1)-C(114)	114,9(5)
C(22)-C(21)-C(27)	118,4(2)
C(22)-C(21)-C(26)	115,37(5)
C(27)-C(21)-C(26)	125,3(2)
C(23)-C(22)-C(21)	122,5
C(22)-C(23)-C(24)	118,9
C(23)-C(24)-C(25)	121,4
C(23)-C(24)-Cl(21)	119,2
C(25)-C(24)-Cl(21)	118,8
C(26)-C(25)-C(24)	118,7
C(26)-C(25)-Cl(22)	117,5
C(24)-C(25)-Cl(22)	123,4
C(25)-C(26)-C(21)	122,23(5)
C(22')-C(21')-C(26')	118,07(6)
C(22')-C(21')-C(27)	125,2(2)
C(26')-C(21')-C(27)	115,5(2)
C(23')-C(22')-C(21')	122,13(6)
C(22')-C(23')-C(24')	120,3
C(25')-C(24')-C(23')	120,7
C(25')-C(24')-Cl(1')	120,5
C(23')-C(24')-Cl(1')	118,8

C(24')-C(25')-C(26')	120,9
C(24')-C(25')-Cl(2')	125,1
C(26')-C(25')-Cl(2')	113,9
C(25')-C(26')-C(21')	116,9
C(21)-C(27)-C(217)	112,5(4)
C(21)-C(27)-C(28)	117,0(4)
C(217)-C(27)-C(28)	112,2(4)
C(21)-C(27)-C(21')	16,78(6)
C(217)-C(27)-C(21')	104,9(4)
C(28)-C(27)-C(21')	109,3(4)
C(210)-C(28)-C(214)	118,3(5)
C(210)-C(28)-C(27)	119,9(4)
C(214)-C(28)-C(27)	121,6(4)
C(211)-C(210)-C(28)	121,9(5)
C(210)-C(211)-C(212)	119,6(5)
C(213)-C(212)-C(211)	119,2(5)
C(212)-C(213)-C(214)	121,4(5)
C(213)-C(214)-C(28)	119,6(5)
C(213)-C(214)-C(215)	118,8(5)
C(28)-C(214)-C(215)	121,5(5)
N(2)-C(215)-C(214)	108,4(4)
N(2)-C(215)-C(216)	111,1(5)
C(214)-C(215)-C(216)	114,0(4)
C(215)-C(216)-C(217)	111,4(5)
C(27)-C(217)-C(216)	110,7(5)
C(215)-N(2)-C(2)	108,3(4)
Cl(34)-Zn(3)-Cl(32)	108,70(6)
Cl(34)-Zn(3)-Cl(33)	113,31(7)
Cl(32)-Zn(3)-Cl(33)	105,69(7)
Cl(34)-Zn(3)-Cl(31)	114,76(7)
Cl(32)-Zn(3)-Cl(31)	107,88(8)
Cl(33)-Zn(3)-Cl(31)	106,01(7)

^a Átomos primados corresponden a la conformación con menor ocupación [47,8(4)%] de las dos que modelan el grupo -PhCl₂ desordenado

Debido a una extensa deslocalización del orbital molecular π , los grupos fenilos (Ph) y diclorofenilos de SerH₂⁺ son planos (raíz de la desviación cuadrática media de los átomos no-H del mejor plano por cuadrados mínimos igual a 0,0047 Å y 0,0076 Å, respectivamente, para #1 e igual a 0,0041 Å para el anillo bencénico de #2). Los planos subtienden ángulos diedros de 71,1(2)° en #1 y 85,8(1)° en #2.

Las distancias y ángulos de enlaces inter-atómicos de ambas moléculas de SerH₂⁺ en (SerH₂)₂[ZnCl₄] sólido acuerdan entre sí y con los valores correspondientes reportados para polimorfos de clorhidrato de sertralina^{7,8}, para otras sales de SerH₂Cl.^{9,10}

La conformación de las dos moléculas de SerH₂⁺ difiere significativamente entre sí y de la exhibida por otros compuestos relacionados. Esto puede explicarse en términos de la relativa libertad rotacional intra-molecular de Sertralina alrededor del enlace- σ C-C

vinculando entre si los anillos diclorofenilos y naftaleno (naf) y también alrededor del enlace- σ C(naf)-N. Como es de esperar, las mayores diferencias en distancias de enlace en la molécula SerH_2^+ cuando se las compara con la sertralina neutra¹¹ se manifiestan como alargamiento de los enlaces C(naf)-N (de 0,046 Å para #1 and 0,042 Å para #2) y N-CH₃ (de 0,022 Å para #1 y 0,056 Å para #2).

La sal cristalina es adicionalmente estabilizada por puentes de hidrógeno intermoleculares involucrando el grupo NH_2^+ de SerH_2^+ como grupo donador y como aceptor los átomos de cloro del anión complejo $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ vecino (Figura 2, distancias N...Cl en el rango 3,179-3,488 Å y ángulos de enlace N-H...Cl en el intervalo 130.2-160.5°). La estructura de puentes de hidrógeno se describe en mayor detalle en la Tabla S6 suplementaria.

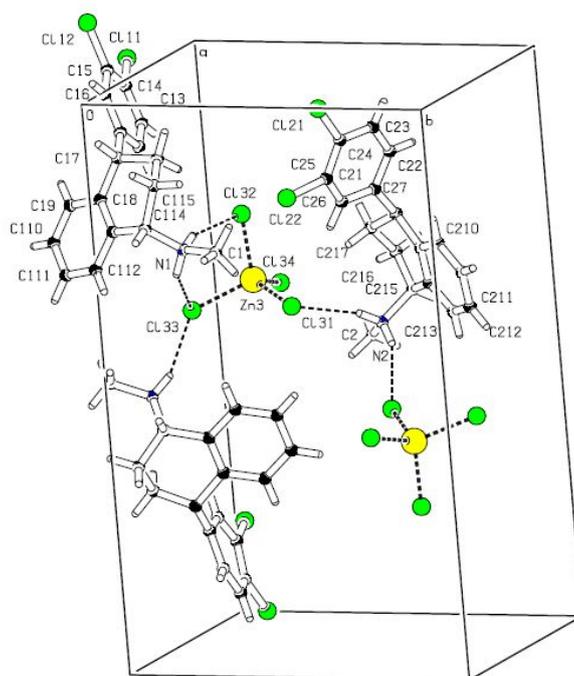


Figura 2. Vista de la formación de puentes H entre el grupo NH_2^+ de SerH_2^+

2.3.1.2. Polvo microcristalino

En la Figura 3 se compara el patrón de difracción de rayos-X en polvo de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ con el calculado (LAZY-PULVERIX¹²) sobre la base de la estructura molecular determinada por difracción de rayos-X en mono-cristal. La figura muestra que el material en su forma usual de agregado poli-cristalino posee la misma estructura cristalina que su contrapartida mono-cristalina y que está libre de una contribución significativa de impurezas, de esta manera proveyendo una referencia útil para una rápida confirmación de la identidad y pureza de cualquier muestra farmacéutica de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ en forma de polvos. Pueden observarse picos de difracción diagnósticos en posiciones angulares 2θ (en grados) únicas, incluyendo los valores 8,08; 11,36; 12,03; 13,29; 17,32; 17,96; 19,23; 20,52; 24,68 y 33,33.

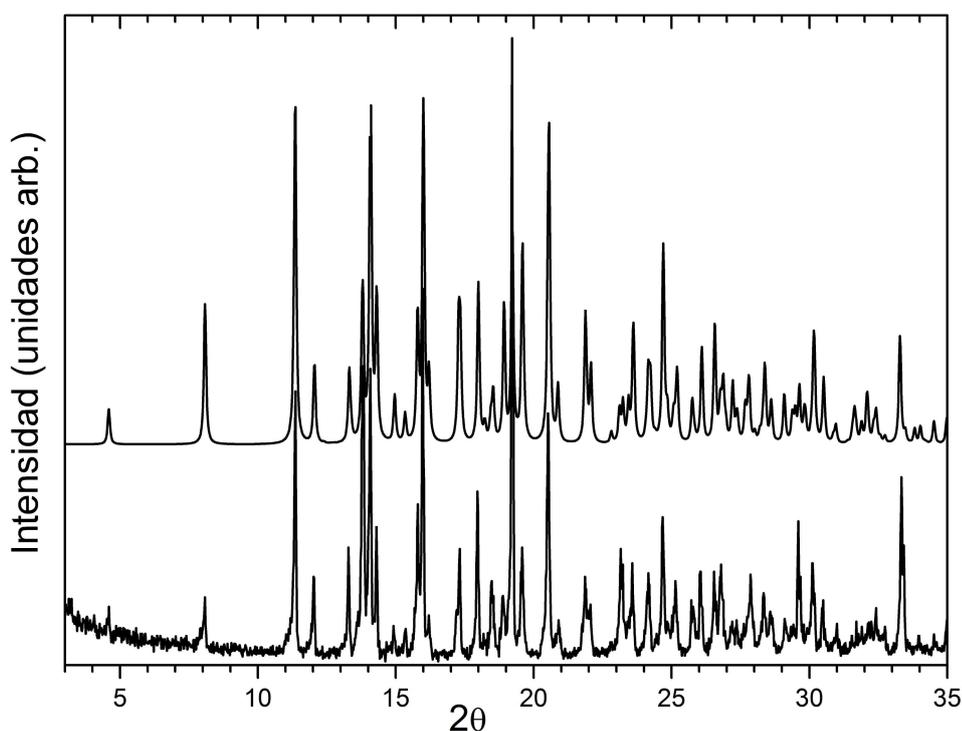


Figura 3. *Traza inferior:* patrón de difracción de rayos-X experimental de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ poli-cristalino colectado con radiación $\text{CuK}\alpha$. *Traza superior:* patrón calculado a partir de la estructura molecular de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ sólido determinada por métodos de difracción de rayos-X en mono-cristales.

A continuación se presenta la información complementaria de los datos cristalográficos.

Tabla S3. Coordenadas atómicas fraccionarias ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamientos isotrópicos equivalentes ($\text{Å} \times 10^3$) de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$. $U(\text{eq})$ se define como igual a un tercio de la traza del tensor U_{ij} ortogonalizado.

Atom	x	y	z	U(eq)
C(1)	19023(10)	18241(5)	7321(4)	68(2)
C(11)	16481(7)	14844(4)	9113(3)	42(1)
C(12)	14866(7)	14792(5)	8683(3)	49(1)
C(13)	13332(8)	14393(5)	8910(3)	54(2)
C(14)	13389(8)	14028(5)	9582(4)	56(2)
C(15)	14983(10)	14093(5)	10031(3)	56(2)
C(16)	16524(8)	14499(4)	9792(3)	49(1)
C(17)	18196(7)	15300(4)	8864(3)	41(1)
C(18)	18651(6)	14848(4)	8186(3)	36(1)
C(19)	18341(7)	13837(4)	8037(3)	43(1)
C(110)	18801(8)	13414(4)	7427(3)	53(1)
C(111)	19624(9)	13987(5)	6955(3)	59(2)
C(112)	19967(8)	14990(5)	7097(3)	51(1)
C(113)	19482(6)	15434(4)	7711(3)	39(1)
C(114)	19917(7)	16537(4)	7822(3)	45(1)
C(115)	19779(9)	16856(5)	8572(3)	61(2)
C(116)	18105(9)	16434(4)	8846(3)	50(1)
N(1)	18622(6)	17153(3)	7325(3)	43(1)
Cl(11)	11443(2)	13470(2)	9838(1)	88(1)
Cl(12)	15105(3)	13670(2)	10875(1)	84(1)
C(2)	882(6)	9836(2)	4987(1)	86(3)
C(21)	3970(3)	11324(2)	7905(1)	38(3)
C(22)	3634(3)	11747(2)	8530(1)	65(5)
C(23)	4905(3)	11758(2)	9101(1)	63(4)
C(24)	6570(3)	11334(2)	9054(1)	66(6)
C(25)	7067(3)	11016(1)	8431(1)	48(3)
C(26)	5784(3)	10956(1)	7882(1)	53(4)
Cl(21)	8219(3)	11343(2)	9787(1)	81(1)
Cl(22)	9237(3)	10552(2)	8329(1)	81(1)
C(21')	4481(3)	11192(2)	7808(1)	57(4)
C(22')	6102(3)	10929(1)	7576(1)	62(4)
C(23')	7600(3)	10775(1)	8008(1)	61(3)
C(24')	7639(3)	11005(1)	8720(1)	62(4)
C(25')	6192(3)	11377(2)	8967(1)	59(4)
C(26')	4498(3)	11472(2)	8535(1)	51(3)
Cl(1')	9671(3)	10821(1)	9269(1)	103(2)
Cl(2')	6094(3)	11746(2)	9839(1)	86(1)
C(27)	2639(7)	11437(4)	7321(3)	41(1)
C(28)	3025(7)	12211(4)	6778(3)	37(1)
C(210)	4013(8)	13074(4)	6978(3)	47(1)
C(211)	4319(8)	13821(4)	6507(3)	50(1)
C(212)	3603(8)	13722(4)	5817(3)	50(1)
C(213)	2595(8)	12873(4)	5611(3)	47(1)
C(214)	2303(7)	12115(4)	6081(3)	36(1)
C(215)	1132(7)	11221(4)	5828(3)	42(1)
C(216)	503(8)	10591(5)	6407(3)	55(2)
C(217)	2030(8)	10440(4)	6998(3)	46(1)
N(2)	2178(7)	10590(3)	5359(2)	49(1)
Cl(31)	5261(2)	9038(1)	5968(1)	61(1)

Cl(32)	4398(2)	7487(2)	7476(1)	67(1)
Cl(33)	5922(2)	6320(1)	5945(1)	61(1)
Cl(34)	1106(2)	7315(1)	5901(1)	71(1)
Zn(3)	4066(1)	7549(1)	6291(1)	45(1)

Tabla S4. Parámetros de desplazamientos atómicos anisotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$. El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico adopta la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$.

Atom	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
C(1)	72(4)	36(3)	94(5)	14(3)	4(4)	-8(3)
C(11)	48(3)	43(3)	34(3)	0(2)	3(2)	4(2)
C(12)	45(3)	55(3)	46(3)	11(3)	7(2)	8(3)
C(13)	35(3)	69(4)	55(4)	17(3)	0(2)	3(3)
C(14)	44(3)	54(3)	74(4)	19(3)	21(3)	9(3)
C(15)	75(4)	50(3)	45(3)	7(3)	14(3)	11(3)
C(16)	58(3)	53(3)	35(3)	6(2)	0(2)	11(3)
C(17)	36(3)	51(3)	33(3)	1(2)	-5(2)	0(2)
C(18)	22(2)	42(2)	43(3)	4(2)	0(2)	3(2)
C(19)	44(3)	38(3)	48(3)	9(2)	9(2)	4(2)
C(110)	58(3)	35(3)	64(4)	-3(3)	5(3)	10(3)
C(111)	64(4)	62(4)	52(3)	-4(3)	13(3)	21(3)
C(112)	49(3)	56(3)	50(3)	15(3)	15(3)	13(3)
C(113)	28(2)	46(3)	43(3)	8(2)	-1(2)	3(2)
C(114)	35(3)	49(3)	52(3)	7(3)	3(2)	-8(2)
C(115)	73(4)	51(3)	53(4)	2(3)	-18(3)	-21(3)
C(116)	71(4)	45(3)	33(3)	-6(2)	0(2)	1(3)
N(1)	42(2)	38(2)	49(3)	7(2)	4(2)	0(2)
Cl(11)	59(1)	92(1)	119(2)	55(1)	32(1)	10(1)
Cl(12)	111(2)	93(1)	51(1)	25(1)	24(1)	0(1)
C(2)	139(7)	45(3)	64(4)	-12(3)	-32(5)	-15(4)
C(21)	57(7)	18(5)	38(7)	6(5)	5(6)	8(5)
C(22)	101(12)	32(6)	53(8)	12(6)	-30(8)	26(7)
C(23)	64(8)	76(9)	51(8)	-22(7)	8(7)	-4(7)
C(24)	131(15)	34(9)	24(8)	7(7)	-23(10)	-38(10)
C(25)	70(9)	49(7)	27(8)	0(6)	12(7)	-10(6)
C(26)	70(9)	58(8)	28(7)	23(6)	-4(7)	-29(7)
Cl(21)	91(3)	90(3)	53(2)	4(2)	-24(2)	-5(2)
Cl(22)	55(2)	103(3)	85(3)	3(2)	8(2)	12(2)
C(21')	53(7)	68(9)	45(8)	15(7)	-16(7)	-13(7)
C(22')	64(8)	70(8)	47(8)	36(7)	-14(6)	4(7)
C(23')	52(7)	47(6)	80(10)	3(7)	-15(6)	8(6)
C(24')	111(13)	42(6)	31(8)	9(6)	-3(8)	-4(7)
C(25')	67(8)	45(10)	65(11)	4(9)	14(8)	1(7)
C(26')	90(9)	28(5)	28(6)	14(4)	-27(6)	12(6)
Cl(1')	77(2)	115(3)	102(3)	20(3)	-47(2)	6(2)
Cl(2')	126(3)	84(2)	41(2)	-2(2)	-18(2)	8(2)
C(27)	51(3)	37(2)	34(3)	0(2)	-1(2)	-2(2)
C(28)	39(2)	37(2)	33(2)	2(2)	1(2)	2(2)
C(210)	54(3)	45(3)	40(3)	-4(3)	-2(2)	-3(3)
C(211)	54(3)	40(3)	54(3)	0(3)	-3(3)	-10(3)

C(212)	64(3)	36(2)	50(3)	8(3)	10(3)	-3(3)
C(213)	57(3)	47(3)	38(3)	5(2)	4(2)	2(2)
C(214)	37(2)	35(2)	36(3)	-1(2)	0(2)	-1(2)
C(215)	45(3)	39(3)	41(3)	-6(2)	-1(2)	-6(2)
C(216)	53(3)	64(4)	49(3)	2(3)	5(3)	-23(3)
C(217)	61(3)	41(3)	36(3)	4(2)	9(2)	-7(3)
N(2)	69(3)	38(2)	38(2)	-2(2)	-1(2)	-5(2)
Cl(31)	72(1)	46(1)	68(1)	5(1)	16(1)	4(1)
Cl(32)	44(1)	119(1)	38(1)	2(1)	6(1)	-6(1)
Cl(33)	76(1)	46(1)	64(1)	-6(1)	21(1)	6(1)
Cl(34)	52(1)	94(1)	62(1)	11(1)	-14(1)	-11(1)
Zn(3)	44(1)	51(1)	40(1)	3(1)	5(1)	2(1)

Tabla S5. Coordenadas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamientos isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) de los átomos de hidrógeno en $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$.

Atom	x	y	z	U(eq)
H(1A)	18604	18552	7721	101
H(1B)	18411	18539	6906	101
H(1C)	20313	18340	7332	101
H(12)	14815	15031	8230	58
H(13)	12251	14367	8613	64
H(16)	17602	14540	10091	59
H(17)	19208	15126	9216	49
H(19)	17813	13436	8353	52
H(110)	18555	12738	7334	63
H(111)	19940	13700	6547	70
H(112)	20527	15380	6784	61
H(114)	21165	16658	7717	55
H(11A)	20855	16628	8865	73
H(11B)	19746	17585	8596	73
H(11C)	18024	16690	9311	60
H(11D)	17025	16646	8550	60
H(1D)	18650	16911	6892	51
H(1E)	17483	17068	7437	51
H(2A)	335	9441	5323	129
H(2B)	1540	9403	4707	129
H(2C)	-51	10185	4695	129
H(22)	2500	12035	8563	78
H(23)	4641	12050	9514	76
H(26)	6084	10666	7473	63
H(22')	6151	10857	7101	74
H(23')	8632	10514	7840	73
H(26')	3454	11703	8711	62
H(210)	4482	13151	7441	56
H(211)	5002	14386	6653	60
H(212)	3796	14219	5496	60
H(213)	2102	12809	5149	57
H(215)	45	11480	5546	50
H(21A)	90	9941	6223	67
H(21B)	-518	10921	6585	67
H(21C)	1605	10007	7349	55
H(21D)	3054	10111	6820	55

H(2D)	3098	10268	5613	58
H(2E)	2652	10986	5048	58

Tabla S6. Distancias (Å) and ángulos (°) de enlaces de hidrógeno en (SerH₂)₂[ZnCl₄].

D-H	d(D-H)	d(H..A)	∠(D-H..A)	d(D..A)	A	Operación de simetría
N1-H1D	0.900	2.681	130.17	3.333	Cl33	[x+1, y+1, z]
N1-H1D	0.900	2.838	130.28	3.488	Cl34	[x+2, y+1, z]
N1-H1E	0.900	2.355	155.91	3.198	Cl32	[x+1, y+1, z]
N2-H2D	0.900	2.333	160.47	3.196	Cl31	
N2-H2E	0.900	2.339	155.18	3.179	Cl33	[-x+1, y+1/2, -z+1]

2.3.2. Estudios termogravimétricos (TGA) y de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico, ha sido estudiado mediante termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la descomposición térmica de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ (Figura 4) se observan dos etapas: (i) la primera se presenta en el rango de temperatura de 18-385 °C (punto de inicio (onset point): 244,8 °C, punto final (endset point)=270,6 °C) donde se observa la mayor pérdida de masa correspondiente a un 84,34 % de la masa inicial, (ii) la segunda etapa se produce en el rango de temperatura de 385-600 °C (punto de inicio (onset point): 423 °C, punto final (endset point)=475 °C) correspondiéndole una pérdida de masa de 13,84% y un residuo final de 0,119 mg.

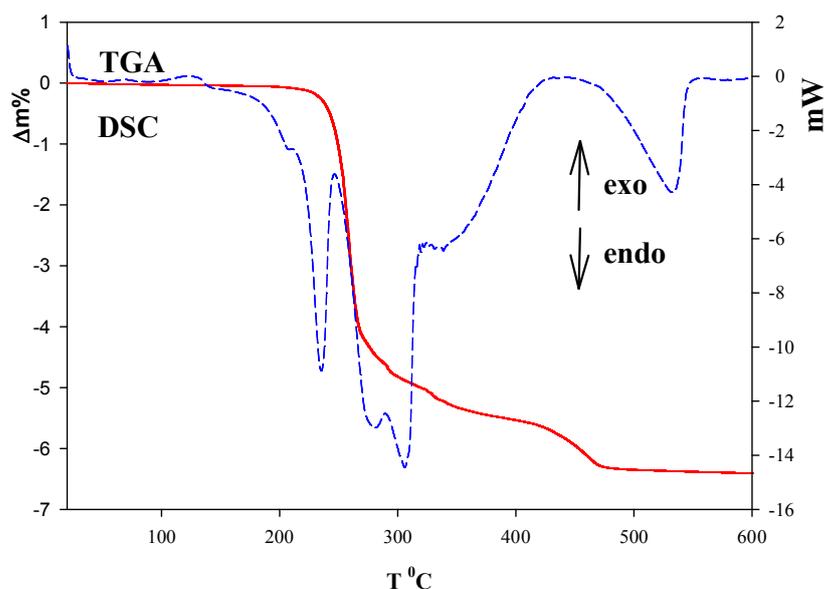


Figura 4. Comportamiento térmico: TGA (línea roja): Curva termogravimétrica: Masa de la muestra 6,5 mg, velocidad de calentamiento= 10 °C/min, Flujo de N_2 = 50 mL/min. DSC (línea azul): Curva de barrido calorimétrico diferencial, Masa de la muestra 13,72 mg, velocidad de calentamiento= 10 °C/min.

La calorimetría diferencial de barrido (Figura 4) revela la presencia de un único pico endotérmico asociado al punto de fusión $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ (235 °C, $\Delta H_f = -44,80$ J/g). (punto de inicio (onset point): 244,8 °C, punto final (end set point)=270,6 °C). Posteriormente se presentan dos picos endotérmicos localizados en 280 °C y 306 °C

respectivamente y que se corresponden a la mayor pérdida de masa observada en el TGA. La etapa final presenta un pico endotérmico localizado en 533 °C de N₂ = 50mL/min

2.3.3. Caracterización por espectroscopía FTIR y Raman

El compuesto (SerH₂)₂[ZnCl₄] fue caracterizado por Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía Raman.

Los espectros de FTIR de hidrocloruro de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻) y (SerH₂)₂[ZnCl₄] se muestran en la Figura 5 y sus asignaciones tentativas se dan en la Tabla 3.

Nuestro complejo en estudio presenta grupos NH₂⁺ y en consecuencia se espera la aparición de dos bandas correspondientes a las frecuencias de estiramiento simétrico y asimétrico (N-H), en donde la $\nu_{as}NH_2^+$ se presentaría a valores de números de onda mayores que la relacionada al estiramiento simétrico. Por lo general, los intervalos en los que las frecuencias de estos modos vibracionales aparecen son 3420 a 3500 cm⁻¹ ($\nu_{as}NH_2^+$) y 3340-3420 cm⁻¹ ($\nu_sNH_2^+$), respectivamente.¹³

Como pudimos observar anteriormente, existe formación de puentes H intermoleculares que involucran los átomos de H de grupo NH₂⁺ (SerH₂⁺) como átomos donantes y los átomos de cloro del anión [ZnCl₄]²⁻ como aceptores (Figura 2, sección difracción de rayos X). La presencia entonces del enlace de hidrógeno afecta notablemente las frecuencias de estiramiento NH (N⁺H---Cl) mediante la eliminación de la densidad de electrones del enlace NH causando un corrimiento de la banda hacia menores frecuencias. Comparando el espectro de la sal preparada con el del hidrocloruro de sertralina hemos podido realizar la asignación de estas bandas. De hecho, es posible observar la presencia de cuatro bandas débiles en esta región (Figura 5).

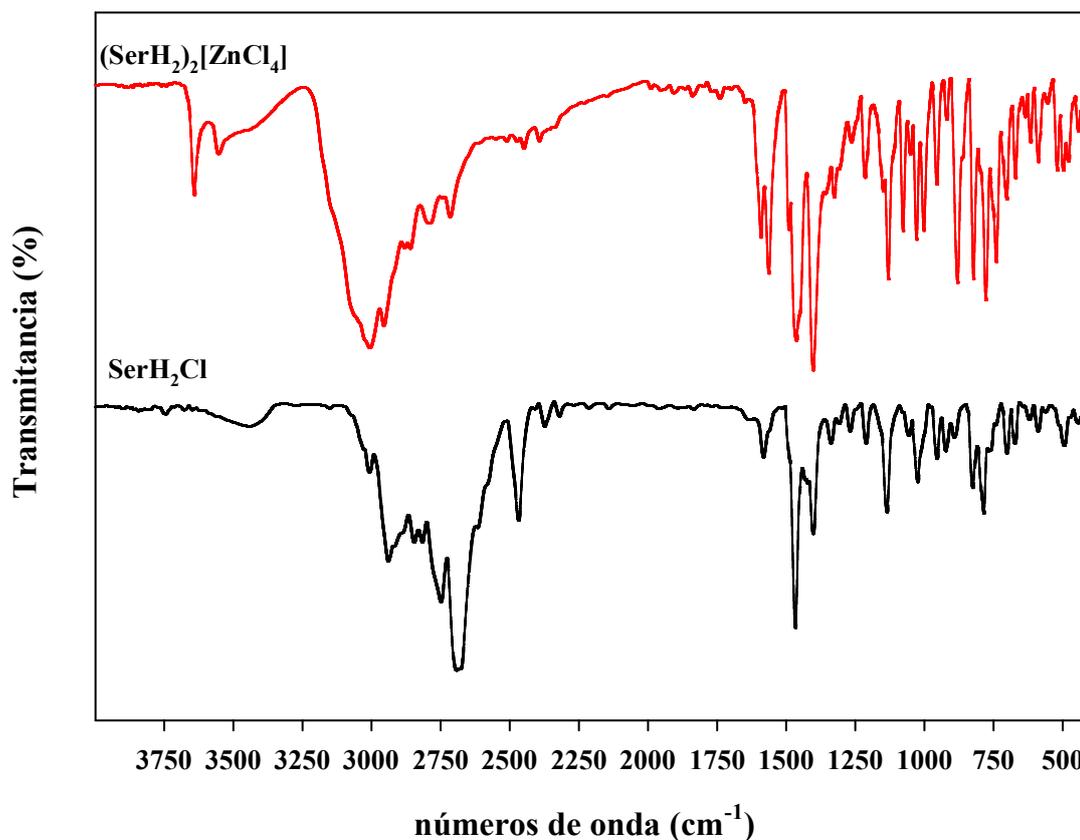


Figura 5. Espectros FTIR de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ y de $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$.

