



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

*Trabajo de Tesis Doctoral*

## **“ESTUDIO DE COMPLEJOS METÁLICOS CON LIGANDOS DE INTERÉS BIOLÓGICO”**

---

**Tesista**

*Farm. Libertad Leonor López Tévez*

**Directora**

*Dra. Patricia A.M. Williams*

**Co-directora**

*Dra. Nora B. Okulik*

**Año**

2016

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 y en el Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS), bajo la dirección de la Profesora Dra. Patricia A.M. Williams y la co-dirección de la Profesora Dra. Nora B. Okulik.

Año 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

*El momento de agradecer es para mí, casi una ceremonia, ya que me lleva a transitar por las instancias más relevantes que hicieron a este doctorado y a momentos muy fuertes tanto en lo académico como en lo personal. Recuerdo de chica que era mi abuela paterna, la que siempre me alentó en los estudios, festejó mis avances y aplaudió mis logros. Siento que ese valor que ella le daba al conocimiento, a aprender, a destacarse y a estudiar con placer y sin esfuerzo como una posibilidad natural y merecida es lo primero que me hizo declarar la decisión de ser profesional en una familia sin antecedentes universitarios y aferrarme a ese pensamiento con decidida convicción. Gracias abuela Adelina por encender en mí esa chispa. En lo académico agradezco en primer lugar a Nora, mi ejemplo, mi motivación, la que me recibió, siendo yo aún alumna y me abrió las puertas al mundo de la docencia universitaria, junto con Mary y María Inés, mis primeras maestras. Gracias por dar respuestas a mis inquietudes y moderar mis ansias y por haberme permitido más tarde, con el mismo grupo, incursionar en el mundo de la investigación. Inicé este doctorado, de la mano de Nora Okulik, mi jefa y amiga, y Alicia Jubert, a quienes agradezco por el ánimo infundido y la confianza depositada en mí y por ponerme en contacto con profesionales del CEQUINOR que me brindaron su espacio, sus conocimientos, su experiencia y su prestigioso acervo científico. Un agradecimiento muy especial a Evelina por su amabilidad, hospitalidad, cordialidad y generosidad intelectual. Gracias a Patricia, mi directora de tesis por su confianza, por su paciencia (que varias veces puse a prueba), por su profesionalismo, por sus estratégicas intervenciones, por su constante seguimiento y la supervisión continua de mis avances. Y en lo académico y personal agradezco a mis colegas y amigos, Fabiana, Edit, Carola, Juan, Cristina, compañeros de trabajo que están conmigo también fuera del ámbito universitario compartiendo experiencias, proyectos, becas, viajes, cursos, acontecimientos personales y académicos. Gracias a los becarios, pasantes y ayudantes que formaron y/o forman parte de mi rutina y que me eligieron como guía y tutora de sus planes de investigación: Daniel, Emilio, Walter, Maxi, Ailén, Flavia, Yaini, Lucía. Gracias al sistema universitario y especialmente a María Alicia que con su ejemplo y trayectoria, nos facilita y asesora más allá de todo lo referente a proyectos de investigación.*

*Gracias a las dificultades y vicisitudes que la vida fue incorporando en mi camino, porque de cada experiencia se sale fortalecido y se suma un aprendizaje invaluable.*

*Un agradecimiento súper especial a lo más importante de mi vida, mi familia. Gracias por el aguante a mis cuatro preciosos hijos, Diana, María Fernanda, Juliana y Santiago, y al hombre que estuvo a mi lado la mayor parte de mi vida y que sigue estando y que me brindó y me brinda siempre su apoyo incondicional. Un infinito agradecimiento a mi tía Chini por el aliento,*

*la admiración, la confianza, los halagos y el asesoramiento lingüístico que organiza el flujo de ideas. A mis padres por respetar mi rebeldía y seguir estando a pesar de las diferencias y porque de una u otra manera terminan apoyando y sintiendo orgullo de su hija no convencional. Gracias a todos por estar y por comprenderme o no, pero respetar mis sueños y acompañarme de diferentes maneras en este ambicioso emprendimiento. A todos y cada uno de los que fui nombrando y lo que no hace falta nombrar, gracias!*

## INDICE

Capítulo 1	
1. Introducción. Bioelementos y sus complejos de coordinación	1
1.1. La Química de Coordinación	1
1.2. Aplicaciones de los compuestos de coordinación	2
1.3 Interés biológico de iones metálicos	5
2. Elementos esenciales (cobre y zinc)	6
2.1. Cobre	6
2.1.1. Química del cobre	6
2.1.2. Cobre en la naturaleza	7
2.1.3. Importancia biológica del cobre	7
2.1.4. Metabolismo del cobre	8
2.1.5. Toxicidad del cobre	8
2.1.6. Deficiencia del cobre	8
2.1.7. Enfermedades relacionadas con el Cobre	9
2.2. Zinc	9
2.2.1. Química del zinc	9
2.2.2. El zinc en la naturaleza	9
2.2.3. Importancia biológica del zinc	10
2.2.4. Metabolismo del zinc	11
2.2.5. Toxicidad del zinc	12
2.2.6. Deficiencia del zinc	13
2.2.7. Enfermedades relacionadas con el zinc	14
3. Elementos tóxicos (Cadmio)	14
3.1. Cadmio en la naturaleza	15
3.2. Metabolismo tóxico del cadmio	15
3.3. Importancia biológica del cadmio	16
3.4. Toxicidad del cadmio	17
3.5. Enfermedades relacionadas con el Cadmio	18
3.6. Tratamiento para detoxificación del cadmio	19
4. Generalidades	20
4.1. Quelatoterapias	20
4.2. Titulaciones potenciométricas	23
4.3. Actividades enzimáticas	30
4.3.1. Superóxidodismutasa	30
4.3.2. Fosfatasa alcalina	32
4.4. Actividad antimicrobiana	34
4.4.1. Conservación de cepas	35
4.4.2. Indicadores biológicos	37
4.5. Efecto post-antimicrobiano (PAE-PAFE)	46
4.6 Cálculos computacionales	46
4.6.1 Método de Estructura Electrónica	47
5 Objetivos	48
Bibliografía Capítulo 1	49
Capítulo 2	55
COMPLEJOS DE Cu CON CIANOQUANIDINA Y FENANTROLINA	55
1- Introducción	55

1.1. Cianoguanidina	55
1.2. Fenantrolina	56
1.3. Generalidades	57
2- Síntesis de los complejos de Cu/cnge/fen	59
2.1. Preparativa	59
2.2. Estudios estructurales de los complejos	59
2.3. Espectroscopía vibracional	63
2.4. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (EPR)	65
2.5. Espectros electrónicos	68
3- Determinación de constantes de acidez y de estabilidad. Mediciones potenciométricas	71
3.1. Resultados	71
4- Estudios de estabilidad en diferentes solventes	74
5- Ensayos Biológicos	76
5.1. Ensayo de actividad antimicrobiana de los complejos	76
5.2. Efectos post-antibacteriano y post-antifúngico (PAE y PAFE)	80
6. Metodología computacional	83
6.1. Cálculos DFT	84
7- Actividades enzimáticas	89
7.1. Ensayos de la capacidad de imitar la enzima superóxidodismutasa (SOD)	89
7.2. Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa alcalina (FAL)	91
Conclusiones	94
Bibliografía Capítulo 2	96
Capítulo 3	100
COMPLEJO DE Zn CON CIANO GUANIDINA Y FENANTROLINA	100
1- Introducción	100
2- Síntesis y caracterización del complejo $[Zn(fen)_2(cnge)(H_2O)](NO_3)_2 \cdot H_2O$	101
2.1. Preparativa	101
2.2. Espectroscopias FTIR y Raman	102
2.3- Determinación estructural por Rayos X	104
3- Cálculos teóricos geométricos y vibracionales	107
4- Determinación de constantes de acidez y de estabilidad. Mediciones potenciométricas	113
5- Propiedades fluorescentes	117
6- Estudios de estabilidad del complejo disuelto	118
7- Ensayos Biológicos	120
7.1. Determinación de la actividad antibacteriana	120
7.2. Determinación de la actividad antifúngica	122
7.2.1. Método de difusión en agar	123
7.2.2. Método de dilución en agar	124
7.2.3. Análisis del efecto post-antifúngico (PAFE)	125
Conclusiones	128
Bibliografía capítulo 3	129
Capítulo 4	132
COMPLEJOS DE Cd CON CIANO GUANIDINA Y FENANTROLINA	132
1- Introducción	132
2- Síntesis del complejo de Cd/cnge/fen	132
2.1. Preparativa	132
2.2 Estudio estructural del complejo	133
2.3. Comportamiento térmico	136
2.4. Espectroscopía vibracional	137
3- Metodología computacional. Cálculos DFT para el sistema Cd-cnge-fen	139

4- Estudios en solución	143
4.1. Espectros de fluorescencia	143
4.2 Titulaciones potenciométricas	144
5- Ensayos Biológicos. Ensayo de actividad antimicrobiana	147
Conclusiones	151
Bibliografía Capítulo 4	153
Capítulo 5	155
CONCLUSIONES GENERALES	155
Capítulo 6	158
Materiales y Métodos	158
1- Caracterización fisicoquímica	158
1.1. Análisis elemental	158
1.2. Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)	158
1.3. Espectros electrónicos (UV-vis)	158
1.4. Espectros infrarrojos (FTIR)	158
1.5. Espectros Raman	159
1.6. Espectros de Reflectancia Difusa	159
1.7. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	159
1.8. Determinación de las estructuras cristalinas	159
2- Estudios en solución	159
2.1. Estudios de estabilidad en solución	159
2.2. Titulaciones potenciométricas	160
2.3. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil	160
2.4. Capacidad inhibitoria de la enzima fosfatasa alcalina (FAL)	161
3- Determinación de la Actividad Antimicrobiana	161
3.1. Cepas de bacterias y hongos	161
3.2. Preparación del inóculo	162
3.3. Preparación de soluciones	162
3.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de dilución en agar	162
3.5. Determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en agar	163
4- Metodología computacional	164
ANEXO	165
Publicaciones	165
Comunicaciones a congresos	165

## Capítulo 1

### 1- INTRODUCCIÓN. BIOELEMENTOS Y SUS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN

#### 1.1- La Química de Coordinación

La Química de Coordinación es una disciplina que tiene como objeto el estudio de los compuestos en los que un grupo de moléculas, átomos y/o iones denominados ligandos rodean a una especie central generalmente un catión o un átomo metálico. Esta especie central se comporta como ácido de Lewis y como veremos más adelante, los metales de transición tienen una gran tendencia a formar este tipo de compuestos con facilidad, denominados también complejos de coordinación. El impulso de la Química de Coordinación se debe en gran parte al desarrollo de estos compuestos en el campo teórico, en los métodos de síntesis y en el campo de sus aplicaciones. La teoría del campo de los ligandos (que incluye a su vez la teoría del campo cristalino y aspectos mecánico-ondulatorios que permiten describir, mediante enlaces policéntricos, las uniones metal-ligando), consigue resolver problemas relacionados con la estructura, la naturaleza del enlace y la estabilidad de los compuestos de coordinación. Además, la teoría del funcional de la densidad (DFT) permite un conocimiento más profundo de la estructura electrónica de los compuestos de coordinación y está siendo utilizada para calcular parámetros espectroscópicos, predecir estructuras con precisión y comprender la reactividad química [1]. La ampliación y mejora de los métodos de síntesis y el desarrollo de numerosos métodos experimentales, unidos a los avances tecnológicos e instrumentales ha hecho posible la síntesis de especies complejas antes impensadas. Por otra parte el desarrollo de técnicas espectrofotométricas, ópticas, eléctricas, magnéticas, térmicas, de difracción, [2] etc. ha permitido el estudio de la estequiometría, estabilidad, estructura y propiedades de los complejos.

El comportamiento del ion metálico en el proceso de formación de una especie compleja viene dado por su carga, tamaño y configuración de la capa de valencia. Generalmente cuanto mayor es la relación entre la carga y el tamaño ( $Z/r^2$ ) del ion central, mayor estabilidad presenta el compuesto de coordinación. La configuración electrónica del ion del elemento de transición condiciona el número de coordinación y la fuerza del enlace metal-ligando.

Con relación al ligando, su tamaño y la basicidad de sus átomos donadores favorecen la formación de complejos estables [3]. Además los ligandos con dos o más átomos donadores



forman quelatos, especies complejas más estables debido al efecto más favorable en la variación de entropía asociada a su formación [4].

## 1.2. Aplicaciones de los compuestos de coordinación

La Química Analítica emplea métodos para el enmascaramiento de iones interferentes basados en reacciones de formación de complejos [5, 2]. Es además frecuente la utilización del método gravimétrico complejométrico para determinar la cantidad de metal en una muestra, por ejemplo níquel a partir del agente quelante bidentado dimetilgloximato. También son de gran relevancia los métodos de valoración complejométricos que permiten determinar el punto final de una titulación por la formación de un complejo metálico, como ser la TEA (trietanolamina) para valorar Cu(II) [6, 3]. Asimismo, dentro de la Química Industrial son frecuentes los catalizadores basados en complejos de Fe, Co, Ni y Cu entre otros, debido a su estabilidad para coordinar grupos de manera específica (efecto template) [7, 4].

La Química de Coordinación constituye uno de los campos más importantes de la Química Inorgánica, porque además de su amplitud y complejidad, se le destina un gran espacio en la investigación. Esta importancia se ve incrementada debido a su contribución al desarrollo de otras ramas de la Química. Un ejemplo de ello lo constituyen ciertos compuestos de coordinación que desempeñan un papel crucial en procesos biológicos de interés, lo cual ha originado la denominada Química Bioinorgánica. Ésta es una materia interdisciplinaria que surgió por solapamiento entre la Química Inorgánica y la Bioquímica. Sin embargo, desde su nacimiento, esta disciplina sufrió una enorme expansión ocupándose en la actualidad del estudio de una gran variedad de problemas ubicados en la interfase entre la Química y otras áreas de conocimiento como la Medicina, la Farmacología o la Toxicología.

En ciertos procesos bioquímicos numerosas moléculas esenciales para la vida forman, con ciertos biometales como el hierro y el magnesio, complejos proteicos. Además algunos iones metálicos pueden interactuar con ciertas proteínas modificando su estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria ocupando posiciones específicas en metaloenzimas [8]. Los cationes metálicos esenciales establecen enlaces e interacciones con biomoléculas (fundamentalmente con las proteínas y los ácidos nucleicos) siendo con frecuencia los responsables del mantenimiento de su estructura tridimensional y de su función biológica. Desde el punto de vista de las relaciones entre la Bioinorgánica y la Farmacología, es indispensable el estudio estructural y funcional de las metalobiomoléculas entre las que se

podrían destacar las metaloenzimas, para dilucidar los mecanismos de acción, metabolismo y excreción de los fármacos.

Numerosos complejos metálicos de coordinación con actividad antimicrobiana y antitumoral han conducido a un gran desarrollo en el campo de la medicina y la farmacología. Asimismo se ha detectado un importante aumento de productos de origen inorgánico con sustancias susceptibles de actuar como ligandos interactuando específicamente con sistemas inorgánicos causantes de desórdenes fisiológicos [9]. Debido a los importantes avances de la bioinorgánica se han adquirido conocimientos acerca de los efectos de ciertos sistemas inorgánicos sobre los sistemas biológicos y específicamente metales de transición sobre los seres humanos dando lugar al desarrollo y/o aparición de la Química Inorgánica Medicinal como nueva disciplina dentro del campo médico-farmacológico [10]. La creciente cantidad de fármacos de esta naturaleza ha permitido que se acuñe el término metalofármacos haciendo referencia a agentes terapéuticos que contienen metales como ingrediente activo. Asimismo, la presencia de xenobióticos entre los cuales se encuentran los iones de metales de transición puede conducir a la producción excesiva de radicales libres y la complejación es un recurso que presenta grandes potenciales [11]. La aplicación de los compuestos de coordinación como modelos miméticos de los centros activos de las metaloenzimas y, en las últimas décadas, en terapia y diagnóstico clínico, es de interés en el diseño y síntesis de compuestos biológicamente activos. Además para aquellos metales que resultan tóxicos para la gran mayoría de los seres vivos incluido el hombre, la Bioinorgánica se ocupa de correlacionar sus propiedades químicas y su reactividad con los mecanismos de toxicidad, así como de diseñar los posibles antídotos que permitan reducir sus efectos tóxicos.

Las investigaciones sobre metaloenzimas han experimentado un auge extraordinario en los últimos años [12]. De estos estudios se concluye que la actividad específica de estas especies está íntimamente relacionada con la estructura de sus centros activos. Dichos centros se caracterizan por contener cantidades estequiométricas de uno o varios elementos metálicos, y son considerados como complejos de coordinación en los cuales los metales están unidos de forma estratégica a determinados ligandos. La relación entre las propiedades de algunos complejos de coordinación de tipo sintético y las observadas en determinadas metaloenzimas, ha permitido a los químicos orgánicos el diseño y preparación de especies de bajo peso molecular capaces de realizar transformaciones similares a las que ocurren en los seres vivos [13].

La exposición de organismos marinos a metales como el Cu, Cd y Hg induce a la síntesis de proteínas de baja masa molecular, ricas en cisteína, las metalotioneínas (Mts) [14, 15] a las

que se les atribuyen funciones de inactivación, metabolización y detoxificación [16] de metales en diferentes tejidos del organismo [17]. Por otro lado se comprobó que la preexposición de *Perna viridis* a una dosis subletal de un metal esencial como el cobre aumentó la capacidad de incorporación de Cadmio en el organismo y su tolerancia al metal, sugiriendo un efecto protector de las Mts previamente inducidas por el Cu, al efecto tóxico de una posterior exposición a Cd. Algunos iones metálicos pueden interaccionar con las Mts para mantener o modificar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria y ocupar posiciones específicas en metaloenzimas [8]. Estas proteínas actúan como reservorio de zinc mientras previenen la toxicidad del metal involucrado en la transferencia de zinc a apo-metalotioneínas nuevamente sintetizadas. Además estas dos isoformas son inducibles por ciertas condiciones de stress y por ciertos compuestos incluyendo glucocorticoides, citoquinas, especies reactivas de oxígeno e iones metálicos [18]. De todo ello se deduce que la Química Bioinorgánica requiere los conocimientos de la Química de Coordinación, en particular en lo relativo a la forma de acción de los biometales [19].

El uso de los complejos de coordinación en el campo médico y farmacológico da cuenta de la utilización de diferentes ligandos con fines terapéuticos en los casos de envenenamiento por metales ya que forman complejos estables, solubles y no tóxicos [20]. Por otro lado, la evidencia de que un gran número de compuestos presenta actividad antimicrobiana y antitumoral, ha conducido a un gran desarrollo en el estudio de estos compuestos [21]. Los complejos de cobre(II) han sido ampliamente estudiados como fármacos antiinflamatorios, demostrando que la actividad de este tipo de compuestos es superior a la de los ligandos cuando éstos la presentan, o se genera cuando el ligando no la posee. Esto es especialmente interesante ya que parece posible que la actividad antiinflamatoria de ciertas sustancias orgánicas tenga su origen en la formación preliminar *in vivo* de los correspondientes complejos de cobre [22]. Además estos compuestos poseen actividad antiulcerosa y una menor toxicidad que otras formas inorgánicas del cobre. En el caso de intoxicación por exceso de ciertos metales, como el padecimiento de la enfermedad de Wilson, debida a trastornos en el metabolismo del cobre, y el envenenamiento con mercurio, entre otros, se recurre al tratamiento con distintos agentes quelantes terapéuticos, como será discutido más adelante [23].

### 1.3 Interés biológico de iones metálicos

Los organismos vivos tienen diferentes cantidades de metales (como iones o complejos) que intervienen en procesos bioquímicos específicos. La concentración puede variar dentro de ciertos límites cuidadosamente controlados mediante procesos biológicos de asimilación y excreción. Cuando ésta se encuentra fuera del rango considerado normal, se producen disfunciones que pueden llegar a ser graves e incluso causar la muerte del organismo en cuestión [24].

Dentro de los diferentes elementos de la corteza podemos distinguir los oligoelementos que cumplen con funciones de micronutrientes pero que superado cierto umbral resultan tóxicos (As, Co, Cr, Cu, Mn, Mg, Se, Zn) y los altamente tóxicos que no tienen una función biológica conocida (Pb, Cd, Hg, Bi). A los primeros los llamaremos biometales o metales bioinorgánicos mientras que los otros son contaminantes. La actividad de un metal depende de su concentración y de su forma química o compuestos en los que aparece en el sistema vivo o en el medio ambiente (especiación). La determinación de la especiación logra definir el estado de oxidación, la concentración y la composición de cada una de las especies presentes en solución.

El efecto contaminante de los metales radica en que pueden o bien reemplazar metales de características similares de las proteínas o enzimas, o generar estrés oxidativo: el metal interactúa con el ion superóxido (producido por la reducción incompleta del oxígeno) produciendo oxígeno y el metal en su forma reducida (reacción de Haber-Weiss) y ese metal reducido interacciona con  $H_2O_2$  produciendo radicales hidroxilo,  $HO\cdot$ , mediante la reacción de Fenton. El radical hidroxilo es una especie altamente oxidante que provoca daños en lípidos de membrana, en proteínas y en ácidos nucleicos. Estos daños metabólicos en el organismo, pueden conducir a la muerte ya que sus efectos pueden ser pre-mutagénicos.

La competencia entre los metales contaminantes y los metales esenciales se debe a que comparten los sistemas de transporte, disminuyen la concentración efectiva del metal esencial, activan receptores de membrana provocando reacciones en cadena, reemplazan a metales esenciales en biomoléculas, alterando su funcionamiento y/o reaccionan con grupos funcionales de biomoléculas, alterando su funcionamiento.

Los metales que alcanzan el núcleo celular pueden unirse al ADN, a proteínas histónicas y a proteínas no histónicas. Allí generan radicales libres que provocan la oxidación de bases o de la desoxirribosa y pérdida de bases que dan lugar a la formación de hélices sencillas, rotura de dobles hélices, formación de puente ADN-proteína y de puente ADN-ADN. Todos estos efectos son potenciales premutagénicos. Los metales afectan la fidelidad de la replicación

porque inhiben enzimas involucradas en la replicación, inhiben la síntesis de nucleótidos, alteran los procesos de metilación del ADN y de los componentes del complejo de replicación del ADN. Estos cambios pueden modificar la expresión génica, aunque no haya cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN.

En este trabajo se ha realizado un estudio de la interacción de los ligandos cianoguanidina y ortofenantrolina con los iones metálicos Cu(II), Zn(II) y Cd(II). Por esa razón, se analiza con mayor detalle el interés biológico de dichos cationes. Tanto el cobre, como el zinc y el cadmio son elementos de la tabla periódica que tienen carácter metálico y presentan una densidad superior a la media de la corteza terrestre ( $5 \text{ g.cm}^{-3}$ ).

## **2. Elementos esenciales (cobre y zinc)**

### **2.1. Cobre**

#### **2.1.1. Química del cobre**

Los complejos de cobre(II) pueden ser de tipo 1 con el característico color azul intenso, presentan una banda de absorción muy intensa a 600 nm y con un coeficiente de absorptividad molar elevado, 300 veces más que los complejos usuales de cobre(II) y son paramagnéticos [8]. Los complejos de cobre(II) tipo 2 son también paramagnéticos pero poseen un espectro electrónico típico, mientras que los complejos de cobre(II) tipo 3 resultan diamagnéticos ya que están constituidos por un par de iones cobre(II) sometidos a un fuerte acoplamiento antiferromagnético, presentan una banda de absorción muy intensa a 330 nm pero no pueden ser detectados por ESR (espectroscopía por resonancia de espín electrónico).

#### **2.1.2. Cobre en la naturaleza**

El cobre está ampliamente distribuido en plantas y animales [25], muchos de los cuales constituyen alimentos para la especie humana. Los niveles de cobre que de forma natural se encuentran en el agua de bebida pueden variar considerablemente dependiendo del tipo de rocas o suelo que ha atravesado y del uso de cañerías que contengan cobre, lo cual puede suponer una cantidad adicional considerable del metal. Los mariscos (moluscos y crustáceos), las vísceras, nueces, legumbres secas, chocolate y cacao y algunas verduras son los alimentos que mayor cantidad de cobre aportan a la dieta. La OMS estableció para el agua potable una cantidad máxima de cobre de 2 mg por litro [26]. El valor umbral límite (TLV por sus siglas en inglés: Threshold Limit Values) es de  $1 \text{ mg.cobre.m}^{-3}$

### 2.1.3. Importancia biológica del cobre

Como este elemento presenta más de un estado de oxidación, participa en los sistemas biológicos que han hecho buen uso especialmente de esta capacidad para aceptar y donar electrones (es decir, como participante en reacciones de oxidación-reducción) mientras forma complejo con alguna proteína, ya que cuenta con numerosas posibilidades de coordinación gracias a las cuales puede adaptarse fácilmente a los ligandos con átomos dadores de azufre, nitrógeno y oxígeno, como los aminoácidos de las proteínas. Las especies Cu(II) forman fácilmente complejos con los aminoácidos, generalmente más estables que los que éstos forman con otros iones metálicos. Se han identificado un número relativamente grande de metaloproteínas y otras enzimas que lo contienen, como ser citocromo oxidasa (componente terminal de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna de las mitocondrias de los mamíferos), oxidasa, oxigenasas intra y extracelulares, superóxido-dismutasa (eliminación de aniones superóxidos potencialmente perjudiciales), lisiloxidasa (secretada al espacio extracelular del tejido conectivo contribuye a la formación de enlaces entrecruzados característicos de las moléculas de colágeno y elastina), ceruloplasmina (transporte de cobre: aloja mayor cantidad de cobre extracelular en plasma y líquido intersticial), dopamina betahidroxilasa (biosíntesis de catecolaminas del SNC y en la médula adrenal), triptófano oxigenasa hepática y tirosinasa [27]. El cobre es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, después del hierro y el zinc.

Todos los fluidos del cuerpo contienen complejos de cobre. Un organismo humano adulto contiene entre 60 y 80 mg de cobre como constituyente de proteínas, no como ión libre, sino formando parte principalmente de enzimas implicadas en los procesos biológicos en los que participa, entre los que cabe destacar el metabolismo del hierro, la formación de colágeno, elastina y queratina, la síntesis de hemoglobina y catecolaminas, procesos detoxificantes y del metabolismo oxidativo [28]. Además, debido a su afección por ligandos con S y N, se une a grupos tiólicos de la membrana celular provocando la lisis. Los complejos de cobre pueden potenciar la acción antiinflamatoria de ciertos fármacos y se ha comprobado que pueden inducir "*in vitro*" los procesos de apoptosis con lo que se confirma la actividad anticancerosa de algunos quelatos de cobre [22, 29].

### 2.1.4. Metabolismo del cobre

El cobre que se ingiere con la dieta es absorbido en el estómago e intestino delgado entre un 30 y un 60%. Esta absorción es favorecida por la presencia de ciertos aminoácidos y

proteínas y es interferida fuertemente por la presencia de zinc. El metabolismo del cobre se centra en el hígado, que es además el principal órgano reservorio, donde se genera la cuproproteína más abundante del plasma, la ceruloplasmina, entre otras enzimas que contienen el metal. También puede acumularse en el hígado, cerebro, músculo, riñón, corazón, y en la parte pigmentada del ojo, encontrándose altas concentraciones en el fluido biliar que es su principal ruta excretoria (80%). La orina y el sudor contienen niveles muy bajos de cobre. El cobre no absorbido se excreta en la materia fecal [27]. En los hepatocitos el cobre se encuentra en su mayor parte en el citoplasma combinado con proteínas (metalotioneína, superóxido dismutasa y proteínas similares) [30].

#### **2.1.5. Toxicidad del cobre**

No se conocen casos de toxicidad por cobre excepto aquellos por ingestas voluntarias o por un envenenamiento agudo causado por el consumo accidental de agua contaminada, durante la hemodiálisis, por fungicidas ( $\text{CuSO}_4$ ), o debido a desórdenes genéticos, como la ya citada enfermedad de Wilson [31]. Los efectos de esta intoxicación son hemólisis intravascular y necrosis hepatocelulares. Asimismo, la exposición continuada puede causar cirrosis.

#### **2.1.6. Deficiencia del cobre**

Como todo elemento esencial, su carencia o defecto también genera enfermedades por ejemplo, anemia, disminución de glóbulos blancos, disminución de plaquetas, osteoporosis y fragilidad del hueso, menor crecimiento, disminución de las defensas, mayor frecuencia de infecciones pulmonares severas, menor pigmentación de la piel y pelos, aumento del colesterol, aumento de la glucosa en sangre, alteraciones del ritmo cardíaco, aumento de la presión arterial, malformaciones o menor crecimiento del feto, compromiso de la fuerza y coordinación muscular y de la sensibilidad, daño cerebral y retardo mental, pelo retorcido y dilatación de vasos sanguíneos (éstos tres últimos sólo en la enfermedad de Menkes) [32, 33].

#### **2.1.7. Enfermedades relacionadas con el Cobre**

Existen dos desórdenes genéticos íntimamente ligado al cobre: la enfermedad de Wilson y la enfermedad de Menkes. Para ambas se han descubierto los genes involucrados que guardan estrecha relación con el cobre (gen  $\text{ATP7A}$  para la enfermedad de Menkes y gen  $\text{ATP7B}$  para la enfermedad de Wilson). La enfermedad de Wilson, también denominada

degeneración hepatolenticular, se caracteriza por excesiva acumulación de cobre en hígado, cerebro, riñón y córnea. Su etiología es la insuficiente síntesis de ceruloplasmina. Cursa con afectaciones hepáticas, biliares y del sistema nervioso y es progresiva y fatal. Frente a un exceso del biometal, se usan agentes quelantes como D-penicilamina, trientina para el tratamiento de la enfermedad de Wilson (quelatoterapia). La enfermedad de Menkes se caracteriza por bajos niveles de cobre en cerebro e hígado y muy altos en otros órganos debido a una alteración en la síntesis de la metalotioneína [34]. Para la enfermedad de Menkes el cobre puede suministrarse mediante suplementos de complejos de cobre con aminoácidos o pequeños péptidos.

## **2.2. Zinc**

### **2.2.1. Química del zinc**

El zinc actúa como catión divalente en sus funciones bioquímicas cuando se une a enzimas y otras proteínas. Es redox inerte, presenta un único estado de oxidación estable, Zn(II), por eso no puede participar en procesos redox. Su fuerza ácida se ve exaltada con bajos índices de coordinación. Su configuración electrónica estable  $3d^{10}$  hace que su efecto polarizante sea isotrópico y que presente gran flexibilidad de coordinación (números de coordinación cuatro, cinco, seis). Esta flexibilidad y el hecho de que el agua y el OH<sup>-</sup> puedan entrar y salir fácilmente de su esfera de coordinación, facilita su reactividad e influye positivamente la cinética de los procesos en los que participa [8]. Los complejos de zinc son incoloros y diamagnéticos, lo cual dificulta su identificación y caracterización.

### **2.2.2. El zinc en la naturaleza**

El zinc se encuentra ampliamente distribuido y es indispensable para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, plantas y animales. Se encuentra en numerosos alimentos y bebidas, pero los contenidos son variables. En general son los productos de origen marino, principalmente los mariscos (ostras y crustáceos), los alimentos más ricos en zinc, seguidos de las carnes rojas, derivados lácteos y huevos, y los cereales integrales. En estos alimentos el zinc se halla asociado particularmente a las proteínas y ácidos nucleicos, lo que va a condicionar en cierta medida su biodisponibilidad [35, 36]. Las grasas, pescados y dulces, así como también los vegetales en general (verduras, hortalizas y frutas), con excepción de las leguminosas, no son alimentos que presenten altos contenidos en zinc. Además, el zinc procedente de los



alimentos vegetales es de menor biodisponibilidad debido a la presencia de ácido fítico que forma complejos insolubles poco absorbibles [37, 38].

### **2.2.3. Importancia biológica del zinc**

Es uno de los elementos esenciales más abundantes en el cuerpo humano, el segundo oligoelemento en cantidad, superado sólo por el hierro. Las primeras referencias del zinc como elemento esencial para el sistema biológico humano datan de 1956 cuando se estudió el metabolismo del zinc en individuos cirróticos [39] y hoy se sabe del papel fundamental del metabolismo del zinc para salvaguardar la salud y el rendimiento del cerebro.

Cada individuo adulto tiene entre 1 y 2,5 g de zinc como ion intracelular (mayormente en el citosol). En muchas proteínas 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, el zinc resulta indispensable tanto para la estabilidad como para la función catalítica de las mismas. Este metal participa en las reacciones de biosíntesis y degradación de proteínas; en procesos biosintéticos de ácidos nucleicos y compuestos hemo y en el transporte de CO<sub>2</sub> [40]. El zinc puede acumularse en metalotioneínas de todos los tejidos, tiene afinidad por grupos -SH y -OH de aminoácidos, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos con diversos efectos. En altas concentraciones es desestabilizante del ADN, membranas, ribosomas y lisosomas [41]. Provoca la disminución del contenido celular de hierro y cobre. TLV 1mg zinc.m<sup>-3</sup>

El Zn interviene en los procesos bioquímicos necesarios para el desarrollo de la vida como ser la respiración celular, la utilización de oxígeno por parte de la célula, la replicación tanto de ADN como de ARN (ácido ribonucleico), el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la membrana celular y la eliminación de radicales libres, proceso que se hace a través de una cascada de sistemas enzimáticos [42]. Se han identificado más de 200 sistemas en los cuales el zinc actúa como cofactor y como integrante de 300 metaloenzimas que dependen de él para ejercer su función [43]. Desempeña funciones catalíticas, estructurales y de regulación que definen su papel biológico esencial. Por ejemplo, en la enzima citosólica superóxido dismutasa CuZn, el cobre asume función catalítica mientras que el zinc ejerce la función estructural [44]. En los “dedos de zinc” estabiliza la estructura de una serie de proteínas y regulan la expresión de genes al actuar como factores de transcripción (uniéndose al ADN e influenciando la transcripción de genes específicos) y se han localizado en muchos receptores de membrana. El zinc también juega un papel en la señalización celular, y se ha

encontrado que influye en la liberación de hormonas y en la transmisión del impulso nervioso. Actualmente se sabe que el zinc participa en la apoptosis (muerte celular coordinada genéticamente), un proceso de regulación celular fundamental con consecuencias en el desarrollo y el crecimiento, como también en una serie de enfermedades crónicas [45]. Se reconoce su importante papel en el sistema inmunológico ya que las células mediadoras en las funciones inmunes decrecen en las deficiencias de Zn. La pérdida de zinc desde las membranas biológicas incrementa su susceptibilidad al daño oxidativo y deteriora su función [46]. Se plantea entonces el uso del zinc como un antioxidante y que además puede estabilizar las membranas celulares al igual que la vitamina E.

#### **2.2.4. Metabolismo del zinc**

Las concentraciones séricas o plasmáticas de zinc experimentan oscilaciones circadianas, disminuyen durante el estrés y se hallan sometidas a depresiones posprandiales (después de las comidas) transitorias. Una ingesta excesiva de zinc puede incrementar en varias veces sus concentraciones sanguíneas. Entre el 3 y el 38% del zinc de la dieta se absorbe en el tubo digestivo proximal (intestino delgado). Esta absorción del zinc parece estar regulada por la síntesis de una proteína intestinal denominada metalotioneína (proteína de bajo peso molecular rica en cisteína) que tiene la capacidad de ligar diferentes metales divalentes como el Zn, Cu y Cd. Esta proteína actúa como ligando que amortigua la absorción del Zn [47]. La absorción también depende de las cantidades de Zn en la dieta y la presencia de sustancias que interfieren con él, tales como: la fibra y los fitatos (que forman complejos disminuyendo su absorción), el Ca, Cu y Cd (que compiten y pueden reemplazar al Zn en la proteína transportadora dificultando su absorción) [48]. La glucosa, la lactosa y determinadas proteínas favorecen la absorción de Zn.

La velocidad inicial de captación de Zn por los tejidos a partir de una dosis oral dada es mayor en el hígado, seguido de la médula ósea, el hueso, la piel, el riñón y el timo, en este orden. El zinc liberado por las células intestinales en los capilares mesentéricos es transportado hasta el hígado, siendo la albúmina la proteína transportadora más importante, de forma que el 70% del zinc plasmático se encuentra unido a la albúmina y el resto a la alfa macroglobulina, transferrina y algunos aminoácidos como cisteína e histidina. La mayor parte del zinc es intracelular. El 90% se distribuye principalmente en los tejidos óseo y muscular y el resto se localiza en la piel, el hígado, el páncreas, la retina, las células hemáticas y los tejidos gonadales en el varón. El Zn contenido en los hematíes, músculo, pelo y testículos se

intercambia más rápidamente que el contenido en el esqueleto y dientes. En el músculo, el encéfalo, los pulmones y el corazón las concentraciones son relativamente estables y no responden a las variaciones del contenido del metal en la dieta. En otros tejidos como el hueso, los testículos, el pelo y la sangre, la concentración tiende a reflejar la ingesta dietética del mismo [49]. Para valorar su estatus en el organismo se usan principalmente como biomarcadores los niveles en suero, plasma y eritrocitos [50]. La sangre total contiene aproximadamente diez veces más zinc que el plasma, debido a la presencia de este catión en la enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica. Se excreta por las heces a través de las secreciones pancreáticas biliares o intestinales y de las células mucosas descamadas, también es excretado en la superficie corporal como parte de una descamación epitelial y en menos de un 2% por la orina, viéndose aumentadas las pérdidas renales en pacientes con nefrosis, alcoholismo, cirrosis hepática y con estados de estrés metabólico [51]. Otras vías de excreción de Zn son el sudor, el crecimiento del pelo y la descamación de la piel.

#### **2.2.5. Toxicidad del zinc**

El zinc es el menos tóxico de todos los oligoelementos, y aunque su margen de seguridad (diferencia entre la dosis tóxica y la dosis recomendada) es muy amplio, existen reportes de brotes aislados de toxicidad por zinc como resultado del consumo de alimentos o bebidas contaminados con el zinc liberado por contenedores galvanizados o como consecuencia de la ingesta de dosis relativamente elevadas durante un cierto período de tiempo [52]. Se ha demostrado cómo en hombres, un elevado consumo de suplementos de zinc produce un riesgo significativamente mayor de cáncer avanzado de próstata, así como la inhibición de los efectos beneficiosos de los biofosfonatos, el incremento de los niveles de testosterona, incremento de colesterol, reducción de los niveles de HDL (High Density Lipoprotein Cholesterol) y puede fomentar una disfunción inmune. Una suplementación con zinc, especialmente en altas dosis, también puede producir otros efectos adversos como interferir y disminuir el estatus corporal de cobre. Elevadas dosis diarias de zinc en forma de suplementos pueden provocar hipocupremia con anemia, leucopenia y neutropenia, además de una nefrosis [53, 54]. Los efectos tóxicos remiten al suprimir el consumo de zinc. La inhalación de altas concentraciones de este metal, concretamente en forma de cloruro de zinc, puede causar neumonitis y un síndrome respiratorio en el adulto [55].

El nivel superior de ingesta (Upper Intake Level, UIL) se define como el nivel más alto de la ingesta diaria de un nutriente que no supone riesgos o efectos adversos sobre la salud. Para

el Zn, el UIL es de 40 mg/día (proveniente de la ingesta total: alimentos, agua y suplementos) [56].

#### **2.2.6. Deficiencia de zinc**

Los estados carenciales de zinc pueden estar causados por diferentes factores como son: ingesta insuficiente, problemas en la absorción intestinal o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de determinadas enfermedades. Mucho de lo que se conoce respecto a la deficiencia severa de zinc fue el resultado de un estudio en individuos nacidos con acrodermatitis enteropática. Algunas condiciones que incrementan la mala absorción y la pérdida de zinc tienen lugar en individuos sometidos a nutrición parenteral con ausencia total de zinc, en los que abusan del alcohol, y en aquellos que están tomando ciertos medicamentos como la penicilamina [57]. Las quemaduras graves o la diarrea prolongada, también pueden provocar una deficiencia severa de zinc. Los síntomas característicos son disminución del crecimiento, maduración sexual tardía, erupciones cutáneas, diarrea crónica, inmunodeficiencia, cicatrización lenta de heridas, anorexia, disminución en la sensación del gusto, ceguera nocturna, hinchazón y opacamiento de las córneas y trastornos del comportamiento [50].

Una dieta con alto contenido en fitatos (presente en vegetales) y falta o escasez de alimentos de origen animal provoca manifestaciones clínicas leves de la deficiencia de este elemento especialmente en niños causando disminución del desarrollo físico y neuropsicológico y aumento del riesgo de infecciones [58]. Se ha postulado la deficiencia de zinc como un factor de importancia en la esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer, isquemia cerebral transitoria, ataques de apoplejía y daños cerebrales [59]. Las alteraciones en la homeostasis del zinc se relacionan con disminución de los niveles de fosfatasas alcalinas. La deficiencia de zinc puede estar asociada con un incremento en el riesgo de padecer cáncer debido a sus propiedades antioxidantes y a su participación en la función inmunológica y frente al estrés oxidativo [60].

Normalmente concentraciones de zinc en plasma y cabello inferiores a 50 mg/100 ml ó 70 mg, respectivamente, son indicativas de deficiencia, aunque es conveniente la determinación del contenido de anhidrasa carbónica de hematíes, fosfatasa alcalina en suero y saliva y medición de la absorción y excreción utilizando Zn. La suplementación con zinc durante el embarazo se asocia con una incidencia más baja de partos prematuros principalmente en mujeres de bajos recursos [61].

### **2.2.7. Enfermedades relacionadas con el zinc**

Existen una enfermedad congénita sumamente rara conocida como acrodermatitis enteropática, un trastorno genético causado por un deterioro en la captación y transporte del zinc, que conlleva la incapacidad del individuo para absorber en forma adecuada el zinc. Antes de que se conociera la causa de esta enfermedad, los pacientes morían habitualmente en la infancia. Actualmente la terapia con zinc oral resulta en la remisión completa de los síntomas y debe ser mantenida de por vida [44]. La carencia de zinc no se ha considerado como un problema serio de salud pública en ningún país del mundo, ni tampoco se ha descrito claramente ningún síndrome de enfermedad por falta de zinc. Sin embargo, muchas enfermedades comentadas anteriormente están relacionadas directa o indirectamente con el zinc: partos prematuros [61], inmunodeficiencia y riesgo de cáncer [60], Parkinson, Alzheimer y otros trastornos neurológicos como la isquemia transitoria del prosencéfalo, convulsiones y lesión cerebral traumática [59].

## **3. Elementos tóxicos (Cadmio)**

El vocablo cadmio significa calamina, nombre que recibía antiguamente el carbonato de cinc. El elemento cadmio lleva este nombre porque fue descubierto en Alemania en 1817 por Friedrich Stromeyer como una impureza en el carbonato de cinc [62]. El cadmio es un metal no fisiológico que presenta reacciones de toxicidad variadas y en su forma catiónica Cd(II) presenta fuertes analogías con el zinc y el calcio, lo cual da cuenta de sus principales efectos tóxicos.

### **3.1. Cadmio en la naturaleza**

El cadmio generalmente no se halla en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos de zinc, plomo y cobre. Un dato trascendental es que menos de 5% del metal puede ser reciclado, por lo que es importante considerar la contaminación ambiental que provoca [63]. El tiempo de permanencia del cadmio en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse [64]. Pero el cadmio se encuentra presente también en el aire y en el agua y la US Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental Americana) lo considera como uno de los 126 contaminantes prioritarios [65]. Un ejemplo de fuentes naturales es la

erosión de depósitos minerales en los que se encuentra en forma de sulfuro y óxido y asociado a depósitos de zinc con otros minerales con la blenda y la asfalerita. Está naturalmente presente en diversas concentraciones en la roca de fosfato extraída para ser utilizada como fertilizante. El cadmio es liberado por las emisiones volcánicas y por la quema de combustibles fósiles y de biomasa [66]. Los incendios forestales y el transporte por el viento de las partículas del suelo generan cantidades variables de cadmio en el aire. En la población general (no ocupacional, no fumadores) la comida y los cigarrillos son las principales fuentes de exposición al cadmio [67].

Las fuentes antropogénicas asociadas a actividades industriales como ser refinamiento de zinc, soldaduras, pinturas, baterías, reactores nucleares, galvanoplastia y estabilizante de PVC entre otros, añaden de 3 a 10 veces más cadmio a la atmósfera que las fuentes naturales [68]. También la minería, la metalurgia, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la incineración de residuos de madera, carbón o “plásticos”, la combustión de aceite y gasolina, el humo del cigarrillo y diversas aplicaciones industriales son fuentes antropogénicas de cadmio.

### **3.2. Metabolismo tóxico del cadmio**

En condiciones normales, cuando el cadmio entra al torrente sanguíneo (por absorción en el estómago o en los intestinos, luego de la ingestión de comida o agua, o por absorción en los pulmones después de la inhalación) y su concentración es pequeña, la mayor parte queda retenida en la mucosa intestinal, principalmente unida a la metalotioneína (MT), y es eliminada posteriormente con la descamación de la pared [69, 70]. Cuando la dosis oral de cadmio es elevada, el metal libre atraviesa la mucosa para pasar a la circulación sanguínea. La absorción a nivel intestinal se produce en dos etapas: en la primera, las células de la mucosa internalizan el cadmio presente en el lumen intestinal; y en la segunda etapa, una parte del cadmio atraviesa la membrana lateral de los enterocitos para pasar a la circulación sanguínea [71]. El cadmio absorbido por vía transcutánea alcanza sólo un 4%. Una vez absorbido, se transporta por la sangre, ligado de modo principal a células hemáticas y albúmina. Llega en primer término al hígado, para ser redistribuido lentamente de ahí a los riñones en forma de complejo de cadmio-metalotioneína (Cd-MT). Entre el 40 y 80% del cadmio presente en el organismo se almacena en el hígado y los riñones [72, 71].

El cadmio captado por el hígado se combina con el grupo sulfhidrilo de glutatión (GSH) y se excreta en la bilis o bien, se liga a la metalotioneína creando una forma de depósito del

metal. Parte de este complejo Cd-MT pasa al plasma [63] y al ser captado por las células renales, penetra en los lisosomas donde la metalotioneína es degradada en sus aminoácidos componentes y se libera el cadmio que pasa al citosol. En el riñón sólo se excreta 1 a 2% del cadmio tomado directamente de las fuentes ambientales, lo que provoca una acumulación dentro de dicho órgano 10.000 veces más alta que en el torrente sanguíneo [72, 71]. Cualquiera sea la vía de entrada se produce una irritación por precipitación de proteínas. El cadmio absorbido se excreta principalmente por orina y en menor cantidad con la bilis, aunque pequeñas porciones puedan eliminarse con sudor, pelo y aún secreción gastrointestinal, pero el Cd que sale con heces en su mayor parte es el que no se absorbió [73]. El contenido corporal de cadmio se incrementa con la edad hasta los 50 años y se acumula en la mayor parte de los tejidos durante el envejecimiento [74]. En los adultos, la carga corporal de cadmio puede llegar a 40 mg y alcanza al doble en fumadores [75]. La semivida del cadmio en el cuerpo es de 10 a 30 años. En consecuencia, el metal tiene la propensión a acumularse en órganos como el riñón, hígado y pulmón y con la exposición ambiental continua aumentan las concentraciones históricas del metal durante toda la vida [63].

### **3.3. Importancia biológica del cadmio**

El cadmio, dentro de los metales pesados, es considerado una genotoxina (agentes tóxicos capaces de interactuar con el material genético de los organismos, alterándolo y produciendo mutaciones) porque aunque es incapaz de generar directamente radicales libres, participa indirectamente en la formación de superóxido, hidroxilo y óxido nítrico. Esto es debido a que puede reemplazar al cobre y al hierro en diversas proteínas citoplasmáticas y de membrana aumentando la cantidad de iones hierro y cobre libres que inducen el estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton [76].

El cadmio no puede atravesar las membranas biológicas debido a su escasa tendencia a formar complejos organometálicos, por lo que utiliza los canales de Ca(II). La toxicidad del cadmio resulta potenciada cuando los bioelementos zinc, cobre, calcio, hierro y selenio se encuentran en deficiencia.

La acción tóxica del cadmio se debería a su afinidad por radicales de los grupos –SH, –OH, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil y a su actividad competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales como cinc, cobre, hierro y calcio [77].

El cadmio(II) puede desplazar al Zn(II) de sus sitios activos y compite con el Ca(II) en ciertos sistemas biológicos como el hueso. Además provoca la inhibición de enzimas,

desorganización de microtúbulos, altera la membrana, incrementa la glucólisis, inhibe la respiración celular y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. TLV 0,01mg cadmio.m<sup>-3</sup>.

### 3.4. Toxicidad del cadmio

Los efectos tóxicos del cadmio se manifiestan principalmente en los huesos y los riñones y también en los pulmones pero se tiene menos evidencia de sus efectos neurotóxicos, teratogénicos o alteradores del sistema endocrino. Puede causar osteoporosis, osteomalacia, enfisema no hipertrófico, lesión tubular renal irreversible con necrosis del tejido renal, anemia, eosinofilia, anosmia y rinitis crónica [78]. El cadmio ha sido clasificado como carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, [79] y el Programa Nacional de Toxicología [80]. Puede causar cáncer en pulmón, próstata, páncreas y riñón. Las manifestaciones clínicas de la exposición al cadmio pueden clasificarse, de acuerdo con el tiempo (agudas y crónicas) y el modo de dicha exposición (inhalación e ingestión principalmente) [70].

Los síntomas de intoxicación aguda incluyen fuertes dolores de cabeza, vómitos, calambres abdominales e hipertensión. En estos casos los efectos tóxicos se deben a la inhibición de enzimas como la carboxipeptidasa, que utilizan el zinc como cofactor. Además el cadmio compite por sitios de unión al calcio en proteínas como la calmodulina.

Las mutaciones se producen tanto en las células germinales como en las células somáticas. Los cambios que se generan en los gametos pueden provocar esterilidad en el individuo portador o bien fijarse en el material genético, lo cual se traduce en cambios heredables. Si las mutaciones se producen en células somáticas el individuo puede desarrollar enfermedades, o bien iniciar el proceso canceroso. Los cambios genéticos también pueden provocar alteraciones en el embrión durante el desarrollo embrionario. Se ha demostrado en animales es que el cadmio es teratógeno y embriotóxico [81]. Existe una correlación del 58% entre las concentraciones de cadmio en la sangre de la madre y las del cordón umbilical. En animales de experimentación expuestos a altas concentraciones ambientales del metal, se manifestaron graves alteraciones neurotóxicas. Por otro lado la exposición conjunta de la madre a cadmio y lindano (agente ectoparasiticida empleado en shampoos) aumenta el riesgo de toxicidad en el embrión produciendo una reducción significativa en el peso corporal de presas y cachorros de animales de experimentación y un aumento de las muertes embrionarias totales. Los grupos coexpuestos mostraron además deformidades esqueléticas como costillas onduladas, insuficiente osificación del cráneo y reducción de vértebras caudales [82]



### 3.5. Enfermedades relacionadas al Cadmio

Existe una enfermedad que afecta principalmente la zona de cultivo de arroz del sureste asiático llamada **itai-itai** que produce desmineralización (deformidades, postura encorvada, marcha de pato, dolor lumbar inducido por la percusión vertebral), disentería y problemas renales. Hoy se sabe que ésta es causada por envenenamiento por cadmio arrojado como residuo del trabajo de minería en la parte alta del río Jinzu que atraviesa la isla principal de Japón y que anega las zonas de cultivo de arroz [83]. Esta contaminación se traslada al arroz y agua de bebida y a los alimentos marinos produciendo osteomalacia incapacitante y aumento de la incidencia de fracturas con manifestación de cuatro disfunciones: disnea, daño renal, dolor óseo y articular y deformidades. Los pacientes que sufren una acumulación crónica de cadmio y que son también fumadores suelen presentar además coloración amarillenta en los dientes [84]. Uno de los indicios típicos y tempranos de larga exposición al cadmio es la insuficiencia renal aguda capaz de ocasionar una lesión tubulointersticial [85]. En concentraciones de  $200 \mu\text{g. g}^{-1}$  o mayores, el cadmio daña el tejido renal y ocasiona proteinuria. Afecta sobre todo a las enzimas e interactúa con grupos -SH de las proteínas, generando radicales libres. La reabsorción en los túbulos renales proximales se ve afectada y se manifiesta con intensa proteinuria tubular, que puede resultar en una excreción de proteínas totales 10 veces superior a lo normal [86] y se observa excreción de glucosa, aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular, como la beta 2 microglobulina, en orina.

Los pulmones son considerados órganos críticos en la exposición al polvo de cadmio. Los síntomas incluyen tos, expectoración, disnea, molestias torácicas y en los casos más severos edema pulmonar. Las alteraciones incluyen enfisema pulmonar, disminución del volumen respiratorio, obstrucción de flujo de aire, bronquitis obstructiva crónica y fibrosis pulmonar [87]. Las alteraciones óseas surgen por la exposición crónica a concentraciones elevadas de cadmio y causan osteomalacia y osteoporosis [88] y fracturas espontáneas de huesos.

Los fumadores presentan elevados niveles de este metal tanto en riñón como en sangre debido a que la hoja de tabaco acumula de manera natural, altas concentraciones de cadmio y esto favorece su acción carcinogénica en pulmón y en próstata. El cadmio asociado al plomo, produce efectos severos en el sistema reproductivo de hombres y mujeres especialmente si su exposición tuvo lugar en la prepubertad [89].

### 3.6. Tratamiento para detoxificación del cadmio

A pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) fijó una ingestión semanal tolerable provisional de  $7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de peso corporal [90] es importante resaltar que no existen reglas sobre el control de cadmio en los artículos de uso diario y también el hecho de que ninguna organización internacional se pone de acuerdo en la cantidad de cadmio exacta que provocaría daños a la salud a corto o largo plazo [91].

Existen plantas (*Spartina densiflora*) y animales (caracol común *Helix pomatia* y trucha alpina: *Salvelinus alpinus*) que participan en procesos de detoxificación de metales [92]. En las plantas el cadmio que ingresa a las células atraviesa la pared de las vacuolas y allí se compleja con fitoquelatinas y/o ácidos orgánicos. En los animales los procesos implicados en la detoxificación incluyen sistemas de gránulos y metalotioneínas (Mt) [93]. Algunas Especies de cefalópodos de diferentes áreas del mundo demostraron altos niveles de cadmio lo que sugiere que estos organismos han desarrollado mecanismo eficientes de detoxificación. El cadmio en estos casos se encuentra mayormente asociado a proteínas del citosol, no a Mt [94].

Algunas levaduras han desarrollado estrategias diferentes para la detoxificación de cadmio en forma de CdS. Actualmente la ingeniería genética propone la utilización de bacterias genéticamente modificadas para la biorremediación de metales pesados, en este caso se cambia el estado de oxidación del metal para hacerlo menos tóxico [95]. El ácido etilendiamina tetra acético, EDTA, una sustancia que elimina metales indeseables del cuerpo, ha sido usado por décadas por la medicina tradicional para tratar intoxicación de metales pesados, tal como un exceso de plomo, mercurio, y cadmio [96].