Este desdoblamiento observado podría estar relacionado con las diferentes conformaciones espaciales de las dos moléculas SerH_2^+ dando cuatro modos activos en el infrarrojo.^{8,14}

El modo de deformación correspondiente a la vibración de los enlaces denominada tijeras relacionada al grupo NH_2^+ suele aparecer en la región de $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$, muy posiblemente junto con el modo de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{C})$ correspondiente al anillo aromático. En el espectro de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ la banda se observa en 1604 cm^{-1} .

Adicionalmente se pueden observar a valores de frecuencias más bajos el modo de torsión NH (1327 cm^{-1}) y aleteo (1450 cm^{-1}) modos de vibraciones del grupo NH_2^+ junto con otros modos de vibración.

El modo de estiramiento $\nu(\text{C}-\text{N})$ resulta siempre problemático de identificar debido a la posible superposición del mismo con otros modos vibracionales. Analizando el

espectro en comparación con las moléculas estudiadas anteriormente, es posible sugerir que la banda situada en 1028 cm^{-1} corresponde a este modo de vibración.⁷

Para el grupo metilo se esperan varios modos de vibración. Este grupo da lugar a dos diferentes modos CH, los estiramientos simétrico y asimétrico que normalmente caen en el rango $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ esperándose nuevamente que el modo de estiramiento asimétrico aparezca a mayor frecuencia que el simétrico. Es entonces posible que los hombros que aparecen al 3180 , 3147 cm^{-1} y la banda situada en 3068 cm^{-1} estén relacionados con estos modos del grupo CH.

El modo de deformación simétrica de metilo para clorhidratos de aminas aparece generalmente en $1470 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ ¹³. Esto se correlaciona muy bien con la banda que aparece en 1464 cm^{-1} siendo el modo de deformación asimétrica de metilo el localizado en 1491 cm^{-1} como era de esperar.

Los modos de deformación en el plano del grupo C-H aparecen en general próximos a ca. $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ y los correspondientes fuera del plano en ca. $750\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ en general en los compuestos aromáticos. Podemos entonces sugerir que dichas bandas se encuentran localizadas en 1306 y 1051 cm^{-1} (en el plano) y 880 y 955 cm^{-1} , (fuera de plano) respectivamente.

Tabla 3. Frecuencias vibracionales características (cm^{-1}) y asignaciones tentativas para los espectros de infrarrojo y Raman del hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$) y $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$.

FTIR		Raman		Asignaciones tentativas
$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$	$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$	$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$	$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$	
3240 d		3232 f	3233 f	ν_{CH} (Ph-Cl)
				ν_{asCH} (PhCl)
				$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
3178 d	3180 h			ν_{CH} (Ph)
3154 d	3147 h	3144 d	3144 d	$\nu_{\text{asCH}}(\text{CH}_2), \nu_{\text{CH}}(\text{cycle})$
				$\nu_{\text{as}} \text{CH}(\text{CH}_2),$
3076 d	3068 h	3081 mf	3082 m	$\nu_{\text{CH}}(\text{cycle})$
		3068 m	3063 m	
		3055 m	3051 m	
2470 m	2475 d 2451 d			$\nu_{\text{a}} (\text{N}^+\text{H}---\text{C})\text{l}$
2375 m	2376 d 2357 d			$\nu_{\text{s}} (\text{N}^+\text{H}---\text{C})\text{l}$
1640 m	1651 d			NH_2 tijeras
1583 m	1604 d	1590 f	1591 f	$\nu \text{C}=\text{C}$ (Ph)
1515 d	1507 d			$\nu \text{C}=\text{C}$ (PhCl), CH_2 tijeras CH_3 deformación asimétrica
1488 h	1491 f	1491 d	1493 d	CH_3 deformación asimétrica
1467 mf	1464 mf	1468 d	1461 d	CH_2 aleteo,
		1453 d	1458 d	CH_3 deformación simétrica
1433 m	1450 mf	1432 d	1432 d	NH_2 aleteo, deformación $\text{CH}(\text{ciclo})$ CH_3 deformación simétrica, CH_2 aleteo
1423 m	1426 d	1418 d		CH_3 deformación simétrica, δ CCH ip (PhCl)
1403 f	1404 f	1402 d	1402 d, a	CH_3 deformación simétrica, $\delta \text{CH cycle}$
1339 m	1327 m	1370 d	1364 d	CH_3 balanceo, NH_2 tdfifting, δCH cycle
		1348 d	1343 d	CH_2 torsión
1310 m	1315 m	1315 d	1314 d	$\delta \text{CCH ip}$ (PhCl, Ph), CH_2 torsión,
1270 m	1306 m	1310 h	1306 d	$\delta \text{CCH ciclo}$
1250 m	1264 m	1293 d	1295 d	
1248 d	1247 d			
1214 m	1215	1217 m	1219 d	$\delta \text{CCH ip}$ (PhCl, Ph), $\delta \text{CCH ciclo}$
		1189 m	1189 d	CH_2 torsión, νCNC
1136 f	1130 f	1163 m	1164 d	$\delta \text{CCH ip}$ (PhCl, Ph), $\delta \text{CCH ciclo}$, CH_2 torsión, NH_2 torsión
1081 d		1082 d	1079 d	$\delta \text{CCH ip}$ (PhCl, Ph), $\delta \text{CCH ciclo}$
1057 m	1051 m	1056 d	1052 h	$\delta \text{CCH ip}$ (PhCl, Ph), $\delta \text{CCH ciclo}$
		1041 m	1044 m	
1025 m	1028 m	1029 m	1032 d	$\nu(\text{C}-\text{N})$
1002 h	1002 f	1009 d	1002 d	$\delta \text{CCH op}$ (PhCl, Ph)

Capítulo II: Complejo de Zn(II) con sertralina

		1007 h		
893 m	880 f 877 f	964 d 930 m 903 m	955 vmd 925 h 919 d 897 d 890 d 883 d 877 d	δ CCH op (PhCl, Ph), respiración (Ph,PhCl) CH ₃ balanceo, CH ₂ balanceo , NH ₂ balanceo
845 vd	862 m	867 d	861 m	δ CCH op (PhCl, Ph), δ CH ciclo CH ₃ balanceo
826 m	822 f	826 m 812 d	817 m 808 d	respiración (Ph), δ CH ciclo, CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo
796 h	795 f		797 m	respiración (Ph), δ CH ciclo, CH ₃ balanceo, CH ₂ balanceo
785 m 769 m 743 d	778 f 756 m 740 f	780 m	783 d 777 d 757 h	δ CCH op (PhCl, Ph), CH ₃ balanceo, CH ₂ balanceo
702 m	702 m	758 d 714 md 700 md	716 md 702 md	respiración (Ph,PhCl), CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo
673 m	670 m	672 m	673 d	respiración (Ph), CH ₂ balanceo
643 d	635 m	643 d	638 d	respiración (Ph), CH ₃ balanceo CH ₂ balanceo
620 m	616 m	620 d	617 d	respiración (Ph), CH ₂ balanceo
589 m 563 d 534 d	588 d	593 d 566 d	592 md 560 d 552 d	Torsión y respiración (Ph, PhCl, ciclo)
514 m	520 m	524 d	525 d 519 d	Torsión y respiración (Ph, PhCl, ciclo)
495 m	499 m	500 m 478 d	500 m 481 d	Torsión y respiración (Ph, PhCl, ciclo) v C-Cl
445 d	444 m	456 m 439 m	458 d 444 d	Torsión y respiración (Ph, PhCl, ciclo)
426 d	427 m	426 d	426 d	Torsión y respiración (Ph, PhCl, ciclo)
			290 d	v ₃ Zn-Cl
			261 d	v ₁ Zn-Cl
			123 h,d	v ₄ Zn-Cl
			108 m	v ₂ Zn-Cl

Abreviaturas: s, fuerte; m, medio; d, débil; h, hombro; md, muy débil, a= ancha, ip= en

el plano, op= fuera del plano, Ph=fenilo

Los anillos aromáticos presentan vibraciones típicas. En bencenos sustituidos, las bandas observadas en la región $1400\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ son características de los modos de estiramiento de los enlaces C=C. En este trabajo, las vibraciones del anillo asignadas para el complejo se encuentran en 1605 y 1507 cm^{-1} .

También se pudo asignar el modo de estiramiento $\nu(\text{C-Cl})$ en 499 cm^{-1} en comparación con el asignado para el hidrocloreuro de sertralina.

Todos los modos de vibración Raman esperados se muestran también en la Tabla 3 y la región del espectro Raman comprendida entre 1700 a 100 cm^{-1} se muestra en la Figura 6. En particular, el espectro Raman permitió la asignación de los modos de vibración Zn-Cl, ya que es posible observar todos los modos vibracionales activos fundamentales del anión tetraédrico tetraclorozincato(II) ($[\text{ZnCl}_4]^{2-}$).^{15,16}

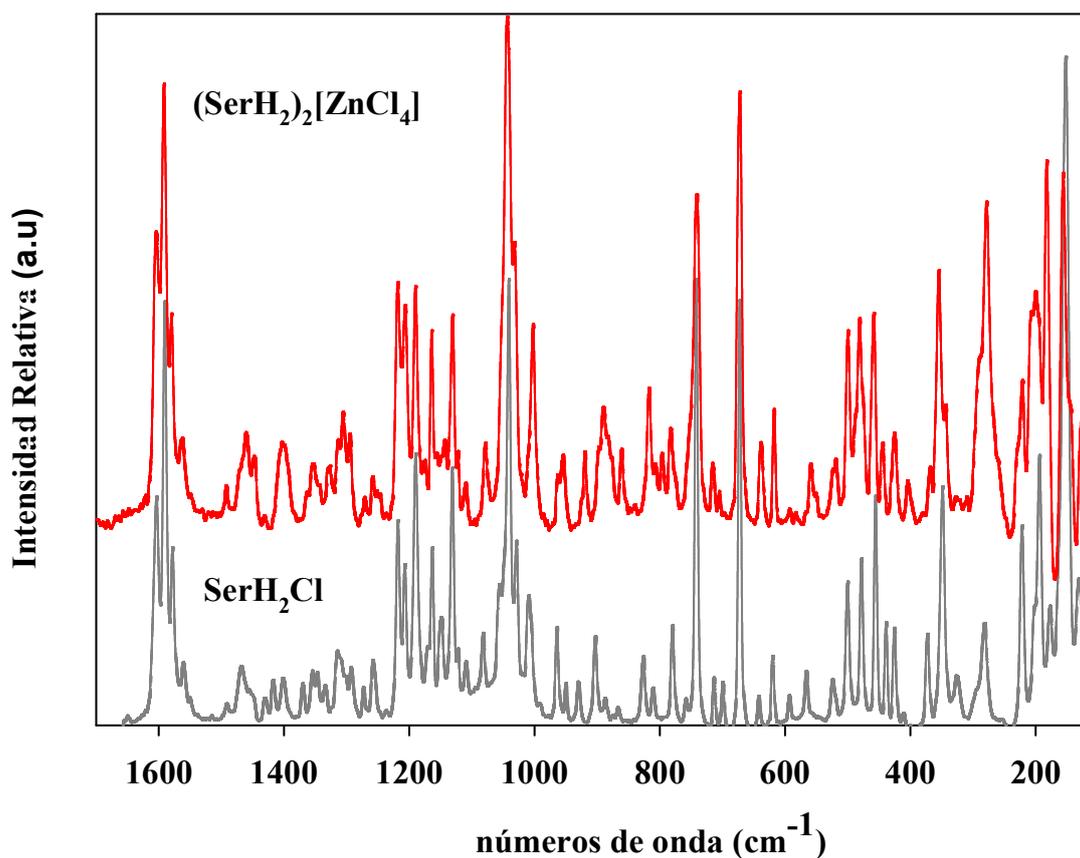


Figura 6. Espectros Raman de $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ (rojo) y de SerH_2Cl . Muestra sólida en tubo capilar.

2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.4.1. Actividad antidepresiva.

El compuesto ha sido sujeto a los ensayos *in vivo* que se detallan a continuación considerándose al momento un prototipo funcional de un fármaco antidepresivo.

Asimismo, se obtuvieron las evidencias experimentales preclínicas basados en el test de natación forzada (Forced Swimming Test) después de la administración crónica (14 días) de dos dosis del compuesto en ratas macho Wistars por vía de administración oral. En este modelo de depresión animal, la disminución del tiempo de inmovilidad es indicador de un efecto antidepresivo del compuesto estudiado.

2.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test)

Se utilizó para comparar el efecto del complejo, una dosis con efecto terapéutico demostrado para esos animales de hidrocloreto de sertralina (10 mg/Kg). La dosis del complejo (grupo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$) fue calculada en base a la dosis antidepresiva de sertralina, a los fines de poder comparar los resultados. Esta dosis de complejo fue de 13,0 mg/Kg. Además, y también a los fines comparativos y como ya que se han descrito efectos antidepresivos del Zn(II), se administró a un grupo Zn(II) (como cloruro de Zn(II)) en una dosis equivalente (5,55 mg/kg) a la que forma el complejo de coordinación. Este estudio se completó utilizando una segunda dosis del complejo, de 26,0 mg/kg.

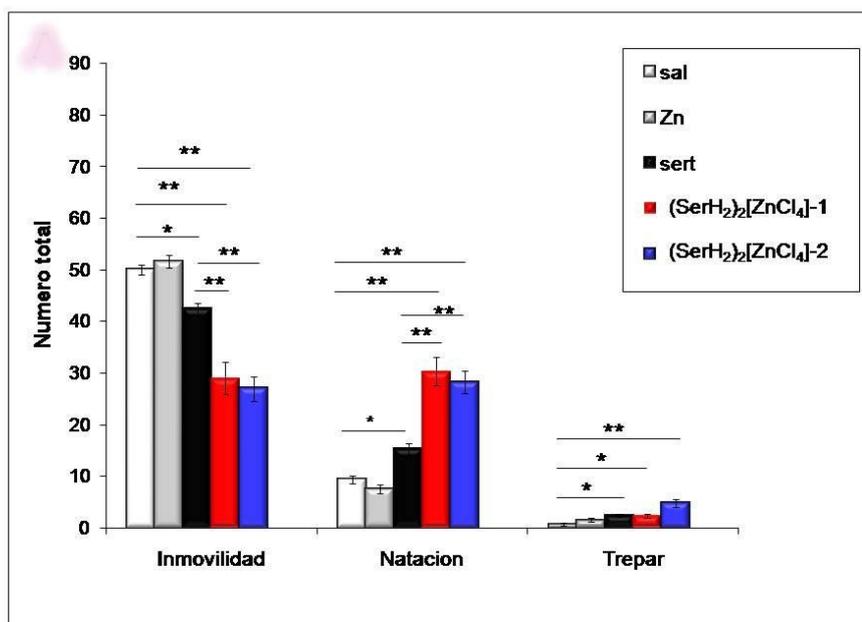


Figura 7. Efectos del complejo de la invención en la Prueba de natación forzada (Forced Swimming Test). Los resultados se expresan en media \pm SEM (n= 5-10 ratas/grupo). sal: tratamiento con solución salina, Zn: tratamiento con cloruro de zinc(II) (5,55 mg/kg), sert: tratamiento con clorhidrato de sertralina, ((SerH₂)₂[ZnCl₄]-1): tratamiento con el complejo sertralina-Zn (13,0 mg/kg) y ((SerH₂)₂[ZnCl₄]-2): tratamiento con el complejo sertralina-Zn (26,0 mg/kg). *Diferencia significativa a nivel de P< 0,05, **Diferencia significativa a nivel de P< 0,01.

Los resultados mostrados en la Figura 7 indican que el hidrocloreto de sertralina (en concordancia con la bibliografía), disminuyó el tiempo de inmovilidad indicando un efecto antidepresivo. Mientras que el Zn(II) a la dosis equivalente que su presencia en el complejo, no modificó significativamente el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo control (grupo sal). Interesantemente, el complejo (grupo (SerH₂)₂[ZnCl₄]) disminuyó significativamente la inmovilidad, a las dos dosis, indicando un efecto antidepresivo superior al del fármaco sertralina a la misma dosis (Tabla 4).

Tabla 4: Efectos del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ en el Forced Swimming Test (Prueba de natación forzada) expresado en % del tiempo de inmovilidad como una medida del efecto antidepressivo. Los resultados se expresan en media \pm SEM (n= 5-10 ratas/grupo).

<i>Tratamientos</i>	<i>Tiempo de inmovilidad (seg) (media \pm SEM)</i>	<i>% de disminución respecto del grupo control</i>
Sal (control)	50 \pm 0,89	0,00
ZnCl ₂ (5,55 mg/Kg)	51,63 \pm 1,25	3,2
SerH ₂ Cl (10,0 mg/Kg)	42,40 \pm 1,21	15,2
$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ -1 (13,0 mg/kg)	29,00 \pm 3,15	42,0
$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ -2 (26,0 mg/kg)	27,00 \pm 2,39	46,0

Es de destacar que en la literatura no se encontraron informes acerca de la actividad antidepressiva de complejos metálicos de coordinación con fármacos de actividad probada. Sólo se informan ensayos de tratamiento de combinados con administración simultánea de sales simples de Zn(II) con algunos antidepressivos de uso en el mercado.^{17,18}

2.4.1.2. Prueba de campo abierto (PCA)

Para descartar que los efectos antidepressivos observados en la prueba de natación forzada fueran inespecíficos, se utilizó la prueba de campo abierto.

En la Figura 8, se observan los efectos sobre la actividad locomotora de los distintos tratamientos. Los resultados indicaron que la actividad locomotora no se modificó ni con el tratamiento con cloruro de Zn(II) (5,55 mg/kg), ni con hidrocloreto de sertralina, ni con el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ a las dos dosis utilizadas (13,0 mg/kg y 26,0 mg/kg), de acuerdo con el aumento del número de cuadrados totales que el animal cruzó en los 5 minutos de la prueba.

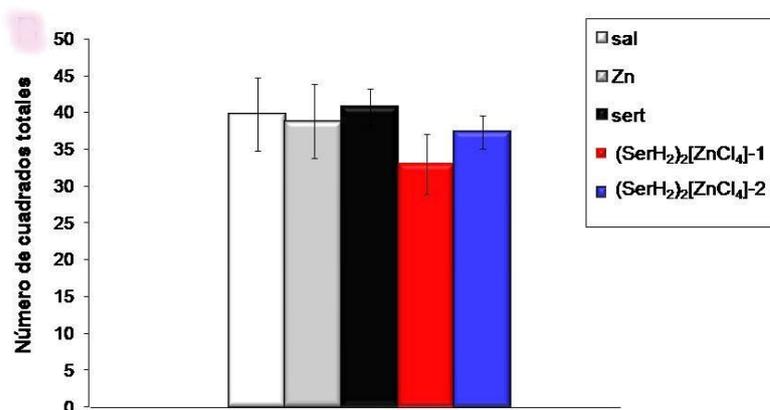


Figura 8: Efectos del complejo sertralina-Zn sobre la actividad locomotora. Los resultados se expresan en media \pm SEM ($n= 5-10$ ratas/grupo). sal: tratamiento con solución salina, Zn: tratamiento con cloruro de Zn(II) (5,55 mg/kg), sert: tratamiento con clorhidrato de sertralina (10,0 mg/kg), (SerH₂)₂[ZnCl₄]-1: tratamiento con 13,0 mg/kg y (SerH₂)₂[ZnCl₄]-2: tratamiento con el complejo con 26,0 mg/kg.

2.4.1.3. Variación de peso

Se estudió también la variación de peso después del tratamiento crónico del complejo para compararlo con el tratamiento con hidrocloreuro de sertralina. En concordancia con la bibliografía, el tratamiento con hidrocloreuro de sertralina produjo disminución en el peso corporal de los animales en comparación con el grupo control (grupo sal).¹⁹ Este efecto anorexígeno también se observó en estudios clínicos.²⁰

Interesantemente, el complejo (grupo (SerH₂)₂[ZnCl₄]) revirtió totalmente el efecto anorexígeno del hidrocloreuro de sertralina (grupo Ser). Y además, a una dosis mayor del complejo, el peso corporal aumentó en relación al grupo control, siendo éste un efecto opuesto al del clorhidrato de sertralina (Figura 9).

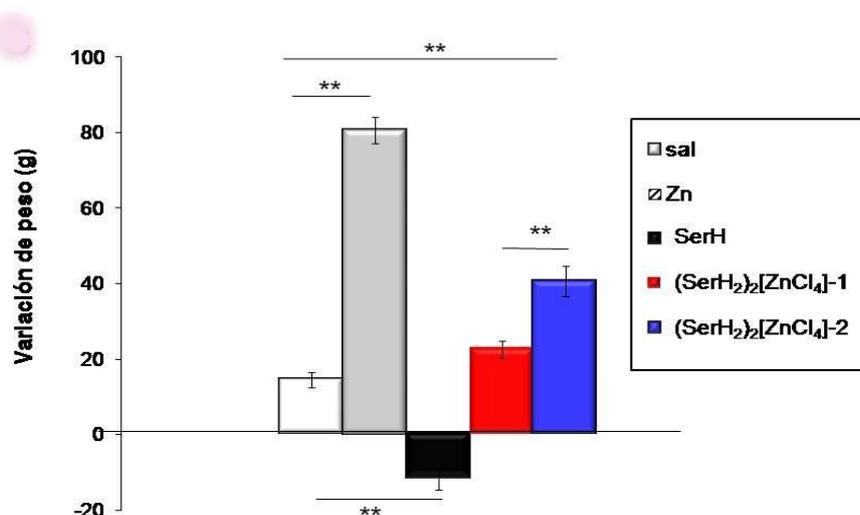


Figura 9: Efectos del complejo de la invención sobre la variación de peso corporal. Los resultados se expresan en media \pm SEM (n= 5-10 ratas/grupo). sal: tratamiento con solución salina, Zn: tratamiento con cloruro de zinc(II) (5,55 mg/kg), sert: tratamiento con clorhidrato de sertralina (10,0 mg/kg), (SerH₂)₂[ZnCl₄]-1: tratamiento con el complejo con 13,0 mg/kg y (SerH₂)₂[ZnCl₄]-2: tratamiento con el complejo con 26,0 mg/kg. ** Diferencia significativa a nivel de P< 0,01.

2.5. Actividad antimicrobiana

Los fármacos psicotrópicos han demostrado tener actividad antimicrobiana frente a varios grupos de microorganismos. Algunos de estos fármacos, tales como los agentes antidepresivos sertralina, fluoxetina y paroxetina son conocidos por actuar como inhibidores de la bomba de eflujo en las células humanas. Su actividad se ha estudiado en forma aislada o con combinación con antibióticos, contra las especies bacterianas demostrándose que tienen una actividad sorprendente, principalmente frente a microorganismos Gram positivos. También muestran actividad sinérgica cuando se combina con algunos antibióticos contra varias bacterias, que se muestra por una disminución en los valores de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) que convierte las cepas previamente resistentes a la categoría de sensibles, y modifican los aspectos fisiológicos relacionados con la patogenicidad.²¹

Por otra parte, pruebas realizadas con interacción de sertralina con *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida dubliniensis* muestran que se altera la virulencia candidiásica. En particular, el tratamiento con sertralina sobre *Candida spp.* afectó la elongación de las hifas, la actividad fosfolipasa, la producción de aspartil proteasa y la viabilidad del hongo.²²

Sobre la base de estos datos previamente existentes, nos propusimos determinar la actividad antimicrobiana del complejo en comparación con la del hidrocloreuro de sertralina y del ZnCl₂ en nuestras condiciones de trabajo (Tabla 5).

Tabla 5. Determinación de la actividad antimicrobiana del fármaco antidepresivo hidrocloreuro de sertralina, ZnCl₂ y su sal tetraclorozincato de sertralonio. Valores de concentraciones inhibitorias mínimas, CIM, en µg/mL.

	SerH ₂ ⁺ Cl ⁻	ZnCl ₂	(SerH ₂) ₂ [ZnCl ₄]
<i>E. coli</i>	24	188	48
<i>P. aeruginosa</i>	750	1500	750
<i>E. faecalis</i>	24	1500	24
<i>S. aureus</i>	24	188	24
<i>S. epidermidis</i>	24	188	24
<i>C. albicans</i>	6	1500	24
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12	1500	12
<i>C. parapsilosis</i>	12	750	12
<i>C. parapsilosis</i> (sensu stricto) ATCC 22019	6	750	12
<i>C. krusei</i>	3	1500	12
<i>C. glabrata</i>	3	1500	12
<i>C. tropicalis</i>	6	750	24

Bacterias (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12238, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y **Hongos** (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* de aislamiento clínico).

Se sabe que la actividad antibacteriana se considera significativa cuando los valores de CIM son de 100 µg/mL o menores. Cuando la CIM está en el rango de 100 a 500 µg/mL la actividad antibacteriana se considera moderada, cuando la CIM están entre 500 a 1000 µg/mL se considera débil, y cuando la CIM es de 1000 µg/mL se considera inactivo.²³ De los datos obtenidos se demuestra que la presencia de Zn(II), que evidencia sólo actividad moderada para *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis* e inactiva para el resto de las cepas estudiadas no provoca un efecto sinérgico positivo por su presencia en el complejo pero tampoco disminuye significativamente el efecto mostrado por sertralina ya que los valores de CIMs se encuentran dentro del rango significativo.

En consecuencia la sal formada no produce efectos de mejora significativos sobre la capacidad antimicrobiana del fármaco sertralina pero se mantiene igual o levemente inferior por formación de la sal.

2.6. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB)

Las proteínas transportadoras son aquellas que proporcionan un medio de transporte, bien en el plasma o a través de la membrana celular, a aquellos sustratos que interaccionan en el centro activo de ésta. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden citar las lipoproteínas, que son las encargadas de transportar las grasas por todo el organismo, las albúminas séricas, que son proteínas plasmáticas que actúan como vehículo de diversos agentes, tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas) como exógenos (fármacos) y la α -glicoproteína ácida, que es otra proteína plasmática que, entre otras funciones, se encarga del transporte de fármacos básicos o neutros por el organismo.

La albúmina sérica se encuentra presente en todas las especies animales. Se puede extraer de bovinos (ASB), ratas (ASR), conejos (ASC), cerdos (ASCe), perros (ASP), humanos (ASH), etc. Muchas de estas albúminas se han usado para estudios de interacción con fármacos y de farmacocinética en lugar de ASH, basándose en la alta similitud encontrada en las secuencias de aminoácidos de otras especies respecto a la humana.

Las albúminas son proteínas flexibles que pueden adaptar su estructura para interaccionar con una gran variedad de sustratos en sus distintos sitios de unión. El estudio de la interacción fármaco/albúminas séricas es importante para conocer la

biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de éstos en el organismo.

Debido a la función de transporte de la albúmina sérica, resulta de gran interés el estudio de la formación de complejos con ASB. Una gran cantidad de drogas se transportan a través del torrente sanguíneo formando complejos con la albúmina. Esta proteína resulta un verdadero depósito de drogas en el organismo, y las protege de ser modificadas por el metabolismo. A menudo, la albúmina sérica aumenta la solubilidad de drogas hidrofóbicas en el plasma y modula la circulación, el metabolismo y la eficacia de muchas drogas *en vivo* y *en vitro*.^{24,25,26}

Se ha demostrado que las interacciones proteína-ligando desempeñan un papel importante en una gran variedad de procesos biológicos. Profundizar en el conocimiento sobre cómo se produce la interacción entre ligandos y albúmina sérica es de gran importancia desde el punto de vista de la farmacocinética, la farmacodinamia y la toxicidad asociada a cualquier sustancia.

En general la naturaleza de estas interacciones es de tipo electrostático, por puente de hidrógeno, puente salino o de tipo van der Waals; el proceso, que generalmente es reversible, tiene unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M^{-1} . En otras ocasiones, las interacciones entre AS y fármacos son irreversibles. Esto se da con ciertos tipos de metabolitos de los fármacos, y es más pronunciada con algunos de aquellos que tienen tendencia a formar glucurónidos.²⁴

Para estudiar estas interacciones se emplean diferentes tipos de técnicas, entre ellas la técnica de fluorescencia que se aplicará en esta tesis.

En este estudio se realizaron las determinaciones en comparación con hidrocloreto de sertralina aunque se conocen de forma exhaustiva los datos relativos a la farmacocinética del medicamento. Así por ejemplo se sabe que la sertralina es capaz de unirse en un 98% a la proteína plasmática y que su concentración máxima se encuentra en un tiempo medio estimado entre 6-8 h incluso cuando existen diferencias en la cantidades de dosis así como en la forma que las mismas son administradas en humanos.²⁷

2.6.1. Resultados de la interacción

En este trabajo las determinaciones se realizaron a 37 °C y en un tiempo promedio de 8 h y en rango de concentraciones de 25-500 μ M para asegurar la formación de

complejos con la albúmina en base a los estudios farmacocinéticos mencionados para sertralina.²⁸ Se muestran también las constantes obtenidas para dos horas de interacción con la finalidad de marcar las diferencias observadas.

La interacción de un compuesto con la albúmina se pone de manifiesto por modificación del entorno de la albúmina y se refleja en la desactivación de la fluorescencia intrínseca de la albúmina (“*quenching*” de fluorescencia).²⁹

En ese caso, la desactivación de la fluorescencia del triptófano (“*quenching*”) se puede analizar mediante la relación de *Stern-Volmer* (Ec(1)).²⁹

$$F^0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

Donde F^0 y F denotan las intensidades de fluorescencia de la albúmina en ausencia y en presencia del desactivador, respectivamente. K_{sv} es la constante de *quenching* de Stern–Volmer la cual está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al desactivador (“*quencher*”) (mayor accesibilidad, mayor K_{sv}), y $[Q]$ es la concentración del desactivador.

En un cierto intervalo de concentración, la curva de F^0/F en función de $[Q]$ (curva de Stern-Volmer) es lineal si el tipo de *quenching* es único: *quenching* estático o dinámico. El *quenching* estático se debe a la formación de un complejo entre el fluoróforo y se puede diferenciar del colisional ya que generalmente las K_{sv} obtenidas de *quenching* estático son mayores que las del colisional. Teniendo en cuenta la relación existente entre la constante de velocidad de *quenching* de una biomolécula, K_q y la constante de *quenching* dinámico K_{sv} : $K_q = K_{sv}/\tau_0$. donde τ_0 es el tiempo de vida media de la biomolécula sin desactivador y, considerando que el tiempo de vida media de fluorescencia de las biomoléculas es en promedio 10^{-8} s³⁰, puede estimarse un valor de K_q con la ecuación formulada. De acuerdo a la bibliografía, el valor máximo de K_q de referencia es de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, entonces, si el valor de la constante estimada es mayor a ese valor puede proponerse que el mecanismo de interacción es por formación de un complejo, en caso contrario sería un *quenching* colisional.

Cuando el “*quenching*” es estático, se supone que existen sitios de unión para el desactivador que son similares pero independientes. Esos sitios de unión así como su constante de asociación pueden ser estimados utilizando la relación matemática (2):

$$\log [(F^0-F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

donde K_b es la constante de unión o la constante de asociación aparente para la interacción de compuesto-proteína, y n es el número de sitios de unión (“binding sites”) y $[Q]$ es la concentración del desactivador (*quencher*).

En la Figuras 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos para la representación de las curvas mencionadas y en la Tabla 6 los valores de las constantes estimadas sobre la base de las mismas.

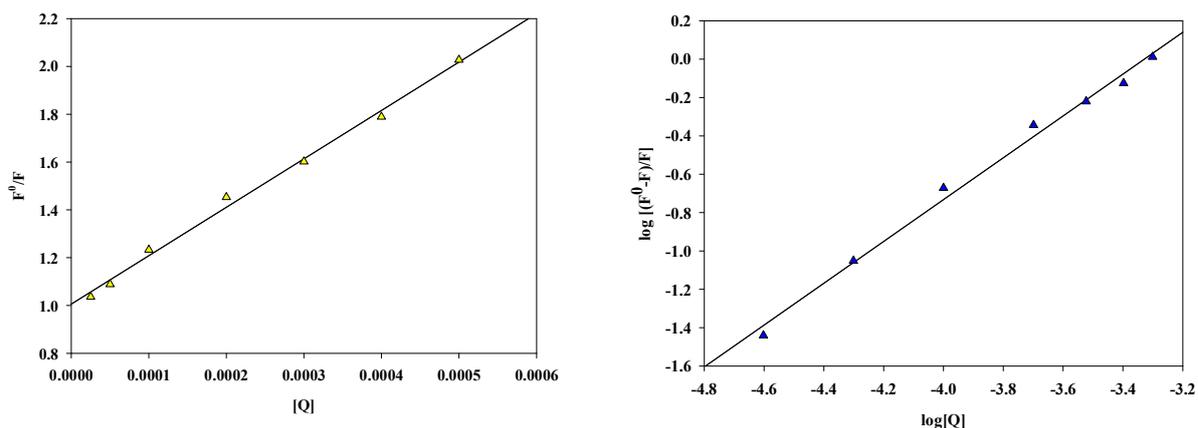


Figura 10. Representación para el sistema SerH₂Cl-BSA de (i) F^0/F vs $[Q]$ (izquierda) y de (ii) $\log [(F^0-F)/F]$ vs $\log[Q]$ (derecha).

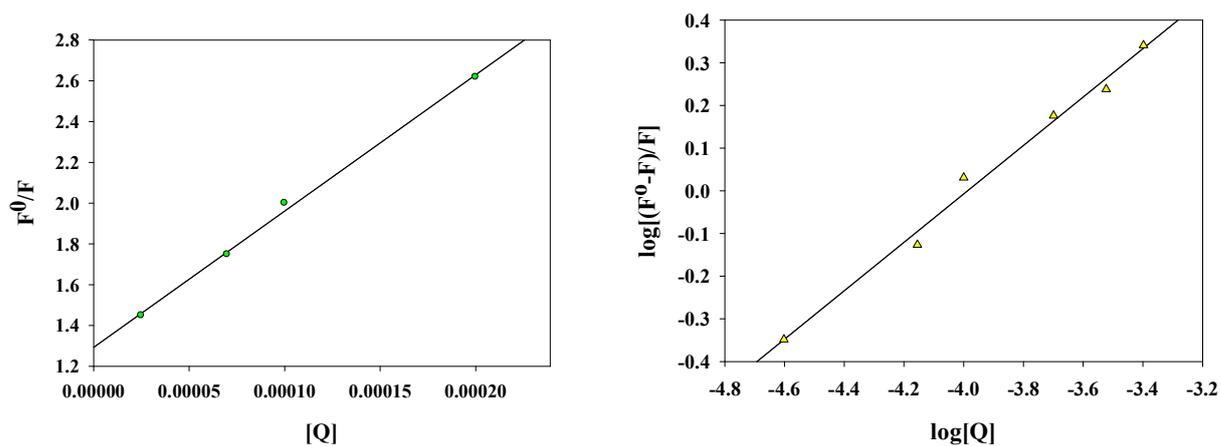


Figura 11. Representación para el sistema $(SerH_2)_2[ZnCl_4]$ -ASB de (i) F^0/F vs $[M]$ (izquierda) y de (ii) $\log [(F^0-F)/F]$ vs $\log[Q]$ (derecha).

Tabla 6. Constantes de *quenching* de Stern Volmer, constantes biomoleculares de *quenching* (K_q) y constantes de unión aparente K_b y sitios de unión “n” los sistemas $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ -ASB a 310 K y pH=7,4.

Sistema	$K_{sv}(\text{M}^{-1}) \pm \text{DS}$	$^*K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$^*R^2$	$K_b(\text{M}^{-1}) \pm \text{DS}$	$n \pm \text{DS}$	$^{**}R^2$
2 h de incubación						
$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ -ASB	$2,37 \times 10^3 \pm 0,03$	$2,37 \times 10^{11} \pm 0,03$	0,998	$40,74 \pm 1,10$	$0,45 \pm 0,01$	0,995
$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]^-$ -ASB	$6,48 \times 10^3 \pm 0,10$	$6,48 \times 10^{11} \pm 0,10$	0,988	$173,8 \pm 1,23$	$0,57 \pm 0,01$	0,978
8 h de incubación						
$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ -ASB	$2,03 \times 10^3 \pm 0,02$	$2,03 \times 10^{11} \pm 0,02$	0,980	$4,27 \times 10^3 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,03$	0,992
$(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]^-$ -ASB	$3,46 \times 10^3 \pm 0,03$	$3,46 \times 10^{11} \pm 0,03$	0,979	$81,28 \pm 0,50$	$0,50 \pm 0,05$	0,996

* K_q : valores calculados con la finalidad de descartar el proceso de “quenching dinámico”

** R^2 , coeficiente de correlación de los valores de las constantes. DS: desviación estándar.

Como puede verse, para sertralina existe una mejora significativa en el valor de la constante de unión aparente cuando el sistema se deja interaccionar por 8 h asumiendo la existencia de al menos un sitio de unión a la proteína en el tiempo transcurrido. Eso reflejaría la tendencia demostrada *in vivo* para los estudios de sertralina en relación al tiempo de asimilación.

Si comparamos con datos obtenidos mediante técnicas similares para otros antidepresivos bloqueadores de la recaptación de neurotransmisores, por ejemplo fluoxetina³¹ y citalopran³² con ASB y duloxetina con ASH³³, las K_{sv} encontradas son del mismo orden de magnitud mientras que clomipramina presenta un orden de magnitud mayor.³⁴

Sin embargo, cuando se analizan los datos encontrados para el sistema $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]^-$ -ASB, un mayor tiempo de interacción provoca una disminución en los parámetros encontrados. Se podría entonces sugerir una mejora en la asimilación del complejo por parte de la albúmina en comparación con la sertralina disminuyendo el

tiempo necesario para una interacción efectiva siendo el valor de su K_b cuatro veces mayor en las mismas condiciones experimentales para las 2h de incubación.

2.7. CONCLUSIONES

Nuestro grupo de trabajo ha tenido éxito en la síntesis de una sal de formulación $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$, la cual ha sido caracterizada por métodos de difracción de rayos X, espectroscopía vibracional, incluyendo análisis térmicos entre otras técnicas. Sobre la base de las búsquedas realizadas tanto por nuestro grupo de trabajo como por la oficina de patentes del CONICET se concluye que no se detectaron documentos que revelen la estructura de un compuesto iónico formado por un complejo de coordinación aniónico de Zinc(II) y el catión sertralonio como el descrito en este capítulo. En consecuencia, este nuevo compuesto resulta novedoso. Si bien existen en la bibliografía información sobre otras sales (no conteniendo Zn(II)), ninguna de las referencias sugiere que tales complejos de coordinación puedan exhibir actividad antidepresiva potenciada.

Sobre la base de los resultados mostrados, nuestro compuesto demuestra actividad antidepresiva potenciada, es decir es mayor que la demostrada por hidrocloreto de sertralonio *per se* anulando además el efecto anorexígeno del antidepresivo, lo cual puede eventualmente constituir una segunda ventaja clínica adicional en el caso que pueda ser formulado como un fármaco.

Los datos de interacción con albúmina sérica bovina permiten sugerir una mejora en la asimilación del complejo a corto plazo.

Por este motivo este compuesto ha sido considerado una invención desarrollada por nuestro grupo de trabajo y es susceptible de protección por la vía de las patentes.

Por otra parte nuestro compuesto al igual que hidrocloreto de sertralina presenta actividad antimicrobiana sobre las cepas estudiadas no afectando la presencia del Zn(II) al efecto significativo demostrado por la presencia de sertralina.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ C. Rubio, D. González Weller, R. E. Martín-Izquierdo, C. Revert, I. Rodríguez y A. Hardisson. *Nutr Hosp.* 22 (2007) 101-107. ISSN 0212-1611-CODEN NUH0EQ-S.V.R. 318.
- ² (i) K. Jurowski, B. Szewczyk, G. Nowak, W. Piekoszewski. *J Biol Inorg Chem.* 19(2014):1069-1079, (ii) C.W. Levenson. *Rev. Nutr* 64 (2006) 39-42.
- ³ E. Ranjbar, J. Shams, M. Sabetkasaei, M. M-Shirazi, B. Rashidkhani, A. Mostafavi, E. Bornak. J. Nasrollahzadeh. *Nutr. Neurosci.* 17 (2014) 65-71.
- ⁴ K. Młyniec, C.L. Davies, I.G. de Agüero Sánchez, K. Pytka, B. Budziszewska, G. Nowak. *Pharmacol. Rep.* 66 (2014) 534-544.
- ⁵ G. Brauer, *Química inorgánica preparativa*, Editorial Reverté, Barcelona, 1958.
- ⁶ C. K. Johnson, *ORTEP-II. A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program*. Report ORNL-5318, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, 1976.
- ⁷ K. Ravikumar, B. Sridhar, M. N. Bhanu, *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 62 (2006) o565.
- ⁸ F. Caruso, A. Besmer, M. Rossi, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* 55 (1999) 1712.
- ⁹ O. Almarsson, M. B. Hickey, M. L. Peterson, S. L. Morissette, S. Soukasene, C. McNulty, M. Tawa, J. M. MacPhee, J. F. Remenar, *Cryst. Growth Des.* 3 (2003) 927.
- ¹⁰ Quan He, S. Rohani, J. Zhu, H. Gomaa, *Chirality* 24 (2012) 119.
- ¹¹ Quan He, S. Rohani, J. Zhu, H. Gomaa, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 1633.
- ¹² K. Yvon, W. Jeitschko, E. Parthe, *J. Appl. Cryst.* 10 (1977) 73-74.

- ¹³ L.J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, vol. 2, Chapman and Hall, London, 1980,
- ¹⁴ G.A.Giffin, S. Boesch, D.N. Bopege, D. R. Powell, R. A. Wheeler, R. J. Frech, J. *Phys. Chem. B* 113 (2009) 15914-15920.
- ¹⁵ K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*, Sixth Edition, 2009, John Wiley and Sons.
- ¹⁶ J.S.Avery, C.D Burbridge, D.M.L. Goodgame, Raman spectra of the tetrahalo-anions of Fe(III), Mn(II), Fe(II), Cu(II) and Zn(II), *Spectrochim. Acta* 24A (1968) 1721-1726.
- ¹⁷ K. Jurowski, B. Szedczyk, G. Nowak, D. Piekoszedfki, *J. Biol. Inorg. Chem* 19 (2014) 1069-1079 y referencias incluidas.
- ¹⁸ K. Młyniec, C.L. Davies, I. Gómez de Agüero Sánchez, K. Pytka, B. Budziszedska, G. Nowak, *Pharmacol. Reports* 66 (2014) 534-544.
- ¹⁹ J.A. Nielsen, D.S Chapin, J.L. Jr Johnson, L.K. Torgersen. *Am J Clin Nutr.* 55 (1992) 185S-189S.
- ²⁰ S. Ranjbar, N.B. Pai, C. Deng. *J. Health Allied Sci.* 12 (2013) 1-9.
- ²¹ J.L. Muñoz-Bellido, S. Muñoz-Criado, J.A. García-Rodríguez. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 177-180.
- ²² C. Lass-Flörl, M. Ledochowski, D. Fuchs, C. Speth, L. Kacani, M. P. Dierich, A. Fuchs, R. Würzner. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35 (2003) 11-15.

²³ N.M. Urquiza, M.S. Islas, S.T. Ariza, N. Jori, J.J. Martínez Medina, M.J. Lavecchia, L.L. López Tévez, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer, *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 64–72.

²⁴ U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bull.* 25, 695-704 (2002).

²⁵ Y. J Hu, Y.Liu; R.M. Zhao, J.X Dong, S.S.Qu., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 179 (2006) 324.

²⁶ E.G. Ferrer, A.Bosch,; O.Yantorno, E.J. Baran, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 3878-3886.

²⁷ R.A. Ronfeld, L.M. Tremaine, K.D. Wilner, *Clin. Pharmacokinet.* 1997 ; 32 Suppl. 1: 22-30.

²⁸ C.L. DeVane, H.L. Liston, J.S. Markowitz, *Clin. Pharmacokinet.* 41(2002) 1247-1266.

²⁹ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Plenum Press, New York (1999).

³⁰ Tian, M. Y.; Zhang, X. F.; Xie, L.; Xiang, J. F.; Tang, Y. L.; Zhao, C. Q. *J. Mol. Struct.* 20 (2008) 892.

³¹ U. Katrahalli, S.Jaldappagari, S.S. Kalanur, *J. Lumin.* 130 (2010) 211-216.

³² J. Lin, Y. Liu, M. Chen, H. Huang, L. Song, *J. Lumin.* 146 (2014) 114-122.

³³ X. Liu, Y. Du, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4043-4049.

³⁴ M.A. Rub, J.M. Khan, A.M. Asiri, R.H. Khan, K-ud-Din, *J. Lumin.* 155 (2014) 39-46.

CAPÍTULO III. COMPLEJO DE Zn(II) CON S-METIL-L-CISTEÍNA

3.1. INTRODUCCIÓN

Como venimos mostrando, son muchas y notables las funciones fisiológicas y metabólicas pertinentes al Zn, junto con su relevancia en la participación de procesos de la vida y su presencia como centros activos de muchas enzimas.^{1,2} Particularmente, se sabe que el Zn está presente en el sistema nervioso central, corteza cerebral, la glándula pineal y el hipocampo. Las alteraciones en la homeostasis del zinc pueden entonces relacionarse con el mecanismo de la fisiopatología y el tratamiento de la depresión. Los datos clínicos han puesto de manifiesto la presencia de menor concentración de Zn en suero en pacientes que sufren de depresión la que puede ser restaurada a posteriori de un tratamiento antidepresivo eficaz. Más evidencia de que la deficiencia de zinc induce comportamiento depresivo ha sido confirmada en estudios realizados sobre modelos animales para depresión³. También se ha demostrado que una dieta con privación Zn provoca cambios relacionados al aumento del tiempo de inmovilidad (test de natación forzada) y en las pruebas de suspensión de la cola en ratones y ratas siendo indicio que su carencia tiene influencia sobre el comportamiento antidepresivo. Por lo general, las sales simples ($ZnCl_2$ o $ZnSO_4$)^{4,5} se utilizan como complementación de la deficiencia de zinc en el cuerpo. Hasta el momento, como se mencionara, sólo un complejo de coordinación, el hidroaspartato de cinc (ZINCAS®)⁶ (suplemento alimenticio) ha demostrado exhibir efecto antidepresivo. En este contexto, nuestro grupo de investigación se interesó en el desarrollo y evaluación de Zn(II) en compuestos de coordinación con el fin de evaluar su potencial actividad antidepresiva.

Por otra parte, nuestro interés también está focalizado en el estudio de complejos metálicos como inhibidores enzimáticos debido al interés en estos últimos años por sus diferentes tipos de aplicaciones desde el punto de vista farmacológico. En los últimos años, varios complejos de Zn(II) y de otros metales han estado involucrados en los procesos de inhibición de enzimas relacionadas con el cáncer, la hipertensión, aplicaciones neurológicas⁷, tumores⁸, producción de ácido úrico⁹, entre otros. En particular, estamos interesados en la inhibición de la enzima fosfatasa ácida (ACP) en vista de la aplicación de los inhibidores en tratamientos quimioterapéuticos, osteoporosis, la encefalopatía, el SIDA, enfermedad de Guacher, leucemia, enfermedad

de Alzheimer, metástasis óseas, hiperparatiroidismo, cáncer de próstata, etc^{10,11}. Otro punto a remarcar es el hecho que las fosfatasas son producidas también por algunos microorganismos (por ejemplo bacterias) como requisito de supervivencia para producir por ese medio fosfato inorgánico (Pi) en períodos de inanición de fosfatos (debido a su esencialidad para su existencia).¹² En consecuencia, en el control de los niveles de fosfatasa puede ser una manera de controlar la supervivencia del microorganismo. La capacidad de inhibición enzimática de los iones Zn(II) y de algunos complejos ha sido demostrada^{13,14} y por esta razón, también decidimos probar el comportamiento del complejo como inhibidor de fosfatasa ácida.

Asimismo, en vista de que aminoácidos derivados de azufre y sus complejos con Zn(II) demostraron ser eficaces como antioxidantes¹⁵ y considerando además que los radicales libres están implicados en varias enfermedades, también hemos investigado la capacidad de extinción de radicales por parte del complejo en estudio.

Por el momento, el aminoácido S-metil-L-cisteína no se ha tenido suficientemente en cuenta en relación con sus propiedades beneficiosas para la salud. Se sabe que ha sido estudiado como antioxidante en la oxidación de las especies a partir de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) durante la formación de la lipoproteína de baja densidad humana (LDL)¹⁶, ha sido probado como neuroprotector en ratones tratados con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)¹⁷ y que también fueron analizados los efectos antioxidantes y anti-inflamatorias en riñones de ratones.¹⁸ Otro tema relevante son las pruebas realizadas por Morimura y colaboradores que demostraron que la S-metil-L-cisteína puede servir como un agente quimiopreventivo para la hepatocarcinogénesis, en el que la reducción de la proliferación celular se produce por un mecanismo que aparentemente implica la eliminación del IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina I, y el incremento del estrés oxidativo.¹⁹ Por eso es muy interesante estudiar y analizar los beneficios potenciales de la S-metil-L-cisteína y su complejo de coordinación desde el punto de vista de su comportamiento como compuestos antioxidantes.

3.1.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron:

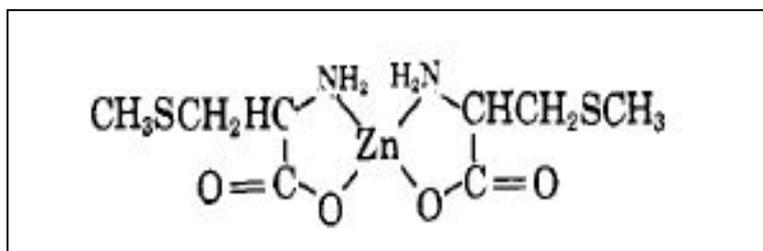
- 1) Mejorar el método de síntesis del complejo Zn(S-Met)₂ para lograr un mayor rendimiento.

- 2) Lograr una caracterización desde el punto de vista de la espectroscopía vibracional con el fin de asignar los modos de las vibraciones características de una manera más completa.
- 3) El estudio del potencial efecto antidepresivo del complejo de Zn(II) en comparación con el ligando.
- 4) Determinar la capacidad antioxidante de la S-metil-L-cisteína y su complejo con Zn(II) y verificar si hubo potenciación debido a la formación del complejo.

3.2. PREPARACIÓN DE BIS(S-METIL-L-CISTEINATO) DE ZN(II) (Zn(S-METILCISTEÍNA)₂)

El complejo de Zn(II) con S-metil-L-cisteína se preparó de acuerdo a la técnica reportada por Shindo y colaboradores.²⁰ De acuerdo al procedimiento descrito se procede de la siguiente manera: 0,01 mol de S-metil-L-cisteína se disuelve en una solución de conteniendo 0,1 mol de NaOH en 50 mL de agua bidestilada. Sobre dicha solución se agrega lentamente, gota a gota y mediante agitación continua 0,005 moles de ZnCl₂. A los minutos de la adición comienza a formarse un precipitado de color blanco. El mismo se deja 2 hs en agitación y luego se procede a su filtración y lavado reiterado con agua bidestilada hasta asegurarse la eliminación completa de iones cloruro mediante reacción negativa al test de formación de AgCl. Para esta preparación la formulación indicada refiere: C₆H₁₆N₂S₂O₄Zn. C, 28,79%, H, 4,83%, N, 8,39%.

Asimismo la estructura propuesta para el complejo se presenta a continuación:



Tomada de Shindo y colaboradores²⁰

3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

3.3.3. Caracterización por espectroscopía FTIR y Raman

Con la finalidad de asegurar la correcta formación del complejo incluyendo su pureza y a la vez poner en práctica los procedimientos estudiados durante la tesis para la asignación de las bandas características de los compuestos en estudio mediante las técnicas de Infrarrojo y Raman se procedió a la determinación de los espectros.

En la Figura 1 se muestran los espectros infrarrojo de S-metil-L-cisteína y Zn(S-metil-L-cisteína)₂ y en la Tabla 1 las asignaciones realizadas por comparación de ambos espectros y tomando como referencia algunos datos existentes.

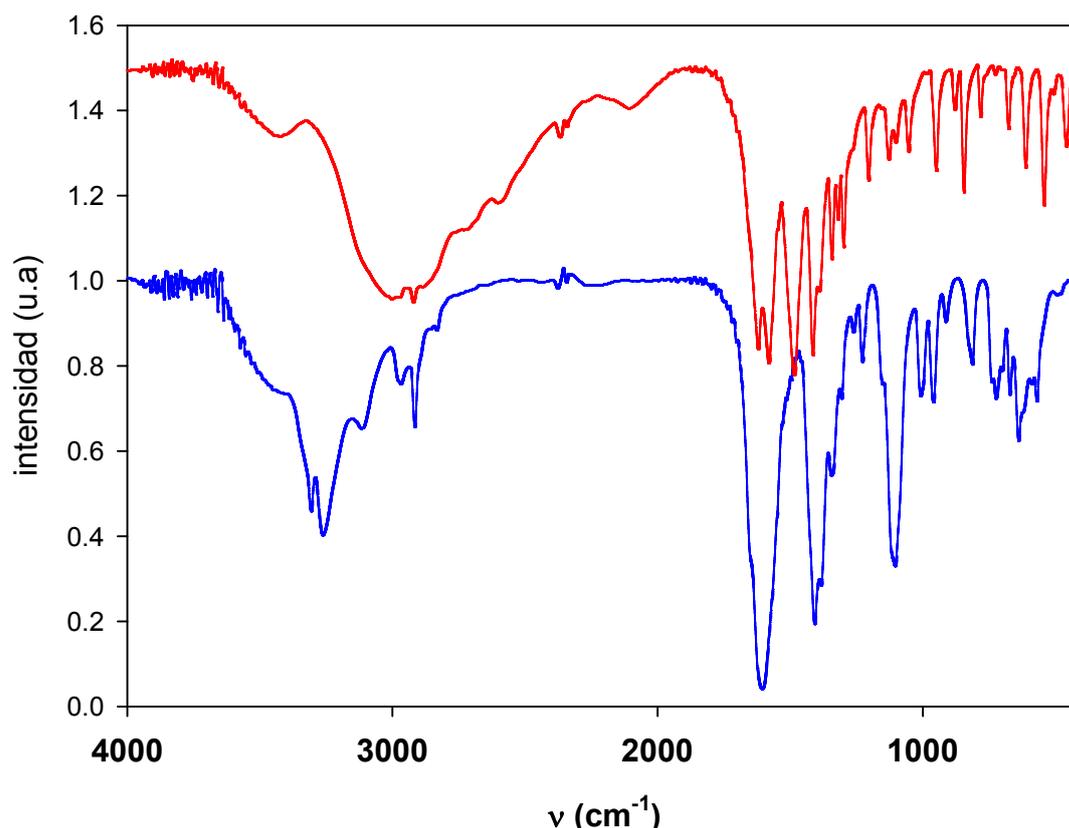


Figura 1. Espectros FTIR de S-metil-L-cisteína (rojo) y Zn(S-Met)₂ (azul)

A continuación en la Figura 2, se presentan los espectros Raman.