## **4. Generalidades**

### **4.1. Quelatoterapias**

Dentro del campo de la Medicina y la Farmacología se ha logrado aumentar la cantidad de medicamentos con productos nuevos de origen inorgánico y con sustancias susceptibles de actuar como ligandos formando quelatos e interaccionando de forma muy específica con sistemas inorgánicos causantes de desórdenes fisiológicos. Los quelatos son complejos formados con ligandos con dos o más sitios de coordinación, produciendo un anillo heterocíclico. Un quelante es un ligando polidentado que coordina al metal por dos o más átomos dativos. La formación de quelatos polidentados da por resultado un compuesto mucho más estable que los complejos con ligandos monodentados y esto se explica por efectos

entrópicos dado que luego de la primera coordinación las demás etapas se producen liberando ligandos monodentados, aumentando la entropía del sistema: efecto quelato [97].

Los agentes quelantes deben ser hidrosolubles, capaces de penetrar en los tejidos de almacenamiento de metales y tener baja afinidad por metales esenciales. Entre ellos están: -BAL-*British Anti-Lewisite*- (dimercaprol): Se ha utilizado en las intoxicaciones por arsénico, mercurio y plomo; DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico) y DMSA (ácido meso-2,3-dimercatosuccínico o Succimer): derivados del BAL, hidrosolubles, empleados en la intoxicación crónica por los mismos agentes; Derivados del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): la sal cálcico disódica es capaz de quelar diversos metales pesados pero se ha empleado sobre todo en las intoxicaciones por plomo; Penicilamina ( $\beta,\beta$ -dimetilcisteína): Se emplea por vía oral para las intoxicaciones por plomo, arsénico y mercurio; Desferoxamina: forma complejos con el hierro.

Un agente quelante o antagonista de metales pesados, es una sustancia que administrada en el cuerpo promueve la formación de complejos con iones de metales pesados para evitar la toxicidad de éstos. Como se mencionó anteriormente, los metales pesados no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano y persisten en el organismo, donde ejercen sus efectos tóxicos cuando se combinan con uno o más grupos reactivos (ligandos) esenciales para las funciones fisiológicas normales. Los agentes quelantes se diseñan para competir con los metales por los grupos reactivos fisiológicos para evitar o revertir sus efectos tóxicos e incrementar su excreción. Los quelatos resultantes que se forman en el cuerpo son solubles en agua y se excretan intactos en gran parte por la orina, a una velocidad más rápida que la esperada para el metal en sí.

Los agentes quelantes naturales son aminoácidos que tienen la capacidad de atrapar en su molécula a los iones de minerales y metales bivalentes que se puedan encontrar durante su recorrido por el flujo sanguíneo, entre ellas el glutatión y varias enzimas y vitaminas [97]. En la actualidad, se están utilizando tratamientos de quelatoterapia oral/sublingual para limpiar el organismo de la toxicidad de metales pesados y sedimentos dañinos de calcio en las arterias, para ayudar a licuar la sangre y prevenir la formación de coágulos reduciendo el riesgo de un ataque cardíaco o un derrame cerebral, también para bajar la presión arterial y los niveles de colesterol, así como para neutralizar los radicales libres (una de las principales causas de la aterosclerosis y de la aceleración del envejecimiento).

El EDTA es capaz de actuar sobre los depósitos calcáreos que se forman en las paredes internas de las arterias aunque deja completamente intacto el calcio de los huesos. Al retirar el

calcio depositado y los restos de metales pesados, las arterias recobran su elasticidad natural. Con ello el organismo consigue proporcionar una mejor nutrición a las células y se vuelven a poner en acción diversos sistemas enzimáticos que antes se encontraban reprimidos. Si bien el EDTA elimina parte del calcio localizado en los ateromas, su acción principal se basa en la eliminación de metales de transición como el cobre y el hierro o de metales tóxicos como el plomo, mercurio, cadmio y otros. Los primeros actúan como potentes catalizadores en las reacciones de los radicales libres que, como dijimos, posiblemente sean los procesos subyacentes responsables del desarrollo de la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad. Los segundos son por sí mismos extremadamente tóxicos para cualquier organismo vivo. Por lo tanto, el mayor beneficio del tratamiento con EDTA parecería ser su capacidad para reducir drásticamente la producción de radicales libres al eliminar los catalizadores metálicos que se van acumulando a medida que el individuo envejece.

La Terapia de Quelación está orientada a reducir los depósitos de calcio, remover los metales pesados que alteran el sistema enzimático antioxidante, controlar la peroxidación de las grasas y disminuir la adhesividad de las plaquetas. Si tomamos en cuenta que la aterosclerosis es uno de los procesos directamente relacionados con el envejecimiento, se entiende por qué la quelatoterapia previene el envejecimiento prematuro y promueve una mejor nutrición de los tejidos y órganos del paciente, logrando así mejores estados de bienestar y salud en general.

El ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA, Succimer) es un agente quelante por vía oral que se utiliza comúnmente para el tratamiento de metales en la sangre. Es un análogo de dimercaprol soluble en agua pero tiene un índice terapéutico más amplio y tiene ventajas con respecto a dimercaprol y CaNa<sub>2</sub>EDTA. Succimer es una molécula de cuatro carbonos con dos grupos carboxilo y dos sulfuros. Los metales como plomo y cadmio se unen a átomos de azufre y oxígeno contiguos mientras que arsénico y mercurio se unen a ambos átomos de azufre lo que da como resultado un compuesto soluble en agua, pH dependiente [98]. El compuesto se absorbe rápidamente alcanzando la concentración máxima en 3 horas después de administrar una dosis de 10mg/kg en voluntarios humanos adultos. DMSA parece estar unido en primer lugar a la albúmina del plasma a través de un enlace disulfuro con la cisteína [99] y podría eliminarse por orina, materia fecal y se estima también una recirculación enterohepática [100].

Como ya se mencionó, cada célula en el cuerpo fabrica sus propios agentes quelantes (quelantes naturales) tales como la cisteína, la histidina, glutamina, metalotioneínas y otras destinadas a eliminar los metales pesados y otras toxinas que forman parte de nuestra alimentación, cosméticos y hábitos diarios [101]. A medida que envejecemos, nuestras células

producen menos y menos de estos agentes quelantes. Así, a lo largo de nuestra vida, la suplementación es cada vez más importante para eliminar los metales pesados y otras toxinas de nuestros cuerpos. Por lo tanto un aumento en el consumo dietético de proteínas de plantas y animales es muy recomendable para mantener la quelación natural activa. Muchas son las sustancias que actúan como quelantes, entre ellos, los aminoácidos. Por ejemplo, nuestros cuerpos sólo pueden sintetizar cisteína de una cantidad suficiente de metionina proveniente de proteínas ingeridas en la dieta y así pueden movilizar los extractos de cadmio, plomo, arsénico y mercurio para ser eliminados.

Las dudas con respecto a la eficacia y seguridad de los agentes quelantes han despertado el interés en buscar terapias alternativas seguras y accesibles en las plantas medicinales. Tanto los compuestos organosulfurados como los flavonoides son conocidos por sus propiedades antioxidantes y de quelación de metales pesados [102]. El azufre forma parte del glutathione, un tripéptido particularmente importante compuesto por tres aminoácidos, cisteína, glicina y ácido glutámico, que reacciona con las toxinas formando un producto soluble en agua (quelato) que puede eliminarse por los riñones, ayuda a la homeostasis celular y es un poderoso antioxidante que remueve los metales pesados [103]. Una deficiencia del glutathione aumenta la toxicidad de las sustancias venenosas porque éstas permanecen en el cuerpo durante más tiempo. El cuerpo requiere, por lo tanto, un aporte adecuado de azufre para quelar y eliminar los complejos de metales pesados, que de otra manera permanecerían en el organismo durante un largo periodo de tiempo [104]. Entre los alimentos que más aportan azufre a la dieta se encuentran el ajo, la cebolla y el brócoli. El ajo (*Allium cepa*) ejerce un efecto secundario sobre la detoxificación de metales pesados ya que, además de elevadas concentraciones de sustancias con azufre activo como la metil-L-cisteina-sulfóxido, es rico en flavonoides (antocianinas y quercetina).

#### **4.2. Titulaciones potenciométricas**

En sistemas con ligandos de interés biológico y/o farmacológico, los estudios potenciométricos permiten la obtención de las constantes de equilibrio de los complejos formados, los diagramas de distribución de especies, la identificación de las zonas de pH donde existen especies únicas y, a partir de esa información, la síntesis de los complejos sólidos en las condiciones experimentales preestablecidas. En los sistemas biológicos se encuentran diversos biometales en diferentes estados de oxidación, entre ellos el  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  (además de Fe, Co, Ni entre otros), lo que motiva el interés de estudiar la interacción de los mismos con

diversos ligandos de interés biológico para generar modelos comparables con los naturales y tener una mejor comprensión de su actividad biológica y posteriormente su mecanismos de acción.

Para estudiar las posibles interacciones de estos bioelementos (cobre, zinc y cadmio) con ligandos bioactivos y con el objetivo de determinar los diferentes tipos de especies metal/ligando presentes y la relación en la que se encuentran en solución acuosa y evaluar cuál es la especie activa a pH fisiológico caracterizando el complejo formado, se recurre a las titulaciones potenciométricas.

Una constante de estabilidad es una constante de equilibrio para la formación de un complejo en solución que mide la fuerza de la interacción entre las especies que reaccionan para formar el complejo. Es decir que puede proporcionar la información necesaria para calcular la concentración del complejo en solución. Tengamos en cuenta que existen al menos dos tipos de complejos: aquellos formados por la interacción de un ión metálico con un ligando y los complejos supramoleculares, tales como complejos hospedador-huésped y complejos de aniones.

La formación de un complejo entre un ión metálico, M, y un ligando, L, es generalmente una reacción de sustitución. Por ejemplo, en soluciones acuosas, los iones metálicos estarán presentes como acuo-iones y la reacción para la formación del primer complejo sería:



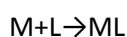
Por lo tanto la constante de equilibrio para dicha reacción será:

$$\beta' = \frac{[M(H_2O)_{n-1}L][H_2O]}{[M(H_2O)_n][L]}$$

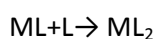
O quitando los términos constantes:

$$\beta = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

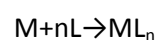
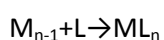
Generalizando:



$$K_1 = [ML] / [L] \cdot [M]$$



$$K_2 = [ML_2] / [ML] \cdot [L] \quad \beta_2 = [ML_2] / [M] \cdot [L]^2$$



$$K_n = [ML_n] / [ML_{n-1}] \cdot [L]$$

$$\beta_n = [ML_n] / [M] \cdot [L]^n = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_n$$

constante de formación sucesiva  $K_n$ ,  $K_{MLn}$

Constante de formación global  $\beta_n$ ,  $\beta_{MLn}$

La termodinámica de la formación de complejos de iones metálicos proporciona mucha información significativa. Permite distinguir entre efectos de entalpía y de entropía (se sabe que los efectos de entalpía dependerán de la fuerza de adhesión y los entrópicos, de los cambios en el orden/desorden de la solución en su conjunto) [105].

La constante de equilibrio está relacionada con el cambio de energía libre de Gibbs estándar para la reacción de

$$\Delta G^0 = -2,303 RT \log_{10} \beta$$

donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

A 25 °C,

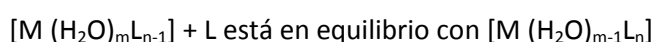
$$\Delta G^0 = (-5.708 \text{ kJ mol}^{-1}) \cdot \log \beta$$

La energía libre se compone de un término de entalpía y un término de entropía.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

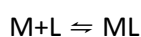
El cambio de entalpía estándar debe ser determinado por el método calorimétrico preferiblemente y cuando se han determinado tanto el cambio de entalpía estándar como la constante de estabilidad, el cambio de entropía estándar se calcula fácilmente a partir de la ecuación anterior.

El hecho de que las constantes de formación por etapas de complejos del tipo  $ML_n$  disminuyan en magnitud a medida que n aumenta puede explicarse en parte en términos del factor de entropía. Tomemos el caso de la formación de complejos octaédricos.



Para el primer paso  $m = 6$ ,  $n = 1$  y el ligando puede entrar en uno de los 6 sitios. Para la segunda etapa  $m = 5$  y el segundo ligando puede entrar en uno de los 5 sitios. Esto significa que hay más aleatoriedad en el primer paso que el segundo;  $\Delta S^0$  es más positiva, por lo  $\Delta G^0$  es más negativa y  $\log K_1 > \log K_2$ . La relación de las constantes de estabilidad paso a paso se puede calcular sobre esta base, pero las relaciones experimentales no son exactamente las mismas porque  $\Delta H^0$  no es necesariamente la misma para cada paso [106]. También es importante considerar la dependencia de la fuerza iónica y de la temperatura.

La constante de equilibrio termodinámico  $K^0$ , para la reacción



Queda definida como:

$$K^0 = \frac{\{ML\}}{\{M\}\{L\}}$$

Donde las llaves indican la actividad de las especies químicas, y como las actividades son magnitudes adimensionales,  $K^0$  también es adimensional. Y como sabemos que la actividad es el producto de las concentraciones por el coeficiente de actividad, podemos escribir también:

$$K^0 = \frac{[ML]}{[M][L]} \times \frac{\gamma_{ML}}{\gamma_M \gamma_L} = \frac{[ML]}{[M][L]} \times \Gamma$$

donde  $\Gamma$  es el cociente de los coeficientes de actividad.

Para evitar complicaciones usando actividades, las constantes de estabilidad se determinan, en lo posible, en una solución de un electrolito de alta fuerza iónica, es decir, en condiciones en las que  $\Gamma$  puede suponerse que es siempre constante. Por ejemplo, el medio puede ser una solución de 0,1 M de nitrato de sodio o 3 M de perclorato de potasio. Entonces  $\Gamma$  es constante y puede ser ignorado.

Todos los valores de constantes de estabilidad publicados se refieren al medio iónico específico utilizado en su determinación y bajo diferentes condiciones se obtienen diferentes valores. Además  $\Gamma$  es diferente para diferentes electrolitos, incluso a la misma fuerza iónica. Si bien no tiene por qué haber ninguna interacción química entre las especies en equilibrio y el electrolito de fondo, éstas pueden ocurrir en casos particulares. Por ejemplo, los fosfatos forman complejos débiles con metales alcalinos, por lo que, cuando se busca determinar las constantes de estabilidad de compuestos relacionados con fosfatos, tales como ATP, el electrolito de fondo utilizado será, por ejemplo, una sal de tetraalquilamonio. Otro ejemplo implica Fe(III), que forma complejos débiles con haluro y otros aniones, en este caso el perclorato podría ser el electrolito de fondo. Por lo tanto cuando los valores de constante publicados están referidos a una fuerza iónica diferente de la requerida para un caso en particular, deben ser ajustados por medio de una teoría como la teoría específica de iones (SIT). Todas las constantes de equilibrio varían de acuerdo con la temperatura, de acuerdo con la ecuación de Van't Hoff

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{\Delta H^0_m}{RT^2}$$

Donde  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura termodinámica. Por eso, para reacciones exotérmicas, con entalpía negativa,  $K$  decrece con el aumento de la temperatura y para reacciones endotérmicas,  $\Delta H^0$  positivo,  $K$  aumenta con la temperatura.



Para este trabajo de Tesis doctoral se usó la técnica de potenciometría para calcular las constantes de estabilidad mediante el programa PKAS, generando un modelo teórico para las diferentes especies que puedan estar presentes en solución y analizando los datos experimentales de la titulación ácido base. Luego esas constantes se introducen en el programa BEST, el que minimiza la desviación estándar entre los valores de pH calculados y observados de la totalidad de la curva de titulación. El programa SPE calcula la distribución de especies a partir de constantes de estabilidad dadas. Finalmente, las constantes obtenidas se introducen en el programa SUPERQUAD para su refinación final. Así pudimos determinar las constantes asociadas a la formación de los complejos de coordinación y la existencia de una correlación en las especies presentes en solución con la mostrada por los cristales obtenidos en fase sólida en determinadas condiciones experimentales [107].

Entre los factores que afectan la constante de estabilidad de los complejos se puede mencionar el efecto quelato (mencionado en la sección anterior) y el efecto macrocíclico, algunos factores geométricos, la naturaleza de los iones metálicos y el radio iónico.

En cuanto al efecto quelato podemos decir que bajo condiciones comparables de concentraciones y fuerza donadora de dos ligandos monodentados *versus* un ligando bidentado, con la misma especie metálica en solución, la cantidad de complejo con ligando bidentado (efecto quelato con formación de un anillo) que se determina es mayor que la cantidad del otro complejo (ejemplo: etilendiamina + Cd y 2-metilamina + Cd). Esta diferencia radica principalmente en los cambios de entropía standard, ya que ambos ligandos tienen la misma potencia de donante y entonces la entalpía de formación de enlace N-Cd, por ejemplo, es la misma en ambos casos. Dado que la concentración del complejo quelato es mayor, la constante de equilibrio  $K$  será mayor también. Se observa que a mayor número de anillos, mayor concentración y por lo tanto mayor valor de  $K$ .

Si consideramos el número de partículas involucrado en las reacciones, veremos que en la formación del quelato se pierde menos entropía (de 2 a 1) que en la formación del complejo con ligando monodentado (3 a 1). Otros factores incluyen cambios de solvatación y la formación del anillo.

Equilibrio	$\log \beta$	$\Delta G^\ominus$	$\Delta H^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$	$-T\Delta S^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$
$\text{Cd}^{2+} + 4 \text{MeNH}_2 \rightleftharpoons \text{Cd}(\text{MeNH}_2)_4^{2+}$	6,55	-37,4	-57,3	19,9
$\text{Cd}^{2+} + 2 \text{en} \rightleftharpoons \text{Cd}(\text{en})_2^{2+}$	10,62	-60,67	-56,48	-4,19

Como vemos la entalpía es similar para ambos casos del ejemplo de la tabla, mientras que la entropía es favorable para la formación del quelato. El efecto macrocíclico considera la estabilidad, mucho mayor de lo esperado, del complejo con ligando macrocíclico en comparación con la estabilidad del complejo con el ligando equivalente de cadena abierta [108]. Este fenómeno se llamó "el efecto macrocíclico" y fue interpretado en un principio como un efecto principalmente de la entropía, pero estudios posteriores sugieren que también la entalpía es un factor implicado en este comportamiento [109].

Una diferencia importante entre los ligandos macrocíclicos y los ligandos quelantes de cadena abierta es la selectividad para iones metálicos. Ésta, se basa en el tamaño de la cavidad en la que se inserta el ión metálico cuando se forma el complejo como en la porfirinas metálicas (hemoglobina, clorofila, etc).

Existen factores geométricos involucrados en la estabilidad del complejo. Cuando determinamos constantes  $K_n$  en sucesivas etapas de sustitución ( $ML_n$ ) se observa que a medida que  $n$  aumenta,  $K_n$  generalmente decrece. Las excepciones a esta regla se producen cuando la geometría de los complejos  $ML_n$  no es la misma para todos los miembros de la serie. Los datos termodinámicos muestran que tanto la entalpía como la entropía son efectos importantes que determinan el resultado [110].

Los iones metálicos podrían clasificarse como de clase A si forman complejos más fuertes con ligandos cuyos átomos donantes son N, O o F que con ligandos cuyos átomos donantes son P, S o Cl; y de clase B si se da el caso contrario [111]. Por ejemplo,  $Ni^{2+}$  forma complejos más fuertes con aminas que con fosfinas, pero el  $Pd^{2+}$  forma complejos más fuertes con fosfinas que con aminas. Considerando la teoría de ácidos y bases, duros y blandos (teoría ABDB) [112] propuesta más tarde por Pearson, los metales de clase A, como  $Ni^{2+}$ , son ácidos duros y los de clase B, como  $Pd^{2+}$ , son ácidos blandos. Algunos iones, como el cobre (I) están clasificados como dudosos. La teoría prevé que ácidos duros formarán complejos más fuertes con bases duras que con bases blandas (y viceversa). En términos generales las interacciones duro-duro son predominantemente de naturaleza electrostática mientras que las interacciones blando-blando son covalentes. La teoría ABDB resulta útil pero es sólo semi-cuantitativa [113]. La dureza de un ion metálico aumenta con el estado de oxidación.

Los efectos del radio iónico también influyen en la estabilidad de los complejos. La serie de Irving Williams considera los iones de metales divalentes de la primera serie de transición, octaédricos y de alto spin. Esta serie ubica las estabilidades de los complejos en un orden que se mantiene para una amplia variedad de ligandos:  $Mn < Fe < Co < Ni < Cu > Zn$  [114]. Tres consideraciones se tienen en cuenta para esta secuencia:

- 1- El radio iónico disminuye de Mn a Zn como tendencia normal en la tabla periódica, aumentando la estabilidad del complejo.
- 2- La energía de estabilización del campo cristalino aumenta desde 0 para el Mn(II) hasta un máximo para el Ni(II) haciendo que la estabilidad sea mayor (y vuelve a 0 para el Zn).
- 3- El cobre presenta obviamente menor energía del campo cristalino que el Ni pero en los complejos octaédricos de cobre(II) se da un aumento adicional de la estabilidad debido al efecto Jahn Teller.

Otro efecto del radio iónico lo constituye el aumento de la estabilidad de los complejos con un determinado ligando a lo largo de la serie de los iones lantánidos trivalentes (efecto de la contracción lantánida).

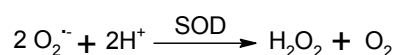
Las aplicaciones de los valores de las constantes de estabilidad abarcan una amplia variedad. La terapia de quelación se utiliza en el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con metales, tales como la sobrecarga de hierro en los pacientes con  $\beta$ -talasemia que han recibido transfusiones de sangre. El ligando ideal se une al ión metálico diana y no a otros, pero este grado de selectividad es muy difícil de lograr. La deferiprona droga sintética logra selectividad por tener dos átomos donadores de oxígeno de modo que se une a  $\text{Fe}^{3+}$  con preferencia a cualquiera de los otros iones divalentes que están presentes en el cuerpo humano, tales como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . El tratamiento de la intoxicación por iones tales como  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  es mucho más difícil, ya que estos son ambos iones divalentes y la selectividad es más difícil de lograr [115]. El exceso de cobre en la enfermedad de Wilson puede ser eliminado por la penicilamina o trietilentetramina (TETA). El ácido dietilentriamina pentaacético, DTPA, ha sido aprobado por la Food and Drug Administration para el tratamiento de la intoxicación por plutonio. DTPA también se utiliza como un agente complejante para gadolinio en el realce de contraste de MRI. El requisito en este caso es que el complejo debe ser muy fuerte ya que el  $\text{Gd}^{3+}$  es muy tóxico. La gran constante de estabilidad del ligando octadentado asegura que la concentración de libre  $\text{Gd}^{3+}$  es casi insignificante, ciertamente muy por debajo de umbral de toxicidad [116, 117]. Además, el ligando ocupa sólo 8 de los 9 sitios de coordinación sobre el ión gadolinio. El noveno sitio está ocupado por una molécula de agua que intercambia rápidamente con el fluido que lo rodea y es este mecanismo el que hace posible que el complejo paramagnético pueda ser empleado como un reactivo de contraste [118] de alta estabilidad termodinámica e inercia cinética a pH fisiológico.

### 4.3. Actividades enzimáticas

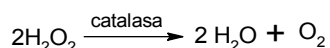
#### 4.3.1. Superóxidodismutasa

Otro aspecto tenido en cuenta en este trabajo fue la posible actividad enzimática de los complejos. Esto es de suma importancia ya que muchos de estos complejos pueden presentar una síntesis dirigida a imitar la esfera de coordinación de enzimas y proteínas.

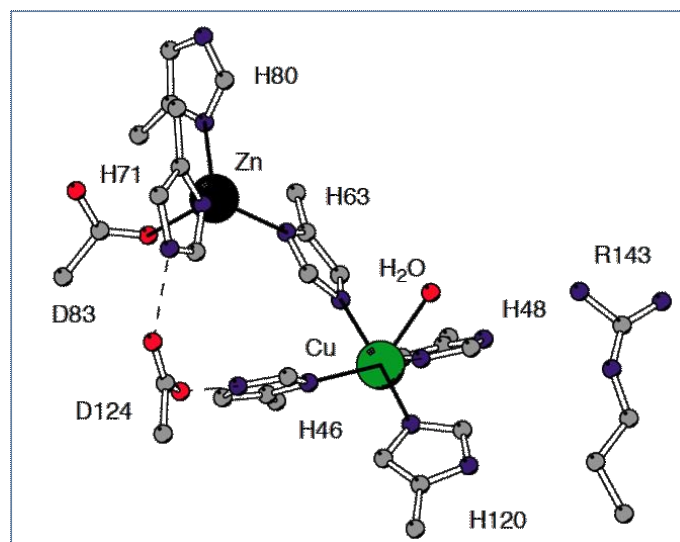
Como se mencionó más arriba, el cobre es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, contenido en un gran número de metaloproteínas. Además, está presente en diferentes sistemas biológicos, asociado a oxidasas, superóxido-dismutasa y al transporte de oxígeno y electrones. La enzima superóxido dismutasa es una proteína usada como mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo bajo condiciones fisiológicas y patológicas y tiene la función de dismutar el ión superóxido de acuerdo a la siguiente reacción:



En la dismutación se generan peróxidos que luego son dismutados por la enzima catalasa, que contiene hierro en su sitio activo y que genera finalmente agua y oxígeno:



La enzima SOD de eritrocitos bovinos y humanos dependiente de Cu y Zn está constituida por dos subunidades. Cada subunidad tiene un ión Cu(II) en su sitio activo (Figura 1) y un ión Zn(II) que cumple una función estructural, estabilizando la estructura de la proteína y no participa de la actividad enzimática. El ión Cu(II) interacciona con 4 nitrógenos imidazólicos de restos de histidina en el sitio activo. Uno de esos grupos coordina simultáneamente al Cu(II) y al Zn(II) formando un puente entre ellos. La esfera de coordinación del Zn(II) se completa con 2 N imidazólicos y un O proveniente de un grupo carboxilato perteneciente a un ácido aspártico.



**Figura 1.** Sitio activo de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn.

Es bien sabido que la deficiencia de cobre deprime la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y de otras enzimas antioxidantes que dependen de cobre. También se observó que el nivel de cobre en suero de animales y humanos con cáncer, se eleva y fue sugerido que se podría deber a una respuesta fisiológica diseñada para activar enzimas de cobre en células tumorales y así inhibir su crecimiento. Las primeras observaciones de la actividad SOD sobre los tumores cancerosos data de 1975 [119]. Asimismo, las células tumorales poseen cantidades menores a las normales de SOD y se sabe que esta enzima es fundamental para convertir los radicales superóxidos ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno y que cuando está ausente esto no sucede y se acumulan hasta cinco veces más cantidades de radicales superóxidos [120]. El tratamiento con la enzima nativa bovina Cu-SOD ralentiza el crecimiento de algunos tumores. Numerosos complejos de cobre que poseen propiedades superóxido dismutasa similares poseen propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas [121].

Existe un número significativo de complejos metálicos de bajo peso molecular capaces de secuestrar el anión superóxido y otros radicales y especies reactivas que fueron propuestas para usarse como fármacos potenciales en varias enfermedades o como agentes “anti-edad”. Además, fue reportado que la presencia de sitios de coordinación con anillos heteroaromáticos nitrogenados como imidazol, piridina y pirazol alrededor del Cu(II) aumentan la actividad SOD [122]. Este ion es fundamental en el control de procesos inflamatorios, en los que se incrementa la concentración del metal en suero y en consecuencia la ceruloplasmina hepática también aumenta su concentración [123] transportando el cobre a enzimas no hepáticas de cobre. Una enfermedad inflamatoria de articulaciones es la artritis reumatoidea y desde la antigüedad se utilizan brazaletes de cobre para su tratamiento [124]. También se eleva el nivel

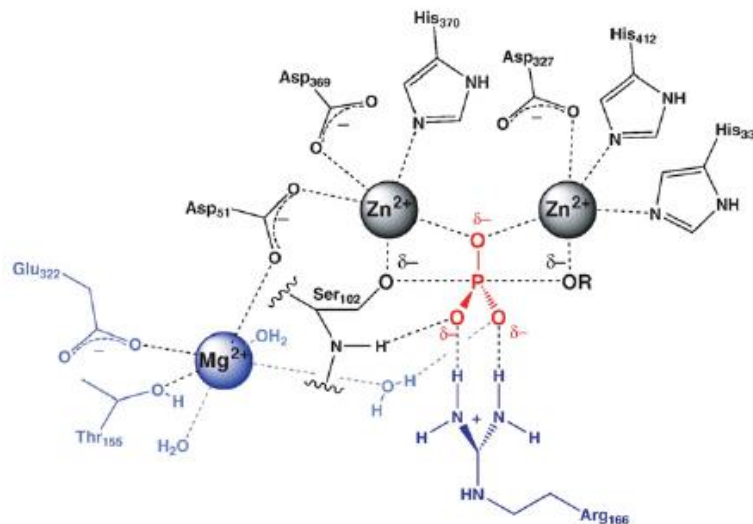
de cobre en suero en animales y humanos con cáncer y se sugirió que es una respuesta fisiológica diseñada para activar enzimas de cobre en células tumorales para inhibir su crecimiento [125].

Es por eso que en este trabajo se midió asimismo la actividad SOD del complejo de Cu con ligantes que imiten los sitios activos de los sistemas biológicos mencionados.

#### 4.3.2. Fosfatasa alcalina

Como ya fue mencionado, el Zn es el segundo biometal de transición más abundante en el ser humano y del cual se conocen la mayor cantidad de metaloenzimas, participando, además como estabilizador estructural. Por eso se estudiaron sistemas modelo que incluyen complejos binarios y ternarios de Zn(II). En particular, el Zn está presente en la enzima fosfatasa alcalina (FAL). Esta enzima se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, sobre todo en hígado, vías biliares y huesos. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un entorno alcalino. La actividad de la FAL en el suero se correlaciona usualmente con enfermedades de hígado y es un marcador de diferenciación osteoblástica [126]. Es una enzima hidrolasa responsable de la remoción de grupos fosfato de muchos tipos de moléculas que incluyen nucleótidos, proteínas y alcaloides, mediante el proceso de desfosforilación. Se encuentra en casi todos los organismos vivos, con excepción de algunas plantas. En bacterias Gram-negativas la enzima se localiza en el espacio periplasmático, externo a la membrana celular. En hongos, se encuentra en vacuolas similares a lisosomas y en mamíferos es una glicoproteína unida a la membrana y se conocen cuatro isoenzimas, donde tres de ellas son tejido-específicas: de placenta, células germinales (similar a placenta) e intestinal. La cuarta forma es tejido no-específica y fue previamente conocida como la isoenzima hígado/hueso/riñón.

La enzima extraída de la mucosa intestinal bovina es una metaloenzima homodimérica que contiene dos iones Zn(II) y un magnesio (Mg(II)) en el sitio activo. A modo de ilustración se muestra el sitio activo de la FAL en *Escherichia coli*, análogo al de la enzima bovina en la Figura 2. La diferencia de acción radica en que el pH óptimo para la actividad de la enzima en *E. coli* es 8,0 mientras que la enzima bovina necesita un pH óptimo mayor a 8,5. Cuando la enzima cataliza la hidrólisis del fosfomonoéster, la serina 102 coordinada al átomo de Zn forma el intermediario fosfoserilo el que subsecuentemente es atacado por el Zn(II)-OH<sup>-</sup> adyacente para completar la hidrólisis y reproducir la forma libre de serina para reiniciar el ciclo catalítico. El paso limitante de la velocidad es la liberación del grupo fosfato inorgánico [127].



**Figura 2.** Iones involucrados en el centro activo de la enzima fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*.

Como medidas de las actividades enzimáticas, de acuerdo a las características del complejo sintetizado se utilizaron las siguientes metodologías:

- Capacidad del complejo de Cu para secuestrar radicales superóxido *in vitro*.
- Inhibición *in vitro* que ejercen los compuestos de cobre sobre la fosfatasa alcalina (FAL).

#### 4.4. Actividad antimicrobiana

El tratamiento de las enfermedades bacterianas es la lucha del hombre frente a los microorganismos. El hombre dispone de las propias defensas del organismo y además de armas muy potentes como son los fármacos antimicrobianos, pero las bacterias pueden desarrollar sus mecanismos de resistencia para destruirlos y/o hacerse insensibles a ellos. Por esto hay que elegir el antibiótico que por sus características farmacológicas y por otros parámetros sean efectivos donde deben serlo y contra los microorganismos que se desean inhibir [128].

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia. Los mecanismos de resistencias adquiridas y transmisibles son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas. Así en los años 50 ya se conocían cepas de

*Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección. El uso erróneo o innecesario de fármacos antimicrobianos en esta indicación representa uno de los gastos más importantes de estos fármacos en el ámbito extrahospitalario y potencia la aparición de cepas resistentes a los antibióticos de mayor uso (lo ideal sería ante la sospecha de infección, realizar previamente un estudio microbiológico, pues la elección más correcta de un antibiótico es la que se instaura tras el aislamiento del germen y después de estudiar su sensibilidad *in vitro*) [129].

Según la OMS (Organización Nacional de la Salud) la resistencia a los agentes antimicrobianos compromete la prevención y el tratamiento eficaces de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos ya que, en general, los pacientes que contraen infecciones causadas por microorganismos farmacorresistentes tienen peor pronóstico y un mayor riesgo mortal que los individuos infectados con bacterias de la misma especie que no presenten esas resistencias. Se ha detectado resistencia en el tratamiento de enfermedades tales como las causadas por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*), *Plasmodium falciparum* (agente causal de malaria), *Staphylococcus aureus* (infecciones nosocomiales principalmente) y *Neisseria gonorrhoeae* entre otras [130].

En el informe de la OMS correspondiente a 2014 sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los compuestos antimicrobianos se puso de manifiesto que, en el caso de los antibióticos, esta cuestión ha dejado de ser una posible preocupación futura para convertirse en un problema real que sin una acción urgente y coordinada nos dirige hacia una era post-antibióticos en la que infecciones corrientes y lesiones menores que se han venido tratando satisfactoriamente durante décadas pueden volver a resultar mortales.

#### **4.4.1. Conservación de cepas**

La criopreservación es el uso de temperaturas muy bajas para preservar la estructura intacta de células y tejidos vivos. El enfriamiento puede ser utilizado entonces para preservar la viabilidad de los microorganismos mediante la congelación de agua ya que de esta manera los solutos disueltos se concentran porque existe menos agua disponible. Muchas estructuras y procesos dependen de la temperatura y, en consecuencia, el enfriamiento tiene efectos



complejos muy distintos sobre la fisiología normal. Cuando enfriamos por debajo de 0°C los efectos biológicos están dominados por la congelación del agua, que normalmente constituye al menos el 80% de la masa de tejido. Congelación es la conversión de agua líquida en hielo cristalino, esto provoca la concentración de los solutos en la fase líquida restante y la precipitación de los que excedan su límite de solubilidad.

Se considera que el efecto biológico de la congelación sin protección es normalmente letal debido a que los cristales de hielo pueden destruir directamente las células por acción mecánica, desmenuzándolas o debido a que se producen cambios secundarios en la composición de la fase líquida. Por eso se emplean crioprotectores [131] para mejorar el procedimiento y producir un aumento de la concentración total de todos los solutos en el sistema y esto reduce la cantidad de hielo formado. Para que un agente crioprotector sea biológicamente aceptable debe penetrar en las células y tener baja toxicidad. Algunos compuestos que poseen dichas propiedades incluyen el glicerol, DMSO (dimetilsulfóxido), etanodiol y propanodiol.

La velocidad de enfriamiento es un factor importante que controla el transporte de agua a través de la membrana celular y esto influye a su vez, indirectamente, en la congelación intracelular, que en general resulta letal [132]. La velocidad de enfriamiento controla la velocidad a la que el agua se convierte en hielo, lo que influye a su vez en los cambios de concentración de la solución que rodea las células (se controla la osmolalidad del fluido circundante). Lo que ocurre durante el proceso de enfriamiento es que el agua intracelular abandona la célula a través de la membrana plasmática para mantener el equilibrio termodinámico de manera tal que el citoplasma no se enfriará por debajo de su punto de congelación y todo el hielo será extracelular. Por lo tanto la velocidad de enfriamiento también influye en la velocidad a la cual el agua es transportada fuera de las células durante el enfriamiento y posteriormente hacia el interior celular durante el calentamiento.

Se sabe que el hielo extracelular es inofensivo para las células [133] y que el daño de la congelación es causado por los efectos indirectos de la formación de hielo. Sin embargo, la sal en el medio de suspensión no es el único soluto a concentrarse, sino que el crioprotector se concentra en el mismo grado. Por lo tanto los agentes crioprotectores si bien son de baja toxicidad, no son inocuos. Si se conoce la permeabilidad de la membrana celular al agua y además se puede estimar el coeficiente de temperatura de permeabilidad al agua, es posible predecir el efecto de la velocidad de enfriamiento sobre la supervivencia celular. El grado de sobreenfriamiento calculado para diferentes tasas de enfriamiento muestra que la congelación intracelular es poco probable en una velocidad de 1°C/min, pero es altamente probable a una

velocidad de enfriamiento de 10°C/min porque produce sobreenfriamiento intracelular significativo. Por supuesto, distintas células tienen diferentes permeabilidades y distintas velocidades de enfriamiento para un índice de supervivencia óptimo [134].

Pequeñas cantidades de hielo intracelular pueden ser compatibles con la recuperación y esto tiene relación o depende de la tasa de calentamiento. En el calentamiento lento los pequeños cristales se recrystalizan y crecen dañando a las células mientras que el calentamiento rápido no deja tiempo suficiente para que esto suceda y el hielo simplemente se derrite. Resumiendo, la velocidad de enfriamiento influye en la formación de hielo intracelular. Las células se diferencian en su permeabilidad al agua y probablemente también en su susceptibilidad al hielo intracelular. Los requisitos de refrigeración y calentamiento determinan el índice de supervivencia.

La mayoría de los estudios de lesiones mecánicas de congelación/descongelación se han llevado a cabo con suspensiones de células relativamente diluidas. Algunos sistemas cuyas células están densamente empaquetadas son más propensos a ser dañados durante los procesos de congelación y descongelación. En el caso de las suspensiones bacterianas esta concentración puede ser controlada convenientemente ya que se trata de células aisladas.

La crioprotección generalmente implica el tratamiento de las células o tejidos con solutos crioprotectores, a menudo en alta concentración, y esto produce una fuerza motriz para el movimiento del agua por ósmosis y de solutos por difusión. Como se dijo anteriormente, la congelación implica cambios en la concentración y composición de las soluciones acuosas y esto también produce fuerzas motrices para el movimiento de agua y solutos. Los sistemas biológicos contienen numerosas barreras a la difusión libre de solutos (membranas), que pueden provocar cambios transitorios (y algunas veces de equilibrio) en los volúmenes de compartimentos. Si estos cambios son excesivos pueden ser perjudiciales. Por lo tanto, los procesos de difusión y ósmosis son muy importantes en la crioconservación [135][136].

#### **4.4.2. Indicadores Biológicos**

Las cepas bacterianas de referencia que se usaron como indicadores biológicos en esta tesis fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 6538, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Listeria innocua* ATCC 33090.

*Staphylococcus aureus*, descubierto en 1880 por el médico cirujano Alexander Ogston (Escocia), es una bacteria que puede causar múltiples enfermedades tanto en humanos como en animales. Son cocos Gram positivos generalmente agrupados formando racimos de uvas (de allí su nombre del griego *staphyle* que significa racimo de uvas). Son bacterias anaerobias facultativas no móviles, no esporuladas, que no poseen cápsula (algunas cepas desarrollan cápsula de limo). La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. Producen infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. Éstas pueden ser adquiridas a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. *S. aureus* puede presentar resistencia a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina (SARM) [137] lo que ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad. Entre un 25 y un 50 % de la población sana está colonizada de forma intermitente por esta bacteria en nasofaringe, piel, más raramente en vagina y en forma excepcional en recto y zona perineal, constituyendo un riesgo por su diseminación con posibilidad de brotes epidémicos. Si bien la piel constituye una barrera mecánica eficiente de protección contra *S.aureus*, la pérdida de la solución de continuidad de la piel debido a un traumatismo o cirugía permite que el microorganismo acceda a los tejidos subyacentes y desarrolle una lesión local característica como el absceso. La liberación de toxinas en la piel y otros órganos puede causar diversos tipos de exantemas cutáneos y síntomas generales, como el síndrome de choque tóxico (SST por sus siglas en inglés) o enfermedad diarreica aguda. Las bacterias pueden además sobrepasar los mecanismos fagocíticos locales (debido a la presencia de cápsula mucoide de naturaleza polisacárida o slime con capacidad antifagocitaria) en cualquier momento y acceder a los canales linfáticos y al torrente sanguíneo, dando origen a una bacteriemia estafilocócica, complicación severa que puede conducir a una infección metastásica de mal pronóstico. Esta bacteria produce, además de infecciones comunitarias, infecciones nosocomiales multirresistentes [138], especialmente en pacientes con hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas, infectados con VIH y adictos a las drogas [139], de gran repercusión económica y social [140]. La producción del biofilm (o biopelícula) de naturaleza polisacárida está implicada en la colonización y persistencia de la bacteria en catéteres, prótesis y sondas de pacientes hospitalizados [141]. Por eso constituye un gran desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención.

*Pseudomonas aeruginosa*, bacilo gramnegativo de naturaleza aeróbica y motilidad unipolar, es causa de importantes infecciones nosocomiales. Este microorganismo fue

descubierto por A. Lucke, en 1862 cuando investigaba un exudado azul verdoso en los apósitos quirúrgicos y diez años más tarde Schroeter formaliza el descubrimiento. Pero fue Carle Gessard, farmacéutico francés (1850-1925), quien llevó a cabo los estudios más minuciosos y una completa descripción del “bacilo del pus azul”. El pigmento de color azul se logra cristalizar con la ayuda de cloroformo y ácido sulfúrico y recibe el nombre de pirocianina. Los cultivos de *Pa* tienen un aroma particular muy agradable. La bacteria fue originalmente una bacteria saprófita que parasitaba algunos vegetales de la selva húmeda europea que se adaptó al intestino tibio de los humanos y se propagó mediante contaminación fecal por praderas y campos y actualmente es capaz de causar infecciones en varias regiones anatómicas mostrando además una notable capacidad para resistir a los antibióticos. Esta resistencia puede ser intrínseca (debido a la expresión constitutiva de las Beta-lactamasas y bombas de eflujo, combinado con una baja permeabilidad de la membrana externa) o después de adquirir genes de resistencia (por ejemplo, genes de Beta-lactamasas, o enzimas que inactivan los aminoglucósidos o modifican los blancos, la sobre expresión de bombas de eflujo, disminución de la expresión de las porinas, o mutaciones en las moléculas blanco de quinolona, por ejemplo). Lo más preocupante es que estos mecanismos están presentes a menudo de forma simultánea, confiriendo así fenotipos multirresistentes. Las opciones terapéuticas innovadoras para el futuro siguen siendo escasas, mientras que los intentos de desarrollar vacunas no han tenido éxito hasta la fecha.

Conocida por años por estar presente en infecciones graves de heridas y cirugías, pero a menudo considerada un invasor secundario u oportunista más que una causa primaria de la infección en los tejidos sanos, *Pseudomonas aeruginosa* surge ahora como un importante patógeno nosocomial en pacientes inmunodeprimidos y debilitados, así como en pacientes con fibrosis quística [142]. *P. aeruginosa* siempre ha sido considerada como un objetivo difícil para la quimioterapia antimicrobiana ya que su genoma se encuentra entre los más grandes del mundo procariota y el 0,3% de los genes codificados tienen que ver con la resistencia antimicrobiana. Además la bacteria tiene la capacidad de adquirir fácilmente grandes elementos genéticos móviles (integrones) que codifican la resistencia [143] codificando una cantidad inusual de proteínas lo que puede explicar la alta versatilidad de esta especie. El genoma es flexible ya que el 10% de los genes están organizados en islas de patogenicidad que codifican para factores de virulencia. Tanto el tamaño como la complejidad del genoma permiten que *P. aeruginosa* pueda prosperar en diversos ambientes y colonizar gran variedad de sitios del cuerpo. Rara vez *P. aeruginosa* infecta los tejidos sanos pero, cuando las defensas están en peligro, puede infectar prácticamente todos los tejidos. Esto explica por qué la

mayoría de las infecciones son nosocomiales [144] y son consideradas graves incluso poniendo en peligro la vida. Las mayores tasas de mortalidad registradas en los casos de bacteriemia se registraron en pacientes neutropénicos (30-50%) [145] y los casos de neumonía nosocomial (45-70%) [146]. *P. aeruginosa* está bien adaptada al tracto respiratorio, especialmente en pacientes inmunocomprometidos u hospitalizados en unidades de cuidados intensivos [147] y es la causa predominante de neumonía nosocomial y de la infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística. La bacteriemia por *P. aeruginosa* es una complicación frecuente en pacientes neutropénicos con cáncer sometidos a quimioterapia [148]. La bacteriemia y septicemia puede también ocurrir en pacientes con inmunodeficiencia relacionada a causa del SIDA, la diabetes mellitus o quemaduras graves. La mayoría de estas infecciones se adquieren en los hospitales y hogares de ancianos [149]. *P. aeruginosa* es la tercera causa de infecciones del tracto urinario adquiridas en el hospital y son generalmente secundarias a la cateterización de las vías urinarias, la instrumentación o la cirugía [150]. *P. aeruginosa* es el agente causal predominante de una forma de otitis externa conocida como "oído de nadador" [151] y de la otitis maligna en los pacientes diabéticos. Aunque menos frecuentes que otros organismos, *P. aeruginosa* puede también ser la causa de devastadoras infecciones oftálmicas como la queratitis bacteriana en individuos que usan lentes de contacto [152], meningitis y abscesos cerebrales y endocarditis en los usuarios de drogas por vía intravenosa [153]. Las infecciones de la piel y el hueso son raras, pero pueden ocurrir después de heridas punzantes. *P. aeruginosa* rara vez provoca verdaderas infecciones del tracto digestivo pero su colonización favorece el desarrollo de infecciones invasivas en pacientes de riesgo [154]. A comienzos del tercer milenio, *P. aeruginosa* representa sin duda una de las bacterias patogénicas más difíciles.

*Staphylococcus epidermidis* es una bacteria grampositiva cuyo nombre deriva de las palabras griegas *staphy* (racimo de uvas) y *coccus* (grano) cuyo significado etimológico hace referencia a que se observan en forma de racimos al microscopio. Desde 1974 lleva este nombre y desde entonces se lo considera como un estafilococo coagulasa negativo, para diferenciarlo de *S. aureus*. Se caracteriza por ser además ADNasa negativo y sensible a Novobiocina. También es negativo para otras enzimas, propias de *S. aureus* como lipasas, hialuronidasa, etc. No fermenta el manitol ni tolera el cloruro de sodio. Posee una hemolisina llamada "épsilon".

*Staphylococcus epidermidis*, como otros estafilococos coagulasa negativos (ECN), son comensales de la piel considerados además como la principal causa de contaminación de hemocultivos [155] y muestran frecuentemente resistencia a varios antibióticos [156]. Esta

resistencia a los antimicrobianos de microorganismos que son parte de la flora habitual de la piel suele estar asociada con la exposición a antibióticos por tratamientos que el mismo paciente recibió o debido a la interacción con otros pacientes portadores de flora microbiana resistente, por ejemplo durante la residencia en centros de cuidados crónicos o por hospitalizaciones frecuentes [157].

La sensibilidad a antimicrobianos de *S. epidermidis* es similar a la de *S. aureus*, con producción de  $\beta$ lactamasas, y cepas meticilino resistentes. La incidencia en las colonizaciones de catéteres se facilita por la producción de SLIME o limo extracelular, un polímero mucopolisacárido de composición similar a la de una cápsula, pero de estructura amorfa, formando un "barro" que adhiere al catéter y envuelve las bacterias y cumple una doble función: adherencia y antifagocítica. Su prevalencia está asociada con su tendencia a colonizar los catéteres venosos centrales y otros dispositivos médicos implantados [158], que se basa en su capacidad para desarrollar una estructura muy consolidada: la biopelícula. En particular cepas de formación de biopelículas de *S. epidermidis* que también son resistentes a la meticilina (MRSA) se han convertido en un problema clínico muy grave, ya que estas infecciones son especialmente difíciles de erradicar de los dispositivos colonizados [159].

*Staphylococcus epidermidis*, como otros estafilococos coagulasa negativos (no tienen la enzima coagulasa y por lo tanto no coagulan el plasma sanguíneo) era considerado un contaminante común de los hemocultivos. Ahora, sin embargo se encuentra entre las principales causas de infecciones nosocomiales de la sangre [160] con resistencia a múltiples fármacos. Recientemente se reportó la resistencia a quinolonas, especialmente ciprofloxacina.

El biofilm está constituido principalmente de polisacárido y parece ser el factor más importante por el cual *Se* se adhiere y coloniza materiales artificiales (catéteres, dispositivos médicos) comúnmente implantados en pacientes que manifiestan infecciones nosocomiales (IN). Esta biopelícula haría que las cepas de *Se* sean más resistentes a los antibióticos administrados y a los mecanismos de defensa del huésped e incide en la prevalencia de Infecciones en paciente hospitalizados. Además los antibióticos glicopéptidos como la vancomicina van perdiendo efectividad [156] frente a cepas de estafilococos coagulasa negativos, aisladas de biofilms adheridos a dispositivos médicos como catéteres vasculares, derivaciones cefalorraquídeas, articulaciones protésicas, catéteres peritoneales, injertos vasculares y válvulas cardíacas protésicas [161]. Los grupos de riesgo están constituidos por pacientes inmunodeprimidos, pacientes críticos con cuidados intensivos que involucran el uso de catéteres vasculares (neutropénicos oncológicos) y neonatos con catéter umbilical, catéteres venosos centrales (CVC), ventilación mecánica, nutrición parenteral y en general

siempre que se someta a procedimientos invasivos. La resistencia a por lo menos seis antimicrobianos es un factor independiente que predice una verdadera infección sanguínea, por sobre la contaminación del cultivo [162]. *S. epidermidis* presenta un patrón de resistencia a meticilina similar al establecido para *S. aureus* ya que es una resistencia cruzada a los  $\beta$ -lactámicos que se ha incrementado en las últimas tres décadas debido al uso indiscriminado de estos agentes. Esta resistencia es mediada por plásmidos [163].

Las quinolonas demostraban alta efectividad frente a aislamientos de *S. epidermidis* meticilino-resistentes. Sin embargo fueron apareciendo cepas resistentes especialmente a la ciprofloxacina [164]. El uso indiscriminado de esta droga es el principal responsable de la aparición de tolerancia especialmente en lo que respecta al tratamiento empírico del síndrome febril de paciente neutropénicos. Durante las dos últimas décadas, *S. epidermidis* aparece como una causa importante de infecciones en pacientes con dispositivos médicos permanentes y la producción de limo es el factor de virulencia relacionado [165].

*Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram-positiva cuyo hábitat normal es el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos de sangre caliente [166]. Son microorganismos ubicuos en la naturaleza, están presentes en suelos, agua, vegetales crudos y productos de origen animal. Son muy resistentes a la congelación, desecación y tratamiento térmico por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados y desecados. Los enterococos juegan un papel importante en la maduración y mejora del sabor de quesos y salchichas y han sido utilizados como probióticos para mejorar el equilibrio microbiano del tracto intestinal, sin embargo se usan como un indicadores de contaminación fecal y están asociados con enfermedades transmitidas por alimentos por la producción de aminas biógenas [167]. Una característica clínica importante de *Enterococcus faecalis* es que puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en el ámbito hospitalario, y la resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos como se ha demostrado en cepas aisladas de alimentos y agua [168] ya que son capaces de adquirir resistencia antimicrobiana a través de la transferencia de genes por plásmidos y transposones. Estos microorganismos muestran una resistencia intrínseca a ciertos antibióticos como las cefalosporinas, clindamicina y aminoglucósidos. Además de estas resistencias intrínsecas, los enterococos han adquirido los determinantes genéticos que confieren resistencia a muchas clases de agentes antimicrobianos, incluyendo la tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, y, más recientemente, la vancomicina [169]. Casi todas las cepas de enterococos aisladas de alimentos y medidas muestran resistencia a por lo menos un antimicrobiano ensayado con elevada incidencia de resistencia a los antimicrobianos de uso

frecuente en agricultura como la bacitracina y lincomicina. También se observa un alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos y a varios de los antimicrobianos utilizados en la medicina humana como la tetraciclina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, vancomicina y quinupristina/dalfopristina pero se observa susceptibilidad a la norfloxacina [170]. El mismo gen de resistencia fue encontrado en bacterias aisladas de alimentos y de humanos [171] lo que sugiere que los enterococos resistentes que contaminan los alimentos, al entrar en el tracto gastrointestinal y colonizar los seres humanos pueden pasar sus genes de resistencia a las bacterias comensales presentes en el tracto intestinal humano [172] ya que, una vez ingeridos, los enterococos puede sobrevivir al paso gástrico, multiplicarse y colonizar el tracto gastrointestinal durante un tiempo suficiente para transmitir horizontalmente la resistencia [173]. Esto representa una situación de riesgo para la comunidad ya que plantea la cuestión de que la población de enterococos multirresistentes ocupan el mismo micronicho que los enterococos comensales de la flora nativa [174] lo cual es de seria consideración.

Las levaduras con las que se trabajó corresponden al género *Cándida*. Este género incluye más de 100 especies de las cuales, al menos 10, se asocian con cuadros clínicos, sin embargo el 95-97% de las candidemias están causadas por *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* [175]. Empleamos cepas de aislamiento clínico y de colección (ATCC) de estas cinco especies.

*Candida albicans* es un hongo dimórfico (micelio-levaduriforme), constituyente de la flora indígena del ser humano, normalmente en tracto gastrointestinal y genital femenino [176]. Es considerada la más patógena y se relaciona con cuadros graves e incluso mortales. La candidiasis por *C. albicans* es una infección que se asocia a cuadros patológicos en los que usualmente el hospedero presenta inhibición de los mecanismos de defensa celular o tisular permitiendo que organismos normalmente comensales, como *C. albicans*, invadan y causen infecciones. Los factores predisponentes pueden ser: uso de drogas inmunosupresoras, antibióticos de amplio espectro o drogas anticancerígenas, inmunodepresión infecciosa por síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [177], diabetes mellitus y deficiencias nutricionales. El uso de catéteres y los procedimientos quirúrgicos son considerados también factores de riesgo ya que constituyen una puerta de entrada para el hongo a tejidos y/u órganos internos. *C. albicans* posee un arsenal de factores de virulencia que le permiten invadir tejidos y evadir la fagocitosis (proteinasas [178], esterases, proteasas aspárticas secretoras [179], la capacidad de adherencia a las superficies de las células de hospedero [180], la producción de tubo germinativo que le permite penetrar en el tejido y evadir la fagocitosis mejorando su capacidad invasiva [181] y las fosfolipasas que catalizan la hidrólisis



de las moléculas de fosfolípidos de las membranas celulares del huésped, facilitando la penetración a la célula. Se acepta que la patogenicidad de *C.albicans* es multifactorial (no depende exclusivamente de uno o varios factores de virulencia [182] sino que se debe a la interacción de determinantes epidemiológicos del hospedero y del hongo, que por antonomasia se considera un patógenos oportunista. La estructura de las biopelículas producidas por *C. albicans* involucra dos capas distintas: una delgada, capa basal constituida básicamente de levaduras, y una gruesa, capa hifal menos compacta [183].

*Candida parapsilosis* es un hongo levaduriforme diploide (doble de cromosomas) incapaz de formar hifas verdaderas, produce pseudohifas [184]. Forma parte de la flora comensal humana normal. Actualmente *C. parapsilosis* es considerada un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente a infecciones que van desde superficiales (piel, uñas, oído medio) hasta infecciones sistémicas que pueden comprometer la vida del paciente (peritonitis, endoftalmitis, trastornos articulares) [185].

Recientemente hubo un incremento en el número de casos de vulvovaginitis debida a especies de *Candida* “no *albicans*”, particularmente *C. parapsilosis* debido al uso indiscriminado de derivados azólicos [186]. Si bien esta levadura es un comensal de la vagina, las cepas vaginopáticas se caracterizan por una mayor secreción de proteinasas aspárticas, enzimas que hidrolizan la inmunoglobulina A de la mucosa, una de las barreras vaginales más efectivas contra la infección, comprometiendo la integridad de la vagina. Las infecciones urinarias por *C. parapsilosis* han aumentado notablemente en los últimos años y se encuentran relacionadas con la utilización de drenaje urinario debido a la adherencia del microorganismo a la superficie de los dispositivos, lo que constituye un factor determinante en la colonización e infección [187]. La frecuencia de candidiasis diseminada o sistémica debida a *C. parapsilosis* se ha incrementado en América Latina [188]. Es la única especie que muestra resistencia in vitro a fluconazol y a las equinocandinas, principales antifúngicos utilizados para el manejo clínico convencional de la candidiasis diseminada.

La endocarditis por *C. parapsilosis* presenta una mortalidad comprendida entre 42% al 65% y suele estar asociada con la utilización de válvulas prostéticas, el consumo intravenoso de drogas, nutrición parenteral, antibioticoterapia prolongada, enfermedad preexistente de válvulas cardíacas, episodios previos de endocarditis y cirugía cardiovascular reconstructiva [189]. *C. parapsilosis* se convirtió en los últimos años en el agente etiológico más prevalente de la peritonitis fúngica, complicación poco común pero potencialmente fatal de la diálisis peritoneal ambulatoria continua, asociado con una tasa de mortalidad por encima del 44%. Este microorganismo posee la habilidad, bajo elevadas concentraciones de glucosa (presente

en pacientes dializados), de adherirse fácilmente a material protésico con extensa formación de biopelícula en la superficie de catéteres plásticos [190]. La endoftalmitis causada por *C. parapsilosis* ha sido relacionada con extracción quirúrgica de catarata, trasplante de córnea, implantación de lentes intraoculares y tratamiento con esteroides.

Se han descrito algunos casos de infecciones pancreáticas ocasionadas por *C. parapsilosis*, principalmente necrosis y abscesos pancreáticos [191]. Dentro de los factores de riesgo se encuentran: trastornos crónico-degenerativos (particularmente la diabetes mellitus), [192] obesidad, inmunosupresión, antibioticoterapia prolongada, nutrición parenteral, alargadas estancias hospitalarias, cirugía, la utilización de dispositivos de asistencia médica [193] y neonatos prematuros de bajo peso. *C. parapsilosis* presenta diversos factores de virulencia como ser su adherencia a las células del hospedero, su capacidad de producir extensas biopelículas y limo para adherirse a catéteres plásticos [194](conglomerados de levaduras dispuestos irregularmente que le confieren resistencia significativa a la fármaco terapia) la secreción de enzimas hidrolíticas (proteinasas aspárticas, fosfolipasas y lipasas), la generación de pseudohifas (blastoconideas alargadas) y el "cambio fenotípico" (la cepa cambia su morfología colonial sin afectar su genotipo identificable) [195]. El manejo terapéutico habitual de la enfermedad invasiva por *C. parapsilosis* consiste en la administración de antifúngicos sistémicos: anfotericina B, ciertos compuestos azólicos, flucitosina y las equinocandinas (nueva línea de agentes antifúngicos que incluyen la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina).

*Cándida glabrata* es una levadura saprófita, que forma parte de la microbiota comensal. La frecuencia de infecciones superficiales y profundas por este agente ha aumentado significativamente en los últimos años con el uso de la terapia antifúngica de amplio espectro, por lo que se considera un patógeno emergente [196]. La alta mortalidad asociada a infecciones por esta levadura y su prevalencia apoyan la idea que este microorganismo sí es patogénico. Esta levadura no produce hifas ni pseudohifas pero sí, proteinasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular, lo que facilita su adherencia. El genoma de *C. glabrata* es haploide, lo cual facilita la rápida adquisición de resistencia secundaria a azoles. Ha sido aislada en infecciones intrahospitalarias y superficiales, fundamentalmente en candidiasis vulvovaginal, presentando además una mayor resistencia al fármaco de elección para el tratamiento: fluconazol [197]. Dentro del hospital, afecta a pacientes inmunocomprometidos o debilitados; se asocia al uso previo de antibacterianos y antifúngicos [198]. Se ha descrito un aumento en el aislamiento de este agente en infecciones del torrente sanguíneo. También ha sido aislada de cavidad oral, considerándose un patógeno oportunista en esa localización. Las

infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar por lo que debe solicitarse antifungigrama cuando se aísla esta levadura [186].

*Candida tropicalis* es una especie emergente que da origen a candidemias y candidurias nosocomiales [199]. Son levaduras con capacidad de filamentación formadoras de biocapa y con especial característica de adherencia relacionada con su hidrofobicidad. Manifiesta actividad enzimática aspartil-proteasa. Su prevalencia se asocia al uso prolongado de catéteres y terapéutica antifúngica de amplio espectro [200], a estados de inmunosupresión y a cirugías.

*Candida krusei* es una levadura oportunista multirresistente que se aísla cada vez con mayor frecuencia en pacientes con leucemia, adultos neutropénicos con cáncer y en trasplantados de médula ósea. Presenta una resistencia intrínseca a fluconazol y es fuertemente inhibida por caspofungina [201]. Es una especie muy hidrofóbica y por lo tanto presenta adherencia al plástico, No forma biofilm. No forma filamentos. Presenta una actividad hemolítica moderada [202].

#### **4.5. Efecto post-antimicrobiano**

El efecto post-antibiótico (PAE) [203] es la fase de latencia o recuperación del crecimiento bacteriano después de una breve exposición a un antibiótico. Es un parámetro farmacodinámico recomendable ya que su determinación es de fundamental importancia en el diseño de los regímenes de dosificación del antibiótico [204, 205]. Cuando se estudian cepas fúngicas se denomina efecto post-antimicótico (PAFE) y se define como el período de tiempo que el agente antifúngico es capaz de provocar la supresión del crecimiento del organismo luego de una exposición limitada a los agentes probados [206]. El crecimiento microbiano se determinó utilizando un método espectrofotométrico.

#### **4.6. Cálculos computacionales**

La química computacional constituye una herramienta valiosa para el análisis e interpretación de resultados experimentales e incluso, para la determinación de propiedades moleculares predictivas en sistemas de los que no se disponen valores empíricos ya que la permite simular numéricamente estructuras moleculares y reacciones químicas, basándose total o parcialmente en las leyes fundamentales de la mecánica cuántica. Existen métodos que permiten modelar moléculas estables e intermediarios inestables, de vida muy corta, así como estados de transición. La química computacional comprende dos grandes áreas dedicadas a las

estructuras de las moléculas y a su reactividad, basadas en principios físicos diferentes [207]. Una de ellas es la mecánica molecular (MM) que se basa en la mecánica clásica y la otra corresponde a los métodos de estructura electrónica (MEE) que se basan en la aplicación de la mecánica cuántica. Ambas permiten calcular un conjunto de propiedades moleculares, como por ejemplo: la energía de un determinado arreglo de átomos, la geometría óptima de un sistema molecular (es decir, el arreglo geométrico de los núcleos considerados que brinde la energía más baja con el método de cálculo empleado), frecuencias vibracionales, etc.

En esta tesis se emplearon cálculos computacionales basados en MEE (Métodos de Estructura Electrónica).

#### 4.6.1 Métodos de estructura electrónica

Los sistemas microscópicos obedecen las leyes de la mecánica cuántica, que establece que la energía y otras propiedades físicas relacionadas con sistemas como los átomos y las moléculas pueden obtenerse resolviendo la ecuación de Schrödinger [208]:

$$H \Psi = E \Psi$$

Sin embargo, excepto para algunos sistemas simples no es posible obtener soluciones exactas de esta ecuación y se utilizan diferentes aproximaciones matemáticas como los métodos *ab initio* (del latín: *desde el principio*) en los que no se emplea ningún dato empírico y los cálculos se basan solamente en los principios de la mecánica cuántica y los semiempíricos, que utilizan datos experimentales para simplificar los cálculos.

El desarrollo de la Teoría del Funcional de la Densidad (Density Functional Theory, DFT) creó una alternativa a los métodos *ab initio* y fueron elegidos fundamentalmente por el tamaño de los sistemas estudiados, ya que es aplicable a sistemas relativamente grandes, y por su costo computacional relativamente bajo. Puede definirse como aquella que persigue el objetivo de calcular la energía electrónica del estado fundamental de un sistema de  $n$  electrones por medio únicamente de su densidad, sin necesidad de conocer previamente la función de onda de dicho sistema. Así, la energía se expresa como una suma de funcionales dependientes de la densidad electrónica y permite comprender las interacciones que se producen entre los metales y los ligandos. Para lograrlo, en algunos casos se determinó la topología, y en otros se determinaron las propiedades vibracionales comparándolas con los espectros vibracionales.

La Espectroscopía Vibracional (EV) es una de las herramientas más importantes utilizadas en la caracterización de la estructura de una molécula en la que se combinan los cálculos teóricos con la información extraída de los espectros IR y Raman lo que provee inestimable información estructural [209] ya que la comparación de las frecuencias de vibración experimentales con las calculadas ayuda a interpretar los espectros de vibración y obtener conclusiones sobre los resultados experimentales.

La teoría de átomos en moléculas (Atoms in Molecules, AIM) [210, 211] provee una definición simple y rigurosa de los átomos y de los enlaces químicos, tendiendo un puente entre las modernas funciones de onda *ab initio* y el conocimiento químico. Esta teoría ayuda a recuperar conceptos químicos a través de un estudio topológico de la densidad electrónica  $\rho(\mathbf{r})$  y cantidades relacionadas tales como el Laplaciano de  $\rho(\mathbf{r})$ ,  $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ .

## 5. Objetivos

Esta tesis sostiene como objetivo sintetizar nuevos compuestos de coordinación empleando como centro metálico a los cationes de Cu(II), Zn(II) y Cd(II) y como ligando orgánicos, las moléculas de cianoguanidina y o-fenantrolina. Además se aborda el estudio de las nuevas especies complejas desde una perspectiva teórica y experimental para brindar información respecto de su estructura y sus propiedades físicoquímicas y biológicas. Entre las determinaciones realizadas destacamos aquellas que han permitido conocer la estructura del nuevo complejo (IR, Raman, cristalográfico), su solubilidad en distintos solventes y mezclas de solventes (especialmente agua y agua/dmsó), estabilidad térmica y en solución, especiación en un rango amplio de pH, actividad sobre sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa y fosfatasa alcalina), actividad antibacteriana y antifúngica sobre las cepas mencionadas anteriormente (algunas de colección y otras de aislamientos autóctonos) y actividad post antimicrobiana.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- McCleverty J, Meyer T, Eds, en *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier Pergamon, New York (2004)
- 2- Lever A, en *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 2, (J.A. McCleverty, T.J. Meyer, Eds.), Elsevier Pergamon, New York (2004).
- 3- Ribas Gispert J, *Química de Coordinación*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona (2000)
- 4- J. Huheey, *Química Inorgánica. Principios de Estructura y Reactividad*", 4 Ed., Harla, México D.F. (1997)
- 5- *Química Analítica Cualitativa 17ª Edición*, Burriel F. Madrid (1999)
- 6- Rodgers G. *Química Inorgánica*, Madrid (1995)
- 7- Kobayashi S, Mori Y, Yamashita Y. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Comprehensive Coordination Chemistry II* (2003), Pages 399–444 Volume 9: Applications of Coordination Chemistry
- 8- Baran E, "*Química Bioinorgánica*", McGraw-Hill, Madrid (1995)
- 9- Sadler P. *Inorg Chem* (1991) 36:1.
- 10- Guo Z, Sadler P. *Med Inorg Chem* (1999) 49: 183–306
- 11- Halliwell B. *Free Rad Res Commun* (1990) 9: 1-32
- 12- *Metalloproteins: Chemical Properties and Biological Effects en Bioactive Molecules*, Editado por S. Otsuka y T- Yamanaka, Elsevier. 1988, vol 8
- 13- Ibers J y Holm R, *Science*, (1980) 204: 44-53
- 14- Wolfgang M. *Amer Soc Nut Sc* (2000) 130:1455S-1458S
- 15- Lemus M, Marín L, Aponte A, Chung K. *Revista Científica, FCV-LUZ* (2012) 22:376-380
- 16- Mao H, Wang DH, Yang WX. *Aquat Toxicol* (2012) 110-111:208-213
- 17- Hamza-Chaffai A, Pellerin J, Amiard JC. *Environ Int* (2003) 28: 609–617
- 18- Vasak M, Hasler DW. *Curr Opin Chem Biol* (2000) 4:177–183
- 19- E. Ochiai, "*Química Bioinorgánica*", Reverté, Barcelona (1985)
- 20- Aaseth J. *Hum Toxicol* (1983) 257-272
- 21- Gómez Ruiz, S. *An Quím* (2010) 106: 13–21
- 22- Sorenson, J. *University of Arkansas for Medical Sciences* (1982), Little Rock, Arkansas
- 23- Kim B, Nevitt T, Thiele D, *J Nat Chem Biol* (2008) 4: 176–185
- 24- Hoekstra W, Suttie J, Ganther H, Mertz W. *University Park Press*, Baltimore (1980)
- 25- Frausto Da Silva J, Williams R. *Clarendon Press*, Oxford (1991)
- 26- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición. Vol. 1: Recomendaciones*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2006. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf) - (Sadhra SS, Wheatley AD, Cross HJ. *Dietary exposure to copper in the European Union and its assessment for EU regulatory risk assessment. Sci Total Environ.* 2007; 374:223-34.) – (WHO/FAO/IAEA. *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva: World Health Organization, 1996
- 27- Linder M. *Nutrición, Aspectos Bioquímicos, Metabólicos y Clínicos*, Cap 7, MC. Ed. Eunsa. (1988)
- 28- Almeida, A. y Lima, J. *Atom Spectrosc* (2001) 22: 324-330
- 29- Singh A, Kaushik N, Verma A, Gupta R. *Indian J Chem* (2011) 50 A: 474-483
- 30- Bartnikas T, Gitlin J. *J Biol Chem* (2003) 278: 33602–33608
- 31- King R. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 2, John Wiley & Sons, Chichester (1994)
- 32- Olivares M, Araya M, Uauy R. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2000) 31:102-111
- 33- Castillo-Durán C, Fisberg M, Valenzuela A, Egaña J, Uauy R. *Am J Clin Nutr* (1983) 37:898-903
- 34- Soria M, Repetto G, Repetto M. *Revisión general de la toxicología de los metales*. En: M. Repetto, ed. *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, Madrid (1995) 293-358
- 35- Macarulla M, Marcos R, Martínez J, Larralde J. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Farmacia y Productos Fitosanitarios. Monografías Técnicas Nº 8. VII Jornadas Toxicológicas Españolas*. Madrid (1989) 261-265
- 36- Barberá R, Farré R. *Rev Esp Cienc Tecnol Alim* (1992) 34:381-399
- 37- Aranda P y Llopis J. *Minerales*. En: *Nutrición y salud. Aspectos sanitarios* (1993): 183-239 Consejo General de Colegios Farmacéuticos
- 38- Honda R, Tsuritani I, Ishizaki M. *Environ Res* (1997) 75: 41-48
- 39- Prasad AS. *Nutrition* (2001) 17:67-69

- 40- M. Dekker. Metal Ions in Biological Systems, Vol 15 (H.Sigel Edit) New York, 1983
- 41- Cunningham B, Bass S, Fuh G, Wells J. Science (1990) 250:1709-1712
- 42- Rubio Armendáriz C, González Weller D, Alonso Marrero S, Revert Girones C, Hardisson de la Torre A. Alimentaria, Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos (2004) 353:37-44
- 43- McCall K, Huang C, Fierke C. J Nutr (2000)130:1437S-1446S
- 44- King J, Cousins R. Zinc. In: Shils M, Shike M, Ross A, Caballero B, Cousins R, eds. Modern Nutrition in Health and Disease. 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; (2006) 271-285
- 45- Truong-Tran A, Ho L, Chai F, Zalewski P. J Nutr. (2000) 130:1459S-1466S
- 46- O'Dell B. J Nutr. (2000) 130:1432S-1436S
- 47- Cousins R. Physiol Rev (1985) 65:238-309
- 48- Goyer R. Annu Rev Nutr (1997) 17:37-50
- 49- Cousins R. En: Ziegler E, Filer L. Conocimientos actuales sobre nutrición. Séptima Edición. Washington: International Life Sciences Institute (1999) 312-27
- 50- Rubio C, González Weller D, Martín-Izquierdo R, Revert C, Rodríguez I y Hardisson A. Nutrición Hospitalaria (2007) 22:101-107
- 51- SINU. Società Italiana di Nutrizione Umana. LARN (1996) 91-109
- 52- Arab A, Barr S, Becking G. National Academy Press, Washington, DC (2001) 442-501
- 53- Salzman M, Smith E, Koo C. Journal of Pediatric Hematology and Oncology (2002) 24:582-584
- 54- Hein M. South Dakota J Med (2003) 56:143-147
- 55- Barceloux D. J Toxicol: Clin Toxicol (1999) 37:279-292
- 56- National Research Council. Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC (2001)
- 57- Prasad A. J Trace Elem Med Biol (2012) 26:66-69
- 58- Hambidge M. J Nutrit (2000) 130:1344S-1349S
- 59- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Progr Neurobiol (2005) 75:367-390
- 60- Prasad A y Kucuk O. Cancer Metastasis Rev (2002) 21:291-295
- 61- Mori R, Ota E, Middleton P, Tobe-Gai R, Mahomed K, Bhutta Z. Cochrane Database Syst Rev (2012) 7:CD000230.
- 62- Ramirez A. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2002) 63:51-64
- 63- Klaassen C. En: Brunton L, Lazo J, Parker K, editores. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. Nueva York: McGraw Hill (2008) 1766-1768
- 64- La Dou J. Medicina Laboral y Ambiental. 2ª. Edición (1999). México: Ed. El Manual Moderno
- 65- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Toxicology (2003) 192: 95-117
- 66- Mead M. Noticias de salud ambiental. Salud Publica Mex (2011) 53:178-185
- 67- Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Servicios de Salud Pública. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. División de Toxicología y Medicina Ambiental. Resumen de salud pública, cadmio (1999) 1306-1319-0:1-10
- 68- Irwin R, Van Mouwerik M, Stevend L, Seese M, Basham W: Environmental contaminants encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the federal government as electronic document, retrieved 25 February 2003, form <http://www.nature.nps.gov/toxic/cadmium.pdf>
- 69- Manahan S. Environmental chemistry. 7ª ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers(2000)
- 70- Pasquali R. Química ambiental. Buenos Aires: Akadia, (2003)
- 71- Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Estudio sobre los posibles efectos en la salud humana y el medio ambiente en América Latina y el Caribe del comercio de productos que contienen cadmio, plomo y mercurio. México: PNUMA (2010) 40-41
- 72- Hu H. En: Kasper D, Braunwald E, Fauci A, editores. Principios de Medicina Interna de Harrison. 16ª edición online. México: McGrawHill Interamericana, (2005) 1636,8291,9171,13276,13284
- 73- Kjellstrom T, Nordberg G. Environ Res (1978) 16:248-69
- 74- Manahan S. Environmental chemistry. 7ª ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers (2000)
- 75- Piotrowski J, Coleman D. Marc Report N° 20, MARC, Chelsea College, University of London. London (1990)
- 76- Wätjen W, Beyersmann D Biometals (2004) 17:65-78
- 77- U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries. Washington: United States Government Printing Office (2008)
- 78- Jarup L and Alfven T. Biometals (2004) 17: 505-509

- 79- International agency for research on cancer (IARC) IARC Scientific Publications Lyon (1993) 58: 119-237
- 80- National toxicology Program. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, USA (2000)
- 81- Nordberg G. *Environ Sci* (1996) 133: 137-45
- 82- Saxena D, Murthy R, Chandra S. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* (1986) 59:175-178.
- 83- Masanori K, *Ethics Sci Environm Polit* (2012) 12: 99–111
- 84- Bernard A. *Indian J Med Res.* (2008) 128:557-64
- 85- <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2008/mcs2007.pdf>
- 86- Fauci A, Braunwald E, Kasper D en Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 17ª ed. Mexico: McGrawHill Interamericana, (2009):1617,8331
- 87- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2008). *Toxicological Profile for Cadmium*. Draft for public comment. US Department of Health and Human Services. Atlanta, US
- 88- Environment Agency (EA) (2009). *Cadmium*. Science report: SC050021 / TOX 3. Environment Agency. Bristol, Uk
- 89- Gollenberg A, Hediger M, Lee P, Himes J, Louis G. *Environ Health Perspect* (2010) 118:1782-1787
- 90- Manahan S. *Environmental chemistry*. (2000)7ª ed. Boca Raton Florida: Lewis Publishers
- 91- Pérez García P, Azcona Cruz M. *Rev Esp Méd Quir* (2012) 17:199-205
- 92- Dallinger, R.en M.P. *Cajaraville, Cell biology in environmental toxicology* (1995) 135-154. Bilbao: University of the Basque Country Press Service
- 93- Dallinger R, Egg M, Köck G, Hofer R. *Aq Toxicol* (1997) 38:47–66
- 94- Bustamante P, Cosson R, Gallien I, Caurant F, Miramand P. *Marine Environ Res* (2002) 53:227-241
- 95- Bagot D, Lebeau T, JezequelK, Fabre B. *Environmental Chemistry* (2005) 215-222
- 96- Pazos, H. VIII Seminario Internacional de Terapias Alternativas, Caracas (1996)
- 97- Shivar & Atkins. *Química inorgánica*. 4ª Ed. McGraw Hill (2008)
- 98- Rivera M, Zeng W, Aposhian H, Fernando Q. *Toxicol Appl Pharmacol*. (1989) 100:96-106
- 99- Maiorino R, Akins J, Blaha K, Carter D, Aposhian H. *J. Pharmacol Exp Ther* (1990) 254:570-577
- 100- Asiedu P, Moulton T, Blum CB, et al. *Environ Health Perspect* (1995) 103:734-739
- 101- <http://www.quelatoterapia.com/quelantes-naturales.html>
- 102- Stephen M. Suru. *Biometals* (2008) 21:623-633
- 103- Hagen T, Wierzbicka G, Bowman B, Tak Yee Aw, and Jones D . *Am J Nutr* (1990) 259:G530-G535
- 104- Flora S, *Al Ameen Journal of Medical Science* (2009) 2:4–26
- 105- Rossotti F, J. (1960) en Lewis, J.; Wilkins, R. G. *Modern coordination chemistry*. New York: Interscience Publishers, Inc.
- 106- Beck M, Nagypál I. *Chemistry of Complex Equilibria* (1990) Horwood. ISBN 0-85312-143-5. sections 3.5.1.2, 6.6.1 and 6.6.2
- 107- Martell A, Motekaitis R, *Determination and Use of Stability Constants*, VCH Publishers, Inc, New York, 2<sup>nd</sup> Ed. (1992)
- 108- Cabinness D, Margerum D. *J. Am. Chem. Soc.* (1969) 91:6540-6541
- 109- Lindoy, L. *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*. Cambridge University Press. (1990). Chapter 6, Thermodynamic considerations.
- 110- Lundeen M, Hugus Z. *Thermochim. Acta* (1992)196:93-103
- 111- Ahrland S, Chatt J, Davies N. *Quart. Rev.* (1958) 12:265-276
- 112- Pearson R. *J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85:3533–3539
- 113- Beck M, Nagypál I. *Chemistry of Complex Equilibria* (1990). Hungarian Horwood. ISBN 0-85312-143-5. p354
- 114- Irving H, Williams R. *J Chem Soc* (1953) 3:3192–3210
- 115- Arena G, Contino A, Longo E, Sciotto D, Spoto G. *J Chem Soc* (2001)-*Perkin Trans. 2* (12): 2287–2291
- 116- Wedeking P, Kumar K, Tweedle M. *Mgn Reson Imaging* (1991) 10:641-648
- 117- Runge V, Scott S. *Contrast-enhanced Clinical Magnetic Resonance Imaging*. University Press of Kentucky (1998)
- 118- <http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1982/pdf/5412x2675.pdf>
- 119- Dionisi D, Galeotti T, Terranova T, Azzi, A. *Biochim. Biophys. Acta* (1975) 403:292-300
- 120- Oberley L, Bueftner G. *Cancer Research* (1979) 39:1141-1149
- 121- Sorenson J. *Biology of Copper Complexes*, Humana Press (1987): Clifton



- 122- Bienvenue E, Choua S, Lobo-Recio M, Marzin C, Pacheco P, Seta P, Tarrago G. *J Inorg Biochem* (1995) 57:157-168
- 123- Dollwet H, Sorenson J. *Trace Elements in Medicine* 2 (1985) 2:80-87
- 124- Jackson G, May P, Williams D. *J Inorg Nucl Chem* (1978) 40:1189-1194
- 125- Sorenson J, Milanino R, Rainsford K, Velo G. Eds *Kluwer Academic Publishers: Dordrecht* (1989): 69
- 126- Li M, Ding W, Baruah B, Crans D, Wang, R. *J Inorg Biochem* (2008) 102:1846-1853
- 127- Zalatan J, Fenn T, Herschlag D. *J Mol Biol* (2008) 384:1174-1189
- 128- Gomis Gavilán M, Ledesma Martín-Pintado F, Sánchez Artola B. en: *Eficacia in vivo, Eficacia in vitro. Madrid-Barcelona. ed Doyma S.A. (1997) 11135*
- 129- *Guidelines for Antimicrobial Usage, Cleveland Clinic* (2013) ISBN: 978-1-932610-85-7
- 130- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- 131- Polge C, Smith A, Parkes A. *Nature* (1949) 164:666-666
- 132- Mazur P. *J Gen Physiol* (1963) 47:347-369
- 133- Lovelock J. E. *Biochim Biophys Acta* (1953) 11:28-36
- 134- Leibo S. *Ciba Foundation Symposium 52 (new series) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands* (1977): 69-92
- 135- Kedem O, Katchalsky A. *Biochim Biophys Acta* (1958) 27:229-246
- 136- Kleinhans F. *Cryobiology* (1989) 37:271-289
- 137- Lowy F. *J Clin Infect* (2003) 111: 1265-1273
- 138- Creench C, Talbot T, Schaffner W. *J Infect Dis* (2006) 193:169-171
- 139- von Eiff E, Becker K, Machka K, Stammer H. *N Engl J Med.* (2001) 344:11-16
- 140- Olaechea P, Insausti J, Blanco A, Luque P. *Med Intensiva* (2010) 34:256-267
- 141- Crossley K, Jefferson K, Archer G, Fowler V. *Staphylococci in Human Disease 2da Edición Wiley-Blackwell* (2009)
- 142- Pier G, Ramphal R. en: *Mandell G, Bennett J, Dolin R, editores, Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone* (2005) 2587-2615
- 143- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. *Med Mal Infect* (2006) 36:78-91
- 144- Morrison J, Wenzel R. *Rev Infect Dis* (1984) 6:S627-S642
- 145- Maschmeyer G, Braveny I. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2000) 19:915-925
- 146- Crouch Brewer S, Wunderink R, Jones C, Leeper K. *Chest* (1996) 109:1019-1029
- 147- Crnich C, Safdar N, Maki D. *Respir Care* (2005) 50:813-836
- 148- Krcmery V, Koprnova J, Gogova M, Grey E, Korcova J. *J Infect* (2006) 52:461-463
- 149- Dubois V, Arpin C, Noury P, Andre C, Coulange L, Quentin C. *J Clin Microbiol* (2005) 43:4129-4138
- 150- Hamasuna R, Betsunoh H, Sueyoshi T. *Int J Urol* (2004) 11:941-947
- 151- Wang M, Liu C, Shiao A, Wang T. *J Chin Med Assoc* (2005) 68:347-352
- 152- Stern G. *Cornea* (1990) 9:S36-S38
- 153- Vrochides D, Feng W, Singh A. *Tex Heart Inst J* (2003) 30:322-324
- 154- Marshall J, Christou N, Meakins J. *Ann Surg* (1993) 218:111-119
- 155- N'Guyen Y, Baumard S, Vernet-Garnier V. *Scand J Infect Dis* (2012) 44:79-85
- 156- Fajardo Olivares M, Hidalgo Orozco R, Rodríguez Garrido S. *Rev Esp Quimioter* (2011) 24:74-78
- 157- Ahlstrand E, Persson L, Tiddefelt U. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2012) 31:1679-1687
- 158- Uçkay I, Pittet D, Vaudaux P, Sax H, Lew D, Waldvogel F. *Ann Med* (2009) 41:109-119
- 159- Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. *Clin Microbiol Infect* (2005) 11:967-973
- 160- Obolski U, Alon D, Hadany L and Stein G. *J Antimicrob Chemother* (2014) 69:2541-2546
- 161- Raad I, Bodey G. *Clin Infect Dis* (1992) 15:197-21
- 162- Herwaldt L, Geiss M, Kao C, Pfaller M. *Clin Infect Dis* (1996) 22:14-20
- 163- Daini O, Akano S. *Scientific Research and Essay* (2009) 4:346-350
- 164- Haque N, Hossain M, Bilkis L, Musa A, Mahamud C, Bari M. *Mymensingh Med J.* (2009) 18:142-147
- 165- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. *J Antimicrob Chemother* (2010) 65:1955-1958
- 166- Ryan K, Ray C (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw Hill*
- 167- Franz C, Stiles M, Schleifer K, Holzapfel W. *Int J Food Microbiol.* (2003) 88:105-122
- 168- Eaton T, Gasson M. *Appl Environ Microbiol* (2001) 67:1628-1635
- 169- Gilmore M, Lebreton F, van Schaik W. *Curr Opin Microbiol* (2013) 16:10-16
- 170- Pelicoli Riboldi G, Frazzon J, Alves d'Azevedo P, Guedes Frazzon A. *Braz J Microbiol* (2009) 40:125-128

- 171- Donabedian S, Thal L, Hershberger E, Perri M, Chow J, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos M. *J Clin Microbiol* (2003) 41:1109-1113
- 172- Witte W. *Int J Antimicrob Agents* (2000) 14:321-325
- 173- Sørensen T, Blom M, Monnet D, Frimodt-Møller N, Poulsen R, Espersen F. *N. Engl J Med* (2001) 345:1161-1166
- 174- Gilmore M, Ferretti J. *Science* (2003) 299:1999–2002
- 175- Pemán J y Salavert R. *Enferm Infecc Microbiol Clin* (2013) 31: 328-341
- 176- Rippon J. *Micología Medica* (1991) Editorial Interamericana
- 177- Bruatto M, Marinuzzi G, Raitere R, Sinicco A. *Mycoses* (1992) 35:53-56
- 178- Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, Alakomi HL, Perheentupa J, Asikainen S. *Oral Microbiol Immunol* (2000) 15:238-244
- 179- Zaugg C, Borg Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. *Infect Immun* (2001) 69:405-412
- 180- Cotter G, Kavanagh K. *Br J Biomed Sci* (2000) 57: 241-249
- 181- Fekete-Forgacs K, Gyure L, Lenkey B. *Mycoses* (2000) 43:273-279
- 182- Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, Alakomi HL, Perheentupa J, Asikainen S. *Oral Microbiol Immunol* (2000) 15:238-244
- 183- Baillie G, Douglas L. *J Med Microbiol* (1999) 48:671-679
- 184- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF. *Nature* (2009) 459:657-6624
- 185- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Clin Microbiol Rev* (2008) 21:606-625
- 186- Sobel J. *Lancet* (2007) 369:1961-1971
- 187- Camacho D, Gasparetto A, Svidzinski T. *Mycopathologia* (2007) 163:261-266
- 188- Colombo A, Nucci M, Salomao R. *Diagn. Microbiol. Infect Dis* (1999) 34:281-286
- 189- Khan M, Ali S, Baig M, *J Cardiol* (2007) 118:58-59
- 190- Van Asbeck E, Clemons K, Stevens D. *Crit Rev Microbiol* (2009) 35:283-309
- 191- Kull E, Ripault M, Gautret P. *Gastroenterol Clin Biol* (1999) 23:978-980
- 192- Dorko E, Baranova Z, Jenca A. *Folia Microbiol (Praha)* (2005) 50:255-261
- 193- Figueiredo V, de Assis Santos D, Resende M. *Mycopathologia* (2007) 164:27-33
- 194- Branchini M, Pfaller M, Rhine-Chalberg J. *J Clin Microbiol* (1994) 32:452-456
- 195- Fidel P, Vazquez J, Sobel J. *Clin Microbiol Rev* (1999) 12:80-96
- 196- Torres-Rodríguez J, Morera Y, López O. *Candida glabrata: un patógeno emergente. Control de Calidad SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica)*. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/cglabra.pdf>
- 197- Tapia, Cecilia *Rev Chil Infect* (2008) 25:293-294
- 198- Pfaller M, Diekema D J. *Clin Microbiol Rev* (2007) 20:133-163
- 199- Galán Ladero M, Blanco M, Hurtado C, Perez Giraldo C, Gómez García A. *Yeast* (2013) 30:331-339
- 200- Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski T, Azeredo J, Oliveira R. *Mycopathol* (2010) 169:175-182
- 201- Mensa J, Gatell J, García Sánchez, J, Letang E, López Suñé E, Marco F. *Guía de Terapéutica Antimicrobiana* (2014) 24 Ed. Editorial Antares, Madrid, España
- 202- Luo G, Lakshman P, Samaranayake L, Joyce Y. *J Clin Microbiol* (2001) 39:2971-2974
- 203- Dolcino M, Zoratti A, Debbia E, Schito G, Marchese A. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2002) 46:4022–4025
- 204- Rescott D, Nix D, Holden P, Schentag J, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1988) 32:450-453
- 205- Stubbings W, Bostock J, Ingham E, Chopra I, J. *Antimicrob. Chemother.* (2004) 54:139-143
- 206- Taweechaisupapong S, Ngaonee P, Patsuk P, Pitiphat W, Khunkitti W. *S. Afr. J. Bot.* (2012) 78:37-43
- 207- Foresman J, Frisch A. *Exploring chemistry with electronic structure methods, 2nd Edition*, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA. USA (1996)
- 208- Levine I. *Química Cuántica*. Editorial AC, España (1977)
- 209- Islas M, Franca C, Etcheverry S, Ferrer E, Williams P. *Vib. Spectrosc.* 62 (2012) 143-151
- 210- Bader R. *Atoms in Molecules. A Quantum Theory*, Clarendon, Oxford (1990)
- 211- Popelier P. *Atoms in Molecules. An Introduction*. Pearson Education, Harlow, UK (1999)

## Capítulo 2

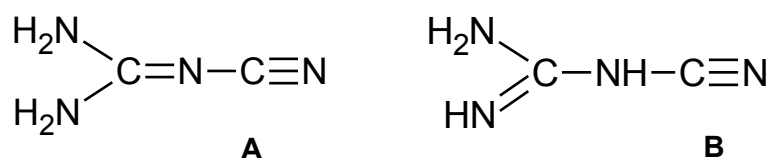
### COMPLEJOS DE Cu CON CIANOguanidina Y FENANTROLINA

#### 1- Introducción

Numerosos iones metálicos son reconocidos debido a su importante y específico rol en los procesos biológicos humanos [1, 2]. El cobre es el tercer metal de transición más abundante del ser humano y se encuentra además en otros sistemas biológicos predominantemente como catión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ya que el  $\text{Cu(I)}$  es inestable. La transición entre estos dos estados de oxidación permite que este elemento participe en una diversidad de actividades catalíticas propias de la transferencia de electrones. Este metal es requerido para el metabolismo aeróbico, y se puede encontrar como sitio activo o como componente estructural de un gran número de enzimas [3, 4]. Los complejos metálicos de cobre(II) y a veces también el catión  $\text{Cu(II)}$  están implicados en la inhibición de enzimas y han sido ampliamente estudiados por sus aplicaciones biológicas promisorias en la medicina.

#### 1.1. Cianoguanidina

La cianoguanidina (cnge) ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$ ) es un nitrilo derivado de la guanidina, es la forma dimérica de la cianamida. Puede disolverse en agua, acetona y alcohol pero no en solventes orgánicos no polares. Recientemente su actividad biológica ha sido reconocida como sustrato de la enzima nitrogenasa. El dímero funciona como un agente de acoplamiento de la deshidratación que une la glucosa y la adenosina al ácido fosfórico y luego forma glucosa-6-fosfato y adenosina-5 fosfato, respectivamente [5]. La cianoguanidina (cnge) ha sido ampliamente utilizada como un ligando de metales de transición en la síntesis de compuestos de coordinación [6, 7]. Su estructura de estado sólido ha planteado varios estudios teóricos y experimentales que sugieren la coexistencia de dos formas tautoméricas: cianoimina y cianoamina (Figura 1) [8].

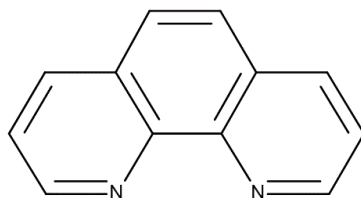


**Figura 1-** Estructuras de los diferentes conformeros de cianoguanidina: cianoimina (A) y cianoamina (B).

A pesar de su importancia biológica, cngc también tiene aplicaciones comerciales como intermediario en la formación de productos farmacéuticos, pesticidas, fungicidas, y diversos polímeros. Algunos iones de metales de transición (cobre, platino y níquel) son capaces de catalizar la adición de alcoholes al grupo nitrilo en cngc, formando n-alquilguanilureas que coordina los iones metálicos [9, 10].

## 1.2. Fenantrolina

La 1,10-fenantrolina, (o-fen) es un compuesto orgánico heterocíclico (Figura 2) liposoluble que actúa como ligando bidentado para iones metálicos de transición que ha jugado un importante rol en el desarrollo de la química de coordinación y que aún tiene un interés considerable como material de partida versátil tanto para la química orgánica, como para la inorgánica. La 1,10-fenantrolina es una molécula planar, hidrofóbica cuyos átomos de nitrógeno se encuentran bien ubicados para actuar cooperativamente en la unión con un catión. Estas características estructurales determinan su habilidad para la coordinación con iones metálicos. Tiene una gran facilidad para formar complejos octaédricos con los metales de transición [11]. La molécula de fen es moderadamente neurotóxica, altamente tóxica para los riñones y un potente diurético [12]. Se emplea como agente quelante para detectar hierro en aguas naturales y tratadas ya que tres moléculas de fen pueden unirse al Fe de la muestra y dar un complejo coloreado a pH 3 aproximadamente [13].



**Figura 2-** ortofenantrolina

### 1.3. Generalidades

En los últimos años, además, han aumentado los complejos metálicos con actividad antibacteriana. El Cu(II) y varios de sus complejos presentan actividad antimicrobiana. La complejación constituye, por lo tanto, una estrategia eficaz y promisoriosa en la mejora de las actividades biológicas de los ligandos [14, 15]. La literatura da cuenta de que diversos ligandos orgánicos pueden mejorar su perfil bacteriostático mediante la formación de complejos que resultan más activos en comparación con los ligandos no quelados [16]. Otra alternativa es la selección apropiada de ligandos basada en sus características químicas y bioquímicas del mismo. Así, 1,10-fenantrolina (o-fen) es un ligando bidentado de campo fuerte que forma quelatos muy estables con muchos metales de transición de la primera fila [17] y posee propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales reconocidas [18]. Los iones de Cu(II) son esenciales para las bacterias pero se tornan tóxicos en concentraciones mayores debido a que las células acumulan grandes cantidades del metal y este padecimiento les hace perder su integridad [19, 20]. La simple formación de complejos de cobre(II) y fenantrolina  $[\text{Cu}(\text{fen})^2][\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$  aumenta la actividad biocida en términos de sus valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) [18] y varios complejos de o-fen han demostrado tener actividad antimicrobiana [21]. O-fen es un ligando quelante que inhibe también la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) de *Escherichia coli* por eliminación de su ion zinc en la complejación [22].

Comparando la actividad de los ligandos y sus respectivos complejos de cobre(II) se determina si las diferencias en la disposición química y en el entorno de cobre(II) afectan sus actividades biológicas. El desarrollo de nuevos medicamentos antibacterianos contribuiría a minimizar los inconvenientes que surgen de la resistencia bacteriana a los antibióticos actualmente disponibles.

Se estudiaron dos complejos de Cu(II) con cnge y o-fen,  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , complejo 1 y  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ , complejo 2 [23]. Y se determinaron sus estructuras moleculares, la biodisponibilidad mediante titulaciones potenciométricas, junto con la determinación de las constantes de estabilidad y las actividades biológicas.

Por otra parte, el perfil antimicrobiano de algunos compuestos puede modificarse mediante la formación de complejos y ya fueron estudiados algunos complejos de cobre con actividad antimicrobiana [24- 27]. Es bien sabido que el cobre es un oligoelemento esencial para muchas funciones biológicas; Sin embargo, en ciertas cantidades puede tener efectos tóxicos contra los microorganismos [20]. Además, la acción antimicrobiana de o-fen se ha

demostrado en varias especies de bacterias y hongos en algunos informes anteriores [28, 29]. Dado que el aumento del uso de antibióticos, así como el uso indebido e indiscriminado de los mismos, ha dado lugar al desarrollo de cepas resistentes, es interesante tener en cuenta la enorme importancia de desarrollar nuevos fármacos con actividad antimicrobiana para el tratamiento de las enfermedades infecciosas [25, 30]. En vista de esto, se ha investigado la actividad antimicrobiana de sales de cobre(II), de los ligandos cngc y o-fen libres y del complejo 2 por los métodos de difusión en agar y dilución en agar frente a las bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y hongos (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* y *Candida albicans* de aislamientos clínicos). Por otro lado, como ya se mencionó, la supresión persistente del crecimiento bacteriano después de una breve exposición a los antibióticos está bien documentada para una amplia variedad de microorganismos; este fenómeno se conoce como efecto post-antibiótico (PAE) [31]. El PAE es la fase de latencia o período de recuperación del crecimiento bacteriano luego de una breve exposición a un antibiótico. Este parámetro farmacodinámico es una consideración importante en el diseño de los regímenes de dosificación del antibiótico [32, 33]. Es conveniente realizar la determinación del PAE en la evaluación preclínica de todos los nuevos agentes antimicrobianos para seleccionar los intervalos óptimos de dosificación de la medicación antimicrobiana [34]. El efecto post-antifúngico o postantimicótico (PAFE) también fue definido como el tiempo en el que el agente antifúngico es capaz de inhibir el crecimiento del crecimiento del microorganismo luego de una exposición limitada a los agentes antimicrobianos [35]. El PAE para cada una de las tres cepas bacterianas y el PAFEs para cada una de las cepas de *Cándida* fueron inducidos por la exposición al doble de la CIM (2xCIM) de todos los compuestos (sal de cobre, o-fen y complejo 2 durante 1 hora a 37 °C. El punto en el que se produjo el crecimiento microbiano fue determinado utilizando un método espectrofotométrico.

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) en el suero normalmente se correlaciona con enfermedades de hueso e hígado y es un marcador de diferenciación osteoblástica. Los análisis de la enzima sérica se han aplicado ampliamente en diagnósticos clínicos de rutina [36]. Algunos complejos de cobre (II) inhiben la actividad de la FAL [37, 38], lo que permite determinar un posible mecanismo de la acción antimicrobiano de los compuestos, la inhibición enzimática.

## 2- Síntesis de los complejos de Cu/cnge/fen.

### 2.1. Preparativa

El complejo 1:  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , se preparó mezclando 1 mmol de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  disuelto en 2 mL de agua, agregando una solución acuosa de cnge (5ml) y una solución etanólica de fenantrolina (2 mL) tibias bajo agitación en relación molar 1:2:2 (Cu:cnge:fen). El valor de pH se llevó a 11 por agregado de gotas de una solución de NaOH 1M y la solución se calentó a 100 °C por 10 minutos. La solución resultante, de color verde, se dejó a temperatura ambiente para su cristalización. Luego de 2 semanas, se obtuvieron cristales verdes adecuados para los estudios cristalográficos. Anal. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{Cu}$ . Calcd. C%: 46,7, H%: 3,6, N%: 21,0. Exp. C%: 47,1, H%: 3,4, N%: 20,7. El momento magnético determinado fue de 1,88 MB, indicando la presencia de un único electrón desapareado como se espera para un ion  $d^9$ .

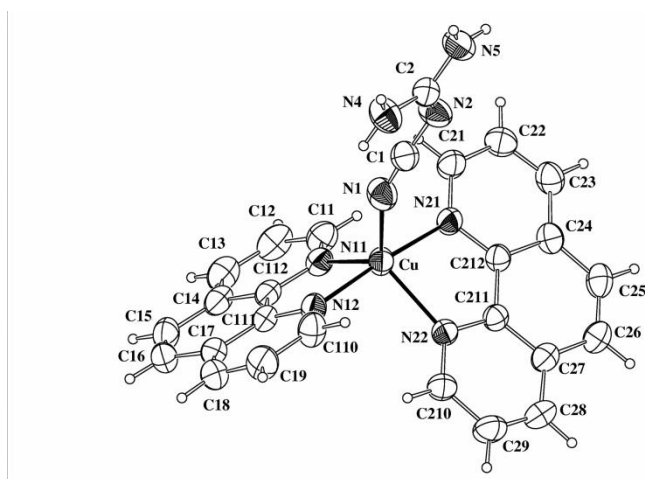
El complejo  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})](\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2$  (**2**) se preparó [23] disolviendo 1 mmol de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en 2 mL de agua tibia, luego con agitación se añadieron 5 mL de solución acuosa de cnge y 2 mL de solución etanólica de o-fen, ambas tibias. La relación molar final Cu(II):cnge:fen fue fijada en 1:1:1, con un valor de pH final de 5, a 30 °C. La solución azul resultante se mantuvo a temperatura ambiente para su cristalización. Después de tres días, se obtuvieron cristales de color azul adecuados para las mediciones de rayos X. Anal. calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_8\text{O}_7$  : 35,8%; H: 3,0%; N: 23,8%. Experimental: C: 36,0%; H: 2,9%; N: 23,9%. El valor del momento magnético fue 1,85 MB indicando la misma configuración electrónica para el cobre(II) que en el complejo 1(  $[\text{Cu}(\text{cnge})(\text{o-fen})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) cuyo momento magnético fue 1,88 MB.

### 2.2. Estudios estructurales de los complejos

La estructura de rayos X del complejo (1) revela que el ion cobre(II) está ubicado en un entorno de tipo bipiramidal trigonal, coordinado con dos grupos o-fen que actúan como ligandos bidentados a través de sus átomos de nitrógeno (N) SI y el átomo de N del grupo ciano de una molécula de cianoguanidina que entra en coordinación con un ángulo de doblado Cu-N-N. (Figura 3) Se encontraron tres aniones nitratos diferentes en el cristal. Uno de ellos está en una posición general cristalográfica, otro en un eje binario y el tercero, desordenado en el centro de inversión. Ese último se refinó por fiteo del grupo rígido  $\text{NO}_3^-$  con ocupación  $\frac{1}{2}$  correspondiente a la densidad electrónica residual. Hay 3 moléculas de agua independientes, una en posición general, otra en un eje binario y la tercera también desordenada sobre el

centro de inversión. Los átomos de H de los ligandos orgánicos se posicionaron estereoquímicamente y se refinaron con el método “riding”.

El ion cobre(II) está en un entorno bipiramidal trigonal, coordinado a dos grupos o-fenantrolina que actúan como ligandos bidentados a través de sus átomos de N [distancias de enlace Cu-N en el intervalo de 1,982 (2) a 2,115 (2) Å] y al grupo ciano del átomo de N de una molécula de cianoguanidina [d (Cu-N) = 2,004 (2) Å] que entra en la coordinación con un ángulo de Cu-NN doblada de 154,0 (3) °. Los cristales se estabilizan aún más por una red intermolecular con enlaces NH ...O de medio a fuerte involucrando como donante de los grupos terminales NH<sub>2</sub> del ligando cianoguanidina y como aceptores el ion nitrato en la posición general y las moléculas de agua de cristalización O2w y O3w.

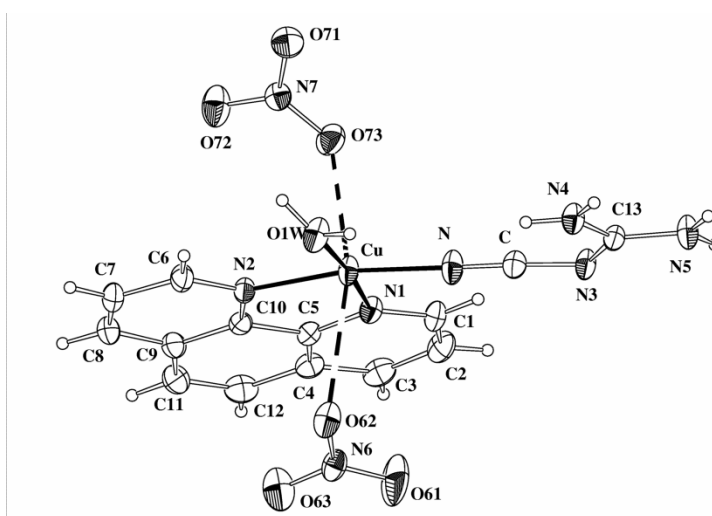


**Figura 3.** Complejo 1 [Cu(o-fen)<sub>2</sub>(cngc)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

En el complejo (2), el ion metálico está en el centro de un entorno octaédrico fuertemente alargado, ecuatorialmente coordinado a un ligando o-fen a través de sus átomos de N, hasta el átomo de N del cianuro de una molécula de cianoguanidina que entra en la esfera de coordinación y radialmente a una molécula de agua por medio de un par de electrones solitarios del oxígeno. La coordinación octaédrica distorsionada alrededor del cobre(II) se completa con dos iones nitrato en posiciones axiales (Figura 4). Los átomos de H de los ligandos orgánicos se refinaron como para el complejo (1). Los átomos de H del agua se localizaron en un mapa diferencia de Fourier y se refinaron isotrópicamente en sus posiciones encontradas. El ion metálico se encuentra en el centro de un entorno octaédrico fuertemente elongado, ecuatorialmente coordinado a un ligando o-fenantrolina a través de sus átomos de N [longitudes de enlace Cu-N de 1,990 (2) y 2,001 (2) Å], al átomo de N del grupo ciano de una



molécula de cianoguanidina [ $d(\text{Cu-N}) = 1,945(2) \text{ \AA}$ ] que entra en la coordinación radialmente [ $\angle(\text{Cu-NC}) = 177,6(2)^\circ$ ] y con una molécula de agua a lo largo del par solitario de electrones de oxígeno [ $d(\text{Cu-Ow}) = 1,966(2) \text{ \AA}$ ]. La coordinación octaédrica distorsionada alrededor de cobre se completa con dos iones de nitrato en las posiciones axiales [distancias de contacto  $\text{Cu} \dots \text{O}$  de  $2,569(2)$  y  $2,831(2) \text{ \AA}$ ]. Los contactos  $\text{Cu} \dots \text{O}$  (nitrato) se producen a través del par solitario del oxígeno [ángulos  $\text{Cu} \dots \text{ON}$  de  $126,3(2)$  y  $112,3(2)^\circ$ ]. Además, la red se estabiliza por un entramado de enlaces  $\text{N-H} \dots \text{O}$  (nitrato),  $\text{N-H} \dots \text{N}$  (cnge) y  $\text{Ow-H} \dots \text{O}$  (nitrato).



**Figura 4.** complejo **2**  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})](\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2$

En la Tabla 1 se presentan métodos para calcular los datos cristalográficos y la solución de la estructura para los complejos  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**1**) y  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$  (**2**). En la Tabla 2 se muestran las distancias interatómicas y los ángulos determinados alrededor del cobre para ambos complejos.

**Tabla 1.** Datos cristalinos y resultados del refinamiento estructural para los complejos [Cu(o-fen)<sub>2</sub>(cnge)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (**1**) y [Cu(o-fen)(cnge)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**2**)

	Complejo 1	Complejo 2
Formula empírica	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> Cu	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub> Cu
Peso molecular	668,09	469,87
Temperatura (K)	293(2)	
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c	P2 <sub>1</sub> /n
Dimensiones de celda unidad		
a(Å)	12,621(5)	10,245(1)
b(Å)	31,968(3)	13,923(2)
c(Å)	15,39(1)	12,391(2)
β(°)	111,68(4)	98,07(1)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	5771(5)	1750,0(4)
Z; densidad (calc.) (Mg/m <sup>3</sup> )	8; 1,538	4; 1,783
Coef. de Absorción. (μ, mm <sup>-1</sup> )	1,661	2,343
F(000)	2744	956
Dimensiones del cristal (mm)	0,25 x 0,25 x 0,16	0,20 x 0,20 x 0,20
Color de cristal/forma	verde/fragmento	azul claro/esférico
difractómetro/barrido	CAD4/ω-2θ	CAD4/ω-2θ
Radiac.grafito, monocr.	MoKα, λ=0.71073 Å	CuKα, λ=1.54184 Å
Rango-θ en colec. de datos	2,76 to 67,02°	4,80 to 67,91°
Rangos de índices de Miller	-14≤h≤15,0≤k≤28,-18≤l≤4	-12≤h≤12,0≤k≤16,0≤l≤14
Reflexiones recolectadas	6800	3340
Reflexiones independientes	5113[R(int)=0.0151]	3188[R(int)=0.0363]
Complejitud	99,1% (hasta θ=67,02°)	100,0%(hasta θ=67,91°)
Reflexiones observadas [I>2σ(I)]	3653	2793
Corrección de absorción	Multi-scan [39]	PLATON [40]
Max. y min. transmisión	0,777 and 0,682	0,652 and 0,652
Datos/restricciones/parámetros. <sup>b</sup>	EXPRESS [41]	
y estruct. soluc. <sup>c</sup> y	SHELXS-97 [42]	
programas refinamiento <sup>d</sup>	SHELXL-97 [43]	
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Pesos, w	$[\sigma^2(F_o^2)+(0.097P)^2+1.24P]^{-1}$	$[\sigma^2(F_o^2)+(0.058P)^2+0.97P]^{-1}$
	$P=[\text{Max}(F_o^2,0)+2F_c^2]/3$	
Datos/restric./param.	5113/4/434	3188/0/280
Bondad de ajuste en F <sup>2</sup>	1,045	1,075
Índices R finales [I>2σ(I)]	R1=0,0497,wR2=0,1391	R1=0,0364, wR2=0,0970
Índices R (todos los datos)	R1=0,0679,wR2=0,1622	R1=0,0422, wR2=0,1035
Mayor diferencia pico-hueco (e.Å <sup>-3</sup> )	0,288 y -0,343	0,526 y -0,353

<sup>a</sup> Refinamiento por cuadrados mínimos de valores de  $(\sin\theta/\lambda)^2$  con reflexiones 25(**1**) y 23(**2**) en los rangos  $16.22<\theta<40.28^\circ$  (**1**) y  $17.89<\theta<39.58^\circ$  (**2**).

<sup>b</sup> Correcciones: Lorentz, polarización y absorción.