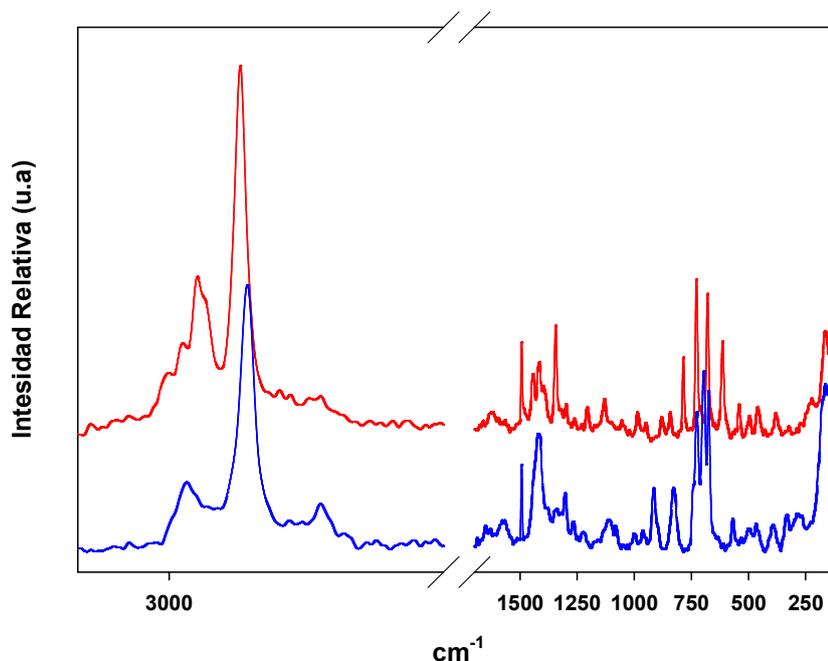


Figura 2. Espectros Raman de S-metil-L-cisteína (rojo) y Zn(S-Met)₂ (azul)

Como se sabe, en forma general, cuando los aminoácidos se encuentran en forma sólida policristalina, se presentan en la forma de “zwitterion” que implica la presencia del grupo carboxilato en la forma desprotonada ($-\text{COO}^-$) el grupo amino protonado ($-\text{NH}_3^+$). Por tanto como puede verse en el FTIR de la S-metil-L-cisteína, se observa como era de esperar, la presencia de dos bandas características 1582 y 1415 cm^{-1} correspondientes a los modos de vibración $\nu_{\text{as}}(-\text{COO}^-)$ y $\nu_{\text{s}}(-\text{COO}^-)$ del grupo carboxilato, respectivamente.

La coordinación con el Zn(II) produce un corrimiento de estas bandas hacia 1610 y 1385 cm^{-1} de los modos de estiramiento mencionados. Este corrimiento en conjunto con su valor de $\Delta\nu$ de 225 cm^{-1} es indicativo de la coordinación monodentada del grupo carboxilato, tal como fuera sugerido.²¹ A su vez, la determinación del espectro Raman nos permite confirmar la asignación de las frecuencias de estiramiento del grupo

carboxilato ya que se produce de acuerdo a lo previsto la marcada disminución de la intensidad del modo de estiramiento asimétrico en el espectro.

A su vez, la presencia del grupo $-\text{NH}_3^+$ muestra el doblete característico asignado en 1485 y 1622 cm^{-1} . La deprotonación de este grupo ($-\text{NH}_2$) acompañado de la coordinación al centro metálico produce un corrimiento de la banda hacia mayores frecuencias de estiramiento. También se producen modificaciones en los otros modos vibracionales relacionados a este grupo (Tabla 1).

Otra ventaja del espectro Raman es que permitió la detección de los modos de estiramientos Zn-O y Zn-N que no siempre son posibles de visualizar.

De esta forma se caracterizó el complejo y se procede a continuación a realizar las determinaciones de las actividades *in vitro* teniendo la seguridad de su pureza.

Tabla 1. Asignaciones de algunas frecuencias características de las bandas de los espectros FTIR y Raman (cm^{-1})

S-metil-L-cisteína		Zn(S-metilcisteína) ₂		Asignaciones
FTIR	Raman	FTIR	Raman	
		3307 f 3265 f		$\nu_{\text{as}} \text{NH}_2$ estiramiento asimétrico $\nu_{\text{s}} \text{NH}_2$ estiramiento simétrico
3006 a, f 2921 d	3001 m 2966 m 2969 f			$\nu_{\text{as}} \text{NH}_3^+$, $\nu \text{H}_2\text{O}$
		1650 h	1653 m	$\delta_{\text{as}} \text{NH}_2$ deformación asimétrica
1622 f	1625 a, m			$\delta_{\text{s}} \text{NH}_3^+$ deformación asimétrica
1582 f	1598 d	1610 f	1615 d	$\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$ estiramiento asimétrico
1485 f	1493 f			$\delta_{\text{s}} \text{NH}_3^+$
1415 f	1417 m	1385 f	1383 m	$\nu_{\text{s}} \text{COO}^-$ estiramiento simétrico
		1154 h		δNH_2
1129 m	1134 f			δNH_3^+ balanceo
1054 m				$\nu (\text{C-N})$
950		1009 m 961 m	1101 m 975 m	$\nu (\text{C-C})$ estiramiento
782 d	786 f			δCH_2 balanceo
			291 d	Zn-N
			145 d	Zn-O

f=fuerte, m=media, d=débil, a=ancha, h=hombro

3.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.4.1. Actividad antidepresiva.

3.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test) y Prueba de campo abierto (PCA)

Para un mejor análisis del efecto antidepresivo y con fines comparativos con las publicaciones existentes, se repitieron los ensayos utilizando $ZnCl_2$. De la misma manera que lo reportado, los experimentos realizados utilizando Zn(II) redujeron la inmovilidad y aumentaron el comportamiento de natación sugiriendo para Zn(II) efecto antidepresivo (Figura 3A). La administración de S-metil-L-cisteína no tuvo ningún efecto significativo sobre la PNF. Sin embargo, el tratamiento de $[Zn(S-Met)_2]$ disminuyó la inmovilidad y provocó un aumento de la conducta de nadar en una magnitud que supera a los efectos mostrados por $ZnCl_2$.

Los efectos de diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora espontánea en ratas se muestran en la Figura 3B. Ninguno de estos tratamientos afectó los niveles de actividad, lo que confirma la especificidad de los resultados PNF.

La depresión es una condición altamente prevalente e incapacitante asociada con alta morbilidad y mortalidad.²² A pesar de la disponibilidad de muchos fármacos antidepresivos aprobados para el tratamiento de trastornos depresivos mayores, casi el 50% de los pacientes presentan resistencia al tratamiento.²³ Además, Lin y colaboradores²⁴ han reportado una alta tasa de abandono del tratamiento prematuro debido principalmente a los efectos secundarios de los medicamentos. Otras preocupaciones terapéuticas también se enfrentan en el tratamiento de los trastornos bipolares y la depresión perinatal y la infancia, sobre todo debido a las consultas relativas a la eficacia y la seguridad de los medicamentos.

Los avances en la neurobiología de la depresión han sugerido una serie de nuevos objetivos para el tratamiento antidepresivo. Sobre la base de una mejor comprensión de la neurobiología de la depresión, se están desarrollando varias intervenciones farmacológicas y no farmacológicas novedosas. Los nuevos avances farmacológicos incluyen antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) como el zinc.²⁵

En este estudio, se utilizó la prueba de natación forzada (PNF), un modelo bien aceptado para probar la acción antidepresiva y una herramienta importante para estudiar los mecanismos neurobiológicos implicados en las respuestas antidepresivos. La PNF

emplea estímulos como factor de estrés para generar un comportamiento caracterizado por el aumento de tiempo de inmovilidad.

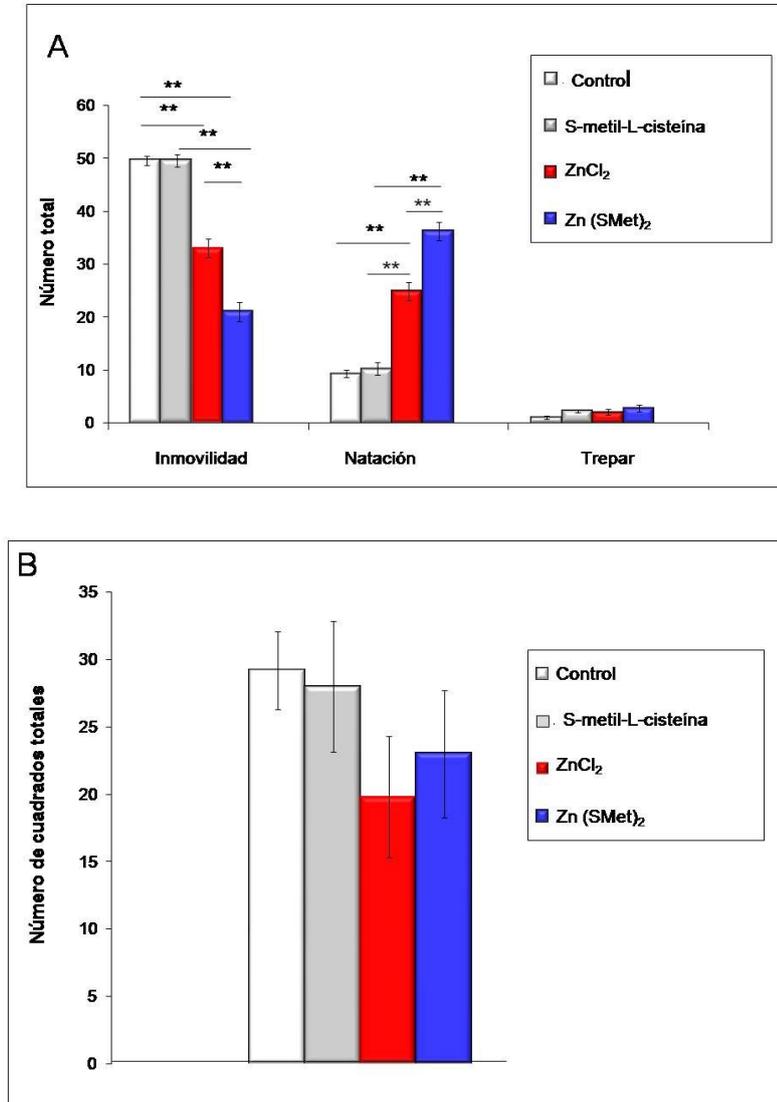


Figura 3. Efectos del comportamiento de las ratas durante el test de natación forzada (PNF) (A) y pruebas de campo abierto (OFT) (B) de la administración de solución salina, S-metil-L-cisteína, ZnCl₂ y [Zn(S-Met)₂]. Los valores representan la media (\pm SEM) para las cuentas de la inmovilidad, la natación y el comportamiento de escalar para un muestreo cada 5 s durante el período de prueba de 5 min. * P <0,05, ** P <0,01, n = 6 ratas por grupo. Los datos se analizaron por ANOVA y por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

La aparición de este fracaso conductual se ha asociado a los cambios en los neurotransmisores y las vías de señalización celular en el cerebro.²⁶

Algunos estudios han reportado efectos antidepresivos del zinc después de la administración de ZnSO₄ a una dosis de 30 mg/kg²⁷ y subcrónica (tres veces: 24, 5 y 1 h antes de la prueba)⁵ en la prueba de natación forzada en ratones y ratas, respectivamente. Por otra parte el ZnCl₂ induce un efecto antidepresivo después de administración aguda (30 mg/kg intraperitoneal) usando el mismo tipo de experimento.²⁸

Estudios recientes han demostrado que el zinc (en forma de hidroaspartato) en administración subcrónica o crónica ha reducido el tiempo de inmovilidad en diferentes modelos animales de depresión (estrés leve crónico, el estrés crónico impredecible y prueba de natación forzada).^{29,30,31,32}

Nuestros resultados muestran, por primera vez en la literatura, que el ZnCl₂ (30 mg/kg) después de la administración crónica es eficaz en la reducción del tiempo de inmovilidad en la prueba de PNF, consistente con un efecto antidepresivo en este test predictivo.³³ Por otra parte, la disminución de la inmovilidad o el aumento en el comportamiento natatorio inducida en la PNF por este tratamiento pueden ser considerados como específicos ya que no son atribuibles a los cambios en la actividad locomotora.

Puesto que, el requisito reconocido para la administración crónica de un antidepresivo para lograr una respuesta terapéutica en pacientes deprimidos que incluye un aumento de la neurogénesis en el hipocampo de la rata³⁴, demuestra que las propiedades farmacológicas de fármacos antidepresivos no dan cuenta de la eficacia clínica de esta clase de drogas.

Por otra parte, nos muestran que [Zn(S-Met)₂] ejerce efectos antidepresivos en ratas en una forma mejor que ZnCl₂. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que muestra el efecto antidepresivo del complejo [Zn(S-Met)₂]. Curiosamente, el tratamiento crónico con [Zn(S-Met)₂] tiene un efecto antidepresivo significativamente más alto que el ZnCl₂.

En general, nuestros datos podrían tener consecuencias importantes en la práctica médica y en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento antidepresivo.

3.4.1.2. Inhibición de Fosfatasas

Como se mencionara, altas concentraciones de AcP en el suero es asociada con varias enfermedades siendo esta enzima un objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos. Es bien sabido que algunos iones metálicos incluyendo el Zn(II) fueron capaces de inhibir las fosfatasas ácidas. Este comportamiento de inhibición depende del pH del medio de reacción y de la concentración del inhibidor.^{35,36}

En nuestros experimentos, el efecto sobre la actividad se ensayó a pH = 5,60 variando las concentraciones del complejo y el ligando. Los efectos del complejo [Zn(S-Met)₂] sobre la actividad AcP se muestran en la Figura 4.

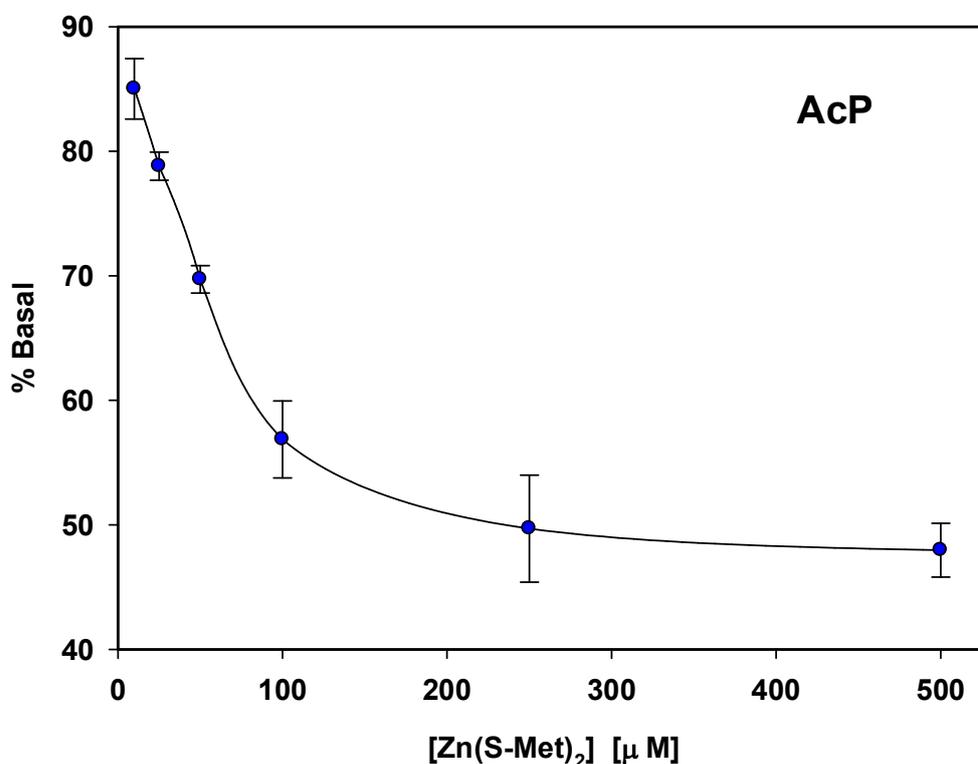


Figura 4. Efecto del complejo [Zn(S-Met)₂] sobre la actividad de la AcP. Los valores se expresan como la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes.

Como se puede observar, el complejo se comporta como un buen inhibidor en un rango de 10-500 μM siendo el valor de IC₅₀ de 250 μM. El ligando, S-metil-L-cisteína, no produce efecto sobre la actividad AcP cuando se prueba en el mismo intervalo de concentración (no se muestra). Por tanto, es evidente que la formación de complejos con

Zn(II) produce una acción sinérgica, mejorando la capacidad inhibitoria y mostrando una acción específica sobre AcP.

Estos resultados son muy interesantes y relevantes teniendo en cuenta que no existen muchos ejemplos relacionados a metales de coordinación que sea eficientes inhibidores de AcP. Se puede demostrar que el complejo $[Zn(S-Met)_2]$ se comporta como un mejor inhibidor que los complejos de Cu(II) con metimazol especialmente en comparación con el complejo ternario $[Cu(Met)_2(fen)(H_2O)_2]Cl_2$ (Cu-Met-fen, Met=metimazol, fen=fenantrolina) que presenta un valor de IC_{50} de $300 \mu M$.³⁷ Entonces, sería ésta la primera vez que el efecto inhibitorio sobre AcP se determina para un complejo de Zn(II) enmarcado en la búsqueda de encontrar mejores sustancias inhibitoras para potenciales aplicaciones farmacológicas.

3.4.2. Propiedades antioxidantes

En vista de la probada reducción del estrés oxidativo demostrado por agentes antioxidantes que contienen cisteína y, teniendo en cuenta los datos existentes de la eficacia del compuesto en la disminución de la hidroperóxido lipídico (LOOH) en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas, el efecto antioxidante de la S-metil-L-cisteína y del complejo fueron ensayados sobre los radicales hidroxilo y peroxilo.

Ninguno de ellos mostró ninguna actividad antiperoxilo al menos en el intervalo de concentración ensayado (0-50 μM). En cuanto a la atenuación del radical hidroxilo, la S-metil-L-cisteína y el complejo $[Zn(S-Met)_2]$ se comportaron como buenos supresores de hidroxilo (Figura 5).

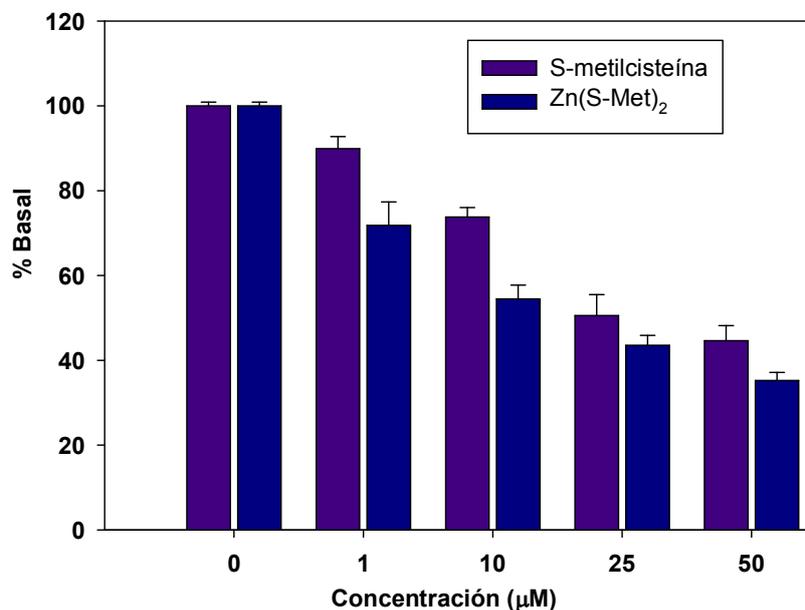


Figura 5. Efecto del complejo $[Zn(S-Met)_2]$ y de la S-metil-L-cisteína sobre la degradación de desoxirribosa por parte del radical hidroxilo, medido con el método del ácido tiobarbitúrico. Los valores se expresan como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

El mejor efecto encontrado para el complejo en comparación con el ligando se presenta a 10 μM . A esta concentración el ligando muestra una disminución del 26,21% respecto del basal y el complejo presenta un efecto mayor en disminución de la concentración inicial de los radicales del orden de un 45,43%. A pesar de que en todo el intervalo de concentración del complejo es más eficaz que el ligando que causa un 65% de reducción en 50 μM ; es en la concentración 10 μM donde se observa la mayor diferencia en porcentaje entre la eficacia mostrada por ambos compuestos (19,22%).

Una vez más, hay una mejora de la actividad antioxidante de la S-metil-L-cisteína por medio de la coordinación con Zn(II) (efecto sinérgico).

3.5. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB)

La afinidad para unirse a la albúmina ha sido evaluada para la S-metil-L-cisteína y el complejo.

Es bien sabido que la albúmina es la proteína más abundante del plasma y que su papel fisiológico comprende el control de la presión osmótica de la sangre, el transporte, el metabolismo y la distribución de varias sustancias endógenas o exógenas y que tiene la capacidad de mejorar la disolución en el medio biológico de las sustancias incluyendo las más hidrofóbicas. Por esta razón, la interacción y el transporte de las drogas por esta proteína es un punto crucial para determinar su biodisponibilidad.³⁸

La interacción y unión de nuestros compuestos con la albúmina fueron estudiadas por espectroscopía de fluorescencia. En este experimento la interacción del compuesto con la albúmina produce una marcada disminución de la intensidad de la banda de fluorescencia típica de la ASB siendo indicativa del grado de la interacción. Este efecto podría estar asociado a una variedad de interacciones moleculares. Cuando una unión a una macromolécula se produce, el equilibrio entre las moléculas libres y ligadas podría ser evaluado por la ecuación siguiente:

$$\log [(F^0-F)/F] = \log K_b + n \log [Q]$$

donde K_b es la constante de unión aparente, y n es el número de los sitios de unión. Para S-metil-L-cisteína la interacción no fue lo suficientemente fuerte y este comportamiento no nos permitió realizar cálculos. Sí fue posible valorar la constante de unión aparente y el valor de n para el complejo de Zn(II). Estos parámetros fueron calculados por la ordenada y la pendiente de la curva de regresión logarítmica doble (Figura 6, Tabla 2).

El valor de constante de unión calculado se encuentra en el intervalo 10^3 - 10^6 M⁻¹ lo que resulta compatible con una unión reversible a ASB y está de acuerdo con los valores de afinidades comunes de los medicamentos para su interacción con albúmina.³⁹

Tabla 2. Constantes de unión aparente K_b , sitios de unión “n” y parámetros termodinámicos para el sistema $[Zn(S-Met)_2]$ -ASB.

pH	T (K)	$K_b (M^{-1}) \pm DS$	n $\pm DS$.	$*R^2$	ΔH^0	ΔG^0	ΔS^0
					(kJ/mol)	(kJ/mol)	(J/mol.K)
7,4	298	$7,48 \times 10^4 \pm 0.18$	$1,42 \pm 0.04$	0,993	-52,42	-27,79	-82,65
	310	$3,30 \times 10^4 \pm 0.20$	$1,21 \pm 0.05$	0,996			

* R^2 , coeficiente de correlación de los valores de K_b .

DS. desviación estándar.

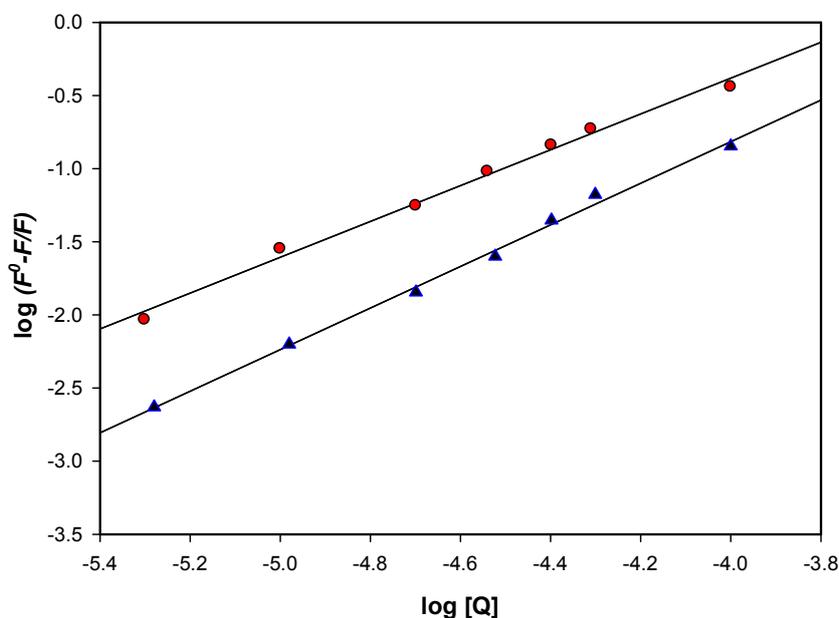


Figura 6. Representación de $\log [(F^0-F)/F]$ vs a $\log [Q]$ para el $[Zn(S-Met)_2]$ -ASB sistema a un pH de 7.40: \blacktriangle 298 K y \bullet 310 K. \bullet

El número de sitios de unión es aproximadamente igual 1,0, lo que indicaría que el complejo se une a la albúmina en un sitio específico. Como se sabe, existen básicamente cuatro tipos de interacciones no covalentes: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas que juegan un papel importante en la unión del ligando a la proteína.⁴⁰ Para tener conocimiento del tipo de interacción, se calcularon los parámetros termodinámicos.

El cambio de entalpía estándar (ΔH^0) se calculó utilizando la ecuación de Van't Hoff.

$$\ln (K_{b2}/K_{b1}) = -\Delta H^0/R (1/T_2-1/T_1)$$

y el cambio de energía libre estándar (ΔG^0) y el cambio de entropía estándar libre (ΔS^0) fueron evaluados de acuerdo a las relaciones termodinámicas conocidas:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b$$

$$\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$$

Sobre la base de varios estudios, Ross y colaboradores³⁸ propusieron que el signo de los parámetros termodinámicos, describe el tipo de interacción que tiene lugar durante la formación del complejo entre el compuesto estudiado y la albúmina. Para el complejo $[Zn(S-Met)_2]$, los valores negativos de entalpía y cambios de entropía sugirieron que las interacciones posibles son del tipo no enlazantes (van der Waals) y de la formación de enlaces de hidrógeno. Las condiciones experimentales de nuestros ensayos nos llevan a sugerir que la unión del complejo a la ASB se produce principalmente a través de interacciones de van der Waals.

3.6. CONCLUSIONES

Los compuestos, S-metil-L-cisteína y $[Zn(S-Met)_2]$ se han estudiado con el interés de explotar nuevas potenciales actividades farmacológicas. En particular, nos enfocamos en el estudio de la actividad antidepresiva. Se relevaron los datos para sales simples de Zn(II), encontrándose que la actividad locomotora espontánea no se vio afectada en un grado relevante tal que confirma la especificidad de los resultados prueba de natación forzada (PNF). También se demostró que la S-metil-L-cisteína no tuvo ningún efecto significativo en la PNF mientras que el tratamiento de las ratas con $[Zn(S-Met)_2]$ disminuyó su inmovilidad y el aumento de su comportamiento de natación siendo estos efectos más eficaces y notables que los observados cuando se administra $ZnCl_2$. Estos resultados nos permiten confirmar la generación de un efecto sinérgico como resultado de la coordinación del Zn(II) con S-metil-L-cisteína.