<sup>c</sup> Factores de scattering neutral y correcciones de dispersion anómalas .

<sup>d</sup> Estructura resuelta por métodos directos y Fourier.

<sup>e</sup>  $R1=\sum ||F_o|-|F_c||/\sum |F_o|$ ,  $wR2=[\sum w(F_o^2-F_c^2)^2/\sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$ .

**Tabla 2.** Distancias de enlace interatómicas (Å) y ángulos (°) alrededor del cobre en [Cu(o-fen)<sub>2</sub>(cnge)] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y [Cu(o-fen)(cnge)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

[Cu(o-fen) <sub>2</sub> (cnge)] (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		[Cu(o-fen)(cnge)(H <sub>2</sub> O)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	
<b>Distancias de enlace</b>		<b>Distancias de enlace</b>	
Cu-N(12)	1,982(3)	Cu-N	1,945(2)
Cu-N(21)	2,001(2)	Cu-O(1W)	1,966(2)
Cu-N(1)	2,004(4)	Cu-N(2)	1,990(2)
Cu-N(22)	2,095(2)	Cu-N(1)	2,001(2)
Cu-N(11)	2,115(3)	Cu-O(73)	2,569(2)
		Cu-O(62)	2,831(2)
<b>Ángulos de enlace</b>		<b>Ángulos de enlace</b>	
N(12)-Cu-N(21)	173,7(1)	N-Cu-O(1W)	92,38(9)
N(12)-Cu-N(1)	95,9(1)	N-Cu-N(2)	171,48(8)
N(21)-Cu-N(1)	90,4(1)	O(1W)-Cu-N(2)	91,81(8)
N(12)-Cu-N(22)	95,8(1)	N-Cu-N(1)	93,05(8)
N(21)-Cu-N(22)	80,6(1)	O(1W)-Cu-N(1)	174,38(8)
N(1)-Cu-N(22)	121,3(1)	N(2)-Cu-N(1)	82,62(8)
N(12)-Cu-N(11)	80,9(1)	N-Cu-O(73)	100,85(8)
N(21)-Cu-N(11)	96,0(1)	O(1W)-Cu-O(73)	89,92(8)
N(1)-Cu-N(11)	122,2(1)	N(2)-Cu-O(73)	86,56(7)
N(22)-Cu-N(11)	116,4(1)	N(1)-Cu-O(73)	90,47(7)
		N-Cu-O(62)	95,20(8)
		O(1W)-Cu-O(62)	91,10(8)
		N(2)-Cu-O(62)	77,31(6)
		N(1)-Cu-O(62)	86,97(7)
		O(73)-Cu-O(62)	163,86(6)

### 2.3. Espectroscopía vibracional

Las principales características en los espectros IR de los ligandos modificados por coordinación están relacionadas con los modos de vibración de cnge y el anión nitrato. Se observan dos bandas de fuerte intensidad  $\nu$  (C≡N) para cnge en 2212 y 2162 cm<sup>-1</sup>. Cuando se produce la coordinación en el complejo 2 estas bandas se corren a mayores frecuencias con inversión en sus intensidades, 2223-2184 cm<sup>-1</sup> de manera similar a lo que sucede cuando el ion cianuro coordina a un metal (Figura 5) [44-47].

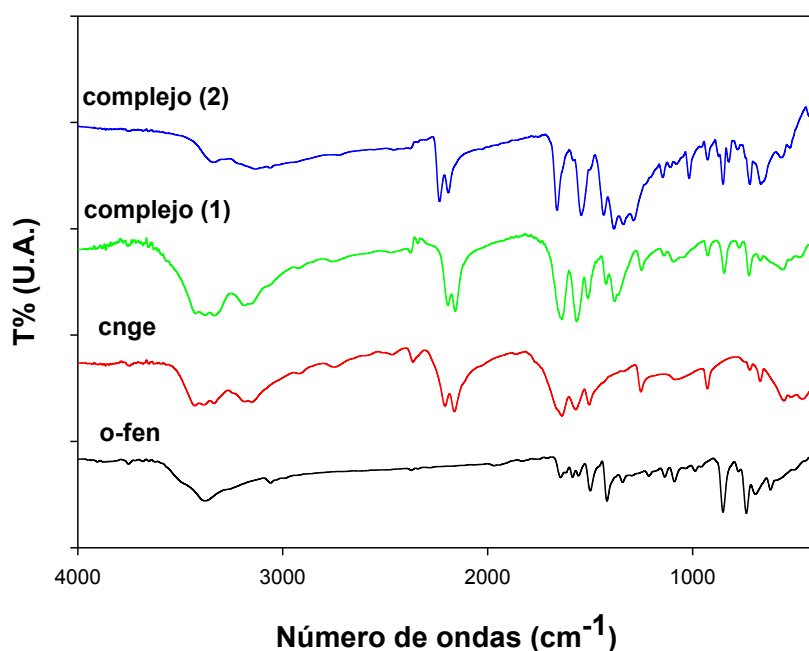
Por el contrario, la coordinación de cnge en el complejo 1 produce el efecto contrario en el desplazamiento de estas bandas (2180-2148 cm<sup>-1</sup>) manteniendo la misma relación en sus intensidades relativas. En el complejo 2 cnge está unido firmemente en un entorno octaédrico con una distancia muy corta Cu-N (1,945 Å) y los ángulos son mayores Cu-NC (177,6°). En el complejo 1, cnge se encuentra en la base de una bipirámide trigonal con distancias Cu-N mayores (2,004 Å), y menores ángulos de coordinación Cu-N (1) -C (1) ángulos (154,0°), por lo

que la unión al metal es más débil y el modo vibracional ocurre a menores valores de número de onda (Tabla 3).

En el segundo complejo el Cu(II) tiene menor densidad electrónica y recibe densidad del grupo ciano por vía  $\sigma$  tan fuertemente que se produce el acortamiento de la distancia Cu-N y el doblete del espectro vibracional se corre a mayor frecuencia. Evidentemente, el enlace Cu-N se hace más fuerte en el segundo complejo donde el metal se une a 3 átomos de N y 3 átomos de O. En el primer complejo el cobre se une a 5 átomos de N y se comporta como un ácido de Lewis más débil. Además, en relación con el grupo nitrato, una disminución de la simetría de  $D_{3h}$  en (1) a  $C_{2v}$  en (2) explica el desdoblamiento de la banda  $\nu_3$  ( $E'$ ) del anión nitrato ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ) que se observa en  $1425$  y  $1377\text{ cm}^{-1}$ . La diferencia de estos dos valores,  $\Delta = 48\text{ cm}^{-1}$ , es menor que la reportada ( $\Delta = 115\text{ cm}^{-1}$ ) [31] para una coordinación monodentada del anión nitrato. Sin embargo, la tendencia en el valor de  $\Delta$  confirma la interacción de un solo átomo de oxígeno del anión nitrato al cobre(II), de acuerdo con el análisis estructural. Por otra parte, en base a nuestros datos espectroscópicos hemos descartado una interacción en forma bidentada del anión nitrato con el metal debido a que en este caso, se esperaría un desdoblamiento aún mayor de las bandas ( $\Delta = 186\text{ cm}^{-1}$ ). Para ambos compuestos, hemos observado las bandas características de o-fen situadas en  $850$  y  $721\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 3.** Comparación de las distancias de enlace de los complejos de Cu (1) y (2) con los datos vibracionales observados.

<b>[Cu(o-fen)<sub>2</sub>(cnge)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>		<b>[Cu(o-fen)(cnge)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]</b>	
<b>Distancias de enlace</b>		<b>Distancias de enlace</b>	
Cu-N(1)	2,004(4)	Cu-N	1,945(2)
C(1)-N(1)	1,146(5)	C-N	1,151(3)
C(1)-N(2)	1,284(5)	C-N(3)	1,293(3)
C(2)-N(2)	1,327(5)	N(3)-C(13)	1,345(3)
C(2)-N(4)	1,320(4)	N(4)-C(13)	1,317(3)
C(2)-N(5)	1,320(4)	N(5)-C(13)	1,326(3)
$\nu_{C\equiv N},\text{ cm}^{-1}$	2180	2223	<b>2208 (cnge)</b>
$\nu_{C\equiv N},\text{ cm}^{-1}$	2148	2184	<b>2162 (cnge)</b>



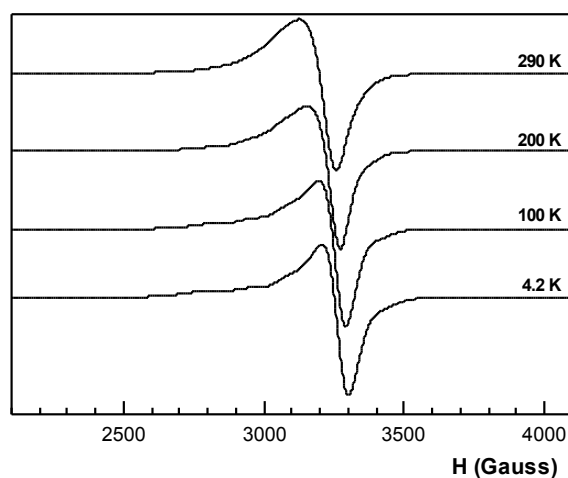
**Figura 5.** Espectros de FTIR de los complejos de Cu **(1)** y **(2)** y comparación con los espectros de los ligandos cnge y o-fen.

#### 2.4. Espectroscopía de resonancia de espín electrónico (EPR)

Los espectros de EPR de polvo se registraron a temperaturas desde 4,2 K hasta temperatura ambiente para ambos compuestos. La simulación del espectro experimental se realizó cuando el programa SimFonia (WINEPR SimFonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmβH, 1996). Las medidas de susceptibilidad magnética para muestras policristalinas se llevaron a cabo en el rango de temperatura de 5-300 K con un magnetómetro Quantum Design MPMS-7 SQUID y un campo aplicado de 0,1 T. Las correcciones diamagnéticas de los átomos constituyentes se estimaron a partir de las constantes de Pascal.

Los espectros de polvo de EPR de ambos compuestos se registraron a diferentes temperaturas operando con las bandas X- y Q-. Los parámetros del Hamiltoniano fueron estimados por comparación con el espectro experimental y aquellos calculados por la teoría de perturbación de segundo orden con el programa de simulación (WINEPR-SimFonia, version 1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmβH, 1996). Los parámetros fueron optimizados por el método de prueba y error. La apariencia general de todos los espectros registrados sugiere un sensor g- de simetría axial para ambos complejos, a pesar que se observen diferencias entre ellos.

La evolución térmica del espectro de banda X- de  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**1**) registrado en muestra policristalina se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Espectro de EPR experimental en banda X a 4,2; 100; 200 y 290 K del complejo  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

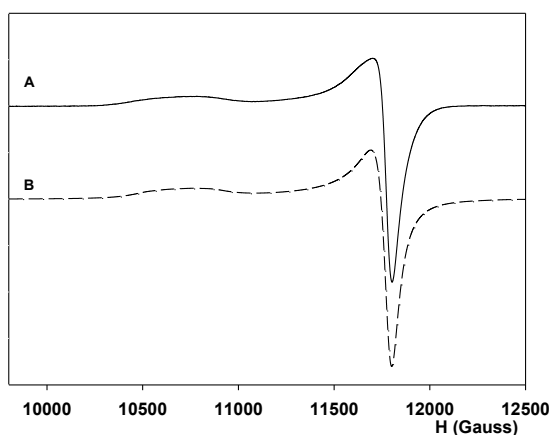
El espectro a temperatura ambiente es característico de un tensor  $g$  axial aún si está pobremente resuelto debido al ancho de línea relativamente grande. Al enfriar hasta 4,2 K el incremento del tiempo de relajación del espín de la red produce un angostamiento significativo de la banda y pueden claramente detectarse contribuciones de una estructura hiperfina en la región de campo bajo del espectro. Desafortunadamente, la resolución alcanzada a bajas temperaturas no fue suficiente para permitirnos fitear el espectro con una única solución sin ambigüedades.

La simetría axial aparente del tensor  $g$ - y la posición de la contribución perpendicular ( $g_{\perp} > 2,04$ ) sugieren un estado fundamental  $dx^2-y^2$  para el cromóforo  $[\text{CuN}_5]$  en vez de la topología de bipirámide trigonal (BPT) deducida por los estudios de difracción de rayos X. Sin embargo, es de hacer notar que la apariencia axial de muchos espectros de EPR de  $\text{Cu}(\text{II})$  con simetría BPT no se debería a una pequeña pero importante contribución del orbital  $dx^2-y^2$  que permanece en el estado fundamental, sino a la contribución a efectos vibrónicos del orbital  $dz^2$  que promedian los valores  $g$  y  $A$  en el plano [48, 49]. Como para el efecto Jahn-Teller usual, parece que modos vibracionales apropiados puedan admitirse para permitir desviaciones del estado fundamental  $dz^2$  el que fue forzado por la restricción que ejercen los ligandos bidentados o-fen sobre el  $\text{Cu}(\text{II})$ . La estructura cristalina del complejo (**1**) indica una desviación del ángulo de  $120^\circ$  de una geometría BPT y cristaliza en un grupo espacial  $C2/c$  con gran similitud con otros complejos BPT [50]

Para estos tipos de simetría, los valores  $g$  reflejan mejor la gran anisotropía en el plano ecuatorial de la BPT, con valores de  $g_{||}$  mayores que los de  $g_{\perp}$  (como se observa en el complejo 1). La existencia de procesos dinámicos se comprueba por la dependencia con la temperatura exhibida en los espectros de EPR del complejo 1, de manera similar a aquéllos observados en complejos de níquel y amoníaco debido al desarrollo de simetrías más efectivas a mayores temperaturas [51].

La Figura 7 muestra la señal de resonancia mejor resuelta para el EPR de la muestra policristalina del complejo 2  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ . Los parámetros de EPR deducidos a partir del espectro simulado obtenido de la banda Q- (290K) son  $g_{||} = 2,272$  y  $g_{\perp} = 2,061$  siendo  $A_{||} = 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  y  $A_{\perp} < 10 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . La secuencia  $g_{||} > g_{\perp} > 2,04$  es coherente con un estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$  como se esperaba para un octaedro alargado. Por otra parte, el bajo valor  $g_{||}$  está en buen acuerdo con el entorno octaédrico fuertemente alargado observado en el análisis estructural para el ion Cu(II). Como era de esperar, la constante de acoplamiento hiperfino calculada para la componente paralela es comparable con los valores encontrados para los complejos en los que el átomo de cobre(II) con grupos atómicos que contienen átomos de N- y O- [52-55]. A partir de nuestros parámetros de EPR se calcula un factor de distorsión tetragonal  $f = g_{||} / A_{||} = 162 \text{ cm}$  (enfoque Blumberg-Peisach) que se encuentra en el rango para los complejos de cobre(II) que contienen 3 átomos de N- y 1 átomo de O- en el esfera de coordinación alrededor del centro metálico [56].

Las medidas de susceptibilidad magnética realizadas entre 4,2 K y temperatura ambiente han mostrado un comportamiento típico de Curie-Weiss para ambos compuestos. Las constantes de Curie calculadas resultaron  $0,440$  y  $0,428 \text{ cm}^3\text{K/mol}$  para los complejos 1 y 2, respectivamente, correspondientes a un promedio de los valores de  $g$ - de  $2,16$  y  $2,13$  en buen acuerdo con los resultados de EPR. La intersección de la temperatura de Weiss es cercana a cero en ambos casos indicando que los centros de Cu(II) están prácticamente aislados desde el punto de vista magnético, en acuerdo con la detección de estructura hiperfina en los espectros de EPR.



**Figura 7.** Espectros en polvo de EPR, banda Q-, (A) Experimental y (B) simulado a 290 K para el complejo  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$ .

## 2.5. Espectros electrónicos

Se midieron los espectros electrónicos UV-visible y los espectros de reflectancia difusa de los dos complejos (véase la Tabla 4). El espectro de reflectancia difusa para el complejo (2) mostró bandas anchas características de complejos de cobre (II) con efecto Jahn-Teller (octaedro tetragonalmente distorsionado), y cromóforo  $\text{CuN}_3\text{O}_3$  [57].

Para el complejo (1) las transiciones se localizaron en el rango esperado para un cromóforo  $\text{CuN}_5$  (bipirámide trigonal). El cambio a la región azul con respecto al complejo cobre(II)bis(o-fenantrolina)( $\text{H}_2\text{O}$ ) es indicativo de la sustitución del átomo de oxígeno de la molécula de agua de la esfera de coordinación de cobre por el átomo dador de nitrógeno de cnge [50].

Los espectros UV-visible en solución acuosa a pH 10,2 muestran los máximos de absorción de las bandas a ca. 670 nm. Como la posición de las bandas d-d no sufre cambios apreciables tras la disolución del complejo 2, se deduce que no existen diferencias significativas entre el entorno alrededor del metal en estado sólido y en solución. Sin embargo, el complejo 1 es capaz de ampliar su esfera de coordinación en caso de disolución, según lo sugerido por el cambio observado en el desplazamiento de la banda electrónica hacia el azul. Los espectros en solución consisten en una banda ancha centrada a ca. 670 nm y un hombro en el lado de baja energía. Este envolvente de banda ancha contiene las transiciones  $\text{d}_{xy} \rightarrow \text{d}_{x^2-y^2}$  y  $\text{d}_{xz}, yz \rightarrow \text{d}_{x^2-y^2}$ . La tercera transición electrónica esperada en una simetría  $\text{D}_{4h}$  aproximada ( $\text{d}_{z^2} \rightarrow \text{d}_{x^2-y^2}$ ) se produce a bajas energías. La posición del pico principal de la



banda ancha se encuentra entre los valores normales observados para cromóforos  $\text{CuO}_6$  y  $\text{CuN}_6$  (770 y 550 nm, respectivamente).

**Tabla 4.** Espectros electrónicos de absorción y de reflectancia difusa para los complejos (1) y (2) (posiciones de las bandas en nm).  $\epsilon$ , coeficientes de extinción molar en  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

	<b>[Cu(cnge)(o-fen)H<sub>2</sub>O(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (complejo 2) Azul</b>	<b>[Cu(cnge)(o-fen)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (complejo 1) Verde</b>
<b>Reflectancia difusa</b>	650, 745 (ancha)	755 (ancha)
<b>Solución acuosa pH=10</b>	668 $\epsilon= 47.8$	672 $\epsilon= 21.2$

### 3- Determinación de constantes de acidez y de estabilidad. Mediciones potenciométricas

Las constantes de estabilidad, o constantes de equilibrio para la formación de complejos metálicos, han sido empleadas como una medida efectiva de la afinidad de un ligando por un ión metálico en solución. La IUPAC define el análisis de especiación como “la actividad analítica de identificar y medir la cantidad de una o más especies químicas individuales en una muestra” [58, 59]. La especiación de una muestra se define como la distribución de especies químicas definidas de un elemento en un sistema.

El Cu(II) se asocia con actividades catalíticas o regulatorias a proteínas que participan en algunos de los procesos químicos vitales fundamentales y en dichas enzimas y proteínas actúa como ácido de Lewis. Con la finalidad de estudiar qué especies predominan en solución acuosa a pH fisiológico se hace necesario un estudio de distribución de especies utilizando técnicas potenciométricas.

Existen diferentes métodos para determinar constantes de estabilidad (potenciometría, espectrofotometría, espectroscopía NMR, polarografía, colorimetría, conductividad iónica, etc). En el campo de la Química Bioinorgánica, la técnica más usada es la potenciometría [60, 61]. Ésta es una titulación potenciométrica, en la que se agrega una base estandarizada en pequeños incrementos a una solución ácida del ligando bien caracterizada, en ausencia y en presencia de concentraciones conocidas del ión metálico y de un electrólito que provea la fuerza iónica necesaria (se eligió una fuerza iónica similar a la que existe en los fluidos biológicos: NaCl 0,150 M) y se va midiendo la concentración de iones hidrógeno utilizando un electrodo de vidrio de alta precisión.

Las constantes de estabilidad de los complejos y las constantes de protonación de los ligandos fueron determinadas en una celda termostatazada a 298 K ( $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ ) sellada, con agitación magnética constante de la mezcla, 0,150 mol  $\text{L}^{-1}$  de fuerza iónica (NaCl) y con

circulación de nitrógeno como gas inerte [23, 62]. Las FEM se midieron con un pehachímetro Schott Gerate TS165 de las siguientes características: rango  $-2.000$  a  $20.000$  pH, Resolución:  $0.1/0.01/0.001$  pH;  $1/0.1$  mV y  $0.1$  °C y precisión relativa:  $\pm 0.002$  pH,  $\pm 0.1$  mV a  $25$  °C y  $\pm 0.2$  °C.

Los volúmenes añadidos se determinaron usando una pipeta automática Techware (Sigma) Digitrate de 25 ml o bureta digital capaz de leer volúmenes de hasta 0,01 mL. La primera corrida experimental se destina a la determinación de las constantes de protonación del ligando aislado, a través del perfil de pH en un rango que usualmente va entre 2 y 12. Luego es necesario obtener el perfil de pH medido para el sistema que contiene diversas relaciones molares metal/ligando. A continuación se repite la operación para el segundo ligando y, por último, se titula el sistema cuaternario.

El programa que se utilizó para calcular las constantes de protonación a partir de los datos potenciométricos es el PKAS [63]. Luego esas constantes se introducen en el programa BEST [64], el cual minimiza la desviación estándar entre los valores de pH calculados y observados de la totalidad de la curva de titulación. El programa SPE calcula la distribución de especies a partir de constantes de estabilidad dadas. Finalmente, las constantes obtenidas se introducen en el programa SUPERQUAD para su refinación final.

Todas las soluciones fueron preparadas usando como solvente agua tridestilada, desionizada, libre de carbonatos y enfriada bajo flujo constante de nitrógeno y fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. El grado de contaminación con carbonato se determina por el método de Gran [65]. Las soluciones diluidas de HCl (Merck pa) se estandarizaron *versus* base Trisma (hidroximetil aminometano). El agente titulante, es este caso hidróxido de sodio diluido, se preparó a partir de una solución saturada de NaOH y fue estandarizada con biftalato de potasio frente al ácido clorhídrico. El NaCl se secó hasta peso constante y se guardó en un desecador sobre  $\text{CaCl}_2$ . El electrodo de vidrio se calibró aparte en una solución cuya concentración de cationes de hidrógeno era bien conocida antes y después de cada titulación.

Para la calibración del electrodo y la obtención de la constante respectiva, se trabajó con la siguiente ecuación:

$$E = E^{\circ} + g \cdot \log [H] + E_j (I)$$

donde  $E_j = J_{ac}$ , el cual fue despreciado por trabajar a pH menor a 3.

Luego se graficó  $E - g \cdot \log [H]$  en función de  $[H]$

$$[H] = (V_o \cdot H_o + V_t \cdot H_t) / (V_o + V_t)$$

donde  $H_o = [H]$  en el vaso.

El valor de  $H_o$  se calculó determinando el volumen equivalente por extrapolación, graficando  $10E/g (V_o+V_t)$  en función de  $V_t$ .

Con el valor de  $H_o$  se pudo calcular  $[H]$  para cada volumen de titulante añadido y así se calculó  $E^\circ$ , que constituye la constante del electrodo, de esta manera se llegó a la ecuación (I) donde:

$$E = 405,6 + 59,09 \cdot \log [H]$$

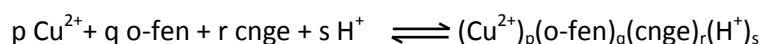
Luego se realizó la titulación potenciométrica Cu(II)/cianoguanidina. Con los valores de  $[H]$  obtenidos en la titulaciones se graficaron las curvas correspondientes a cada una de ellas. Se ensayaron diferentes proporciones de metal/ligando con el fin de evitar la precipitación. Las soluciones de cobre se prepararon disolviendo  $CuCl_2$  (Merck) y todos los datos se determinaron desde un pH muy bajo (el más bajo al que se pudo llegar experimentalmente) hasta pH 11.

### 3.1. Resultados

La síntesis química indicó que los complejos  $[Cu(o-fen)_2(cnge)](NO_3)_2 \cdot 2H_2O$  y  $[Cu(o-fen)(cnge)(H_2O)(NO_3)_2]$  se podrían preparar con éxito en forma microcristalina usando como disolvente una mezcla orgánico-agua. Sin embargo, es dudoso que también puedan existir las mismas estructuras en la solución acuosa. Con el fin de obtener una mejor comprensión del comportamiento del sistema cuaternario, se llevaron a cabo estudios de titulación. Para la determinación de la constante de disociación ácida de los ligandos ( $LH = cngeH$ , y  $AH^+ = o-fenH^+$ ), se titularon soluciones acuosas de los ligandos protonados en ausencia de metal. El valor experimental medido para  $o-fenH^+$   $\beta_{0101}$  de 5,0 se encuentra en buen acuerdo con el valor reportado [66, 67]. El valor de pKa para  $cngeH$  no había sido reportado previamente en la literatura.

Las constantes de estabilidad de los complejos ternarios se refinaron por separado utilizando los datos de la titulación potenciométrica de estos sistemas, en las mismas condiciones de temperatura y fuerza iónica. Estos valores se fijaron y en consecuencia sólo se refinaron las especies cuaternarias en el modelo final. Se llevaron a cabo series de titulaciones con concentraciones totales variables y relaciones de concentración de los componentes diferentes para establecer el equilibrio del sistema cuaternario  $Cu^{2+}/o-fen/cnge/H^+$ .

Las constantes de formación,  $\beta_{pqrs}$ , se corresponden con la notación general:



Se asumió el valor de  $\text{pK}_w = 13,76$  (correspondiente a  $\log \beta_{000-1} = -13,76$ ) para las condiciones experimentales ( $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 150 \text{ mM}$ ).

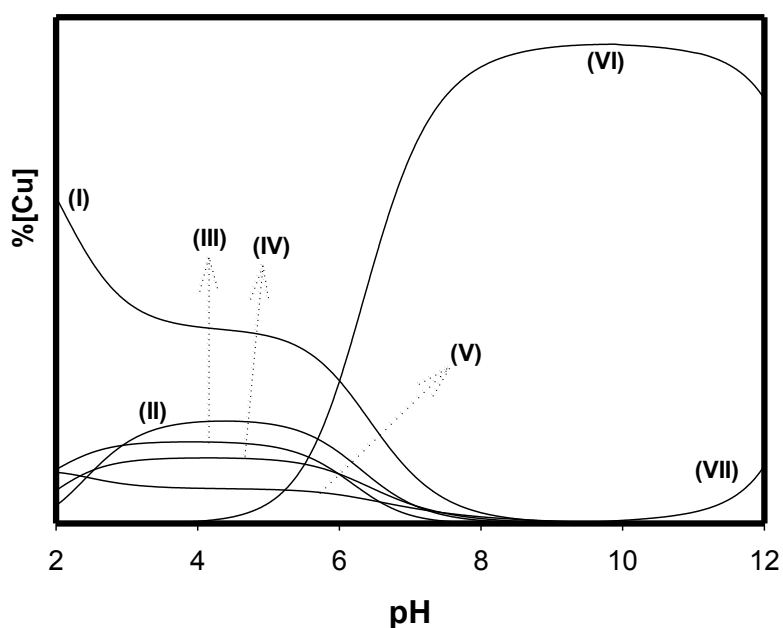
Para determinar las constantes de formación de los sistemas ternarios ( $\text{Cu}^{2+}/\text{o-fen}/\text{H}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}/\text{cnge}/\text{H}^+$ ) y cuaternario ( $\text{Cu}^{2+}/\text{o-fen}/\text{cnge}/\text{H}^+$ ), los datos recopilados de varios conjuntos de titulaciones se analizaron con los programas de cálculo Best y SUPERQUAD [58]. Para ajustar los datos potenciométricos con el programa SUPERQUAD, fueron consideradas diferentes especies y el mejor modelo fue refinado. Las constantes de estabilidad ( $\log \beta$ ), presentadas en la Tabla 5 se utilizaron para calcular la curva de distribución de las especies que se muestra en la Figura 8 para la relación 1:1:1 Cu/o-fen/cnge.

Como puede verse en la Figura 8, la característica más llamativa del sistema cobre/o-fen/cnge/ $\text{H}^+$  es que el porcentaje de cobre libre a bajos valores de pH es despreciable. Las reacciones de formación de complejos comienzan más temprano en solución fuertemente ácida ( $\text{pH} < 2$ ) cuando se forman los complejos estables mono y bis (ligando). Este comportamiento está de acuerdo con las mayores estabilidades relacionadas con los sistemas quelatos tales como Cu/o-fen/ $\text{H}^+$  [68] donde  $[\text{CuA}]^{2+}$ ,  $[\text{CuA}_2]^{2+}$  y  $[\text{CuA}_3]^{2+}$  son especies principales en este rango de pH.

Por otra parte, el complejo  $[\text{CuLH}]^{2+}$  se observó también en condiciones ácidas y parece ser la especie dominante del sistema ternario Cu/cnge/ $\text{H}^+$ , cuando se usan cantidades equimolares de cobre y del ligando. Por otro lado, al variar la relación de cobre a concentraciones de ligando tales como 1:3:1 (Cu(II):o-fen:cnge), la especie  $\text{CuA}_3$  domina el diagrama de especies (no se muestran los datos). Bajo las condiciones experimentales (relación 1:1:1), la interacción de los ligandos con el centro metálico se produce con los mismos grupos de donantes, coordinando a través de átomos de N tanto de la especie neutra (o-fen) como de la cianoguanidina protonada (cnge). La competencia entre las especies-bis ligando,  $[\text{CuA}_2]^{2+}$  y  $[\text{CuL}_2\text{H}_2]^{2+}$  se observa desde  $\text{pH} = 2$  hasta 7.

**Tabla 5.** Composición, notación y constantes de formación ( $\beta$ ) para el sistema  $\text{Cu}^{2+}/\text{cnge}(\text{L})$  y  $\text{Cu}^{2+}/\text{o-fen}(\text{A})/\text{cnge}(\text{L})/\text{H}^+$  ( $\text{NaCl}$  0,150 M, 298 K).

Especies pqrs	Fórmula	$\log \beta$
0011	$\text{AH}^+$	5,00
0101	LH	11,57
1100	$[\text{CuA}]^{2+}$	9,08
1200	$[\text{CuA}_2]^{2+}$	15,80
1300	$[\text{CuA}_3]^{2+}$	21,00
110-2	$[\text{CuAH}_2]$	-9,90
1011	$[\text{CuLH}]^{2+}$	19,27
1022	$[\text{CuL}_2\text{H}_2]^{2+}$	34,06
1110	$[\text{CuAL}]^+$	19,03
1111	$[\text{CuALH}]^{2+}$	18,40
1210	$[\text{CuA}_2\text{L}]^+$	22,14



**Figura 8.** Distribución de especies para el sistema  $\text{Cu}^{2+}/\text{o-fen}/\text{cnge}/\text{H}^+$ . Concentración total de  $\text{Cu}^{2+}$ : 1mM, o-fen: 1mM y cnge: 1mM en función del pH, 25°C,  $I = 0,150$  M NaCl.  $[\text{CuLH}]^{2+}$  (I),  $[\text{CuA}_3]^{2+}$  (II),  $[\text{CuL}_2\text{H}_2]^{2+}$  (III),  $[\text{CuA}_2]^{2+}$  (IV),  $[\text{CuA}]^{2+}$  (V),  $[\text{CuAL}]^+$  (VI),  $[\text{CuAH}_2]$  (VII).

Bajo las presentes condiciones experimentales, el aumento del valor pH induce la formación de  $[\text{CuAL}]^+$  que aparece como la especie principal en el intervalo de pH alcalino. La concentración de las otras especies cuaternarias es casi insignificante en las condiciones experimentales seleccionadas. Como vemos, la formación de especies (1,1,1,0) se ve favorecida en solución acuosa, contra las especies (1,1,1,1). El desplazamiento del equilibrio y

la liberación de un protón a partir del complejo  $[\text{CuALH}]^{2+}$  se puede explicar por la posible desprotonación de una molécula de agua coordinada, produciendo un aumento de la estabilidad termodinámica del complejo [69].

La presencia de especies hidroxilo se observa también para el complejo  $[\text{CuAH}_2]$  a valores de pH más altos. La especie  $[\text{CuAL}]^+$  también aparece como principal en el rango de pH neutro o alcalino en el intervalo de concentraciones utilizado para las determinaciones de SOD (50  $\mu\text{M}$ ). Desde pH 8,6-11,9 esta especie es prácticamente el único en el sistema (distribución porcentual: 99%, datos no mostrados).

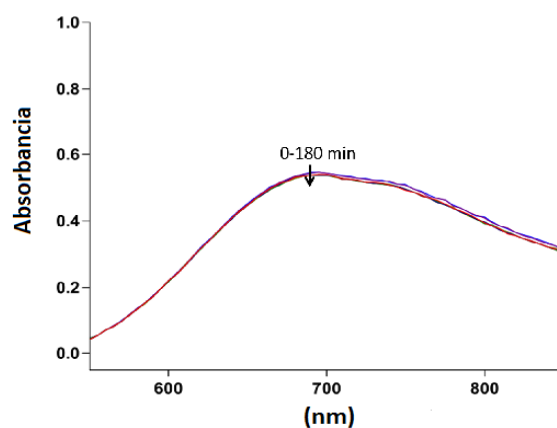
En conclusión, los resultados potenciométricos representan la distribución de las especies en soluciones acuosas a 25 °C. La formación del complejo sólido y neutro  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cngc})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$  a pH = 6 en un medio de agua-metanol caliente (condiciones empleadas en la síntesis de los monocristales) puede ser favorecida por la menor solubilidad del compuesto neutro en estos solventes. La síntesis de la especie 1,2,1,1 se realizó en condiciones extremas, es decir, a pH = 11, diferente relación molar de los reactivos (1: 2: 2), una mezcla de agua-etanol como solvente y a temperatura de ebullición. La concentración de esta especie se convierte en insignificante cuando se usan las condiciones experimentales de los estudios potenciométricos. Además, se ha determinado que este sólido no fue estable en solución acuosa, siendo transformado en el catión  $[\text{CuAL}]^+$  tras la disolución en medios alcalinos. Este estudio confirma las observaciones encontradas para los otros estudios realizados (espectros electrónicos en solución y medidas de actividades de SOD, ver más abajo).

#### **4- Estudios de estabilidad en diferentes solventes**

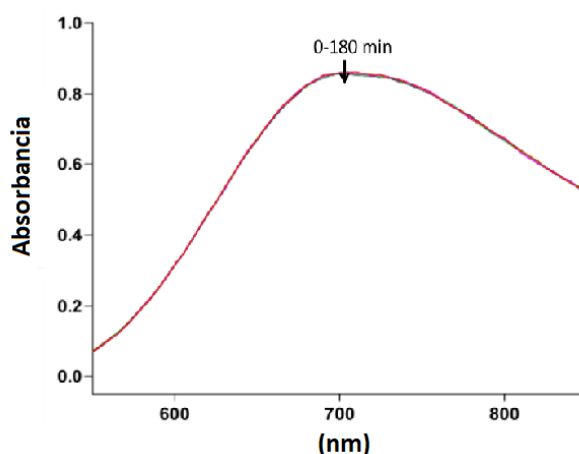
Los estudios de estabilidad del complejo disuelto dan cuenta de que no ocurren cambios apreciables en la posición de bandas d-d muy amplias después de la disolución del complejo 2 en el agua y esto nos permite afirmar que no existen diferencias significativas en el entorno del metal en el estado sólido y en solución. Sin embargo, el complejo 1 puede expandir su esfera de coordinación en caso de disolución, como lo sugiere el cambio observado a la nada de la banda electrónica. Por lo tanto, todas las determinaciones microbiológicas y enzimáticas se llevaron a cabo con el segundo complejo.

Por otra parte, se analizó la variación de los espectros electrónicos con respecto al tiempo con el fin de determinar la estabilidad del complejo 2 durante la preparación de las soluciones para mediciones enzimáticas y antimicrobianas. Debido a la baja solubilidad en

agua de este complejo (a las concentraciones ensayadas en los métodos de dilución y difusión en agar), se empleó como disolvente una mezcla de agua/DMSO 1:1. Se realizaron determinaciones de estabilidad por espectrofotometría por 180 minutos para cubrir el tiempo de manipulación del sólido disuelto en la mezcla durante la reacción de FAL o antes de ser adicionado al Agar Mueller Hinton (MHA) fundido y luego plaqueado. También se determinó la estabilidad del complejo 2 disuelto en agua a bajas concentraciones y estas determinaciones fueron seguidas por espectrofotometría durante 180 minutos para cubrir el tiempo de manipulación del sólido disuelto en agua antes y durante la exposición del complejo al microorganismo durante el análisis de PAE y PAFE.



**Figura 9.** Variación del espectro electrónico del complejo (2) en agua (15 mmol.L<sup>-1</sup>).



**Figura 10.** Variación del espectro electrónico del complejo (2) en agua/DMSO (20 mmol.L<sup>-1</sup>).

## 5- Ensayos Biológicos

### 5.1. Ensayo de actividad antimicrobiana de los complejos

El perfil antimicrobiano del metal ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), los ligandos (cnge y o-fen) y el complejo 2 contra bacterias y hongos fue determinado por dos métodos microbiológicos diferentes: método de difusión en agar y de microdilución en agar. Además, el PAE y PAFE fueron determinados por un método espectrofotométrico [32].

Se emplearon cuatro cepas bacterianas derivadas de la *American Type Culture Collections* (*E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212) y tres cepas de hongos (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* y *C. albicans* de aislamiento clínico).

Los medios de cultivo para todas las cepas fueron caldo Mueller Hinton y agar Mueller Hinton (MHB, MHA) [70, 71]. Los inóculos de las cepas bacterianas y fúngicas se prepararon a partir cultivos en caldo de 18 hs. Para cada aislamiento se preparó una suspensión microbiana de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (equivalente al estándar 0,5 de McFarland), excepto para el ensayo de dilución en agar con bacterias, en el que el inóculo se diluyó a  $10^7$  UFC/mL, una dilución 1:10 de la anterior [30, 72-74]. Tanto el metal como los ligandos cnge y o-fen fueron disueltos en agua. A partir de estas soluciones madre de los respectivos agentes antimicrobianos se prepararon diluciones dobles seriadas acuosas para dar concentraciones que van desde 14,65 a 15.000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Para el análisis de PAE y PAFE, el metal, el ligando o-fen y el complejo 2 fueron disueltos en agua. Todas las soluciones se esterilizaron por filtración antes de su uso.

Para el complejo 2 y los ligandos cnge y o-fen se empleó el método de difusión en agar como selección preliminar de los agentes con posible actividad antibacteriana frente a bacterias y hongos. Una suspensión microbiana de turbidez igual al estándar 0.5 de McFarland se extendió uniformemente sobre placas de Petri que contienen MHA usando hisopos de algodón esterilizados. Los discos de papel estéril de 6 mm de diámetro fueron impregnados asépticamente con 60  $\mu\text{L}$  de las soluciones estériles de cada compuesto (metal, ligando, complejo) y se los mantuvo asépticamente en Cabina de Seguridad Biológica (CSB) hasta la evaporación completa del disolvente. Luego se aplicaron sobre la superficie de agar sólido previamente inoculado. Las placas fueron incubadas aeróbicamente a 37 °C durante 18 y 48 horas para bacterias y hongos, respectivamente. Se registraron las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros. Los valores reportados son un promedio de al menos tres ensayos experimentales distintos [30, 75-77].

La gentamicina y ampicilina fueron los antimicrobianos que se utilizaron como estándares de referencia positivos para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y *E. faecalis*,



respectivamente. Para todas las cepas de *Candida*, se utilizó fluconazol como estándar de referencia positivo. Los resultados de este barrido preliminar (Tabla 6) sugieren actividad antimicrobiana del cobre y del ligando libre o-fen contra todas las cepas bacterianas y fúngicas mientras que el complejo exhibe actividad contra todas las cepas ensayadas, excepto frente a *P. aeruginosa*. Nuestros datos indican que el ligando libre o-fen podría ejercer una mayor actividad antimicrobiana que el cobre. Tomando en cuenta las diferentes zonas de inhibición medidas, este ligando puede tener bajos valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) contra las cepas de *Candida*, *S. aureus* y *E. coli*. El ligando cnge no generó halos de inhibición lo que indica ausencia de actividad antimicrobiana. El orden observado de la zona de inhibición fue *C. albicans* > *C. tropicalis* > *E. faecalis* > *E. coli*, *S. aureus* > *C. parapsilosis*.

**Tabla 6.** Barrido preliminar del perfil antimicrobiano de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , o-fen y el complejo (2) en cepas bacterianas y hongos. Los diámetros de la zona de inhibición se expresan en mm.

	Cepas bacterianas				Cepas fúngicas		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b><math>\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></b>	10,3 ± 0,6	11,3 ± 0,6	15,6 ± 0,6	9 ± 1,0	9 ± 1,0	12,3 ± 0,6	15 ± 1,0
<b>o-fen</b>	36 ± 1,0	40 ± 1,0	28,3 ± 0,6	19,6 ± 0,6	59,3 ± 1,1	43,3 ± 1,1	58,3 ± 1,5
<b>complejo 2</b>	23 ± 1,0	23,6 ± 0,6	29 ± 1,0	0	43,3 ± 0,6	41 ± 1,0	14,3 ± 1,1
<b>Gentamicina</b>	23 ± 1,0	24,6 ± 0,6		24,6 ± 0,6			
<b>Ampicilina</b>			21 ± 1,0				
<b>Fluconazol</b>					43,6 ± 1,5	49 ± 1,0	39,6 ± 2,0

Se determinaron además los valores de CIM de gentamicina y ampicilina (estándar de referencia positiva) frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, respectivamente. Se determinaron los valores de CIM de fluconazol (como estándar de referencia positiva) contra todas las cepas de *Candida*. Para todos los casos valores de CIM mayor que  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en mediciones *in vitro* se consideran sin importancia clínica [78, 79]. En este contexto, la actividad antimicrobiana de cnge contra todas las cepas ensayadas (CIM > 1.500) y la del complejo ternario contra *P. aeruginosa* (MIC > 1500) se consideran no significativas clínicamente (Tabla 7). Estos resultados están en concordancia con la proyección preliminar.

**Tabla 7.** Valores de CIM ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , o-fen y el complejo (2) en cepas bacterianas y fúngicas.

	Cepas bacterianas				Cepas fúngicas		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<b><math>\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></b>	75	375	375	375	>1500	>1500	>1500
<b>o-fen</b>	2	24	74	375	3	12	12
<b>complejo 2</b>	4	24	24	>1500	12	47	47
<b>Gentamicina</b>	0,8	0,2		1,5			
<b>Ampicilina</b>			0,4				
<b>Fluconazol</b>					>375	1,5	6

Los ensayos antimicrobianos no se realizaron sobre el complejo 1 debido a que éste no era estable en solución acuosa. Esto se había determinado con anterioridad tras el análisis de las determinaciones potenciométricas [23]. Por esta razón, solamente se usó el segundo complejo.

La actividad antimicrobiana se considera significativa cuando los valores de CIM son menores de 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Cuando los valores de CIM están entre 100 y 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , el potencial antibacteriano se considera moderado mientras que cuando estos valores se encuentran entre 500 y 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , la actividad antibacteriana fue considerada débil. Los valores de CIM de 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  o más se consideraron sin actividad antibacteriana [78].

El cobre es un elemento esencial que funciona como un cofactor durante el metabolismo aeróbico; sin embargo, en cantidades bajas o excesivas, puede tener efectos deletéreos [20]. Como era de esperar [80], nuestros datos indican que el cobre ejerce efectos antibacterianos moderados frente a las cepas probadas. Sin embargo, la actividad antifúngica de este metal es clínicamente irrelevante (CIM > 1500), en contraposición con los resultados esperados según el screening preliminar. *C. albicans* y *C. tropicalis* se han descrito previamente como hongos superiores resistentes a concentraciones elevadas de cobre [81-83]. Weissman et al. reportaron el aislamiento de dos genes presentes en *C. albicans* implicados en la desintoxicación (detoxificación) de cobre (una ATPasa tipo P transportadora de cobre, un CaCrp1 y una metalotioneína, CaCup1)[82]. Ambos genes son inducidos por el cobre extracelular, pero CaCrp1 es más eficaz que CaCup1, debido a que catalíticamente funciona como una bomba de extrusión, mientras que un agente quelante (metalotioneína) funciona estequiométricamente [83]. Nuestros datos también indican que se mejoró la actividad antimicrobiana de este metal por complejación. Algunos valores de CIM de sales de cobre(II) contra diferentes cepas de bacterias y hongos se han publicado anteriormente en la literatura incluyendo nuestro informe anterior [81, 82]. Varios autores reportan valores de CIM que están en concordancia con nuestros resultados: Patel et al. reportan valores de CIM de 460  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 410  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  y 580  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente [58-60], Recio Despaigne et al. Informan valores de CIM de 112  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 214  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  y 285  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, respectivamente [25]. Chen et al. informan CIM de 256  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente a *S. aureus* [84]. Suksrichavalit et al. informan que 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  no muestra actividad frente a *C. albicans* [71]. Sin embargo,

previamente se habían determinado una MIC > 396  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *E. faecalis* ATCC19433 [12] y 64  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *C. albicans* ATCC 18804 [27] mediante la prueba de macrodilución.

Por otro lado, o-fen y sus derivados (incluyendo complejos metálicos) son de interés debido a su potencial actividad anticancerígena y contra infecciones causadas por virus, bacterias, hongos [85]. El ligando libre o-fen muestra los valores de CIM más bajos contra *E. coli* y *S. aureus* [80, 86], y contra todas las cepas de *Candida*, como se esperaba por resultados obtenidos en el examen preliminar. Algunos valores de CIM de o-fen contra diferentes cepas bacterianas y fúngicas fueron previamente reportados (MIC = 3,31  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *C. albicans* [87], CIM = 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  frente a *S. aureus* [88], MIC = 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 256  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, respectivamente [28]. Nuestros datos están de acuerdo con estos informes. Sin embargo, Creaven et al. reportan valores de CIM de 51,34  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 99,11  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  frente a *S. aureus* y *E. coli* de aislados clínicos, respectivamente [87]. Efthimiadou et al. dieron a conocer valores de CIM de 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *E. coli* y *P. aeruginosa* usando el método de diluciones en caldo [88]. Roy et al. informan una CIM de 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *E. coli* JM109 [85]. Kalia et al. reportan valores de CIM de 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *E. coli* NCTC 10418 (National Collection of Type Cultures) y *C. albicans* de aislados clínicos [28]. Las diferencias entre los valores de CIM reportados y nuestros datos podrían atribuirse a la utilización de diferentes cepas microbianas y diferentes métodos microbiológicos.

Actualmente, se están probando las propiedades antimicrobianas de diferentes complejos de cobre contra numerosos agentes patógenos [24-27]. Nuestros resultados indican que la actividad antibacteriana luego de la complejación es inferior a la del metal Cu(II) y el ligando o-fen libres contra *P. aeruginosa*. Por otra parte, la actividad inhibidora del complejo 2 contra todas las cepas de *Candida* se produce a concentraciones más altas que o-fen. Curiosamente, la actividad inhibidora del complejo contra *E. faecalis* se produce a concentraciones más bajas que la de la sal de cobre(II) y o-fen.

Es un hecho bien conocido que la complejación aumenta la liposolubilidad de iones metálicos [24, 83]. Se ha demostrado por el método AIM (Átoms in Molecules) que la densidad electrónica de o-fen disminuye debido a un proceso de transferencia de carga del ligando al metal mostrando el complejo mayor liposolubilidad y mayor permeabilidad celular (concepto Overtone's) [89] que el metal. También se pudo confirmar por fluorescencia espectroscópica que la coordinación de o-fen a Cd ( $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cng})\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) aumenta la rigidez conformacional de o-fen y que la deslocalización del ligando puede ser mayor que en el complejo quelato [65]. O-fen es un ligando que produce un efecto sinérgico en el complejo

ternario mediante la redistribución de carga mejorando la actividad del metal y cngé en el complejo ternario (en la mayoría de las cepas analizadas). Para *E. faecalis*, el paso de materiales liposolubles a través de la membrana plasmática celular sería mayor, por eso la actividad antibacteriana del complejo resulta más potente frente a esta cepa. Se intuye que las otras cepas bacterianas y fúngicas se registrarán por otros mecanismos debido a un comportamiento diferente frente a los compuestos ensayados.

## 5.2. Efectos post-antibacteriano y post-antifúngico (PAE y PAFE)

El período de la inhibición de crecimiento bacteriano o fúngico después de que el antibiótico ha sido completamente eliminado se denomina efecto post-antibacteriano y post-antifúngico (PAE y PAFE). Este período también puede ser una medida de la retardada rebrote de bacterias / hongos después de un corto período de antibiótico / antimicótico la exposición [35, 90]. Para la determinación de PAE y PAFE mediante espectrofotometría, se emplearon tubos de centrífuga (Eppendorfs) conteniendo 900  $\mu$ l de caldo con el compuesto antimicrobiano al doble de la MIC y fueron inoculados con 100  $\mu$ L de una suspensión microbiana ajustada al 0,5 del estándar de McFarland [91]. Se incluyeron controles de crecimiento con el inóculo microbiano pero sin el agente antimicrobiano en cada experimento. Los tubos inoculados se colocaron en un baño de agua termostatzado a 37 °C durante 1 hora [33, 35]. Al final del período de exposición el agente antimicrobiano se eliminó por dilución [90, 92] 1: 1000 considerando que de esta manera la droga fue inactivada. La dilución de los cultivos en un medio de cultivo termostatzado y libre de antimicrobiano se vuelve a incubar a 37 °C [31, 33]. Desde luego que los cultivos de control no fueron sometidos a este proceso de "eliminación de drogas" [90]. Una disminución del 5% en la transmitancia medida se utilizó para definir el punto en el que se detectó incremento del número de microorganismo o crecimiento. La duración de PAE o PAFE, según corresponda, se calcula utilizando la fórmula  $PAE/PAFE = T-C$  donde T es el tiempo que se requiere para una disminución del 5% en la transmitancia de los cultivos de microorganismos expuestos al antimicrobiano y C es el tiempo requerido por el mismo inóculo para disminuir 5% en la transmitancia del control sin exposición al agente [32, 33, 35]. Las lecturas de transmitancia a una longitud de onda de 670 nm se registraron a intervalos de 5 minutos [93]. Cada medición PAE o PAFE se llevó a cabo por duplicado [32, 93].

En el análisis las medidas de PAE o PAFE de 20 minutos o menos fueron consideradas insignificantes debido a las limitaciones del ensayo y se les asignó un valor de cero [32]. En

este estudio *in vitro*, utilizando un método espectrofotométrico se analizaron las PAEs y PAFES del metal, del ligando y del complejo 2 en cepas de bacterias y fúngicas. Los PAEs del metal y del ligando o-fen en *P. aeruginosa* no fueron determinados debido a que el complejo no ejerce inhibición contra esta cepa bacteriana (MIC > 1500). El ligando cngc no muestra actividad antibacteriana frente a ninguna de las cepas ensayadas y el metal (sal cúprica de metal) no actúa sobre cepas de *Candida* (MIC > 1.500). PAE o PAFE, según corresponda, no pueden determinarse sin valores de CIM. Se dan los valores de la PAE y PAFES en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Efecto Post-antibiótico (PAE) y efecto post-antimicótico (PAFE) de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , o-fen y complejo 2 a 2xMIC para las cepas bacterianas y fúngicas. Los valores de PAE y PAFE en horas (h)

		$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	o-fen	complejo (2)
<b>Cepas bacterianas</b>	<i>E. coli</i>	2,54 ± 0,04	0,54 ± 0,04	3,87 ± 0,04
	<i>S. aureus</i>	3,04 ± 0,21	0	3,04 ± 0,29
	<i>E. faecalis</i>	1,87 ± 0,04	1,58 ± 0,17	1,04 ± 0,12
<b>Cepas fúngicas</b>	<i>C. albicans</i>	-	0	0,79 ± 0,04
	<i>C. tropicalis</i>	-	0	0,54 ± 0,04
	<i>C. parapsilosis</i>	-	0	5,46 ± 0,29

Estas medidas muestran que 2xCIM de cobre permiten obtener PAEs medible en las cepas bacterianas estudiadas. El metal exhibió un PAE más largo que el ligando o-fen en todos los casos. El orden observado de PAE de sal cloruro de cobre(II) fue *S. aureus* > *E. coli* > *E. faecalis*.

Otros datos previamente reportados [94] dan cuenta de la capacidad del silicato de cobre para causar efecto post antibiótico contra *S. aureus* (ATCC 29213, al doble de la CIM) de 2,1 h y concuerdan con nuestros resultados.

El ligando o-fen exhibió un buen PAE sobre *E. faecalis*. Para el complejo 2, el orden observado de PAEs y PAFES fue *E. coli* > *S. aureus* > *E. faecalis* y *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *C. tropicalis*. Frente a *S. aureus*, la complejación no modifica los tiempos de PAE. Frente a *E. coli*, el complejo 2 exhibió un PAE más largo que el cobre y la o-fen sin complejar, o sea que la complejación aumenta el PAE del complejo (2) contra *E. coli*, pero lo disminuye contra *E. faecalis*. La PAE mejorada del complejo 2 comparado con el metal y o-fen, sobre *E. coli* se puede explicar en las bases de la teoría de la quelación de Tweedy. Ésta postula que la quelación reduce la polaridad del átomo metálico central debido a que comparte parcialmente su carga positiva con el ligando. Además, aumenta la deslocalización de electrones  $\pi$  ( $\pi$ ) sobre todo el anillo quelato y realza la lipofilicidad de los complejos [24, 83]. Este aumento de lipofilicidad del complejo podría ser la respuesta a los mayores PAEs observados en bacterias

Gram-negativas (*E. coli*) debido a que el complejo podría permanecer más tiempo en el lipopolisacárido y otros componentes lipídicos de la pared celular, siendo por lo tanto más difícil de eliminarse por dilución.

Para las tres cepas fúngicas, el complejo exhibió PAEs más largos que o-fen. Los valores elevados de PAE en *E. coli* y de PAFE en todas las cepas de hongos frente a los complejos son relevantes desde una perspectiva clínica ya que podrían ser considerados en el diseño de dosificación de antibióticos. Una prolongada PAE permitiría la extensión de los intervalos de dosificación de antibióticos o antifúngicos más allá del tiempo que las concentraciones de otros agentes caen por debajo de la CIM [32]. Los PAEs y PAFEs del complejo 2 fueron comparados con los PAEs y PAFEs reportados en la literatura para agentes antibióticos o antimicóticos (determinados en condiciones experimentales similares contra cepas similares de bacterias y de hongos). El PAE del complejo 2 en *E. coli* es más largo que el PAE inducido por ampicilina [32, 92], ciprofloxacina [32, 95, 96], tobramicina [32, 97], gentamicina [92, 95], garenoxacina [33], enrofloxacina y tetraciclinas [92], cloranfenicol y rifampicina [96]. El PAE del mismo complejo sobre *S. aureus* es más largo que el PAE inducido por gentamicina y ciprofloxacina [95], garenoxacina [33], tobramicina [97], ampicilina y enrofloxacina [45] y es más corto que el PAE inducido por gentamicina (en contraposición con Domínguez et al. [95]) y tetraciclina [92], daptomicina, vancomicina y nafcilina (contra cepas de *S. aureus* meticilino susceptible y meticilino resistente excepto SARM-1) [98].