Anteriormente se ha mencionado el interés científico en nuevos compuestos farmacológicos que actúen como inhibidores enzimáticos. En este trabajo se pudo demostrar que la S-metil-L-cisteína no produjo ningún efecto sobre la actividad AcP en contraste con la acción del complejo $[Zn(S-Met)_2]$ que se comportó como un buen agente inhibidor ($IC_{50} = 250 \mu M$) siendo el primer ejemplo de un complejo de Zn(II) para los que se haya determinado el efecto de inhibición sobre AcP.

El interés para determinar la actividad antioxidante de S-metil-L-cisteína se basó en resultados previamente publicados que indicaban la disminución en el estrés oxidativo bajo la presencia de agentes que contenían cisteína. Por esta razón las actividades anti hidroxilo y peroxilo se ensayaron mostrando que tanto S-metil-L-cisteína y $[Zn(S-Met)_2]$ actuaron como buenos supresores del radical hidroxilo siendo el complejo más eficaz en todo el rango de concentración pero más notablemente en una concentración de $10 \mu M$. Los datos sobre la biodisponibilidad se obtuvieron por espectroscopía de fluorescencia y mostraron que el complejo pero no el ligando era capaz de ser transportado por la ASB y el valor medido de K_b indicó la existencia de una unión reversible a la albúmina. Estos resultados predicen la potencia del nuevo compuesto como un fármaco prometedor basado en un complejo de coordinación con Zn(II) accionando como antidepresivo, antioxidante y con capacidad de actuar como inhibidor de la enzima AcP.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Sigel H (Ed.), Metal Ions in Biological Systems, Vol. 15, Zinc and its Role in Biology and Nutrition, Marcel Dekker, New York, 1983.
- ² K. Młyniec, C. Linzi Davies, I. Gómez de Agüero Sánchez, K. Pytka, B. Budziszewska, G Nowak. Pharmacol Reports 66 (2014) 534-544.
- ³ K. Jurowski, B. Szewczyk, G. Nowak, W.Piekoszewski. J. Biol. Inorg. Chem. 19 (2014) 1069-1079.
- ⁴ M.P. Cunha, D.G. Machado, L.E.B. Bettio, J.C. Capra, A.L.S. Rodrigues. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 32 (2008)1913-1920.
- ⁵ B. Krocicka, P. Branski, A. Palucha, A. Pilc, G. Nowak. Brain Res. Bull. 552001:297-300.
- ⁶ A. Partyka, M. Jastrzębska-Wiêsek, B. Szewczyk, K. Stachowicz, Sawińska, E. Poleszak, U. Doboszevska, A. Pilc, G. Nowak. Pharmacol. Reports 63A (2011) 1050-1055.
- ⁷ A.Y. Louie, T.J.Meade. Chem. Rev. 99 (1999) 2711-2734.
- ⁸ J.R. Dilworth, S.I. Pascu, P.A. Waghorn, D. Vullo, S.R. Bayly, M. Christlie, X. Suna, C.T. Supuranc. Dalton Trans.44 (2015) 4859-4873.
- ⁹ M. Ikram, S. Rehman, A. Khan, R.J. Baker, T.S. Hofer, F. Subhan, M. Quayum Faridoo, C. Schulzke. Inorg. Chim. Acta 428 (2015) 117-126.
- ¹⁰ D. Feder; W.M. Hussein; D.J. Clayton; M.W. Kan; G. Schenk; R.P. McGeary; L. W. Guddat. Chem. Bio.l Drug. Des. 80 (2012) 665-674.

- ¹¹ C. Ozu; J. Nakashima; Y. Horiguchi; M. Oya; T. Ohigashi; Murai M.. *Int J Urol* 15 (2008) 419-422.
- ¹² P. Prada, J. Loveland-Curtze, J.E.Brenchley. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3732-3738.
- ¹³ N. Alia, M.N. Tahir, S. Alia, M. Iqbala, K.S. Munawara, S.Perveenc. *J. Coord. Chem.* 67 (2014) 1290-1308.
- ¹⁴ L. Almeri Tabaldi, R. Ruppenthal, D. Cargnelutti, V.M. Morsch, L. Belmonte Pereira, M.R. Chitolina Schetinger. *Environ. Exp. Bot.*59 (2007) 43-48.
- ¹⁵ D. Bagchi, M. Bagchi, S.J. Stohs. *Gen. Pharmac.* 28 (1997) 85-91.
- ¹⁶ H. Nishimura, O. Higuchi, K. Tateshita. *BioFactors* 21 (2004) 277-280.
- ¹⁷ C-M Chen, M-C Yin, C-C Hsu, T-C Liu. *Nutrition* 23 (2007) 589-597.
- ¹⁸ M-C Yin, C-C Hsu, P-F Chiang, W-J Wu. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 572-579.
- ¹⁹ K. Morimura, A. Kinoshita, T. Nishikawa, S. Hayashi, Y. Yano, S. Fukushima. *Carcinog* 27 (2005) 982-988.
- ²⁰ H. Shindo, T.L.Brown. *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1965)1904-1909.
- ²¹ K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry, Sixth Edition*, 2009, John Wiley and Sons.
- ²² P.E. Holtzheimer, C.B. Nemeroff. *NeuroRx* 3 (2006) 42-56.
- ²³ G.I.Papakostas. *J. Clin. Psychiatry* 70 (2009)16-25.

- ²⁴ E.H. Lin, M. Von Korff, W. Katon, T. Bush, G.E. Simon, E. Walker, P. Robinson. *Med. Care* 33 (1995) 67-74.
- ²⁵ G. Nowak, M. Siwek, D. Dudek, A. Ziêba, A. Pilc. *Pol. J. Pharmacol* 55 (2003) 1143-1147.
- ²⁶ D. Tardito, J. Perez, E. Tiraboschi, L. Musazzi, G. Racagni, M. Popoli. *Pharmacol. Rev.* 58 (2006)115-134.
- ²⁷ B. Krocza, A. Ziêba, D. Dudek, A. Pilc, G. Nowak. *Pol. J. Pharmacol.* 52 (2000) 403-406.
- ²⁸ A.O. Rosa, J. Lin, J.B. Calixto, A.R. Santos, A.L.S. Rodrigues. *Behav. Brain Res.* 144 (2003) 87-93.
- ²⁹ G. Nowak, B. Szewczyk, J.M. Wieronska, P. Branski, A. Palucha, A Pilc, K Sadlik, W Piekoszewski. *Brain Res. Bull.* 61 (2003)159-164.
- ³⁰ M. Sowa-Kućma, B. Legutko, B. Szewczyk, K. Novak, P. Znojek, E. Poleszak, M. Papp, A. Pilc, G.Nowak. *J. Neural. Trans.* 115 (2008)1621-1628.
- ³¹ K. Cieřlik, B. Klenk-Majewska , Z. Danilczuk , A. Wróbel, T. Łupina , G. Ossowska. *Pharmacol. Rep.* 59 (2007) 46-52.
- ³² B. Szewczyk, E. Poleszak, P. Wlaz, A. Wrobel, E. Blicharska, A. Cichy, M. Dybala, A. Siwek, L. Pomiermy-Chamiolo, A. Piotrowska, P. Branski, A. Pilc, G. Nowak. *Biol. Psychiatry* 33 (2009) 323–329.
- ³³ M.J. Detke, M. Rickels, I. Lucki. *Psychopharmacol.* 121 (1995) 66-72.
- ³⁴ J.E. Malberg, A.J. Eisch, E.J. Nestler, R.S. Duman. *J. Neurosci* 20 (2000) 9104-9110.

- ³⁵ M. Kruzel, B. Morawiecka. *Acta Biochim. Pol.* 29 (1982) 321-330.
- ³⁶ G.G. Bozzo, K.G. Raghothama, W.C. Plaxton. *Biochem. J.* 377 (2004) 419-428.
- ³⁷ N.M. Urquiza, M.S. Islas, S.T. Ariza, N. Jori, J.J. Martínez Medina, M.J. Lavecchia, L.L. López Tévez, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 64-72.
- ³⁸ B. Pannia Espósito, R. Najjar. *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 137-149.
- ³⁹ U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M.I. Otagiri. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695-704.
- ⁴⁰ P.D. Ross, S. Subramanian. *Biochem.* 20 (1981) 3096-3102.

CAPÍTULO IV. SAL SERTRALINA- CUMARÍN-3 CARBOXILATO

4.1. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los casos la depresión puede estar relacionada con cambios en la neuroquímica de tres monoaminas neurotransmisores, que derivan de aminoácidos como por ejemplo: serotonina, norepinefrina o noradrenalina y dopamina. Como se mencionara, la sertralina es un antidepresivo que pertenece al grupo de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), ya que actúa bloqueando el transportador de serotonina para ingresar este neurotransmisor desde el espacio extracelular hacia la neurona. Consecuentemente a este efecto, se produce un aumento de los niveles de serotonina en el espacio sináptico, restaurando así las anomalías en la neurotransmisión serotoninérgica, el cual estaría relacionado con los efectos antidepresivos del fármaco.¹

Como los ISRS presentan una baja solubilidad en agua, una estrategia para el aumento de solubilidad de la sertralina ha consistido en la formación de sales con malato, citrato, adipato, L-aspartato, tartrato y aniones L-glutamato fundamentado en la capacidad de disolución en agua de este tipo de ácidos orgánicos, como ya se mencionó en el capítulo II. Las sales de sertralina con L-acetato, L-aspartato² y mandelato (Figura 1)³ mostraron una mayor solubilidad en agua y una mayor estabilidad comparada con sertralina.

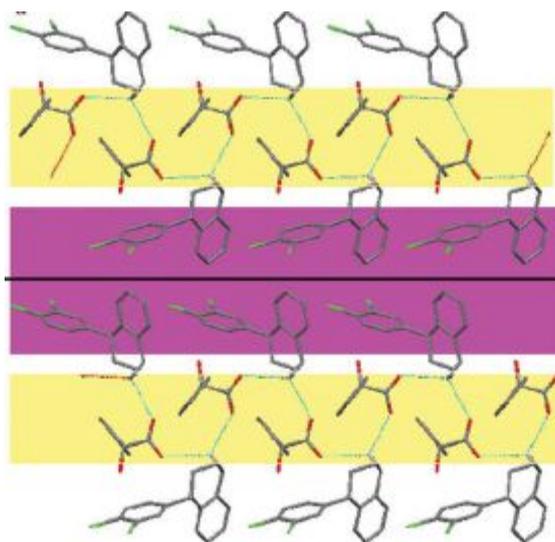


Figura 1. Empaquetamiento en diferentes capas de la sal de ácido mandélico con sertralina. Tomado de He y colaboradores.³

Por otra parte, varias cumarinas de origen natural han sido identificadas a partir de fuentes naturales, especialmente de plantas verdes. Las cumarinas y sus derivados han estimulado la investigación en las áreas de la biología y la medicina, debido a su uso como antibiótico, antioxidante, anticancerígeno^{4,5} y antidepresivo.⁶ Así por ejemplo, existen estudios que demuestran cómo la metástasis espontánea de células tumorales del carcinoma MTLn3 provenientes de mamas de ratas es reducida de manera significativa en los animales tratados con warfarina.⁷ Este mismo derivado de cumarinas es hoy en día, el anticoagulante oral más comúnmente utilizado en todo el mundo, empleado en el tratamiento y prevención de la trombosis venosa profunda, infarto agudo de miocardio y accidente cerebrovascular.⁸ Asimismo, Melagraki y colaboradores prepararon nuevos híbridos de cumarinas y ácido lipoico demostrando que actúan eficientemente como antirradicales HO•.⁹

Otra mención relevante es la actividad antimicrobiana. Se ha demostrado como en dichos compuestos inhibe el homólogo bacteriano de la vitamina K epóxido reductasa (VKOR) en la *E. Coli*.¹⁰

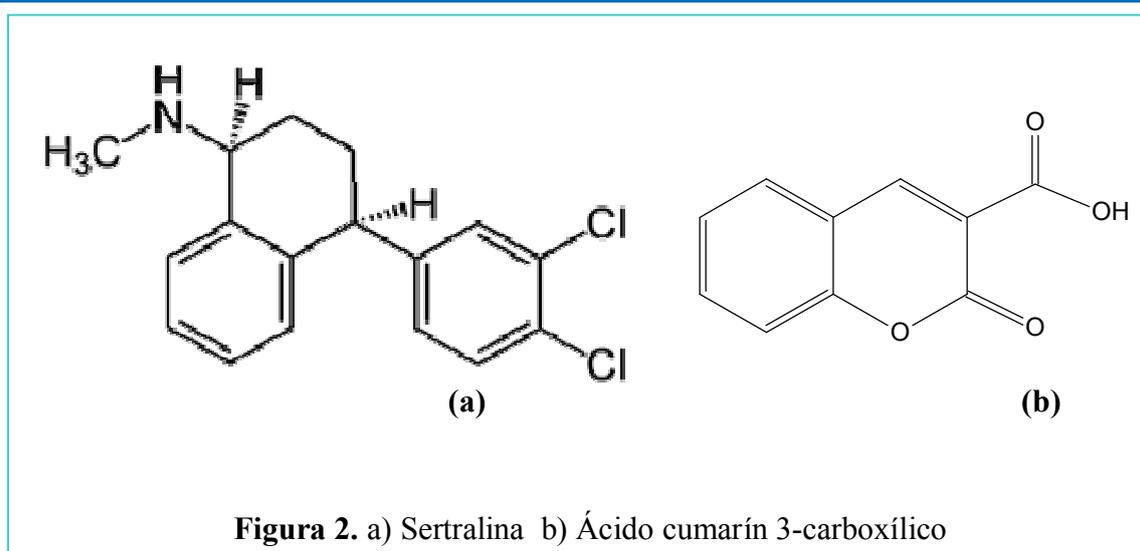
Resulta interesante, entonces, generar una sal formada por dos principios activos: un fármaco antidepresivo junto a una sustancia antioxidante que mejoren la solubilidad del fármaco y al mismo tiempo que sea un buen agente secuestrante de radicales libres.

Sobre la base de lo comentado, se indican los siguientes objetivos para este capítulo.

4.1.1. OBJETIVOS:

Los objetivos de este capítulo fueron:

- 1) Preparar una sal entre sertralina y el anión derivado de cumarín-3 carboxilato con la finalidad de acrecentar aún más la bioactividad demostrada por el fármaco (Figura 2).
- 2) Realizar la caracterización fisicoquímica por medio de los métodos de difracción rayos X y espectroscopía de FTIR
- 3) Determinar la actividad antidepresiva *in vivo* del nuevo compuesto y evaluar si se produce una mejora de la misma.
- 4) Determinar la actividad antimicrobiana
- 5) Determinar la actividad antioxidante



4.2. Preparación de cumarín 3-carboxilato de sertralonio, SerH₂⁺CCA⁻ (C₂₇H₂₂Cl₂NO₄)

Método 1.

La sal cumarín 3-carboxilato de sertralonio se prepara a partir de sertralina básica y del del ácido cumarín 3-carboxílico (HCCA). En un primer paso, 1 mmol de hidrocloreuro de sertralina fue disuelto en 20 ml de agua a 100 °C. A continuación se procede a agregar una solución de hidróxido de sodio 1 M hasta modificar el pH a un valor de 7 y se deja en agitación continua durante al menos 30 minutos. En ese lapso se forma un precipitado blanco, que se deja enfriar a temperatura ambiente (25 °C) y se centrifuga para obtener finalmente la sertralina básica. A posteriori este sólido se lava reiteradas veces con agua bidestilada con la finalidad de asegurar la eliminación de los iones cloruro el cual se comprueba con reacción negativa al agregado a la solución de lavado de AgNO₃.

En un segundo paso se procede a la preparación de soluciones de sertralina básica (por disolución de 1 mmol de dicho compuesto en 20 ml de etanol a 60-70 °C) y de 1 mmol de ácido cumarín 3-carboxílico en 20 ml de etanol. A continuación, la solución del ácido se añade en pequeñas alícuotas a la solución de sertralina bajo agitación continua. La mezcla de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente (25 °C), se filtra con la finalidad de eliminar posibles impurezas y se deja a cristalizar por evaporación del solvente obteniendo de esa manera cristales de SerH₂⁺-CCA⁻ adecuados para el estudio estructural de difracción de rayos X.

Método 2.

Alternativamente, la sertralina-coumarín-3-carboxilato puede ser preparada directamente a partir del hidrocloreuro de sertralina, sin previa preparación de sertralina básica.

En un primer paso, se prepara la sal sódica del CCA (NaCCA), disolviendo 2 mmoles de HCCA en 40 ml de agua a 100 °C y agregando una cantidad equivalente de NaOH. La solución amarilla resultante se enfría a temperatura ambiente (25 °C) y el precipitado blanco formado de NaCCA se filtra por succión en vacío y se lava varias veces con acetona. A continuación, este sólido (2 mmol) se disuelve en una mezcla de 40 ml de etanol y 20 ml de agua (temperatura de ebullición) y luego se mezcla con una solución etanólica de hidrocloreuro de sertralina (2 mmol en 40 ml) en ebullición. Los cristales de $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ fueron obtenidos por evaporación lenta de la solución a temperatura ambiente (25 °C).

La identificación del compuesto se lleva a cabo por espectroscopía FTIR (ver debajo) donde se confirma que se obtiene el mismo compuesto con ambos métodos de síntesis.

4.3. Caracterización fisicoquímica

4.3.1. Caracterización de la estructura mediante difracción de rayos X.

La Figura 3 muestra un dibujo mediante el programa ORTEP¹¹ de la sal mientras que los datos estructurales y las correspondientes distancias intramoleculares de enlace y ángulos se indican en la Tabla 1 y 2, respectivamente.

La molécula del fármaco sertralina, se encuentra en el sólido en su forma catiónica, protonada en el grupo amino, esto es (1*S*,4*S*)-4-(3,4-diclorofenil)-*N*-metil-1,2,3,4-tetrahidro naftalen-1-amonio (SerH_2^+). La contraparte aniónica corresponde al ácido coumarín 3-carboxílico, el cual aparece desprotonado en su grupo carboxílico, es decir, 2-oxo-2H-1-benzopirán-3-carboxilato (CCA^-).

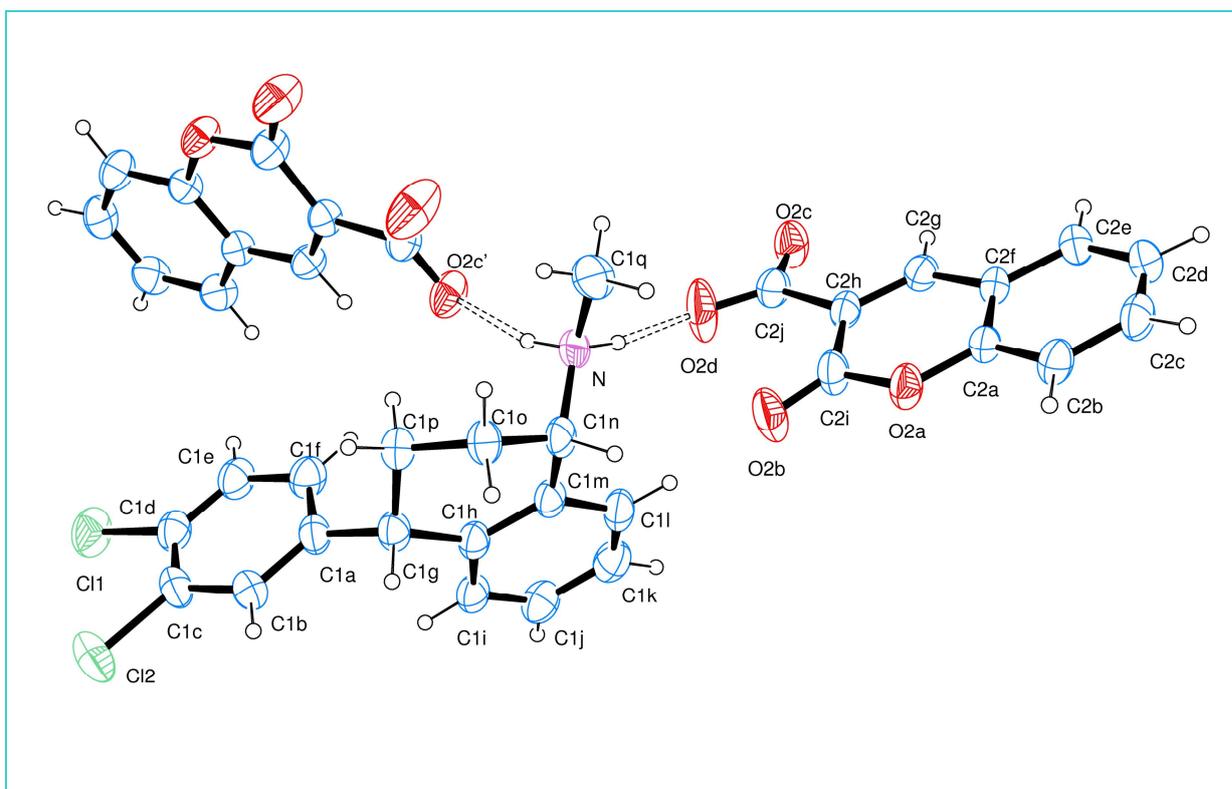


Figura 3. Dibujo de $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ en estado sólido mostrando el rotulado de los átomos no-H y sus elipsoides de desplazamiento al nivel del 30% de probabilidad. Los enlaces de inter-moleculares de H se indican con las líneas punteadas. Las moléculas de CCA^- con indicación de átomos se relaciona con la operación de simetría $-x, y-1/2, 2-z$.

Tabla 1. Resultados de los datos y refinamiento de la estructura del cristal de SerH₂⁺CCA⁻.

Fórmula empírica	C ₂₇ H ₂₂ Cl ₂ NO ₄
Peso molecular	496.36
Temperatura	295(2) K
Longitud de onda	1.54184 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Dimensiones de celda unidad	a = 11.4045(6) Å b = 8.1812(5) Å c = 12.7394(5) Å β = 91.792(4)°
Volumen	1188.0(1) Å ³
Z Densidad (calculada)	2, 1.388 Mg/m ³
Coefficiente de Absorción	2.746 mm ⁻¹
F(000)	516
Tamaño del cristal	0.278 x 0.134 x 0.042 mm ³
Rango-Θ de recolección de datos	3.47 to 70.99°
Rango de índices de Miller	-13 ≤ h ≤ 12, -9 ≤ k ≤ 9, -15 ≤ l ≤ 15
Reflexiones colectadas	4964
Reflexiones independientes	3314 [R(int) = 0.0289]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	2651
Completud hasta Θ = 70.99°	99.6 %
Método de refinamiento	Cuadrados mínimos, matriz completa en F ²
Datos/restricciones/parámetros	3314/3/316
Bondad de ajuste en F ²	1.040
Índices R Finales ^a [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0731, wR2 = 0.2067
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0853, wR2 = 0.2298
Parámetro de la estructura absoluta	0.04(4)
Mayor diferencia pico y hueco	1.047 and -0.363 e.Å ⁻³

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

Tabla 2. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] de (SerH₂⁺)CCA⁻

C(1A)-C(1B)	1.354(8)	C(1J)-C(1I)-C(1H)	121.8(6)
C(1A)-C(1F)	1.411(9)	C(1K)-C(1J)-C(1I)	119.5(7)
C(1A)-C(1G)	1.508(7)	C(1J)-C(1K)-C(1L)	120.6(7)
C(1B)-C(1C)	1.447(8)	C(1K)-C(1L)-C(1M)	121.0(6)
C(1C)-C(1D)	1.35(1)	C(1L)-C(1M)-C(1H)	119.0(6)
C(1C)-Cl(2)	1.725(6)	C(1L)-C(1M)-C(1N)	118.6(5)
C(1D)-C(1E)	1.338(9)	C(1H)-C(1M)-C(1N)	122.4(6)
C(1D)-Cl(1)	1.745(6)	N-C(1N)-C(1M)	108.5(5)
C(1E)-C(1F)	1.419(8)	N-C(1N)-C(1O)	113.2(5)
C(1G)-C(1H)	1.515(9)	C(1M)-C(1N)-C(1O)	112.5(5)
C(1G)-C(1P)	1.523(8)	C(1P)-C(1O)-C(1N)	111.6(6)
C(1H)-C(1I)	1.394(8)	C(1O)-C(1P)-C(1G)	110.9(5)
C(1H)-C(1M)	1.400(7)	C(1N)-N-C(1Q)	115.3(6)
C(1I)-C(1J)	1.38(1)	O(2A)-C(2A)-C(2B)	117.8(5)
C(1J)-C(1K)	1.37(1)	O(2A)-C(2A)-C(2F)	121.0(4)
C(1K)-C(1L)	1.36(1)	C(2B)-C(2A)-C(2F)	121.2(5)
C(1L)-C(1M)	1.41(1)	C(2C)-C(2B)-C(2A)	119.3(6)
C(1M)-C(1N)	1.517(9)	C(2D)-C(2C)-C(2B)	120.0(6)
C(1N)-N	1.490(8)	C(2C)-C(2D)-C(2E)	121.9(6)
C(1N)-C(1O)	1.52(1)	C(2D)-C(2E)-C(2F)	119.2(6)
C(1O)-C(1P)	1.517(7)	C(2A)-C(2F)-C(2E)	118.2(5)
C(1Q)-N	1.513(9)	C(2A)-C(2F)-C(2G)	117.2(5)
C(2A)-O(2A)	1.360(6)	C(2E)-C(2F)-C(2G)	124.6(5)
C(2A)-C(2B)	1.377(8)	C(2H)-C(2G)-C(2F)	122.6(5)
C(2A)-C(2F)	1.394(8)	C(2G)-C(2H)-C(2I)	120.1(5)
C(2B)-C(2C)	1.386(9)	C(2G)-C(2H)-C(2J)	119.1(5)
C(2C)-C(2D)	1.35(1)	C(2I)-C(2H)-C(2J)	120.9(5)
C(2D)-C(2E)	1.377(9)	O(2B)-C(2I)-O(2A)	115.5(5)
C(2E)-C(2F)	1.407(7)	O(2B)-C(2I)-C(2H)	128.5(5)
C(2F)-C(2G)	1.430(7)	O(2A)-C(2I)-C(2H)	116.0(5)
C(2G)-C(2H)	1.333(8)	O(2D)-C(2J)-O(2C)	124.8(5)
C(2H)-C(2I)	1.465(9)	O(2D)-C(2J)-C(2H)	118.6(6)
C(2H)-C(2J)	1.533(7)	O(2C)-C(2J)-C(2H)	116.3(5)
C(2I)-O(2B)	1.190(7)	C(2A)-O(2A)-C(2I)	123.0(4)
C(2I)-O(2A)	1.398(6)		
C(2J)-O(2D)	1.218(8)		
C(2J)-O(2C)	1.225(8)		
C(1B)-C(1A)-C(1F)	118.9(6)		
C(1B)-C(1A)-C(1G)	122.3(6)		
C(1F)-C(1A)-C(1G)	118.8(5)		
C(1A)-C(1B)-C(1C)	120.0(6)		
C(1D)-C(1C)-C(1B)	119.4(5)		
C(1D)-C(1C)-Cl(2)	124.1(5)		
C(1B)-C(1C)-Cl(2)	116.5(5)		
C(1C)-C(1D)-C(1E)	122.0(6)		
C(1C)-C(1D)-Cl(1)	118.9(5)		
C(1E)-C(1D)-Cl(1)	119.0(5)		
C(1D)-C(1E)-C(1F)	119.8(6)		
C(1A)-C(1F)-C(1E)	119.8(6)		
C(1A)-C(1G)-C(1H)	112.4(5)		
C(1A)-C(1G)-C(1P)	111.4(5)		
C(1H)-C(1G)-C(1P)	110.8(5)		
C(1I)-C(1H)-C(1M)	118.1(5)		
C(1I)-C(1H)-C(1G)	119.9(5)		
C(1M)-C(1H)-C(1G)	122.0(6)		

Debido a la deslocalización extendida de los orbitales moleculares π , los grupos fenilo y diclorofenilo de SerH_2^+ son planares (desviación *rms* de átomos excepto los de H del mejor plano de cuadrados mínimos en 0.008 y 0.023 Å, respectivamente). Los planos a su vez subtienden un ángulo diedro de 73,7 (1) ° entre sí. Debido a la misma razón, los anillos fusionados de CCA^- son planares (desviación *rms* de los átomos a un mejor plano de cuadrados mínimos de 0,0362 Å). El grupo carboxilato se aparta ligeramente del plano (un ángulo de 12,9 (7) °).

Las distancias de enlace intra-moleculares y los ángulos en el interior de SerH_2^+ y en $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ están de acuerdo con valores informados previamente para polimorfos de hidrocloreuro de sertralina y otras sales de SerH_2^+ .^{12,13} Aunque la conformación de SerH_2^+ está estrechamente relacionada con lo observado por Ravikumar y colaboradores¹⁴, difiere sin embargo significativamente en comparación con los otros compuestos mencionados. Esta podría estar relacionado con la libertad de rotación de SerH_2^+ alrededor del enlace σ -CC que une el grupo diclorofenilo y los anillos del naftaleno y también alrededor del enlace σ -C (naftaleno)-N. Como era de esperar, las mayores diferencias de las longitudes de enlace de SerH_2^+ en comparación con sertralina neutra¹⁵ muestran un alargamiento de las distancias de enlace C(naftaleno)-N y N-CH₃ (de 0,021 Å y 0,059 Å, respectivamente) tras la protonación en el grupo amino.

Las distancias de enlace y ángulos dentro del anión CCA^- están en concordancia con los valores reportados en otras sales de la cumarina y, difieren solamente en el ángulo diedro subtendido por el grupo $-\text{COO}^-$ con el plano de los anillos fusionados.^{16,17} Las principales diferencias en las distancias de enlace de CCA^- cuando se compara con cumarina neutra¹⁸ se producen debido al cambio de estructura del enlace en el grupo carboxílico producida por su desprotonación desde valores estrictamente de doble enlace C=O y simple enlace C-OH (longitudes de 1.214 y 1.330 Å) en la cumarina neutra hasta la formación del anión con dos enlaces σ CO localizados, más un enlace π deslocalizado en el grupo carboxilato- COO^- de CCA^- (distancias de enlace C-O de 1.219 y 1.224 Å).

Como se muestra en la Figura 3, la sal cristalina se estabiliza adicionalmente por fuertes enlaces intermoleculares de H (lineales) que implican al grupo amino NH_2^+ de la entidad SerH_2^+ como grupo donante y a los átomos de oxígeno del grupo carboxilato $-\text{COO}^-$ de los dos aniones CCA^- vecinos, relacionados simétricamente [distancias de enlace N...O de 2.712 (6) y 2.759 (9) Å, y el correspondiente ángulo de enlace de N-

H...O de 170° (7) y 161° (7)]. La unión N-HN.....O ocurre cerca del único par de orbitales del oxígeno].

4.3.2. Caracterización por espectroscopía FTIR

Como venimos realizando para los compuestos en estudio, se procede al análisis de sus espectros de infrarrojo. Los datos obtenidos en el estudio teórico y experimental realizado para el fármaco de sertralina del primer capítulo de la tesis han servido de guía y referencia en las posteriores asignaciones. En particular en este capítulo, se procedió a la síntesis de la sal K^+CCA^- con fines comparativos.

Los espectros experimentales de la sal de potasio del ácido cumarín-3-carboxílico, del hidrocloreto de sertralina y de la sal preparada $SerH_2^+CCA^-$ se muestran en la Figura 4. Las bandas relacionadas a los modos vibracionales más representativos de las moléculas y sus correspondientes asignaciones de los valores de las frecuencias de las bandas se dan en la Tabla 3. Las asignaciones se realizaron teniendo en cuenta las interpretaciones previas mencionadas de los espectros de vibración de $SerH_2^+Cl^-$ ¹⁹ y del ácido cumarín-3-carboxílico.²⁰

Como era de esperar, el espectro FTIR del de la sal $SerH_2^+CCA^-$ incluye la contribución de ambos espectros de los componentes de CCA^- y $SerH_2^+$. Las principales bandas debido a $SerH_2^+$ son las que implican los modos de vibración del grupo NH_2 , ubicadas a 1640 cm^{-1} , 1467 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} y 1136 cm^{-1} . Además, la banda correspondiente al modo de estiramiento del grupo carbonilo se encuentra en la misma posición tanto para K^+CCA^- y el la sal $SerH_2^+CCA^-$ indicando la falta de participación de este grupo en algún tipo de interacción en la formación del cristal. Por otra parte, pero los modos de estiramiento simétrico y anti-simétrico típicos de la desprotonación del grupo carboxilato y su posterior formación en anión mostraron un corrimiento hacia menores valores de frecuencia en comparación con la sal de potasio de al menos 30 cm^{-1} .

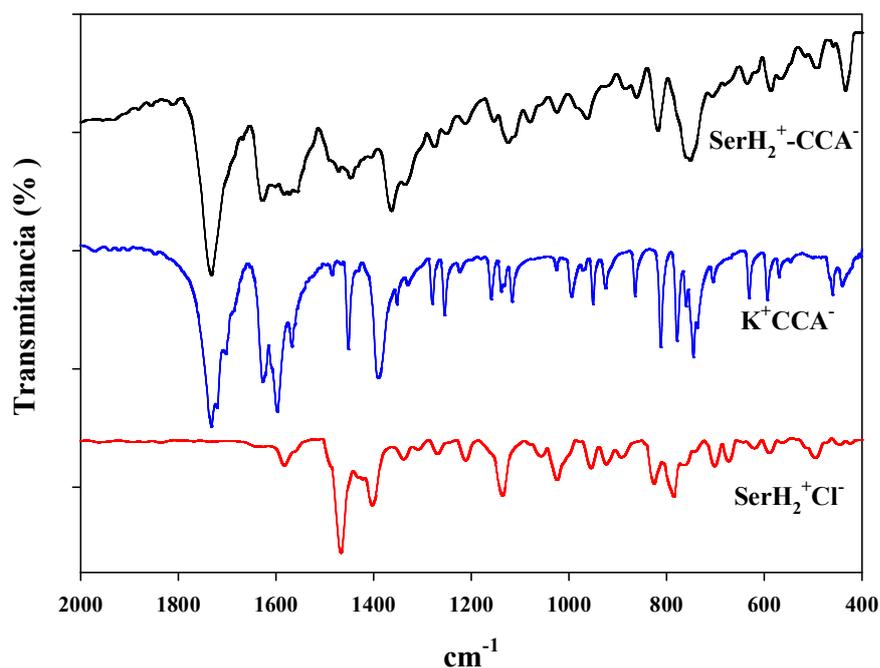


Figura 4. Espectro FTIR del hidrocloreto de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$), la sal de potasio del ácido coumarín-3-carboxílico y la sal $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$.

Como se mostró anteriormente, la conformación de la estructura de la sal muestra una fuerte estabilización estructural proveniente de enlaces intermoleculares $(\text{Ser})>\text{NH}_2^+\dots-\text{OOC}^-$ (CCA) que provocan un debilitamiento del orden de enlace en el grupo COO^- con la concomitante disminución de las frecuencias de estiramiento. La formación de enlaces H también pueden ser observado en los espectros FTIR de $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ y la sal cristalina $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ en la región de $3200\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ con la presencia de una banda ancha y fuerte (Figura 5).

Tabla 3. Números de onda seleccionadas (cm^{-1}) de FTIR de K^+CCA^- , $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ y $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$.

Asignación tentativa	K^+CCA^-	$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$	Asignación tentativa	$\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$
$\nu(\text{C}=\text{O})$ carbonilo	1732 (f) 1721 (h) 1704 (h)			1732 (f) 1702 (h)
$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{CCH})$	1626 (f)	1640 (m) 1626 (m)	NH_2 tijeras $\nu(\text{C}=\text{C})$ (PhCl)	1640 (h) 1628 (m), 1608 (m),
$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ $\nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{CCH})$	1599 (mf) 1569 (m) 1616 (mf) 1569 (f)	1583 (m) 1515 (d)	$\nu(\text{C}=\text{C})$ (Ph) (PhCl), CH_2 tijeras $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	1558 (m) 1585 (m) 1573 (m)
$\delta(\text{CH})$ ciclo	1451 (m)	1467 (mf) 1433 (f)	$\omega(\text{CH}_2)$, $\delta_s(\text{CH}_3)$ $\omega(\text{NH}_2)$, $\delta(\text{CH})$ ciclo	1473 (m) 1448 (m)
$\nu_s(\text{COO}^-)$ (f)	1390 (f)	1337 (m)	$\rho(\text{CH}_3)$, $\tau(\text{NH}_2)$, $\delta(\text{CH})$ ciclo $\tau(\text{CH}_2)$	1365 (f) 1337 (m)
$\delta(\text{CCH}) + \nu(\text{C}-\text{O}_{\text{lac}})$ $\delta(\text{CCH})$	1158 (m) 1137 (m) 1116 (m)	1136 (f)	$\delta(\text{CCH})$ ip (PhCl, Ph), $\delta(\text{CCH})$ ciclo, $\tau(\text{CH}_2)$, $\tau(\text{NH}_2)$	1156 (d) 1136 (h) 1125(m) 1115(h)

En negrita: modos que implican las vibraciones NH_2 ; mf, muy fuerte; f, fuerte; m, medio; d, débil; h, hombro, ν , estiramiento; δ , flexión; ρ , balanceo; τ , torsión.

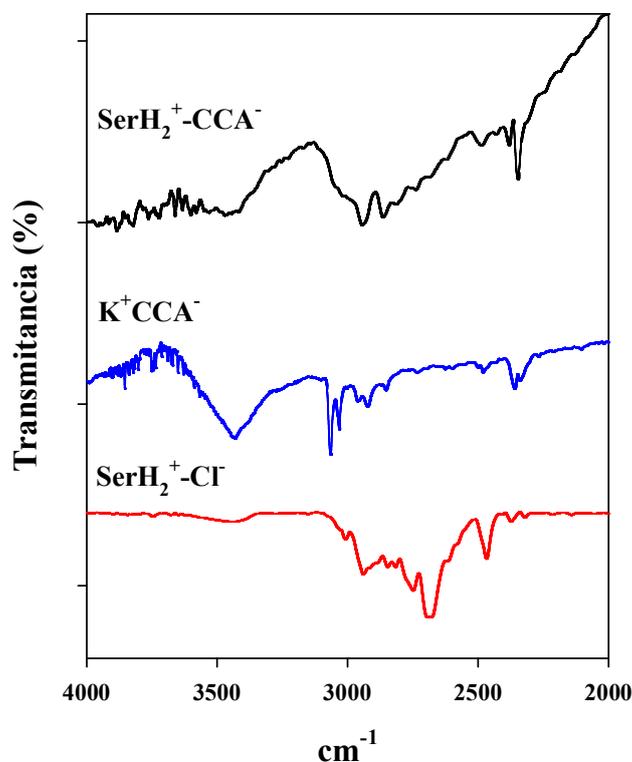


Figura 5. Espectros de FTIR para hidrocloreto de sertralina (SerH₂⁺Cl⁻), la sal de potasio del ácido cumarín 3-carboxilato, y su sal (SerH₂⁺CCA⁻) que muestran la formación de enlaces de H en la región de 4000-2000 cm⁻¹.

4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.4.1. Actividad antidepresiva.

4.4.1.1. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test)

Con la finalidad de comprobar la potencial eficiencia de la sal como agente antidepresivo, se somete el compuesto a la prueba de natación forzada y se muestra siempre su comparación con el efecto del fármaco sertralina y con la sal de sodio del ácido cumarín-3-carboxílico, con la finalidad de cotejar que el efecto que demuestre la sal preparada sea intrínseco de su naturaleza química y que no provenga de los ligandos utilizados. Se utiliza la sal de sodio en vez de la de potasio para evitar eventuales efectos cardiovasculares que la presencia de este ion pudiera ocasionar sobre las ratas durante los ensayos.

De acuerdo con los datos observados, el hidrocloreuro de sertralina disminuye el tiempo de inmovilidad y aumenta el de natación, indicando así un efecto antidepresivo. La administración de la sal de sodio NaCCA no tuvo ningún efecto significativo sobre la PNF (Figura 6). Sin embargo, el tratamiento con $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ disminuye el tiempo de inmovilidad y provoca un aumento en la conducta de nadar en una magnitud que supera a los efectos individuales producidos por $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$.

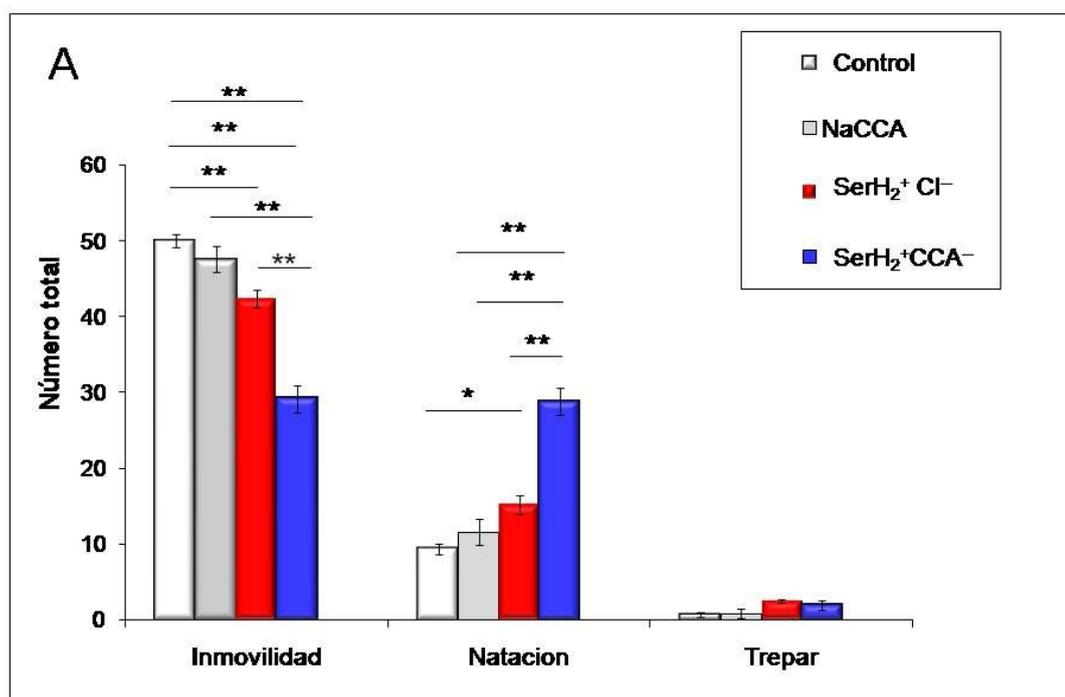


Figura 6. Efecto del hidrocloreuro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$), la sal sódica del CCA (NaCCA) y la sal sertralina- cumarin-3 carboxilato ($\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$) en la prueba de natación forzada.

Los valores representan la media (\pm SEM) de las conductas de inmovilidad, la natación y trepar. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $n = 6$ ratas por grupo. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

4.4.1.2. Prueba de campo abierto (PCA)

Los efectos de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora espontánea en ratas son mostrados en la Figura 7. Ninguno de estos tratamientos modificó estos niveles de actividad, lo que confirma la especificidad de los resultados en la PNF.

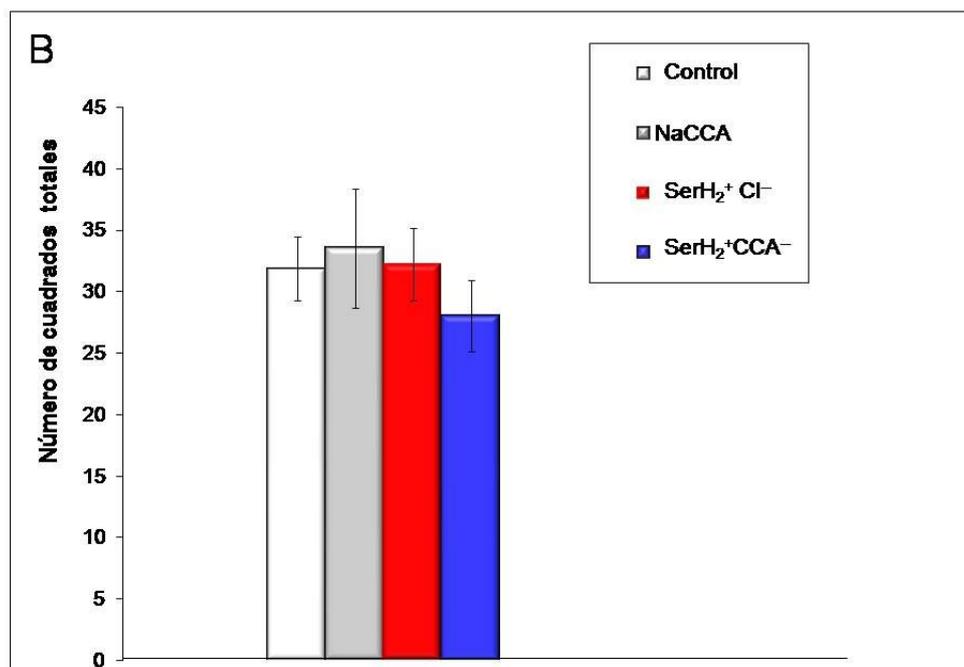


Figura 7. Efecto del hidrocloruro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$), la sal sódica del CCA (NaCCA) y su sal sertralina-cumarin-3 carboxilato ($\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$) en la prueba de campo abierto. Los valores representan la media (\pm SEM) de la cantidad de cuadrados, $n = 6$ ratas por grupo. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

4.5. Actividad antimicrobiana

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque la curación y control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto, en el que estas afecciones ocupan el primer lugar entre las causas de muerte. La actividad de un agente antimicrobiano frente a una

bacteria depende primeramente de su capacidad para atravesar la pared bacteriana, paso necesario para acceder a su punto de acción. Dicha capacidad está en relación con su naturaleza fisicoquímica y con la estructura de la barrera que ha de franquear. La pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas no es idéntica; la pared de las grampositivas es más permeable a los antibióticos que la de las gramnegativas.

Como destacamos en la introducción de este capítulo, existe en la literatura una gran cantidad de trabajos que destacan el uso de las cumarinas y sus derivados como agentes antimicrobianos considerando además que existen datos para sertralina, nos pareció entonces sumamente interesante probar experimentalmente si nuestro nuevo compuesto $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ sería capaz de presentar actividad antimicrobiana.

Como se mencionara en el capítulo de materiales y métodos, se emplearon cepas derivadas de cultivos de colección tipo americano (American Type Culture Collections-ATCC). Se determinaron las CIM de los compuestos frente a **Bacterias** (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1263, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y **Hongos** (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* de aislamiento clínico).

En las condiciones de trabajo utilizadas se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 4.

Teniendo en cuenta que la actividad antibacteriana resulta significativa cuando los valores de CIM son 100 $\mu\text{g/mL}$ o menores, moderada en el rango de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, débil entre 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ inactiva para 1000 $\mu\text{g/mL}$ ²¹

Tabla 4. Ensayos antimicrobianos para $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$, HCCA y $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$. Valores de CIM en $\mu\text{g/mL}$.

	$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$	HCCA	$\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$
<i>E. coli</i>	24	>1500	94
<i>P. aeruginosa</i>	750	1500	750
<i>E. faecalis</i>	24	1500	48
<i>S. aureus</i>	24	1500	48
<i>S. epidermidis</i>	24	1500	48
<i>C. albicans</i>	6	>1500	24
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12	>1500	24
<i>C. parapsilosis</i>	12	>1500	24
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	6	>1500	24
<i>C. krusei</i>	3	>1500	12
<i>C. glabrata</i>	3	>1500	12
<i>C. tropicalis</i>	6	>1500	24

Lo primero que nos llama la atención es la evidencia experimental que el ácido coumarín 3-carboxílico (HCCA) no presenta actividad antimicrobiana como se podría haber esperado en función de este tipo de actividades mencionadas para las cumarinas en general. Por el contrario tanto $\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ como la sal $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ presentan actividad antimicrobiana frente a todas las cepas ensayadas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre cuando se determina la actividad antidepressiva, la presencia del anión CCA^- en la sal no contribuye a la mejora del efecto que el hidrocloreuro de sertralina presenta en forma individual. Aunque los valores obtenidos son muy buenos en ambos casos, los valores de la sal resultaron ser comparables en algunos casos con los del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ y algo mayores en otros.

Como ya fue mencionado en el capítulo II, los resultados obtenidos para sertralina refieren a un efecto antimicrobiano para un grupo amplio de microorganismos,

principalmente con un mayor efecto frente a los Gram positivos²² y cepas de *Candidas*.²³

Por otro lado la falta de efecto antimicrobiano del ácido cumarín 3-carboxílico encontrada en este estudio también ha sido publicada. Sin embargo, esta actividad se incrementó cuando el anión forma complejos de coordinación en especial con Ag(I) ²⁴ como fue reportado en la introducción de este trabajo.

En consecuencia es probable esperar que la nueva sal formada no produzca efectos en la mejora de la capacidad antimicrobiana del fármaco sertralina. Sin embargo, esta actividad se mantiene igual o levemente inferior por formación de la sal.

Asimismo, en términos generales se observa que ambos compuestos resultan tener un mayor efecto antimicrobiano frente a las bacterias Gram(+) que las Gram(-) (que generalmente son más resistentes por presentar una doble membrana y ofrecer mayor resistencia a las drogas y antibióticos).

4.6. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (ASB).

Los estudios concernientes a la interacción y su potencial transporte por la albúmina sérica fueron realizados también para el ácido cumarín 3-carboxílico como para su sal de sertralonio ($\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$) preparada en esta tesis. Como habíamos mencionado en el capítulo anterior, resulta necesario realizar las determinaciones a 37 °C (310K) y en un tiempo promedio de 8 h para asegurar la formación de complejos con la albúmina en base a los estudios farmacocinéticas perpetrados para sertralina. Las determinaciones fueron realizadas también luego de 2 h de interacción con fines comparativos. El rango de concentraciones utilizadas fue de 2-100 μM debido a que a mayores concentraciones se producen otros tipos de efectos que están fuera del alcance de la discusión.

Para el análisis de la interacción se utilizó la ecuación de Stern Volmer (1) y también la expresión que nos permite calcular la constante de unión aparente y en número de sitios de unión (2) que vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$F^0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

$$\log [(F^0-F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

donde K_{sv} es la constante de Stern Volmer, K_b es la constante de unión aparente, y n es el número de los sitios de unión.

En la Figura 8 se muestran las gráficas realizadas para HCCA y SerH₂⁺CCA⁻ en base a la desactivación de la fluorescencia de la albúmina para cada uno de ellos en el rango de concentración medido.

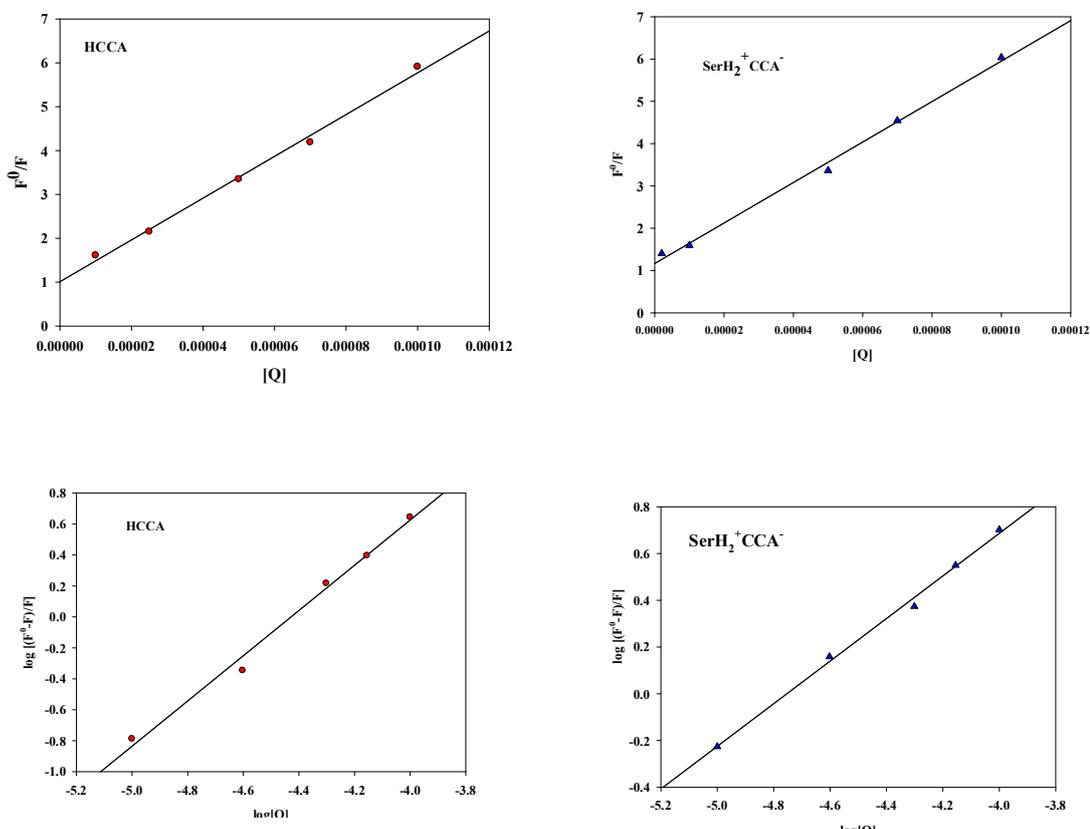


Figura 8. Representación para los sistemas HCCA-ASB y SerH₂⁺CCA⁻-ASB de la ecuación de Stern Volmer (1) (parte superior) y de la ecuación (2) (parte inferior). T=37 °C, tiempo= 8 h.

Como se mencionara, generalmente las K_{sv} obtenidas de *quenching* estático son mayores que las del colisional. Entonces, comparando la K_{sv} obtenida con un valor estimado de K_{sv} usando una K_q (constante cinética de reacción) controlada por difusión se puede tener una idea primaria del tipo de *quenching*.

Como se mencionó en el capítulo II, la constante de velocidad de *quenching* K_q se determinó mediante la ecuación $K_q = K_{sv}/\tau_0$ ($\tau_0 = 10^{-8}$ s, para ASB) y se consideró que si se obtiene un valor mayor a $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, el mecanismo de interacción resulta por formación de complejo y en caso contrario es un *quenching* colisional.²⁵

De las representaciones presentadas surgen los datos que se presentan en la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Constantes de *quenching* Stern Volmer, constantes biomoleculares de *quenching* (K_q) y constantes de unión aparente K_b y sitios de unión “n” los sistemas HCCA-ASB y $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ -ASB a 310 K y pH=7,4 con fines comparativos se agrega el efecto del hidrocloreuro de setralina.