El PAE del complejo 2 sobre *E. faecalis* es similar al inducido por Garenoxacina [33] y penicilina G en 12xMIC contra la cepa mutantes 4 [99]. Este PAE es más corto que el PAE inducido por gentamicina en el doble de la MIC contra todas las cepas [99] y la penicilina G [98, 99], daptomicina y vancomicina [98]. El PAFE del mismo complejo sobre *C. albicans* es similar a la anfotericina B (1xMIC) [100]. Este PAFE es más largo que el de la 5-fluorocitosina (1xMIC) [100], el ketoconazol [100, 101] y el fluconazol [100-102] y es más corto que el PAFE inducido por la anfotericina B [100-102] y la 5-fluorocitosina [100, 101] a valores más altos que el doble de la MIC, MK-0991 y LY303366 [102], y nistatina [101, 103]. El PAFE del complejo 2 frente a *C. tropicalis* es más corto que el PAFE inducido por Nistatina (1xMIC) [103]. El PAFE de este complejo sobre *C. parapsilosis* es más corto que el PAFE inducido por anidulafungina, caspofungina y micafungina [104], y nistatina [103].

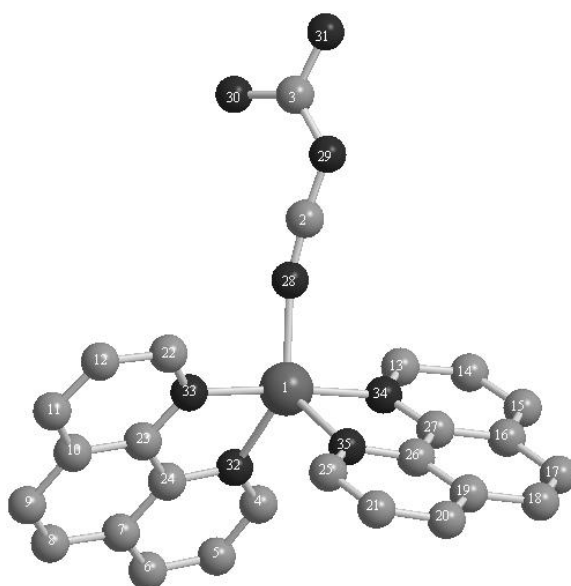
## 6. Metodología computacional

Los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 03 [105]. Las estructuras moleculares de los ligandos y de los complejos metálicos fueron completamente optimizadas en varios niveles. Las geometrías de partida se construyeron a partir de los datos cristalográficos y se realizaron optimizaciones a nivel HF/3-21G\*. Posteriormente se incluyó el efecto de correlación de electrones usando el funcional (B3LYP) [106] y empleando 6-31G (d, p) y 6-31 + G (d, p) como conjunto base. Para la comparación de las estructuras se calcularon los RMSD (root mean square deviation) que constituye una medida natural para cuantificar la similitud de dos estructuras [107]. Por ello, con el objeto de poner a prueba la capacidad de los cálculos mecano-cuánticos química para reproducir la estructura experimental de los complejos metálicos, se calcularon las desviaciones (RMSD) entre las coordenadas del complejo optimizado y los parámetros experimentales. Para ello se hizo uso del paquete Qmol [108].

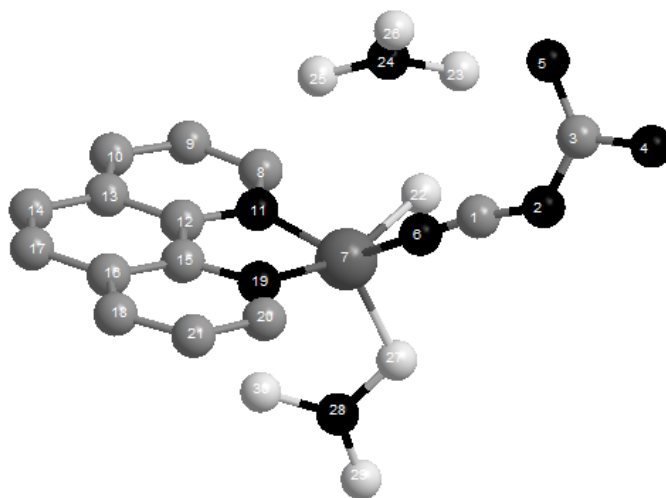
El análisis topológico de la densidad electrónica derivado de la teoría AIM [109] se realizó utilizando el paquete PROAIM [110] y los resultados se evaluaron en términos de la densidad electrónica ( $\rho_b$ ), el Laplaciano de la densidad electrónica ( $\nabla^2\rho_b$ ), la elipticidad del enlace ( $\varepsilon$ ) y la densidad de energía electrónica local del sistema ( $E_b$ ) evaluados en los puntos críticos de enlace (PCE).

### 6.1. Cálculos DFT

Las geometrías de los complejos fueron optimizadas sin restricciones. En las Figuras 11 y 12 se muestran las estructuras optimizadas de los complejos (1) y (2) respectivamente, junto con el esquema de numeración adoptado.



**Figura 11.** Estructura optimizada del complejo  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1). Los átomos de hidrógeno se han omitido para dar mayor claridad a la figura. Las esferas negras representan átomos de nitrógeno y las grises átomos de carbono y el átomo 1 es Cu.



**Figura 12.** Estructura optimizada del complejo  $[\text{Cu}(\text{o-fen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$  (2). Los átomos de hidrógeno se han omitido para dar mayor claridad a la figura. Las esferas negras representan átomos de nitrógeno y las grises átomos de carbono, las blancas, átomos de oxígeno y el átomo 7 es Cu.

Los parámetros geométricos más relevantes de las estructuras optimizadas de los complejos (1) y (2) se presentan en las Tablas 9 y 10, respectivamente.

**Tabla 9.** Longitudes de enlace (Å) y ángulos de enlace ( $^\circ$ ) más relevantes en la estructura calculada para el complejo (1). Los valores experimentales [6] se indican con fines comparativos.

Longitud de enlace <sup>a</sup>	Calc. <sup>b</sup>	Exptl.	Ángulo de enlace <sup>a</sup>	Calc. <sup>b</sup>	Exptl.
Cu1N28	2,0235	2,0045	N28Cu1N32	135,194	122,206
N28C2	1,1775	1,1465	N28Cu1N33	93,299	95,889
Cu1N34	2,0265	2,0015	N28Cu1N34	91,811	90,408
N34C13	1,3335	1,3215	N28Cu1N35	117,662	121,227
C13C14	1,4055	1,3985	N32Cu1N33	80,461	80,806
C25N35	1,3305	1,3265	N32Cu1N34	96,170	96,031
N35C26	1,3605	1,3525	N32Cu1N35	107,144	116,490
C26C27	1,4385	1,4265	N33Cu1N34	174,874	173,699
C26C19	1,4165	1,4015	N33Cu1N35	97,349	95,843
C27C16	1,4175	1,4075	N34Cu1N35	79,885	80,635
C27N34	1,3615	1,3505	C14C13N34	122,250	122,207
Cu1N35	2,1835	2,095	C12C22N33	122,097	122,007
Cu1N33	2,0265	1,9845	C7C24N32	123,026	122,979
Cu1N32	2,131	2,115	C23C24N32	117,282	117,236
C4N32	1,3315	1,3295	C21C25N35	122,839	121,717
N32C24	1,3615	1,3605	Cu1N28C2	167,366	154,004
C23N33	1,3605	1,3605	Cu1N32C4	130,791	131,911

<sup>a</sup> Para la denominación de los átomos ver Figura 11.



<sup>b</sup> Cálculos a nivel B3LYP/6-31+g(d,p)

Las geometrías de los complejos, optimizadas a nivel B3LYP/6-31+g(d,p), convergen a estructuras que están en buen acuerdo con las correspondientes estructuras experimentales, lo que implica la adecuación del método teórico empleado para las optimizaciones de geometría de este tipo de sistemas. Las longitudes de enlace Cu-N en el ligando cnge son similares a las encontradas en las estructuras de rayos X y correlacionan bien con los desplazamientos observados en las bandas de estiramiento en los espectros experimentales de infrarrojo de ambos complejos [23]. Si bien de manera general se observa que los datos experimentales están bien reproducidos por los cálculos, existen algunas diferencias entre los valores de los ángulos de enlace calculados y los correspondientes valores experimentales. Cabe señalar que la geometría de la estructura en el estado sólido presenta interacciones intra- e intermoleculares, tales como enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, que no siempre están presentes en las moléculas aisladas que se consideran en los cálculos teóricos.

**Tabla 10.** Longitudes de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) más relevantes en la estructura calculada para el complejo (2). Los valores experimentales [23] se indican con fines comparativos.

Longitud de enlace <sup>a</sup>	Calc. <sup>b</sup>	Exptl.	Ángulo de enlace <sup>a</sup>	Calc. <sup>b</sup>	Exptl.
C1-N2	1,289	1,292	N2C1N6	172,704	173,961
C1-N6	1,177	1,151	N2C3N4	114,796	123,357
N2-C3	1,335	1,345	C1N6Cu7	163,925	177,668
C3-N4	1,360	1,326	N6Cu7N11	140,800	93,045
C3-N5	1,336	1,317	N6Cu7N19	88,899	171,477
N6-Cu7	1,950	1,945	N6Cu7O34	87,741	92,409
Cu7-N11	1,944	1,990	N6Cu7O41	101,702	95,2
Cu7-N19	1,939	2,002	N11Cu7N19	83,787	82,584
Cu7-O34	1,971	1,966	N11Cu7O34	85,612	174,360
Cu7-O41	1,969	2,570	N11Cu7O41	116,683	87
C8-N11	1,337	1,324	N19Cu7O34	158,742	91,82
N11-C12	1,355	1,362	N19Cu7O41	112,573	77,3
C15-N19	1,359	1,357	O34Cu7O41	88,656	91,1
N19-C20	1,338	1,325	Cu7N11C8	129,050	130,139
O41-N42	1,389	1,251	Cu7N11C12	112,355	111,921
N42-O43	1,267	1,241	C8N11C12	118,544	117,928
O35-N38	1,350	1,251	Cu7N19C15	112,318	112,259
N38-O39	1,282	1,237	Cu7N19C20	129,040	129,403
N38-O40	1,314	1,241	Cu7O41N42	111,983	112,3

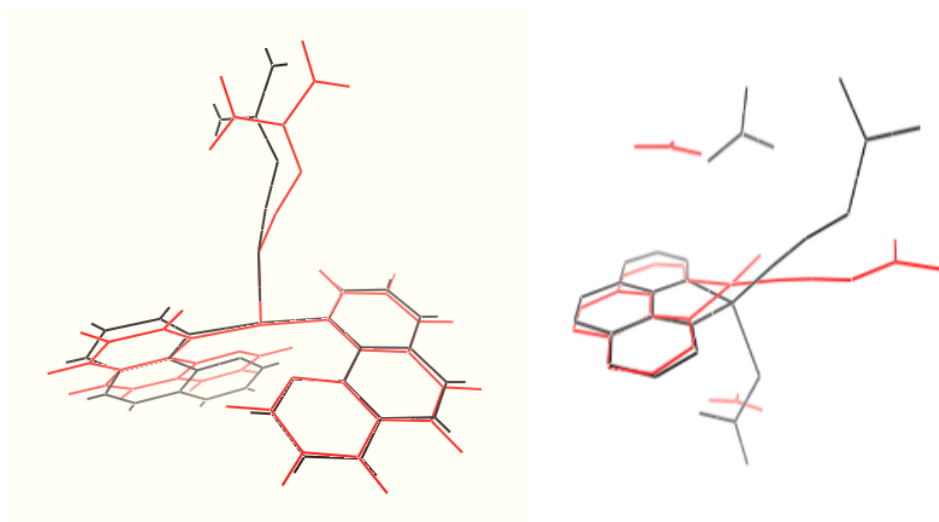
<sup>a</sup> Para la denominación de los átomos ver Figura 12.

<sup>b</sup> Cálculos a nivel B3LYP/6-31+g(d,p)

La estrecha relación entre las estructuras calculadas y las cristalográficas se ilustra mejor con los valores de RMSD (0,106 Å y 0,234 Å para los complejos 1 y 2 respectivamente)

obtenidos cuando los átomos de la esfera de coordinación del cobre se superponen en dichas estructuras (Figura 13). El mayor error de RMSD del complejo 2 se atribuye a un mayor efecto de las interacciones existentes en el estado sólido, descritas anteriormente.

Con el objeto de obtener mayor conocimiento acerca de la naturaleza de los enlaces metal-ligando se realizó un análisis topológico, cuyos resultados muestran en las Tablas 11 y 12 para los complejos (1) y complejo (2), respectivamente. También se reporta el análisis topológico de enlaces seleccionados en los ligandos aislados con un propósito comparativo.



**Figura 13.** Superposición de las estructuras calculadas (gris) y en estado sólido (rojo) de los complejos 1 (izquierda) y 2 (derecha).

**Tabla 11.** Propiedades topológicas de enlaces seleccionados del complejo 1:  
[Cu(o-fen)<sub>2</sub>(cnge)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>a,b</sup>

Enlace	$\rho_b$	$\nabla^2\rho_b$	$\varepsilon$	$E_b$
Cu1 – N28	0,0793	0,2753	0,02854	0,0688
Cu1 – N32	0,0687	0,2066	0,0355	0,0517
Cu1 – N33	0,0853	0,2629	0,0466	0,0658
Cu1 – N34	0,0855	0,2615	0,0663	0,0653
Cu1 – N35	0,0616	0,1936	0,0433	0,0484
C23 – N33	0,3252 [0,3366]	-0,9496 [-1,1164]	0,1144 [0,1009]	-0,2373 [-0,2791]
C23 – C24	0,2986 [0,2857]	-0,8083 [-0,7462]	0,1767 [0,1614]	-0,2020 [-0,1866]
N33 - C22 38	0,3397 [0,3529]	-0,8072 [-0,9936]	0,1129 [0,1289]	-0,2018 [-0,2482]
C10 – C23	0,3048 [0,2993]	-0,8191 [-0,7841]	0,1792 [0,1764]	-0,2048 [-0,1961]
C2 – N28	0,4466 [0,4531]	-0,1681 [0,0226]	0,0146 [0,0174]	-0,0420 [0,0056]
C2 - N29	0,3699 [0,3470]	-1,2101 [-1,1947]	0,0593 [0,0446]	-0,3025 [-0,2987]
C3 - N29	0,3488 [0,3673]	-1,2471 [-1,321]	0,1575[0,2290]	-0,3117 [-0,3303]

<sup>a</sup> Todos los valores están en unidades atómicas (u.a.)

<sup>b</sup> Los valores entre corchetes corresponden a los valores de los enlaces en los ligandos aislados.

Los enlaces más importantes para analizar mediante la teoría AIM son los enlaces entre el metal y los ligandos, centrando el análisis en los valores de  $\rho_b$  y de  $\nabla^2\rho_b$  y comparándolos con los valores de referencia [47] que ayudan a su caracterización. Todos los puntos críticos de los enlaces Cu-N en ambos complejos muestran una menor concentración de carga electrónica con valores de  $\rho_b$  que van desde 0,0936 a 0,1026 u.a. y valores positivos de  $\nabla^2\rho_b$  (0,3482 u. a. y 0,3756 u.a., respectivamente). Los valores de densidad de energía,  $E_b$ , en dichos BCP son positivos en todos los casos indicando interacciones de capa cerrada. Características similares muestran los enlaces Cu-O (con la molécula de agua) y Cu-O (con el ion nitrato).

**Tabla 12.** Propiedades topológicas de enlaces seleccionados del complejo 2:  $[\text{Cu}(\text{o-fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]^{a,b}$

Enlace	$\rho_b$	$\nabla^2\rho_b$	$\epsilon$	$E_b$
Cu7 -N6	0,0936	0,3482	0,0423	0,0870
Cu7 -O(water)	0,0828	0,3611	0,1054	0,0903
Cu7 -O (nitrate)	0,0880	0,3818	0,0421	0,0954
Cu7 -N11	0,1025	0,3661	0,0292	0,0915
Cu7 -N19	0,1026	0,3756	0,0153	0,0939
C15 -N19	0,3288 [0,3366]	-1,0000 [-1,1164]	0,1035 [0,1009]	-0,2500 [-0,2791]
C12 - C15	0,3087 [0,2857]	-0,8686 [-0,7462]	0,1666 [0,1614]	-0,2171 [-0,1866]
N19 - C20	0,3382 [0,3529]	-0,8779 [-0,9936]	0,1133 [0,1289]	-0,2195 [-0,2482]
C12 - C13	0,3109 [0,2993]	-0,8517 [-0,7841]	0,1804 [0,1764]	-0,2129 [-0,1961]
C1 - N6	0,4462 [0,4531]	-0,1587 [0,0226]	0,0188 [0,0174]	-0,0397 [0,0056]
C1 - N2	0,3674 [0,3470]	-1,1508 [-1,1947]	0,0504 [0,0446]	-0,2877 [-0,2987]
C3 - N2	0,3463 [0,3673]	-1,2249 [-1,3211]	0,1614 [0,2290]	-0,3062 [-0,3303]

<sup>a</sup> Todos los valores están en unidades atómicas (u.a.)

<sup>b</sup> Los valores entre corchetes corresponden a los valores de los enlaces en los ligandos aislados.

Las propiedades topológicas en los puntos críticos de los enlaces Cu-N están en buen acuerdo con los correspondientes valores reportados para enlaces Cu (II) -N en complejos de cobre (II) con ligandos donores [ $\rho_b=0,08-0,10$  u.a.,  $\nabla^2\rho_b=0,31-0,43$  u.a.,  $\epsilon=0,06$ ] [48].

Los enlaces C-C y C-N presentan las características de las interacciones covalentes, es decir, valores relativamente grandes de  $\rho_b$  y valores negativos para  $\nabla^2\rho_b$ . Las elipticidades de los enlaces que forman los anillos de la fenantrolina tienen valores relativamente grandes (por ejemplo, 0,1666 en el enlace C12-C15), revelando el carácter parcial de doble enlace debido a que la carga electrónica está deslocalizada sobre la superficie del anillo. Estos valores son comparables con enlaces similares encontrados en otras moléculas [49-51]. Los valores de  $E_b$  son negativos, como se espera para enlaces covalentes. Las propiedades topológicas calculadas en los BCP de los enlaces C-C y C-N BCP muestran muy pocos cambios con respecto a los valores respectivos en las moléculas de los ligandos aislados.

Dado que el complejo 1 resultó ser inestable en agua y que el equilibrio está desplazado hacia el complejo 2, como lo sugiere el desplazamiento de la banda electrónica [23], podemos proponer que la causa de la inestabilidad de este ligando en solución acuosa puede atribuirse a la mayor longitud del enlace Cu1-N32 (o-fen) que se observa tanto en la estructura calculada en el complejo 1 como en la correspondiente estructura experimental. Por otra parte, el enlace Cu-N (cnge) en el complejo 2 es ligeramente más fuerte que el mismo enlace en el complejo 1, de acuerdo con los valores obtenidos de  $\rho_b$  y de  $\nabla^2\rho_b$  (Tablas 10 y 11) en los PCE. Asimismo, el enlace Cu-N (fen) en el complejo 1 presenta menor valor de densidad de carga electrónica, lo que sugiere que estos enlaces son más fuertes en el segundo complejo. Según esta tendencia, es posible afirmar que el carácter iónico del enlace Cu-N en el complejo 1 es ligeramente más fuerte que en el complejo 2. Esta situación podría explicar la diferente estabilidad de ambos complejos.

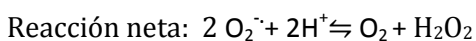
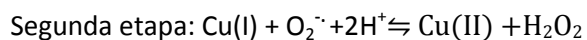
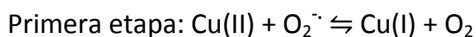
## **7- Actividades enzimáticas**

### **7.1. Ensayos de la capacidad de imitar la enzima superóxidodismutasa (SOD)**

La actividad de superóxido dismutasa se examinó indirectamente usando el ensayo de nitroazul de tetrazolio (NBT). La determinación indirecta de la actividad de SOD y los complejos de cobre se ensayó por su capacidad para inhibir la reducción de NBT por el anión superóxido generado por el sistema xantina/xantina oxidasa, a pH 10,2 (buffer carbonato) [111, 112].

A medida que avanza la reacción, se desarrolla el color de formazán y el cambio de amarillo a azul que se observó, fue asociado con un aumento en el espectro de absorción a 560 nm. El sistema de reacción contenía diferentes concentraciones del SOD nativa de eritrocitos bovinos o el complejo de cobre. La reacción se inició por el sistema xantina/xantina oxidasa en una concentración necesaria para producir el cambio de absorbancia entre 0,2 y 0,4. Se añadió solución acuosa de cloruro de cobre(II) 0,2 mM, con el fin de detener la reducción de NBT. El ion cobre(II) es capaz de interactuar con el superóxido y producir la dismutación del anión. Se incluyó además, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 mM, debido a la formación de un quelato de cobre (CuEDTA) que no tiene actividad SOD. Cada experimento se realizó por triplicado y por lo menos se realizaron tres experimentos independientes en cada caso. Se utilizaron todos los reactivos (Sigma) tal como fueron adquiridos. La cantidad de complejo (o SOD) que da una inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ) se obtuvo representando gráficamente el porcentaje de inhibición frente al log de la concentración de la solución probada.

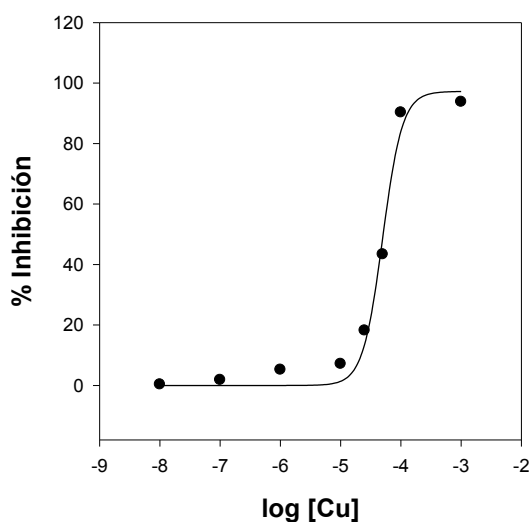
El papel beneficioso del cobre en varias enfermedades se ha atribuido a su actividad redox, particularmente como el sitio catalítico de enzimas como la SOD para eliminar el radical anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  pro-inflamatorio altamente reactivo [113, 114]. El ciclo redox  $Cu(II) \rightleftharpoons Cu(I)$  implica la dismutación del radical superóxido por el cobre de la siguiente manera:



El anión superóxido generado en los sistemas biológicos es dañino para los tejidos debido a su capacidad para actuar como una base débil ( $pK_a = 4,8$ ) y por esta razón la enzima SOD actúa al principio evitando los procesos degenerativos produciendo oxígeno y peróxido de hidrógeno. El  $H_2O_2$  es también perjudicial para las células pero el organismo dispone de ciertas enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa que disminuyen los efectos nocivos del  $H_2O_2$  [113, 114].

Las mediciones de las actividades de SOD símil son un buen marcador de las propiedades antioxidantes de los compuestos de cobre. Se ha informado de que la presencia de sitios de coordinación que pertenecen a anillos heteroaromáticos de nitrógeno tales como imidazol, piridina y pirazol son importantes para la alta actividad de la SOD [114].

Por lo tanto, hemos seleccionado el ligando fenantrolina como fuente dadora de átomos de nitrógeno y otro el ligando, cianoguanidina, que también contiene N para generar un sitio activo similar al de cobre(II) en la enzima nativa. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando el sistema de ensayo xantina/xantina oxidasa/NBT. NBT actúa como agente de detección de superóxido a través de su reducción a metilformazan ( $MF^+$ ). En presencia del complejo de cobre el mecanismo de la reducción de NBT a  $MF^+$  comprende varias reacciones. El sistema xantina / xantina oxidasa produce superóxido que reacciona con NBT para producir  $MF^+$ . Al mismo tiempo, el complejo de cobre interactúa con  $O_2^{\cdot-}$  catalizando su dismutación a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno; esta reacción reduce la concentración de superóxido en la solución y, por lo tanto, las velocidades de producción de  $MF^+$  (es decir, disminuyendo la variación de absorbancia). La determinación experimental de la actividad de SOD se realizó a pH 10,2 teniendo en cuenta la presencia de una sola especie en esta región. El complejo 2 produjo una inhibición 50% ( $IC_{50}$ ) de  $40,7 \pm 3,7 \mu M$  (Figura 14). En las actuales condiciones experimentales el valor  $IC_{50}$  de la enzima SOD (de eritrocitos bovinos) fue: 4 nM, similar a los valores reportados previamente [115].



**Figura 14.** Porcentaje de inhibición de la reducción de NBT en función del logaritmo de [Cu] para el complejo (2),  $[\text{Cu}(\text{o-phen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Si los compuestos tienen un valor  $\text{IC}_{50}$  por debajo de  $20 \mu\text{M}$  muestran actividad de tipo SOD pero en concentraciones más altas no son activos. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  experimentales obtenidos para el complejo 2 que se forma en solución se encuentran en el límite inferior de los compuestos activos [116] (a veces llamado el comportamiento moderado hacia la dismutación del superóxido).

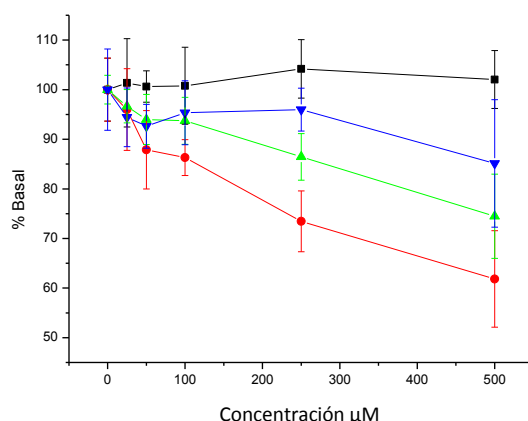
## 7.2. Ensayos de inhibición de la actividad fosfatasa alcalina (FAL)

Los microorganismos no sintetizan fosfato inorgánico sino que deben obtenerlo a partir de ácidos nucleicos, azúcares y proteínas mediante hidrólisis. Este proceso es catalizado por las fosfatasas que resultan, por lo tanto, fundamentales para la supervivencia celular [117]. Se ha descubierto una importante diversidad de fosfatasas en diferentes formas de vida. Los monómeros de las enzimas van de  $15,5 \text{ kDa}$  a  $160 \text{ kDa}$  para diferentes cepas. Algunas son triméricas y varían en la especificidad del sustrato, rangos de pH, requerimientos de iones metálicos y localización (en *E. coli* por ejemplo, se encuentra asociada a la membrana periplasmática y en otras especies es extracelular) [117]. Aunque este tipo de determinación es muy común para los complejos de coordinación de vanadio debido a su relevancia como insulino-miméticos, no lo era para complejos de cobre(II). Se determinó el efecto de la sal de cobre(II), o-fen, cnge y el complejo 2 sobre la FAL por espectroscopia UV-visible.

Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó un compuesto artificial: p-NPP (para nitrofenilfosfato) que, al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido, puede ser reconocido por la enzima y al ser hidrolizado origina p-Nitrofenol como producto. Éste es un

compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, por lo que su aparición en el transcurso de la reacción puede seguirse colorimétricamente. Las condiciones experimentales para la medición de la actividad FAL específica fueron las siguientes:  $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de FAL proveniente de la mucosa intestinal bovina (metaloenzima homodimérica con dos iones  $\text{Zn(II)}$  y uno de  $\text{Mg(II)}$  en cada sitio activo) y 5 mM de p-NPP se disolvieron en el *buffer* (pH = 10,5) y se mantuvieron durante 10 min. Luego se fueron adicionando diferentes concentraciones (entre 1  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ ) de cada mezcla pre-incubada para determinar el efecto de los compuestos. La solución del complejo se preparó en agua/DMSO en partes iguales (1:1) antes de añadir el tampón para obtener las concentraciones finales deseadas. La reacción se inició con la adición del sustrato p-NPP y la formación del producto p-nitrofenol se fue controlando mediante los cambios de absorbancia a 405 nm. El efecto de cada concentración se ensayó por triplicado en tres instancias diferentes [37].

Se evaluó el efecto del metal, los ligandos y el complejo 2 sobre la actividad de FAL (Figura 15). El  $\text{Cu(II)}$ , como era de esperar [37, 38, 80, 118], no muestra un efecto inhibitorio significativo ya que el metal no está involucrado en los mecanismos de inhibición enzimática (unido a residuos proteicos, interacciones electrostáticas o coulombicas con el sitio activo, inducción de agregación de proteínas o inactivación reversible debido a un intercambio de iones metálicos). El compuesto o-fen ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad FAL, cianoguanidina se comporta de una manera similar al  $\text{Cu(II)}$  y el complejo 2 ejerce efectos inhibitorios. La apo-fosfatasa alcalina intestinal bovina, preparada utilizando el ión quelado con el agente EDTA, mostró una disminución dramática de su actividad hidrolasa, junto con cambios conformacionales en su estructura cuaternaria y la recuperación total de la actividad enzimática por adición de iones divalente a la enzima no fue obtenida utilizando EDTA. Este comportamiento es diferente si se usa la enzima de *E. coli*. En este caso, la pérdida de los iones divalentes induce la monomerización de la proteína y una recuperación total de la actividad enzimática por adición de iones divalentes. Además, el quelante o-fenantrolina (ligando bidentado) también produce inhibición de la enzima intestinal bovina. Este efecto se puede explicar mediante un mecanismo dependiente del tiempo, en el que los iones  $\text{Zn}^{2+}$  requeridos por la enzima FAL, son lentamente removidos, haciendo que la enzima se inactive. Este efecto se es reversible en discrepancia con la comportamiento del EDTA quelante más potente [119].



**Figura 15.** Efecto de  $\text{CuCl}_2$  (triángulo lleno invertido), o-fen (círculo lleno), cnge (cuadrado lleno) y el complejo (2) (triángulo lleno) sobre la actividad de FAL de mucosa intestinal bovina. La velocidad inicial se determinó por incubación de la enzima a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min en ausencia o presencia de concentraciones variables de los inhibidores. La actividad basal resultó  $5,2 \pm 0,2 \text{ nmol pNP min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína.

Para los complejos de coordinación se postula un mecanismo diferente de inhibición de FAL. En este caso se sugiere una interacción en el sitio catalítico de la enzima por inhibidores competitivos que se unen en o cerca de los sitios activos [118] pero también se estima que el efecto inhibitor puede deberse a una mejor biodisponibilidad [120]. La complejación aumenta el efecto inhibitor del metal y del ligando cnge, sin embargo el efecto de o-fen sobre la actividad enzimática sigue siendo mayor debido al efecto de quelación en los sitios metálicos de la enzima, similar al efecto de EDTA. La actividad antimicrobiana de o-fen y del complejo 2 podría deberse a la inhibición de la actividad FAL por diferentes mecanismos de acción. En el complejo, la alta interacción con el sitio catalítico podría ser la causa de la inhibición enzimática debido al aumento de la biodisponibilidad de los iones cúpricos por complejación que, como ya se mencionó mejora la liposolubilidad y permeabilidad celular. En el caso del ligando o-fen el mecanismo de inhibición enzimática se produce por una quelación de los metales del sitio activo de FAL que conducen a la formación de la apoenzima [38].

## Conclusiones

La síntesis con control racional de nuevos complejos inorgánicos se presenta como un proceso influenciado por los cambios en las condiciones experimentales. Para lograr el control sobre ellos se recurre a la ingeniería cristalina. De este modo, pueden generarse variaciones significativas en las propiedades químicas y físicas así como en las estructuras globales. En este capítulo se presenta la síntesis de dos nuevos complejos de Cu (II), cianoguanidina y o-



fenantrolina, obtenidas utilizando diferentes relaciones estequiométricas de cada reactivo y temperaturas. Nuestros resultados subrayan la importancia de la adecuada elección de las condiciones experimentales (solvente, temperatura, relaciones metal a ligando) para la manipulación de la composición de los complejos metálicos en estado sólido. Además, se observa que ya sea en solución o en estado sólido, las estequiometrías de los compuestos cobre (II) pueden ser diferentes.

El comportamiento en fluidos biológicos se rige por el equilibrio termodinámico, siendo la distribución de las especies una poderosa herramienta para la determinación de las principales especies presentes en sistemas fisiológicos. Las constantes de formación de cada especie, permiten la determinación de la fracción de las diferentes especies a un valor fijo de pH que nuevamente depende de la relación molar de los reactivos. En la determinación de la distribución de las especies en solución acuosa para el sistema Cu/o-fen/cnge/H<sup>+</sup> a 25 °C, a fuerza iónica fisiológica se puede concluir que las especies bioactivas más estables son las especies cuaternarias y para las condiciones experimentales seleccionadas, la especie [CuAL]<sup>+1</sup> (1,1,1,0) (hidroxo complejo (2)) predomina a valores de pH superiores a 7. Las actividades biológicas se han determinado por su capacidad de imitar enzima superóxidodismutasa y de la actividad para inhibir la fosfatasa alcalina. Los estudios *in vitro* fueron llevados a cabo utilizando sólo el complejo (2) debido a que el complejo (1) es inestable en solución acuosa y el equilibrio se desplaza hacia la formación de complejo (2). La actividad SOD mimética medida se considera moderada. Asimismo, el complejo (2) mejora la actividad inhibidora de la fosfatasa alcalina del metal y la cnge, lo que puede ser una de las razones de su actividad antibacteriana y antifúngica (mayor interacción con el sitio activo de la enzima debido a una mayor biodisponibilidad respecto de cobre y cnge).

Los parámetros geométricos calculados para los dos complejos de Cu(II) con cianoguanidina (cnge) y o-fenantrolina (o-fen), se correlacionan bien con los valores experimentales. El análisis de la estructura electrónica de los complejos, realizado mediante la teoría AIM, permitió estudiar la naturaleza de las principales interacciones metal-ligando. Las propiedades topológicas calculadas en los puntos críticos de enlace muestran el carácter covalente de los enlaces C-N y C-C mientras que las propiedades en los enlaces Cu-N corresponden a enlaces de capa cerrada. Las propiedades topológicas calculadas en los puntos críticos de enlace revelan que los enlaces C-C y C-N de cnge y o-fen presentan similares características después de la formación del complejo, indicando que se producen muy pequeños cambios al producirse la unión del ligando al metal.

La formación de complejos aumenta el carácter antibacteriano del metal y los ligandos contra *E. faecalis*, pero su actividad contra *P. aeruginosa* es nula. Si bien la CIM es un importante ensayo antimicrobiano para determinar la susceptibilidad de algunos microorganismos frente a los agentes antimicrobianos, proporciona información limitada acerca de la actividad del fármaco en el tiempo. En este contexto, la determinación de PAE en 2xMIC de todos los compuestos se consideró apropiada para determinar la modificación de estos parámetros farmacodinámicos frente a la formación de complejos. El complejo (2) exhibió PAEs y/o PAFEs más largos que el cobre y o-fen contra *E. coli* y todas las cepas fúngicas. Además, el complejo (2) tuvo PAE/PAFs más largos contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* que algunos antibióticos o antifúngicos respectivamente de probada eficacia. De esta manera se confirma que la formación de complejos con el cobre modificada algunas propiedades biológicas. En lo que respecta a las propiedades antimicrobianas o inhibidoras de la fosfatasa alcalina, la formación de complejos de cobre resulta ser una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos con mejores actividades.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Williams R. *Coordination Chemistry Reviews* (1991) 100:573-610
- 2- Glusker J, Katz A, Bock C, *The Rigaku Journal* (1999) 16:8-16
- 3- Barán E. *Química bioinorgánica* (1994). McCraw Hill. Madrid. España
- 4- Tapiero H, Townsend D, Tew K, *Biomed. Pharmacother.* (2003) 57:386-389
- 5- Belsky A, Brill T, J. *Phys. Chem. A* (1998) 102:4509-4516
- 6- Batsanov A, Hubberstey P, Russell C, Waltin P, J. *Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 2667-2672
- 7- Martins L, Fraústo da Silva J, Pombeiro A, Henderson R, Evans D, Benetollo F, Bombieri G, Michelin R, *Inorg. Chim. Acta* (1999) 291:39-48
- 8- Sheludyakova L, The Late E. Sobolev V, Arbuznikov A, Burgina E, Kozhevina L. J. *Chem. Soc., Faraday Trans.* (1997) 93:1357-1360
- 9- Ray P, *Chem. Rev.* (1960) 61:313-359
- 10- Williams P, Ferrer E, Baeza N, Piro O, Castellano E, Baran E, Z. *Anorg. Allg. Chem.* (2005) 631:1502-1506
- 11- Bencini A, Lippolis V. *Coordination Chemistry Reviews* (2010) 254: 2096-2180
- 12- Dwyer F, Gyrfas E, Rogers W, Koch J. *Nature* (1952) 170: 190-191
- 13- Caroli S. "Element Speciation in Bioinorganic Chemistry" (1996), John Wiley & Sons INC, Cap. 1
- 14- Bhagat S, Deshpande M, J. *Chem. Pharm. Res.* (2012) 4: 1454-1456
- 15- Singh R, Jadeja R, Thounaojam M, Patel T, Devkar R, Chakraborty D. *Inorg. Chem. Commun.* (2012) 23:78-84
- 16- Rehman S, Ikram M, Rehman S, Faiz A, Shahnawaz S, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* (2010) 24:201-207
- 17- Bencini A, Lippolis V, *Coord. Chem. Rev.* (2010) 254:2096-2180
- 18- Zoroddu M, Zanetti S, Pogni R, Basosi R, J. *Inorg. Biochem.* (1996) 63:291-300
- 19- Espirito Santo C, Lam E, Elowsky C, Quaranta, Domaille D, Chang C, Grass G, *Appl. Environ. Microbiol.* (2011) 77:794-802
- 20- Ibrahim M, Wang F, Lou M, Xie G, Bo B, Zhang G, Liu H, Wareth A, J. *Biosci. Bioeng.* (2011) 112:570-576
- 21- Patel J, Dholariya H, Patel K, Patel K, *Appl. Organomet. Chem.* (2012) 26:604-613
- 22- Plocke D, Vallee B, *Biochemistry* (1962) 1:1039-1043
- 23- Ferrer E, López Tévez L, Baeza N, Correa M, Okulik N, Lezama L, Rojo T, Castellano E, Piro O, Williams P. J. *Inorg. Biochem.* (2007) 101:741-749
- 24- Chandraleka S, Ramya K, Chandramohan G, Dhanasekaran D, Priyadharshini A, Panneerselvam A. J. *Saudi Chem. Soc.* (2011) 18:953-962
- 25- Recio Despaigne , Da Costa F, Piro O, Castellano E, Louro S, Beraldo H, *Polyhedron* (2012) 38:285-290
- 26- Dendrinou-Samara C, Psomas G, Raptopoulou C, Kessissoglou D, J. *Inorg. Biochem.* (2001) 83:7-16
- 27- Mendes I, Moreira J, Mangrich A, Balena S, Rodrigues B, Beraldo H, *Polyhedron* (2007) 26:3263-3270
- 28- Kalia S, Kaushal G, Kumar M, Cameotra S, Sharma A, Verma M, Kanwar S, *Braz. J. Microbiol.* (2009) 40:916-922
- 29- Agwara M, Ndifon P, Ndosiri N, Paboudam A, Yufanyi D, Mohamadou A, B. *Chem. Soc. Ethiopia* (2010) 24:383-389
- 30- Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi C, J. *Ethnopharmacol.* (2007) 112:426-429
- 31- Dolcino M, Zoratti A, Debbia E, Schito G, Marchese A. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2002) 46:4022-4025
- 32- Rescott D, Nix D, Holden P, Schentag J, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1988) 32:450-453
- 33- Pankuch G, Jacobs M, Appelbaum P, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2003) 47:1140-1142
- 34- Stubbings W, Bostock J, Ingham E, Chopra I, J. *Antimicrob. Chemother.* (2004) 54:139-143
- 35- Taweechaisupapong S, Ngaonee P, Patsuk P, Pitiphat W, Khunkitti W. *S. Afr. J. Bot.* (2012) 78:37-43
- 36- Li M, Ding W, Baruah B, Crans D, Wang R, J. *Inorg. Biochem.* (2008) 102:1846-1853
- 37- Urquiza N, Manca S, Moyano M, Arrieta Dellmans R, Lezama L, Rojo T, Naso L, Williams P, Ferrer E, *Biometals* (2010) 23:255-264
- 38- Martin C, Evans W, J. *Inorg. Biochem.* (1991) 15:177-178

- 39- Blessing RH, R. *Acta Cryst.* A51 (1995) 33-38.
- 40- PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, Spek, A. L. (1998).
- 41- CAD4 Express Software. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands (1994)
- 42- Sheldrick G. SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. Univ. of Göttingen: Göttingen, Germany (1997).
- 43- Sheldrick G. SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis. Univ. of Göttingen: Göttingen, Germany (1997).
- 44- Batsanov A, Hubberstey P, Russell C, Walton P. J. *Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 2667-2672
- 45- Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4<sup>th</sup>. ed, John Wiley , New York (1986)
- 46- Sheludyadova L, Sobolev E, Arbuznikov A, Burgina E, Kozhevina L. J. *Chem. Soc, Faraday Trans.* 93 (1997) 1357-1360
- 47- Begley M, Hubberstey P. J. *Chem. Res. (S)* (1982) 1982:118-119
- 48- Kokozska G, Karlin K, Padula F, Baranowski J, Goldstein C, *Inorg. Chem.* (1984) 23:4378-4380
- 49- Barbucci R, Bencini A, Gatteschi D. *Inorg. Chem.* (1977) 16:2117-2120
- 50- Bencini A, Gatteschi D. *Inorg. Chem.* (1977) 16:1994-1997
- 51- Stankowski J, Janik J, Dezor A, Sczaniecki B. *Phys. Statu Solidi A* (1973) 16 :K167-K168.
- 52- Jezowska-Bojczuk M, Le'sniak W. J. *Inorg. Biochem.* (2001) 85:253-261.
- 53- Williams J, Morris H, Svorec J, Valkova M, Valko M, Moncol J, Manzur M, Valach F, Melnik M. J. *Mol Struct.* (2003) 659:53-60.
- 54- Rockenbauer A, Szabo-Planka T, Arkosi Z, Korecz L. *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123:7646-7654.
- 55- Perkinson J, Brodie S, Yoon K, Mosny K, Carroll P, Vance Morgan T, Nieter Burgmayer S, Rockenbauer A, Szabó-Plánka T, Árkosi Z, Korecz L. *Inorg. Chem.* (1991) 30:719-727.
- 56- Peisach J, Blumberg W. *Archv. Biochem. Biophys.* (1974) 165:691-708.
- 57- Lever A, *Inorganic Electronic Spectroscopy* (2<sup>nd</sup>. edition), Elsevier, The Netherlands (1984)
- 58- Martell A, Matekaitis R. *Determination and use of stability constants*. VCH Publishers, Inc. USA, (1992).
- 59- Ebdon L, Pitts L, Cornelis R, Crews H, Donard O. Quevauviller, Ph. Eds. *Trace element speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (2001).
- 60- Chruscinska E, Garribba E, Micera G, Panzanelli A. J. *Inorg. Biochem.* (1999) 75:225-232
- 61- Garribba E, Lodyga-Chruscinska E, Sanna D, Micera G. *Inorg. Chim. Acta* (2001) 322:87-98
- 62- López Tévez L, Martínez Medina J, Islas M, Piro O, Castellano E, Bruzzone L, Ferrer G, Williams P. J. *Coord. Chem.* (2011) 64:3560-3574
- 63- Matekaitis R, Martell A. *Can. J. Chem.* (1982) 60:168-173
- 64- Matekaitis R, Martell A. *Can. J. Chem.* (1982) 60:2403-2409
- 65- Gran G. *Analyst* (1952) 77: 661-671.
- 66- Scharff J, Páris M, *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1967) 5:1782-1788
- 67- Banks C, Bystroff R. *J. Amer. Chem. Soc.* (1959) 81:6153-6158
- 68- Anderegg G. *Helv. Chim. Acta* (1963) 46:2397-2410
- 69- Bandyopadhyay S, Mukherjee G, Drew M. *Inorg. Chim. Acta* (2005) 358:3786-3798
- 70- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Mozina S, J. *Microbiol. Methods* (2010) 81:121-126
- 71- Suksrichavalit T, Prachayasittikul S, Nantasenammat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V, *Eur. J. Med. Chem.* (2009) 44:3259-3265
- 72- Rowe F, Vargas Superti S, Machado Scheibe R, Gomes Dias C, *Diagn. Micr. Infec. Dis.* (2002) 43:45-48
- 73- Koru O, Ozyurt M, *Anaerobe* (2008) 14:161-165
- 74- Smith C, Foleno B, Barrett, Fresco M, *Diagn. Micr. Infec. Dis.* (1997) 27:85-92
- 75- Cavicchioli M, Massabni A, Heinrich T, Costa-Neto C, Abrão E, Fonseca B, Castellano E, Corbi P, Lustrì W, Leite C, J. *Inorg. Biochem.* (2010) 104:533-540
- 76- Rauf M, Imtiaz-ud-Din, Badshah A, Gielen M, Ebihara M, de Vos D, Ahmed S, J. *Inorg. Biochem.* (2009) 103:1135-1144
- 77- Shaheen F, Badshah A, Gielen M, Dusek M, Fejfarova K, de Vos D, Mirza B, J. *Organomet. Chem.* (2007) 692:3019-3026
- 78- Tanaka J, da Silva C, de Oliveira A, Nakamura C, Dias Filho B, *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2006) 39:387-391

- 79- Aliero A, Ibrahim A, in: Y. Kumar (Ed.), Salmonella: A Diversified Superbug, In Tech, Open Access Company, Croatia, Europe (2012)1-26
- 80- Urquiza N, Islas M, Dittler M, Moyano M, Manca S, Lezama L, Rojo T, Martínez Medina J, Diez M, López Tévez L, Williams P, Ferrer E. *Inorg. Chim. Acta* (2013) 405:243-251
- 81- Rehman A, Farooq H, Shakoori A, *Pak. J. Zool.* (2007) 39:405-412
- 82- Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari B, Kornitzer D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97:3520-3525
- 83- Patel M, Dosi P, Bhatt B, Thakkar V, *Spectrochim. Acta Part A* (2011) 78:763-770
- 84- Chen J, Ren X, Mao Z, Le X. *J. Coord. Chem.* (2012) 65:2182-2191
- 85- Roy S, Hagen K, Maheswari P, Lutz M, Spek A, Reedijk J, van Wezel G. *ChemMedChem.* (2008) 3:1427-1434
- 86- López Tévez L, Islas M, Martínez Medina J, Diez M, Piro O, Castellano E, Ferrer E, Williams P. *J. Coord. Chem.* (2012) 65:2304-2318
- 87- Creaven B, Egan D, Karcz D, Kavanagh K, McCann M, Mahon M, Noble A, Thati B, Walsh M. *J. Inorg. Biochem.* (2007) 101:1108-1119
- 88- Efthimiadou E, Katsarou M, Karaliota A, Psomas G. *J. Inorg. Biochem.* (2008) 102:910-920
- 89- Anjaneyulu Y, Rao R. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* (1986) 16:257-272
- 90- Braga P, Culici M, Dal Sasso M. *Int. J. Antimicrob. Agent* (2004) 24:254-260
- 91- McFarland J. *J. Am. Med. Assoc.* (1907) 49:1176-1178
- 92- Fang W. *J. Microbiol. Methods* (1996) 26:151-159
- 93- Diarra M, Malouin F, Jacques M. *Int. J. Antimicrob. Agent* (1999) 12:229-237
- 94- Bartlett J, Tan T, Riley T. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007) 51:4505-4507
- 95- Domínguez M, de la Rosa M, Borobio M. *J. Antimicrob. Chemother.* (2001) 47:391-398
- 96- Wickens H, Pinney R. *Int. J. Pharm.* (2001) 227:149-156
- 97- D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G, Furneri P, Bisignano G. *Phytomedicine* (2010) 17:317-322
- 98- Bush L, Boscia J, Wendeler M, Pitsakis P, Kaye D. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1989) 33:1198-1200
- 99- Hessen M, Pitsakis P, Levison M. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1989) 33:608-611
- 100- García M, Llorente M, Mínguez F, Prieto J. *J. Infect.* (2002) 45:263-267
- 101- Ellepola A, Samaranayake L. *J. Oral Dis.* (1998) 4:260-267
- 102- Ernst E, Klepser M, Pfaller M. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44:1108-1111
- 103- Ellepola A, Samaranayake L. *J. Oral Pathol. Med.* (1999) 28:112-116
- 104- Smith R, Baltch A, Bopp L, Ritz W, Michelsen P. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* (2011) 71:131-138
- 105- Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Gill P, Johnson B, Robb M, Cheeseman J, Keith T, Petersson G, Montgomery J, Raghavachari K, Al-Laham M, Zakrzewski V, Ortiz J, Foresman J, Cioslowski J, Stefanov B, Nanayakkara A, Challacombe M, Peng C, Ayala P, Chen W, Wong M, Andres J, Replogle E, Gomperts R, Martin R, Fox D, Binkley J, Defrees D, Baker J, Stewart J, Head-Gordon M, Gonzalez C, Pople J, GAUSSIAN 03, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, (2003)
- 106- Becke A. *J. Chem. Phys.* (1993) 98:5648-5652
- 107- Flower D. *J. Mol. Graphics Modell.* (1999) 17:238-244
- 108- Gans J, Shalloway D. *J. Mol. Graphics Modell.* (2001) 19:557-559
- 109- Bader R. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Clarendon Press, Oxford, (1990)
- 110- Biegler-König F, Bader R, Tang T. *J. Comput. Chem.* (1982) 3:317-328
- 111- Beauchamp C, Fridovich I. *Anal. Biochem.* (1971) 44:276-287
- 112- Iwamoto I, Mifuchi I. *Chem. Pharm. Bull.* (1982) 30:237-241
- 113- Weder J, Dillon C, Hambley T, Kennedy B, Lay P, Biffin J, Regtop H, Davies N. *Coord. Chem. Rev.* (2002) 232:95-126
- 114- Bienvenue E, Choua S, Lobo-Recio M, Marzin C, Pacheco P, Seta P, Tarrago G. *J. Inorg. Biochem* (1995) 57:157-168
- 115- Árkosi Z, Paksi Z, Korecz L, Gajda T, Henry B, Rockenbauer A. *J. Inorg. Biochem.* (2004) 12:1995-2005
- 116- Roberts N, Robinson P. *British J. Rheum.* (1985) 24:128-136
- 117- Prada P, Curtze J, Brenchley J. *Appl. Environ. Microbiol.* (1996) 62:3732-3738
- 118- Martin C. *J. Inorg. Biochem.* (1995) 58:89-107
- 119- Bortolato M, Besson F, Roux B. *Protein Struct. Funct. Genet.* (1999) 37:10-318
- 120- Peters K, Davis M, Howard B, Pokross M, Rastogi V, Diven C, Greis K, Eby-Wilkens E, Maier M, Evdokimov A, Soper S, Genbauffe F. *J. Inorg. Biochem.* (2003) 96:321-330

### Capítulo 3

#### COMPLEJO DE Zn CON CIANO Guanidina Y FENANTROLINA

##### 1- Introducción

Este metal es esencial y se encuentra ampliamente distribuido en las células y es el elemento traza más abundante intracelularmente. Las principales funciones biológicas del metal, son: catalítica, regulatoria y estructural [1]. En metaloproteínas como la superóxidodismutasa (SOD) citosólica Cu-Zn, el cinc juega un rol estructural y el cobre, catalítico. También se determinó el papel de zinc en la estabilización estructural del plegamiento de las metaloproteínas dedos de zinc, las cuales se encuentran ubicadas en muchos receptores de membrana y factores de transcripción. Este biometal también es importante en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y en la división celular. Además Zn desempeña una función importante en el sistema inmunológico y por eso el agotamiento del Zn es seguido por una disminución en la respuesta inmune mediada por células. Teniendo en cuenta la participación en los procesos antioxidantes, Zn es capaz de proteger y estabilizar las membranas celulares, así como la vitamina E [2]. En los sistemas biológicos el zinc puede formar complejos; la concentración nanomolar de Zn(II) en los fluidos y tejidos del cuerpo se debe a la presencia de grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes coordinados. Así es que en los procesos bioquímicos Zn-dependientes resulta ventajosa la liberación biológica mediante el uso de quelatos de bajo peso molecular o complejos de Zn para abastecer de ion metálico libre para la síntesis enzimática [3].

Varios sistemas modelo fueron desarrollados para determinar el modo de acción de los sistemas naturales que contiene metales de transición. Para simular entornos de nitrógeno alrededor de Zn(II), se propone la utilización de cianoguanidina (cng) y o-fenantrolina (o-fen). Como ya se mencionó en el capítulo anterior, cng es la forma dimérica de cianamida, siendo este último reconocido recientemente como un sustrato para la nitrogenasa que contiene ciano y guanidina que puede coordinar con diversos metales [4-6] y ha sido ampliamente empleado como un ligando de los metales de transición en la síntesis de compuestos de coordinación [4, 7] y varios estudios teóricos y experimentales sugieren la coexistencia de dos formas tautoméricas: cianoimina y cianoamina en estado sólido [8] (Figura 1, cap 2). Asimismo, se mencionó que la 1,10-fenantrolina, (fen) es un compuesto orgánico heterocíclico que puede actuar como un fuerte campo ligando bidentado formando quelatos muy estables con muchos metales de transición de la fila primera [9].

El complejo  $[\text{Zn}(\text{phen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  fue sintetizado a valores altos de pH y su estructura cristalina fue determinada por el método de difracción de rayos X. El complejo fue caracterizado en estado sólido y en solución por espectroscopias FT-IR, Raman y de fluorescencia. También se ensayaron *in vitro* los posibles efectos antimicrobianos del metal, los ligandos y el complejo para determinar la posible mejora de esta propiedad luego de la complejación.

En el capítulo de cobre ya se determinó que el ligando o-fen tiene propiedades antibacterianas, antifúngicas y propiedades antivirales, como ya había sido demostrado en varias cepas bacterianas y de hongos [10-12]. Por su parte el zinc es un elemento esencial que interviene en muchas reacciones celulares de vital importancia cuando se encuentra en bajas concentraciones endógenas. Sin embargo, en las células procariotas concentraciones por encima del rango óptimo, producen efectos citotóxicos. La actividad antimicrobiana de Zn(II) es esencialmente dependiente de la cepa microbiana [13]. De este modo, Zn(II) podría ser capaz de mostrar su actividad antimicrobiana en calidad de agente antibacteriano o antifúngico. Por otra parte, se pretende demostrar que el perfil antifúngico de algunos compuestos pueden ser modificado con la formación de complejos [10, 14, 15], dado que algunos complejos de zinc ejercen un efecto antifúngico frente a algunas cepas de *Candida* mientras que otros complejos promueven el crecimiento de *Candida albicans* [16]. Investigamos la actividad antifúngica del complejo de zinc con cnge y o-fen por el método de difusión en agar y el método de microdilución en agar y también determinamos el efecto post antifúngico (PAFE) para el ión Zn(II), los ligandos cnge y o-fen y el complejo sintetizado frente a siete cepas del género *Candida*. Estas medidas fueron complementadas con ensayos toxicológicos.

La especiación (distribución de especies) fue determinada mediante estudios potenciométricos con el fin de determinar la especie en equilibrio que prevalece en condiciones de pH fisiológico, que sería aquella en la que se encontraría directamente frente a los microorganismos *in vivo*.