Sistema	$K_{sv} (\text{M}^{-1}) \pm \text{DS}$	* $K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_b (\text{M}^{-1}) \pm \text{DS}$	n $\pm \text{DS}$.	** R^2
2 h de incubación					
HCCA-ASB	$5,23 \times 10^4 \pm 0,06$	$5,23 \times 10^{12} \pm 0,06$	$2,95 \times 10^6 \pm 0,18$	$1,46 \pm 0,03$	0,998
$\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ -ASB	$4,79 \times 10^4 \pm 0,04$	$4,79 \times 10^{12} \pm 0,04$	$2,29 \times 10^4 \pm 0,20$	$0,91 \pm 0,05$	0,997
$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ -ASB	$6,48 \times 10^3 \pm 0,10$	$6,48 \times 10^{11} \pm 0,10$	$173,8 \pm 1,23$	$0,57 \pm 0,01$	0,978
8 h de incubación					
HCCA-ASB	$4,53 \times 10^4 \pm 0,10$	$4,53 \times 10^{12} \pm 0,10$	$3,80 \times 10^7 \pm 0,21$	$1,73 \pm 0,03$	0,999
$\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ -ASB	$4,05 \times 10^4 \pm 0,08$	$4,05 \times 10^{12} \pm 0,08$	$1,09 \times 10^4 \pm 0,17$	$0,85 \pm 0,05$	0,998
$\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$ -ASB	$2,03 \times 10^3 \pm 0,02$	$2,03 \times 10^{11} \pm 0,02$	$4,27 \times 10^3 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,03$	0,992

* K_q : valores calculados con la finalidad de descartar el proceso de “quenching dinámico”

** R^2 , coeficiente de correlación de los valores de las constantes. DS: desviación estándar.

De las representaciones de las curvas de Stern Volmer que indican una correlación lineal para concentraciones inferiores a 100 μM se infiere que habría un evidente carácter de *quenching* estático en ese rango de concentraciones.

Si comparamos entonces las constantes de *quenching* de colisión calculadas con la K_q , de diversos inactivadores, puede observarse que las constantes de velocidad de *quenching* de la albúmina iniciados por HCCA y $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ son mayores que el K_q para el mecanismo de dispersión o colisional. Esto implica que en ambos casos el *quenching* se origina en la formación de un complejo entre el compuesto y la albúmina.

Como fue mencionado anteriormente, la naturaleza de estas interacciones puede ser de tipo electrostático, por puente de hidrógeno, puente salino o de tipo van der Waals; el proceso, que generalmente es reversible, tiene unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M^{-1} .²⁶ Por tanto, si analizamos los valores obtenidos para las constantes

de “binding” de los compuestos en estudio puede visualizarse que ambos presentan valores que implican que pueden ser transportados de manera reversible por albúmina.

Sobre la base de lo mencionado para sertralina, si analizamos las diferencias obtenidas en los valores de las constantes entre las dos y ocho horas de incubación para ambos compuestos, sólo para el ácido cumarín 3-carboxílico se nota una mejora en la interacción con el aumento en un orden de magnitud del valor de la constante. No ocurre lo mismo para $\text{SerH}_2^+\text{-CCA}^-$ donde el aumento del tiempo de incubación no produce una mejora sustancial desde el punto de vista del valor de la constante obtenida.

Esto se ve también reflejado en los valores encontrados para los sitios de unión donde podría considerarse que el tiempo de interacción mejora la posibilidad del ácido en unirse por otro sitio específico a la proteína mientras que no se producen cambios para la sal de $\text{SerH}_2^+\text{-CCA}^-$.

Sin embargo, en términos generales el reemplazo del anión cloruro en el hidrocloreto de sertralina por el cumarín-3-carboxilato, mejora sustancialmente la capacidad de unión a la albúmina de la sertralina (ver capítulo II) como puede verse en la Tabla 5. Es decir, que pudimos comprobar que la formación de sales del catión sertralonio con aniones derivados de ácidos carboxílicos no sólo puede mejorar solubilidades y estabildades del fármaco,^{3,4} sino también puede producir mejoras en el transporte del fármaco en los sistemas biológicos.

4.7. CONCLUSIONES

Como se había mencionado inicialmente, con la finalidad de aumentar aún más la bioactividad demostrada por la sertralina farmacéutica, se preparó su sal con un compuesto biológicamente activo, denominado ácido coumarín-3 carboxílico.

Los métodos de difracción rayos X y de espectroscopía de FTIR permitieron la determinación de la estructura de $\text{SerH}_2^+\text{CCA}^-$ y mostraron cómo la presencia de fuertes enlaces de H entre el grupo amino proveniente de la entidad SerH_2^+ y el grupo carboxilato (anión CCA^-) son capaces de producir un efecto de fuerte estabilización en el enrejado del cristal.

La determinación de la actividad antidepresiva, permitió mostrar cómo los efectos conductuales producidos en la prueba de natación forzada en ratas Wistar macho confirma que la nueva sal posee propiedades antidepresivas superiores a las de la sertralina *per se*. Asimismo se determinó que a pesar que el ácido cumarín-3-carboxílico

no presenta de forma aislada ningún efecto, su presencia en la formación de la sal probablemente derivado de la fuerte interacción con la sertralina, la cual aparentemente permanece y prevalece aún en solución, presenta un marcado efecto sinérgico de potenciación de la actividad dando lugar a una alta probabilidad de que la nueva sal pueda ser evaluada como un nuevo fármaco antidepresivo. Adicionalmente, la determinación del efecto antimicrobiano indica que los compuestos ensayados poseen una relevante actividad debido a las concentraciones que se necesitan para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Los análisis de los datos de fluorescencia realizados sobre HCCA y $\text{SerH}_2^+ \text{-CCA}^-$ dan cuenta de valores de constantes de unión (K_b) del orden de 10^4 - 10^5 M^{-1} los cuales hacen referencia a una unión del tipo reversible e indican además la presencia de un sitio específico de unión a las dos horas de interacción. El tiempo de interacción de 8 horas mejora la complejación del ácido cumarín 3-carboxílico aumentando el valor de la constante y del sitio de unión pero no se produce el mismo efecto sobre la sal. Por lo tanto, se puede suponer que ambos compuestos pueden ser estables en sistemas biológicos y pueden ser transportados por la albúmina.

4.8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ D. Chancellor, Nat. Rev. Drug Discov. 809 (2011) 9-10.
- ² E.M. Tanya, C.W. Juratolo, H.L. Friedman, R.M. Chanker, S.M. Herbig, D.T. Friesen, J.B. West, Patent: WO 1999001121 A1.
- ³ Q. He, S. Rohani, J. Zhu, H. Goma, Chirality 24 (2012) 119-128.
- ⁴ I. Kostova, Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents 5 (2005) 29-46.
- ⁵ I.K. Georgieva, T. Mihaylov, N. Trendafilova, J. Inorg. Biochem. 135 (2014) 100-112.
- ⁶ K.V. Sashidhara, R.K. Modukuri, S. Singh, K.B. Rao, G.A. Teja, S. Gupta, S. Shukla Bioorg. Med. Chem. Lett. 25 (2014) 337-341.
- ⁷ P. McCulloch, W.D. George, Br. J. Cancer 59 (1989) 179-183.
- ⁸ N. Au, A.E. Rettie, Drug Metab. Rev. 40 (2008) 355-375.
- ⁹ G. Melagraki, A. Afantitis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Detsi, M. Koufaki, C. Kontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina. Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 3020-3026.
- ¹⁰ C. Kontogiorgis, A. Detsi, D. Hadjipavlou-Litina. Expert Opin. Ther. Pat. 22 (2012) 437-454.
- ¹¹ C. K. Johnson, *ORTEP-II. A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program*. Report ORNL-5318, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, 1976.
- ¹² Q. He, S. Rohani, J. Zhu, H. Goma. Chirality 24 (2012) 119-128.
- ¹³ O. Almarsson, M.B. Hickey, M.L. Peterson, S.L. Morissette, S. Soukasene, C. McNulty, M. Tawa, J.M. MacPhee, J.F. Remenar, Cryst. Growth Des. 3 (2003) 927-933.

- ¹⁴ K. Ravikumar, B.Sridhar, M.N. Bhanu. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* 62 (2006) o565-o567.
- ¹⁵ Q.He, S.Rohani, J.Zhu, H. Gomaa, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 1633-1645.
- ¹⁶ A.D.Yan, G.O.Delori, B.Lloyd, T. Patel, G. Friic, M.Day, D.K.Buar, W Jones, J. Lu, M. Wei, D.G.Evans, X. Duan, *Cryst. Eng. Comm.* 14 (2012) 5121-5123.
- ¹⁷ U.K.Das, V.G.Puranik, P.Dastidar, *Cryst. Growth Des.* 12 (2012) 5864-5868.
- ¹⁸ J.A.K.Howard,; M.F.Mahon, P.R.Raithby,; H.A. Sparkes, *Acta Crystallogr., Sect.B: Struct. Sci.* 65 (2009) 230-237.
- ¹⁹ G.E. Escudero, V. Ferraresi Curotto, C.H Laino, R. Pis Diez,; P.A.M. Williams, E.G.Ferrer, *Spectrochim. Acta Part A* 2013, 104, 271-279)
- ²⁰ B.S. Creaven, M.Devereux, I.Georgieva, D.Karcza, M.McCann, N.Trendafilova, M. Walsh. *Spectrochim. Acta Part A* 84 (2011) 275-285.
- ²¹ N.M. Urquiza, M.S. Islas, S.T. Ariza, N. Jori, J.J. Martínez Medina, M.J. Lavecchia, L.L. López Tévez, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer, *Chem. Biol. Interact.* 229 (2015) 64–72.
- ²² J.L. Muñoz-Bellido, S. Muñoz-Criado, J.A. García-Rodríguez. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 177-180.
- ²³ C. Lass-Flörl, M. Ledochowski, D. Fuchs, C. Speth, L. Kacani, M. P. Dierich, A. Fuchs, R. Würzner. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35 (2003) 11-15.
- ²⁴ B.S. Creaven, D.A. Egan, K. Kavanagh, M. Andy Noble, B. Thati, M. Walsh. *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 3976–3984.

²⁵ Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed., Plenum Press, New York (1999).

²⁶ N. Barbero, E. Barni, C. Barolo, P. Quagliotto, G. Viscardi, L. Napione, S. Pavan, F. Bussolino, Dyes Pigments 80 (2009) 307-313.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis doctoral nos propusimos por un lado realizar la modificación estructural del reconocido fármaco antidepresivo hidrócluro de sertralina con la finalidad de analizar si los cambios producidos provocarían una mejora en la actividad farmacológica del mismo

Las estrategias recorridas fueron por un lado la incorporación estructural del Zn(II) a través de un anión complejo y posterior formación de una sal así como la modificación estructural por incorporación de yodo o formación de sal. En ese sentido se trabajó en primer lugar con el producto yodo-sertralina (I-SerH₂⁺I⁻) donde además de manera comparativa se completaron estudios para SerH₂⁺Cl⁻ pudiéndose estudiar sus propiedades geométricas, electrónicas y vibracionales mediante la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Se mencionó que uno de los logros de estos estudios ha consistido en la evaluación de los modos de estiramiento de C-X (X=halógeno) y de los modos vibracionales simétricos y asimétricos N-H correspondientes al grupo NH₂⁺ en ambos compuestos mostrando en todos los datos obtenidos una mejor concordancia con los espectros experimentales de FTIR.

No obstante, este compuesto, que se pensaba podría también manifestar actividad antidepresiva demostró por el contrario tener efecto tóxico. Desafortunadamente, dadas las condiciones de toxicidad no se pudieron realizar algunos de los otros testeos de actividades propuestas en este trabajo. Sin embargo, pudimos demostrar *in vitro* el uso de hidrócluro de sertralina como agente antihipertiroideo presentando un efecto al menos en el mismo orden de magnitud que el efecto determinado para otros agentes antidepresivos y se continuó a lo largo de este trabajo de tesis doctoral realizando para la misma otros tipos de pruebas y ensayos.

Otra de las propuestas mencionadas que pudimos desarrollar con éxito fue la formación de cristales de la sal de hidrócluro de sertralina con el ácido cumarín-3-carboxílico. Los métodos de difracción rayos X y de espectroscopía de FTIR permitieron realizar la determinación estructural de SerH₂⁺CCA⁻ así como la observación de la fuerte estabilización estructural producida por la presencia enlaces de H entre el grupo amino proveniente de la entidad SerH₂⁺ y el grupo carboxilato. Esta nueva sal que se pudo caracterizar de forma completa, muestra efectos antidepresivos superiores a las de la sertralina *per se*, aunque el ácido cumarín-3-carboxílico no lo

presenta de forma aislada pero resulta evidente su marcado efecto sinérgico a través de la potenciación de la actividad antidepresiva. Por lo demostrado, existiría una alta probabilidad de que la nueva sal pueda ser evaluada como un nuevo fármaco antidepresivo. Todos los compuestos utilizados fueron ensayados como agentes antimicrobianos, demostrándose que poseen una relevante actividad debido a las concentraciones que se necesitan para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Las estrategias de síntesis recorridas nos permitieron llegar a la síntesis de nuestro compuesto más sobresaliente en este trabajo de tesis doctoral: $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ el cual pudo ser caracterizado por difracción de rayos X, desde el punto de vista espectroscópico (FTIR y Raman), así como estudios térmicos que completaron su análisis. La característica sobresaliente está determinada por la síntesis de un único compuesto, denominado químicamente “complejo de coordinación” en forma de sal cristalina que presenta en su composición el complejo de coordinación de la especie metálica Zn(II), (cuya deficiencia ha sido establecida *in vivo* para pacientes con síntomas depresivos y de reconocido efecto antidepresivo) y el contracción hidrocloreuro de sertralina, (reconocido inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina). El compuesto ha sido sujeto a los ensayos *in vivo* considerándose al momento un prototipo funcional de fármaco antidepresivo de mayor efectividad que el fármaco habitual hidrocloreuro de sertralina por lo que se encuentra sometido la tramitación de la patente del mismo.

Finalmente, se estudiaron los compuestos, S-metil-L-cisteína y $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$ con el interés de explotar nuevas potenciales actividades farmacológicas tomando como principal objetivo el estudio de la actividad antidepresiva. Los estudios realizados permitieron demostrar que la S-metil-L-cisteína no tuvo efecto significativo en la FST mientras que el tratamiento de las ratas con $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$ disminuyó su inmovilidad y el aumento de su comportamiento de natación siendo estos efectos más eficaces y notables que los observados cuando se administra ZnCl_2 . Estos resultados nos permiten confirmar la generación de un efecto sinérgico como resultado de la coordinación del Zn(II) con S-metil-L-cisteína. También se determinaron los efectos inhibitorios sobre la actividad AcP encontrándose que el complejo se comportó como un buen agente inhibidor siendo el primer ejemplo de un complejo de Zn(II) para los que se haya realizado este ensayo. Otra cuestión de interés fue determinar la actividad antioxidante de S-metil-L-cisteína ensayándose las actividades anti hidroxilo y peroxilo en los que

tanto S-metil-L-cisteína y $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$ actuaron como buenos supresores del radical hidroxilo siendo el complejo más eficaz en todo el rango de concentración pero más notablemente en una concentración de 10 μM . Estos resultados sugieren que el nuevo compuesto se comportaría como un fármaco prometedor accionando como antidepresivo, antioxidante y con capacidad de actuar como inhibidor de la enzima AcP.

Cabe mencionar entonces que ha sido posible cumplir con los objetivos planteados de manera prioritaria en la búsqueda de nuevos modelos de compuestos con efectos antidepresivos así como en el ensayo y estudio de nuevas actividades biológicas tanto para los fármacos modificados de hidrocloreuro de sertralina como para S-metil-L-cisteína.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Caracterización fisicoquímica

6.1.1 Análisis Elemental

Para el análisis elemental de C, H, N, O y S se usó un analizador Carlo Erba EA 1108, que pertenece al Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía, INQUIMAE.

6.1.2 Análisis Termogravimétricos (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA)

El comportamiento térmico, ha sido estudiado mediante termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El análisis termogravimétrico se realizó mediante el empleo de un sistema termoanalítico y DSC Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DSC-50 respectivamente. Se trabajó en atmósfera de N₂ con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La cantidad de muestra utilizada fue 5-15 mg. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa TASYs.

6.1.3 Espectros Infrarrojo (FTIR)

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4000 a 400 cm⁻¹ bajo la forma de pastillas de KBr. La resolución espectral fue de ± 4 cm⁻¹ y el número de barridos igual a 64. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa OPUS 3.1.

6.1.3.1. Métodos computacionales

La utilización de métodos que tienen en cuenta los efectos relativistas da como resultado una mejor asignación general, en especial para aquellos modos que involucran la presencia de halógenos.

El espacio conformacional de las moléculas fue investigado empleando simulaciones de dinámica molecular en el ensamble NVT utilizando el método semiempírico AM1 como campos de fuerza del cual se obtuvo un conjunto de veinte conformaciones para cada caso que fueron optimizadas con el método AM1¹, implementado con el programa MOPAC.² Las moléculas se calentaron primero de 0 a 600 K en 0,1 ps. El sistema de temperatura se mantuvo constante mediante el acoplamiento del sistema a un termostato Berendsen³ con un tiempo de relajación de 0,5 ps. Después de un período de equilibrio de 20 ps, se llevó a cabo una simulación de mayor tiempo de duración (500 ps) guardando las coordenadas moleculares cada 25 ps. El paso del tiempo para las simulaciones fue de 0,5 fs.

Al finalizar la simulación resultaron una serie de geometrías que fueron optimizadas con el método AM1.

Las geometrías de los 20 isómeros conformacionales o confórmeros obtenidos de acuerdo con la metodología anterior fueron luego reoptimizadas más aun, mediante el uso de herramientas de la Teoría del Funcional de la Densidad.⁴ Las geometrías obtenidas por el procedimiento anterior fueron posteriormente reoptimizadas usando el funcional híbrido meta-GGA de intercambio y correlación M06-2X.⁵

El conjunto de bases 6-311G(d,p)⁶ se utilizó para todos los átomos.

La integración numérica de intercambio-correlación funcional se realizó en una cuadrícula que contiene 96 puntos radiales y 590 puntos angulares alrededor de cada átomo. Esa rejilla proporciona gradientes nucleares que son precisos a unas 0,00001 unidades atómicas. La matriz de segundas derivadas de la energía con respecto a las coordenadas nucleares se calculó en el mismo nivel de la teoría.

Luego, la matriz de Hesse fue diagonalizada y sus valores propios se utilizaron para verificar si las geometrías optimizadas fueron mínimos locales o puntos de silla sobre la superficie de energía potencial de las moléculas.

Todos los conformeros, por encima de los conformeros de mínima energía de hasta 2 kcal mol^{-1} , fueron incluidos en el cálculo de las propiedades indicadas a través de una media estadística de Maxwell-Boltzmann de 298,15 K según la siguiente fórmula:

$$\langle A \rangle = \frac{\sum A_i \exp(-E_i/RT)}{\sum \exp(-E_i/RT)}$$

En donde E_i es la energía relativa del conformero i y A_i es la propiedad dada. El umbral arbitrario de 2 kcal mol^{-1} asegura que sólo fueron considerados los conformeros que contribuyen aproximadamente con más de 3% a cada propiedad.

Todas las figuras fueron producidas con la ayuda del programa Gabedit.⁷

6.1.4. Espectros Raman

Los espectros Raman fueron medidos mediante un equipo Raman Horiba Jobin Yvon T64000 con microscopio confocal Olympus BX41 en una muestra policristalina empleando la línea de 514,5 nm del láser de Ar, una potencia de 400 mW con un tiempo de adquisición de 10 s y 10 acumulaciones, y en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

6.1.5. Espectros Electrónicos (UV-vis)

Las medidas espectrales se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis de simple haz Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos) 8453 con arreglo de diodos, para adquirir los espectros se utilizó un software desarrollado por la Universidad de Cornell.

También se utilizó, principalmente para medidas a longitud de onda fija, el espectrofotómetro UV-vis de doble haz Shimadzu UV-300, con monocromador. Para ambos equipos se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

6.2. Difracción de rayos X

6.2.1. Determinación de la estructura cristalina de SerH₂⁺CCA⁻.

Las medidas fueron realizadas mediante un difractómetro Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD empleando radiación CuK α ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$) reflejada en un monocromador de grafito.

Las intensidades de difracción de rayos-X fueron colectadas (barridos en ω con ángulos Θ y κ dados), integradas y colocadas en una misma escala mediante el paquete de programas CrysAlisPro.⁸ Los parámetros de celda unidad fueron obtenidos a partir de un refinamiento por cuadrados mínimos (basado en las posiciones angulares de todas las reflexiones colectadas con intensidades mayores que siete veces la desviación estándar de los errores de medición) mediante CrysAlisPro. Los datos fueron corregidos empíricamente por efectos de absorción empleando el método de múltiple-barrido implementado en CrysAlisPro. La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXS-97 del paquete de programas SHELX y el modelo molecular inicial desarrollado mediante ciclos alternados de métodos de Fourier y refinamiento por cuadrados mínimos de matriz completa con SHELXL-97 del mismo paquete de programas.⁹

La mayoría de los átomos de hidrógeno se localizaron en un mapa de Fourier. Sin embargo, todos menos los átomos de hidrógeno del grupo amino se colocaron en una base estereoquímica y fueron refinados utilizando el modelo de cabalgata (“*riding model*”).¹⁰ Las posiciones de los hidrógenos del grupo metilo se refinaron considerándolos un grupo rígido que se deja girar durante el refinamiento alrededor de las uniones N-C como para maximizar la densidad electrónica residual en las posiciones calculadas. Como consecuencia, el grupo -CH₃ convergió a una conformación escalonada.

Los átomos de hidrógeno del grupo amino se refinaron teniendo en cuenta las posiciones encontradas con parámetros de desplazamiento isotrópicos y las distancias de enlace NH restringidas a un valor de 0,86(1) Å.

Los datos estructurales cristalográficos fueron depositados en el Centro de Datos cristalográfica de Cambridge (CCDC). Cualquier solicitud a la CCDC para este material debe citar a la cita la literatura completa y el número de referencia CCDC (991.981).

6.2.2. Determinación de la estructura cristalina de $(\text{SerH}_2)_2(\text{ZnCl}_4)$

6.2.2.1. Para el monocristal de $(\text{SerH}_2)_2(\text{ZnCl}_4)$

Las medidas fueron realizadas mediante un difractómetro Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD empleando radiación $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) reflejada en un monocromador de grafito. Las intensidades de difracción de rayos-X fueron colectada (barridos en ω con ángulos ϑ y κ dados), integradas y colocadas en una misma escala mediante el paquete de programas CrysAlisPro.⁸ Los parámetros de celda unidad fueron obtenidos a partir de un refinamiento por cuadrados mínimos (basado en las posiciones angulares de todas las reflexiones colectadas con intensidades mayores que siete veces la desviación estándar de los errores de medición) mediante CrysAlisPro. Los datos fueron corregidos empíricamente por efectos de absorción empleando el método de múltiple-barrido implementado en CrysAlisPro. La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXS-97 del paquete de programas SHELX¹¹ y el modelo molecular inicial desarrollado mediante ciclos alternados de métodos de Fourier y refinamiento por cuadrados mínimos de matriz completa con SHELXL-97 del mismo paquete de programas. En esta etapa se observó que el grupo diclorofenilo ($\text{Ph}=\text{fenil}$; PhCl_2) de una de las moléculas de sertralinaH (SerH_2^+) mostraba desorden rotacional alrededor del enlace $\text{C}-\text{PhCl}_2$. Este desorden pudo modelarse adecuadamente en términos de dos conformaciones rotadas 180° entre sí alrededor del enlace y refinada con parámetros de desplazamiento aniso-trópicos de manera que sus ocupaciones sumaran uno.

Los átomos de hidrógeno fueron posicionados sobre bases estero-químicas y mantenidos durante el refinamiento rígidamente vinculados a los átomos de carbono correspondientes con parámetros de desplazamiento isotrópicos igual a 1,2 veces el del carbono al cual están enlazados, excepto los hidrógenos metílicos en que este factor es 1,5. La posición de los átomos de H metílicos fue optimizada tratándolos como un grupo rígido que durante el refinamiento se permite rotar alrededor del enlace N-C correspondiente de tal manera de maximizar la suma de las densidades electrónicas residuales en las posiciones calculadas.

6.2.2.2. Datos de difracción de rayos-X en polvos

Datos de difracción de rayos-X en poli-cristales de $(\text{SerH}_2)_2(\text{ZnCl}_4)$ en condiciones ambientales se obtuvieron mediante un difractómetro PANalytical X'Pert PRO, empleando radiación característica $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) de un tubo de vacío operado a 40 kV y 40 mA. Las medidas se realizaron recurriendo a la geometría θ - θ de Bragg-Brentano, un contador de centelleo y un monocromador de grafito en el haz de salida. El patrón de difracción fue colectado en el rango $2^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$, con pasos de 0.02° de ancho y un tiempo de conteo de 1s por paso.

6.3. Estudios en Solución

Para evaluar la estabilidad de los complejos en solución se registró la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo. Los complejos se disolvieron en sus respectivos solventes y se mantuvieron a 25°C durante al menos 3 h, tiempo que duró cada medida.

6.4. Medida de la capacidad antioxidante

6.4.1. Actividad secuestrante del radical OH^\bullet

El radical OH^\bullet fue generado por el sistema ascorbato/ $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$. La mezcla de reacción contiene 3,75 mM de 2-desoxirribosa, 1 mM de H_2O_2 , 100 μM de FeCl_3 y 100 μM de EDTA más los compuestos de interés en buffer KH_2PO_4 - KOH (20 mM, pH 7,4). La reacción comienza por el agregado de 100 μL de ácido ascórbico (100 μM) a la mezcla incubando los tubos a 37°C durante 30 min. Finalmente la degradación de la desoxirribosa por los radicales OH^\bullet se mide por el método del ácido tiobarbitúrico (ATB): la reacción del producto formado con el ATB en caliente y bajo condiciones ácidas (en presencia de ácido tricloroacético (TCA) da como resultado la formación de un cromógeno color rosa (532 nm).¹²

6.4.2. Ensayo de la actividad anti radical DPPH•

A una solución metanólica de DPPH (4 ml, 40 ppm) se le agrega 1 ml de las soluciones de ligandos, compuestos o metales diluidos en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 7,1). Luego de incubar 1 hora en oscuridad se mide la absorbancia de las distintas muestras a 517 nm y se las compara con un control al que se le asigna un valor arbitrario de 100%, que fue preparado con el radical y el buffer.¹³ Con fines comparativos, se utilizó ácido ascórbico como antioxidante de referencia, el cual provoca una decoloración inmediata del color violeta inicial, lo que indica su fuerte actividad anti radical DPPH•.

7. Fluorescencia. Interacción con albúmina sérica.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) equipado con una lámpara de xenón pulsada (altura media del pico <10 μ s, 60 Hz), un tubo fotomultiplicador R928 y una computadora con software FL Winlab. Ambas rendijas de excitación y emisión se establecieron a 5 nm a lo largo de este estudio. La intensidad de la fluorescencia de las soluciones de albúmina sérica bovina (ASB) de concentración base 6 μ M se valoró por las sucesivas adiciones de solución de los ligandos, las sales de los metales utilizados y los respectivos compuestos preparados utilizando una $\lambda_{\text{excitación}} = 280$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 348$ nm a 25⁰C.

La albúmina sérica bovina se disolvió en el buffer TRIS-HCl (0,1M, pH=7,4). La concentración de la solución de ASB se estabilizó en 6 μ M y las concentraciones de las soluciones de los ligandos y de los compuestos variaron desde 0 a 500 μ M. Las soluciones de cada compuesto fueron agregadas gota a gota a la solución de ASB. Para cada muestra y concentración, la medición se realizó por triplicado. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) equipado con una lámpara de xenón pulsada (altura media del pico <10 μ s, 60 Hz).