## 2- Síntesis y caracterización del complejo $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

### 2.1. Preparativa

Para sintetizar el complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se comenzó con una solución de 1mmol de cnge en 5 mL de agua a la cual se le fue agregando con agitación continua 5 mL de una solución acuosa de 1 mmol de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ . Posteriormente se adicionaron también 5 mL de una solución etanólica de 2 mmoles de o-fen resultando una solución

incolora cuyo pH fue ajustado a 10 mediante el agregado de NaOH (1M). Este sistema permaneció en agitación durante aproximadamente 15 minutos. El precipitado blanco que se formó fue separado por filtración y posteriormente se descartó. Después de 2 semanas de evaporación lenta a temperatura ambiente, en el seno del líquido madre se empezó a observar la formación de cristales incoloros adecuados para el trabajo de difracción de rayos X. Los valores calculados para  $C_{26}H_{24}N_{10}O_8Zn$  fueron: C, 46,6%; H, 3,6%; N, 20,9% mientras que los valores encontrados experimentalmente para el mismo complejo fueron: C, 45,8%; H, 3,7%; N, 21,2%. Para corroborar el número de moléculas de agua en el complejo, se midió la descomposición térmica desde 20 °C a 200 °C. El proceso de descomposición fue registrado en la curva de TGA mostrando la liberación de dos moléculas de agua en dos etapas diferentes, la primera a los 78 °C puede ser asignado a un agua de cristalización (pérdida de masa calculada 2,69% y encontrada 2,63%). El segundo paso, a 110 °C implica la pérdida de una molécula de agua enlazada químicamente (ligando agua, la pérdida de masa calculado fue de 2,69% y encontrado fue de 2,69%). Dos picos endotérmicos que aparecen dentro del rango térmico anteriormente, en el estudio DTA, apoyan estas determinaciones.

## 2.2. Espectroscopias FTIR y Raman

En la Tabla 1 pueden observarse las bandas correspondientes a los modos vibracionales de cnge, o-fen y del anión nitrato, medidos por espectroscopías FTIR y Raman. En el caso de cnge, el estiramiento asimétrico ( $\nu_{as}(NCN)$ ), es un doblete sensible a la coordinación con metales de transición. Los modos de cnge pueden correrse a mayor o menor número de ondas por coordinación dependiendo de la distancia metal-N(cnge) [17, 18]. En este caso, se observa un desplazamiento de las bandas a menores frecuencias (de 2212-2162  $cm^{-1}$  a 2188-2146  $cm^{-1}$ ), en acuerdo con una distancia Zn-N más larga que para el Cu (2,092 Å) y un menor ángulo Zn-N-C (161°). las vibraciones simétricas CN aparecen en la zona de 930  $cm^{-1}$  (934  $cm^{-1}$ , de intensidad fuerte en el espectro Raman, como es de esperar).



**Tabla 1.** Frecuencias vibracionales del complejo  $[\text{Zn}(\text{cnge})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , cianoguanidina (cnge) y o-fenantrolina (o-fen) ( $\text{cm}^{-1}$ ). Itálica: frecuencias Raman.

$[\text{Zn}(\text{cnge})(\text{fen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	cnge	o-fen	Asignaciones
2189 f 2186 <i>md</i>	2208 m 2204 <i>m</i>		$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ cnge
2148 f 2153, 2147 <i>md</i>	2162 f 2158 <i>mf</i>		$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ cnge
1647 h, 1636 f, 1629 h 1627 <i>m</i>	1637 <i>mf</i> 1647 <i>d</i> , 1635 <i>d</i>	1645 m, 1620 d 1617 <i>d</i>	$\nu(\text{C}=\text{N})$
1606 <i>m</i> , 1586 <i>m</i>		1585 m 1601 <i>d</i> , 1590 <i>d</i>	o-fen
1569 f, 1552 f	1570 f 1543 <i>d</i>	1558 m 1564 <i>md</i>	$\nu(\text{C}=\text{N})$
1516 f, 1491 h 1518 <i>m</i>	1505 m 1524 <i>d</i>	1501 f 1503 <i>d</i>	
1423 f 1455 <i>f</i> , 1423 <i>mf</i>		1418 f 1447 <i>m</i> , 1405 <i>mf</i>	o-fen
1380 vs 1381 <i>md</i>			$\nu_3(\text{E}') \text{NO}_3^-$
1353 h 1344 <i>d</i> , 1319 <i>h</i>		1341 m 1345 <i>d</i>	o-fen
1308 h 1308 <i>m</i>		1297 d 1295 <i>m</i>	o-fen
1250 m 1255 <i>d</i>	1252 m	1273 <i>d</i>	
1223 m 1226 <i>md</i> , 1207 <i>md</i>		1215 d	o-fen
1196 <i>d</i>		1183 d	o-fen
1141 m, 1098 m 1148 <i>d</i> , 1106 <i>d</i>	1086 m 1098 <i>d</i>	1090 m 1090 d	
1055 <i>m</i>			$\nu_1(\text{A}_1')$ $\text{NO}_3^-$
1042 m 1045 <i>h</i>		1034 d 1036 <i>m</i>	o-fen
997 m		990 d	
962 m 968 <i>md</i>		961 d	o-fen
920 m 921 <i>d</i> , 900 <i>d</i>	928 m 934 <i>f</i>		$\nu_s(\text{C}\equiv\text{N})$ cnge
856 h, 847 f 867 <i>d</i>		852 <i>mf</i>	o-fen
773 m, 754 h		776 d	o-fen
724 f 732 <i>m</i>	723 d	738 <i>mf</i> 711 <i>m</i>	o-fen

f, fuerte; m, mediana; md, mediana-débil; d, débil; md, muy débil; h, hombro

En relación al grupo nitrato se deduce simetría  $C_{2v}$  por la presencia del desdoblamiento de la banda correspondiente a  $\nu_3(E')$  del ion nitrato ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ) que se observa en  $1426$  y  $1375\text{ cm}^{-1}$ . Si bien la diferencia entre estos dos valores,  $\Delta = 48\text{ cm}^{-1}$ , es algo menor a la reportada por Nakamoto  $\Delta = 115\text{ cm}^{-1}$  para coordinación monodentada del ion nitrato, este valor bajo indica que la interacción del nitrato con el ion zinc se produce a través de un sólo oxígeno. El desdoblamiento que se espera para el modo de coordinación bidentado del anión nitrato es mucho mayor ( $\Delta = 186\text{ cm}^{-1}$ ), por lo que se descarta dicha interacción [19]. Las bandas características de o-fenantrolina se observan en  $866$  y  $724\text{ cm}^{-1}$  con pequeños corrimientos asignados a la coordinación con el metal.

### 2.3- Determinación estructural por Rayos X

La estructura molecular del complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})]$ , como parte de la sal  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  fue resuelta por el método de difracción de rayos X. La sal cristaliza en el grupo especial monoclinico  $P2_1/a$  con  $a = 13,0273(3)$ ,  $b = 18,4151(4)$ ,  $c = 13,6855(3)\text{ \AA}$ ,  $\beta = 110,71(1)^\circ$ , y 4 moléculas por celda unidad,  $Z=4$ . La estructura se determinó a partir de 5157 reflexiones con  $I > 2\sigma(I)$  y el refinamiento por cuadrados mínimos de la matriz, a un acuerdo con valor de  $R_1$  de 0,0419.

Las medidas de difracción de rayos X para el monocristal  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se realizaron en un difractómetro Enraf-Nonius Kappa-CCD con radiación  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073\text{ \AA}$ ) reflejada en un monocromador de grafito. Las intensidades de difracción de rayos-X fueron colectadas (barridos en  $\omega$  con ángulos  $\vartheta$  y  $\kappa$  dados), integradas y colocadas en una misma escala mediante el paquete de programas COLLECT [20] y HKL DENZO-SCALEPACK [21] para integrarlos. 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) usando HKL SCALEPACK [20]. La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXS-97 [22] y el modelo molecular inicial desarrollado mediante ciclos alternados de métodos de Fourier y refinamiento por cuadrados mínimos de matriz completa con SHELXL-97 [23]. Como el mapa diferencia de Fourier basado en los átomos no-H del fragmento molecular  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$  mostraron que el otro contra-ion nitrato y la molécula de agua estaban severamente desordenadas en la red, este desorden no pudo modelarse adecuadamente en términos de la molécula esperada. Por lo tanto, se procedió con el refinamiento de la estructura parcial  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$  recurriendo al procedimiento

descrito en [24] e implementado en el programa SQUEEZE incluido en el de PLATON [25]. Los átomos de hidrógeno se localizaron en un mapa diferencia de Fourier. Sin embargo, todos los átomos menos los H del agua se posicionaron en una base estereoquímica y se refinaron con el modelo de riding. Los átomos de H del agua se refinaron y las posiciones encontradas se restringieron a valores topes de 0,86(1) y 1,36(1) Å. Los datos cristalinos, el procedimiento de colección de datos, los métodos de determinación estructural y los resultados de refinamiento se resumen en la Tabla 2.

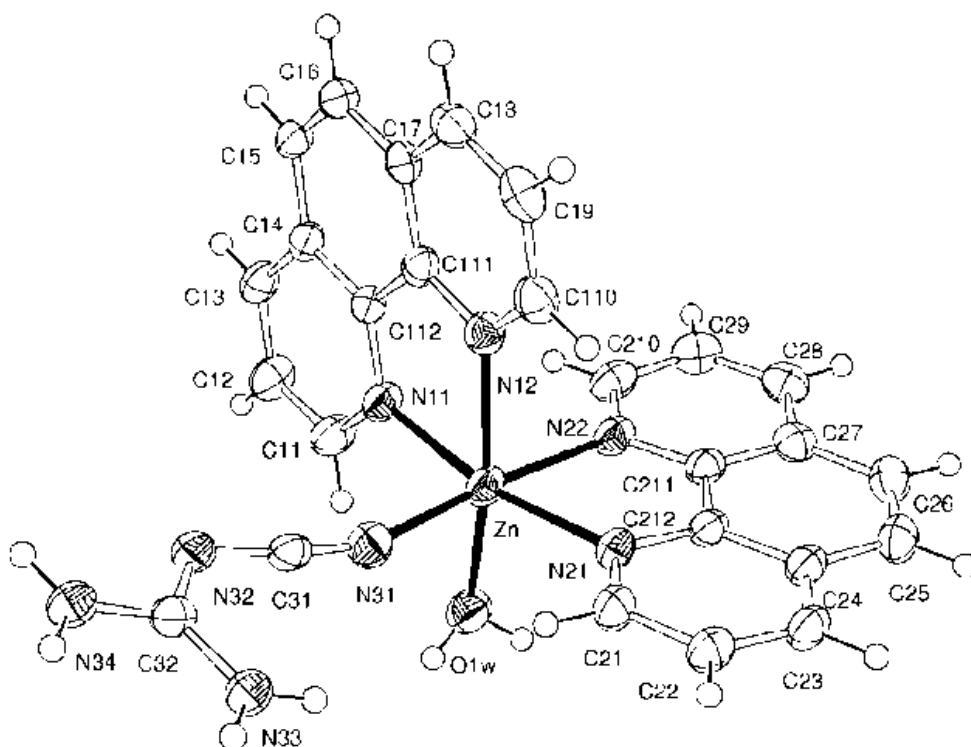
Tabla 2. Datos cristalinos y resultados del refinamiento estructural del complejo ordenado  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$  en su estructura parcial para el sólido  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Formula empírica	$\text{C}_{26} \text{H}_{22} \text{N}_9 \text{O}_4 \text{Zn}$
Peso molecular	589.90
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$
Dimensiones de celda unidad	$a = 13,0273(3) \text{ Å}$ $b = 18,4151(4) \text{ Å}$ $c = 13,6855(3) \text{ Å}$ $\beta = 110,71(1)^\circ$ .
Volumen	$3070,99(12) \text{ Å}^3$
Z	4
densidad (calculada)	$1,449 \text{ mg/m}^3$
Coeficiente de Absorción	$0,86 \text{ mm}^{-1}$
F(000)	1212
Dimensiones del cristal	$0,20 \times 0,12 \times 0,12 \text{ mm}^3$
Rango- $\vartheta$ en colección de datos	$2,72$ to $26,00^\circ$ .
Rangos de índices de Miller	$-16 \leq h \leq 16$ , $-22 \leq k \leq 22$ , $-16 \leq l \leq 16$
Reflexiones recolectadas	25823
Reflexiones independientes	6016 [R(int) = 0,0411]
Reflexiones observadas [ $I > 2\sigma(I)$ ]	5157
Complejidad hasta $\vartheta = 26,00^\circ$	99,7 %
Max. and min. Transmisión	0,9055 y 0,8494
Método de refinamiento	Cuadr. mínimos, matriz completa en $F^2$
Datos/restricciones/parámetros	6016 / 3 / 369
Bondad de ajuste en $F^2$	1,068
Índices R finales <sup>a</sup> [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0419$ , $wR_2 = 0,1235$
Índices R (todos los datos)	$R_1 = 0,0479$ , $wR_2 = 0,1273$
Mayor diferencia pico y hueco	$0,356$ y $-0,682 \text{ e.Å}^{-3}$

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

La Figura 1 es un dibujo ORTEP [24] del complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})]$ . Las distancias de enlace intra-moleculares y los ángulos alrededor del zinc(II) se muestran en la Tabla 3. El ion zinc(II) se encuentra en un entorno octaédrico coordinado a cinco átomos de nitrógeno y uno de

oxígeno de dos moléculas de o-fenantrolina casi planares (la desviación de los átomos rms, a partir del mejor plano de cuadrados mínimos es menor que 0,055 Å) y mutuamente perpendiculares (ángulo diedro, 88,82 y longitudes de enlace Zn-N entre 2,124(2) Å y 2,193(2) Å) que actúan como ligandos bidentados a través de sus átomos de N (la longitudes de los enlaces Zn-N varían en el rango: 2,124(2)-2,193(2) Å). Las restantes posiciones de coordinación se ocupan por el nitrógeno (ciano) de la molécula de cnge ( $d(\text{Zn-N}) = 2,092(2)$  Å,  $\angle(\text{Zn-N-C})=161,1(2)^\circ$ ) que coordina con un ligero desplazamiento en el ángulo ( $\angle(\text{Zn-N-C})=161.1(2)^\circ$ ) y por una molécula de agua ( $d(\text{Zn-O}_w) = 2,112(2)$  Å).



**Figura 1.** Complejo de zinc (II) en  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cngc})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  sólido mostrando la numeración de los átomos no-H y sus elipsoides de desplazamiento en el nivel de 50% de probabilidad. Los enlaces entre el ión zinc(II) y los ligandos se indican con líneas llenas.

**Tabla 3.** Longitudes [Å] y ángulos [°] de enlace alrededor del átomo de Zn(II) en [Zn(fen)<sub>2</sub>(cnge)(H<sub>2</sub>O)].

N(11)-Zn	2,124(2)
N(12)-Zn	2,193(2)
N(21)-Zn	2,136(2)
N(22)-Zn	2,189(2)
N(31)-Zn	2,092(2)
O(1W)-Zn	2,112(2)
N(31)-Zn-O(1W)	91,00(9)
N(31)-Zn-N(11)	94,01(8)
O(1W)-Zn-N(11)	91,76(8)
N(31)-Zn-N(21)	94,84(8)
O(1W)-Zn-N(21)	95,46(8)
N(11)-Zn-N(21)	168,47(8)
N(31)-Zn-N(22)	171,95(8)
O(1W)-Zn-N(22)	90,55(8)
N(11)-Zn-N(22)	93,84(8)
N(21)-Zn-N(22)	77,15(8)
N(31)-Zn-N(12)	91,08(8)
O(1W)-Zn-N(12)	168,98(7)
N(11)-Zn-N(12)	77,29(8)
N(21)-Zn-N(12)	95,15(8)
N(22)-Zn-N(12)	88,89(8)

### 3- Cálculos teóricos geométricos y vibracionales

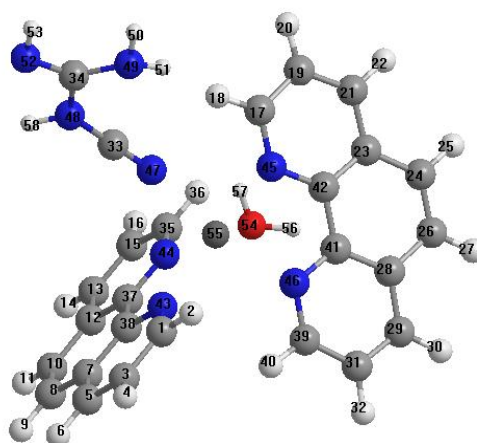
Para extender este estudio se realizaron cálculos teóricos de la geometría y un estudio vibracional basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT) [25, 26]. Los resultados se compararon con los datos experimentales obtenidos por rayos X, FT-IR y FT-Raman. Las geometrías del complejo de Zn y de los ligandos se optimizaron completamente a varios niveles de teoría empleando diferentes conjuntos base para los diferentes átomos. En el caso del complejo, la información obtenida de los espectros de difracción de rayos X se utilizó para generar una estructura de partida. Todos los cálculos se realizaron con Gaussian 09 [27] y las estructuras finales se optimizaron usando el funcional B3LYP [28] y conjuntos de bases de calidad triple zeta con polarización (triple-zeta quality with polarization quality, TZVP) para átomos de Zn, C e H, y agregando funciones difusas (TZVPD) para átomos de O y N [29]. Los cálculos teóricos se realizaron simulando la existencia de un solvente (agua) usando un modelo continuo (Conducting Polarizable Continuous Model, CPCM) tal como está implementado en Gaussian 09 [27].

Los espectros IR y Raman de cianoguanidina en diferentes estados (cristalino y en solución) revelan la coexistencia de dos especies estructurales diferentes: cianoimina y

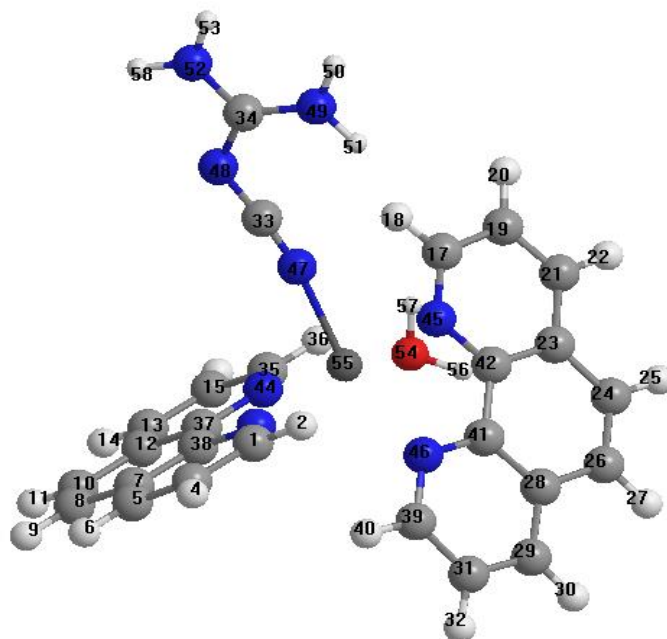
cianoamina [8] y los cálculos teóricos con ambos isómeros confirman la coexistencia de las dos formas [30]. Asimismo, los espectros de difracción de rayos X muestran longitudes de enlace equivalentes para C-N y C=N en los fragmentos de cianoguanidina como consecuencia de la superposición de ambos tautómeros presentes simultáneamente en las muestras de cnge. Teniendo en cuenta estas estructuras, la optimización del complejo catiónico de Zn se realizó considerando ambos tautómeros individualmente: 1-cianoguanidina (cianoamina) y 2-cianoguanidina (cianoimina) y las estructuras resultantes se llamaron (1) y (2), respectivamente.

La espectroscopía vibracional es uno de las más importantes y prometedoras herramientas para la caracterización estructural de las moléculas (grupos funcionales). La combinación de cálculos teóricos con espectroscopía de IR y Raman proporcionan valiosa información estructural [31]. Para confirmar la existencia de mínimos en la superficie de energía potencial y realizar la asignación teórica a los espectros se realizaron cálculos vibracionales al mismo nivel de teoría de la optimización de geometría. La capacidad para reproducir los datos experimentales a través de los cálculos teóricos se puso a prueba analizando los valores de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media) de las correspondientes estructuras moleculares, ya que constituyen una medida natural para cuantizar la similitud de dos estructuras rotadas [32]. Estos cálculos se realizaron con el programa Qmol [33].

Las geometrías de los complejos de cinc formados con los dos tautómeros de cnge: cianoamina (1) y cianoimina (2) se optimizaron sin restricciones y las estructuras resultantes se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente.



**Figura 2.** Estructura optimizada del complejo (1):  $[Zn(fen)_2(cianoamina).H_2O]$ . Las esferas grises representan átomos de C, las blancas H, las azules N, la roja es O y el átomo 55 es Zn.



**Figura 3.** Estructura optimizada del complejo (2):  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cianoimina})\cdot\text{H}_2\text{O}]$ . Las esferas grises representan átomos de C, las blancas H, las azules N, la roja es O y el átomo 55 es Zn.

En la Tabla 4 se muestran algunos parámetros geométricos que se seleccionaron para realizar una comparación entre la estructura experimental y las estructuras resultantes de los complejos calculados (1) y (2). Las estructuras optimizadas muestran buen acuerdo con la estructura experimental obtenida por difracción de rayos X, lo que implica la adecuación del método teórico empleado para las optimizaciones de geometría. Los valores de las longitudes de enlace Zn-N (cnge) calculadas son similares a los experimentales [34] y, en general, puede decirse que los datos experimentales son bien reproducidos por los cálculos. En cuanto a los ángulos de enlace, la comparación de los datos teóricos con los experimentales indica que los valores son ligeramente diferentes. Esto puede deberse a que la geometría del complejo en el estado sólido está sujeta a interacciones intra e intermoleculares, como enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, mientras los cálculos se realizan sobre moléculas aisladas.

**Tabla 4.** Longitudes (Å) y ángulos de enlace (°) calculados para el complejo (1). Se presentan también los correspondientes valores experimentales [34] para comparación.

Longitudes de enlace <sup>a</sup>	Exp.	Calc. <sup>b</sup>	Calc. <sup>b</sup>	Ángulos de enlace <sup>a</sup>	Exp.	Calc. <sup>b</sup>	Calc. <sup>b</sup>
Zn(55)-N(45)	2.136	2.159	2.173	N(45)-Zn(55)-N(46)	77.15	77.6	76.5
Zn(55)-N(46)	2.189	2.184	2.215	N(43)-Zn(55)-N(44)	77.29	77.8	77.2
Zn(55)-N(44)	2.193	2.174	2.187	C(33)-N(47)-Zn(55)	161.1	168.3	169.9
Zn(55)-N(43)	2.124	2.158	2.177	N(49)-C(34)-N(52)	119.1	130.0	119.1
Zn(55)-O(54)	2.112	2.278	2.308	N(49)-C(34)-N(48)	123.3	114.4	123.8
Zn(55)-N(47)	2.092	2.211	2.102	C(34)-N(48)-C(33)	119.2	125.7	122.6
C(34)-N(49)	1.342	1.362	1.337	N(52)-C(34)-N(48)	117.5	115.5	117.0
C(34)-N(48)	1.345	1.423	1.334	N(47)-C(33)-N(48)	174.2	178.9	174.9
C(34)-N(52)	1.320	1.271	1.334				
C(34)-N(47)	1.164	1.155	1.166				
C(34)-N(48)	1.296	1.312	1.286				

<sup>a</sup>Para la numeración de los átomos ver las Figuras 2 y 3.

<sup>b</sup>Estructuras calculadas a nivel B3LYP/TZVPD.

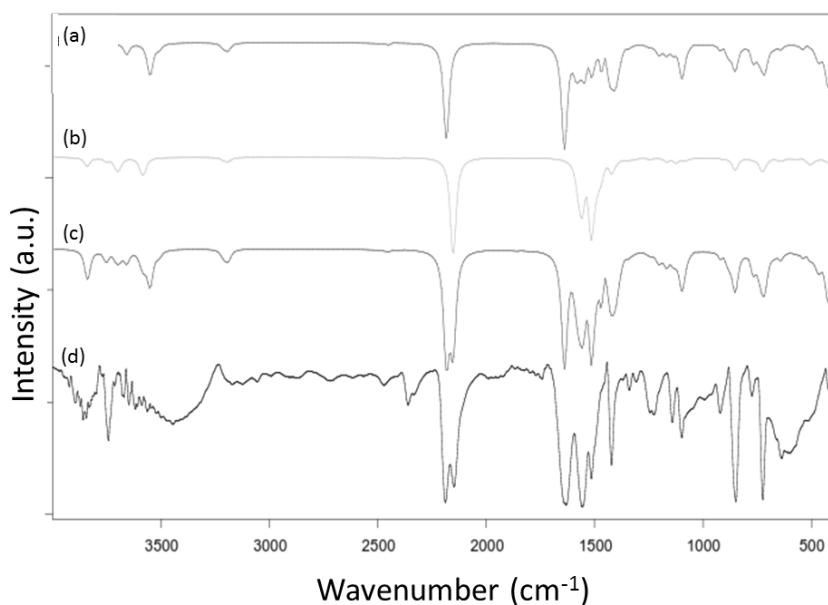
Para evaluar la similitud estructural las geometrías optimizadas de los complejos fueron superpuestas a la estructura cristalográfica (Figura 4) (superponiendo los átomos de la esfera de coordinación del Zn) y los valores obtenidos de RMS fueron de 1,156 Å y 1,155 Å para los complejos (1) y (2), respectivamente. Estos valores de RMS son ligeramente elevados debido a que, como se comentó antes, la estructura de rayos X corresponde a la forma cristalina compactada.



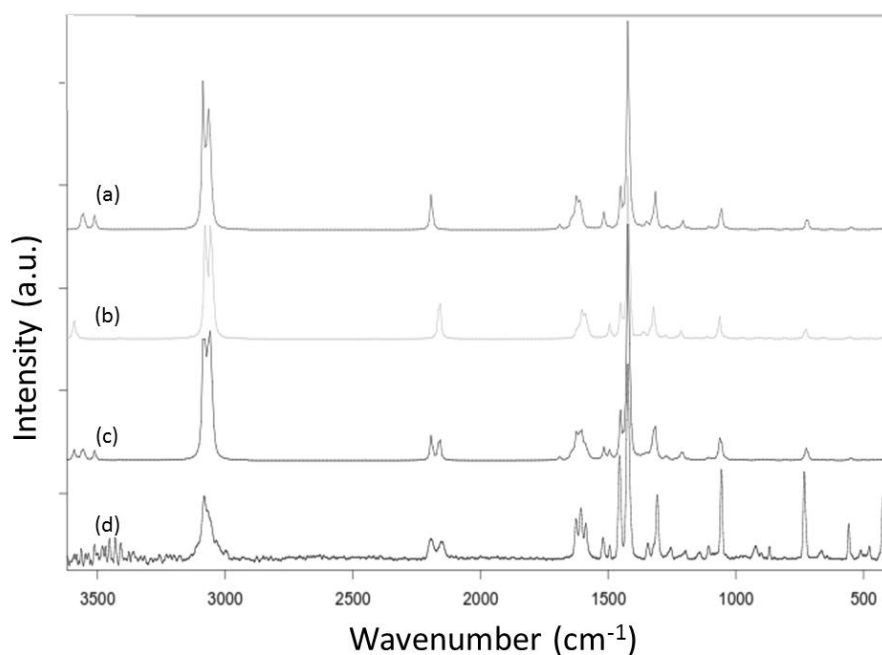
**Figura 4.** Superposición de las estructuras del estado sólido (rojo) y calculada (negro) del Complejo 1 (izquierda) y del Complejo 2 (derecha).



Los espectros teóricos IR y Raman de los dos complejos se muestran en las Figuras 5 (a y b) y 6 (a y b) y se compararon con los espectros experimentales (Figuras 5d y 6d). Ambos espectros calculados muestran una banda simple alrededor de  $2.200\text{ cm}^{-1}$  que se asigna al modo de estiramiento del enlace  $\text{C}\equiv\text{N}$ . En el espectro experimental, las frecuencias de estiramiento para las bandas de mayor intensidad (fuertes) asignadas al grupo ciano coordinado se encontraron localizadas a  $2.189\text{ cm}^{-1}$  y  $2.148\text{ cm}^{-1}$  y han sido asignadas a la contribución de los dos tautómeros (1) y (2), respectivamente, presentes en estado sólido. Los valores calculados de  $2.170\text{ cm}^{-1}$  (intensidad: 803) y  $2.150\text{ cm}^{-1}$  (intensidad: 1,704) para (1) y (2), respectivamente, mostraron el mismo comportamiento que los datos experimentales. Estos resultados están en acuerdo con datos reportados previamente [8, 30, 35] e indican la coexistencia de dos complejos distintos ya que contienen diferentes formas tautoméricas de  $\text{cngc}$  coordinadas al centro de Zn en el estado sólido, en cada caso. Las longitudes y ángulos de enlace calculados son compatibles con una alta contribución del complejo (2) (Zn-cianoimina) y el mismo comportamiento se observó en los cálculos teóricos del tautómero imino de la cianoguanidina aislada, que es la forma predominante, la que resulta energéticamente más estable por alrededor de 42-50 kJ que la forma amino [35]. Los cálculos presentados en esta tesis indican que el complejo (2) (con el tautómero cianoimina) es más estable por 5,1 kJ/mol que la forma Zn-cianoamina (1).



**Figura 5.** Espectros IR de (a) Complejo 1, (b) Complejo 2, (c) espectro promediado, pesado para los complejos 1 y 2 y (d) experimental.



**Figura 6:** Espectros Raman de (a) Complejo 1, (b) Complejo 2, (c) espectro promediado, pesado para los complejos 1 y 2 y (d) experimental.

De un análisis de los datos de la Tabla 4 resulta claro que los valores calculados para *cngc* en (2) muestran una mayor coincidencia con los datos experimentales que los valores teóricos calculados para (1). No obstante, para reproducir los espectros IR y Raman (tanto en posición de las bandas como en intensidades de las mismas) fue necesario aplicar una contribución de 70,67% y de 29,33% para los complejos (1) y (2), respectivamente, para poder representar el doblete en la banda correspondiente al estiramiento del enlace C≡N (Figs. 5c y 6c). En definitiva, tanto los resultados teóricos como los obtenidos experimentalmente referidos a los espectros vibracionales de los complejos sugieren la coexistencia de las dos formas tautoméricas de *cngc* coordinadas al ión Zn<sup>2+</sup> en el estado cristalino. Por otra parte, la banda de estiramiento del ión nitrato en el espectro obtenido experimentalmente, se observa a 1.380 cm<sup>-1</sup> (FTIR, modo  $\nu_3(E')$ ) y 1.055 cm<sup>-1</sup> (Raman, modo  $\nu_1(A'_1)$ ). Estas bandas están ausentes en los espectros calculados debido a que los cálculos teóricos se realizaron solamente con el complejo en su forma catiónica.

#### 4- Determinación de constantes de acidez y de estabilidad. Mediciones potenciométricas

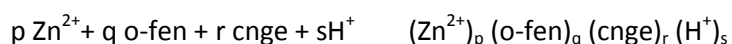
El Zn(II) se asocia con actividades catalíticas o regulatorias a proteínas que participan en algunos de los procesos químicos vitales fundamentales y en dichas enzimas y proteínas actúa como ácido de Lewis. Con la finalidad de estudiar qué especies predominan en solución acuosa a pH fisiológico se hace necesario un estudio de distribución de especies utilizando técnicas

potenciométricas [36-39]. Para simular entornos nitrogenados alrededor del Zn(II), se propone el uso de cianoguanidina (cnge) y o-fenantrolina (fen), simultáneamente. La primer corrida experimental se destina a la determinación de las constantes de protonación del ligando aislado, a través del perfil de pH en un rango que usualmente va entre 2 y 12. Luego es necesario obtener el perfil de pH medido para el sistema que contiene diversas relaciones molares metal/ligando. A continuación se repite la operación para el segundo ligando y, por último, se titula el sistema cuaternario.

Como ya se indicó se utilizaron los programas PKAS [40], BEST [41], SPE y SUPERQUAD. El electrodo fue calibrado de la misma forma que para el complejo de Cu [42].

Luego se realizó la titulación potenciométrica de Zn(II)/cianoguanidina. Se ensayaron diferentes proporciones de metal/ligando con el fin de evitar la precipitación. Las soluciones de zinc se prepararon disolviendo ZnCl<sub>2</sub> (Merck) y todos los datos se determinaron desde un pH muy bajo (el más bajo al que se pudo llegar experimentalmente) hasta pH 11. Con los valores de [H] obtenidos en la titulaciones se graficaron las curvas de la variación de pH en función del volumen de base agregados. Las constantes de protonación de los ligandos (LH=cngeH y AH<sup>+</sup>=o-fenH<sup>+</sup>) fueron re-determinadas en las mediciones pH-potenciométricas de los sistemas Zn(II)-ligando. Los valores del logaritmo de K están de acuerdo con nuestras medidas en condiciones idénticas [17, 18] (como en el caso del cobre). El registro experimental de β<sub>0101</sub> con un valor de 5,0 para o-fenH<sup>+</sup> se calculó nuevamente y estuvo de acuerdo con el valor reportado [43, 44]. Las constantes de estabilidad de los complejos ternarios fueron refinadas por separado utilizando los datos de valoración de estos sistemas (utilizando el programa Best y Superquad) [45]. Estos valores se mantuvieron fijos en el modelo final y en consecuencia sólo las especies cuaternarias fueron refinadas. Para las especies cuaternarias se llevaron a cabo titulaciones con concentraciones variables de los componentes con el fin de establecer el equilibrio del sistema Zn<sup>2+</sup>/ o-fen /cnge /H<sup>+</sup>.

Las constantes de formación, según β<sub>pqrs</sub> corresponden a la notación general:



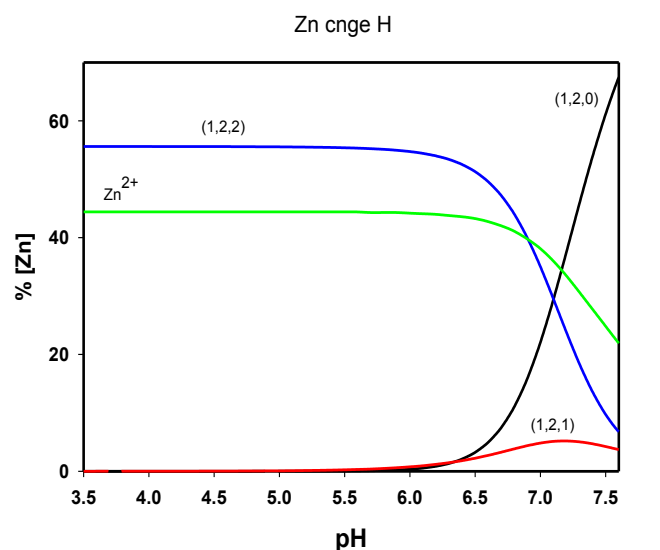
Un valor de pK<sub>w</sub> 13,76 (equivalente a log β<sub>000-1</sub>= -13,76 fue adoptado para las condiciones experimentales (T=298 K, I=150 mmol.L<sup>-1</sup>). Para ajustar los datos potenciométricos con el programa Superquad, fueron consideradas diferentes especies y el mejor modelo fue

refinado. Las constantes de estabilidad ( $\log\beta$ ) del sistema ternario ( $\text{Zn}^{2+}/\text{cnge}/\text{H}^+$ ) se presentan en la Tabla 5. Estos valores se utilizaron para calcular la curva de distribución de las especies que se muestra en la Figura 7.

Se puede observar que existe una competencia en el sistema ternario  $\text{Zn}^{2+}/\text{cnge}/\text{H}^+$  entre el catión  $\text{Zn}^{2+}$  libre y  $[\text{ZnL}_2\text{H}_2]^{+2}$  para pH 3,5 a pH 6,5 ( $\log\beta_{122}$  32,31). A valores de pH más altos se observó la formación de hidroxocomplejos. Además, las constantes de estabilidad calculadas para el sistema  $\text{Zn}^{2+}/\text{o-fen}/\text{H}^+$  están muy de acuerdo con los resultados anteriores [44, 46].

**Tabla 5.** Composición, notación y constantes de formación ( $\beta$ ) para el sistema  $Zn^{2+}/cngc/H^+$  (298 K y  $0.150 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaCl}$ )

Especie (pqr)	Fórmula	Log $\beta$
011	LH	11,57
10-1	$[Zn H_1]^{1+}$	10,20
10-2	$[Zn H_2]$	19,40
10-3	$[Zn H_3]^-$	27,70
10-4	$[Zn H_4]^{2-}$	37,20
11-3	$[Zn L H_3]^-$	-16,58
122	$[Zn L_2 H_2]^{+2}$	32,31
121	$[Zn L_2 H]^{+1}$	23,51
120	$[Zn L_2]$	17,30



**Figura 7.** Patrones de distribución de especies de los complejos de Zn(II) en el sistema binario  $Zn^{2+}/cngc(L)/H^+$  en función del pH. Concentraciones totales:  $Zn^{2+}$   $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  y  $cngc$ ,  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$   $I = 0,150 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaCl}$   $25 \text{ }^\circ\text{C}$

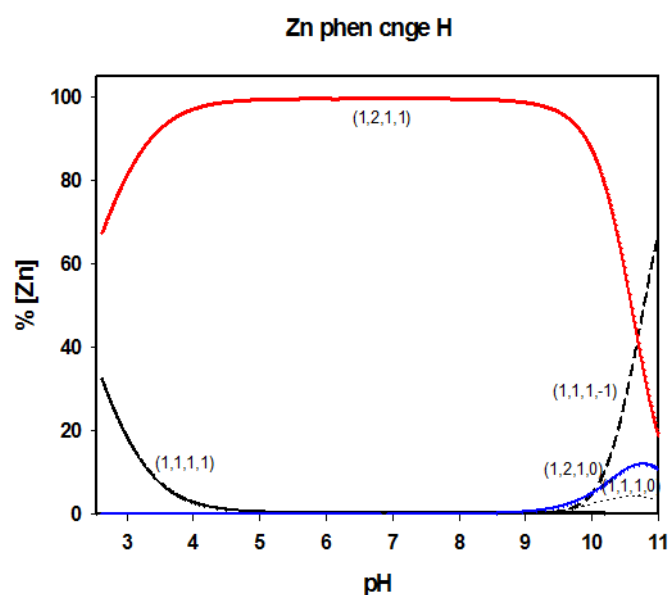
Los valores de las constantes estequiométricas y de estabilidad de los complejos cuaternarios se detallan en la Tabla 6 y en la Figura 8, se muestran los patrones de distribución de especies.

Como se observa, cuando el medio es ácido prevalecen los complejos con una sola molécula de  $cngc$  y una o dos moléculas de  $o$ -fen. La especie cuaternaria  $[ZnA_2LH]^{2+}$  ( $\log\beta_{1211}=37,90$ ) se destaca dominante a valores de pH entre 4 y 9. A medida que el pH se incrementa, se puede observar una pérdida de protones (ya sea a partir de las moléculas de agua coordinadas o de  $cngc$ ) y prevalece la nueva especie  $[ZnAL-H]$ ,  $\log\beta_{111-1}=13,38$ . En las

condiciones experimentales seleccionadas, los porcentajes de las otras especies cuaternarias en el equilibrio son prácticamente insignificantes.

**Tabla 6.** Composición, notación y constantes de formación para el sistema  $Zn^{2+}/o$ -fen(A)/cnge(L)/H<sup>+</sup> (0,150 mol.L<sup>-1</sup> NaCl, 298 K)

Especies (pqrs)	Fórmula	Logβ
0011	LH	11,57
0101	AH	4,96
1100	$[ZnA]^{2+}$	6,40
1200	$[ZnA_2]^{2+}$	12,20
1300	$[ZnA_3]^{2+}$	17,00
1020	$[ZnL_2]$	17,30
1021	$[ZnL_2H]^+$	23,91
1022	$[ZnL_2H_2]^{+2}$	32,31
1211	$[ZnA_2LH]^{+2}$	37,90
1210	$[ZnA_2L]^+$	26,66
1111	$[ZnALH]^{+2}$	32,07
1110	$[ZnAL]^+$	23,08
111-1	$[ZnALH_{-1}]$	13,38



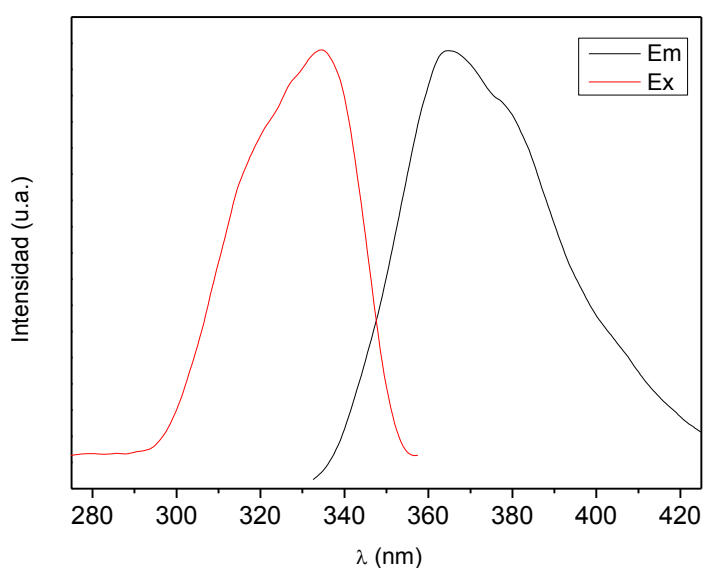
**Figura 8.** Patrones de distribución de especies de los complejos de Zn (II) en el sistema ternario Zn/o-fen(A) / cnge(L) / H<sup>+</sup> en función del pH. Concentraciones totales:  $Zn^{2+}$  0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, o-fen 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>, cnge 1 mmol.L<sup>-1</sup>, 25 °C, I = 0,150 mol.L<sup>-1</sup> (NaCl).

Como puede verse en la Figura 8, la formación de la especie (1,2,1,1), incluso en el rango de concentración utilizado para las determinaciones antibacterianas (1 mmol.L<sup>-1</sup>) permite asegurar que la especie de mayor prevalencia a pH neutro es  $[ZnA_2LH]^+$ .

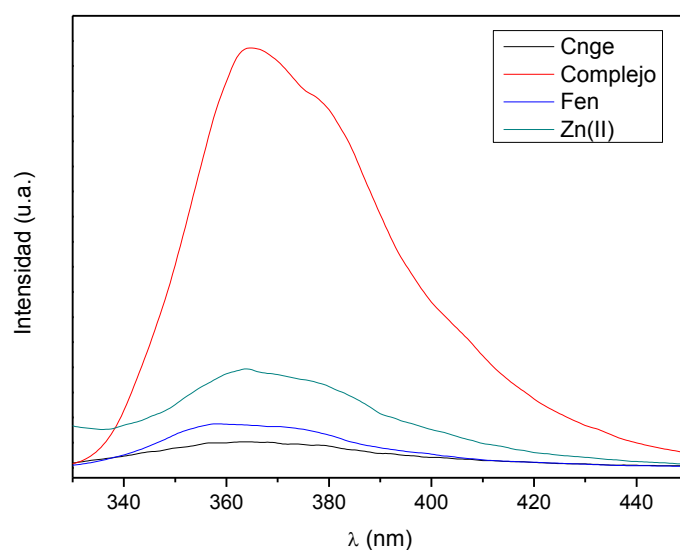
## 5- Propiedades fluorescentes

Los espectros de fluorescencia del complejo de Zn fueron determinados en soluciones de agua/etanol (1/1) para de  $ZnCl_2$ , cnge y el complejo de cinc y para  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de o-fen. Cnge no mostró fluorescencia apreciable. El espectro de o-fen mostró emisiones débiles a 358 y 377 nm ( $\lambda_{ex} = 359 \text{ nm}$ ) que corresponde a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  [47]. El complejo mostró la banda de emisión fluorescente azul con mayor intensidad de a 365, 377 (h) y 405 (h) nm tras fotoexcitación a 334 nm (Figuras 9 y 10).

La mejora de la luminiscencia por complejación se atribuye al aumento de la rigidez del ligando (configuración plana) que se coordina al metal lo cual reduce la pérdida de energía por decaimiento sin radiación. La banda centrada en 365 nm es asignada tentativamente a la fluorescencia intraligando de la o-fen coordinada. Estos resultados son comparables con otra conformación de complejos de Zn (II) que contienen o-fen y otros ligandos, pero deben tenerse en cuenta las diferentes condiciones experimentales empleadas [48].



**Figura 9.** Espectros de emisión y excitación del complejo Zn /cnge /fen en solución de etanol/agua (1/1).



**Figura 10.** Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones etanol/agua (1/1) del complejo de Zn,  $\text{ZnCl}_2$ , cnge ( $1\text{mmol. L}^{-1}$ ) y fen ( $2\text{mmol. L}^{-1}$ ).

Por ejemplo, el espectro de fluorescencia del complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})_2]_n$  muestra una banda ancha de emisión en la región de luz azul (picos máximos de emisión a 400,  $\lambda_{\text{ex}}$  280 nm) [49]. Este espectro se desplaza al rojo en comparación con los espectros de las soluciones acuosas. Estos efectos son atribuidos a las emisiones heterodiméricas y pusieron de manifiesto las fuertes interacciones entre moléculas, generados por el fuerte apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de los anillos aromáticos [50].

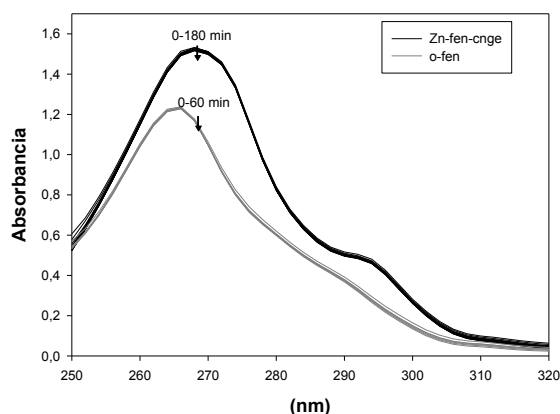
## 6- Estudios de estabilidad del complejo disuelto

Sabiendo que la disociación del ligando del centro lábil del metal podría interferir con las determinaciones experimentales del complejo en solución y para evaluar que en los estudios biológicos *in vitro*, los efectos observados por el complejo disuelto se deben al mismo complejo y no a sus productos de disociación, se llevaron a cabo estudios de estabilidad del complejo de zinc en las mismas condiciones en que se realizan los ensayos toxicológicos y de la actividad antimicrobiana.

Se disolvió el complejo en una mezcla de DMSO:agua (1:1) y se midió espectrofotométricamente (espectroscopía electrónica y de fluorescencia) la variación de los espectros electrónicos de absorción con el tiempo para determinar la estabilidad por un lapso de 15 minutos, que es el tiempo de manipulación antes de ser agregado al medio (agar

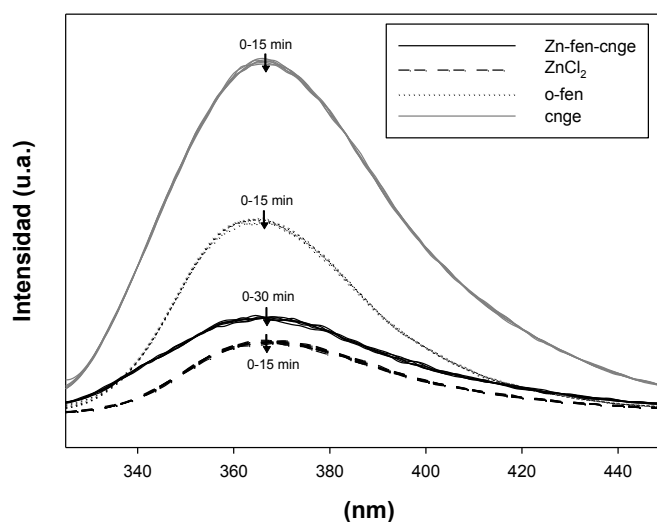


Mueller Hinton termostatzado a 45 °C) y plaqueado; esto en lo concerniente al ensayo de determinación de la actividad antibacteriana. Los espectros UV de o-fen y del complejo ternario con Zn dan como resultado las curvas que se muestran en la Figura 11. El ligando es estable durante al menos 1 h y el complejo es estable durante las 3 h de las determinaciones espectroscópicas.



**Figura 11.** Variación en el tiempo de los espectros electrónicos de o-fenantrolina ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) y  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en agua:DMSO (1:1 v/v).

Los espectros de fluorescencia del complejo y sus componentes en diferentes momentos se muestran en la Figura 12. El complejo disuelto se mantuvo estable durante 15 min siendo la única especie que puede contribuir a los ensayos antimicrobianos.



**Figura 12.** Variación del espectro de fluorescencia en el tiempo de una solución de agua:DMSO (1:1 v/v) de  $\text{ZnCl}_2$ ,  $[\text{Zn}(\text{fen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{cnge}$  ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) y de o-fen ( $2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Longitudes de onda de excitación: 288 nm, 320 nm, 300 nm, and 316 nm, respectivamente.

Por otro lado se determinó, con la misma técnica, la estabilidad del complejo en agua destilada y agua de mar artificial durante 30 minutos que es el tiempo de manipulación del sólido disuelto antes de ser empleado en los ensayos toxicológico y de determinación de la actividad antifúngica. Para ello, se trabajó con soluciones de  $2,5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> del complejo en agua destilada y en agua de mar artificial. Los espectros electrónicos de absorción no mostraron variación en al menos dos horas, por lo que se demuestra que las soluciones se mantuvieron estables durante al menos en ese período siendo el complejo de zinc la única especie que contribuye a la actividad detectada en los ensayos biológicos. La presencia de la misma especie bioactiva en todos los solventes probados (agua destilada, agua de mar artificial y H<sub>2</sub>O:DMSO) permite asegurar que el complejo no sufre descomposición durante el tiempo de manipulación de las soluciones en los ensayos biológicos mencionados. La especie dominante en el intervalo de pH 4-9 [34] corresponde al complejo  $[Zn(fen)_2(cnge)H]^{2+}$  de acuerdo con el patrón de distribución de especies.

## 7- Ensayos Biológicos

### 7.1. Determinación de la actividad antibacteriana

Los datos espectrales (FT-IR, Raman, y fluorescencia) y los estudios de especiación concuerdan con la estructura encontrada en el estado sólido y la que se propone existiría en solución. Se llevaron a cabo estudios para evaluar los cambios en la CIM (concentración inhibitoria mínima) del complejo comparando con los ligandos y el metal frente a cinco cepas bacterianas. La actividad antibacteriana de cinc mejora con la complejación en tres de las cepas bacterianas utilizadas. Para la determinación de la actividad antibacteriana de los complejos estudiados se emplearon como indicadores las siguientes cepas de bacterias derivadas de las *American Type Culture Collections* (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12263) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). El medio de cultivo empleado en estas determinaciones fue el que forma parte de las condiciones estándar de este tipo de ensayo, agar Mueller Hinton (AMH) y caldo Mueller Hinton (CMH) [51]. Cada inóculo bacteriano fue preparado suspendiendo de tres a cinco colonias del microorganismo en cuestión en 5 ml de caldo de Mueller Hinton estéril e incubando a 37 °C durante al menos 8 horas. Este inóculo primario se utiliza para preparar el inóculo cuya turbidez se ajusta al estándar 0,5 de la escala de McFarland que equivale a una concentración de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>) en solución fisiológica calidad endovenosa

(NaCl al 0,85%). Estos cultivos fueron luego diluidos (1:10) en solución salina dando una concentración bacteriana de  $1.10^{-7}$  UFC.mL<sup>-1</sup> [52, 53].

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó por el método de dilución en agar. El complejo se disolvió en DMSO acuoso al 50% a una concentración final de 66,9 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir de la solución madre de los potenciales agentes antimicrobianos se prepararon diluciones dobles seriadas acuosas de concentraciones que van desde 0,2 a 60 mg.mL<sup>-1</sup>. Para la sal de cinc y o-fen se realizaron soluciones acuosas (120 mg.mL<sup>-1</sup>) y a partir de éstas se obtuvieron diluciones doble seriadas, como para el complejo, cuyas concentraciones variaban de 7,3 a 120 mg.mL<sup>-1</sup>. Todas las soluciones mencionadas fueron esterilizadas por filtración. Por cada placa de 45 mm de diámetro se dosificaron 4,5 mL de los medios de cultivo agarizados, los cuales fueron esterilizados y termostatizados a 45 °C y a cada uno se le adicionaron 0,5 mL de cada dilución de la solución antimicrobiana completando un volumen total de 5 mL por placa. Este medio fundido fue plaqueado en ambiente estéril garantizado por la cabina de seguridad biológica clase II tipo A2. Una placa de agar con 5 mL de medio de cultivo fundido y sin agente antibacteriano se estableció como control de crecimiento y esterilidad. Tanto las diluciones como las placas fueron acondicionadas el mismo día del ensayo. Una vez solidificado el medio, cada placa fue inoculada con 2 µL de sendas suspensiones bacterianas conteniendo  $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> del germen en cuestión y fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en ambiente aeróbico. Todas las determinaciones se repitieron hasta coincidir con el rango de inhibición y posteriormente se repitió el ensayo dos veces más. La inhibición de crecimiento bacteriano fue juzgada por comparación con el crecimiento en la placa control definiéndose la CIM como la dilución más baja del complejo, sal metálica y ligando o-fen que inhibe visiblemente el crecimiento del organismo indicador. Así, cuando se observó una colonia tenue o sólo una neblina leve en el lugar de instilación del inóculo, éste fue considerado como ausencia de crecimiento [52, 54]. No se ensayaron las cepas bacterianas frente a cng libre ya que anteriormente se determinó que las mismas no eran susceptibles a este ligando. La CIM del metal, del ligando o-fen y del complejo se muestran en la Tabla 7. En el Capítulo de cobre se reportaron los diámetros de la zona de inhibición en mm para o-fen.

Se sabe que el cinc (II) es esencial en todos los sistemas biológicos, desde los microorganismos hasta los mamíferos en general cumpliendo funciones biológicas importantes como constituyente de metaloenzimas y contribuyendo a la estabilización de la membrana, entre otras. En especial es esencial para el crecimiento bacteriano óptimo de la mayoría de los microorganismos *in vitro* en concentraciones que varían de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M (moles.l<sup>-1</sup>), sin embargo, a elevadas concentraciones puede resultar tóxico.

**Tabla 7.** Valores de CIMs en mg.mL<sup>-1</sup>

Agente atm	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Zn/cnge/o-fen	47	94	94	3000	6000
ZnCl <sub>2</sub>	188	188	188	1500	1500
o-fen	12	24	12	94	375

En la tabla podemos observar que concentraciones de 0,8 a 6 mmol. L<sup>-1</sup> de ZnCl<sub>2</sub> pueden inhibir el crecimiento bacteriano. Esto concuerda con otros trabajos que dan cuenta de concentraciones milimolares de ZnCl<sub>2</sub> son requeridas para producir inhibición del crecimiento bacteriano frente a *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* [55] y *P. aeruginosa* [56]. El ligando libre o-fen muestra los valores más bajos de CIM contra todas las cepas probadas, como era de esperar [10, 11]. La complejación con Zn muestra una caída de la actividad antimicrobiana de o-fen y una mejora de la misma con respecto a la del metal en *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. En las otras dos cepas, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, la susceptibilidad se manifiesta a las concentraciones más altas tanto del metal como del complejo. Sin embargo, éste último efecto no reviste importancia ya que mediciones de CIM con valores superiores a 1.000 mg.mL<sup>-1</sup> son consideradas irrelevantes desde una perspectiva clínica [57, 58].

## 7.2. Determinación de la actividad antifúngica

El perfil antifúngico del metal (ZnCl<sub>2</sub>), los ligandos (cnge y o-fen) y el complejo se han medido frente a siete cepas fúngicas por dos técnicas microbiológicas diferentes: difusión en agar y dilución en agar. Las cepas utilizadas como indicadores biológicos fueron: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 10231, y los aislados clínicos de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*. El caldo Mueller Hinton (MH) y el Agar Mueller Hinton (MHA) se utilizaron como medios de cultivo. Cada inóculo de las cepas fúngicas se preparó a partir de un cultivo en caldo de 18 h que luego fue ajustado a la turbidez del 0,5 de McFarland para dar una suspensión de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC).mL<sup>-1</sup> [59, 60]. Para el método de difusión en agar, el complejo de zinc se disolvió en una mezcla de H<sub>2</sub>O: DMSO en partes iguales mientras que tanto el metal como los ligandos libres se disolvieron en agua destilada a una concentración final de 250 mmol.L<sup>-1</sup>. Para el método de dilución en agar, todas las especies se disolvieron en agua destilada a una concentración final de 15 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir de las soluciones madres se practicaron diluciones dobles seriadas en agua para dar concentraciones de 14,65 a 1.500 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 7.2.1. Método de difusión en agar

En primer lugar se realizó un *screening* (barrido) del complejo, los ligandos y el metal frente a las cepas de *Candida sp* mencionadas, para detectar actividad inhibidora. Las suspensiones fúngicas fueron distribuidas uniformemente sobre la superficie estéril de placas de Petri que contienen MHA usando hisopos de algodón estériles. Los discos blanco estériles de 6 mm de diámetro se impregnaron asépticamente con 8  $\mu$ L de las soluciones estériles de cada especie química a ensayar. El complejo de zinc se ensayó a una concentración de 1,34 mg/disco y el ligando o-fen a 0,4 mg/disco. Los discos impregnados fueron aplicados sobre la superficie previamente inoculada antes de transcurrir 15 minutos. Uno de los discos se impregnó con una mezcla de H<sub>2</sub>O: DMSO (1:1) y se utilizó como control negativo. Como referencia estándar se utilizó un disco con 0,04 mg de fluconazol. Las placas se incubaron invertidas en aerobiosis a 37 °C durante 48 h. Los valores reportados de los diámetros (mm) de zonas de inhibición son el promedio de al menos tres ensayos independientes [59, 60].

Los resultados de este análisis (Tabla 8) confirmaron la actividad antimicrobiana del ligando o-fen y mostraron un efecto similar del complejo de zinc contra todas las cepas ensayadas. El metal y el ligando cnge no manifestaron halos de inhibición a las concentraciones ensayadas, lo que sugiere ausencia de actividad antimicótica para éstos. Se observó el siguiente orden decreciente de la zona de inhibición para el complejo de zinc: *C. parapsilosis* > *C. tropicalis* > *C. albicans* ATCC > *C. glabrata* > *C. krusei* > *C. parapsilosis* ATCC > *C. albicans*. Esto concuerda con valores informados en la literatura con respecto a la actividad antifúngica de varios complejos de Zn (II) contra diferentes cepas de *Candida* [14, 61, 15]: Un orden *C. parapsilosis* > *C. tropicalis* > *C. albicans* para el complejo [Zn (NAL)<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (NAL: N-fenil-3-piridincarboxamida) y *C. glabrata* > *C. albicans* para el complejo [ZnCl<sub>2</sub> (3TTSCH)<sub>2</sub>] (3TTSCH: 3-tiofeno tiosemicarbazona aldehído), respectivamente. Además, los halos fueron más grandes que los halos reportados para una serie de complejos de zinc haluro/pseudohaluro de una base de Schiff, ligando bidentado frente a *C. albicans* [15].

**Tabla 8.** Estudio preliminar del perfil antimicrobiano de o-fen, el complejo de zinc y fluconazol como control positivo frente a las cepas fúngicas. Los diámetros de las zonas de inhibición en mm. [Fen]: 0,40 mg/disco; [complejo de zinc]: 1,34 mg/disco y [fluconazol]: 0,04 mg/disco.

	Fen	Complejo	Fluconazol
<i>C. albicans</i>	59,3 ± 1,1	13,7 ± 0,6	43,6 ± 1,5
<i>C. albicans</i> ATCC	56,7 ± 2,9	52,7 ± 2,5	48,7 ± 1,5
<i>C. parapsilosis</i>	56,7 ± 5,8	59,3 ± 1,1	50,7 ± 1,1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	58,3 ± 1,5	44,7 ± 2,5	39,6 ± 2
<i>C. tropicalis</i>	43,3 ± 1,1	55 ± 5	49 ± 1
<i>C. glabrata</i>	44,7 ± 8	48,3 ± 3,5	36,3 ± 1,5
<i>C. krusei</i>	49,3 ± 1,1	48 ± 2	15 ± 1

### 7.2.2. Método de dilución en agar

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada por este método. Se prepararon sendas series de diluciones dobles seriadas de los compuestos ensayados en agua. Se tomaron 0,5 ml de cada dilución y fueron añadidos a 4,5 ml de MHA fundido que posteriormente fue vertido en placas de Petri de 45 mm de diámetro. El rango de concentraciones fue de 1,46 a 1.500 mg.mL<sup>-1</sup>. Además se contó con una placa con agar sin el agente antimicrobiano como control de la esterilidad y de crecimiento de las cepas ensayadas. Cuando el agar vertido en las placas solidificó, se inoculó la superficie con 2 µL de las suspensiones fúngicas y luego de unos minutos, fueron invertidas e incubadas en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 48 h. Transcurrido ese lapso, se interpretan los resultados comparando la inhibición del crecimiento microbiano con el crecimiento en las placas de control. La MIC se define como la concentración más baja del complejo que inhibe el crecimiento visible del microorganismo ensayado. Cuando en el lugar de inoculación se observó sólo una leve turbidez distinta a la colonia de la placa control, se consideró como inhibición del crecimiento. Cada ensayo de MIC fue medido por triplicado [34, 59, 60, 62]. Así se determinan los valores de MIC de cada compuesto para cada cepa. En la Tabla 9 pueden observarse los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) de ZnCl<sub>2</sub>, o-fen, el complejo de zinc y fluconazol como control positivo. La determinación *in vitro* de actividades antimicrobianas con valores de MIC ≥ 1000 mg.mL<sup>-1</sup> son consideradas sin relevancia desde una perspectiva clínica [60, 62]. Así, la actividad antifúngica de cnge contra todas las cepas ensayadas (MIC > 1500 mg.mL<sup>-1</sup>) y la actividad antifúngica del metal frente a *C. albicans*, *C. albicans* ATCC, *C. glabrata* y *C. krusei* (MIC = 1500 mg.mL<sup>-1</sup>) fueron consideradas irrelevantes. La actividad antifúngica del metal contra *C. parapsilosis*, *C. parapsilosis* ATCC y *C. tropicalis* fue baja (MIC = 750 mg.mL<sup>-1</sup>). Estos resultados coinciden con los observados en la selección preliminar. El ligando fen y sus derivados (incluyendo sus complejos metálicos) son de gran interés ya que manifiestan propiedades biológicas importantes contra el cáncer y las infecciones causadas por virus, bacterias y hongos [12]. Los valores de CIM del ligando o-fen libre contra *C. albicans*, *C. albicans* ATCC y *C. krusei* fueron inferiores a los del complejo de zinc. Estos resultados fueron consistentes con lo observado en la difusión en agar. Estos datos concuerdan con los valores reportados para el ligando o-fen con otras cepas fúngicas [60]. Como se puede ver en la Tabla 9, la complejación aumentó la actividad antifúngica del metal para todas las cepas ensayadas y disminuyó con respecto a la o-fen libre sólo frente a *C. albicans*, *C. albicans* ATCC y *C. krusei* pero mantuvo la misma actividad antifúngica frente a las

otras cepas. El hallazgo más destacado fue que el complejo de zinc mostró una mayor actividad (valores de MIC más bajos) que el fármaco fluconazol frente a *C. albicans*, *C. albicans* ATCC, *C. glabrata* y *C. krusei*. Este complejo de zinc manifiesta mejor actividad antifúngica que otros complejos de Zn(II) contra cepas similares de *Candida*. [10, 60, 63, 64].

**Tabla 9.** Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de ZnCl<sub>2</sub>, Fen, el complejo de zinc y el Fluconazol como control positivo frente a las cepas seleccionadas. Valores de CIM en mg.L<sup>-1</sup>

	ZnCl <sub>2</sub>	Fen	Complejo de Zn	Fluconazol
<i>C. albicans</i>	1500	3	6	>375
<i>C. albicans</i> ATCC	1500	3	6	>375
<i>C. parapsilosis</i>	750	12	12	3
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	750	12	12	6
<i>C. tropicalis</i>	750	12	12	1,5
<i>C. glabrata</i>	1500	6	6	47
<i>C. krusei</i>	1500	6	12	47

### 7.2.3. Análisis del efecto post-antifúngico (PAFE)

El efecto postantifúngico (PAFE) es el período de tiempo de inhibición del crecimiento de hongos después de la acción del agente antifúngico y una vez que éste se ha retirado. Este período puede ser también una medida del crecimiento tardío de hongos después de un corto período de exposición al agente antifúngico. La determinación de CIM es un ensayo muy importante para medir la susceptibilidad de algunos microorganismos frente a los agentes antimicrobianos, pero no proporciona información acerca de la actividad del fármaco en el tiempo. En este contexto, la determinación de PAFE se considera relevante para establecer la posible modificación de este parámetro farmacodinámico del ión metálico y los ligandos frente a la formación de complejos. La determinación de PAFE debe ser tomada en cuenta en el diseño de los regímenes de dosificación antifúngicos y se recomienda su determinación en la evaluación preclínica de todos los nuevos agentes antimicrobianos [60, 65].

Mediante un método espectrofotométrico se realizó un estudio *in vitro* para investigar los PAFES correspondientes. En primer lugar se inocularon 100 µL de una suspensión fúngica ajustada al estándar 0,5 de la escala de McFarland en tubos de microcentrífuga conteniendo 900 µl de caldo MH con una cantidad del compuesto antimicrobiano que representa el doble del valor hallado de CIM (2 CIM). Cada ensayo incluyó además un control del crecimiento con el inóculo pero sin los compuestos antimicrobianos. Posteriormente los tubos inoculados fueron mantenidos a 37 °C en un baño termostático durante 1 h y luego se procedió a la eliminación del antimicrobiano por dilución (1: 1000) en un medio de cultivo libre de

antimicrobiano y a la misma temperatura. Estos sistemas fueron incubados a 37°C y se fueron leyendo los valores de transmitancia (670 nm) a intervalos de tiempo de 5 minutos. Se consideró que había crecimiento cuando la lectura de transmitancia disminuyó un 5%. La duración de PAFE se calculó utilizando la fórmula  $PAFE = T - C$ , donde T es el tiempo necesario para una disminución del 5% de la transmitancia en los tubos que fueron expuestos al antimicrobiano y C, el tiempo necesario para una disminución del 5% de la transmitancia del mismo inóculo en el control. Cada medición PAFE se llevó a cabo por duplicado [61, 65].

En la Tabla 10 se pueden observar los resultados de las medidas de los PAFES. Valores de PAFE de 20 minutos o menos fueron considerados insignificantes debido a las limitaciones del ensayo y en este caso se le asignó un valor de 0 (cero) [65]. Los efectos posantifúngicos del metal y del ligando cng libre no se determinaron porque mostraron una actividad antifúngica muy baja frente a todas las cepas y es necesario conocer los valores de CIM como paso preliminar a la determinación de los PAFES.

Como puede observarse las concentraciones de 2 CIM del ligando o-fen arrojaron valores medibles de PAFES sobre *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* ATCC, *C. parapsilosis*, en ese orden decreciente. Para el complejo de zinc, el orden de PAFES observado fue *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. albicans* ATCC > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* ATCC > *C. albicans*. Es interesante destacar que el complejo exhibió PAFES más largos que el ligando o-fen en todos los casos excepto con las cepas en las que el efecto posantifúngico estuvo ausente (*C. parapsilosis*).

**Tabla 10.** Efecto post-antifúngico (PAFE) del ligando o-fen y del complejo de zinc. Los valores de PAFE se expresan en h. Los valores de nistatina [66] y la anfotericina B [67, 68] se han incluido a efectos comparativos.

	Fen	Complejo de zinc	Nistatina o
<i>C. albicans</i>	0 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.07	6.85 <sup>b</sup> >12 <sup>c</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC	2.15 ± 0.49	2.35 ± 0.49	0,80 <sup>d</sup>
<i>C. parapsilosis</i>	1.75 ± 0.35	0	15,17 <sup>b</sup>
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	0 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.35	
<i>C. tropicalis</i>	0 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.21	12,73 <sup>b</sup>
<i>C. glabrata</i>	2.90 ± 0.14	3.80 ± 0.28	8,51 <sup>b</sup>
<i>C. krusei</i>	2.75 ± 0.35	5.85 ± 0.21	11,58 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> PAFES determinados a 2 CIM [60].

<sup>b</sup> PAFES de Nistatina determinados a 1 CIM [66].

<sup>c</sup> PAFE de Anfotericina B determinados a 2 CIM [68].

<sup>d</sup> PAFE of Anfotericina B determinados a 1 CIM [67].

La teoría de la quelación de Tweedy postula que la formación de complejos reduce la polaridad del metal debido a que comparte parcialmente su carga positiva con el ligando y



además aumenta la deslocalización de electrones  $\pi$  en todo el quelato y el complejo resulta más lipofílico [69,70]. Esto explica los PAFEs mejorados de los complejos en comparación con el ligando libre, ya que el incremento de la lipofilia permitiría que el complejo pudiera permanecer más tiempo en los componentes lipídicos de la membrana celular bacteriana. Los valores de PAFEs mejorados por formación de complejos son relevantes desde una perspectiva clínica en el diseño de regímenes de dosificación del compuesto antifúngico prolongando los intervalos de dosificación más allá del tiempo en el que las concentraciones caen por debajo de la CIM [65].

No se encontraron valores de PAFE para otros complejos de zinc, por lo que se han realizado comparaciones con valores determinados en condiciones experimentales similares para Nistatina [41] la anfotericina B, agentes antifúngicos convencionales [67, 68] (Tabla 10) y como puede observarse, el complejo de Zn manifestó PAFEs más largos frente a *C. albicans* ATCC. Por otro lado, la 5-fluorocitosina presenta PAFEs medibles frente a *C. albicans* [66, 67], mientras que el Fluconazol no produce PAFEs relevantes sobre esta cepa [66, 67]. Ketoconazol ejerció un PAFE medible sobre *C. albicans* en valores de 4 CIM [66], pero no en *C. albicans* ATCC a valores de 1 MIC [68]. El PAFE del complejo de zinc para *C. albicans* y *C. albicans* ATCC resultó similar al de la 5-fluorocitosina en valores de 1 MIC [67], pero inferior a los valores mayor que 2 MIC [66, 67]. Además, los valores reportados para PAFEs el complejo [Cu(o-fen)(cnge)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] [60] habían resultado mayores para *C. albicans* y *C. parapsilosis* ATCC que este complejo de zinc, pero no para *C. tropicalis*.

La formación de complejos con el zinc, entonces, aumentó los valores de PAFEs del ligando o-fenantrolina incluso con mejor *performance* que la de algunos agentes antifúngicos que se encuentran en el mercado.

## Conclusiones

La interacción de o-fen y cnge con Zn(II) produjo un complejo de coordinación con entorno ZnN<sub>5</sub>O. La longitud del enlace N-C de cnge coordinada, fue determinada por estudios de Rayos-X, de FTIR y por determinaciones de cálculos teóricos y resultó ser más larga por coordinación desplazándose sus modos vibracionales al rojo. Las medidas de fluorescencia muestran una mayor rigidez del ligando o-fen luego de la coordinación. Los estudios de especiación permitieron demostrar cuál es la especie activa en condiciones fisiológicas ([ZnA<sub>2</sub>LH]<sup>2+</sup>) la cual permanece estable cuando se disuelve el complejo sólido en diferentes solventes (al menos durante el tiempo de manipulación de los ensayos biológicos). La

formación de complejos de coordinación con ligandos conteniendo bases nitrogenadas permite mejorar la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y la antifúngica del metal y del ligando cianoguanidina. Tanto el ligando o-fen como el complejo mostraron mayor actividad que el fármaco fluconazol contra *C. albicans*, *C. albicans* ATCC, *C. glabrata* and *C. krusei* y además la complejación incrementó los PAFEs en todos los casos menos para *C. parapsilosis*, siendo esta actividad más larga que para otros fármacos convencionales. Evidentemente, la actividad biológica se relaciona a la presencia de o-fenantrolina, cuyo conocido mecanismo de inhibición está basado en la interacción con la molécula de ADN.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Prasad A. J. Am. Coll. Nutr. (1996) 2: 113-120
- 2- Prasad A. Nutrition (1995) 11: 93-99
- 3- May P, Linder P, Williams D. J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1977) 588-595.
- 4- Batsanov A, Hubberstey P, Russell C, Waltin P, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1997) 2667-2672
- 5- Bailey P, S. Pace. Coord. Chem. Rev. (2001) 214:91-141
- 6- Pickardt J, B. Kuhn. Z. Kristallogr. (1995) 11: 901-901
- 7- Martins L, Fraústo da Silva J, Pombeiro A, Henderson R, Evans D, Benetollo F, Bombieri G, Michelin R, Inorg. Chim. Acta (1999) 291:39-48
- 8- Sheludyakova L, The Late E. Sobolev V, Arbuznikov A, Burgina E, Kozhevina L. J. Chem. Soc., Faraday Trans. (1997) 93:1357-1360
- 9- Bencini A, Lippolis V. Coordination Chemistry Reviews (2010) 254: 2096-2180
- 10- Kalia S, Kaushal G, Kumar M, Cameotra S, Sharma A, Verma M, Kanwar S, Braz. J. Microbiol. (2009) 40:916-922
- 11- Agwara M, NdifonP, NdosiriN, Paboudam A, Yufanyi D, Mohamadou A. Bull. Chem. Soc. Ethiop. (2010) 24:383-389
- 12- Zoroddu M, Zanetti S, Pogni R, Basosi R, J. Inorg. Biochem. (1996) 63:291-300
- 13- Pasquet J, Chevalier Y, PelletierJ, Couval E, Bouvier , Bolzinger M, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. (2014) 457:263-274
- 14- Raja Balan A, Ashok R, Vasanthi M, Prabu R, Paulraj A. Inorg. Chim. Acta (2013) 408:103-108
- 15- Montazerzohori M, Zahedi S, Naghiha A, Montazer Zohour M. Mater. Sci. Eng. C (2014) 35:195-204
- 16- Holló B, Magyari J, Zivkovic-Radovancic V, Vuckovic G, Tomic Z, Miklós Szilágyi I, Pokol G, Mészáros Szécsényi K. Polyhedron (2014) 80:142-150
- 17- Ferrer E, López Tévez L, Baeza N, Correa M, Okulik N, Lezama L, Rojo T, Castellano E, Piro O, Williams P. J. Inorg. Biochem. (2007) 101:741-749
- 18- López Tévez L, Martínez Medina J, Islas M, Piro O, Castellano E, Bruzzone L, Ferrer G, Williams P. J. Coord. Chem. (2011) 64:3560-3574
- 19- Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 4th. ed, John Wiley , New York (1986)
- 20- Enraf-Nonius (1997-2000). COLLECT. Nonius BV, Delft, The Netherlands
- 21- Otwinowski Z, Minor W. in Methods in Enzymology, 276, edited by C.W. Carter, Jr., R. M. Sweet pp. 307-326, New York: Academic Press, (1997)
- 22- Sheldrick G. SHELXS-97. Program for Crystal Structure Resolution. University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997. See also: Sheldrick GM, Acta Crystallogr. (1990) A 46:467-473
- 23- Sheldrick G. SHELXL-97. Program for Crystal Structures Analysis. University of Göttingen: Göttingen, Germany 1997. See also: Sheldrick GM, Acta Crystallogr. (2008) A 64:112-122
- 24- Van der Sluis P, Spek A. Acta Crystallogr. (1999) A 46:194-201
- 25- Spek A. PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands (1998)
- 26- Parr R, Yang W. Density Functional Theory of Atoms, Molecules, Oxford University Press, Clarendon Press, Oxford; New York (1989)
- 27- Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, ScalmaniG, Barone V, Mennucci B, Petersson G, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian H, Izmaylov A, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg J,

- Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery J Jr., Peralta J, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd J, Brothers E, Kudin K, Staroverov V, Keith T, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant J, Iyengar S, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam J, Klene M, Knox J, Cross J, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann R, Yazyev O, Austin A, Cammi R, Pomelli C, Ochterski J, Martin R, Morokuma K, Zakrzewski V, Voth G, Salvador P, Dannenberg J, Dapprich S, Daniels A, Farkas O, Foresman J, Ortiz J, Cioslowski J, Fox D, Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc, Wallingford CT (2010)
- 28- Becke A. J. Chem. Phys. (1993) 98:5648-5652
- 29- Rappoport D, Furche F. J. Chem. Phys. (2010) 133:134105/1-134105/11
- 30- Arbuznikov A, Sheludyakova L, Burgina E. Chem. Phys. Lett. (1995) 240:239-244
- 31- Islas M, Franca C, Etcheverry S, Ferrer E, Williams P. Vib. Spectrosc. (2012) 62:143-151
- 32- Flower D. J. Mol. Graph. Modell. (1999) 17:238-244
- 33- Gans J, Shalloway D. J. Mol. Graph. Modell. (2001) 19:557-559
- 34- López Tévez L, Islas M, Martínez Medina J, Díez M, Piro O, Castellano E, Ferrer E, Williams P. J. Coord. Chem. (2012) 65:2304–2318
- 35- Alía J, Edwards H, García Navarro F. J. Mol. Struct. (2001) 597:49-55
- 36- Martell A, Matekaitis R. Determination and use of stability constants. VCH Publishers, Inc. USA (1992)
- 37- Ebdon L, Pitts L, Cornelis R, Crews H, Donard O. Quevauviller, Ph. Eds. Trace element speciation for environment, food and health". The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (2001)
- 38- Chruscinska E, Garribba E, Micera G, Panzanelli A. J. Inorg. Biochem. (1999) 75:225-232
- 39- Garribba E, Lodyga-Chruscinska E, Sanna D, Micera G. Inorg. Chim. Acta (2001) 322:87-98
- 40- Matekaitis, R J, Martell, A E. Can. J. Chem. (1982) 60:168-173
- 41- Matekaitis, R J, Martell, A. E. Can. J. Chem. (1982) 60:2403-2409
- 42- Gran G. Analyst (1952) 77: 661-671
- 43- Scharff J, Páris M, Bull. Soc. Chim. Fr. (1967) 5:1782-1788
- 44- Banks C, Bystroff R. J. Amer. Chem. Soc. (1959) 81:6153-6158
- 45- Martell A, Matekaitis R. Determination and use of stability constants. VCH Publishers, Inc. USA, (1992)
- 46- Fahsell M, Banks C. J. Amer. Chem. Soc. (1966) 88:878-884
- 47- Shi X, Zhu G, Fang Q, Wu G, Tian G, Wang R, Zhang D, Xue M, Qiu S. Eur. J. Inorg. Chem. (2004) 1:185-191
- 48- Carballo R, Covelo B, Lodeiro C, Vázquez-López E. Cryst. Eng. Comm. (2005) 7: 294-296
- 49- Hu X, Guo J, Liu C, Zen H, Wang Y, Du W. Inorg. Chim. Acta (2009) 362: 3421-3426
- 50- Guo W, Peng Z, Li , Zhou Y. Polyhedron, (2004) 23: 1701-1707
- 51- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Mozina S, J. Microbiol. Methods (2010) 81:121-126
- 52- Koru O, Ozyurt M, Anaerobe (2008) 14:161–165
- 53- Smith C, Foleno B, Barrett, Fresco M, Diagn. Micr. Infec. Dis. (1997) 27:85-92
- 54- Fang M, Hua Chen J, Li Xu X, Hong Yang P, Hildebrand H. Int. J. Antimicrob. Agents, (2006) 27:513-517
- 55- Atmaca S, Gul K, Cicek R. Tr. J. Med. Sci. (1998) 28:595-597
- 56- Fettouhi M, Wazeer M, Isab A. J. Coord. Chem. (2007) 60:369-377

- 57- Tanaka J, da Silva C, de Oliveira A, Nakamura C, Dias Filho B, Braz. J. Med. Biol. Res. (2006) 39:387-391
- 58- Aliero A, Ibrahim A, in: Y. Kumar (Ed.), Salmonella: A Diversified Superbug, In Tech, Open Access Company, Croatia, Europe (2012)1-26
- 59- Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi C, J. Ethnopharmacol. (2007) 112:426-429
- 60- Martínez Medina J, Islas M, Lopez Tevez L, Ferrer E, OkulikN, Williams P. J. Mol. Struct. (2014) 1058:298-307
- 61- Alomar K, Landreau A, Kempf M, Khan M, Allain M, Bouet G. J. Inorg. Biochem. (2010) 104:397-404
- 62- Aliero A, Ibrahim A, Antibiotic resistance and the prospects of medicinal plants in the treatment of Salmonellosis, in: Y. Kumar (Ed.), Salmonella: a Diversified Superbug, In Tech, Open Access Company, Croatia, Europe (2012) 65-90 (Chapter 4).
- 63- Kumar V, Ahamad T, Nishat N. Eur. J. Med. Chem. (2009) 44:785-793
- 64- Cobeljic B, Pevec A, Turel I, Swart M, Mitic D, Milenkovi M, Markovi I, Jovanovi M, Sladic D, Jeremic M, Andelkovic K. Inorg. Chim. Acta (2013) 404:5-12
- 65- Rescott D, Nix D, Holden P, Schentag J, Antimicrob. Agents Chemother. (1988) 32:450-453
- 66- Ellepola A, Samaranyake L. J. Oral Pathol. Med. (1999) 28:112-116
- 67- García M, Llorente M, Mínguez F, Prieto J. J. Infect. (2002) 45:263-267
- 68- Ernst E, Klepser M, Pfaller M. Antimicrob. Agents Chemother. (2000) 44:1108-1111
- 69- Chandraleka S, Ramya K, Chandramohan G, Dhanasekaran D, Priyadharshini A, Panneerselvam A. J. Saudi Chem. Soc. (2011) 18:953-962
- 70- Patel M, Dosi P, Bhatt B, Thakkar V, Spectrochim. Acta Part A (2011) 78:763–770

## Capítulo 4

### COMPLEJOS DE Cd CON CIANOguanidina Y FENANTROLINA

#### 1- Introducción

La complejación de cadmio con ligandos que imitan compuestos de origen natural podría ser una nueva y útil herramienta terapéutica para el tratamiento de tumores malignos. El cadmio fue designado como un carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer: IARC) debido a la conocida toxicidad que presenta [1, 2]. Sin embargo, se ha demostrado que la toxicidad del cadmio puede ser modulada por complejación. Por ejemplo, los complejos de Cd(II) con 1,10-fenantrolina interactúan fuertemente con el ADN celular y la afinidad de la unión con las bases nucleicas disminuye en presencia de agentes quelantes como el conocido ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el ácido cítrico [3], los complejos de nucleótidos acíclicos con Cd(II) son activos contra varios virus [4], los complejos de Cd(II) que contiene un centro de Cd-N<sub>6</sub> muestran una significativa actividad inhibitoria sobre células de glioma [5] y algunos compuestos derivados de cadmio con tiocarbodiazonas se comportan como agentes citotóxicos capaces de mejorar la actividad antitumoral en aquellos tumores que son resistentes al tratamiento con cisplatino [6].

En este capítulo se presenta la obtención y caracterización fisicoquímica del complejo formado entre Cd, cnge y o-fen. Dado que la formación en medio acuoso de las diferentes especies presentes en solución constituye un modelo aceptable para estudiar el efecto de *incorporación y captación* de un catión con propiedades tóxicas en los organismos vivos, se determinó la especiación en solución y los efectos antibacterianos y antifúngicos del complejo y del metal y se comparó con el efecto determinado para los ligandos. Asimismo, se realizaron los estudios teóricos estructurales y vibracionales del complejo sólido obtenido.

#### 2- Síntesis del complejo de Cd/cnge/fen.

##### 2.1. Preparativa

El complejo  $[Cd(fen)_2(SO_4)(H_2O)](cnge).5H_2O$  fue sintetizado a partir de una solución acuosa de  $CdSO_4 \cdot 8H_2O$  (1mmol), a la que se le fueron agregando volúmenes de solución etanólica de o-fen y de solución acuosa de cnge en una proporción 1:2:1. El pH se elevó a 10 usando solución acuosa de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Inmediatamente se pudo observar la formación de un precipitado blanco que enseguida fue desechado. La solución madre se dejó evaporar a

temperatura ambiente y así, después de una semana, se obtuvieron cristales adecuados para el estudio cristalográfico. Los cristales se lavaron con agua y se secaron al aire. Anal. Calc. para  $C_{26}H_{32}N_8SO_{10}Cd$  (%): C: 41,1; H: 4,2; N: 14,7. Exp.: C: 41,2; H: 4,1; N: 14,7

## 2.2. Estudio estructural del complejo

Las mediciones se realizaron en un difractor Enraf-Nonius Kappa-CCD con radiación de grafito monocromado Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). Los datos de difracción a baja temperatura se calcularon ( $\phi$  and  $\omega$  scans with  $\kappa$ -offsets) con COLLECT [7]. La integración y el escalamiento de las reflexiones se realizaron con el conjunto de programas HKL DENZO-SCALEPACK [8]. Los parámetros de la celda unidad se obtuvieron por refinamiento de los mínimos cuadrados basado en los ajustes angulares de todas las reflexiones recogidas utilizando HKL SCALEPACK [8]. La estructura se resolvió por métodos directos con SHELXS-97 [9], y el modelo molecular fue refinado por el procedimiento de la matriz completa de mínimos cuadrados en  $F^2$  con SHELXL-97 [10]. Los átomos de hidrógeno de fen y cnge se posicionaron estereoquímicamente y se refinaron con el método "riding". Los átomos de hidrógeno del agua se refinaron con las distancias Ow-H limitadas a un valor de referencia de  $0,84(1) \text{ \AA}$  y un parámetro de desplazamiento isotrópico igual a 1,5 veces el valor del oxígeno correspondiente. Los datos experimentales del cristal y los resultados del refinamiento se muestran en la Tabla 1.

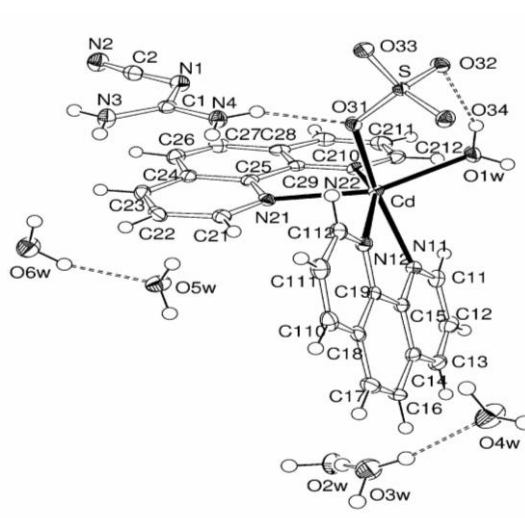
Los resultados de la descripción estructural se muestran en la Figura 1 (ORTEP del complejo) y en la Tabla 2 figuran las distancias de enlace intramoleculares y los ángulos dentro de la molécula de cianoguanidina y alrededor del Cd(II) [11]. La molécula de orto-fenantrolina es casi planar y presenta una desviación *rms* de los átomos inferior a  $0,06 \text{ \AA}$ . El ángulo diedro es de  $77,35(3)^\circ$  y las longitudes de enlace Cd-N varían en el rango de  $2,336(2)$  a  $2,383(2) \text{ \AA}$ . El Cd(II) se encuentra en un entorno octaédrico distorsionado coordinado a los átomos de nitrógeno de dos moléculas de o-fen bidentadas casi planas y perpendiculares entre sí. Estos valores concuerdan con los encontrados en otros complejos de Cd-fenantrolina [12-16].

Los dos posiciones *cis*- restantes son ocupadas por un átomo de oxígeno de un sulfato de (distancia Cd-O<sub>SO4</sub> =  $2,269(1) \text{ \AA}$ ) y con una molécula de agua (distancia Cd-O<sub>w</sub> =  $2,311(2) \text{ \AA}$ ). Una molécula de cnge no coordinada (*rms* desviación de átomos desde el plano molecular de  $0,015 \text{ \AA}$ ) y cinco moléculas de agua de cristalización completan la fórmula del complejo. El cristal resulta estabilizado por una red de interacciones puente de hidrógeno extendida en la que las moléculas de agua son donantes: Ow-H...Ow [d (Ow ... Ow):  $2,691-2,963 \text{ \AA}$  y ang (O<sub>w</sub>-H...O<sub>w</sub>):  $146,0-178,4$ ], O<sub>w</sub>-H...O<sub>sulf</sub> [d (Ow...O):  $2,784-2,938 \text{ \AA}$  y ang (Ow-H...O):  $151,5-171,7^\circ$ ] y O<sub>w</sub>-H...N<sub>cnge</sub> [d (O<sub>w</sub>...N):  $2,891$  y  $2,877 \text{ \AA}$  y ang (Ow-H...N):  $166,7$  y  $159,9^\circ$ , respectivamente].

**Tabla 1.** Datos de la estructura cristalina refinada de  $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cnge}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Fórmula empírica	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{CdN}_8\text{O}_{10}\text{S}$
Peso fórmula	761,06
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$
Dimensiones de la celda unidad	$a = 13,7650(2)$ Å
	$b = 10,2796(2)$ Å
	$c = 21,4418(3)$ Å
	$\beta = 90,106(2)^\circ$
Volumen	$3033,98(9)$ Å <sup>3</sup>
Z, densidad (calculada)	4, 1,666 mg.m <sup>-3</sup>
Coeficiente de absorción	0,859 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1552
Tamaño del cristal	0,23 x 0,18 x 0,14 mm <sup>3</sup>
Rango theta para colección de datos	2,96 to 26,00°
Rangos de índices	$-16 \leq h \leq 16, -12 \leq k \leq 11, -25 \leq l \leq 25$
Reflexiones recogidas/únicas	32141/5710 [R(int) = 0,039]
Reflexiones observadas [ $I > 2\sigma(I)$ ]	4939
Completado a $\theta = 26,00^\circ$	95,8 %
Método de refinamiento	cuadrados mínimos de la matriz total $F^2$
Pesos, w	$[\sigma^2(F_o^2) + (0,0362P)^2 + 2,33P]^{-1}$
	$P = [\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2]/3$
Datos/ restricciones / parámetros	5710 / 12 / 452
Bondad en iteración $F^2$	1,037
Índices R finales <sup>a</sup> [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0,0262, wR2 = 0,0641
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0342, wR2 = 0,0681
Mayores diferencias picos/ valles	0,548 and -0,970 e.Å <sup>-3</sup>

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



**Figura 1.** Descripción ORTEP del complejo  $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cnge}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en estado sólido. Se encuentran indicados todos los átomos distintos de hidrógeno y sus elipsoides de desplazamiento en el nivel de probabilidad del 50%. Los enlaces Cadmio-ligando se indican con línea completa. No se han incluido todas las interacciones puente de hidrógeno para no sobrecargar la figura.



**Tabla 2.** Distancias de enlace intramoleculares (Å) y ángulos (°) en cianoguanidina y alrededor del ion cadmio(II) en  $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cnge}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

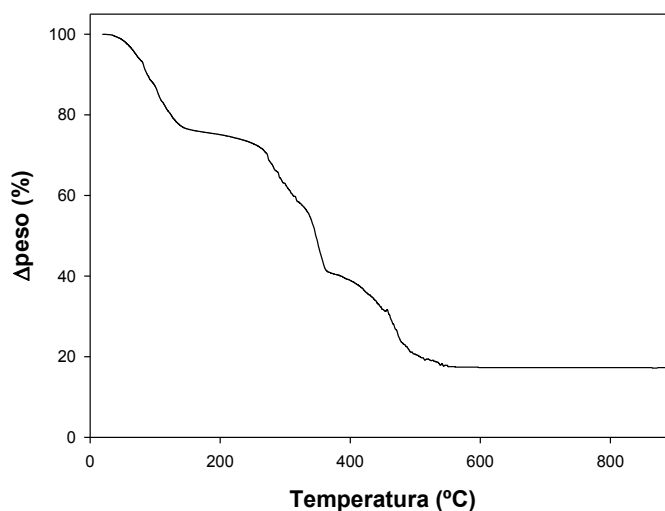
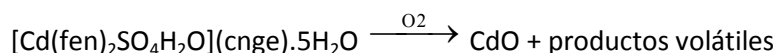
	<b>Distancias de enlace</b>		<b>Ángulos de enlace</b>
N(1)-C(2)	1,307(3)	C(2)-N(1)-C(1)	118,9(2)
N(1)-C(1)	1,344(3)	N(4)-C(1)-N(3)	119,4(2)
N(2)-C(2)	1,165(3)	N(4)-C(1)-N(1)	117,1(2)
N(3)-C(1)	1,333(3)	N(3)-C(1)-N(1)	123,6(2)
N(4)-C(1)	1,327(3)	N(2)-C(2)-N(1)	172,7(2)
Cd-O(31)	2,269(1)	O(31)-Cd-O(1W)	84,81(5)
Cd-O(1W)	2,311(2)	O(31)-Cd-N(12)	89,15(6)
Cd-N(12)	2,336(2)	O(1W)-Cd-N(12)	116,57(6)
Cd-N(11)	2,339(2)	O(31)-Cd-N(11)	157,57(6)
Cd-N(22)	2,340(2)	O(1W)-Cd-N(11)	93,21(6)
Cd-N(21)	2,383(2)	N(12)-Cd-N(11)	71,73(6)
		O(31)-Cd-N(22)	107,09(6)
		O(1W)-Cd-N(22)	86,66(6)
		N(12)-Cd-N(22)	153,20(6)
		N(11)-Cd-N(22)	95,07(6)
		O(31)-Cd-N(21)	88,59(5)
		O(1W)-Cd-N(21)	153,84(6)
		N(12)-Cd-N(21)	88,55(6)
		N(11)-Cd-N(21)	102,16(6)
		N(22)-Cd-N(21)	71,14(6)

La molécula de cnge también es un donante (base de Lewis) en otros enlaces de H que involucran a sus grupos NH en tres interacciones N-H...O<sub>sulf</sub>: [d (N...O): 2,890-2,985 Å y ang (N-H...O): 158,3 a 166,7°] y una interacción N-H...O<sub>w</sub> [d (N...O<sub>w</sub>)=2,963 Å y (N-H...O<sub>w</sub>) =146,0°]. Donde d= distancia, ang= ángulos diedros, O<sub>w</sub>= átomo de oxígeno del agua, (...) = interacción puente de hidrógeno. La presencia de cianoguanidina evita la formación de cadenas complejas en las que los sulfatos estén enlazados químicamente a los centros metálicos de dos esferas de coordinación [17].

### 2.3. Comportamiento térmico

El análisis termogravimétrico (ATG) muestra una curva caracterizada por cinco pérdidas de peso hasta 900°C (Figura 2). La primera pérdida de peso fue del 12,0% y se midió a 100°C y corresponde a la pérdida de las cinco moléculas de agua de hidratación (se esperaba un 11,8%). Este proceso fue acompañado de una señal endotérmica débil ADT (análisis térmico diferencial) en 78,5 °C, el cual es típico de la eliminación de moléculas de agua. Después de la liberación de agua, se observa un proceso de degradación complejo, debido a la pérdida de agua de coordinación y los ligandos enlazados y el producto final de la descomposición a 900 °C resultó

ser CdO (residuo experimental, 17,0%; residuo teórico, 16,9%). La caracterización del CdO ha sido realizada por espectroscopía FTIR [18] y el proceso total puede formularse como:



**Figura 2.** Comportamiento termogravimétrico del complejo  $[\text{Cd}(\text{fen})_2\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](\text{cnge}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , en atmósfera de oxígeno (flujo:  $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ); velocidad de calentamiento  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### 2.4. Espectroscopía vibracional

En la Tabla 3 se muestran las asignaciones de los modos de vibración de cada ligando (cnge y o-fen) y del complejo con Cd. Las principales bandas de los espectros Raman aparecen en cursiva. Las bandas típicas de o-fen se observan desplazadas, lo cual indica la interacción metal-ligando. El doblete del modo de estiramiento CN de la cnge alrededor de  $2200 \text{ cm}^{-1}$  con la componente de baja frecuencia más intensa que la de mayor frecuencia se debe a la presencia de formas tautoméricas cianoamina y cianoimina como ya se discutió para el complejo de Zn [19, 20]. Este doblete es sensible a la coordinación con metales de transición. El cambio espectral de este modo depende de la distancia metal-nitrógeno (cnge) [21]. Esta disposición aparece casi en la misma posición luego de la formación del complejo por lo que se infiere que la cianoguanidina no está coordinada con el cadmio en el complejo, de acuerdo con los datos de difracción de rayos X. El pequeño cambio al azul observado para estas bandas en el complejo podría ser asignado a la formación de interacciones puente de hidrógeno.

Este hecho se confirma por el debilitamiento que se observa para el modo de estiramiento simétrico  $\text{C}\equiv\text{N}$  en el espectro de dispersión Raman en  $934 \text{ cm}^{-1}$  que es fuertemente activo en la cianoguanidina libre. Las vibraciones del doble enlace  $\text{C}=\text{N}$  están en la zona 1550-

1580 cm<sup>-1</sup>. Las bandas debidas a las vibraciones de deformación de NH (1505 cm<sup>-1</sup>) se superponen bandas o-fen. Cuando el grupo aniónico sulfato (simetría T<sub>d</sub>) coordina como un ligando monodentado, la simetría disminuye a C<sub>3v</sub>. En este caso, las frecuencias ν<sub>3</sub> y ν<sub>4</sub> y los modos ν<sub>1</sub> y ν<sub>2</sub> (Raman activo) se convierten en activos al infrarrojo (IR). Las fuertes bandas de IR asignado a los modos ν<sub>3</sub> y ν<sub>4</sub> (estiramientos antisimétricos) aparecen como bandas débiles en los espectros Raman. Las bandas observadas correspondientes a los modos ν<sub>1</sub> y ν<sub>2</sub> mantienen su intensidad tanto en los espectros FTIR como en los Raman. Por lo tanto, por espectroscopía vibracional se deduce que la coordinación del grupo sulfato se produce de manera monodentada a través de un átomo de oxígeno adoptando simetría C<sub>3v</sub> (ver tabla 3) [22]. Esta coordinación se confirma con las determinaciones estructurales por el método de rayos X.

**Tabla 3.** Longitud de ondas (cm<sup>-1</sup>) y la asignación propuesta de los espectros FTIR y Raman (en cursiva) del complejo [Cd(fen)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)SO<sub>4</sub>].(cnge).5H<sub>2</sub>O, y de los ligandos cnge y o-fen, para comparación.

[Cd(fen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)SO <sub>4</sub> ].(cnge).5H <sub>2</sub> O	Cnge	o-fen	Asignación
2201 m 2195 <i>md</i>	2208 m 2204 <i>m</i>		ν(C≡N) cnge
2156 f 2156 <i>m</i>	2162 f 2158 <i>mf</i>		ν(C≡N) cnge
1672 h, 1634 f, 1621 h 1622 <i>m</i>	1637 <i>mf</i> 1647 <i>d</i> , 1635 <i>d</i>	1645 m, 1620 d 1617 <i>d</i>	
1594 m 1604 <i>m</i> , 1592 <i>m</i> , 1580 <i>h</i>		1585 m 1601 <i>d</i> , 1590 <i>d</i>	o-fen
1554 <i>mf</i> , 1547 <i>mf</i>	1570 f 1543 <i>d</i>	1558 m 1564 <i>md</i>	
1514 <i>mf</i> , 1496 h 1515 <i>m</i>	1505 m 1524 <i>d</i>	1501 f 1503 <i>d</i>	
1425 f 1450 <i>m</i> , 1412 <i>mf</i>		1418 f 1447 <i>m</i> , 1405 <i>mf</i>	o-fen
1345 m 1345 <i>d</i>		1341 m 1345 <i>d</i>	o-fen
1303 <i>m</i>		1297 d 1295 <i>m</i>	o-fen
1257 m	1252 m	1273 <i>d</i>	
1224 m		1215 d	o-fen
		1183 d	o-fen
1148 f, 1104 f 1103 <i>d</i>			ν <sub>3</sub> O-SO <sub>3</sub>
	1086 m 1098 <i>d</i>	1090 m 1090 d	
1061 <i>mf</i> 1052 <i>m</i>			ν <sub>3</sub> O-SO <sub>3</sub>
		1034 d 1036 <i>m</i>	o-fen

		990 d	
976 m 974 m			$\nu_1$ O-SO <sub>3</sub>
		961 d	o-fen
934 m 928 d	928 m 934 f		$\nu_s$ (C≡N) cnge
862 m, 849 m 864 d		852 mf	o-fen
773 m, 760 h		776 d	o-fen
727 m 725 m	723 d	738 mf 711 m	o-fen
666 m 667 md	671 m 667 m	693 m	
624 m 636 md, 605 md		617 m	$\nu_4$ O-SO <sub>3</sub>
556 d	555 m	584 d, 564 d 551 d	
521 m 510 md	521 m 519 m		cnge
497 m 497 md	498 m	500 m	
470 md	465 m	448 d	
432 d			
419 m 421 m			$\nu_2$ O-SO <sub>3</sub>
407 d		410 d	

f: fuerte; mf: muy fuerte; m: mediana; d: débil; h: hombro; md: muy débil

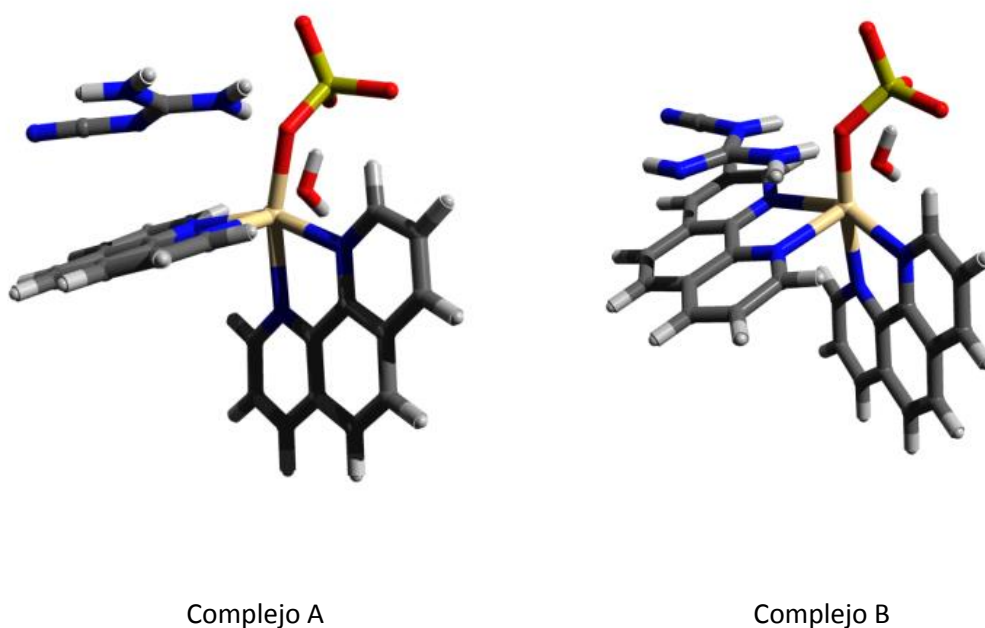
### 3. Metodología computacional. Cálculos DFT para el sistema Cd-cnge-fen

Los cálculos teóricos se realizaron en el marco de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) utilizando como geometría de partida para las optimizaciones de estructura los datos de difracción de rayos X y considerando la existencia de los dos tautómeros de la cianoguanidina (cianoimina y cianoamina). De esta forma se optimizaron los complejos A de cadmio con fenantrolina y cianoimina y B de cadmio con fenantrolina y cianoamina (Figura 3). Todos los cálculos se realizaron empleando el funcional MO62X y la base Lanl2DZ para todos los átomos, tal como están implementadas en Gaussian 09. El ambiente acuoso se simuló con el modelo CPCM (Conducting Polarizable Continuous Model) y las estructuras de mínima energía se verificaron realizando un cálculo de frecuencias, que además permitió poder luego asignar las bandas de los espectros FTIR y Raman.

En base a los resultados de las energías, se calcularon los porcentajes en que contribuye cada una de las especies (complejo con cianoimina o con cianoamina), y el cálculo del espectro

vibracional se promedió para cada complejo pesando la contribución de cada especie al mismo. De ese modo, se completó el estudio teórico vibracional.

La geometría del complejo de Cd,  $[\text{Cd}(\text{fen})_2(\text{SO}_4)\text{H}_2\text{O}]$ , se optimizó teniendo en cuenta la interacción no covalente de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  direccional existente entre el ligando cngc y el ligando fenantrolina. Como se observa en la Figura 1 del sólido cristalino el ligando fenantrolina y cngc se disponen aproximadamente en forma paralela. Las estructuras de cada isómero corresponden a la Figura 3 y la numeración de los átomos seleccionada corresponde a la de la Figura 1 de la estructura cristalina (ORTEP).



**Figura 3.** Esquemas optimizados de los complejos A de cadmio con fenantrolina y cianoimina y B de cadmio con fenantrolina y cianoamina

Las estructuras DFT optimizadas convergen satisfactoriamente. La mayor diferencia encontrada con la estructura en estado sólido radica en el ángulo entre el eje Cd-N22 y el plano de la fenantrolina, donde el valor experimental es de  $102^\circ$  y el calculado resulta ser de  $83^\circ$ . En este caso, como en los complejos anteriores nuevamente el efecto de interacciones intra- e intermoleculares, tales como enlace puente de H e interacciones de Van der Waals, no resulta efectivamente comparable con los cálculos realizados sobre moléculas aisladas. Los parámetros geométricos optimizados seleccionados para el enlace  $\text{C}\equiv\text{N}$  experimental y teórico se muestran en la Tabla 4.

Comparando con los datos calculados reportados para la cianoguanidina [23] y considerando la numeración de la cianoguanidina dada en el complejo de la figura del cristal,

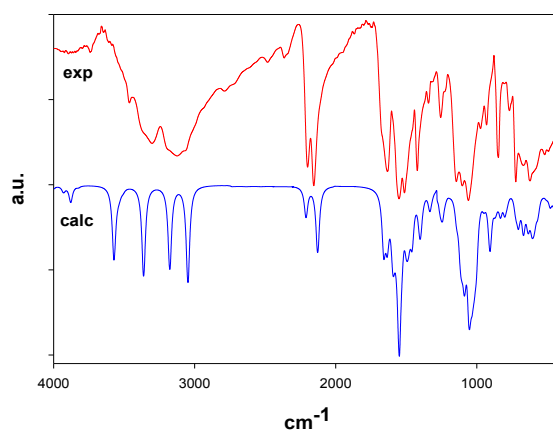
Figura 1, en el tautómero de cianoimina de la cianoguanidina sin complejar, las distancias reportadas fueron: C(2)≡N(2) 1,186, N(1)-C(1) es 1,323 y las distancias N(3)-C(1) y N(4)-C(1) son nuevamente similares dentro del error experimental: 1,381 y 1,377, respectivamente, lo que demuestra que en el cristal hay mayor contribución del tautómero cianoimina. Asimismo, las distancias N(3)-C(1) y N(4)-C(1) para el sólido cristalino toman valores cercanos, dentro del error experimental, 1,333(3) y 1,327(3), respectivamente, indicando la presencia preponderante del tautómero cianoimina en el complejo sólido.

**Tabla 4.** Parámetros geométricos optimizados seleccionados para el enlace C≡N experimental y calculado para el complejo [Cd(fen)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>O].cnge. Comparación con los datos bibliográficos de la molécula de cnge. Las longitudes de enlace se expresan en Å.

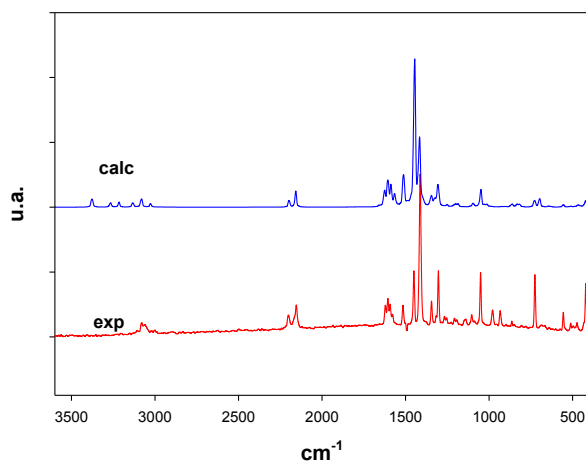
	Exp. [Cd(fen) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> O].cnge	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}_3 \\ \diagdown \\ \text{C}_1 \\ \diagup \\ \text{HN}_4 \end{array} - \text{NH} - \text{C}_2 \equiv \text{N}_2$ <b>B, Cianoamina</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}_3 \\ \diagdown \\ \text{C}_1 \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N}_4 \end{array} = \text{N}_1 - \text{C}_2 \equiv \text{N}_2$ <b>A, Cianoimina</b>	Cnge <sup>a</sup>	
		cianoamina	cianoimina		
C2-N2	1,165(3)	1,180	1,189	1,182	1,186
C2-N1	1,307(3)	1,334	1,325	1,343	1,338
xC1-N1	1,344(3)	1,426	1,344	1,429	1,323
C1-N4	1,327(3)	1,300	1,347	1,290	1,381
C1-N3	1,333(3)	1,369	1,363	1,390	1,377
$\nu\text{C}\equiv\text{N}, \text{cm}^{-1}$	2201, 2156	2205	2151	2210	2165

<sup>a</sup> [23]

Los estudios vibracionales permitieron la comparación del comportamiento vibracional del sólido cristalino con los complejos calculados por los métodos teóricos. De acuerdo a la contribución experimental de cada tautómero, evaluada del FTIR, se asignó un porcentaje de peso estadístico para cada espectro calculado de los complejos (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Comparación de los espectros FTIR experimental y calculado para [Cd(fen)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>O].cnge.



**Figura 5.** Comparación de los espectros Raman experimental y calculado para  $[\text{Cd}(\text{fen})_2(\text{SO}_4)\text{H}_2\text{O}].\text{cnge}$ .

El doblete del modo asignado al estiramiento  $\text{C}\equiv\text{N}$  se encuentra en una posición acorde al del ligando cianoguanidina aislado, como era de esperar (Tabla 4). La presencia de este doblete en los espectros vibracionales, muestra que el complejo cristaliza con las dos formas tautoméricas del ligando cianoguanidina, la forma imino y la forma amino. La mayor intensidad de la banda del doblete a menor energía sería indicativa de la mayor contribución del isómero cianoimina a la mezcla de isómeros. Evidentemente, el tautómero amino debe tener menor contribución en los complejos isoméricos, y esto también está en concordancia con la mejor correlación entre los parámetros estructurales comparados a partir de los datos de RX y los calculados para el complejo B (Tabla 5).