Los datos obtenidos fueron evaluación de acuerdo a las ecuaciones de referencias para los mismos indicados en cada capítulo de interacción de ligandos y compuestos de coordinación con albúmina sérica bovina.

8. Actividad Biológica

8.1. Determinación *in vitro* de la inhibición de la Fosfatasa Ácida (AcP).

El ensayo para la prueba de inhibición de la fosfatasa ácida se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por Blum Schwedt.¹⁴

El buffer de acetato se preparó disolviendo un volumen de 5,72 mL de ácido acético concentrado en agua destilada (volumen final de 250 mL) ajustando el pH a 5,60 con 0,5 M NaOH. La solución madre de la enzima se realizó mezclando 12,5 mg del polvo de la fosfatasa ácida 0,25 U/mL en 2,0 mL del buffer acetato. Para su uso, 100 μ L de la solución madre se diluyó con 1,9 mL de tampón de acetato. Para la solución de sustrato de 0,170 g de para-nitro-fenilfosfato (p-NPP) se disolvieron en 2,5 mL de agua destilada.

Las soluciones de compuestos se prepararon por dilución de las soluciones madre preparadas en DMSO con buffer acetato. Un volumen de 0,50 mL de solución de complejo se mezcló con 0,10 mL de la solución de enzima y 1,00 mL de buffer. La mezcla se mantuvo a 25 °C durante 20 min (tiempo de incubación). Después de iniciar la reacción mediante la adición de 0,10 mL de la solución de sustrato, el tubo se mantuvo a 25°C durante 20 min. La reacción se detuvo con la adición de 0,50 mL de una solución de hidróxido de sodio 0,5 M. La concentración final de DMSO dio lugar a 1,14%. La actividad enzimática se calcula finalmente mediante la medición de la absorbancia del p-nitrofenol a 405 nm contra un blanco preparado sin la enzima.

Se midieron tres repeticiones independientes de cada punto. El 100% de la actividad de la enzima se asigna a una medición basal que contiene todos los medios de reacción que incluyen el mismo volumen de DMSO en todos los experimentos. Cabe mencionar que la presencia de DMSO no afecta a la actividad de la enzima.

8.2. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) se realizó mediante el método de dilución en agar. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los compuestos ensayados sobre diferentes cepas bacterianas y fúngicas de

relevancia clínica. La CIM se define como la menor dilución del complejo que inhibe el crecimiento visible del organismo testado.

8.2.1. Cepas de bacterias y hongos

Se emplearon cepas derivadas de cultivos de colección tipo americano (American Type Culture Collections-ATCC). Se determinaron las CIM de los compuestos frente a **Bacterias** (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12232, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y **Hongos** (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* de aislamiento clínico).

Tanto las cepas de bacterias como las de hongos fueron cultivadas y ensayadas en un medio de cultivo universal (caldo Mueller Hinton (MH) y Mueller Hinton agarizado) de Brithania¹⁵. Las cepas fueron conservadas en placas con MH agarizado en heladera y subcultivadas mensualmente. Además se almacenaron dichas cepas en crioviales mantenidos a temperatura de freezer (BHI Britania con 30% de glicerol v/v a -20°C). Se tomaron todos los recaudos para preservar la esterilidad evitando contaminación de los cultivos y se respetaron las normas de bioseguridad que atañen a la práctica microbiológica. Se realizaron controles periódicos de tipificación y caracterización de la sensibilidad de las cepas para asegurar que durante los subcultivos no hayan sufrido contaminaciones o variaciones en su sensibilidad frente a un antimicrobiano de referencia.

8.2.2. Preparación del inóculo

El inóculo de las bacterias y hongos para realizar los ensayos microbiológicos se preparó a partir de cultivos de 18 horas de crecimiento. Se ajustó la turbidez de la suspensión de los microorganismos por comparación visual con un estándar de turbidez 0,5 de la escala de McFarland. Dicho estándar se corresponde con aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro de medio de cultivo. Para el método de dilución en agar, el inóculo bacteriano ajustado anteriormente se diluye diez veces antes de inocular las placas con el agente en estudio disuelto en el medio MH agarizado

(previamente solidificado), mientras que el inóculo de los hongos se ensaya sin dilución previa.^{16,17}

8.2.3. Preparación de soluciones

Para incorporar el compuesto ensayado en el medio de cultivo se prepararon soluciones empleando como solvente agua/DMSO (1:1). Se utilizaron diluciones dobles seriadas en un rango de concentraciones 1,5 ug/mL-1.500 µg/mL (concentración límite). La esterilización de las soluciones madre y diluciones dobles seriadas se realizan mediante filtros de membrana de 0,22 µm (MC-NYL-02S de MICROCLAR) en cabina de flujo laminar (Cabina de Bioseguridad-General Filter) y se recoge el filtrado en tubos eppendorf estériles.

8.2.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar

Se determinó la CIM para cada compuesto frente a las bacterias y hongos seleccionados. Luego de la preparación de las diluciones dobles seriadas, se colocaron 0,5 mL de cada una de ellas en un tubo conteniendo 4,5 mL de agar MH estéril previamente fundido y mantenido a una temperatura de 50°C, se agitaron las mismas con la ayuda de un vórtex, se vertieron en placas de Petri estériles (se esterilizan a 180 °C durante 2 horas en estufa de secado y esterilización) de 45 milímetros de diámetro y se dejó solidificar el medio. El rango de concentración final en placa fue de 1,46 a 1.500 µg/mL. Una placa de Petri con medio de cultivo y DMSO en la misma concentración que la requerida para la disolución del complejo se utiliza como control de crecimiento de los microorganismos, y al mismo tiempo, como control de esterilidad del medio y del solvente. Luego de que el medio solidificó, la superficie del mismo fue inoculada con 2 µL del inóculo de cada microorganismo. Toda manipulación que requiera ambiente estéril se realizó en la Cabina de Bioseguridad. Las placas inoculadas se incubaron en ambiente aerobio a 37 °C (estufa de cultivo-San Jor) durante 24 o 48 horas. Luego de una incubación de 24 horas para las bacterias y 48 para los hongos, se compara el crecimiento en las placas de ensayo con la placa control. La CIM se interpretó como la

concentración más baja del compuesto ensayado que inhibió el crecimiento visible del microorganismo. Cada CIM se determinó por triplicado.¹⁸

9. Actividad Antitiroidea

El yodo fue bisublimado y se mantuvo en la oscuridad en un desecador que contiene P_2O_5 . El solvente utilizado fue dicloroetano ($C_2H_4Cl_2$) y las soluciones de yodo y $SerH_2^+Cl^-$ se prepararon siempre antes del comienzo del experimento. La concentración de yodo se mantuvo constante (4×10^{-4} M), aunque la concentración de los compuestos se varió entre 1×10^{-4} mol.L⁻¹ hasta 1×10^{-3} mol.L⁻¹. La reacción se llevó a cabo directamente en la celda espectrofotométrica mediante la mezcla de 1,5 mL de cada uno de compuesto (donante) e yodo (aceptor). La temperatura de las soluciones se mantuvo a $25^0 \pm 1^0C$ durante las mediciones. Los espectros se registraron inmediatamente en el espectrofotómetro. Se midieron tres repeticiones independientes de cada solución. Para la determinación de la constante de formación (K_c) y el coeficiente de extinción molar se utilizó el método de Lang.¹⁹ Este método ha sido utilizado para determinar las constantes de formación de complejos de transferencia de carga en relaciones estequiométricas 1:1 en la longitud de onda bajo análisis usando la ecuación (1).

$$[A_0][D_0]/d_c = ([A_0]+[D_0]- d_c/\epsilon_c)/\epsilon_c + 1/(K_c \epsilon_c) \quad (1)$$

En la que d_c es la absorbancia, ϵ_c es el coeficiente de extinción molar y K_c es la constante de formación del complejo de transferencia de carga. Los parámetros se ajustaron con un programa diseñado por nuestro grupo de investigación.

La ecuación (1) se puede volver a escribir en la forma:

$$Y = (1/\epsilon_c)X + 1/(K_c \epsilon_c) \quad (2)$$

$$\text{Donde } Y = [A_0][D_0]/d_c \text{ and } X = [A_0]+[D_0]- d_c/\epsilon_c.$$

A partir de la ecuación (2) se obtiene una línea recta con pendiente $1/\epsilon_c$ y ordenada al origen de $1/(K_c \epsilon_c)$. Para resolver esta ecuación se utiliza un método de interacción y de regresión lineal.

10. Actividad Antidepresiva

10.1. Animales

En el presente trabajo se emplearon como animales de experimentación, ratas macho adultas de la cepa Wistar (6-8 crías por madre), de la colonia cerrada del Bioterio de la Universidad Nacional de La Rioja, de 50-70 días de edad (200-386 g) al inicio de los experimentos.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de luz (fotoperíodo de 8:00 hs. hasta la 20:00 hs.) y reciclado del aire, controlado mediante interruptor automático; la temperatura del bioterio se mantuvo en $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y la humedad promedio registrada fue de aproximadamente 45%. Todos los animales tuvieron libre acceso a comida y agua de bebida.

Para los distintos experimentos se utilizaron cajas de polietileno de 60x40x20 cm., en las cuales se alojaron de 5 a 6 ratas.

Todos estos estudios fueron llevados a cabo de acuerdo las normas de la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio de la National Institutes of Health, USA y los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-UNLAR) de la Universidad Nacional de La Rioja

10.2. Prueba de Natación Forzada (PNF, o Forced swim test (FST))

Esta prueba consiste en colocar a las ratas en un cilindro de acrílico individual (46 cm de alto y 20 cm de diámetro, que previamente se llenó con 30 cm de agua ($23-25^\circ\text{C}$)). La prueba consta de dos sesiones de natación: un pre-test de 15 min y otro test de 5 min separados por los respectivos tratamientos.

Después de los 15 min del pre-test de natación forzada las ratas se retiraron del agua, se secaron con toallas, se colocaron en un lugar caliente durante 30 min. y posteriormente se regresaron a sus respectivas cajas. Posteriormente se iniciaron los tratamientos por 14 días.²⁰ Veinticuatro horas después de finalizados los tratamientos, se realizó el test de natación durante 5 min en las mismas condiciones experimentales del pre-test. Durante estos 5 min se evaluó cada 5 seg la conducta predominante,

pertenciente a 3 categorías: 1) *natación*: cuando el animal nada en busca de una salida, un escape, nadando vigorosamente con sus cuatro miembros, las dos patas anteriores rompiendo la superficie del agua o golpeando el tanque o bien cuando el animal se introduce totalmente dentro del agua en actitud de buceo; 2) *inmovilidad*: cuando la rata no hace ningún esfuerzo por buscar una salida, sólo intenta mantenerse a flote con la cabeza fuera del agua, y 3) *trepar o escalamiento*: cuando el animal trata de subir por la pared del tubo (Figura 1).

Los resultados de esta prueba se expresan como el número total de veces que se observa cada comportamiento o conducta: inmovilidad, natación o escalamiento.

La PNF permite evaluar el efecto antidepresivo de un tratamiento, y en esta prueba la disminución del tiempo de inmovilidad es indicador del efecto antidepresivo.

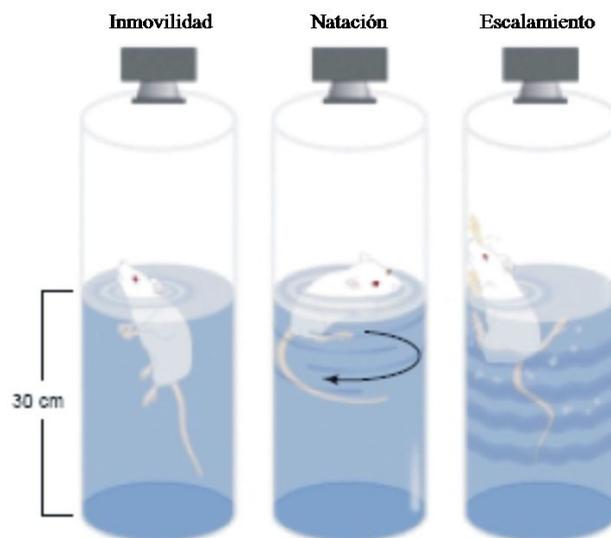


Figura 1: Prueba de natación forzada

10.3. Prueba de campo abierto (PCA) (Open Field Test)

Para descartar que el efecto de los diferentes tratamientos evaluados con la PNF pudiera deberse a efectos inespecíficos relacionados con modificaciones sobre la actividad locomotora, se utilizó la prueba de campo abierto (PCA).

Esta prueba se utiliza comúnmente para medir la actividad locomotora espontánea de los roedores.²¹

El dispositivo usado para esta prueba consiste en un piso negro dividido en cuadrados (15cm x 15cm) con líneas blancas, limitados por cuatro paredes negras (60cm x 60cm), iluminado por una lámpara de 75w ubicada a una altura de 75 cm del piso, en un lugar en oscuridad y en silencio para no perturbar al animal (Figura 2). Para la realización de esta prueba, el animal se coloca en el centro del dispositivo, se registra el número de cuadrados que la rata atravesó con sus cuatro patas durante un período de 5 min. y se expresa como el número de cuadrados totales. Este número es una medida de la actividad locomotora espontánea del animal. Después de evaluar la conducta de cada animal, se procede a la limpieza del dispositivo para hacer constante la influencia olfatoria entre animales.

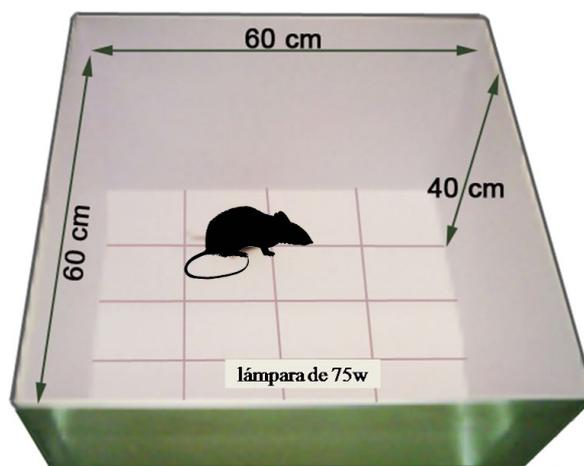


Figura 2: Prueba de campo abierto (PCA)

10.4. Tratamientos

10.4.1. Complejo iodo-sertralina

El hidrocloreuro de sertralina y su derivado con iodo fueron administrados por vía intraperitoneal (ip) en un volumen equivalente a 1 cm³/kg. Las ratas fueron tratadas con dichos compuestos y con o solución salina (ratas control) una vez al día. Todas las ratas de control recibieron inyecciones de solución salina (0,9% NaCl).

Con el fin de hacer comparaciones válidas con datos previamente publicados, la dosis seleccionada para ambos compuestos fue de 10 mg/kg que es la dosis para la cual se sabe que sertralina presenta produce efectos antidepresivos en la PNF en las mismas

condiciones experimentales.²² Alternativamente, se utilizaron dosis de 5 mg/kg con fines comparativos.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 3 grupos experimentales:

- Grupo 1: animales tratados con solución salina (grupo control).
- Grupo 2: animales tratados con hidrocloreuro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$).
- Grupo 3: animales tratados con el complejo iodo-sertralina ($\text{I-SerH}_2^+\text{I}^-$).

La PCA se realizó el día 15 del esquema experimental; después de finalizar los distintos tratamientos de 14 días de duración los animales se sometieron a la PCA en lugar de la PNF, tal como se muestra en la Figura 3. Esta prueba se realizó entre las 14:00hs y las 17:00hs.

El protocolo experimental fue el siguiente:

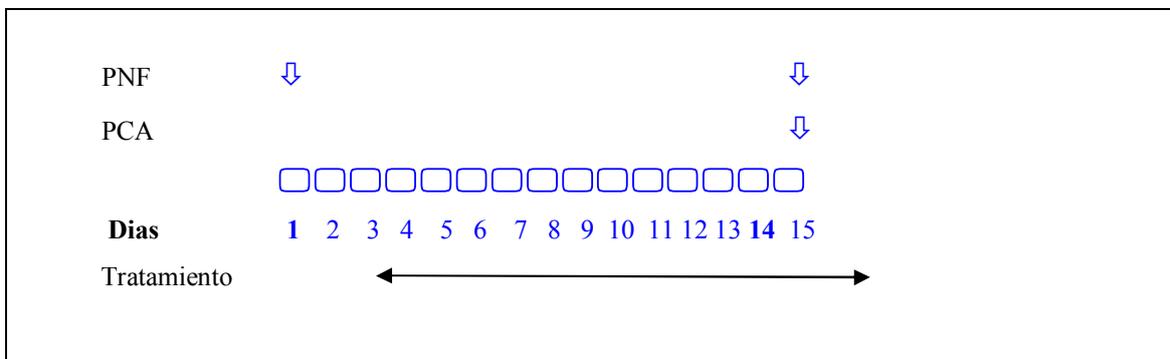


Figura 3: Diseño Experimental: protocolo de los tratamientos con droga, y los días de realización de las pruebas. PNF: prueba de natación forzada; PCA: prueba de campo abierto.

10.4.2. Sal sertralina-cumarín-3-carboxilato ($\text{SerH}_2^+\text{-CCA}^-$)

El hidrocloreuro de sertralina, la sal sódica del CCA (NaCCA) y cristales de $\text{SerH}_2^+\text{-CCA}^-$ fueron administrados por vía oral en una dosis de 10 mg/kg de sertralina, y en una dosis equivalente de $\text{SerH}_2^+\text{-CCA}^-$ y NaCCA , ya que se demostró que a esa dosis de sertralina se produce efectos antidepresivos en la PNF en las mismas condiciones

experimentales.²² Las ratas controles recibieron solución salina (0,9 % NaCl). Todas las ratas recibieron los respectivos tratamientos una vez por día.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales:

- Grupo 1: animales tratados con solución salina (grupo control).
- Grupo 2: animales tratados con hidrocloreuro de sertralina ($\text{SerH}_2^+\text{Cl}^-$)
- Grupo 3: animales tratados con la sal sódica del CCA (NaCCA)
- Grupo 4: animales tratados con los cristales de $\text{SerH}_2^+ - \text{CCA}^-$

El protocolo experimental fue el siguiente:

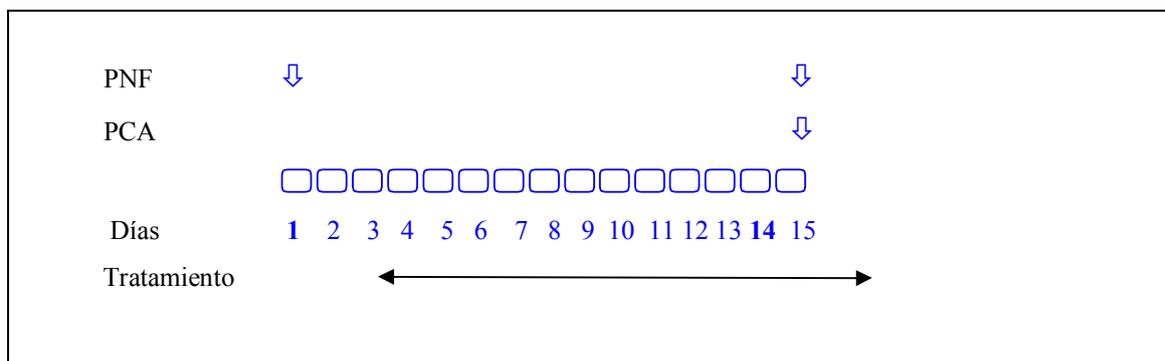


Figura 4: Diseño Experimental: protocolo de los tratamientos, y los días de realización de las pruebas. PNF: prueba de natación forzada; PCA: prueba de campo abierto.

10.4.3. Complejo $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$

El ZnCl_2 se administró en una dosis de 30 mg/kg de ZnCl_2 por kg de animal y el complejo $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$ en las cantidades equivalentes de $\text{Zn}(\text{II})$ presente en el mismo.

Las ratas fueron tratadas con la solución salina (ratas control) y con ZnCl_2 , S-metil-L-cisteína y complejo $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$ una vez al día y todas las soluciones se administraron por vía oral en un volumen constante de 10 mL/kg de peso corporal.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales:

- Grupo 1: animales tratados con solución salina (grupo control).
- Grupo 2: animales tratados con S-metil-L-cisteína
- Grupo 3: animales tratados con ZnCl_2

- Grupo 4: animales tratados con el complejo $[\text{Zn}(\text{S-Met})_2]$.

A posteriori se procede de igual manera que en los casos anteriores.

10.4.4. Complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$

De la misma manera que en los casos anteriores, se utilizó para comparar el efecto del complejo una dosis con efecto demostrado de clorhidrato de sertralina (10 mg/Kg). La dosis del complejo fue calculada en base a la dosis antidepressiva de sertralina, a los fines de poder comparar los resultados siendo de 13,0 g/Kg. Además, y también a los fines comparativos (ya que se han descrito efectos antidepressivos del Zn(II) (como cloruro de Zn(II)), se administró a un grupo de ratas una dosis equivalente en Zn(II) de 5,55 g/kg. Este estudio se completó utilizando una segunda dosis del complejo, de 26,0 g/kg con la finalidad de analizar dosis-respuesta.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos experimentales:

- Grupo 1: animales tratados con solución salina (grupo control).
- Grupo 2: animales tratados con hidrocloreto de sertralina.
- Grupo 3: animales tratados con ZnCl_2
- Grupo 4: animales tratados con el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ (dosis 13,0 g/Kg)
- Grupo 5: animales tratados con el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ (dosis 26,0 g/Kg)

A posteriori se procede de igual manera que en los casos anteriores.

11. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F.Healy, J.J.P. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902-3909.
- ² MOPAC (Molecular Orbital PACKage) 2009; J.J.P. Stewart; Stewart Computational Chemistry; Colorado Springs; CO; USA.
- ³ H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, *J.Chem. Phys.* 81 (1984) 3684-3690.
- ⁴ (i) P. Hohenberg, W. Kohn. *Rev.* 136 (1964) B864-B871; (ii) W.Kohn, L.J. Sham. *Phys. Rev.* 140 (1965) A1133-A1138; (iii) R.G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*; University Press, Oxford, 1989; (iv) GAMESS-US-M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347-1363.
- ⁵ Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215; Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 157-167.
- ⁶ S. Sagdinc , F Kandemirli , S.H. Bayari. *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 405-412.
- ⁷ A.R. Allouche. *J. Comp. Chem.* 32 (2011) 174-182.
- ⁸ CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., version 1.171.33.48 (release 15-09-2009 CrysAlis171.NET).
- ⁹ G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.* A46 (1990) 467-473.
- ¹⁰ R. Srinivasan, N.R.Jagannathan, *Acta Crystallogr.* B38 (1982) 2093.

- ¹¹ G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112-122.
- ¹² C.T. He, A.T. Hsieh, D. Pei, Y.J. Hung, L.Y. Wu,; T.C. Yang, W.C.Lian, W.S. Huang, S. W.Kuo, *Clin. Endocrinol.* 60 (2004) 676-681.
- ¹³ B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, *Anal. Biochem.* 165 (1987) 215–219.
- ¹⁴ U.Blum; G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta.* 360 (1998) 101-108.
- ¹⁵ (i) A. Klančnik, S. Piskernik, B. Jeršek, S.S.Možina, *J. Microbiol. Methods.* 81 (2010) 121; (ii) T.Suksrichavalit, S.Prachayasittikul, C.Nantasenamat, C.Isarankura-Na-Ayudhya, V.Prachayasittikul, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3259.
- ¹⁶ B A.erahou, A. Auhmani, N.Fdil, B A.enharref, M Jana, C.A. Gadhi, *J. Ethnopharmacol.* 112 (2007) 426–429.
- ¹⁷ F.Rowe, S.Vargas Superti, R.Machado Scheibe, C.G. Dias. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43 (2002) 45–48.
- ¹⁸ J.J. Martínez Medina, C.A. Torres, W.S. Alegre, C.A. Franca, L.L. López Tévez, E.G. Ferrer, N.B. Okulik, P.A.M. Williams, *J.Mol. Struct.* 1100 (2015) 366-375.
- ¹⁹ R.P. Lang. *J. Am. Chem. Soc* 84 (1962) 1185-1192.
- ²⁰ J.F. Cryan , R.J. Valentino, I. Lucki. *Neurosci Biobehav Rev.* 29 (2005) 547-569.
- ²¹ W.B. Essman,. *J Comp Physiol Psychol* 66 (1967) 244–246.
- ²² S.Bilge, A. Bozkurt, D.B. Bas, E.Aksoz, S E.avli, F.Ilkeya, Y.Kesim, *Pharmacol. Rep.* 60 (2008) 872-879.

ANEXO.**Publicaciones**

1. Sertraline and its iodine product: experimental and theoretical vibrational studies. Potential *in vitro* anti-thyroid activity of sertraline and iodine product toxicity with respect to male Wistar rats. G.E. Escudero, V. Ferraresi Curotto, C.H. Laino, R. Pis Diez, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer, Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 104 (2013) 271-279.
2. Novel anti-depressant activity in male Wistar rats model of Zn(II)-S-methyl-cysteine complex, its *in vitro* antiradical activity and the inhibitory effect on acid phosphatase, G.E. Escudero, N. Martini, K. Jori, N. Jori, N.R. Maresca, C.H. Laino, L.G. Naso, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer, enviado.
3. Improving the antidepressant action of sertraline by co-crystallization with the antioxidant agent coumarin 3-carboxylic acid. Structural determinations. G.E. Escudero, C.H. Laino, G.A. Echeverría, O.E. Piro, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams, en redacción.

Solicitud de patente

Complejos de Coordinación de Sertralina, Método para su preparación, composiciones farmacéuticas que los comprenden y usos.

Inventores: Graciela Escudero, Carlos Laino, Oscar Piro, Gustavo Etcheverría, Patricia A.M. Williams, Evelina G. Ferrer.

CONICET-UNLP-UNLaR

Comunicaciones a congresos

1. Evento: XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal, *Caracterización espectroscópica de derivado de sertralina*, G. Escudero, C. Laino, P. A.M. Williams, E. G. Ferrer, Lugar: Lanús, Fecha: 13-16 de septiembre 2010.
2. Evento: XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. *Obtención de propiedades estructurales y vibracionales de la sertralina y derivados*

mediante DFT. V. Ferraresi Curotto, G. Escudero, P. A.M. Williams, E.G. Ferrer, R. Pis Diez, Lugar: Córdoba, Fecha: 3-6 de mayo, 2011.

3. Evento: III CONGRESO BIOQUIMICO DEL LITORAL - XVI JORNADAS ARGENTINAS DE MICROBIOLOGÍA. *Determinación de la actividad antimicrobiana del fármaco antidepresivo sertralina y su par iónico cumarin 3-carboxilato de sertraloni.*, A.N. Rodríguez, J.J. Martínez, L.L. López, E.G. Ferrer EG, P.A.M. Williams PAM, Lugar::Santa Fé, Argentina. Fecha: 5-7 agosto de 2015.

4. Evento: Evento: XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. *Actividad antidepresiva y efectos inhibitorios sobre fosfatasa ácida del complejo Zn(S-metil-cisteína)₂.* G.E. Escudero, K. Jori, N. Jori, N. Martini, C.H. Laino, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Lugar: Bs As, Argentina, Fecha: 12-15 abril 2015.

5. Evento: 5° SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA DE COORDINACIÓN Y ORGANOMETÁLICA, 5th LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON COORDINATION AND ORGANOMETALLIC CHEMISTRY. *Novel anti-depressant activity in animal model of Zn(II)-S-methyl-cysteine complex and other pharmacological activities.* E.G. Ferrer G.E. Escudero, N. Martini, K. Jori, N. Jori, N.R. Maresca, C.H. Laino, P.A.M. Williams. Lugar: Angra dos Reis, RJ Brasil. Fecha: 18-23 de octubre 2015. Enviado.