**Tabla 5.** Comparación de las frecuencias de estiramiento ( $\text{cm}^{-1}$ ) del grupo ciano de la cianoguanidina (cnge) con las obtenidas en forma experimental (exp) y teórica (calc) para el complejo  $[\text{Cd}(\text{fen})_2(\text{SO}_4)\text{H}_2\text{O}].\text{cnge}$ . Itálica, espectros Raman.

Exp	Calc, Cianoamina	Calc, Cianoimina	cnge
2201 m <i>2195 md</i>	2205 (int IR=355, int <i>Raman=3</i> )		2208 m <i>2204 m</i>
2156 f <i>2156 m</i>		2151 (int IR=790, <i>int Raman=7</i> )	2162 f <i>2158 mf</i>

f, fuerte; mf, muy fuerte; m, mediano; md, mediano-débil

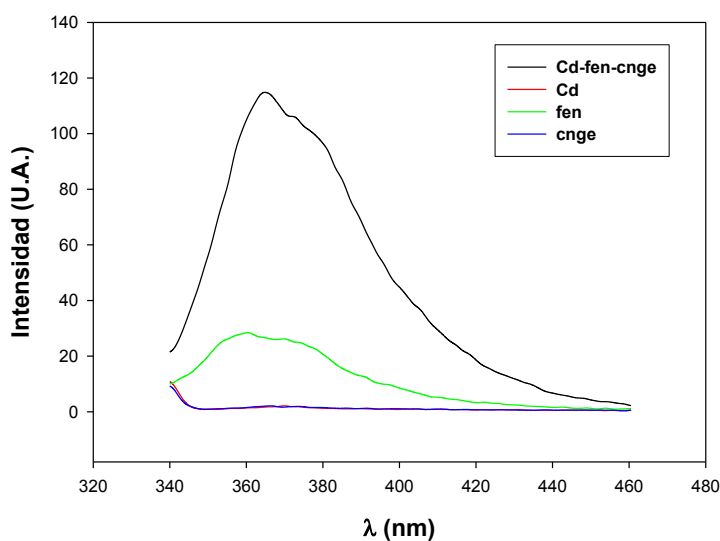
Las bandas muy intensas del anión sulfato con geometría  $\text{C}_{3v}$  también se observaron en los espectros vibracionales calculados, en base a la suma final teniendo en cuenta la contribución de cada tautómero:  $\nu_3$  1052  $\text{cm}^{-1}$ , mf, 1014  $\text{cm}^{-1}$ , h (desdoblada), FTIR y 1052  $\text{cm}^{-1}$ , d, Raman y  $\nu_4$ , 614  $\text{cm}^{-1}$ , m para FTIR y 638  $\text{cm}^{-1}$ , md en Raman, indicando que el anión

sulfato coordina de manera monodentada a través del átomo de O, como se observó en la determinación estructural del cristal.

#### 4. Estudios en solución

##### 4.1. Espectros de fluorescencia

Teniendo en cuenta las excelentes propiedades de fluorescencia de complejos metálicos con configuración  $d^{10}$ , se midieron los espectros de fluorescencia del complejo, del metal y de los ligandos en una mezcla agua-etanol al 50%. Tras la excitación de o-fen a 327 nm, se observaron bandas de emisión en 365 nm y 388 nm, que corresponden a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ . El complejo muestra un aumento en la intensidad de la fluorescencia cuando se lo compara con el ligando (Figura 6). De esta forma, el espectro de las bandas de emisión del complejo de Cd también se puede atribuir a transiciones intra-ligando.



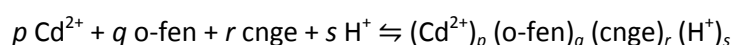
**Figura 6.** Espectros de emisión de fluorescencia del complejo  $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cnge}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y sus componentes en una mezcla hidroalcohólica al 50%. La concentración de las especies es  $1 \times 10^{-3}$  M, excepto para o-fen ( $2 \times 10^{-3}$  M), a temperatura ambiente.

La mejora de la intensidad puede ser debido a la coordinación del ligando al centro metálico, lo cual aumenta la rigidez conformacional del ligando, reduciendo así la desintegración no radiativa del estado excitado intra-ligando  $\pi \rightarrow \pi^*$  [30, 31].



## 4.2. Titulaciones potenciométricas

Los estudios de la titulación potenciométrica permiten comprender mejor el comportamiento del sistema en solución además de identificar la naturaleza de las especies bioactivas que probablemente interactúen con las bacterias. Como en los complejos de los capítulos precedentes (cobre y cinc) se realizaron valoraciones potenciométricas [24] con el objetivo de determinar cuáles son las especies que existen en solución acuosa y poder evaluar cuál es la especie activa a pH fisiológico. Las constantes de formación indican que  $\beta_{pqrs}$  obedece a la notación general:



Un valor de  $pK_w = 13,76$  (correspondiente al  $\log \beta_{000-1} = -13,76$ ) fue asumido para las condiciones experimentales ( $T = 298 \text{ K}$ ,  $I = 150 \text{ mmol.L}^{-1}$  y atmósfera de nitrógeno). Los valores de las constantes de disociación determinadas ( $pK_a$ ) para  $\text{cngeH}$  [21],  $\text{o-fenH}^+$  y la constante de formación para el sistema ternario  $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}/\text{H}^+$  ya se habían determinado previamente, y nuestros datos concuerdan con estos valores [25-28]. Para determinar las constantes de formación del sistema  $\text{Cd}^{2+}/\text{cnge}/\text{H}^+$ , se realizaron cuatro titulaciones en un rango de pH de 2 a 10. La concentración total de cadmio en el vaso fue de  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  y la relación metal:ligando fue de 1:2. Sobre el sistema  $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}/\text{cnge}/\text{H}^+$  se realizaron cuatro titulaciones con concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}/\text{cngeH}$  de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}/1,5 \text{ mmol.L}^{-1}/1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  y el rango de pH osciló entre 2 y 11.

Las constantes de desprotonación de los ligandos se volvieron a calcular por medio de mediciones potenciométricas de diferentes conjuntos de titulaciones utilizando el programa BEST [29]. Los datos calculados de cianoguanidina (LH,  $\text{cngeH}$ :  $pK=11,57$ ) y orto-fenantrolina ( $\text{AH}^+$ ,  $\text{o-fenH}^+$ :  $pK=5,00$ ) concuerdan con los datos reportados (Tablas 6 y 7).

Para determinar las constantes de formación de los sistemas ternarios ( $\text{Cd}^{2+}/\text{cngeH}/\text{H}^+$  y  $\text{Cd}^{2+}/\text{fen}/\text{H}^+$ ) y cuaternario ( $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}/\text{cngeH}/\text{H}^+$ ) se analizaron los datos de una serie de titulaciones y se analizaron con los programas de cálculo BEST y SUPERQUAD. Los criterios habituales para este tipo de programa ( $\text{CHI}^2$ , valores  $R$ , desviaciones estándar, etc.) se utilizaron para seleccionar el modelo de especiación. Como ya se mencionó, los resultados obtenidos para el sistema  $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}/\text{H}^+$  concordaron con los datos informados anteriormente [26].

**Tabla 6.** Composición, notación y constantes de formación ( $\beta$ ) para el sistema  $\text{Cd}^{2+}$  / cnge (L) /  $\text{H}^+$  (0,150 M NaCl, 298 K).

especies (pqr)	Fórmula	log $\beta$
011	LH	11,570
10-1	$[\text{CdH}_{-1}]^{1+}$	-9,650
10-2	$[\text{CdH}_{-2}]$	-19,800
11-3	$[\text{CdLH}_{-3}]^{2-}$	-20,630
210	$[\text{Cd}_2\text{L}]^{3+}$	15,590
121	$[\text{CdL}_2\text{H}]^{1+}$	24,440

**Tabla 7.** Composición, notación y constantes de formación ( $\beta$ ) para el sistema  $\text{Cd}^{2+}$  / o-fen (A) / cnge (L) /  $\text{H}^+$  (0,150 M NaCl, 298 K).

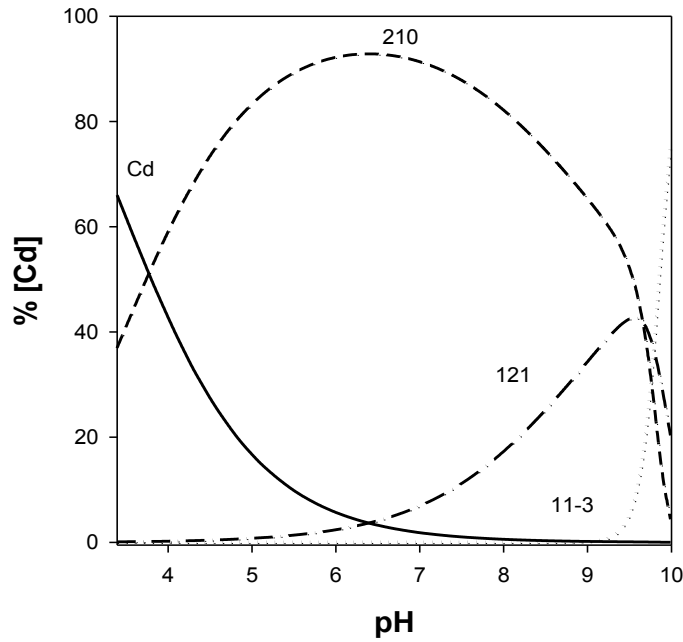
especies (pqrs)	Fórmula	log $\beta$
0011	LH	11,570
0101	A	4,960
1100	$[\text{CdA}]^{2+}$	5,550
1200	$[\text{CdA}_2]^{2+}$	10,400
101-3	$[\text{CdLH}_{-3}]^{2-}$	-20,640
1021	$[\text{CdL}_2\text{H}]^{1+}$	24,440
2010	$[\text{Cd}_2\text{L}]^{3+}$	15,590
1111	$[\text{CdALH}]^{2+}$	23,140
1210	$[\text{CdA}_2\text{L}]^{1+}$	25,070
121-1	$[\text{CdA}_2\text{LH}_{-1}]$	15,570
1110	$[\text{CdAL}]^+$	11,330

El sistema ternario  $\text{Cd}^{2+}$ /cnge $\text{H}^+$ / $\text{H}^+$  muestra una competencia entre el Cd libre y la especie  $[\text{Cd}_2\text{L}]^{3+}$  hasta pH 6,5 donde el complejo binuclear se convierte en la principal especie (Figura 7, Tabla 6). A valores de pH cercanos a 9, se forma aproximadamente 40% de la especie  $[\text{CdL}_2\text{H}]^+$ , y el porcentaje disminuye a pH 10 cuando se forma la especie hidroxilada  $[\text{CdLH}_{-3}]^{2-}$ .

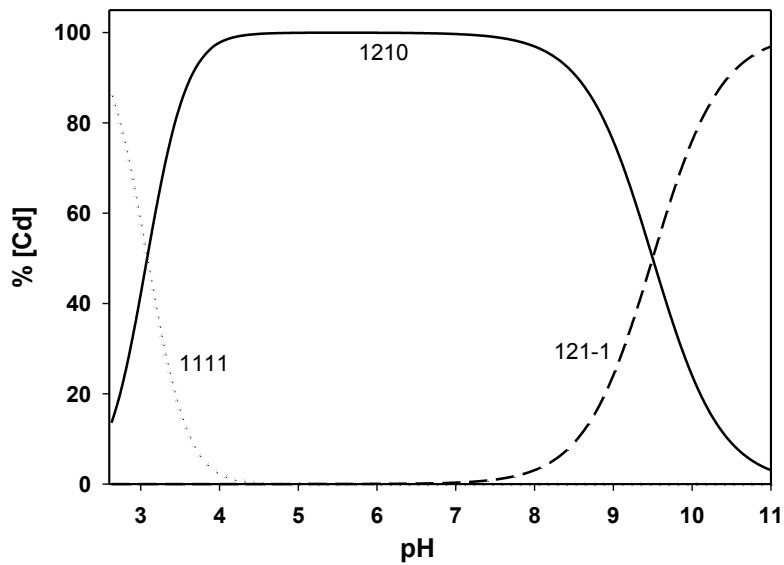
Varios modelos para el sistema en equilibrio  $\text{Cd}^{2+}$ /o-fen/cnge $\text{H}^+$ / $\text{H}^+$  se han probado basándonos en las especies ternarias. En la Tabla 7 podemos observar el modelo propuesto para el sistema cuaternario y los correspondientes valores  $\beta$  de las especies. Empleando el programa SPECIES se obtuvieron los gráficos de los diagramas de distribución de especies en función del pH en el rango de 2 a 11, utilizando las concentraciones de los iones iguales a las de la síntesis del complejo. El comportamiento de este sistema se describe en el diagrama de distribución de especies de la Figura 8.

A valores de pH bajos se observa la formación de la especie  $[\text{CdALH}]^{2+}$  (log  $\beta_{1111}=23,14$ ) que va desapareciendo cerca de pH 3 a expensas de una nueva especie  $[\text{CdA}_2\text{L}]^+$  y que se

mantiene como la principal hasta un valor de pH 4-9. Debido a la pérdida de protones, para valores de pH superiores a 9 prevalece la especie  $[\text{CdA}_2\text{LH}_{-1}]$  ( $\log \beta_{121-1}=15,57$ ).



**Figura 7.** Distribución de Especies para el sistema  $\text{Cd}^{2+}/\text{cnge}(\text{L})/\text{H}^+$ . Concentraciones totales:  $\text{Cd}^{2+}$ , 0,1 mM y cnge, 0,2 mM en función del pH a 25°C y con una fuerza iónica  $I = 0,150 \text{ M NaCl}$



**Figura 8.** Gráfico de distribución de especies para el sistema  $\text{Cd}^{2+}/\text{o-fen}(\text{A})/\text{cnge}(\text{L})/\text{H}^+$ . Las concentraciones totales para el cálculo son:  $\text{Cd}^{2+}$ : 0,5 mM, o-fen: 1,5 mM y cnge: 1 mM en función del pH a 25°C,  $I = 0,150 \text{ M NaCl}$

Mediante estudios potenciométricos puede observarse un comportamiento diferente en la coordinación en solución acuosa, detectando una interacción directa de cnge con el centro metálico Cd(II). La probable causa estos efectos podría ser el uso de diferentes disolventes entre la preparación del compuesto sólido y en el estado líquido. Además, la formación de una especie neutra en estado sólido se ve favorecida por sobre las especies aniónicas cuando se utilizan mezclas hidroalcohólicas.

## 5- Ensayos Biológicos

### Ensayo de actividad antimicrobiana

En una primera etapa, se determinaron las actividades antibacterianas del sulfato de cadmio, o-fen y del complejo ternario frente a cepas bacterianas de referencia: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) por el método de difusión en discos.

Las sensibilidades de los metales y ligandos se ensayaron usando agar Mueller-Hinton (MH) en placas de Petri según la siguiente técnica: Cada cepa bacteriana mantenida en crioviales a  $-18^{\circ}\text{C}$  fue reactivada y luego de 12-18 horas de cultivo a  $35-37^{\circ}\text{C}$  en 15 mL de caldo MH estéril se utilizaron para preparar el inóculo estándar con una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland equivalente a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia  $\text{mL}^{-1}$ . Cada inóculo bacteriano puro diluido en caldo MH (McFarland estándar) se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar MH de 4mm de espesor de una placa de Petri utilizando un hisopo estéril de algodón. Al mismo tiempo se prepararon soluciones acuosas  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  estériles de cloruro de cadmio, o-fen, cnge y el complejo cuaternario. Las mismas fueron esterilizadas por filtrado y se emplearon para impregnar asépticamente discos de 6 mm de diámetro dejándolas en reposo en ambiente estéril (cabina de seguridad biológica clase II tipo A2) hasta la evaporación completa del disolvente y se colocaron sobre la superficie de agar sólido previamente inoculado antes de que transcurrieran 15 minutos de la siembra. Cada disco fue impregnado con un volumen de entre 20 y 60  $\mu\text{L}$  de las soluciones  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  en DMSO / agua estériles de cada compuesto a ensayar. Las placas, así acondicionadas, se incubaron durante 18 h en estufas de cultivo a una temperatura entre  $35-37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo de incubación, se examinaron las placas en busca de halos de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los discos. Los discos que contenían compuestos a los que la cepa en estudio se considera sensible, muestran zonas

claras a su alrededor. Se midió el diámetro en mm de esa zona circular y se evaluó cualitativamente [32-34]. Los valores reportados son el promedio de al menos tres determinaciones independientes.

Mediante el ensayo de difusión en discos se determinaron las zonas de inhibición usando gentamicina y ampicilina como antibióticos de referencia para controles positivos (tabla 8). Las cepas bacterianas gramnegativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y grampositivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) presentan perfiles de sensibilidad frente al cadmio, o-fen y complejo, esto se refleja en la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con estas soluciones. Con 0,27  $\mu$ moles de cadmio por disco no se observó ningún efecto para ninguna de las cuatro cepas (este dato no figura en la Tabla 8), fueron necesarios 0,4  $\mu$ moles de cada solución, por disco, para obtener valores similares al estándar positivo del complejo. Todos los compuestos ensayados resultaron ser altamente eficaces contra *S. aureus*. El efecto antibacteriano del cadmio sobre el crecimiento de los microorganismos ensayados, así como el mayor efecto frente a *S. aureus* que sobre *E. coli* han sido previamente demostrado [35]. Para *P. aeruginosa*, la actividad antibacteriana del metal es menos significativa.

Los ligandos libres (cnge y o-fen) y su complejo ligando mixto (considerando las principales especies en solución a pH 4-9 como  $[\text{CdA}_2\text{L}]^+$ , (ver Figura 8) mostraron actividad antimicrobiana variable *in vitro* contra las cepas analizadas. Como ya se mencionó en los capítulos precedentes, las soluciones de cnge no ejercen ningún efecto de inhibición sobre los microorganismos ensayados por lo que se la considera sin actividad antimicrobiana.

Por su parte la orto-fenantrolina mostró un efecto superior al antibiótico de control gentamicina para *E. coli* y *S. aureus* pero no así frente a *P. aeruginosa* y un efecto similar se observó frente a *E. faecalis* con respecto al control de ampicilina. El orden decreciente del diámetro de la zona de inhibición observado fue el siguiente: *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* *P. aeruginosa* es consistente con las determinaciones de CIM para fenantrolina [36]. Para *P. aeruginosa* una mejora considerable de la actividad antibacteriana se observó por la formación de complejos. Por otro lado, para *E. coli* y *S. aureus*, fenantrolina mostró mayor actividad que el complejo y el antibiótico.

**Tabla 8.** Perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias frente a Cadmio, o-fen, cnge y el complejo ternario Cd<sup>2+</sup>/ fen /cngH en solución. Diámetros de los halos de inhibición en mm

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	20,3 ± 0,6	22,2 ± 0,2	11,3 ± 0,6	18,7 ± 0,6
<b>o-fenH</b>	33,0 ± 1,0	34,3 ± 1,1	12,3 ± 0,6	21,0 ± 1,0
<b>Cnge</b>	0	0	0	0
<b>Cd/o-fen/cnge1:2:1</b>	23,3 ± 0,6	25,0 ± 1,0	25,3 ± 0,6	23,3 ± 0,6
<b>Gentamicina</b>	23,0 ± 1,0	24,6 ± 0,6	24,6 ± 0,6	
<b>Ampicilina</b>				21,0 ± 1,0

La teoría de quelación, como ya se mencionó, explica el aumento de la actividad antimicrobiana del complejo en relación con la del ligando libre [37]. Además, los sitios de unión al metal en las enzimas de los microorganismos se bloquean y también la respiración de las células y la síntesis de las proteínas resulta perturbada con la consecuente inhibición del crecimiento de los microorganismos. Así, el efecto antibacteriano de los complejos metálicos puede ser debido a cualquiera de los mecanismos, ya sea que mate o inhiba la multiplicación del agente bacteriano mediante el bloqueo de sus sitios activos [38]. Este efecto inhibitor se observa en la complejación de varios compuestos a cadmio y otros iones de metales de transición [39-42] y, en particular, en la mejora del efecto inhibitor observado sobre el cadmio complejoado frente a la cepa ensayada de *P. aeruginosa* (Tabla 8).

La orto-fenantrolina y sus derivados son de interés debido a su potencial actividad contra el cáncer y contra infecciones virales, bacterianas y fúngicas. Su interacción con el ADN se produce por apilamiento  $\pi$  aromático entre pares de bases [43]. Además, por espectroscopia de fluorescencia hemos demostrado que la formación de enlaces coordinados alrededor del átomo de Cd aumentó la rigidez conformacional de o-fen y así la deslocalización  $\pi$  del ligando puede ser mayor que en el complejo quelato. Como ya se ha mencionado, los compuestos conformacionalmente restringidos manifiestan una significativa disminución en la actividad biológica si se comparan con análogos que no están conformacionalmente restringidos [44] y que la flexibilidad conformacional de los péptidos les confiere mejores actividades antibacterianas [45, 46]. La teoría de la permeabilidad celular tiene en cuenta que la liposolubilidad de los compuestos influye en las actividades antimicrobianas porque los lípidos de la membrana plasmática que rodea la estructura celular facilitan el paso de materiales liposolubles [47]. Por eso es que la mayor flexibilidad de la molécula de o-fen, comparada con su complejo de cadmio, podría ser la razón de la su actividad antibacteriana

más potente contra *E. coli* y *S. aureus*, dado que los factores críticos (lipofilicidad y buena penetración en las membranas plasmáticas de las células bacterianas) son superiores en el ligando libre. Se obtuvieron resultados similares para complejos de platino [43].

Los compuestos luego fueron medidos mediante la técnica de microdilución en agar para determinar CIM. El perfil antimicótico del cadmio, los ligandos cianoguanidina y orto-fenantrolina y su complejo se determinó mediante la técnica de microdilución en agar. Dicha técnica nos permitió hallar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los compuestos ensayados frente a los microorganismos evaluados. Se emplearon las cepas de *Candida*: *Candida parapsilosis* (sensu stricto) ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* de aislamiento clínico. En la Tabla 9 figuran los valores de la CIM determinada para las cepas fúngicas y se comparan también con los valores determinados para las cepas bacterianas por el mismo método.

Para incorporar el compuesto ensayado en el medio de cultivo se prepararon soluciones acuosas para el metal y los ligandos y una mezcla agua/DMSO (1:1) para disolver el complejo, esterilizadas con filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Se utilizaron diluciones dobles seriadas en un rango de concentraciones 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ -1.500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (concentración límite). En cada placa se inocularon 2  $\mu\text{L}$  de cada suspensión microbiana sobre la superficie del agar y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

**Tabla 9.** Concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de  $\text{CdCl}_2$ , o-fenantrolina (o-fen) y el complejo  $[\text{Cd}(\text{o-fen})_2(\text{SO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{cnge})\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para diferentes cepas de hongos (Cándidas) y bacterias. Los valores de CIM están dados en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

	$\text{CdCl}_2$	o-fen	Atm referencia	Cd/cnge/o-fen
<i>C. albicans</i>	24	3	>375 <sup>b</sup>	3
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	24	3	>375 <sup>b</sup>	3
<i>C. parapsilosis</i>	6	12	3 <sup>b</sup>	24
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	24	12	6 <sup>b</sup>	24
<i>C. tropicalis</i>	12	12	1,5 <sup>b</sup>	12
<i>C. glabrata</i>	3	6	47 <sup>b</sup>	3
<i>C. krusei</i>	3	6	47 <sup>b</sup>	3
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	20	12	23 <sup>c</sup>	23
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	22	24	25 <sup>c</sup>	25
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	19	94	0,4 <sup>a</sup>	23
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	11	375	25 <sup>c</sup>	25

A: Ampicilina; b: Fluconazol; c: Gentamicina.

Los resultados indican que todos los compuestos ensayados tienen muy buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas, excepto el ligando cianoguanidina (CIM > 1500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). El complejo de Cadmio presenta iguales valores de CIM que el ligando orto-

fenantrolina, en algunos casos, e iguales valores que el metal libre en otros. Es decir que la complejación incrementa la actividad del ligando o del metal libres. No obstante, en ningún caso la actividad del complejo es mayor a la del ligando y el metal al mismo tiempo. Por otra parte, el complejo resultó ser menos activo que el ligando y el metal libres frente a *C. parapsilosis*. Asimismo, puede observarse que en algunas cepas de hongos tanto el metal, como la o-fenantrolina y el complejo muestran mayor efectividad que el fármaco fluconazol. Sin embargo, el comportamiento antibacteriano del metal y del complejo igualan la acción de gentamicina pero el fármaco ampicilina resulta ser más efectivo frente a *E. faecalis*.

## Conclusiones

Se logró sintetizar un nuevo complejo de Cd con o-fen y cnge y el mismo fue adecuadamente caracterizado. El cadmio participa de la esfera de coordinación con un entorno  $N_4$  (proveniente de dos moléculas de o-fen) que involucra además un anión sulfato y una molécula de agua. Aún cuando la cianoguanidina no se encuentra coordinada en el estado sólido, el grupo  $NH_2$  es una base de Lewis (donor de electrones) en una interacción de H en tres interacciones N-H ... O (sulfato). Mediante estudios potenciométricos se determinó que trabajando en solución acuosa el ligando cianoguanidina coordina con el Cd, junto con la fenantrolina. El diferente comportamiento podría deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en la preparativa (agua-alcohol) y además a la formación de una especie neutra en estado sólido donde el anión sulfato es el que coordina con el metal

Se realizaron cálculos teóricos estructurales y vibracionales pudiendo comprobar nuevamente la presencia de los tautómeros cianoimina y cianoamina de la cianoguanidina, en este caso sin coordinar, donde la mayor contribución corresponde al tautómero cianoimina. Los espectros vibracionales calculados (FTIR y Raman) reprodujeron de manera satisfactoria los espectros experimentales. Se midieron las actividades antimicrobianas *in vitro* del complejo sintetizado frente a diversas cepas bacterianas y fúngicas. En fluidos biológicos, la complejación de bases nitrogenadas con cadmio Cd(II), puede mejorar o al menos mantener el efecto inhibitor del metal.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Tan A, Woodworth R. *Biochemistry* (1969) 8:3711-3716
- 2- Hamilton D, Valberg L. *Am. J. Physiol.*, (1974)227:1033-1037
- 3- Yang Z, Yu J, Chen H. *Chin. J. Inorg. Chem.* (2002)18:373-377.
- 4- Gómez-Coca R, Kapinos L, Holy A, Vilaplana R, Gonzalez-Vílchez F, Sigel H. *J. Biol. Inorg. Chem.* (2004) 9:961-972
- 5- Illán-Cabeza N, Jiménez-Pulido S, Martínez-Martos J, Ramírez-Expósito M, Moreno-Carretero M. *J. Inorg. Biochem.* (2009) 103:1176-1184
- 6- Pérez J, Cerrillo V, Matesanz A, Millán J, Navarro P, Alonso C, Souza P. *ChemBiochem.* (2001) 2:119-123
- 7- Enraf-Nonius. COLLECT. B.V. Nonius, Delft, The Netherlands (1997–2000)
- 8- Otwinowski Z, Minor W. In *Methods in Enzymology*, C.W. Carter Jr, R.M. Sweet (Eds), Vol. 276, pp. 307–326, Academic Press, New York (1997).
- 9- Sheldrick G. SHELXS-97, Program for Crystal Structure Resolution, University of Göttingen, Göttingen, Germany (1997)
- 10- Sheldrick G. SHELXL-97, Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany (1997)
- 11- Johnson C. ORTEP-II. A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program, Report ORNL-5318, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA (1976)
- 12- Wang H, Xiong R, Chen H, Huang X, You X. *Acta Cryst.* (1996) C52:1658-1661.
- 13- Sun Y, Du Z, Zhang S, He Y, Zhou Z. *Acta Cryst.* (2010) C66:m104-m106.
- 14- Ye L, Ye J, Ye K, Wang Y. *Acta Cryst.* (2007) E63:m75-m77.
- 15- Xiong R, Liu C, Li D, Wang H, You X. *Polyhedron* (1997) 16:1263-1265.
- 16- Ramezanipour F, Aghabozorg H, Sheshmani S, Moghimi A, Stoeckli-Evans H. *Acta Cryst.* (2004) E60:m1803-m1805
- 17- Harvey M, Baggio S, Suescunc L, Baggio R. *Acta Cryst.* (2000) C56, 811-813.
- 18- Fahim R, Kolta G. *J. Phys. Chem.* (1970) 74:2502-2507
- 19- Sheludiyakova L, Sobolev E, Kozhevina L. *J. Appl. Spectrosc.* (1991) 55:661-665
- 20- Alía J, Edwards H, García Navarro F. *J. Mol. Struct.* (2001) 597:49-55
- 21- Ferrer E, López Tévez L, Baeza N, Correa M, Okulik N, Lezama L, Rojo T, Castellano E, Piro O, Williams P. *J. Inorg. Biochem.* (2007) 101:741–749
- 22- Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4<sup>th</sup>. ed, John Wiley, New York (1986)
- 23- Sheludiyakova L, The Late E. Sobolev V, Arbuznikov A, Burgina E, Kozhevina L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* (1997) 93:1357-1360
- 24- López Tévez L, Martínez Medina J, Islas M, Piro O, Castellano E, Bruzzone L, Ferrer G, Williams P. *J. Coord. Chem.* (2011) 64:3560-3574
- 25- Dale J, Banks C. *Inorg. Chem.* (1963) 2:591-594
- 26- Fahsell M, Banks C. *J. Amer. Chem. Soc.* (1966) 88: 878-884
- 27- Anderegg G. *Helv. Chim. Acta* (1963) 2397:263-264
- 28- Canepari S, Carunchi V, Castellano P, Messina A. *Talanta*, (1998) 47:1077-1084

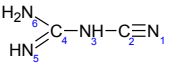
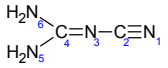
- 29- Martell A, Matekaitis R. *Determination and use of stability constants*. VCH Publishers, Inc. USA (1992)
- 30- Xiao D, Li Y, Wang E, Fan L, An H, Su Z, Xu L. *Inorg. Chem.* (2007) 46:4158-4166
- 31- Boghaei D, Asl F. J. *Coord. Chem.* (2007) 60:1629-1635.
- 32- Shaheen F, Badshah A, Gielen M, Dusek M, Fejfarova K, de Vos D, Mirza B. J. *Organomet. Chem.* (2007) 692:3019-3026
- 33- Rauf M, Din I, Badshah A, Gielen M, Ebihara M, de Vos D, Ahmed S. J. *Inorg. Biochem.* (2009) 103:1135-1144.
- 34- Cavicchioli M, Massabni A, Heinrich T, Costa-Neto C, Abrao E, Fonseca B, Castellano E, Corbi P, Lustri W, Leite C. J. *Inorg. Biochem.* (2010) 104:533-540
- 35- Doyle J, Marshall R, Pfander W. *Appl. Microbiol.* (1975) 29:562-564.
- 36- Kalia S, Kaushal G, Kumar M, Cameotra S, Sharma A, Verma M, Kanwar S, *Braz. J. Microbiol.* (2009) 40:916-922
- 37- Malhotra R, Kumar S, Dhindsa K. *Indian J. Chem.*, (1993) 32A:457-459
- 38- Nishat N, Hasnain S, Dhyani Asma S. J. *Coord. Chem.* (2010) 63:3859-3870
- 39- Alghool S. J. *Coord. Chem.* (2010) 63:3322-3333.
- 40- Kalanithi M, Rajarajan M, Tharmaraj P. J. *Coord. Chem.* (2011) 64:842-850
- 41- Sumathi S, Tharmaraj P, Sheela C, Ebenezer R, Bhava P. J. *Coord. Chem.* (2011) 64:1673-1682.
- 42- Sumathi S, Tharmaraj P, Sheela C, Ebenezer R. J. *Coord. Chem.* (2011) 64:1707-1717
- 43- Roy S, Hagen K, Maheswari P, Lutz M, Spek A, Reedijk J, van Wezel G. *Chem. Med. Chem.* (2008) 3:1427-1434
- 44- Cooper C, Tufano M, Donner P, Chu D. *Bioorg. Med. Chem.* (1996) 4:1307-1315
- 45- Oh D, Shin S, Lee S, Kang J, Kim S, Ryu P, Hahm K, Kim Y. *Biochemistry* (2000) 39:11855-11864.
- 46- Lee S, Kim YK, Lim S, Zhu W, Ko H, Shin S, Hahm K, Kim Y. *Biochemistry*, (2007) 46:3653-3663
- 47- Anjaneyulu Y, Rao R. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* (1986) 16:257-272

## Capítulo 5

### CONCLUSIONES GENERALES

La ingeniería cristalina tiene en cuenta la síntesis y el control racional de nuevos complejos inorgánicos que es un proceso influenciado por las condiciones experimentales. Variando las condiciones experimentales de temperatura, relaciones estequiométricas y el pH se regula la composición de los diferentes complejos metálicos. La interacción de los ligandos orgánicos cnge y o-fen con Cu(II), Cd(II) y Zn(II) producen compuestos de coordinación con diferentes entornos y geometrías (con centros CuN<sub>5</sub>, CuN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, CdN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> y ZnN<sub>5</sub>O). La fuerza del enlace Metal-NC (cnge) determinada por las mediciones de rayos X es esencial para el cambio de azul o rojo del estiramiento antisimétrico de la banda de CN en los espectros de vibración.

Asimismo, para los cálculos teóricos resultó necesario tener en cuenta la presencia de tautómeros del ligando cianoguanidina. Para el tautómero cianoamina, los cálculos teóricos para el complejo de Zn indicaron que las distancias Zn-N resultaron más largas y la C≡N más corta. La forma imino tiene la conjugación entre el enlace doble y el triple lo que reduce parcialmente el triple orden de enlace efectivo C≡N resultando éste más largo (dentro del doblete, corresponde a la banda de menor frecuencia de vibración) por la mayor donación  $\sigma$  al metal y menor distancia Zn-N, de acuerdo a los cálculos teóricos. Se observa que los datos experimentales de RX y de FTIR son promedios de las contribuciones de las formas tautoméricas donde las distancias C-N y C=N están cerca del valor medio:

	Experimental Zn(fen) <sub>2</sub> cnge	B, Cianoamina 	A, Cianoimina 	Cnge <sup>a</sup>	
				cianoamina	cianoimina
		70,7 %	29,3 %		
Zn-N1	2,092	2,211	2,102		
C2-N1	1,164	1,155	1,166	1,182	1,186
C2-N3	1,296	1,312	1,286	1,343	1,338
C4-N3	1,345	1,422	1,334	1,429	1,323
C4-N5	1,320	1,272	1,334	1,290	1,381
C4-N6	1,342	1,362	1,337	1,390	1,377
$\nu_{C\equiv N}$ , cm <sup>-1</sup>	2189, 2148	2189	2148	2210, 2186, DMF	2165 2147, DMF

Para el caso del complejo de Cu designado como (2) las dos bandas del doblete asignado a las vibraciones del grupo ciano (C≡N) de ambos tautómeros se corren al azul respecto al ligando cianoguanidina libre, observándose sólo como diferencia una disminución de la distancia N3-C4, no encontrándose diferencia significativa en las distancias N1-C2 y N3-C2. Esta disminución del enlace y la correspondiente conjugación produce una mayor fuerza en el enlace Cu-N1 (más corto):

Distancias, Å	Cu(fen) <sub>2</sub> cnge (1)	Cufencnge (2)	Zn(fen) <sub>2</sub> cnge	Cd(fen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) Cnge (sin coordinar)	cnge
M-N1	2,004	1,945	2,092	---	
N1-C2	1,146 (5)	1,151 (3)	1,164 (3)	1,165	
N3-C2	1,284	1,293	1,296	1,307	
N3-C4	1,327	1,293	1,345	1,344	
C4-N5	1,320	1,317	1,320	1,333	
C4-N6	1,320	1,326	1,342	1,327	
νC≡N, cm <sup>-1</sup>	2180	2223	2189	2201	2208
νC≡N, cm <sup>-1</sup>	2148	2184	2148	2156	2162

Las medidas de fluorescencia apuntaron a una fuerte rigidez del ligando o-fen con respecto a la coordinación.

Los estudios de especiación permitieron determinar cuáles fueron las especies activas en condiciones fisiológicas (298 K, pH 7,4 y la fuerza iónica 0,150 mol L<sup>-1</sup>(NaCl)). Para el complejo de Cu, resultó la formación en solución de la especie [CuAL]<sup>+</sup>, (con la estequiometría del complejo (2)) la cual fue considerada como especie mayoritaria en los ensayos biológicos efectuados (A = o-fen, L = cnge). En el caso del complejo de Zn, éste mantiene la estequiometría de la sal sólida en solución, siendo la especie [ZnA<sub>2</sub>LH]<sup>2+</sup> mayoritaria en condiciones fisiológicas. Por otra parte, el ión metálico Cd(II) precipita sin coordinar al ligando cianoguanidina, a pH 10 y solución de agua-etanol. Sin embargo, las determinaciones potenciométricas en condiciones fisiológicas dan cuenta de una interacción con cnge, siendo la especie mayoritaria en condiciones fisiológicas: [CdA<sub>2</sub>L]<sup>+</sup>.

La actividad antimicrobiana de los complejos M/fen/cnge se relacionó a la presencia del ligando fenantrolina, cuyo conocido mecanismo de inhibición está basado en la interacción con la molécula de ADN por intercalación. Como ya fue demostrado, el ligando cnge no produjo efectos antibacterianos ni antifúngicos apreciables.

	ZnCl <sub>2</sub>	CuCl <sub>2</sub>	CdCl <sub>2</sub>	Phen	Zn Compl	Cu Compl	Cd Compl
<i>C. albicans</i>	1500	>1500	24	3 >375 <sup>b</sup>	6	12	3

<i>C. albicans</i> ATCC	1500	ND	24	3 >375 <sup>b</sup>	6	ND	3
<i>C. parapsilosis</i>	750	>1500	6	12 3 <sup>b</sup>	12	47	24
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	750	ND	24	12 6 <sup>b</sup>	12	ND	24
<i>C. tropicalis</i>	750	>1500	12	12 1.5 <sup>b</sup>	12	47	12
<i>C. glabrata</i>	1500	ND	<u>3</u>	<u>6</u> 47 <sup>b</sup>	6	ND	<u>3</u>
<i>C. krusei</i>	1500	ND	3	6 47 <sup>b</sup>	12	ND	3
<i>E. coli</i>	188	375	20	12 23 <sup>c</sup>	47	94	23
<i>S. aureus</i>	188	375	22	24 25 <sup>c</sup>	94	24	25
<i>E. faecalis</i>	1500	<b>375</b>	19	<b>94</b> 0.4 <sup>a</sup>	3000	<b>24</b>	23
<i>P. aeruginosa</i>	1500	375	11	375 25 <sup>c</sup>	6000	>1500	25

<sup>a</sup> Ampicilina; <sup>b</sup> Fluconazol; <sup>c</sup> Gentamicina

Como se observa en la Tabla, en general, el complejo con el biometal Zn tiene mayor efecto tóxico frente a bacterias (igualando prácticamente la toxicidad de o-fen) y empeora la toxicidad de o-fen frente a las *Cándidas*. En el caso del complejo del biometal Cu, no se observa efecto benéfico por complejación (sólo frente a *E. Faecalis*). El metal tóxico Cd tiene marcada acción antibacteriana y antifúngica, lo mismo que el ligando o-fen (si bien los mecanismos de acción son diferentes como ya se comentó). La formación de complejos de ambas sustancias mantuvo los efectos antimicrobianos del metal y del ligando por separado. Con respecto a los fármacos comerciales, se observan mejoras en la acción de los complejos con respecto al fármaco antifúngico fluconazol para algunas de las cepas probadas, por lo que estos complejos resultarían promisorios como agentes antifúngicos.

## Capítulo 6

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Caracterización fisicoquímica

##### 1.1. Análisis elemental

Para el análisis elemental de C, H y N se usó un analizador Carlo Erba EA 1108 en el que se produce la combustión de la muestra en un tubo reactor donde es transformada a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>. La separación de los gases se realiza por cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable y para la detección se utiliza un detector de conductividad térmica. El método requiere una calibración previa con una sustancia de composición conocida. En este caso se usaron dos patrones, uno de BBOT (2,5-bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno) y el otro de ácido sulfanílico.

##### 1.2. Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizó mediante el empleo de un sistema termoanalítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50. Se trabajó en atmósfera de O<sub>2</sub> con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El rango de muestra utilizado fue entre 5 y 10 mg. Se empleó Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como estándar para el DTA. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa TASYs.

##### 1.3. 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

##### 1.4. Espectros infrarrojos (FTIR)

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> bajo la forma de pastillas de KBr. Con un total de 60 scans acumulados y una resolución espectral de ± 4 cm<sup>-1</sup>. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa OPUS 4.2.

##### 1.5. Espectros Raman

Los espectros Raman fueron medidos en un espectrofotómetro Bruker IFS 113 FTIR con un accesorio Raman NIR. Para la excitación se utilizó la radiación de un láser de estado sólido Nd:YAG (1064 nm), en el rango entre 3600 y 100  $\text{cm}^{-1}$ . La resolución espectral fue de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ .

### **1.6. Espectros de Reflectancia Difusa**

Los espectros de reflectancia difusa UV-vis para el complejo de Cu fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-300 utilizando el accesorio correspondiente y MgO como estándar.

### **1.7. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)**

Con el objetivo de registrar los espectros del complejo de Cu a distintas temperaturas, se utilizó un espectrofotómetro Bruker ESP300 que opera en banda X (frecuencia=9,5GHz, 3400 Gauss) y banda Q (frecuencia=35GHz, 12500 Gauss) y que está equipado con un estándar de dispositivos de baja temperatura de Oxford (ESR900/ITC4). La ventaja del uso de la banda Q la mejor resolución de sistemas con valores de tensores g similares, la reducción de los efectos de segundo orden en las interacciones hiperfinas, y la observación de transiciones prohibidas, entre otras. Se obtuvo la simulación computarizada de los espectros EPR mediante el programa Simfonia (WINEPR Simfonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, 1996).

### **1.8. Determinación de las estructuras cristalinas**

Las medidas fueron realizadas en un difractómetro automático de 4 círculos Enraf-Nonius CAD-4 equipado con un generador de ánodo giratorio usando un monocromador de grafito con radiación Cu-K $\alpha$ . Cada estructura fue resuelta por método directo con SHELXS-97 y cada modelo molecular fue refinado por el procedimiento en matriz completa por el método de cuadrados mínimos con respecto a  $F^2$  con SHELXS-97, como se menciona en cada capítulo.

## **2. Estudios en solución**

### **2.1. Estudios de estabilidad en solución**

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos en solución, es decir, para asegurar que los mismos fueran agregados a las cepas microbianas sin descomposición, se disolvieron los compuestos en el solvente adecuado y se mantuvieron a 25 °C. Adicionalmente, se estudió la estabilidad simulando condiciones biológicas, es decir, utilizando PBS como solvente mayoritario con hasta un 5% de solventes no acuosos. El estudio se llevó a cabo registrando la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo durante al menos una hora.

### **2.2. Titulaciones potenciométricas**

Para la preparación de las soluciones se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- El NaCl (Merck) se secó hasta peso constante y se almacenó en desecador con  $\text{CaCl}_2$  como agente desecante. Todas las soluciones fueron preparadas bajo atmósfera de nitrógeno con agua tridestilada.
- Se utilizaron soluciones frescas (recientemente preparadas) antes de cada medida realizada.
- Las soluciones de HCl (Merck) se estandarizaron contra TRISMA (Hidroximetilaminoetano) (Anedra).
- Las soluciones de NaOH se prepararon a partir de una solución saturada de NaOH (Merck) y se estandarizaron contra HCl (patrón secundario).
- Las soluciones stock de M(II) fueron estandarizadas con EDTA. La contaminación con carbonato se evaluó mediante el método de Gran.

Las titulaciones se realizaron a 25 °C usando un baño termostático. La fuerza iónica se ajustó a soluciones 0,150 M de NaCl, en atmósfera de nitrógeno. Un pH-metro Schott Gerate TS165 se utilizó para las mediciones de FEM y los volúmenes añadidos se midieron usando una bureta Techware (Sigma) Digitrate (25 ml). Los volúmenes de las alícuotas tituladas fueron siempre 25 ml. Todas las soluciones se prepararon antes de su uso con agua tridestilada fresca, desionizada y libre de carbonatos que se enfrió bajo un flujo constante de nitrógeno. Las soluciones diluidas de HCl (Merck) se estandarizaron contra base Trisma (hidroximetil aminometano). Las soluciones diluidas de NaOH se preparan a partir de una solución de NaOH saturada y estandarizados contra HCl. El electrodo de vidrio se calibró por separado en una solución con  $[\text{H}^+]$  conocidos antes y después de cada titulación. (pH= 2,2 ; 4,0 y 7,0). Los datos se recogieron desde el valor de pH más bajo que se podía llegar en el experimento hasta pH = 12. Se seleccionaron diferentes relaciones de metal-ligando con el fin de evitar la precipitación.

### **2.3. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil**

Este método se utilizó para el complejo de cobre por la capacidad redox del biometal y consiste en generar el radical superóxido a través del sistema fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Esos radicales son capaces de reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. Por lo tanto se determina la habilidad que tiene el complejo, los ligandos libres o los cationes Cu(II).

La mezcla de reacción contiene 0,5 ml de muestra (en distintas concentraciones), 0,5 ml de NADH (1,4 mM) y 0,5 ml de NBT (300  $\mu\text{M}$ ) en buffer fosfato 0,1M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,4). Se incuban los tubos a 25 °C por 15 min y se inicia la reacción agregando 0,5 ml de PMS (120  $\mu\text{M}$ ), luego de 5 min se lee la absorbancia a 560 nm y se compara con el blanco. La concentración de complejo que produce



un 50 % de inhibición ( $IC_{50}$ ) fue obtenida a partir de la construcción del gráfico de porcentaje de inhibición de la reducción de NBT versus  $-\log$  de la concentración de los compuestos utilizando un asistente de regresión sigmoideo provisto por el programa Sigmaplot.

#### **2.4. Capacidad inhibitoria de la enzima fosfatasa alcalina (FAL)**

El efecto de los ligandos el cobre y el complejo (2) en la variación de actividad de FAL fue determinado mediante espectroscopía UV-vis. La reacción se inicia con la adición del sustrato para-nitrofenil fosfato (p-NPP) y se mide la aparición del producto p-nitrofenol por los cambios de absorbancia a 405 nm. Se disuelven 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ALP bovina de intestino y p-NPP 5 mM en el buffer de incubación (glicina 55 mM +  $\text{MgCl}_2$  0,55 mM, pH = 10,5) y se deja 10 minutos. Los efectos de los compuestos se determinaron por agregado de diferentes concentraciones de cada uno (1–100  $\mu\text{M}$ ) a la mezcla pre-incubada. Las medidas se realizan por triplicado. La velocidad inicial, en ausencia de compuestos agregados ( $V_0$ ), se determina como la velocidad de hidrólisis de p-NPP a 37 °C y pH = 10,5. Las velocidades enzimáticas de inhibición por los compuestos,  $V_i$ , se determinaron mediante el agregado de las diferentes concentraciones de los compuestos estudiados.

### **3. 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 testeado.

#### **3.1. Cepas de bacterias y hongos**

Se emplearon las cepas descritas en la introducción y se determinaron los halos inhibitorios o las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los compuestos frente a bacterias y hongos. 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 Brithania<sup>15</sup>. 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  $-20^\circ\text{C}$ ). 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.

### **3.2. 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<sup>8</sup> 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.

### **3.3. 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 µg/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 Bioseguridad Biológica clase II tipo A2 y se recoge el filtrado en tubos eppendorf estériles.

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

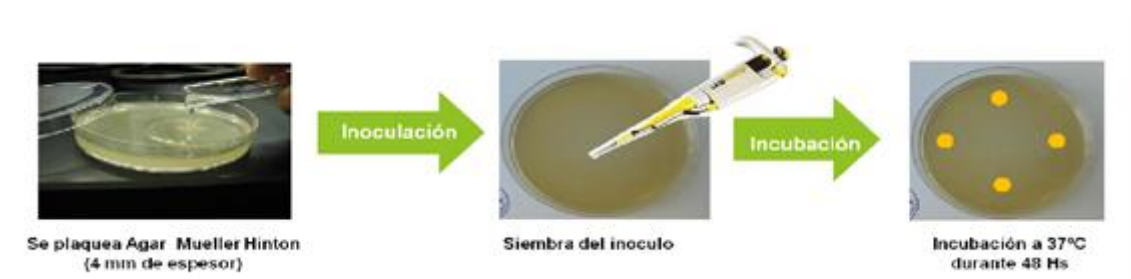
Se determinó la CIM para cada compuesto frente a las bacterias y hongos seleccionados. Luego de la preparación de las diluciones dobles seriadas, se colocaron 0,5 mL de cada una de ellas en un tubo conteniendo 4,5 mL de agar MH estéril previamente fundido y mantenido a una temperatura de 50°C, se agitaron 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.

### 3.5. Determinación de los halos de inhibición por el método de difusión en agar

Cada inóculo bacteriano puro diluido en con caldo MH (McFarland estándar) se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar MH de 4mm de espesor de una placa de Petri utilizando un hisopo estéril de algodón.

Cada disco fue impregnado con un volumen de entre 20 y 60  $\mu\text{L}$  de las soluciones 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  en DMSO / agua estériles de cada compuesto a ensayar. Las placas, así acondicionadas, se incubaron durante 18 h en estufas de cultivo a una temperatura entre 35-37  $^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo de incubación, se examinaron las placas en busca de halos de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los discos. Los discos que contenían compuestos a los que la cepa en estudio se considera sensible, muestran zonas claras a su alrededor. Se midió el diámetro en mm de esa zona circular y se evaluó cualitativamente:



Los valores reportados son el promedio de al menos tres determinaciones independientes.

## 4. Metodología computacional

Los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 09. Las estructuras moleculares de los ligandos y de los complejos metálicos fueron completamente optimizadas en varios niveles: HF/3-21G\*, B3LYP (Beck three-parameters hybrid exchange-correlation functional) que incluye el efecto de correlación de electrones usando el funcional y empleando 6-31G (d, p) y 6-31 + G (d, p) como conjunto base y se calcularon las desviaciones medias de la raíz cuadrada (RMSD) usnso el paquete Qmol para comparar las estructuras teóricas con las experimentales obtenidas por difracción de rayos-X. El análisis topológico de la densidad electrónica derivado de la teoría AIM se realizó utilizando el paquete PROAIM y los resultados se evaluaron en

términos de la densidad electrónica ( $\rho_b$ ), el Laplaciano de la densidad electrónica ( $\nabla^2\rho_b$ ), la elipticidad del enlace ( $\varepsilon$ ) y la densidad de energía electrónica local del sistema ( $E_b$ ) evaluados en los puntos críticos de enlace (PCE).

Se realizaron cálculos vibracionales en el mismo nivel de teoría para determinar la consistencia del mínimo de la superficie de energía potencial y para asignar el espectro teórico vibracional. Para los cálculos vibracionales (en los casos que fueron realizados) se tuvo en cuenta la presencia de tautómeros de cianoguanidina en la optimización del ligando y del complejo y se calcularon los porcentajes de la contribución de cada uno de los tautómeros, para poder promediar cada espectro pesando la contribución de cada especie.

## ANEXO

### Publicaciones

- 1) E.G. Ferrer, L.L. López Tévez, N. Baeza, M.J. Correa, N. Okulik, L. Lezama, T. Rojo, E.E. Castellano, O.E. Piro, P.A.M. Williams. "Molecular structure, bioavailability and bioactivity of  $[\text{Cu}(\text{o-phen})_2(\text{cnge})](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Cu}(\text{o-phen})(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2]$  complexes" *J. Inorg. Biochem.*, 101, 741-749 (2007).
- 2) Leonor L. López Tévez, Juan J. Martínez Medina, María S. Islas, Oscar E. Piro, Eduardo E. Castellano, Liliana Bruzzone, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams. "Antibacterial activity assays of a new cadmium complex with o-phenanthroline and cyanoguanidine. Crystal structure, fluorescence properties and chemical speciation studies." *J. Coord. Chem.* 64, 3560-3574 (2011). ISSN: 0095-8972
- 3) Leonor L. López Tévez, María S. Islas, Juan J. Martínez Medina, Maximiliano Diez, Oscar E. Piro, Eduardo E. Castellano, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams. "Structural, spectral and potentiometric characterization and antimicrobial activity studies of the new Zn(II) complex:  $[\text{Zn}(\text{phen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ". *J. Coord. Chem.* 65, 2304-2318 (2012)
- 4) J.J. Martínez Medina, M.S. Islas, L.L. López Tévez, E.G. Ferrer, N.B. Okulik, P.A.M. Williams "Copper(II) complexes with cyanoguanidine and o-phenanthroline: theoretical studies, *in vitro* antimicrobial activity and alkaline phosphatase inhibitory effect." *J. Mol. Struct.* 1058, 298-307 (2014).
- 5) Juan J. Martínez Medina, Carola A. Torres, Walter S. Alegre, Carlos A. Franca, Libertad L. López Tévez, Evelina G. Ferrer, Nora B. Okulik, Patricia A.M. Williams. "DFT calculations, *in vitro* antifungal activity, genotoxic effects and acute toxicity of the  $[\text{Zn}(\text{phen})_2(\text{cnge})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  complex." *J. Mol Struct.*, 1100, 366-375 (2015).

### Comunicaciones a congresos

- 1) XXVI Congreso Argentino de Química, San Luis, Argentina, 13-15 de septiembre de 2006. "Análisis de la formación de diferentes especies en fase sólida y en solución: sistema Cu(II)-fenantrolina-cianoguanidina". Libertad López Tévez, Nora Okulik, Luis Lezama, Teófilo Rojo, Evelina Ferrer, Patricia Williams.

- 2) XXVII Congreso Argentino de Química. San Miguel de Tucumán. 17-19 de septiembre 2008. "Estudio del sistema Zn(II)-fenantrolina-cianoguanidina en solución y en fase sólida". L.L. López Tévez, E.A. Fernández, N.B. Okulik, M.M. Pérez, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams.
- 3) XVI Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica. Salta. 18-21 de mayo de 2009. "Estudio teórico de dos complejos con centro de cobre(II)" Leonor López Tévez, Nora Okulik, Patricia Williams y Evelina Ferrer.
- 4) XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal, Universidad Nacional de Lanús, 13-16 de septiembre de 2010. "Caracterización del sistema Cd-fenantrolina-cianoguanidina en fase sólida y en solución". Leonor L. López Tévez, María S. Islas, Oscar E. Piro, Eduardo E. Castellano, Liliana Bruzzone, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.
- 5) 31 Congreso Latinoamericano de Química CLAQ-2014 y XXVII Congreso Peruano de Química, 14-17 de octubre 2014, Lima, Perú. "Computational study and antifungal activity, genotoxicity and acute toxicity determinations of the  $[Zn(fen)_2(cnge)(H_2O)](NO_3)_2 \cdot H_2O$  complex." J.J. Martínez Medina, W.S. Alegre, C.A. Torres, L.L. López Tévez, N.B. Okulik, C.A. Franca, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams.
- 6) III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. 5-7 de agosto de 2015. Santa Fe, Argentina. "Determinación de la actividad antifúngica del complejo de Cadmio con cianoguanidina y orto-fenantrolina  $[Cd(o-phen)_2(SO_4)(H_2O)](cnge) \cdot 5H_2O$ ." W.S. Alegre, J.J. Martínez Medina, L.L. López Tévez, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams.