

# Tesis de Doctorado en Química

## Desarrollo de nuevos complejos metálicos con potencial actividad anti *Trypanosoma cruzi*

**Bruno Demoro**

Directoras: Dras. Dinorah Gambino y Lucía Otero

Cátedra de Química Inorgánica  
Facultad de Química – Universidad de la República

Diciembre 2016

*“Vamos a fallar, y fallar de nuevo, hasta que lo logremos”*

Dr. Alejandro Zaffaroni

A mi padre, en lo profesional, por ser el mejor ejemplo de trabajo, dedicación y seriedad y, en lo personal, por su generosidad incondicional.

A mi madre, por ser el ejemplo más lindo de simpatía, calidez y sencillez.

A Ro y Dani, por darle estilo y Buenos Aires a mi vida!

A Guido y Natasha, por darme los mejores regalos con Emma y Lucas y el título de Tío que orgullosamente ostento.

A titi y al tío, por la música y el arte que compartimos.

A mis hermanos de todo menos de sangre: Pelu, Pera y Cono.

A Andrés Tarragó y Andrés Barbery, por los caminos.

A Dinorah, por las herramientas que me brindaste, por Portugal y por ser lo más expeditivo que conocí en mi vida.

A Lucía, por toda la paciencia, por todo lo que me diste y por enseñarme a ver en la sencillez una virtud.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Química Inorgánica, hoy en día una familia.

A toda la gente de Facultad de Química, Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, IST Lisboa y Universidade de Lisboa.

A la ANII, PEDECIBA y RIDIMEDCHAG-CYTED que hicieron posible este trabajo.

# Índice General

Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Propuesta.....	50
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	57
Capítulo 4. Complejos metálicos con bisfosfonatos bioactivos frente a <i>T. cruzi</i> .....	97
Capítulo 5. Complejos Ru- <i>p</i> -cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano.....	154
Capítulo 6 . Conclusiones y perspectivas.....	254
Anexo I. Material suplementario de Capítulo 4	
Anexo II. Material suplementario de Capítulo 5	



# Capítulo 1

# Contenido y propuesta

## 1.1 Introducción

1.1.1 Enfermedades tropicales desatendidas

## 1.2 Enfermedad de Chagas

1.2.1 Distribución

1.2.2 El parásito y su transmisión

1.2.3 Manifestaciones clínicas

1.2.4 Importancia médica y social

1.2.5 Control y prevención

1.2.6 Quimioterapia actual y sus limitaciones

1.2.7 Blancos para fármacos tripanosomicidas

1.2.8 Nuevos enfoques racionales y avances en la actualidad

## 1.4 Química Inorgánica Medicinal

1.4.1 Generalidades

1.4.2 Compuestos metálicos con actividad anti *T. cruzi*

## 1.5 Bibliografía

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1.1 ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS**

Las enfermedades catalogadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades tropicales desatendidas (NTDs: Neglected Tropical Diseases) impactan en la vida de millones de personas en todo el mundo y amenazan la salud de muchos otros millones. Las NTDs afectan a más de mil millones de personas (una sexta parte de la población mundial) y tienen un costo económico de más de un billón de dólares al año [1].

Casi el 100 % de estas enfermedades abarcan estrictamente a la región americana, pero también han sido encontrados casos en Europa y otras partes del mundo debido a la inmigración internacional y la globalización del capital humano de trabajo. En su mayoría, estas enfermedades debilitan a las poblaciones empobrecidas; la falta de conocimiento sobre estas enfermedades entre la comunidad y los gobiernos, así como el impacto sanitario y socioeconómico acumulativo se encuentra poco cuantificado y entendido. Usualmente no se ven como problemas de salud pública por el sector sanitario ya que no representan una emergencia epidemiológica en la mayoría de los casos.

El descubrimiento de fármacos para combatir las NTDs todavía es escaso. Durante años los bajos rendimientos de las inversiones en esta temática han desalentado a las compañías farmacéuticas para llevar adelante proyectos de investigación dedicados al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de las NTDs. Sin embargo, actualmente la evaluación de su impacto en la salud pública y la economía ha convencido a los gobiernos, la industria farmacéutica y otros organismos, incluidas las organizaciones no gubernamentales de invertir en la prevención y el control de este grupo diverso de enfermedades.

Las enfermedades tropicales abarcan todas las enfermedades que se producen únicamente, o principalmente en los trópicos. En la práctica, el término se toma a menudo para referirse a las enfermedades infecciosas que prosperan en ambientes cálidos y húmedos. Estas enfermedades contribuyen a las “trampas de pobreza”, en las cuales los individuos afectados ya se encuentran en situación de pobreza (tanto en

áreas rurales como urbanas). Una vez infectados, éstos presentan una capacidad física y energía vital reducida resultando en un impedimento más para que, en el caso de los adultos, puedan desempeñar su capacidad laboral, así como en el caso de los menores de edad, poder asistir a clases o completar sus estudios. Las familias con individuos infectados pueden ver a un adulto joven morir repentinamente en la primera etapa de sus años económicamente productivos, y de esa manera la familia pierde un ingreso fundamental, pasando a engrosar los cinturones de pobreza de la sociedad.

La organización panamericana de la salud (PAHO) y la OMS listan como enfermedades tropicales desatendidas a las siguientes, entre otras [1]:

- úlcera de Buruli
- enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)
- enfermedad del sueño (Tripanosomiasis africana humana)
- cisticercosis
- dengue/dengue hemorrágico
- dracunculosis (enfermedad del gusano de Guinea)
- equinococosis
- fascioliasis
- leishmaniasis
- lepra
- filariasis linfática
- oncocercosis
- rabia
- esquistosomiasis
- helmintiasis
- tracoma

En este listado es posible reconocer una serie de enfermedades parasitarias e infecciosas. Este tipo de enfermedades son de especial interés debido a su alta incidencia en el global de las enfermedades a nivel mundial (Figura 1) y a su incidencia en las poblaciones de más bajos recursos como son las de la región latinoamericana (Figura 2).

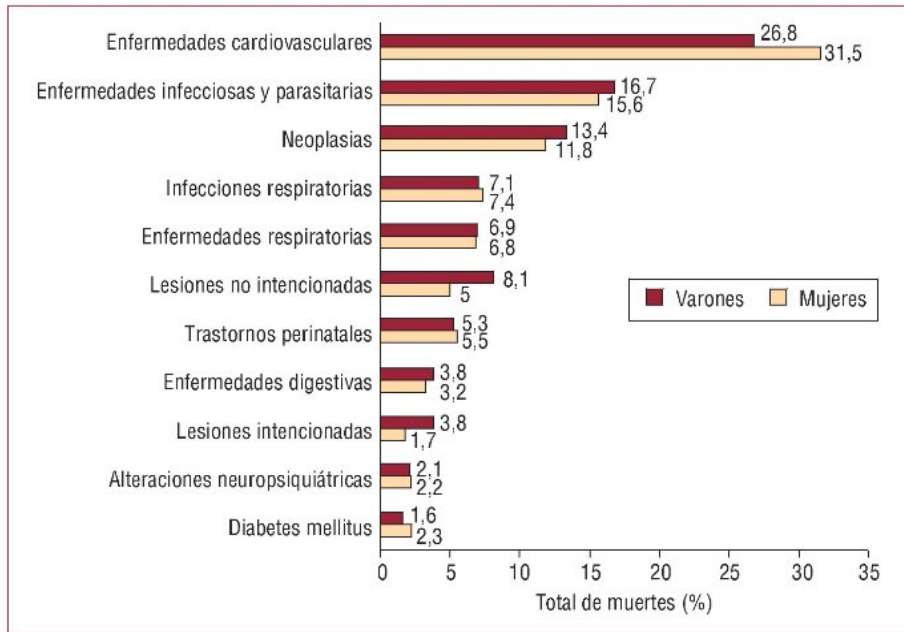


Figura 1: Incidencia de diferentes enfermedades indicando diferencias por sexo.

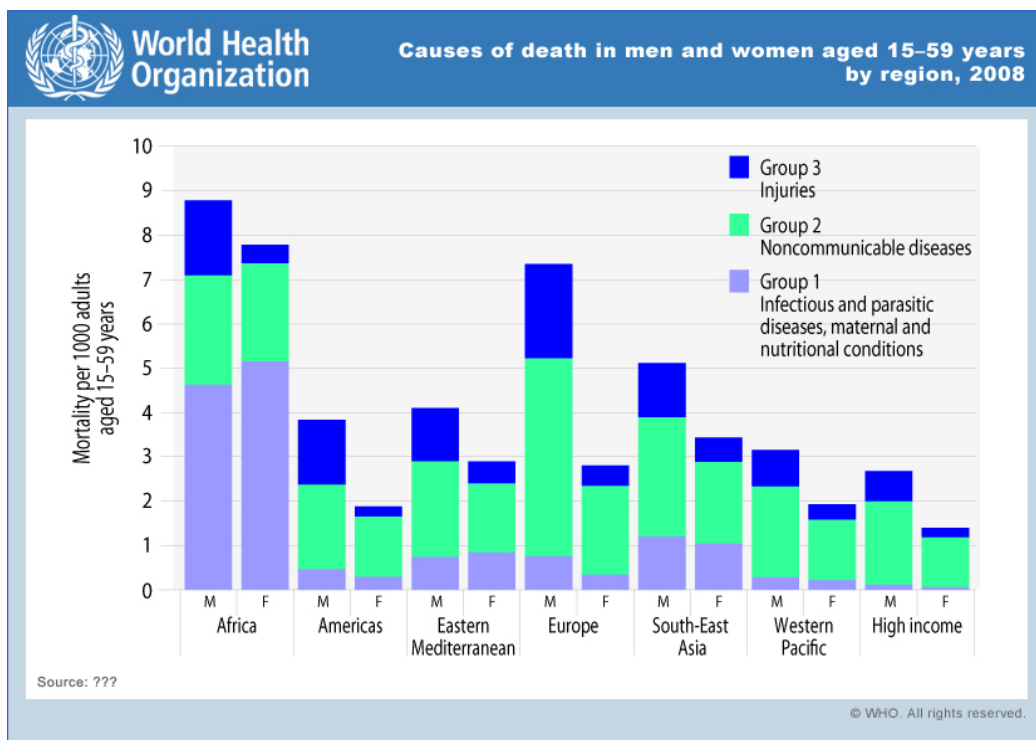


Figura 2: Incidencia de las enfermedades infecciosas y parasitarias en diferentes regiones.

Entre las NTDs, hay un grupo de enfermedades, cuyo agente etiológico pertenece a la familia taxonómica *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, que son responsables de las infecciones parasitarias concentradas en las regiones más pobres del planeta, principalmente en las zonas rurales. En particular, los tripanosomas son responsables de la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), y la enfermedad del sueño

en África (*Tripanosomiasis africana humana*), mientras que *Leishmania spp* es responsable de infecciones cutáneas y viscerales de naturaleza endémica en 88 países en el norte de África, el sur de Asia, y América Latina. Tanto la enfermedad de Chagas como la leishmaniasis afectan de forma singular a la región latinoamericana (Figura 3).

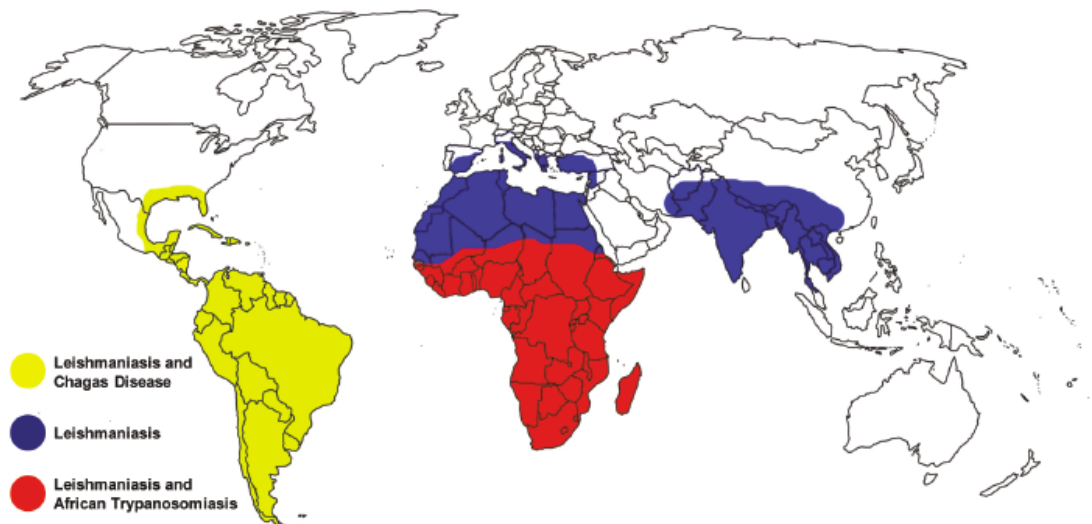


Figura 3: Regiones afectadas por las enfermedades producidas por protozoarios tripanosomátidos.

Debido a su presencia en países de bajo ingreso medio, la tripanosomiasis y la leishmaniasis no son adecuadamente atendidas por la sociedad occidental, a pesar de que la enfermedad de Chagas, la enfermedad del sueño y la leishmaniasis visceral son las tres NTDs con las tasas más altas de muerte. Por estas razones, la OMS las caracteriza como las más desafiantes de las NTDs [1,2].

## 1.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS

La *Tripanosomiasis americana* o enfermedad de Chagas debe su nombre al científico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, quién describió por primera vez la enfermedad en 1909 (Figura 4) [3].



Figura 4: Dr. Carlos Chagas (1879-1934).

Es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) transmitido al humano a través del vector triatómido, comúnmente denominado, “vinchuca”. Es una endemia parasitaria que se presenta principalmente en América Latina, distribuida desde el sur de Méjico hasta Argentina y Chile (Figura 3), causando importantes pérdidas tanto materiales como humanas [1-3]. Como ya fue mencionado anteriormente, el riesgo de infección con la enfermedad de Chagas está directamente relacionado con la pobreza: la vivienda rural pobre latinoamericana (paredes de barro, techos de paja, tablas de madera), así como la presencia de gallineros y chiqueros, proporciona con frecuencia un hábitat apropiado para los insectos que transmiten la enfermedad.

### 1.2.1 DISTRIBUCIÓN

Los orígenes y la distribución de esta enfermedad datan desde épocas precolombinas, pues se han encontrado indicios de la presencia de *T. cruzi* en momias de más de 4000 años de antigüedad; no obstante, se cree que la asociación *T. cruzi*-triatóminos-seres humanos se originó 2000 años a.C.

Según los datos relevados por la OPS y la OMS se estima que entre 6 y 8 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* [1-3] con aproximadamente 50.000 nuevos casos anualmente donde 12.500 personas mueren al año, principalmente en América Latina donde esta enfermedad es endémica. Se estima que el 13% de la población latinoamericana está en condiciones de riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas

cardíaca, mientras que un 40-60% de éstos presentarán cardiopatía chagásica y un 5-35% tendrá megaesófago y/o megacolon [1-3].

Si bien la enfermedad puede ser detectada en gran parte del continente americano, es más frecuente en 21 países de América del Sur y Central (Figura 5) y en la actualidad hay un total de 13 países considerados endémicos de esta parasitosis.

Es importante destacar que esta enfermedad, que originalmente se confinó casi exclusivamente a América Latina, ahora se ha extendido a otros continentes debido a la emigración de personas infectadas y a la ausencia en los países receptores de controles en los bancos de sangre y de órganos y a la transmisión vertical. En particular, en las últimas décadas se ha detectado un número creciente de casos en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países de Europa y algunos países del Pacífico Occidental.

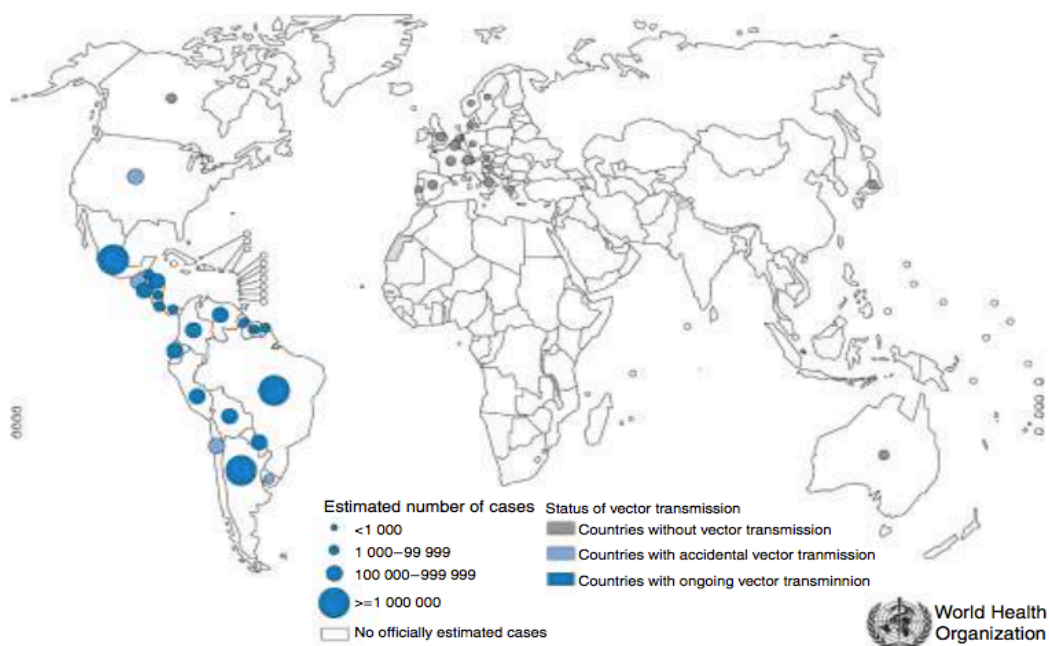


Figura 5: Distribución de la enfermedad de Chagas.

### 1.2.2 EL PARÁSITO Y TRANSMISIÓN

El parásito monoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Como fue mencionado previamente, la enfermedad es transmitida al hombre y a otros huéspedes mamíferos por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, conocidos vulgarmente como “vinchucas”.



Existen 140 especies de triatominos; sin embargo, cada región posee vectores principales de la enfermedad [4]. En el Cono Sur, el principal vector es el *Triatoma infestans* (Figura 6), responsable del 85% de los casos (transmisión vectorial) [1,2,5,6].



Figura 6: Insecto vector: *Triatoma infestans*.

En Centroamérica, la especie predominante es *Rhodnius prolixus* y el *Triatoma dimidiata* se encuentra diseminado desde el centro de México hasta Panamá, registrándose también focos en partes de Colombia, Venezuela, Ecuador y el norte de Perú [1-3].

El *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo, que involucra estadios proliferativos tanto en el vector (epimastigotas) como en el huésped vertebrado (amastigotas), y estadios infecciosos, no-proliferativos (tripomastigotas) presentes también en ambos (Figura 7) [7].

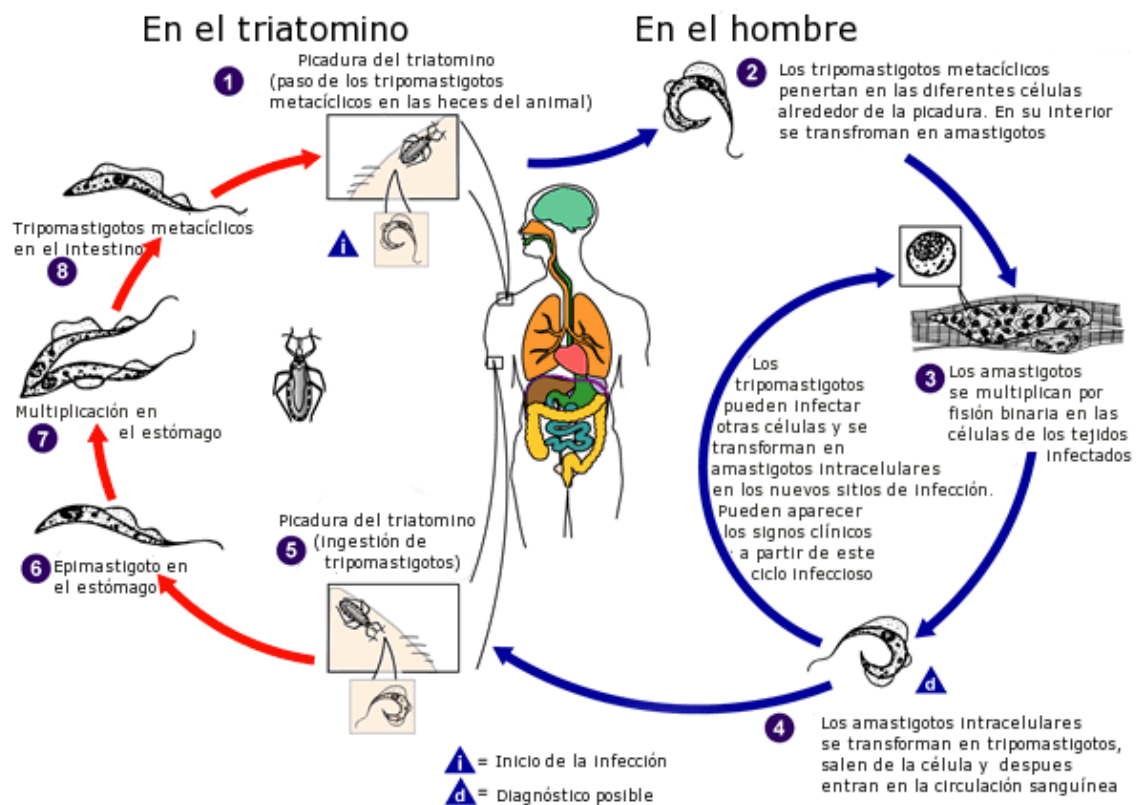


Figura 7: Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*.

La etapa en el huésped vertebrado (hombre o animal) se inicia con los parásitos (tripomastigotas metacíclicos), evacuados en las heces del insecto vector durante su picadura. Estas heces contaminadas pueden entrar al organismo a través de la herida, otras áreas de la piel lesionada o a través de las membranas mucosas, incluyendo la conjuntiva o la mucosa oral/digestiva, y así ocurre la transmisión vectorial. Los parásitos ingresan al organismo cuando la persona instintivamente frota la picadura, los ojos, la boca, o cualquier lesión en la piel. Una vez ingresados, invaden las células del huésped y pierden su flagelo convirtiéndose en la forma amastigota bajo la que se reproducen por división binaria hasta que terminan por destruir la célula que las alberga. Los amastigotos son liberados al torrente sanguíneo transformándose nuevamente en tripomastigotos. Estos tripomastigotos circulantes pueden invadir otras células y el proceso puede repetirse varias veces.

El ciclo en el invertebrado comienza cuando la vinchuca succiona la sangre de un hombre o animal infectado. Los tripomastigotos sanguíneos pasan al tubo digestivo del insecto y allí se transforman en epimastigotas. Se multiplican aumentando extraordinariamente su número y llegan finalmente al recto donde se transforman en

tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva) y son evacuados con las deyecciones del insecto. Las formas metacíclicas atraviesan las mucosas del huésped a través de las heridas dejadas por la picadura, recomenzando el ciclo [6].

Existe un ciclo doméstico que se cumple entre triatominos domiciliarios, como el *Triatoma infestans*, y el hombre, perro o gato y un ciclo silvestre entre triatominos silvestres como *Triatoma rubrovaria* y animales también silvestres como zorros, comadrejas, armadillos entre otros.

Además de la transmisión vectorial mencionada, la enfermedad puede transmitirse al hombre por otras dos vías alternativas [8,9]:

- Transmisión transfusional (5-20%): a través de la utilización de sangre infectada o derivados. Es la forma de transmisión más común en zonas urbanas.
- Transmisión congénita (0,5-8%): de la madre al hijo en gestación.

Otros medios de transmisión secundaria incluyen la contaminación en el trabajo con animales así como la transmisión accidental en el trabajo de laboratorio y el trasplante de órganos [1]. El nivel de contaminación en bancos de sangre en América Central y América del Sur supera a la del SIDA o la hepatitis, y cabe destacar que la transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral a través de alimentos mal cocidos que contengan heces de un insecto infectado, está teniendo una importancia creciente [10].

### **1.2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

#### *Diagnóstico*

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede dividirse en pruebas o métodos directos e indirectos. Con las pruebas directas se busca detectar la presencia del parásito en sangre; entre éstas pueden mencionarse: el *xenodiagnóstico* es un método muy sensible y específico en la fase aguda y con menor alcance en la fase crónica (poco usado en la actualidad); el *microhematocrito* es altamente sensible y específico y posee una sensibilidad de aproximadamente 95%; el *hemocultivo* tiene una sensibilidad de 40% y requiere un período largo para detectar la presencia de parásitos [11].

Por su parte, con los métodos indirectos se detecta la presencia de anticuerpos. Actualmente se utilizan la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ELISA de parásitos totales o recombinantes, con sensibilidades y especificidades próximas a 100%, así como la aglutinación directa y la hemoaglutinación indirecta con muy bajas sensibilidades. Si bien la técnica de PCR aún no se utiliza como técnica de diagnóstico a escala, esta técnica detecta bajas cantidades de parásitos en sangre y tejidos, por lo cual posee una sensibilidad mayor que todas las pruebas previamente mencionadas [11].

### *Síntomas y signos*

Usualmente los síntomas generales de la enfermedad de Chagas se presentan como signos característicos de la enfermedad pero simultáneamente con ellos pueden presentarse manifestaciones clínicas generales, tal cual sucede por ejemplo con la *fiebre*. La presencia, variedad e intensidad de los mismos varía significativamente de un enfermo a otro. La mayoría de los casos presentan muy escasa sintomatología específica, todo lo cual explica las dificultades diagnósticas y la existencia de la enorme cantidad de casos que pasan inadvertidos [1-3].

La enfermedad de Chagas en el hombre presenta dos fases: una fase aguda y una fase crónica.

La *fase aguda inicial*, se desarrolla inmediatamente después de la infección. Se observa una pequeña llaga en la zona de la picadura. Luego de un período de incubación, que puede llevar de 5 a 7 días (aceptándose que en algunos casos pueda llegar a 10 o 12 días) comienza la etapa aguda de la enfermedad que dura alrededor de dos meses [1-3]. Durante esta fase, un gran número de parásitos circulan en la sangre. La mayoría de las veces esta fase es asintomática, pero dependiendo del sitio de la inoculación, el primer signo puede ser un chancro en la piel (chagoma) o edema orbital unilateral morado (signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre durante varias semanas. Puede estar acompañado, entre otros, por dolor de cabeza, palidez, mialgias, disnea, edema de miembros inferiores o en la cara, dolor abdominal, tos, hepatomegalia, exantema, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, linfadenopatías múltiples, miocarditis (dolor en el pecho, insuficiencia

cardíaca) y más raramente meningoencefalitis (convulsiones, parálisis). La morbilidad puede ser mayor en niños menores de cinco años, ancianos, inmunodeprimidos o en los casos de inóculos con alto contenido del parásito, tal como se ve en los casos de transmisión oral por alimentos contaminados.

Luego de la fase aguda existe un largo período entre 10 y 30 años, en el cual se encuentran la mayor parte de los pacientes infectados (aproximadamente el 70%). Es la denominada *fase crónica*. Esta fase, con parásitos ocultos en los tejidos - en especial el corazón y el músculo liso digestivo- tiene diferentes formas clínicas posibles:

- a) *asintomática* (forma indeterminada), con más frecuencia en el inicio de la fase crónica y de duración de por vida en la mayoría de los pacientes;
- b) *forma cardíaca*, ocurre en hasta el 30% de los pacientes. Una vez constituida la miocardiopatía crónica chagásica se exterioriza por insuficiencia cardíaca, arritmias y tromboembolismo, manifestaciones clínicas que tienen la posibilidad de producir incapacidad física y muerte del paciente [1-3]. Este tipo de miocardiopatía chagásica no se ve en Uruguay desde hace casi 30 años [12].
- c) *forma con lesiones digestivas* (megaesófago y megacolon) o formas mixtas (cardíaco más digestivo) que se observa en un 10% de los pacientes [1-3]. Si bien el megaesófago o megacolon es una alteración que puede corresponder a otras enfermedades, en las zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica su prevalencia es mucho mayor. No obstante la frecuencia con la que se observa esta patología es mucho menor que la de la cardiopatía chagásica [1-3].

#### **1.2.4 IMPORTANCIA MÉDICA Y SOCIAL**

Estudios de la Organización Mundial de la Salud indican que la morbilidad y mortalidad asociadas a la enfermedad de Chagas son un orden de magnitud mayores que las correspondientes a otras enfermedades parasitarias como malaria, esquistosomiasis o leishmaniasis [2,13]. El costo social y económico que trae aparejado esta enfermedad

es significativo. En las Américas, los cuidados médicos de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica podrían ser de alrededor de 267 millones de dólares por año, a pesar de que la mayoría de enfermos no recibe los cuidados adecuados. La disminución en la expectativa de vida, la incapacidad laboral y los gastos en atención médica y en programas de control se suman a una carga ya difícil de afrontar, sobre todo para los países subdesarrollados [2].

La enfermedad de Chagas debería ser considerada de importancia en salud pública debido a su magnitud y trascendencia [14].

La *magnitud* puede ser medida por:

- Amplia distribución, tal como se demuestra en la Figura 5.
- Transmisión domiciliar desde el sur de Estados Unidos de América hasta la provincia de Chubut en Argentina.
- Capacidad de ir más allá de los límites establecidos en la geografía.
- Gran cantidad de infectados: 6 a 8 millones de portadores de la infección y 25 a 90 millones expuestos al riesgo (Figura 5).

La *trascendencia* se observa en:

- Los daños clínicos que sufren los pacientes.
- El tratamiento comprobadamente ineficaz, con excepción de infecciones recientes.
- La letalidad elevada en la fase crónica (15.000 óbitos en la última década).
- Su característica incapacitante, generalmente en la edad más productiva del paciente.
- Las pérdidas por enfermedad, que alcanzan 2,6 millones de años de vida perdidos por incapacidad.
- Su vulnerabilidad al control.

### **1.2.5 CONTROL Y PREVENCIÓN**

Toda posibilidad de prevención de la enfermedad de Chagas, de *carácter primario*, está dirigida a los vectores, que representan el único eslabón vulnerable en la cadena de transmisión de la enfermedad. Lo que se puede pretender, de forma concreta, es

reducir las oportunidades de contacto entre el hombre y el vector infectado o, en algunos casos, impedir que este contacto ocurra.

Las principales formas de prevenir la transmisión vectorial son dos: a través del control químico de las poblaciones domiciliadas de triatominos, mediante el empleo regular y sistematizado de insecticidas de acción residual en áreas contiguas y progresivamente crecientes. Esta medida de protección específica puede tener un empleo prolongado, en función de los costos relativamente reducidos y los resultados inmediatos.

La otra medida, el *control físico*, se basa en la mejoría y reestructura habitacional, o la sustitución de casas como suele ser habitual, presentando otro alcance que no es exclusivamente el control de la enfermedad de Chagas. Este control tiene un carácter *promocional*, no siendo simplemente sanitario, sino que también de calidad de vida, en general, de las poblaciones en riesgo [1-3].

En 1991 los ministros de salud de los países de América del Sur “Cono Sur” (Brasil, Chile Uruguay, Paraguay, Argentina y Bolivia) pusieron en marcha una iniciativa para eliminar el insecto vector de la enfermedad y así evitar la transmisión vectorial de la misma en esos países (programa INCOSUR-OMS). A partir de esa iniciativa, la situación en el Cono Sur tuvo la siguiente evolución [1-3]:

- 1997 – Uruguay. Interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi*.
- 1999 – Chile. Interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi*.
- 2001 – Argentina. Interrupción de la transmisión vectorial en cinco provincias: Jujuy, Neuquén, Río Negro, La Pampa, Entre Ríos.
- 2002 – Paraguay. Interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans* en el Departamento de Amambay.
- 2007 – Brasil. Interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans*.
- 2013 – Uruguay. Eliminación del *Triatoma infestans* como problema de salud pública.
- Bolivia presenta transmisión activa en todo su territorio.

Además del éxito en la interrupción de la transmisión vectorial en vastas extensiones de América, se han dado mejoras en la calidad de vida y estabilidad social en algunas regiones rurales, ha habido un cambio en torno a la percepción de la enfermedad, una

disminución de los casos congénitos y agudos y una mayor afluencia de pacientes a las consultas.

Sin embargo, aún persisten debilidades, como que la transmisión sigue ocurriendo en varios países, e incluso podría estar aumentando en algunas partes de Argentina, Venezuela, y en partes de la región amazónica [2]. En Perú, Colombia y Costa Rica aún no tienen un programa nacional para el control de los vectores de la enfermedad de Chagas y los programas para el cribado de donantes de sangre siguen estando muy por debajo de las metas en Bolivia, Ecuador, Perú, Costa Rica y México [2].

Además, en otros estudios se ha estimado que de un total de 6 millones de inmigrantes indocumentados, varios miles podrían estar infectados con *T. cruzi*, por lo que los países no endémicos que reciben estos inmigrantes deberían establecer claras políticas en el control de sangre, el trasplante de órganos y la implementación de un sistema de prevención de Chagas congénito [15].

En Uruguay, la enfermedad de Chagas y su erradicación está bajo la supervisión de la *Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis* y de la *Comisión Nacional Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis*. Como se mencionó previamente, desde 1997 la transmisión vectorial de *T. cruzi* se encuentra interrumpida, no registrándose nuevos casos agudos por esta vía desde 1984 y se ha logrado la eliminación de *Triatoma infestans* en todo el país desde el año 2013 [2].

La transmisión transfusional se encuentra controlada por la obligatoriedad del control de sangre a transfundir (prueba obligatoria por ley desde el año 1985 en el 100% de los donantes). La única vía de transmisión actualmente en el país es la vía de transmisión congénita. La forma congénita es curable.

Aunque la transmisión de la enfermedad de Chagas se encuentra prácticamente detenida en Uruguay, se estima que existen aún 50.000 personas infectadas por *T. cruzi* en nuestro país (Figura 8) [1-3]. La detección de un caso agudo es muy importante y un dato positivo debe notificarse a Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública [15].



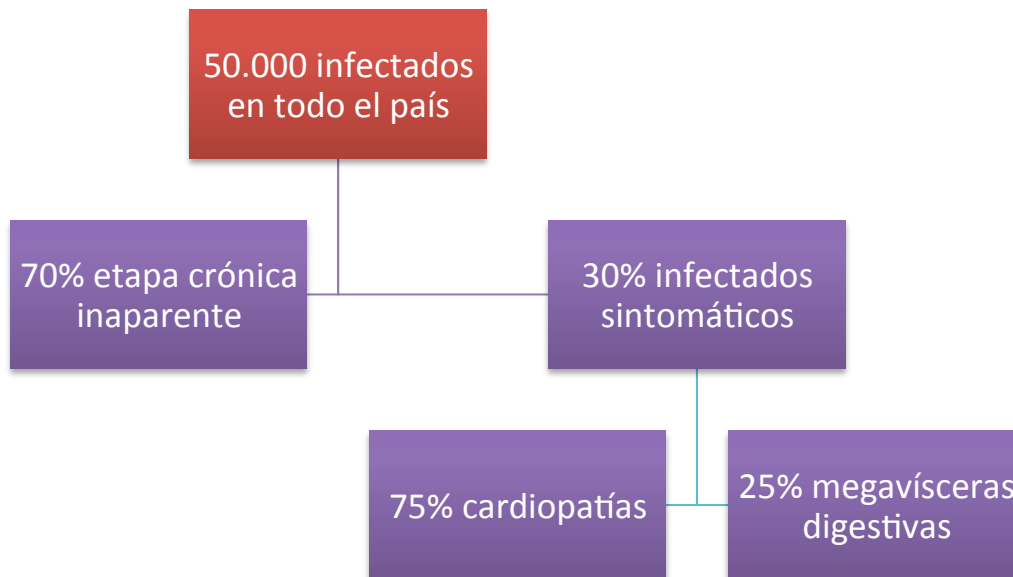


Figura 8: Estimación de infección por *T. cruzi* y casos clínicos de enfermedad de Chagas en Uruguay.

Si bien se han expuesto los avances logrados en el control, así como en la transmisión vectorial y transfusional, la falta de vacunas, así como de una farmacoterapia eficaz para curar a los millones de individuos ya infectados es aún un desafío pendiente [13,16,17].

### 1.2.6 QUIMIOTERAPIA ACTUAL Y SUS LIMITACIONES

Actualmente no se cuenta ni con una vacuna, ni con un tratamiento efectivo para la enfermedad de Chagas. La quimioterapia actual de la enfermedad de Chagas se limita fundamentalmente a dos compuestos nitroheterocíclicos: nifurtimox y benznidazol (Figura 9). El nifurtimox (Lampit®) fue desarrollado originalmente por el laboratorio Bayer. El benznidazol (Radanil®, Rochagan®) fue originalmente desarrollado por el laboratorio Roche, el cual cedió su patente al gobierno brasileño y actualmente es producido en Brasil por el Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco (LAFEPE).

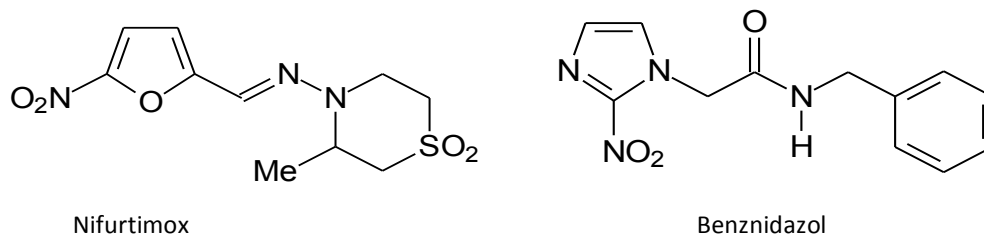


Figura 9: Estructuras de nifurtimox (3-metil-4-(5-nitrofurilidenamino)-1,1-dióxido) y benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazolil)acetamida).

La actividad antichagásica de estos fármacos fue descubierta hace más de 40 años de forma totalmente empírica, y su eficacia es limitada [18]. Ambos fármacos son activos frente a las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi* pero su mecanismo de acción parece ser diferente [19]. Los antecedentes reportados para el nifurtimox sugieren que el mismo actúa a través de la reducción metabólica del grupo nitro formando especies tóxicas como se muestra en la Figura 10.

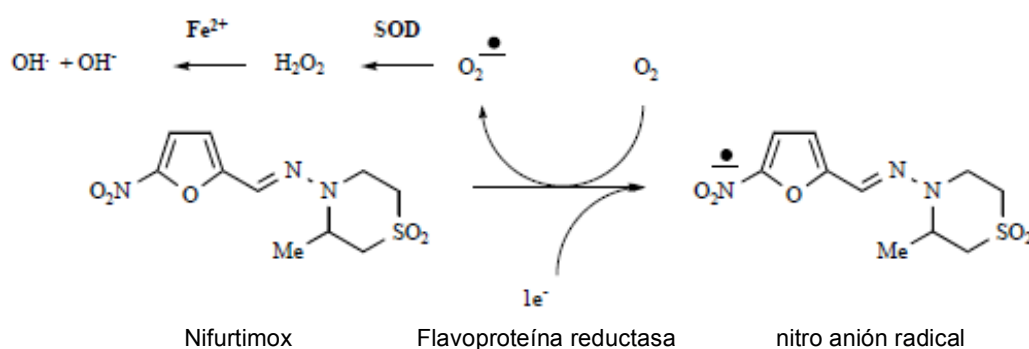


Figura 10: Esquema de la vía biorreductiva de nifurtimox.

El anión radical nitro formado reacciona para producir metabolitos reducidos del oxígeno que resultan altamente tóxicos (ROS, entre ellos: anión superóxido, peróxido de hidrógeno) [20]. La reacción, catalizada por metales de transición, entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno produce el radical hidroxilo [21]. Este último, un oxidante fuerte no específico, puede reaccionar y dañar moléculas de importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La generación de este estrés oxidativo afecta tanto al parásito como al huésped mamífero. Sin embargo, las defensas antioxidantes del parásito son limitadas. En particular, la ausencia de catalasa trae aparejada la acumulación de peróxido de hidrógeno, haciendo al parásito más

sensible al estrés oxidativo. Sin embargo, es importante destacar que investigaciones más recientes reportadas por Denicola y col. indican que el mecanismo de acción del nifurtimox apuntaría en otra dirección. Los resultados sugieren que el reciclaje redox sólo fue observado con concentraciones altas de nifurtimox ( $>400 \mu\text{M}$ ), dos órdenes de magnitud más altas que la concentración de nifurtimox necesaria para la actividad anti-proliferativa. Por este motivo, este grupo propuso que el estrés oxidativo no es el mecanismo de acción principal de este nitrocompuesto contra tripanosomátidos [22].

Por otro lado, el mecanismo de acción del benznidazol se relaciona con el metabolismo reductivo pero sin la generación de productos de reducción del oxígeno y con la unión covalente a macromoléculas de intermediarios de la nitrorreducción [20,23].

Tanto el nifurtimox como el benznidazol tienen una efectividad significativa en la fase aguda de la enfermedad de Chagas con más de un 80% de cura parasitológica (resultados negativos de todos los ensayos parasitológicos y serológicos). Sin embargo, su efectividad varía según el área geográfica debido, probablemente, a diferencias en la susceptibilidad a los fármacos de las diferentes cepas del parásito. Ambos fármacos presentan importantes efectos secundarios, donde destacan, para nifurtimox, la pérdida de peso, náuseas, vómito, prurito, neuropatía periférica, leucopenia, neurotoxicidad, entre otros, y para benznidazol, edemas, fiebre, prurito, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica, dolores musculares y articulares, entre otros [24-26]. En una gran cantidad de casos, estos efectos secundarios llevan a discontinuar el tratamiento. El benznidazol y el nifurtimox no deben ser tomados por mujeres embarazadas o personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox está también contraindicado para personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos. La mayor limitación de estos compuestos es la escasa actividad antiparasitaria en la fase crónica de la enfermedad: más del 80% de los pacientes tratados con estos fármacos no se curan. A pesar de estas limitaciones existe un consenso en que debe tratarse a todos los pacientes seropositivos para eliminar o reducir su carga parasitaria. Sin embargo, muchas veces no se recomienda el uso de estos fármacos en pacientes crónicos, ya que los riesgos superan los beneficios [23].

En los últimos años se han realizado algunos esfuerzos por mejorar las terapias ya existentes y en particular para reevaluar el uso del benznidazol en pacientes con

Chagas crónico [27,28]. Desde el año 2004, el estudio multicéntrico BENEFIT (BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis Program) involucra pruebas al azar, doble ciego, con placebo, del tratamiento con benznidazol, en más de 3000 pacientes con cardiomiopatía chagásica, en 35 centros de América Latina. Este estudio demostró que el tratamiento con benznidazol disminuyó significativamente la carga parasitaria en sangre, pero esta reducción no se correlacionó con el mejoramiento del deterioro cardíaco [29]. Otros esfuerzos han incluido el mejoramiento de las formas farmacéuticas, en especial para uso pediátrico [27].

Cabe destacar que hasta hace poco tiempo los esfuerzos en la búsqueda de nuevos fármacos para combatir la enfermedad de Chagas provenían fundamentalmente del ámbito académico. En 2012, trece compañías farmacéuticas, tres gobiernos, el Banco Mundial y varias organizaciones mundiales de salud se reunieron para prometer acciones y ayuda en apoyo de los nuevos objetivos de la Organización Mundial de la Salud dirigidos hacia la eliminación o el control para 2020 de 10 enfermedades olvidadas, entre las que se encuentra la enfermedad de Chagas. En este sentido, se han logrado progresos sólidos en la última década que culminaron en los primeros ensayos clínicos de los últimos 40 años de potenciales fármacos para la enfermedad de Chagas [28].

### **1.2.7 BLANCOS PARA FÁRMACOS TRIPANOSOMICIDAS**

La dificultad en la obtención de fármacos realmente adecuados para combatir la enfermedad se encuentra relacionada con alguna de las características de *T. cruzi*. Por un lado, ha sido difícil encontrar blancos terapéuticos específicos debido a la gran cantidad de rutas metabólicas comunes entre el parásito y los mamíferos. Por otro lado, no existe un órgano blanco único dónde debería actuar el fármaco, debido a la amplia distribución celular y tisular de las distintas formas del parásito, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad [20,26,27]. Sin embargo, el creciente aumento en el conocimiento profundo de la biología de *T. cruzi* y de otros organismos relacionados ha permitido detectar similitudes y diferencias entre parásito y huésped, identificando algunos procesos bioquímicos y/o moléculas que podrían constituir posibles blancos terapéuticos. El análisis de la secuencia completa del genoma de *T.*

*cruzi* reveló la presencia de más de 10.000 genes codificadores de proteínas, lo que abre la posibilidad de identificar nuevos potenciales blancos para el desarrollo de nuevos fármacos contra este parásito [32-35].

Los blancos terapéuticos que se describen a continuación ya han sido estudiados y validados extensamente en las últimas décadas para el desarrollo de nuevos agentes con actividad biológica sobre *Trypanosoma cruzi* [36].

### *Cruzipaína*

La *cisteína endopeptidasa* también llamada *cruzipaína* es la enzima responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadios del ciclo de *T. cruzi* y es esencial para la supervivencia de éste dentro de la célula huésped, por lo cual los inhibidores de esta enzima serían potencialmente activos en todas las fases de la enfermedad (aguda y crónica) y no sólo en los primeros estadios de la misma, como es el caso de nifurtimox y benznidazol. En las últimas décadas, estudios independientes validan esta enzima como un blanco prometedor contra dicho parásito. Si bien, en la actualidad en el mercado no existe ningún fármaco que posea dicho mecanismo, la vinilsulfona K777 (Figura 11) se encuentra en etapa de estudios clínicos avanzados [16]. Este compuesto, además de mostrar adecuado comportamiento frente a *T. cruzi*, muestra muy buen perfil farmacológico, adecuada solubilidad en agua, biodisponibilidad oral, ausencia de efectos tóxicos y mutagénicos [37] y produce efecto aditivo cuando se combina con benznidazol [38].

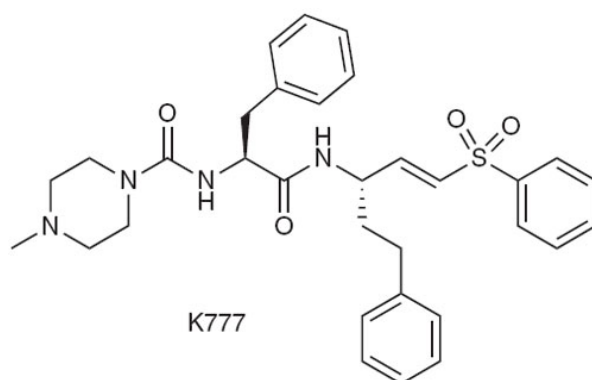


Figura 11: Estructura de la vinilsulfona K777.

## Enzimas involucradas en la síntesis de ergosterol

Los esteroides, como constituyentes de la membrana celular de *T. cruzi*, son esenciales para el normal funcionamiento del parásito. A diferencia de lo que ocurre en sistemas mamíferos, donde el principal esteroide es el colesterol, en organismos eucariotas como los protozoarios, los principales son ergosterol y otros 24-metil-esteroides [39].

Algunas de las enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis de estos esteroides han sido empleadas como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos agentes antichagásicos.

La farnesil difosfato sintasa (FPPS) pertenece a la ruta metabólica por la cual el parásito produce poliisoprenoides esenciales para el normal funcionamiento metabólico del mismo. Como será mencionado posteriormente con mayor detalle, esta enzima es el blanco de los bisfosfonatos y de los compuestos metálicos con éstos como ligandos, obtenidos en este trabajo de Tesis. Compuestos como los bisfosfonatos inhiben el funcionamiento de la FPPS del parásito, al presentar similitudes estructurales con los sustratos de esta enzima y de esta manera inhibir del crecimiento del parásito [40].

Algunos inhibidores de la C14- $\alpha$ -demetilasa de esteroides en hongos y levaduras, descritos primariamente como antifúngicos, como el posaconazol (Figura 12) (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, N.J., EUA), son capaces de inducir, con excelentes resultados, cura parasitológica radical en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica [20].

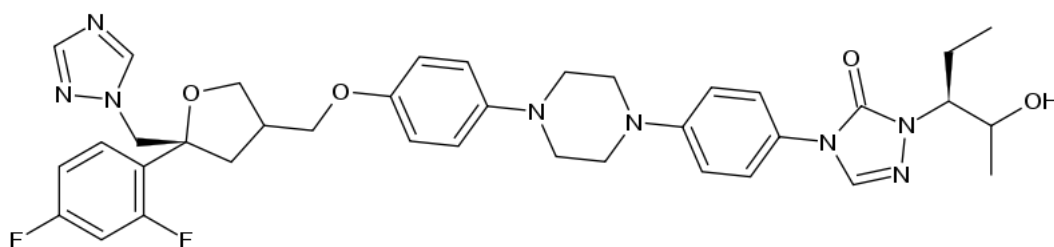


Figura 12: Estructura del posaconazol.

Más aún, este compuesto demostró ser activo contra cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a nifurtimox y/o benznidazol, aún en hospederos inmunosuprimidos. La

actividad tripanosomicida *in vivo* (los parásitos mueren por efecto del tratamiento) de estos compuestos ha sido atribuida a su potente y selectiva actividad intrínseca contra el parásito (las concentraciones mínimas inhibitorias contra la forma amastigota intracelular del parásito, cultivada en células de mamífero *in vitro*, está en el rango nanomolar a sub-nanomolar), así como a las propiedades farmacocinéticas apropiadas para su aplicación (grandes volúmenes de distribución y largos tiempos de eliminación). El posaconazol presenta como ventaja adicional que ya fue aprobado y se comercializa en los Estados Unidos, la Unión Europea y otros países en la forma farmacéutica de suspensión oral Nofafil® para la profilaxis de las infecciones invasivas por *Aspergillus* y *Candida*. En 2011 se comenzó, para el posaconazol oral antifúngico, una prueba de investigación con estudios clínicos contra la enfermedad de Chagas crónica asintomática. La propuesta del ensayo randomizado para posaconazol y benznidazol consistió en un estudio clínico con una suspensión de posaconazol oral, a una dosis de 400 mg dos veces al día, administrada durante 60 días, ya sea como terapia única o concomitantemente con benznidazol. Los resultados obtenidos a partir del estudio muestran que si bien el posaconazol presentó actividad antiparasitaria en pacientes crónicos, las recaídas y fallas durante el tratamiento fueron mayores que en el tratamiento convencional de benznidazol [41].

#### *Tripanotiona reductasa*

La tripanotiona reductasa (TR) cumple funciones similares a la de la glutatión reductasa en el organismo huésped. Interviene en reacciones redox dependientes de NADPH. En este sentido, se pueden mencionar como ejemplo, los complejos de Pd(II) con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano de fórmula [PdCIL], sintetizados y reportados por el grupo de investigación que actualmente integro, y compuestos de Pt(II) con terpiridinas sustituidas que inhiben irreversiblemente la tripanotiona reductasa. Algunos de éstos mostraron no inhibir la enzima humana equivalente, glutatión reductasa, resultando selectivos contra el parásito como consecuencia [42].

### *ADN: blanco de compuestos metálicos*

Las similitudes metabólicas entre las células tumorales y los parásitos tripanosomátidos han determinado que fármacos antitumorales – tanto orgánicos como inorgánicos – también muestren actividad contra tripanosomátidos [43,44]. Se postula que aquellos compuestos capaces de interactuar con el ADN serían buenos candidatos como agentes contra estos parásitos, en particular, para combatir a *T. cruzi*. Por lo tanto, compuestos metálicos, especialmente de la segunda y tercera serie de transición *d*, podrían interactuar a nivel de esta biomolécula inhibiendo el crecimiento de este parásito. En este sentido, como ejemplo, se pueden citar complejos de Pd, Pt y Ru con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano (L) como ligandos que se detallarán en el capítulo 5. Estos compuestos demostraron una interesante interacción con el ADN, además de formar radicales libres tóxicos para el parásito, mecanismo de acción antiparasitario propio de los ligandos [45-47]. Los estudios de interacción con ADN plasmídico y de timo de ternera parecen indicar que los complejos de Pd, [PdCl<sub>2</sub>L], interactúan con el ADN mediante un mecanismo de efectos similares a los producidos por los intercalantes clásicos.

### *Otros blancos terapéuticos de relevancia*

Como otros ejemplos de blancos terapéuticos de *T. cruzi*, se pueden citar la enzima *trans*-sialidasa de *T. cruzi* (*TcTS*), la cual está involucrada en la glicosilación de mucinas cruciales para el reconocimiento y la adhesión del parásito a la célula huésped, desempeñando así, un papel fundamental en el proceso de invasión celular e infección [48]. Debido a que esta enzima no presenta un análogo en el humano, se presenta como un blanco atractivo para atacar al parásito. La mayoría de estos inhibidores son derivados del sustrato ácido siálico o un análogo del estado de transición (ácido 2,3-dehidro-3-deoxi-N-acetilneuramínico, DANA). Además, han sido reportados derivados de flavonoides y antraquinonas como potenciales agentes inhibidores de esta enzima. Entre ellos, el más potente es el ácido 6-cloro-9,10-dihidro-4,5,7-trihidroxi-9,10-dioxo-2-antracencarboxílico [49].



Además de los mencionados, se han estudiado muchos otros blancos para desarrollar estrategias para la búsqueda de nuevos fármacos selectivos para combatir la enfermedad de Chagas. Se pueden citar, por ejemplo, enzimas convertidoras o transferidoras de grupo prenilo, tales como geranilgeraniltransferasa tipo I y farnesiltransferasa, fosfodiesterasas cAMP-específicas, trifosfato isomerasa,  $\alpha$ -hidroxiácido dehidrogenasa, dihidrofolato reductasa, la vía de las purinas, la vía de los aminoácidos, la vía de la glicólisis, la enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, las ADN topoisomerasas y los receptores del factor de activación plaquetaria, entre muchos otros [36].

## **1.4 QUÍMICA INORGÁNICA MEDICINAL**

### **1.4.1 GENERALIDADES**

La Química Bioinorgánica es una rama interdisciplinaria de la Química que se ocupa de una amplia gama de problemas ubicados en la interfase entre la Química y las Ciencias Biológicas y que ha tenido un amplio desarrollo en las últimas tres décadas [50]. La aplicación de la Química Inorgánica en Medicina o Química Inorgánica Medicinal es un área joven y en creciente expansión dentro de la Química Bioinorgánica que involucra, entre otros aspectos, la investigación y desarrollo de compuestos metálicos con actividad terapéutica o diagnóstica [47,51-58].

Ciertos metales, denominados esenciales, que se encuentran ampliamente distribuidos en los sistemas biológicos tienen una función fundamental en el correcto funcionamiento de los sistemas vivientes (Figuras 13 y 14) [59-62].

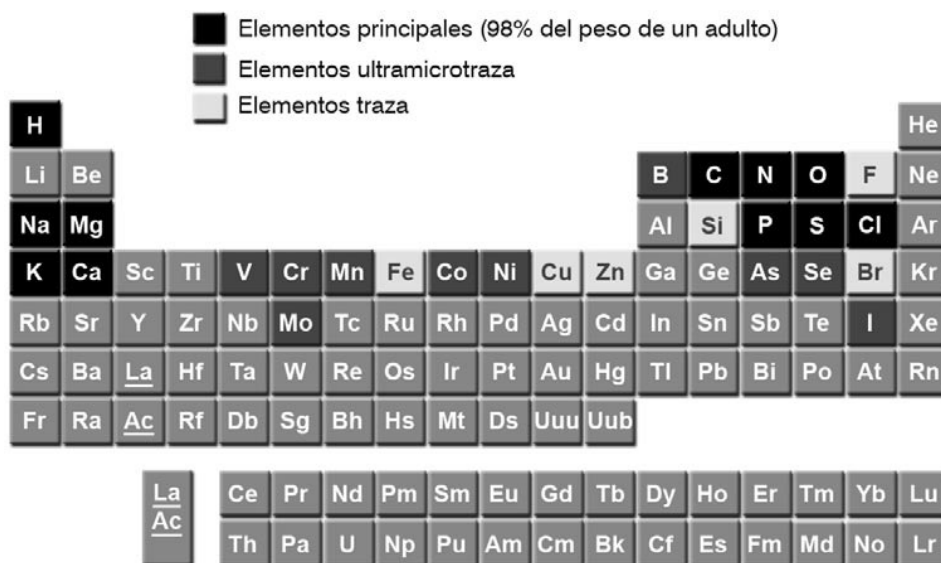


Figura 13: Tabla de elementos esenciales o bioelementos en la que se incluyen también aquellos de naturaleza metálica.

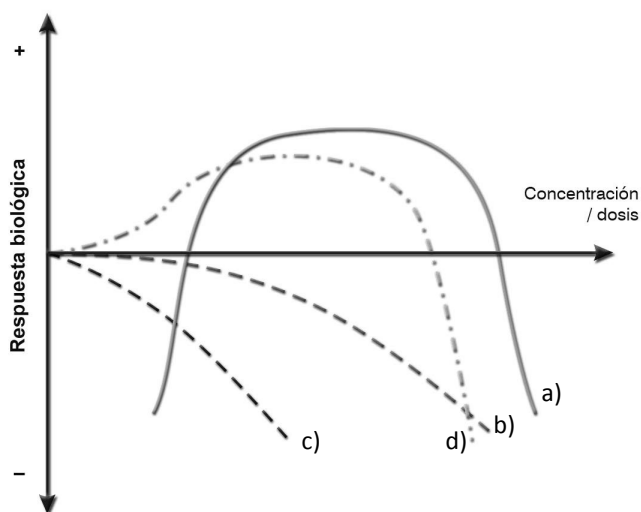


Figura 14: Diagrama de Bertrand modificado que indica de forma esquemática la naturaleza de la respuesta biológica (favorable o desfavorable) producida por un compuesto metálico. a) metal esencial, b) metal no esencial y no tóxico, c) metal tóxico y d) metal no esencial de interés terapéutico.

Como subárea de la Química Bioinorgánica, la Química Inorgánica Medicinal explora la incorporación de estos metales esenciales y de metales no esenciales de interés terapéutico en compuestos químicos que podrían tener utilidad como agentes de diagnóstico médico o como agentes quimioterapéuticos. A éstos, de forma genérica, se les denomina metalofármacos.

Si bien, ha sido en las últimas décadas cuando se ha utilizado este tipo de compuestos metálicos en clínica médica y se investiga su mecanismo de acción, los metales y sus compuestos se han empleado con fines curativos o preventivos desde hace más de 5000 años. Los egipcios ya utilizaban cobre para esterilizar el agua en el año 3000 a.C. En Arabia y China, en el 3500 a.C. se utilizaba el oro para obtener medicamentos. Más recientemente, en el siglo XVI, Paracelso desarrolló medicamentos a base de mercurio. Por otro lado, Paul Ehrlich es considerado el padre de la química médica, por desarrollar, a principios del siglo XX, el primer trabajo sistemático multidisciplinario de diseño racional de compuestos de arsénico que finalmente condujo al compuesto antisifilítico Salvarsan®, lanzado al mercado por la empresa Hoechst. A raíz de tal emprendimiento este científico recibió el premio Nobel en 1908 [51,57,59-62].

Sin embargo, la Química Inorgánica Medicinal moderna surge como disciplina de investigación y desarrollo independiente, a partir del descubrimiento fortuito del biofísico Barnett Rosenberg, en la década de 1960, en torno a la actividad anticancerígena del cisplatino (*cis*-diaminodichloro-platino(II)), compuesto que aún hoy continúa siendo fármaco líder en terapia antitumoral (Figura 10), con una tasa de cura del cáncer testicular cercana al 90%.

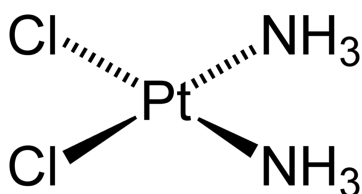


Figura 15: Estructura del cisplatino.

Por otro lado, cabe destacar que el avance en el desarrollo de metalofármacos tiene sólidos cimientos en el vasto conocimiento relativo a las propiedades redox y de coordinación de los distintos iones metálicos aportado por la Química Inorgánica [51,57].

La participación de la Química Inorgánica en el proceso de Investigación y Desarrollo de nuevos fármacos ha determinado que el rango de elementos químicos disponibles para la química medicinal tradicional (fundamentalmente C, N, H, O, S, P y halógenos) se amplíe, incluyendo desde los 24 elementos considerados esenciales para la vida

hasta todos los elementos de la tabla periódica, inclusive aquellos considerados radiactivos o tóxicos [51,57,63].

El campo de la Química Inorgánica Medicinal puede dividirse en dos grandes categorías. Por un lado, fármacos (ligandos) cuyo blanco de acción son determinados iones metálicos presentes en los sistemas biológicos, ya sea libres o unidos a proteínas. Por otro lado, compuestos metálicos bajo la forma de sales o de compuestos de coordinación, en los que el ion metálico juega un rol fundamental para la actividad farmacológica de los mismos. Más allá de esta categorización, que en muchos casos resulta útil, las áreas de mayor desarrollo de la Química Inorgánica Medicinal se esquematizan en la Figura 16 [64-68].

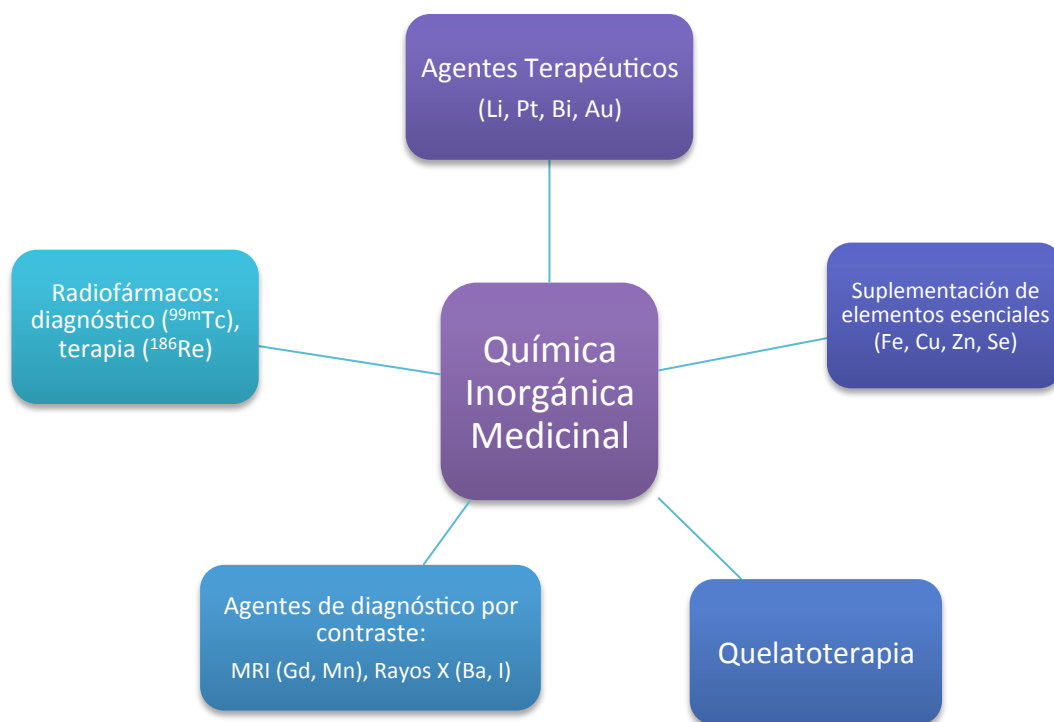


Figura 16: Áreas fundamentales de la Química Inorgánica Medicinal.

Los esfuerzos en investigación han conducido al desarrollo de un gran número de compuestos metálicos bioactivos, de los cuales un significativo número de ellos ha sido incluido en el vademécum internacional para el tratamiento de diferentes patologías, o se encuentra en fases clínicas. Esto demuestra las posibilidades reales que esta área ofrece para el desarrollo de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos [62,65-69,71]. En particular, complejos de diferentes metales (Pt, Ru, Cu, Sn, Ti, Rh, Pd, V, Au, Ga, entre otros) han presentado actividad quimioterapéutica como

anticancerígenos, antivirales o antibacterianos. En la Tabla 1 se indican algunos compuestos metálicos en uso clínico.

Nombre comercial o común	Fórmula del compuesto	Actividad
Cisplatino	$cis-[Pt^{II}Cl_2(NH_3)_2]$	Anticancerígeno
Magnevist	$[Gd^{III}(DTPA)(H_2O)]^{2-}$	Agente de contraste para imagenología por resonancia magnética
Cardiolite	$[^{99m}Tc^I(CNCH_2C(CH_3)_2OCH_3)_6]^+$	Imagenología de miocardio
Vitamina B12	Cianocobalamina	Anemia perniciosa
Manialith, Neulepsin	Carbonato de litio, $Li_2CO_3$	Antimaniaco
Myocrisin	$[Au^I(\text{tiomalato})]$	Antirreumático, antiartrítico
De-Nol	Citrato de $Bi^{III}$ de potasio y amonio	Antibacteriano, antiulceroso
Niprida	$Na_2[Fe^{II}(CN)_5(NO)] \cdot 2H_2O$	Hipotensor
Fosnol	$La_2^{III}(CO_3)_3$	Insuficiencia renal crónica
Ebselen	2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona	Antiinflamatorio
Polaprezinc	(N( $\alpha$ )-(3-aminopropionil)histidinato(2-N1,N2,O( $\alpha$ ))-zinc	Antiulceroso
Subnitrato de bismuto	$Bi_5O(OH)_9(NO_3)_4$	Antiácido
Ferrocilinato	$[Fe(H_2O)_3(C_{11}H_{18}NO_8)]$	Hematínico
Baciferm	Zn-bacitracina	Antimicrobiano
Cuproxolina	Dietilamino oxiquinolina sulfonato de cobre	Antiartrítico
Pentostam	Estibogluconato de sodio	Antiprotozoario

Tabla 1: Algunos ejemplos de metalofármacos de uso clínico o en fases clínicas avanzadas.

En términos generales, los compuestos de coordinación con actividad terapéutica se pueden clasificar en dos grandes grupos [52]:

- I) Fármacos cuya actividad está basada en la presencia del metal. En este tipo de compuestos, el metal es el responsable de la acción terapéutica y el o los ligandos no presentan actividad *per se*. Sin embargo, el o los ligandos unidos al metal afectan indudablemente la biodistribución y biodisponibilidad del fármaco y, por lo tanto, tienen una importante influencia en su actividad biológica y toxicidad. Los ejemplos más representativos de este grupo son los complejos antitumorales de platino y rutenio, los complejos antiartríticos de oro, los complejos leishmanicidas de antimonio.
- II) Complejos metálicos con ligandos bioactivos. Cuando el ligando presenta actividad farmacológica propia, se ha observado que mediante su coordinación a un metal es posible mejorar su perfil farmacológico. Este enfoque, que hace uso de un eventual sinergismo metal-ligando, puede resultar en efectos beneficiosos tanto en relación con el metal como con el ligando. Por un lado, es posible incrementar la biodisponibilidad del ligando bioactivo por modificación de su solubilidad, lipofilia, estabilidad y tiempo de residencia en el organismo y de esta forma mejorar su índice terapéutico por incremento de su actividad, disminución de su toxicidad o ambos. Por otro lado, pueden ser evadidos los múltiples mecanismos de resistencia celular hacia ciertos fármacos, problema cada vez más frecuente en la terapéutica con agentes quimioterápicos, ya que el fármaco (ligando) es enmascarado como una nueva entidad química (el complejo de coordinación) que no “despierta” los procesos moleculares de rechazo contra el fármaco. Otro aspecto de importancia es que la toxicidad del metal puede verse disminuida como resultado de la coordinación a un ligando orgánico, ya que el metal coordinado resulta menos disponible para participar en reacciones no deseadas como la inhibición de enzimas u otras reacciones que generan efectos dañinos para el organismo [72]. En este sentido, los complejos metálicos de un cierto número de agentes terapéuticos han resultado más efectivos que el fármaco original. Puede citarse como ejemplos los complejos insulinomiméticos de V(IV) con biguanidas, los complejos tripanosomicidas de Ru con clotrimazol y complejos antitumorales de Cu con tiosemicarbazonas, entre muchos otros [52,54,68,69,72].

La importancia, desde el punto de vista farmacológico, de un complejo metálico no se debe, en ningún caso, sólo a la presencia del metal o del ligando, sino que depende de la estructura y/o de las propiedades fisicoquímicas de la especie compleja que forman. Por lo tanto, en el desarrollo de un metalofármaco, resulta relevante lograr conocimientos estructurales y químicos completos de los compuestos. Además, es necesario comprender el comportamiento de los complejos en condiciones fisiológicas tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético (estructura en solución, reacciones redox y/o de sustitución) y su interacción con membranas biológicas, proteínas o ADN. El progreso de la Química Inorgánica Medicinal es altamente dependiente de la generación sistemática de estos conocimientos [54,73].

En resumen, esta sub-área de la Química Inorgánica ha demostrado ofrecer posibilidades reales para el descubrimiento de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos. El mayor desarrollo se ha dado en la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral. Sin embargo, el diseño racional de potenciales metalofármacos antiparasitarios es relativamente más reciente y se ha desarrollado en mucha menor extensión [47,51-58].

#### **1.4.2 COMPUESTOS METÁLICOS CON ACTIVIDAD ANTI *T. cruzi***

El uso de compuestos metálicos para el tratamiento de enfermedades parasitarias se inicia a principios del siglo XX con la observación de la actividad en tripanosoma de un compuesto trinuclear de rutenio denominado "*ruthenium red*". En 1905, los primeros intentos en el área de la Química Inorgánica Medicinal mostraron que el compuesto organometálico de arsénico, *Atoxyl*, a pesar de ser muy tóxico, era efectivo para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana. Más recientemente se ha encontrado una buena correlación entre las actividades antitumoral y tripanostática de complejos de platino como el cisplatino o el carboplatino. Como ya ha sido previamente descrito, se ha observado que, en general, fármacos que presentan actividad antitumoral también muestran actividad tripanosomicida. En el caso del *T. cruzi*, esta correlación ha sido explicada en base a la similitud metabólica existente entre las células tumorales y las de *T. cruzi*. Dicha similitud se relaciona con una alta velocidad de respiración generada

por un sistema mitocondrial ineficiente y con la ausencia de catalasas y peroxidasas en ambos sistemas [74]. En este marco, algunos grupos académicos de bioinorgánicos han centrado su atención en el diseño racional de fármacos metálicos para combatirla.

Aunque pueden encontrarse en la bibliografía numerosos artículos con la síntesis de complejos metálicos con potencial actividad anti *T. cruzi*, sólo algunos esfuerzos se han realizado en forma sistemática y basados en un diseño racional. Algunos de ellos se detallan a continuación.

El trabajo liderado por Sánchez-Delgado et al., fue iniciado hace más de 20 años, y representa el punto de partida del estudio de complejos metálicos como potenciales metalofármacos para el tratamiento de infecciones parasitarias. Basándose en el paradigma de la sinergia obtenida a partir del sistema metal-ligando [72,75-77], desarrollaron complejos de rutenio, oro y rodio [72,75,78-81] con derivados de azoles, (clotrimazol, CTZ, y ketoconazol, KTZ), como ligandos. Estos fármacos, CTZ y KTZ, son ampliamente reconocidos como agentes antifúngicos actuando como inhibidores de la biosíntesis de esteroides en el hongo, y además, presentan una moderada actividad en *T. cruzi*. La estrategia utilizada se basó en la combinación de un ligando con actividad farmacológica y un metal de importancia farmacológica que permita la obtención de nuevas especies presentando, no sólo un perfil farmacológico mejorado, sino además la posibilidad de presentar blancos múltiples. De hecho,  $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$  (Figura 17a), resultó 10 veces más activo *in vitro* contra *T. cruzi* y menos tóxico para las células normales de mamífero en comparación con CTZ.

Sin embargo, la alta actividad *in vitro* no pudo ser observada en los estudios *in vivo*, principalmente debido a la baja solubilidad del complejo en agua. Basándose en estos resultados promisorios, el grupo de Sánchez-Delgado ha reportado recientemente ocho nuevos complejos de coordinación de rutenio con CTZ descrito en dos series: cuatro compuestos de coordinación clásicos octaédricos de  $\text{Ru}^{\text{II}}$  y  $\text{Ru}^{\text{III}}$  (*cis, fac*- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{DMSO})_3(\text{CTZ})]$ , *cis, cis, trans*- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{DMSO})_2(\text{CTZ})_2]$ ,  $\text{Na}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{CTZ})]$ ,  $\text{Na}[\text{trans-Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{CTZ})_2]$ ) y cuatro compuestos organometálicos con el centro Ru-*p*-cimeno ( $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}_2(\text{CTZ})]$ ,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{bipy})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]_2$ ,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{en})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]_2$ ,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{acac})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]$ , donde bipy = bipyridina, en = etilendiamina, acac = acetilacetato (Figura 17) [77,82].



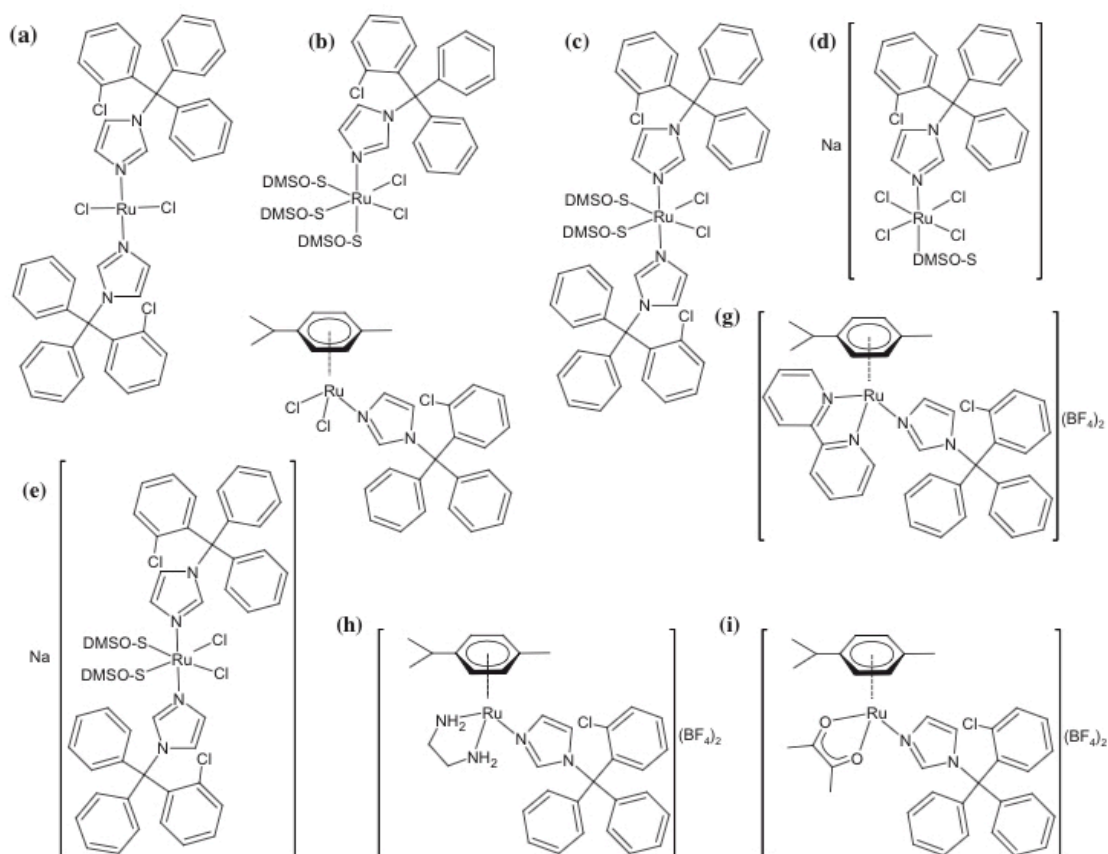


Figura 17: Estructura de los compuestos Ru-CTZ: a)  $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ , b)  $(\text{cis}, \text{fac}-[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{DMSO})_3(\text{CTZ})])$ , c)  $\text{cis}, \text{cis}, \text{trans}-[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{DMSO})_2(\text{CTZ})_2]$ , d)  $\text{Na}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{DMSO})(\text{CTZ})]$ , e)  $\text{Na}[\text{trans}-\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{CTZ})_2]$  f)  $([\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{CTZ})])$ , g)  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{bipy})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]_2$ , h)  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]_2$ , i)  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{acac})(\text{CTZ})][\text{BF}_4]$ .

Todos los compuestos obtenidos fueron testeados *in vitro* contra epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Además, se analizó la actividad citotóxica de los complejos contra osteoblastos humanos. Los resultados muestran que la mayoría de los complejos Ru-CTZ fueron significativamente más activos, que el ligando libre, mientras que otros complejos de Ru (los que no contienen CTZ) usados como control no mostraron ninguna actividad aparente en las dosis ensayadas. La mayoría de estos complejos desarrollados resultaron ser más solubles en agua que el original  $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ , pero no pudo establecerse una clara correlación entre esta propiedad y su actividad biológica. Desafortunadamente, la mayoría de ellos presentaron una mayor citotoxicidad en células humanas como consecuencia de la complejación del rutenio. Sin embargo, el compuesto más promisorio,  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{CTZ})]$  resultó 58 veces más activo

que el CTZ libre contra *T. cruzi*, mostrando valores de DL<sub>50</sub> en el rango submicromolar. Además, este complejo mostró un excelente índice de selectividad lo que lo convierte en un buen candidato para el estudio de su mecanismo de acción y posteriores estudios *in vivo*.

Además del trabajo de Sánchez Delgado, Gambino y col. han desarrollado recientemente un nuevo complejo Ru-CTZ [83]. En este sentido, sintetizaron y caracterizaron completamente un compuesto de Ru-ciclopentadienilo de fórmula [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CTZ)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (Figura 18) con este mismo ligando bioactivo.

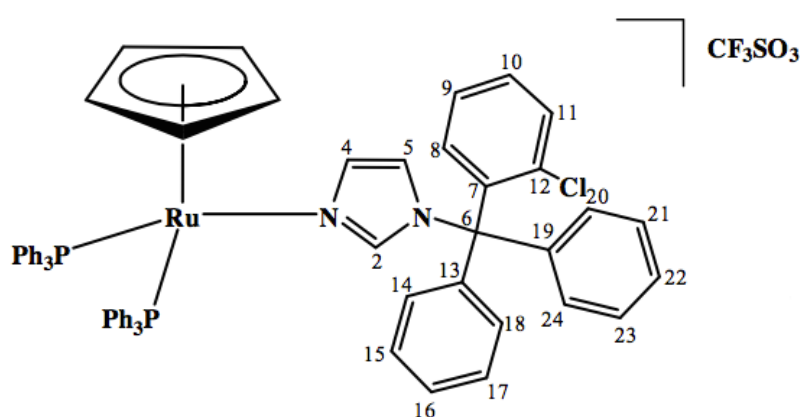


Figura 18: Estructura de [RuCp(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CTZ)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>).

Se evaluó el efecto de este complejo en la forma epimastigota de *T. cruzi*, y se comparó con el ligando libre. Los resultados obtenidos muestran que el complejo presentó una actividad 6 veces mayor comparado con el CTZ libre, y 30 veces mayor en comparación con el fármaco de referencia, nifurtimox (Cl<sub>50</sub>= 8,0 μM).

Otro ejemplo de un efecto sinérgico de la complejación de rutenio a un fármaco bioactivo antiparasitario es el compuesto de rutenio-benznidazol desarrollado por Franco et al [84]. Tal como ha sido previamente reportado, el benznidazol (N-bencil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida, Bz) es, hasta el momento, el fármaco más utilizado clínicamente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, los tratamientos con Bz son insatisfactorios y exhiben diversos efectos secundarios atribuidos al daño redox generado al tejido huésped. Con el objetivo de obtener especies más activas que permitan disminuir la dosis requerida y sean capaces de sortear los mecanismos de resistencia del parásito, se diseñaron complejos Ru-Bz. En

este sentido, se seleccionó el *core* rutenio(II) tetraamina a efectos de obtener un compuesto soluble en agua. El complejo de fórmula *trans*-[Ru(Bz)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> fue obtenido y evaluado *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi* utilizando una cepa parcialmente resistente a Bz (cepa Y). El complejo obtenido resultó ser mucho más activo contra ambas formas epimastigota (CI<sub>50</sub> = 127 μM) y tripomastigota (CI<sub>50</sub> = 79 μM) de *T. cruzi* en comparación con el Bz libre (CI<sub>50</sub> > 1 mM para ambas formas) en las condiciones ensayadas. Además, en el modelo murino de Chagas agudo, se observó un aumento en la actividad con respecto al fármaco de referencia. El complejo Ru-Bz fue capaz de proteger a todos los ratones infectados en concentraciones mil veces menores que la dosis de Bz considerada óptima (385 μmol/kg/día), eliminando todos los nidos de amastigotas en el tejido de miocardio y en los músculos esqueléticos y disminuyendo la miocarditis en los ratones tratados. Además, no se observó toxicidad aguda en dosis de hasta 400 μmol/kg. Se postuló que el aumento de actividad de Bz a través de la coordinación de rutenio se debe a la habilidad de retirar densidad electrónica del Ru(II) que permite una mayor accesibilidad del grupo nitro a reducirse, así como una mayor solubilidad favorecida por la coordinación de Bz al grupo hidrofílico [Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>L]<sup>2+ / + / 0</sup>.

Basándose en un enfoque bastante diferente, el mismo grupo ha desarrollado un importante número de complejos de rutenio-nitrosilo presentando actividad antitripanosoma. El óxido nítrico tiene un rol fundamental en el control de las infecciones parasitarias a través de la modulación de la respuesta inmune del huésped. En este sentido, los sistemas de rutenio(II) donores de NO, que podrían liberar esta molécula de manera controlada, podrían ser útiles para desarrollar potenciales agentes quimioterápicos para este tipo de enfermedades. En este tipo de compuestos, la reducción del ligando NO<sup>+</sup> ocurre en valores de potencial accesibles para el ambiente reductor en el medio biológico generado por los grupos reductores como NADH o sulfhidrilo [85].

Varios años atrás se ha demostrado que el *N*-óxido de 2-mercaptopiridina (mpo) afecta todas las formas del ciclo biológico del parásito sin afectar a las células del hospedero, principalmente por inhibición de la enzima parasitaria NADH fumarato reductasa, responsable de la conversión de fumarato en succinato. Los complejos [Au<sub>2</sub>(mpo-H)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], [Pt(mpo-H)<sub>2</sub>], [Pd(mpo-H)<sub>2</sub>] y [VO(mpo-H)<sub>2</sub>] (Figura 19) mostraron

incrementos significativos de la actividad respecto de la sal sódica del mpo y de nifurtimox en epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* [50,86].

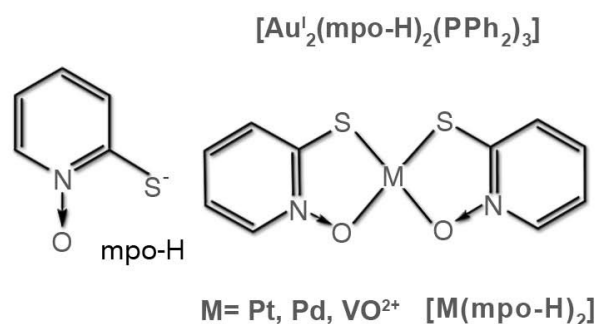


Figura 19: Estructura de  $[\text{Au}_2(\text{mpo-H})_2(\text{PPh}_3)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{mpo-H})_2]$ ,  $[\text{Pd}(\text{mpo-H})_2]$  y  $[\text{VO}(\text{mpo-H})_2]$ .

Los compuestos mostraron altos índices de selectividad por epimastigotas del parásito en relación con células mamíferas (macrófagos J774 y fibroblastos NCTC clon 929). Los estudios de inhibición de la enzima NADH fumarato reductasa demostraron una clara correlación entre el efecto inhibitorio del crecimiento del parásito y el efecto inhibitorio de la enzima, sugiriendo que ésta sería el principal blanco de acción de los compuestos metálicos. Estudios *in vivo* en ratones de la cepa Swiss albina infectados experimentalmente mostraron, para  $[\text{Pd}(\text{mpo-H})_2]$ , una actividad superior que la del benznidazol administrado a una dosis 10 veces mayor [49].

Continuando en esta misma línea, se amplió la serie de compuestos con mpo como ligando bioactivo [87]. Se sintetizaron y caracterizaron completamente dos nuevos compuestos organometálicos y heterobimetálicos de fórmula  $[\text{M}(\text{mpo})(\text{dppf})](\text{PF}_6)$  con  $\text{M} = \text{Pd}(\text{II})$  o  $\text{Pt}(\text{II})$  (Figura 20).

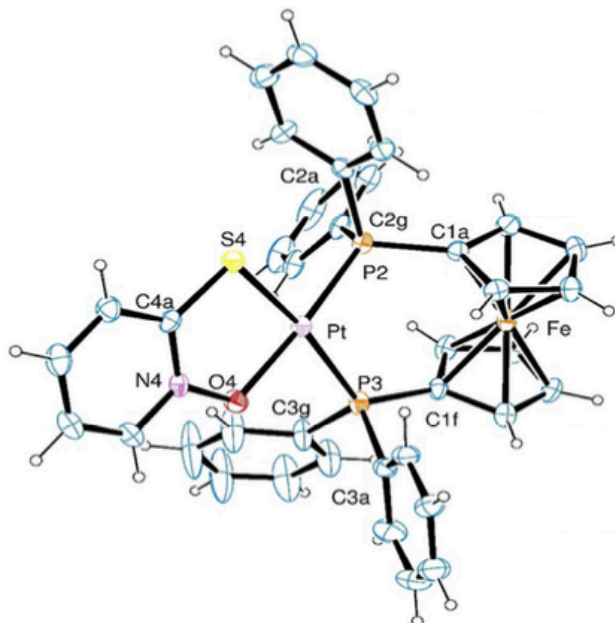


Figura 20: Complejo de platino (II) [Pt(mpo)(dppf)]PF<sub>6</sub>. Las elipsoides se representan con un 20% de probabilidad. Para mayor claridad, sólo algunos átomos representativos fueron numerados y el contraión PF<sub>6</sub> fue omitido.

Los iones metálicos M(II) se presentan en un entorno trapezoide cuasi-plano, coordinando a un anión óxido piridin-2-tiolato, que actúa como ligando bidentado coordinando a través de un átomo de azufre y otro de oxígeno. Además, se completa la esfera de coordinación con un grupo neutro 1,1'-bis(difenil-1-fosfino)ferroceno que coordina de forma bidentada a través de dos átomos de fósforo. Ambos compuestos fueron evaluados contra *T. cruzi* mostrando una actividad de 2 a 5 veces mayor en comparación con el ligando mpo libre, y de 10 a 20 veces mayor comparado con el fármaco de referencia, nifurtimox. Además, se constata que la inclusión del grupo ferroceno (dppf) mejoró la selectividad hacia el parásito en comparación con los complejos [M(mpo-H)<sub>2</sub>] anteriormente descritos.

Por otro lado, considerando las similitudes ya descritas entre kinetoplastidos y células tumorales, el grupo de Gambino y col. ha aprovechado la correlación entre las actividades antitumorales y antitripanosoma para el desarrollo de nuevos potenciales fármacos. En consecuencia, se ha propuesto que aquellos compuestos que interactúan eficientemente con el ADN de forma intercalante podrían presentar actividad en *T. cruzi*. Bajo esta hipótesis, el grupo de la presente investigación ha diseñado compuestos de vanadio (IV) que incluyen dppz (dppz= dipirido(3,2-a: 2'3'-c)fenazina) y diferentes ligandos intercalantes del ADN, en la esfera de coordinación metálica [88-91].

El compuesto  $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(dppz)] \cdot 2H_2O$  mostró actividad *in vitro* ligeramente superior a la de nifurtimox en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) (Figura 21) [88-91].

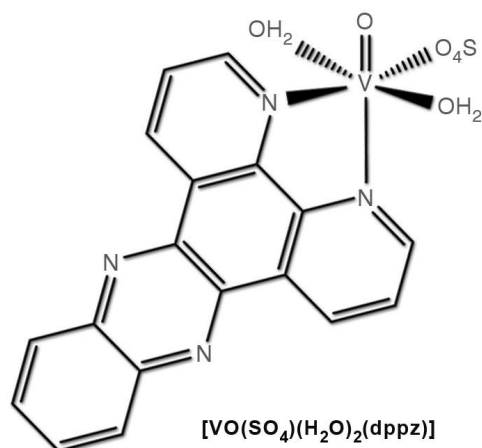


Figura 21: Estructura de  $[V^{IV}O(SO_4)(H_2O)_2(dppz)]$ .

También se diseñaron complejos de vanadio (IV) de ligandos mixtos de fórmula  $[V^{IV}O(L2-2H)(L1)]$  que incluyen un ligando polipiridínico bidentado intercalante del ADN (L1) y un ligando tridentado salicilaldehído semicarbazona sustituida (L2) [90-95].

La actividad de esta familia de compuestos resultó fuertemente dependiente de la naturaleza del ligando intercalante y poco dependiente de la naturaleza de los sustituyentes en el co-ligando semicarbazona. Se realizó un estudio QSAR de los mismos y un profundo estudio de su mecanismo de acción apoyado en metabolómica y estudios teóricos y experimentales de su interacción con ADN. Los compuestos con 5-amino-1,10-fenantrolina como ligando resultaron los más activos y selectivos hacia el parásito de la serie, mostrando valores de  $CI_{50}$  en el rango submicromolar e índices de selectividad entre 100 y 200.

Como se indicó previamente, las proteínas, y en particular las enzimas, constituyen blancos naturales para los metalofármacos. Algunos grupos de investigación han realizado esfuerzos para diseñar compuestos metálicos de coordinación que pudieran unirse selectivamente con enzimas parasitarias específicas, inhibiendo su actividad sin afectar enzimas del hospedero. Uno de los esfuerzos pioneros más interesantes se llevó a cabo con compuestos de platino de terpiridinas sustituidas (Figura 22) [96-98].

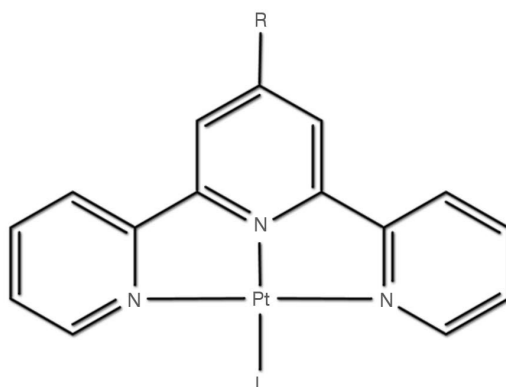


Figura 22: Compuestos bioactivos de Pt(II) con terpiridinas sustituidas como ligandos.

Estos compuestos inhiben el crecimiento de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* en un 78%, a una dosis de 1  $\mu$ M. Si bien estos compuestos también podrían intercalar el ADN, dada la presencia de la terpiridina, o unirse covalentemente con el mismo por medio del Pt, se demostró que inhibían a la tripanotona reductasa (TR), enzima propia del parásito ya discutida en el punto 1.2.7. Resultaron inhibidores irreversibles de la TR sin que prácticamente inhibieran a la enzima glutatión reductasa del hospedero mamífero. El mecanismo de acción involucraría la unión del complejo, por medio del Pt, a la cisteína Cys52, presente en el sitio activo de la enzima.

Por otro lado, el grupo de McKerrow y colaboradores ha evaluado varios compuestos de coordinación de ligandos no bioactivos como potenciales inhibidores de cisteína proteasas de tripanosomátidos [99]. Algunos compuestos de Pd(II), Au(III) y Re(V) demostraron ser potentes inhibidores de la cruzipaína, pero no se logró una adecuada correlación entre inhibición enzimática e inhibición del crecimiento del parásito. Si bien, aún no se han logrado resultados muy prometedores por medio de esta estrategia, al ampliar el trabajo de evaluación de este tipo de compuestos metálicos eventualmente podrían encontrarse inhibidores específicos de enzimas parasitarias.

Finalmente, el grupo de Gambino, Otero y col, ha desarrollado más de cincuenta compuestos de rutenio, renio, paladio y platino con tiosemicarbonas bioactivas derivadas de 5-nitrofurano y 5-nitrofuril acroleína como ligandos. Los resultados obtenidos serán discutidos con detalle en el Capítulo 5.

Los esfuerzos de diseño de nuevos compuestos metálicos activos contra *T. cruzi* realizados hasta la fecha demuestran claramente que la Química Inorgánica Medicinal resulta un área de trabajo muy promisorio para el desarrollo de agentes antiparasitarios. Aún es reducido el número de químicos bioinorgánicos que trabajan en el tema, pero el crecimiento que esta área de investigación ha experimentado en los últimos años seguramente conducirá a compuestos metálicos tripanosomicidas con propiedades adecuadas como para iniciar estudios biológicos avanzados.

En ese sentido, este trabajo pretende aportar nuevas herramientas terapéuticas, basadas en la Química Inorgánica Medicinal, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

## 1.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] [www.who.int](http://www.who.int) (fecha de consulta 11/2016)
- [2] Salvatella R., Chagas en Uruguay 1937-2016, Información Básica para su prevención, control y atención, *Arch. Ped. Urug.* 2016, 87, 49.
- [3] Molina I., Salvador F., Sánchez-Montalvá A., Actualización en enfermedad de Chagas, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2016, 34, 132.
- [4] Schofield C.J., Galvão C., Classification, evolution, and species groups within the Triatominae, *Acta Tropica* 2009, 110, 88.
- [5] Ceballos L.A., Piccinali R.V., Berkunsky L., Kitron U., Gurtler R.E., First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco, *J. Med. Entomol.* 2009, 46, 1195.
- [6] Ossimani, J. J. *Parasitología Médica*; Librería Médica Editorial: Montevideo, Uruguay, 1982; Vol. I.
- [7] Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A., Cazzulo, J. J., Krishna, S., The trypanosomiasis, *The Lancet* 2003, 362, 1469.
- [8] Prata, A., Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *Lancet Infectious Diseases* 2000, 1, 92.
- [9] Rodrigues-Coura, J., DeCastro, S., A critical review on Chagas disease chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002, 97, 3.



- [10] Rodrigues Coura J., The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015, 110, 3, 277.
- [11] Chiarpenello J., Enfermedad de Chagas (*Tripanosomiasis Americana*), *Evid. Actual Pract. Ambul.* 2004, 7, 114.
- [12] Gambino D., L. Otero, A 100 años del Descubrimiento de la Enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay, Ed. Organización Panamericana de la Salud (Organización Mundial de la Salud, OMS), 2009, pp. 91. HSD/CD/550-09
- [13] Franco-Paredes C., Von A., Hidron A., Rodríguez-Morales A.J., Tellez I., Barragán M., Chagas disease: an impediment in achieving the millennium development goals in Latin America. *BMC Int Health Hum. Rights* 2007, 7, 7.
- [14] Silveira A.C., Control Vectorial, Programa *Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina (RG T 1206)*, 2009.
- [15] Schmunis G., Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007, 102 (Supl. 1), 75.
- [16] Cerecetto H., Gonzalez M., Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de medicamentos. Una visión iberoamericana, RIDIMEDCHAG-CYTED, Laboratorios Silanes, Mexico D.F, 2012.
- [17] Bustamante J.M., Tarleton R.L., Methodological advances in drug Discovery for Chagas Disease, *Expert Opin. Drug. Discov.* 2011, 6, 653.
- [18] Cerecetto H., González M., Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 1187.
- [19] Moreno, S., Docampo, R., Mason, R., León, W., Stoppani, A. O. M. Different behaviours of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations, *Arch. Biochem. Biophys.* 1982, 218, 585.
- [20] Urbina J. A., New insights in Chagas' disease treatment, *Drugs of the Future* 2010, 35, 409.
- [21] Docampo, R., Moreno, S. N. J., Stoppani, A. O. M., León, W., Cruz, F. S., Villalta, F., Muniz R. F. A., Mechanism of Nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* 1981, 30, 1947.

- [22] Boiani M., Piacenza L., Hernandez P., Boiani L., Cerecetto H., Gonzalez M., Denicola A., Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?, *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79, 1736.
- [23] Urbina, J. A., Docampo, R., Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, *Trends in Parasitol.* 2003, 19, 495.
- [24] Castro J.A., Montalto de Mecca M., Bartel L.C., Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis), *Hum. Exp. Toxicol.* 2006, 25, 471.
- [25] Nagel R., Genotoxicity studies with two antichagasic drugs, *Mutat. Res.* 1987, 191, 17.
- [26] Bartel L.C., Montalto de Mecca M., Fanelli S.L., Rodriguez de Castro C., Diaz E.G., Castro J.A., Early nifurtimox-induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart. *Hum. exp. Toxicol.* 2007, 26, 781.
- [27] Bermudez J., Davies C., Simonazzia A., Real J. P., Palma S., Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas Disease, *Acta Tropica* 2016, 156, 1.
- [28] Keenan M., Chaplin J. H., A New Era for Chagas Disease Drug Discovery?, *Prog. Med. Chem.* 2015, 54, 185.
- [29] Marin-Neto J.A., Rassi A., Morillo C.A., Avezum A., Connolly S.J., Sosa-Estani S., Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The benznidazole evaluation for interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT), *Am. Heart J.* 2008, 156, 37.
- [30] Croft S. L., Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999, 94, 215.
- [31] Tan, H., Andrews N. W., Don't bother to knock – the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 427.
- [32] Merlino, A.; Gonzalez, M.; Cerecetto, H. Targets for anti-*T. cruzi* drugs in the post-genomic era, *Curr. Enzyme Inhib.* 2010, 6, 195.
- [33] Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2010, 115, 55.
- [34] Rivera A., Bocanegra-García G., Ordaz-Pichardo V., Noguera-Torres C., Monge, A. A New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi* advances and perspectives, *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 3286.

- [35] Maya, J. D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti N., Ferreira A., Morello, A., Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007, 147, 601.
- [36] Otero L., Carvalho I., Kawano D. F., Gonzalez M., Cerecetto H., Otros blancos con potencial uso en el desarrollo de fármacos sobre *T. cruzi*, en: Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de medicamentos. Una visión iberoamericana, RIDIMEDCHAG-CYTED, 2012.
- [37] Abdulla M.H., Lim K.C., Sajid M., McKerrow J.H., Caffrey C.R., Schistosomiasis Mansoni: Novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor, *PLoS Medicine* 2007, 4, e14.
- [38] McKerrow J.H., Doyle P.S., Engel J.C., Podust L.M., Robertson S.A., Ferreira R, Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009, 104, 263.
- [39] Otero L., Rivera G., Gonzalez M., Cerecetto H., Biosíntesis de esteroides de *T. cruzi*, en: Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de medicamentos. Una visión iberoamericana, RIDIMEDCHAG-CYTED, 2012.
- [40] Gabelli B. S., McLellan J. S., Montalvetti A., Eric Oldfield E., Roberto Docampo R., Amzel L. M., Structure and Mechanism of the Farnesyl Diphosphate Synthase from *Trypanosoma cruzi*: Implications for Drug Design, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2006, 62, 80.
- [41] Molina I., Gómez I Prat J., Salvador F., Treviño B., Sulleiro E., Serre N., Pou D., Roure S., Cabezas J., Valerio L., Blanco-Grau A., Sánchez-Montalvá A., Vidal X., Pahissa A., Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease, *New Engl. J. Med.* 2014, 370, 1899.
- [42] Gambino D., Biosistemas susceptibles a metales, en: Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de medicamentos. Una visión iberoamericana, RIDIMEDCHAG-CYTED, 2012.
- [43] Farrell N.P., *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents, In Catalysis by Metal Complexes, Dordrecht: Reidel-Kluwer Academic Press, 1989.*
- [44] Kinnamon K., Steck E.A., Rane E.S., Activity of antitumor drugs against African Trypanosomes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 157.

- [45] Otero L., Vieites M., Boiani L., Denicola A., Rigol C., Opazo L., Olea-Azar C., Maya J.D., Morello A., Krauth-Siegel R.L., Piro O.E., Castellano E., González M., Gambino D., Cerecetto H., Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets, *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322.
- [46] Vieites M., Otero L., Santos D., Olea-Azar C., Norambuena E., Aguirre G., Cerecetto H., Gonzalez M., Kemmerling U., Morello A., Maya J.D., Gambino D. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 411.
- [47] Pagano M., Demoro B., Toloza J., Boiani L., González M., Cerecetto H., Olea-Azar C., Norambuena E., Gambino D., Otero L., Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4937.
- [48] Carvalho I., Leiria Campo V., de Andrade P., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase*, en: Enfermedad de Chagas: estrategias en la búsqueda de medicamentos. Una visión iberoamericana, RIDIMEDCHAG-CYTED, 2012.
- [49] Ivanović I., Gligorijević N., Arandelović S., Radulović S., Roller A., Keppler B.K., Zivoslav Z., Tešić L., Grgurić-Šipka S., New ruthenium(II)-arene complexes bearing hydrazides and the corresponding (thio)semicarbazones of 3- and 4-acetylpyridine: Synthesis, characterization, crystal structure determination and antiproliferative activity, *Polyhedron* 2013, 61, 112.
- [50] Baran, E. J., Química bioinorgánica: avances recientes y perspectivas, *Educación Química* 1999, 10, 30.
- [51] Bertini H. R., Gray S. J., Lippard, J., Valentine, S., *Metals in Medicine*; University Science Books: Sausalito, California, 1994, Vol. 9.
- [52] Sadler P. J., Inorganic chemistry and drug design, *Adv. Inorg. Chem.* 1991, 36, 1-48.
- [53] Farrell N. P., *Uses of Inorganic Chemistry in medicine* The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [54] Guo Z., Sadler, P., Metals in Medicine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 112-1531.
- [55] Keppler, B., *Metal complexes in cancer chemotherapy*, VCH: Weinheim, 1993.
- [56] Abrams M., Murrer B., Metal compounds in therapy and diagnostic, *Science* 1993, 261, 725.

- [57] Zhang C., Lippard S., New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Op. Chem. Biol.* 2003, 7, 481.
- [58] Farrell, N., Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview, *Coord. Chem. Rev.* 2002, 232, 1.
- [59] Casas J., Moreno V., Sánchez A., Sánchez J.L., Sordo J., *Química Bioinorgánica*, Madrid: Síntesis, 2002.
- [60] Metzler-Nolte N., Severin K., Bioorganometallic Chemistry, In: Kraatz HB, editors. *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed. Weinheim: Wiley, 2006, 113.
- [61] Dabrowiak J.C., *Metals in Medicine*, Ed. Chichester: Wiley, 2009.
- [62] Compuestos metálicos como potenciales agentes contra la Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. D. Gambino, L. Otero en: ed. D. Gambino, co-editoras M. Navarro, V. Moreno, *Aplicaciones de compuestos metálicos en Medicina*, libro red CYTED RIIDFCM, Editorial Académica Española: Saarbrücken, Alemania, 2012, pp. 113-140. ISBN: 978-3-8484-7138-6.
- [63] Medicia S., Peana M., Nurchib V. M., Lachowicz J. I., Crisponib G., Zoroddua M. A., Noble metals in medicine: Latest advances, *Coord. Chem. Rev.* 2015, 284, 329–350.
- [64] Jakupec M. A., Galanski M., Arion V. B., Hartinger C. G., Keppler B. K., Antitumour metal compounds: more than theme and variations, *Dalton Trans.* 2008, 183.
- [65] Ronconi L., Peter J., Sadler P. J., Using coordination chemistry to design new medicines, *Coord. Chem. Rev.* 2007, 251, 1633.
- [66] Farrell N., Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, *Comp. Coord. Chem. II* 2003, 9, 809.
- [67] Thompson K. H., Orvig C., Boon and bane of metal ions in medicine, *Science* 2003, 300, 936.
- [68] Beraldo H., Gambino D., Wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 19.
- [69] Thompson K.H., Orvig C., Metal complexes in Medicinal Chemistry: new vistas and challenges in drug design, *Dalton Trans.* 2006, 761.
- [70] Fricker S.P., Metal based drugs: from serendipity to design, *Dalton Trans.* 2007, 4903.

- [71] van Rijt S.H., Sadler P.J., Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discov. Today* 2009, 14, 1089.
- [72] Sánchez-Delgado R. A., Anzellotti A., Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 23.
- [73] Torre, M. H., Estudios de compuestos de cobre con actividad farmacológica, *Tesis de Doctorado en Química*, UDELAR, Montevideo, 2001.
- [74] Urbina J. A., Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant?, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999, 94, 349.
- [75] Sánchez-Delgado R. A., Anzellotti A., Suárez L., in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems 41: Metal Ions and Their Complexes in Medication*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 379.
- [76] Castilla J.J., Mesa-Valle C.M., Sánchez-Moreno M., Arnedo T., Rosales M.J., Mascaro C., Craciunescu D., Osuna A., *Arzneim.-Forsch, Drug Res.* 1996, 46.
- [77] Nothenberg M.S., Takeda G.K., Najjar R., Adducts of nitroimidazole derivatives with rhodium (II) carboxylates: Syntheses, characterization, and evaluation of antichagasic activities, *J. Inorg. Biochem.* 1991, 42, 217.
- [78] Sánchez-Delgado R. A., K. Lazardi, L. Rincón, J.A. Urbina, Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in  $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$ , *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2041.
- [79] Sánchez Delgado R. A., Navarro M., Lazardi K., Atencio R., Capparelli M., Vargas F., Urbina J.A., Bouillez A., Noels A.F., Masi D., Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chim. Acta* 1998, 528, 275.
- [80] Navarro M., Lehmann T., Cisneros-Fajardo E.J., Fuentes A., Sánchez-Delgado R.A., Silva P., Urbina J.A., Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases.: Part 5. Synthesis and characterization of new Ru(II) and Ru(III) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, *Polyhedron* 2000, 19, 2319.
- [81] Navarro M., Cisneros-Fajardo E., Lehmann T., Sánchez-Delgado R. A., Atencio R.,

Silva P., Lira R., Urbina J.A., Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 6. Synthesis and Characterization of New Copper(II) and Gold(I) Clotrimazole and Ketoconazole Complexes and Evaluation of Their Activity against *Trypanosoma cruzi*, *Inorg. Chem.* 2001, 40, 6879.

[82] Martínez A., Carreon T., Iniguez E., Anzellotti A., Sánchez A., Tyan M., Sattler A., Herrera L., Maldonado R. A., Sánchez-Delgado R. A., Searching for New Chemotherapies for Tropical Diseases: Ruthenium–Clotrimazole Complexes Display High *in vitro* Activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and Low Toxicity toward Normal Mammalian Cells, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 3867.

[83] Rodríguez Arce E., Sarniguet C., Morais T. S., Vieites M., Tomaz I., Medeiros A., Comini M., Varela J., Cerecetto H., Gonzalez M., Marques F., Garcia M. H., Otero L., Gambino D., A new ruthenium cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites, *J. Coord. Chem.* 2015, 68, 16, 2923.

[84] Nogueira Silva J.J., Pavanelli W.R., Salazar Gutierrez F.R., Chagas Alves Lima F., Borges Ferreira da Silva A., Santana Silva J., Franco D.W., Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole improves solubility and efficacy, *J. Med. Chem.* 2008, 51, 4104.

[85] Tfouni E., Ramos Truzzi D., Tavares A., Jesus Gomes A., Figueiredo L. E., Franco D.W., Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes, *Nitric Oxide* 2012, 26, 38.

[86] Vieites M., Smircich P., Parajón-Costa B., Rodríguez J., Galaz V., Olea-Azar C., Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008, 13, 723.

[87] Rodriguez Arce E., Mosquillo M. F., Perez-Diaz L., Echeverria G. A., Piro O. E., Merlino A., Coitiño E. L., Maríngolo Ribeiro C., Leite C. Q. F., Pavan F. R., Otero L., Gambino D., Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases, *Dalton Trans.* 2015, 44, 14453.

[88] Benítez J., Guggeri L., Tomaz I., Costa Pessoa J., Moreno V., Lorenzo J., A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-*protozoa* and anti tumor agent, *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1386.

[89] Gambino D., Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. D. Gambino, *Coord. Chem. Rev.* 2011, 255, 2193.

- [90] Costa Pessoa J., Etcheverry S., Gambino D., Vanadium Compounds in Medicine. *J. C, Coord. Chem. Rev.* 2015, 301-302, 24.
- [91] Benitez J., Correia I., Becco L., Fernandez M., Garat B., Gallardo H., Conte G., Kuznetsov M.L., Neves A., Moreno V., Costa Pessoa J., Gambino D., Searching for vanadium-based prospective agents against *Trypanosoma cruzi*: oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline derivatives as ligands. *Zeitschrift fuer Anorganische und Allgemeine Chemie* 2013, 639, 1417.
- [92] Scalese G., Benitez J., Rostan S., Correia I., Bradford L., Vieites M., Minini L., Merlino A., Coitiño E.L., Birriel E., Varela J., Cerecetto H., Gonzalez M., Costa Pessoa J., Gambino D., Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity, *J. Inorg. Biochem.* 2015, 147, 116.
- [93] Fernandez M., Varela J., Correia I., Birriel E., Castiglioni J., Moreno V., Costa Pessoa J., Cerecetto H., Gonzalez M., Gambino D., A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors, *Dalton Trans.* 2013, 42, 11900.
- [94] Fernandez M., Becco L., Correia I., Benitez J., Piro O.E., Echeverria G.A., Medeiros A., Comini M., Lavaggi M.L., Gonzalez M., Cerecetto H., Moreno V., Costa Pessoa J., Garat B., Gambino D., Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents., *J. Inorg. Biochem.* 2013, 127, 150.
- [95] Benitez J., Becco L., Correia I., Milena Leal S., Guiset H., Costa Pessoa J., Lorenzo J., Tanco S., Escobar P., Moreno V., Garat B., Gambino D., Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements, *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 303.
- [96] Lowe G., Droz A.S., Vilaivan T., Weaver G.W., Tweedale L., Pratt J.M., Cytotoxicity of (2,2':6,2''-terpyridine)platinum(II) complexes to *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 999.
- [97] Bonse S., Richards J.M., Ross S.A., Lowe G., Krauth-Siegel R.L., (2,2':6,2''-Terpyridine) platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase but not of human glutathione reductase, *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4812.



[98] Krauth-Siegel R.L., Inhoff O., Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule, *Parasitol Res.* 2003, 90, S77.

[99] Fricker S.P., Mosi R.M., Cameron B.R., Baird I., Zhu Y., Anastassov V., Cox J., Doyle P.S., Hansell E., Lau G., Langille J., Olsen M., Qin L., Skerlj R., Wong R.S.Y., Santucci Z., McKerrow J., Metal compounds for the treatment of parasitic diseases, *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1839.

# Capítulo 2

# Contenido y propuesta

## 2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivos generales

2.1.2 Objetivos específicos

## 2.1 OBJETIVOS

### 2.1.1 OBJETIVOS GENERALES

En función de los antecedentes mencionados, el objetivo general de este trabajo de Tesis es el desarrollo de nuevos compuestos de coordinación con ligandos bioactivos frente a *T. cruzi*, como potenciales metalofármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Como se mencionó en el Capítulo 1, la coordinación de un ión metálico a un ligando bioactivo puede mejorar la biodisponibilidad de este último (por modificación de propiedades como estabilidad, solubilidad y lipofilia), mejorar su índice terapéutico (por incremento de la actividad, disminución de la toxicidad o ambos), así como eludir el desarrollo de resistencia, fenómeno que es un problema de trascendencia creciente en el proceso de descubrimiento y utilización de nuevos fármacos antiparasitarios. A continuación se exponen los ligandos bioactivos seleccionados y los iones metálicos que se utilizarán en este trabajo de Tesis.

#### *Ligandos seleccionados*

Los ligandos seleccionados para este trabajo de Tesis son los bisfosfonatos risedronato (Ris), alendronato (Ale), pamidronato (Pam), e ibandronato (Iba) (Figura 1) y tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano (Figura 2).

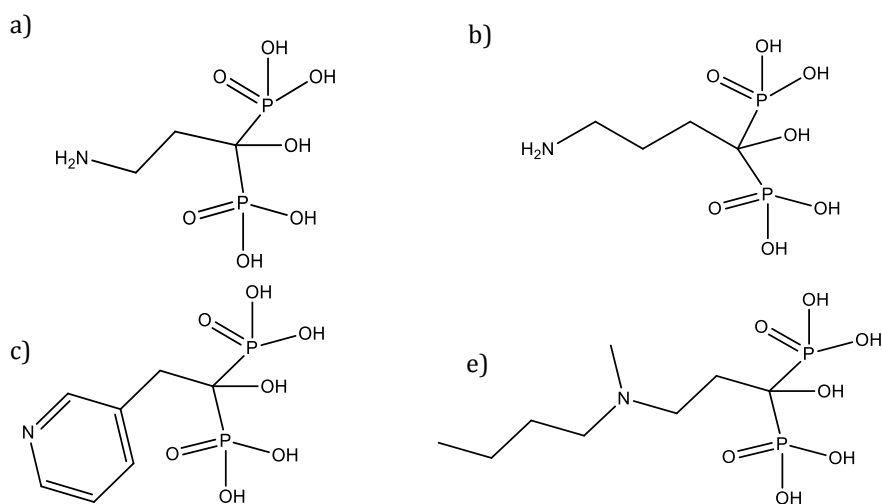


Figura 1: Estructura de los bisfosfonatos a) Pam, b) Ale, c) Ris, d) Iba.

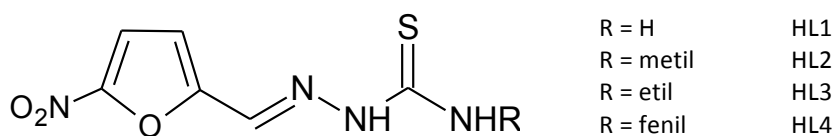


Figura 2: Estructura de las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano como ligandos.

Las propiedades químicas y biológicas de ambos se describirán con mayor detalle en los capítulos 4 y 5, respectivamente.

### *Metales seleccionados*

Para cada uno de los ligandos se utilizarán determinados metales en función de las propiedades químicas y biológicas, así como de los objetivos que se pretenden cumplir con la coordinación.

Para los ligandos bisfosfonato se utilizarán metales de la primera serie de transición (Cu(II), Co(II), Ni(II), Mn(II)). En este caso, como se detallará en el Capítulo 4, el objetivo de la coordinación se centra en generar especies con una mejor biodisponibilidad evitando la ionización de los grupos fosfonato de los ligandos. Por eso, se seleccionaron metales de la primera serie de transición por su carácter de Pearson intermedio-duro, presentando afinidad a coordinar con los átomos de oxígeno presentes en los grupos fosfonato.

Para los ligandos tiosemicarbazona, como se explicará en el Capítulo 5, se utilizará el rutenio como metal, y en particular, el *core* organometálico rutenio-*p*-cimeno. Como ya fue mencionado en el Capítulo 1, en base a los antecedentes descritos, este *core* ha demostrado ser muy adecuado para el desarrollo de potenciales metalofármacos antichagásicos. Además, los complejos bioorganometálicos a obtener podrían presentar un mecanismo de acción múltiple conjugando las propiedades biológicas de los ligandos tiosemicarbazona derivadas de 5-nitrofurano y las del *core* organometálico.

Para llevar a cabo este trabajo, se realizará la síntesis y caracterización estructural completa en estado sólido y en solución de los complejos metálicos obtenidos con los ligandos mencionados. Además del estudio de la actividad anti *T. cruzi in vitro* en

distintas formas del parásito, se pretende profundizar en el mecanismo de acción biológica de los compuestos obtenidos. Para cumplir este objetivo se propone estudiar la interacción de los complejos con biomoléculas como ADN y proteínas y determinar si el mecanismo de acción propio de los ligandos se conserva en las especies complejas.

Estos estudios, junto con el análisis de otras propiedades fisicoquímicas y biológicas de los compuestos, tales como estabilidad en medio acuoso, lipofilia y comportamiento redox, permitirán profundizar en el mecanismo de acción antichagásica de los mismos. Desde el punto de vista químico inorgánico, se espera que los resultados obtenidos permitan profundizar en el conocimiento de la química de coordinación de los metales y ligandos seleccionados.

Por otro lado, la obtención de compuestos de coordinación bioactivos puede aportar nuevas herramientas para el desarrollo y avance de la Química Inorgánica Medicinal y, en particular, para la búsqueda de una respuesta farmacológica para la enfermedad de Chagas.

### **2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Síntesis de complejos de:
  - cobre, cobalto, níquel y manganeso con los bisfosfonatos risedronato, alendronato, pamidronato e ibandronato.
  - rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano.
- Caracterización estructural y fisicoquímica completa de los complejos obtenidos, utilizando, diferentes técnicas: análisis elemental de C, H, N, S, espectroscopías UV-Vis, IR, Raman y <sup>1</sup>H-RMN, voltametría cíclica, difracción de rayos X en polvo y monocristal, espectrometría de masas (ESI-MS).

- Evaluación *in vitro* de la actividad anti *T. cruzi* de todos los complejos obtenidos en las distintas formas celulares del parásito (epimastigota, tripomastigota y amastigota).
- Estudios de toxicidad sobre células mamíferas de los complejos activos sobre *T. cruzi* a efectos de determinar la selectividad hacia el parásito.
- Estudio del mecanismo de acción antichagásica de los complejos que resulten activos. Este punto comprende:
  - caracterización de la especie activa de los complejos estudiando la estabilidad de los mismos frente a la sustitución de ligandos lábiles por agua y su interacción con proteínas.
  - Estudio de inhibición de algunas enzimas parasitarias por efecto de los complejos (cruzipaína, farnesil difosfato sintasa, entre otras).
  - Estudio de la interacción de los complejos con ADN.
  - Estudio de la generación de radicales libres intraparasitarios por técnicas de EPR.
- Evaluación *in vivo* en ratones infectados de la actividad de los complejos activos seleccionados que ameriten, en base a los resultados *in vitro* obtenidos, la realización de estos estudios.
- Estudio comparativo de los resultados obtenidos:
  - comparación de ligandos y sus complejos sintetizados para determinar el efecto de la complejación sobre las propiedades de importancia biológica y la actividad.
  - comparación entre complejos de una misma serie y entre series, para determinar, cualitativamente, las posibles relaciones existentes entre la estructura, las propiedades fisicoquímicas, la actividad biológica y el mecanismo de acción de los mismos.
  - Comparación de compuestos análogos de los diferentes metales en estudio (Cu, Co, Ni, Mn) con el fin de analizar el efecto de la naturaleza del ion

metálico central sobre las propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas de los compuestos obtenidos.



# Capítulo 3

# Materiales y Métodos

## 3.1 Introducción

### 3.1.1 Reactivos

## 3.2 Síntesis

### 3.2.1 Síntesis de ligandos tiosemicarbazona derivadas de 5-nitrofurano

### 3.2.2 Síntesis de los complejos

#### 3.2.2.1 Síntesis de los complejos metálicos con bisfosfonatos

#### 3.2.2.2 Síntesis de los complejos Ru-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano

## 3.3 Caracterización estructural y fisicoquímica

### 3.3.1 Determinación de la fórmula de los compuestos

#### 3.3.1.1 Análisis elemental de elementos livianos

#### 3.3.1.2 Espectrometría de masas

#### 3.3.1.3 Análisis termogravimétrico

#### 3.3.1.4 Medidas de conductividad

### 3.3.2 Caracterización estructural

#### 3.3.2.1 Estructura al estado sólido

##### 3.3.2.1.1 Espectroscopía IR

##### 3.3.2.1.2 Difracción de rayos X en monocristal y en polvo

#### 3.3.2.2 Estructura en solución

##### 3.3.2.2.1 Espectroscopía de RMN

### 3.3.3 Caracterización fisicoquímica

#### 3.3.3.3 Estabilidad en solución acuosa

#### 3.3.3.4 Voltametría cíclica

## 3.4 Actividad biológica de complejos metálicos con bisfosfonatos

### 3.4.1 Estudios *in vitro*

#### 3.4.1.1 Actividad anti *T. cruzi* *in vitro*

##### 3.4.1.1.1 Inhibición del crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi*

##### 3.4.1.1.2 Inhibición del crecimiento de amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

### 3.4.2 Estudio de mecanismo de acción

#### 3.4.2.1 Inhibición de actividad de la farnesil difosfato sintasa de *T. cruzi* (TcFPPS)

3.4.2.2 Inhibición de actividad de la solanesil difosfato sintasa de *T. cruzi* (TcSPPS)

3.4.2.3 Interacción con proteínas

3.4.3 Estudios *in vivo*

### 3.5 Actividad biológica de complejos Ru-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano

3.5.1 Estudios *in vitro*

3.5.1.1 Actividad anti *T. cruzi* *in vitro*

3.5.1.1.1 Inhibición del crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi*

3.5.1.1.2 Inhibición del crecimiento de tripomastigotas de *T. cruzi*

3.5.1.2 Actividad anti *T. brucei*

3.5.1.3 Citotoxicidad inespecífica en macrófagos

3.5.2 Estudio de mecanismo de acción

3.5.2.1 Formación intraparasitaria de radicales libres

3.5.2.2 Inhibición de la cruzipaína

3.5.3 Interacción con ADN

3.5.3.1 Interacción con ADN de timo de ternera

3.5.3.2 Medidas de viscosidad de ADN

3.5.3.3 Microscopía de Fuerzas Atómicas

3.5.4 Interacción con proteínas plasmáticas

3.5.4.1 Dicroísmo Circular

3.5.4.2 Fluorescencia

3.5.5 Estudios de actividad antitumoral

3.5.5.1 Ensayo de actividad

3.5.5.2 Ensayos de apoptosis *in vitro*

### 3.6 Bibliografía

### 3.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen los métodos utilizados en cada una de las etapas de este Trabajo de Tesis: síntesis, caracterización analítica, estructural y fisicoquímica, ensayos biológicos y estudios de mecanismo de acción de los complejos metálicos en estudio. Previamente a la descripción de alguna de las técnicas utilizadas se fundamenta su utilidad en el marco de los objetivos del presente trabajo.

#### 3.1.1 REACTIVOS

Los reactivos para la síntesis de los ligandos tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro-2-furaldehído, las sales metálicas, los disolventes, así como los ligandos bisfosfonatos risedronato ( $C_7H_{10}NO_7P_2Na \cdot 2,5H_2O$ , NaRis $\cdot 2,5H_2O$ ), alendronato ( $C_4H_{12}NO_7P_2Na \cdot 3H_2O$ , NaAle $\cdot 3H_2O$ ), pamidronato ( $C_3H_9NO_7P_2Na_2$ , Na<sub>2</sub>Pam), e ibandronato ( $C_9H_{21}NO_7P_2Na \cdot H_2O$ , NaIba $\cdot H_2O$ ) y todos los reactivos que se encuentran disponibles comercialmente fueron utilizados sin posterior purificación. El complejo precursor  $[Ru^{II}(p\text{-cimeno})(Cl)]_2Cl_2$  fue sintetizado según procedimientos ya establecidos [1,2].

### 3.2 SÍNTESIS

#### 3.2.1 SÍNTESIS DE LIGANDOS TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO

Las tiosemicarbazonas seleccionadas para este Trabajo de Tesis (5-nitro-2-furaldehído tiosemicarbazona (HL1), 5-nitro-2-furaldehído-*N*<sup>4</sup>-metil-tiosemicarbazona (HL2), 5-nitro-2-furaldehído-*N*<sup>4</sup>-etil-tiosemicarbazona (HL3), 5-nitro-2-furaldehído-*N*<sup>4</sup>-fenil-tiosemicarbazona (HL4)) fueron sintetizadas siguiendo metodologías previamente descritas [2], según el procedimiento general que se muestra en la Figura 1.

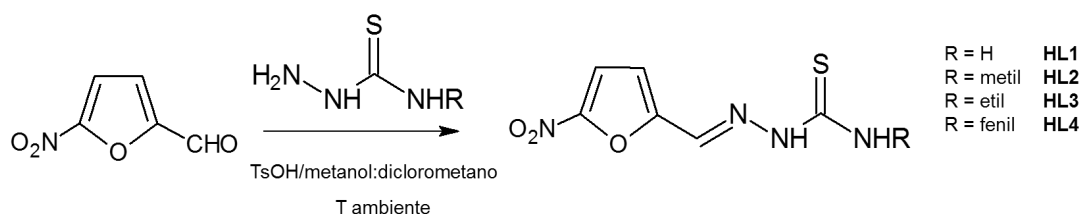


Figura 1: Síntesis de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano.

Se parte de 5-nitro-2-furaldehído y la tiosemicarbazona correspondiente. Los detalles particulares de cada una de las síntesis fueron descritos previamente, así como también los detalles de su caracterización [2].

### 3.2.2 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

#### 3.2.2.1 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS METÁLICOS CON BISFOSFONATOS

Se obtuvieron dieciseis complejos metálicos con metales de la primera serie de transición con los bisfosfonatos risedronato (Ris), alendronato (Ale), pamidronato (Pam) e ibandronato (Iba). Todos los complejos se sintetizaron de manera similar. Se disuelve entre 0,14-0,18 mmol de la sal del bisfosfonato, NaBP, (donde BP = Ris·2,5H<sub>2</sub>O, Ale·3H<sub>2</sub>O, Pam, e Iba·H<sub>2</sub>O) en 5 mL de agua y se ajusta el pH de la solución resultante entre 2-4 para Ris, Ale y Pam y 5-6 para Iba, mediante agregado de HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. Luego, se agrega la cantidad correspondiente (0,07-0,09 mmol) de MCl<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O (donde M = Mn, Co, Ni y Cu y x = 4, 6, 6 y 2, respectivamente). Luego de 24 horas a temperatura ambiente se filtra el sólido obtenido.

#### 3.2.2.2 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS Ru-*p*-CIMENO CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO

Para la síntesis de los complejos [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L)<sub>2</sub>]X<sub>2</sub> (X = Cl o PF<sub>6</sub>) con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano como ligandos se disuelve 0,0825 mmol de [Ru<sup>II</sup>(*p*-cimeno)Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> en 5 mL de metanol y se agrega 0,165 mmol de HL2-HL4 disuelto en 5 mL de metanol. Se deja agitando la solución durante 24 horas a temperatura ambiente. En el caso de HL4, se filtra el sólido obtenido (RuL4). Para los complejos con HL2 y HL3, se agrega 0,165 mmol de NaPF<sub>6</sub> a la solución resultante y se

obtiene un sólido cristalino que finalmente se filtra. Para la obtención del complejo Ru-*p*-cimeno con HL1 se disuelve 0,0825 mmol de  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\textit{p}\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$  en 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se agregan 0,165 mmol de HL1 disueltos en 5 mL del mismo disolvente. Luego, se calienta a reflujo la solución resultante durante 5 horas. Finalmente se filtra el sólido rojo obtenido.

### **3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FÍSICOQUÍMICA**

#### **3.3.1 DETERMINACIÓN DE LA FÓRMULA DE LOS COMPUESTOS**

##### **3.3.1.1 ANÁLISIS ELEMENTAL DE ELEMENTOS LIVIANOS**

Los complejos fueron caracterizados por análisis elemental de C, N, H y S mediante un analizador Thermo Flash 2000, con un procesador de datos Eager 200, perteneciente a Facultad de Química.

##### **3.3.1.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La espectrometría de masas brinda información para la determinación de la fórmula de un compuesto. El patrón de fragmentación puede ayudar a la elucidación de la estructura del compuesto, a partir de la información que brinda en cuanto a los átomos, o grupos atómicos, que se encuentran enlazados.

Se utilizó esta técnica para estudiar el patrón de fragmentación de los complejos  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$  ( $\text{X} = \text{Cl}$  o  $\text{PF}_6$ ) con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano como apoyo para su caracterización y la determinación de su fórmula y estructura.

Los estudios de espectrometría de masas (ESI-MS) de los complejos de la serie Ru-*p*-cimeno fueron realizados en un espectrómetro Varian Ion Trap 500-MS en el Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, bajo la supervisión del Dr. João Costa-Pessoa. Se utilizó metanol como solvente. Cada espectro se obtuvo como la combinación de varios escaneos para cada muestra.

### **3.3.1.3 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO**

El análisis termogravimétrico es una técnica que permite determinar, entre otras cosas, la cantidad de moléculas de agua de hidratación que presenta la fórmula del compuesto, mediante el aumento sucesivo de la temperatura y medida de la disminución de masa de la muestra en función del mismo.

Se utilizó esta técnica para estudiar la cantidad de moléculas de agua de hidratación presentes en la fórmula de los compuestos obtenidos con bisfosfonatos.

El análisis termogravimétrico se realizó en la Cátedra de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad de la República, bajo la supervisión del Dr. Jorge Castiglioni. El experimento se realizó en una termobalanza Shimadzu TGA 50 con una celda de platino, trabajando bajo inyección de nitrógeno ( $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) y una velocidad de calentamiento de  $0,5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (desde temperatura ambiente a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y  $1,0 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (rango de  $80 - 350 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### **3.3.1.3 MEDIDAS DE CONDUCTIVIDAD**

Las medidas de conductividad de los complejos en solución permiten determinar si se trata de un complejo neutro o cargado. Si éste resulta cargado también permiten determinar de qué tipo de electrolito se trata. Existen datos bibliográficos de conductividades molares para numerosos complejos en diferentes solventes. Por comparación de la conductividad molar determinada para los complejos, con los datos bibliográficos en un mismo solvente, se puede determinar el tipo de electrolito presente en solución [3].

Las medidas de conductividad se realizaron a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en soluciones  $10^{-3} \text{ M}$  de los complejos en distintos disolventes (DMSO, DMF). La conductividad se midió con un conductímetro 4310 Jenway.

### **3.3.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL**

#### **3.3.2.1 ESTRUCTURA AL ESTADO SÓLIDO**

##### **3.3.2.1.1 ESPECTROSCOPIA IR**

La espectroscopia infrarroja (IR) como técnica de caracterización permite, a partir de los corrimientos dados en las señales de los espectros vibracionales infrarrojos de los compuestos metálicos obtenidos, determinar la presencia de los distintos ligandos de interés y coligandos coordinados al metal por comparación con los espectros obtenidos para los ligandos libres. A su vez, estos corrimientos sugieren cuál es el sitio de unión del ligando al metal central y qué sectores del ligando no están involucrados en la coordinación.

La simetría de la molécula en estudio determinará el número esperado de bandas activas en el IR. Además, la frecuencia de estiramiento de un determinado enlace estará relacionada con la fuerza y la distancia de enlace. Variaciones en esta frecuencia entre diferentes complejos de una familia permite deducir aspectos relacionados con la coordinación y con la naturaleza electrónica de los demás ligandos presentes en el complejo.

Los espectros FTIR ( $4000-200\text{ cm}^{-1}$ ) fueron medidos en pastillas de KBr o de CsI en un instrumento Bomem M102 de la Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de la República.

Los espectros Raman se realizaron en un equipo Bruker IF 66 (accesorio FRA 106) perteneciente al Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata, Argentina.

##### **3.3.2.1.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL Y EN POLVO**

La difracción de rayos X, tanto en monocristal como en polvo microcristalino, es una técnica consistente en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia en estudio. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que se



pueden interpretar, aplicando la Ley de Bragg, según la ubicación de los átomos en el cristal.

Se resolvió la estructura cristalina por difracción de rayos X de los monocristales de los complejos y de polvos microcristalinos obtenidos.

La obtención de los monocristales adecuados para la resolución de una estructura por difracción de rayos X constituye el paso limitante para la aplicación de esta técnica. En este trabajo se aplicaron distintos métodos para la obtención de dichos monocristales:

- evaporación lenta del disolvente o de mezclas de disolventes de distinta volatilidad a temperatura ambiente o en un rango de -5 °C a 25 °C
- recristalización por cambio de temperatura
- difusión lenta de disolventes miscibles
- disolución de vapor de disolventes volátiles en disolventes no volátiles
- disolución lenta de sales de con contraiones voluminosos

En muchos casos la baja solubilidad de los compuestos limitó de forma importante los métodos a ensayar.

Los estudios de difracción de rayos X en monocristal fueron realizados por el Dr. Franco Caruso, en el Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, Italia. Además, los datos cristalográficos fueron recolectados utilizando bajas temperatura y una radiación MoK $\alpha$  monocromada a través de grafito en un difractómetro de rayos X Bruker SMART APEX II CCD. Los datos fueron estudiados con el programa Mercury, versión 1.2.1, para analizar el empaquetamiento cristalino, ángulos de torsión, distancias entre átomos no enlazados, entre otros.

Los estudios de difracción de rayos X en polvo microcristalino fueron realizados por el Dr. Ricardo Faccio, en el Laboratorio de Cristalografía, Estado Sólido y Materiales, Facultad de Química, Universidad de la República. Los datos cristalográficos fueron obtenidos utilizando un difractómetro de polvo Rigaku ULTIMA IV, radio 285 nm, operando en una geometría Bragg Brentano. Además, se utilizó una radiación CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) monocromada con un haz difractado a través de un cristal de germanio para recolectar datos en el rango 2-70° 2 $\theta$  utilizando un detector de centelleo. Se fijaron cortes de 1/3° para la recolección de datos. Las posiciones de los picos se extrajeron de los datos utilizando un software POWDERX [4] y el indexado de picos, así como la determinación de la celda unidad se realizaron con un software DICVOL04 [5]

a efectos de determinar la celda unidad y la geometría de los grupos espaciales en las muestras cristalinas.

### **3.3.2.2 ESTRUCTURA EN SOLUCIÓN**

#### **3.3.2.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RMN**

La espectroscopía RMN es una fuente importante de información estructural para la caracterización de compuestos de coordinación, en particular, de complejos diamagnéticos. Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento entre núcleos brindan información del entorno químico del núcleo en estudio. Esta técnica permite determinar la naturaleza de los grupos químicos presentes y apoya la determinación de la geometría y la simetría molecular y las relaciones estereoquímicas entre grupos.

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Se realizaron experimentos de correlación heteronuclear (HMQC y HMBC) para facilitar la asignación de las señales. Estos experimentos se utilizaron, en primera instancia, para confirmar la presencia de los ligandos en los distintos complejos. Además, se obtuvieron patrones de desplazamiento químico de las señales de los complejos en relación a los ligandos libres permitiendo concluir acerca de la estructura de los mismos en solución.

Por otro lado, a partir de las características de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (ancho de los picos y desplazamientos químicos) se concluyó respecto a las propiedades magnéticas de estos complejos. Los resultados fueron correlacionados con la posible geometría del complejo y con el estado de oxidación del metal central a efectos de postular, cuando no era conocida, una fórmula para los mismos.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  fueron realizados a  $30^\circ\text{C}$  en DMSO- $d_6$  para los complejos derivados de Ru-*p*-cimeno en un instrumento Bruker DPX-400 a 400 MHz en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República. Se realizaron algunos experimentos variando la temperatura de trabajo para detectar la presencia de distintos conformeros en solución. Previamente se determinó la estabilidad de los complejos en el disolvente del ensayo. Los experimentos de

correlación heteronuclear (2D-HETCOR), HMQC y HMBC, fueron realizados con el mismo equipo utilizando los softwares disponibles.

### **3.3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA**

#### **3.3.3.1 ESTABILIDAD EN SOLUCIÓN ACUOSA**

El estudio de la estabilidad de los complejos en solución acuosa en relación a posibles procesos redox o de sustitución, resulta relevante para determinar la naturaleza de la especie potencialmente activa. Por un lado, es necesario determinar si el ligando de interés es capaz de permanecer unido al metal por lo menos hasta alcanzar su sitio de acción. Por otro lado, la sustitución de ligandos lábiles por agua en el medio biológico, previamente a su interacción con biomoléculas como proteínas o ADN, ha sido ampliamente estudiada para compuestos organometálicos con actividad antitumoral [6-9]. Por lo tanto, resulta importante el estudio de estos procesos de hidrólisis.

Se estudió la estabilidad de los complejos de la serie Ru-*p*-cimeno en una mezcla DMSO : buffer fosfato pH = 7,4 (% de DMSO en la mezcla menor al 1%). Dicho estudio se realizó en condiciones que pudieran ser extrapolables a las existentes en los ensayos de actividad biológica. Se incubaron soluciones de los complejos de concentración adecuada a 37 °C y se determinó espectrofotométricamente la variación del espectro electrónico de los mismos con el tiempo. Se midió, además, la variación de la conductividad de las soluciones con el tiempo para detectar la formación de especies cargadas.

#### **3.3.3.4 VOLTAMETRÍA CÍCLICA**

Las técnicas electroquímicas constituyen herramientas útiles para la caracterización de complejos en solución. En este trabajo, el análisis de los resultados obtenidos de los compuestos metálicos con bisfosfonatos, se utilizó para determinar presencia de especies complejas en solución. Además, en este trabajo se utilizó la técnica de voltametría cíclica con el fin de determinar la variación del potencial de reducción del grupo nitro de los ligandos derivados de 5-nitrofurano como consecuencia de la

coordinación. Uno de los mecanismos de acción antichagásica propuesto para estos últimos ligandos seleccionados (tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano) en este trabajo, por analogía con Nifurtimox, es la formación de radicales libres tóxicos para el parásito (anión radical nitro, derivados nitrosos, etc.) como consecuencia de la reducción metabólica del grupo nitro [10-12]. Esta capacidad de generar radicales libres depende entre otros factores del potencial de reducción del grupo nitro. Por lo tanto, es importante conocer cómo se modifica, luego de la coordinación, el potencial de reducción de ese grupo, a fin de establecer una correlación con la actividad tripanosomicida.

Para los estudios de comportamiento electroquímico por voltametría cíclica se utilizó un equipo Metrohm 693 VA con un convertidor de voltaje-corriente (694 VA Stand) para medir la corriente resultante y un registrador (693 VA Processor). Se utilizó una celda de 10 mL de tres electrodos, donde un electrodo de gota colgante de mercurio (HDME) fue empleado como electrodo de trabajo, un alambre de platino fue utilizado como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl fue utilizado como electrodo de referencia. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente en ausencia de oxígeno disuelto.

Para los compuestos metálicos con ligandos bisfosfonatos se utilizaron soluciones acuosas de los complejos de concentración 0,5 mM (buffer fosfato pH = 7; 0,1 M). El propio buffer se utilizó como electrolito soporte.

Los estudios de comportamiento electroquímico por voltametría cíclica para los compuestos metálicos Ru-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano fueron realizados en DMSO (aproximadamente  $10^{-3}$  M) utilizando perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) (aproximadamente 0,1 M) como electrolito soporte.

## 3.4 ACTIIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS METÁLICOS CON BISFOSFONATOS

### 3.4.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

#### 3.4.1.1 ACTIVIDAD ANTI *T. cruzi* *IN VITRO*

##### 3.4.1.1.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi* (CEPA TULAHUEN 2)

La determinación de la actividad biológica *in vitro* sobre la forma epimastigota de *T. cruzi* se realizó en las mismas condiciones previamente descritas para los ligandos [2,13,14]. Estos ensayos fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Hugo Cerecetto en el Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

La forma epimastigota del parásito *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) fue cultivada a 28 °C en un medio axénico (infusión de cerebro-corazón (BHI)-triptosa agar), complementado con un 5-10% de suero fetal bovino. Las células de un cultivo de 5 días fueron inoculadas en 50 mL de medio de cultivo fresco para dar una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  células/mL. El crecimiento de las células fue seguido por medidas diarias de la absorbancia del cultivo a 600 nm durante un período de 11 días. Antes de la inoculación se agregaron a los medios dosis fijas de los compuestos a evaluar a partir de una solución stock en buffer fosfato pH = 7,4. La capacidad de los compuestos de inhibir el crecimiento del parásito se evaluó, por triplicado, en comparación con el control (ningún fármaco añadido al medio). El control se realizó en ausencia de cualquier compuesto a testear. El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) se calculó como sigue:  $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$  donde  $A_p = A_{600}$  del cultivo que contiene el fármaco en el día 5;  $A_{0p} = A_{600}$  del cultivo que contiene el fármaco después de la adición de los inóculos (día 0),  $A_c = A_{600}$  del cultivo en ausencia de cualquier fármaco (control) en el día 5;  $A_{0c} = A_{600}$  en ausencia del fármaco en el día 0. Se utilizaron nifurtimox y benznidazol como fármacos tripanosomicidas de referencia. Los valores reportados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar menor al 10%.

### **3.4.1.1.2 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *T. cruzi***

La determinación de la actividad biológica *in vitro*, sobre la forma amastigota de *T. cruzi*, se realizó, nuevamente, en las mismas condiciones que para los ligandos correspondientes [2,14]. Estos ensayos fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Roberto Docampo en el Center for Tropical and Emerging Global Diseases and Department of Cellular Biology, University of Georgia, Athens, USA.

Las células Vero ( $3,4 \times 10^4$  cel/plato), previamente irradiadas con Gamma (2,000 Rads) fueron cultivadas en una placa de 96 celdas de fondo claro (Greiner Bio-One) en 100  $\mu$ L de un medio J-RPMI (Sigma) con 10% de suero fetal bovino (FBS). Los cultivos se incubaron durante una noche a 35 °C y 7% de CO<sub>2</sub>. Luego de la incubación, se inocula  $3,4 \times 10^5$  unidades de tripomastigotas/celda (cepa CL sobre-expresando una proteína fluorescente proveniente de Tomate rojo [15]) en 50  $\mu$ L, y se dejaron incubar durante 5 horas a 35 °C y 7% de CO<sub>2</sub>. Luego de la infección, las celdas se lavan una vez con solución Hanks (150  $\mu$ L/celda) a efectos de eliminar cualquier parásito extracelular. Luego, se agregan diluciones seriadas de los compuestos en medio Roswell Park Memorial Medium (RPMI) en volúmenes de 150  $\mu$ L. Cada solución se testeó por cuadruplicado. Cada celda que contenía el control con las células hospedero y sin parásito (para chequeo del blanco), controles con dos diluciones de drogas representativas y sin parásitos (para ensayos de citotoxicidad), y controles con parásitos en ausencia de drogas (control positivo). Benznidazol fue utilizado como control positivo en concentraciones de 3,5 y 1,5  $\mu$ M. Luego de la adición de la droga, las celdas se incuban a 35 °C y 7% de CO<sub>2</sub>. En el día 3 post-infección, las celdas fueron estudiadas mediante fluorescencia. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron a partir de un análisis de regresión no lineal utilizando SigmaPlot.

Con el fin de determinar el grado de selectividad en la acción citotóxica de los complejos metálicos de bisfosfonatos obtenidos en este trabajo se estimó la toxicidad de los compuestos en las células Vero utilizadas.

### **3.4.2 ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN**

#### **3.4.2.1 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FARNESIL DIFOSFATO SINTASA DE *T. cruzi* (TcFPPS)**

Los estudios de inhibición de actividad de la enzima farnesil difosfato sintasa de *T. cruzi* (TcFPPS) permiten dilucidar si el mecanismo de acción de los ligandos como antiparasitarios se conserva en los complejos y si existe alguna correlación entre los datos de inhibición enzimática y los datos de inhibición de crecimiento de los parásitos. Se realizaron ensayos sobre la FPPS humana (HsFPPS) con el fin de estudiar la selectividad de los compuestos.

Estos ensayos se llevaron a cabo en el Tropical and Emerging Diseases and Cellular Biology Department, University of Georgia, United States, bajo la supervisión del Dr. Roberto Docampo.

Se obtiene, expresa, y purifica la HsFPPS y la TcFPPS tal como fue descrito previamente [16,17]. Se precalienta, a 37 °C, una mezcla de 150 µL de buffer HEPES (10 mM HEPES ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico)) pH= 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioneitol 2 mM, [4-<sup>14</sup>C]IPP (isopentenil difosfato) 4,7 µM y DMAPP (dimetilalil pirofosfato) 55 µM. El ensayo se inicia mediante la adición de 10-20 ng de la proteína recombinante y se deja reaccionar durante 30 minutos a 37 °C, y se concluye con la adición de HCl 6 M (10 µL). La solución resultante se alcaliniza con NaOH 6 M (15 µL), diluye en agua (0,7 mL) y extrae con hexano (1 mL). Luego, la solución de hexano se lava con agua y se transfiere a un vial de centelleo para su cuantificación. Se define una unidad de actividad enzimática como la actividad requerida para incorporar 1 nmol de [4-<sup>14</sup>C]IPP en [14-<sup>14</sup>C]IPP en 1 minuto. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal utilizando Sigma-Plot.

#### **3.4.2.2 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SOLANESIL DIFOSFATO SINTASA DE *T. cruzi* (TcSPPS)**

La actividad de la enzima fue determinada mediante un ensayo radiométrico. Brevemente, 100 µL de buffer Tris-HCl 100mM, pH=7,4, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X-

100, 7,07  $\mu\text{M}$  [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]IPP (10  $\mu\text{Ci}/\text{Imol}$ )), y 50  $\mu\text{M}$  GGPP fueron pre entibiados a 37 °C. El ensayo se inicia con el agregado de 10-20 ng de proteína recombinante. La reacción procede por 30 minutos a 37°C y se detiene por enfriamiento en baño de hielo. Los productos de la reacción se extraen con 1 mL de butanol saturado con agua. La capa orgánica se lava con butanol saturado con NaCl y se transfiere a un vial de centelleo con 4 mL de solución de Ecolume para el conteo. Se define una unidad de actividad enzimática como la actividad requerida para incorporar 1 nmol de [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]IPP en [ $4\text{-}^{14}\text{C}$ ]IPP en 1 minuto. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal utilizando Sigma-Plot.

### 3.4.2.3 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

La interacción de un fármaco con las proteínas del plasma tiene importantes consecuencias sobre las propiedades farmacocinéticas del mismo. En particular, los cambios producidos en la biodistribución y biodisponibilidad a partir de su unión a las proteínas pueden resultar en la modificación o pérdida total de su actividad biológica [18-20].

Las proteínas del plasma poseen una gran cantidad de sitios de unión para un metal, mayoritariamente N y S de distintos residuos aminoácidos. Por lo que la interacción de un metalofármaco con las proteínas del plasma es posible [18]. Esta unión, si es irreversible, puede determinar la inactivación total del complejo o, en otros casos, puede servir, como mecanismo de transporte del fármaco hacia la célula blanco. Por otro lado, las modificaciones estructurales producidas por la unión de un complejo a la albúmina por ejemplo, pueden formar parte del mecanismo de acción de dicho complejo [20]. La albúmina es la proteína más abundante del plasma por lo que se la suele utilizar como modelo para los estudios de interacción con proteínas.

Los estudios de interacción con albúmina sérica bovina (BSA) de los complejos metálicos de bisfosfonato fueron realizados en la Facultad de Química de la Universidad de la República de acuerdo a métodos previamente reportados [19]. Se incubó a 37 °C la proteína (500  $\mu\text{M}$ ) con una cantidad del complejo metálico en relación 1:1 en buffer fosfato 100 mM, pH = 7,4, NaCl = 0,15 M durante 48 horas. Luego, a partir de las diferencias en los pesos moleculares, se separa la BSA



(incluyendo BSA unida al complejo metálico) del resto de los componentes de la solución (complejo metálico libre) mediante ultrafiltración con Centrikon (corte 10.000). Se realizó un ensayo de control (sin adición de BSA) para descartar la posible adsorción de los complejos a los filtros. La cantidad de complejo no unido en el filtrado fue cuantificada mediante espectrometría de absorción atómica utilizando un espectrómetro Perkin Elmer 5000.

### **3.4.3 ESTUDIOS *IN VIVO***

Los estudios *in vivo* fueron realizados por personal especializado en el Tropical and Emerging Diseases and Cellular Biology Department, University of Georgia, United States, bajo la supervisión del Dr. Roberto Docampo.

La actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi* fue evaluada *in vivo* en ratones machos Swiss albinos (6 a 8 semanas de edad, 30 g de peso) infectados experimentalmente (tripomastigotas circulantes de la cepa CL, clon Brener de *T. cruzi*, que produce su pico de parasitemia 21 a 25 días después de la infección) por vía intraperitoneal con 5000 parásitos (fase aguda) [21].

Éstos fueron tratados luego del noveno día de infección y durante 2 semanas con benznidazol (50 mg/Kg/día) o con los compuestos en estudio (5 mg/Kg/día), administrados por vía oral. Los ratones infectados no tratados recibieron 200 µL de una solución salina fosfatada. Se evaluó la eficacia del tratamiento por conteo semanal del número de parásitos en sangre periférica [22] durante 8 semanas y observación de la mortandad [21, 23-25].

### **3.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS Ru-*p*-CIMENO CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO**

#### **3.5.1 ESTUDIOS *IN VITRO***

##### **3.5.1.1 ACTIVIDAD ANTI *T. cruzi* *IN VITRO***

Todos los estudios de actividad anti *T. cruzi in vitro* fueron realizados con cepas pertenecientes al Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile bajo la supervisión del Dr. Juan Diego Maya.

##### **3.5.1.1.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi***

La inhibición del crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* se realizó según métodos previamente descritos [26-27]. La forma epimastigota del parásito, cepa Dm28c, fue cultivada a 28 °C en un medio Diamond monofásico, pero sustituyendo la sangre por hemina 4 μM. Se agregó suero fetal bovino hasta una concentración final de 4%. Luego, se adicionaron los compuestos disueltos en DMSO (concentración final de 1%) a una suspensión de 3x10<sup>6</sup> epimastigotas/mL. El crecimiento del parásito fue seguido por nefelometría (procedimiento analítico similar a la turbidimetría que se basa en la medida de la dispersión de la radiación que atraviesa un medio con partículas en suspensión) durante 10 días. Se comprobó que este % de DMSO no tiene ningún efecto por sí mismo sobre la proliferación de los parásitos (no se observó efecto en el crecimiento de epimastigotas por la presencia de hasta 1% DMSO en los medios de cultivo). La capacidad de los compuestos de inhibir el crecimiento del parásito se evaluó, por triplicado, en comparación con el control (ningún fármaco añadido al medio). El control se realizó con la presencia de DMSO 1% y con la ausencia de cualquier compuesto a testear. A partir de la curva de crecimiento exponencial de epimastigota, se calcula la constante de crecimiento del cultivo (kc) para cada concentración de compuesto y para los controles (coeficiente de regresión > 0,9, p < 0,05). Esta constante corresponde a la pendiente resultante del gráfico del logaritmo neperiano (Ln) de la lectura nefelométrica en función del tiempo [27]. Una vez

establecida la actividad a dosis fija se determinaron curvas dosis-respuesta y se calcularon valores de  $CI_{k_{50}}$  (concentración inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito). El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) se calculó mediante un análisis de regresión lineal de los valores de K obtenidos y las concentraciones utilizadas en el experimento. Los valores reportados corresponden a la media de tres experimentos independientes

### **3.5.1.1.2 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE TRIPOMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *T. cruzi***

Se infectaron células Vero con tripomastigotas metacíclicas a partir de cultivos envejecidos de epimastigotas (cepas Dm28c o Y). Posteriormente, las tripomastigotas cosechadas a partir de este cultivo fueron utilizadas para infectar más cultivos Vero hasta una densidad de  $1 \times 10^6$  parásitos /  $25 \text{ cm}^2$ . Estas células Vero infectadas fueron incubadas de 5 a 7 días a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , en aire humidificado con 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de ese tiempo, el medio de cultivo fue centrifugado a  $3.000 \text{ g}$  durante 5 minutos, y los pellets de tripomastigotas se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina hasta una densidad final de  $1 \times 10^7$  parásitos/mL ( $2,10 \times 10^8$  tripomastigotas equivalen a 1 mg de proteína o 12 mg de peso húmedo). Los ensayos de viabilidad fueron realizados utilizando el método de reducción MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), tal como fue previamente descrito [28,29]. Esta reducción metabólica produce formazán de color azul, cuya concentración se determina espectrofotométricamente y permite determinar así, la viabilidad celular. En forma breve, se incubaron  $1 \times 10^7$  tripomastigotas en medio de cultivo RPMI-suero fetal bovino a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas con (y sin) los complejos de estudio en concentraciones finales de 5-100  $\mu\text{M}$ . Se extrajo una alícuota de la suspensión de parásitos y se la incubó en una placa de 96 pocillos a la cual se le agregó MTT (concentración final de 0,5 mg/mL, incubado durante 4 horas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ), se la solubilizó con dodecil sulfato 10% y HCl 0,1 mM y se la incubó una noche.

La formación de formazán se cuantificó a 570 nm con la referencia a 690 nm en un lector de pocillos múltiples (Labsystems Multiskan MS). Los parásitos sin tratar fueron

utilizados como control negativo (viabilidad de 100%). Finalmente, se realizó un análisis de regresión no lineal, graficando Log de las concentraciones en función de la respuesta normalizada, utilizando el software GraphPad prism. Los resultados se expresaron como valores de  $CI_{50}$ . La significancia estadística fue calculada utilizando el test de Mann-Whitney para las comparaciones no paramétricas entre los tratamientos de los grupos.

### **3.5.1.2 ACTIVIDAD ANTI *T. brucei* IN VITRO**

Este ensayo fue realizado en el Grupo de Biología Redox de Trypanosomas del Institut Pasteur de Montevideo, bajo la supervisión del Dr. Marcelo Comini.

La forma infectiva de *T. brucei brucei* cepa 427, línea celular 449 (codificando una copia de la proteína represora de tet: Pleo<sup>R</sup>) [30], fue cultivada de forma aeróbica en un incubador humidificado a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> en un medio HMI-9 [31] suplementado con un 10% (v/v) de suero de timo de ternera (FCS), penicilina 10 U/mL, streptomina 10 µg/mL y 0,2 µg/mL de fleomicina. Se prepararon soluciones stock 10 mM de los compuestos a testear y del precursor [Ru(*p*-cimeno)Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> utilizando DMSO como disolvente y luego se prepararon diluciones en medio de cultivo a fin de obtener 5 concentraciones experimentales (desde 100 µM hasta 0,01 µM). Los controles incluyeron el vehículo para el compuesto (DMSO) a concentraciones finales del rango de 0,0001 a 1% (v/v) y medio de cultivo (control de crecimiento). Cada condición fue testeada por triplicado. El efecto citotóxico de los compuestos como tripanosomicidas fue evaluado por conteo celular absoluto. Los tripanosomas fueron cultivados y crecidos hasta la fase exponencial, cosechados por centrifugación a 2000 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente y suspendidos a una densidad de 5x10<sup>5</sup> cel/mL en medio de cultivo fresco. Luego, se inoculó 1 mL de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Inmediatamente se agregó el DMSO o los compuestos a las concentraciones descritas anteriormente y la placa se incubó a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 24 horas, se realizó un conteo de los parásitos vivos en una cámara Neubauer bajo microscopio óptico o por citometría de flujo. Para la primera técnica de conteo, los parásitos en los pocillos se suspendieron mediante pipeteo, si fuera necesario, se diluyeron en buffer fosfato salino con 1%(m/v) de glucosa, y luego se cargaron en la

cámara Neubauer. Los parásitos vivos fueron contados en ambas semi-cámaras con el microscopio óptico. La falta de motilidad o morfología anormal fue utilizado como criterio para descartar los parásitos muertos. Para el análisis por citometría, se realizó una toma de 490  $\mu\text{L}$  de cada pocillo y se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de Count Bright™ (Invitrogen) como standard interno de conteo. La mezcla se homogeneizó mediante vortex brevemente y se analizó utilizando un citómetro de flujo CyAn™ ADP (Dako). Los parámetros del instrumento se ajustaron para poder discriminar las células de los debris, y para detectar las microesferas acorde a su fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm). Los resultados se analizaron en un software Summit 4.3 (Dako). Para cada concentración de compuesto, la citotoxicidad fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:  $\text{Citotoxicidad (\%)} = (\text{valor experimental} - \text{control de DMSO}) / (\text{control de crecimiento} - \text{control de DMSO}) \times 100$ . El resultado es la media de tres densidades celulares con la absorbancia corregida a 450 nm ( $A_i^{c450}$ ), respectivamente. Los datos se graficaron como porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de compuesto. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  fueron obtenidos a partir de curvas de dosis-respuesta ajustadas a una ecuación sigmoideal (modelo de Boltzmann) o fueron extrapoladas de gráficos no lineales ajustados.

### 3.5.1.3 CITOTOXICIDAD INESPECÍFICA EN MACRÓFAGOS

La toxicidad y la actividad biológica de los nitroderivados están íntimamente relacionadas ya que la formación de radicales tóxicos para el parásito genera también daño en el huésped. Con el fin de determinar el grado de selectividad en la acción citotóxica de los complejos Ru-*p*-cimeno obtenidos en este trabajo se realizaron ensayos de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos murinos. Dichos ensayos fueron realizados por el grupo del Dr. Marcelo Comini del Institut Pasteur de Montevideo.

Los estudios se realizaron con macrófagos J774 que fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (FCS), penicilina (10 U/mL), y estreptomycin (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado 5%  $\text{CO}_2$ /95% de aire. Se prepararon soluciones stock de los compuestos a ser testeados, tal como fue descrito previamente para la actividad anti

*T. brucei*. Cada condición fue realizada por triplicado. El efecto citotóxico de los compuestos hacia los macrófagos fue evaluado mediante un ensayo colorimétrico de viabilidad celular utilizando sal de tetrazolio (reactivo WST-1). Para los macrófagos, se dejó crecer las células hasta la fase mid-log, y luego fueron removidas de la placa de cultivo mediante tripsinización durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de remoción mecánica. Luego de centrifugación a 300 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente, el concentrado celular se resuspendió en medio de cultivo fresco a una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células/mL. Se agregaron 250  $\mu$ L de la suspensión celular a cada pocillo a una placa de microcultivo de 96 pocillos. Luego de 24 horas de incubación a atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, el medio fue reemplazado en cada pocillo por 200  $\mu$ L de medio de cultivo fresco solo (control de crecimiento) o por los compuestos o DMSO a diferentes concentraciones. Consecutivamente, se realizó una nueva incubación de 24 horas, se removió el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con dos porciones de 250  $\mu$ L de medio de cultivo fresco y precalentado. La viabilidad celular se estudió utilizando el reactivo WST-1 (Roche) diluido 1:10 en medio de cultivo. Luego, se agregaron 110  $\mu$ L del reactivo diluido a cada pocillo y se incubaron los mismos a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 3 horas, se midió a 450 nm (longitud de onda de referencia a 630 nm), la absorbancia producida por el colorante formazán producido metabólicamente por las células activas. Esta medición se realizó con una lectora de microplacas (Biotek) modelo 800 EL. Los pocillos de control (n = 12) conteniendo reactivo de proliferación celular pero sin células, fueron incluidos como blancos. Los valores de absorbancia, corregidos a 450 nm, fueron obtenidos de la diferencia entre el valor de absorbancia a 630 nm y el blanco promedio (por ejemplo:  $A_i^{0450} = A_i^{450} - A_i^{630nm} - A_{blanco}^{450nm}$ ). Finalmente se calcularon los valores de citotoxicidad, y los valores de CI<sub>50</sub> se obtuvieron como fue previamente descrito para la citotoxicidad en *T. brucei brucei*.

### 3.5.2 ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN

#### 3.5.2.1 FORMACIÓN INTRAPARASITARIA DE RADICALES LIBRES

El mecanismo de acción de los nitroderivados seleccionados como ligandos involucra la biorreducción del grupo nitro, generando un anión radical nitro. Como se muestra en la Figura 2, dicho radical puede participar en procesos de reciclaje redox reaccionando con el oxígeno para formar el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical OH y peroxinitrito.

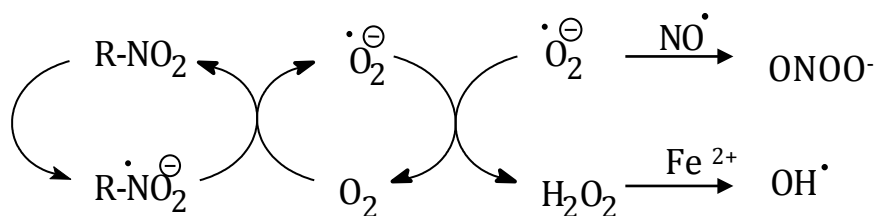


Figura 2: Proceso de reciclaje redox en el que participan algunos nitro compuestos.

Con el fin de determinar si los complejos sintetizados en este trabajo actúan por el mecanismo mencionado se estudió la generación de radicales libres inducida por los complejos en la forma epimastigota de *T. cruzi*. Para ello se utilizó la técnica de resonancia de espín electrónico (EPR) utilizando DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) como atrapador de radicales libres (Figura 3).

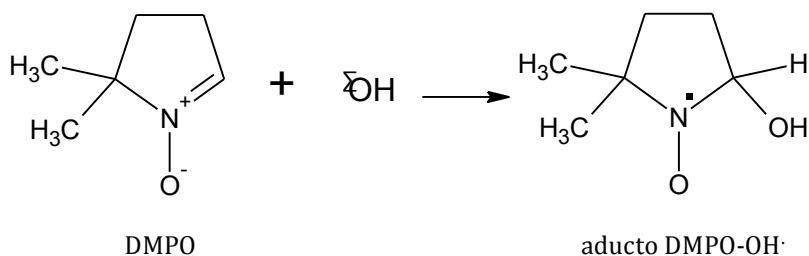


Figura 3: Esquema de la formación del aducto DMPO-OH $^\cdot$  por reacción del radical hidroxilo con DMPO.

El uso de la técnica de “spin trapping” es necesaria debido a que los radicales del oxígeno como el OH<sup>•</sup> tienen una vida media muy corta a temperatura ambiente por lo que no es posible detectarlos por la técnica de EPR convencional. La función del DMPO es reaccionar con los radicales formados generando aductos DMPO-radical cuya vida media puede ser de varios minutos o aún horas. Por ejemplo, el aducto DMPO-OH<sup>•</sup> tiene una vida media de 20 minutos aproximadamente [32-34].

Estos estudios se realizaron en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile bajo la supervisión del Dr. Claudio Olea-Azar, de acuerdo a métodos descritos previamente [35].

Cada compuesto fue disuelto en DMF (grado espectroscópico) (aprox. 1 mM) y la solución fue adicionada a una mezcla conteniendo la forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c, concentración final de proteínas 4-8 mg/mL) y DMPO (concentración final de 250 mM). La mezcla se transfirió a un capilar de 50 µL. Los espectros EPR se registraron en la banda X (9,85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106, con una cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Todos los espectros se registraron en la misma escala después de 15 barridos [2].

### **3.5.2.2 INHIBICIÓN DE LA CRUZIPAÍNA**

La cruzipaína ha sido descrita como potencial blanco de acción de algunas tiosemicarbazonas. El ensayo de inhibición de la actividad de la enzima cruzipaína permite determinar si ésta es un posible blanco de acción de los compuestos obtenidos. El estudio se realizó en la Facultad de Química de la Universidad de la República bajo la supervisión de la Dra. Graciela Mahler.

La enzima cruzipaína se purifica a partir de epimastigotas de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*, según métodos previamente descritos [36]. La misma se incubó en una solución de TRIS-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 100 mM, conteniendo ditioneitol (DTT) 1 M e inhibidor durante 5 minutos a 37 °C. Luego, el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarin clorhídrico (AMC) (constante de Michaelis-Menten:  $K_M = 3 \mu\text{M}$ ) se agrega para obtener 10 mM de sustrato. Los cambios en la intensidad de fluorescencia correspondientes a la formación del producto de hidrólisis, 7-amino-4-metilcumarina (AMC), fueron registrados durante 5 minutos en longitudes de onda de



excitación y de emisión de 390 nm y 460 nm, respectivamente, utilizando un lector de microplacas de fluorescencia (FLUOstar\* OPTIMA, BMG Labtechnologies). Se realizó una curva de calibración de unidades de fluorescencia (UF) vs. AMC (en el orden micromolar) convirtiendo, previo a cada experimento, UF en formación de AMC (en micromolar). El volumen final del experimento fue de 200  $\mu$ L con una concentración de DMSO del 20%. A esa concentración, el DMSO no afectó significativamente la actividad de la cruzipaína. Soluciones stock (10 mM) de los inhibidores de rutenio fueron preparadas en DMSO y testeadas a 10 y 50  $\mu$ M por duplicado. Los controles se realizaron utilizando la enzima disuelta en DMSO. El porcentaje de inhibición de cruzipaína (IC) se calculó según la siguiente ecuación:  $IC (\%) = (v_i/v_o) \times 100 - 100$ , donde  $v_i$  y  $v_o$  corresponde a la velocidad de formación de AMC ( $\mu$ M/seg), con y sin inhibidor, respectivamente. Se utilizó trans-epoxisuccinil L-leucil-amido (4-guanidino) butano, E64, 14 nM como control positivo (inhibición de 100%) [37].

### 3.5.3 INTERACCIÓN CON ADN

La interacción de los complejos de rutenio con ADN ha sido descrita para muchos complejos de este metal que presentan actividad antitumoral. El ADN ofrece varios sitios potenciales de unión con el metal. El tipo de interacción se ve afectada por la naturaleza del metal y su estado de oxidación, la naturaleza de los ligandos y la estereoquímica del complejo metálico, entre otros aspectos. La Figura 4 esquematiza los posibles modos de interacción de complejos metálicos con ADN [38].

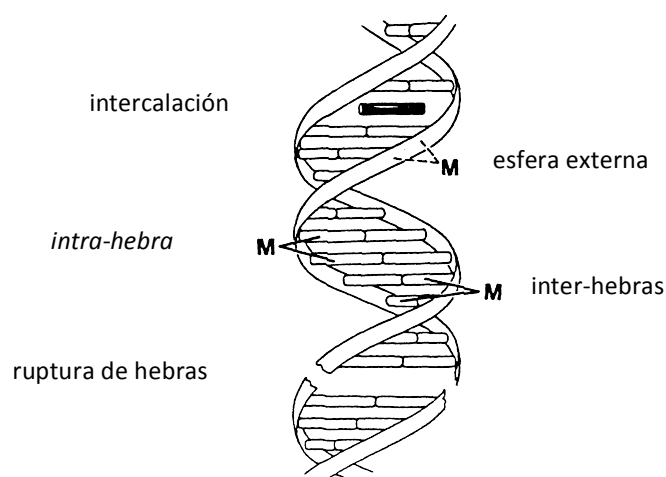


Figura 4: Esquema de las posibles formas de interacción de un complejo metálico con ADN.

Las nucleobases son ligandos ambidentados que aún formando parte de los nucleótidos y nucleósidos presentan diferentes sitios de coordinación, principalmente con N y/o O como átomos donores. Estas uniones ofrecen la posibilidad de crear entrecruzamientos intra- e interhebras. La unión también puede darse, aunque es menos frecuente, a través de los grupos fosfato o los oxígenos de los grupos hidroxilo del azúcar de los ribonucleótidos. Otra forma de unión es la intercalación que involucra la inserción, a través de interacciones de van der Waals, de moléculas planas entre dos pares de bases vecinas. Por último, la unión de un complejo a ADN puede generar la ruptura de una o ambas hebras de la biomolécula. La ruptura de enlaces fosfato-azúcar o C-C en el esqueleto del azúcar son las formas más comunes [38].

### **3.5.3.1 INTERACCIÓN CON ADN DE TIMO DE TERNERA**

Los estudios de interacción primaria con ADN de timo de ternera permiten determinar, de forma preliminar, niveles de unión al ADN y, en particular, permiten determinar la existencia de interacción y estimar su intensidad.

Los estudios se realizaron utilizando ADN de timo de ternero (CT ADN) (tipo I) y una modificación de un procedimiento previamente reportado [14, 39]. Se disolvió 50 mg de CT ADN en 30 mL de agua y se dejó agitando durante toda la noche. Se determinó la concentración de ADN por espectroscopía de absorción UV utilizando un coeficiente de absortividad molar de  $6.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 260 nm. Las soluciones de los complejos en DMSO (grado espectroscópico) (1 mL,  $10^{-3} \text{ M}$ ) se incubaron a  $37^\circ \text{C}$  con una solución de CT ADN (1 mL) durante 96 horas. Luego de varios lavados con NaCl 1M y etanol con le fin de separar el complejo no unido, se determinó la cantidad de metal unida al ADN por espectroscopía de absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer 5000 de Facultad de Química. El ADN unido se cuantificó por espectroscopía electrónica utilizando un coeficiente de absortividad molar de  $6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 260 nm.

### **3.5.3.2 MEDIDAS DE VISCOSIDAD DEL ADN**

Cuando se adicionan compuestos a soluciones de ADN, se pueden observar distintas modificaciones de la viscosidad en la solución resultante. Los compuestos metálicos

que se unen al ADN covalentemente como el cisplatino producen generalmente una disminución de la viscosidad de la solución. Los compuestos con actividad intercalante clásica de ADN producen un incremento de la viscosidad [40,41]. Con esta técnica se puede entonces determinar, por ejemplo, la capacidad de intercalación de un complejo en el ADN, analizando los cambios en la viscosidad de ADN generados por la interacción de los compuestos en estudio.

Los estudios de viscosidad fueron realizados en el Departamento de Química Inorgánica, Universitat Barcelona, con el apoyo de la Dra. Virtudes Moreno, con un viscosímetro modelo AND SV-10 utilizando un baño de agua y un recipiente adecuado para la termostatación a 25 °C. Las soluciones de cada complejo se prepararon por disolución en la mínima cantidad de DMSO necesaria y adición de agua (DMSO/agua (4:1)) y fueron usadas inmediatamente luego de la preparación. La solución 1mM de ADN de timo de ternero se diluyó 1:4 con Tris-EDTA (clorhidrato de Tris (hidroximetil) aminometano-sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético, TE) (pH = 7,4). Para cada complejo se añadieron a la solución de ADN de timo de ternero cantidades cada vez mayores de la solución de complejo madre para llegar a relaciones molares complejo/ADN ( $r_i$ ) en el rango de 0-2,0. La cantidad de DMSO en las muestras nunca superó el 2%. La viscosidad de cada muestra se midió varias veces a 25 °C después que se lograra el equilibrio térmico (15 minutos). Los valores medios de las cinco mediciones realizadas en intervalos de un minuto se utilizaron para evaluar la viscosidad de cada muestra [42].

### **3.5.3.3 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS**

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es una excelente herramienta para el seguimiento de los efectos producidos en la estructura y conformación del ADN, permitiendo incluso cuantificar las modificaciones introducidas en los parámetros topológicos [43-49]. Se utilizó AFM para visualizar moléculas individuales de ADN y analizar los efectos inducidos por la interacción de los complejos sobre la conformación de las mismas. Esta técnica permite analizar los cambios en la longitud de contorno y la distancia entre los extremos de las moléculas de ADN en función de la concentración de los complejos a nivel de moléculas individuales [50-52].

Los estudios de AFM fueron también realizados en el Departamento de Química Inorgánica, Universitat Barcelona, con el apoyo de la Dra. Virtudes Moreno.

Con el objetivo de optimizar la observación de los cambios conformacionales en la estructura terciaria del ADN plasmídico, el plásmido pBR322 se calentó a 60 °C durante 30 minutos para obtener mayoritariamente la forma circular. Se incubaron 15 ng de ADN pBR322 en un volumen adecuado con la concentración de compuestos necesaria para obtener una relación molar de pares de bases (pb)/compuesto ( $r_i$ ) 5:1. Los complejos fueron disueltos en una mínima cantidad de DMSO y se agregó buffer de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (pH = 7,4) hasta la concentración requerida.

Las diferentes soluciones así como el agua Milli-Q® se pasaron por filtros 0,2  $\mu\text{m}$  FP030/3 (Schleicher & Schuell GMBH, Alemania). Se llevaron a cabo incubaciones a 37 °C durante 24 horas. Las muestras fueron preparadas colocando en una mica (Ted Pella, Inc. Redding, California, EEUU) una gota de solución de ADN o de ADN en solución de los compuestos. Después de la adsorción durante cinco minutos a temperatura ambiente, las muestras se enjuagaron durante 10 segundos en un chorro de agua desionizada ( $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$  provenientes de un sistema de purificación de agua Milli-Q®) directamente en la superficie. Las muestras se secaron con argón comprimido y luego se registraron las imágenes de AFM. Estas imágenes fueron exploradas utilizando un instrumento NanoScope multimodo III AFM (Digital Instrumentals Inc., Santa Barbara, CA) que funcionó en el modo de “tapping” en aire a una velocidad de barrido de 1-3 Hz. La sonda de AFM fue de 125  $\mu\text{m}$  de longitud. Se utilizó un cantilever rectangular de silicio monocristalino con puntas “Si” cónicas integradas (Nanosensores GmbH, Alemania), con una frecuencia de resonancia promedio  $f_0 = 330 \text{ KHz}$  y constante de resorte  $K = 50 \text{ N/m}$ . Se utilizaron puntas de radio 10 nm, con un ángulo de cono de 35°. Las imágenes fueron obtenidas a temperatura ambiente ( $T = 23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y la humedad relativa se mantuvo generalmente inferior al 40% [53].

#### **3.5.4 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

Como ya ha sido mencionado, la unión de un fármaco a proteínas plasmáticas es reconocida como un paso crucial en la determinación de la biodisponibilidad [54], y el

estudio de la interacción con proteínas plasmáticas es indispensable en el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos [55].

La unión a la albúmina en particular, juega un rol decisivo en la biodisponibilidad *in vivo* de cualquier fármaco. La albúmina sérica humana (HSA) consiste en una única cadena polipeptídica de 585 aminoácidos [55], organizados en tres dominios, y es la proteína más abundante en el plasma, correspondiendo a cerca del 60% del total de las proteínas plasmáticas (aproximadamente 40 mg/mL o 600  $\mu$ M).

Es la proteína transportadora no específica más importante en el sistema circulatorio, y es caracterizada por su extraordinaria capacidad de unirse a una gran variedad, tanto de compuestos metabólicos endógenos como fármacos terapéuticos exógenos. Además, tiene una fuerte influencia sobre las concentraciones de fármaco libre en plasma, actuando como reservorio para el agente terapéutico (el cual puede resultar accesible a concentraciones más altas que las máximas solubles en plasma) o una ruta de aclaramiento rápido (previniendo que el compuesto ejerza su efecto terapéutico) y puede actuar como blanco pasivo debido a su absorción en tejidos inflamados o tejidos tumorales, debido a una vasculatura defectuosa y permeable, combinado con la ausencia de un sistema de drenaje efectivo [56-59]. La unión a la albúmina sérica humana es en efecto, una primera aproximación a la farmacocinética de cualquier fármaco.

Los estudios de interacción con proteínas plasmáticas fueron realizados en el Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, bajo la supervisión del Dr. João Costa-Pessoa y en la Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, bajo la supervisión de la Dra. Ana Isabel Tomaz, Lisboa, Portugal.

Las soluciones madre de HSA fueron preparadas mediante la disolución de la proteína en buffer fosfato salino (PBS) pH = 7,4 (Sigma-Aldrich). Luego de 30-60 minutos, se completa la hidratación y la disolución de la proteína. La concentración de cada solución madre fue determinada mediante espectrometría UV utilizando el coeficiente de extinción molar de  $\epsilon$  (278 nm) = 36850 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [60-63].

Las medidas espectroscópicas se realizaron en muestras independientes para asegurar el mismo tiempo de pre-incubación a (37 $\pm$ 1) °C para cada una de las muestras del mismo ensayo.

Debido a la limitada solubilidad de los complejos en medio acuoso, se utilizó DMSO (Sigma-Aldrich) para preparar las soluciones madre de cada complejo, seguido de una apropiada dilución para obtener la concentración deseada y el % de DMSO en las muestras finales. Las mencionadas diluciones se realizaron de forma inmediata a la preparación de las muestras. El porcentaje de DMSO en la solución de buffer PBS = 7,4 se mantuvo en 2% (v/v) para todas las muestras en las medidas espectroscópicas. La interacción con HSA se estudió por medidas de dicroísmo circular y fluorescencia.

#### **3.5.4.1 DICROÍSMO CIRCULAR**

El dicroísmo circular es una técnica de espectroscopía ampliamente utilizada para determinar la manera como determinadas biomoléculas interactúan con pequeñas moléculas [64]. Se puede monitorear la interacción a partir de los cambios en el espectro de la biomolécula. Para la albúmina sérica humana, los experimentos se realizan en el rango de longitud de onda de 190-300 nm. El espectro de CD en el rango de 200-250 nm puede brindar información acerca de la estructura secundaria de la proteína y de los cambios que sufre mediante la unión a un compuesto. La necesidad de usar DMSO para solubilizar los compuestos de rutenio en este estudio imposibilita el uso de espectroscopía CD o de absorción UV por debajo de 270 nm (debido a la absorción del DMSO). De todas formas, el CD puede ser, aún, una técnica muy informativa si se estudia u observa la señal de CD inducido. Una señal de CD inducido (ICD) resulta de la quiralidad formada a partir de un compuesto silencioso al CD cuando se une o se encuentra cercano a grupos quirales de la proteína.

Los estudios de interacción con proteínas plasmáticas fueron realizados en el Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, bajo la supervisión del Dr. João Costa-Pessoa, Lisboa, Portugal.

Los estudios de dicroísmo circular fueron realizados en un espectropolarímetro Jasco (modelo J-720, JASCO, Hiroshima, Japan) con un fotomultiplicador 175-800 nm (EXEL-308) en el rango de 300-800 nm. Los espectros se registraron con una celda para CD de cuarzo Suprasil® (con un recorrido óptico de 1 cm, 0,5 cm o 0,2 cm acorde a la intensidad de la señal) a temperatura ambiente (25 °C). Cada espectro CD medido fue el resultado de tres ensayos originalmente registrados en elipticidad y luego

convertidos a  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R =$  diferencial de absorción, con el software del espectropolarímetro Jasco. Los espectros de CD se graficaron como  $\Delta_{em}$  vs.  $\lambda$  con  $\Delta_{em} = \{\text{diferencial de absorción}\} / (bC)$  donde b es el recorrido óptico y (a menos que se indique algo diferente) C es la concentración total de proteína ( $C_{HSA}$ ).

Las muestras con una concentración de proteína constante de 100  $\mu\text{M}$  y concentraciones variables de complejo, fueron incubadas 24 horas previas a su medición. Para las mediciones de CD dependientes con el tiempo, los espectros del complejo de Ru:proteína (2:1) fueron registrados a  $(32 \pm 2)^\circ\text{C}$  utilizando un baño de agua termostático, donde las muestras se mantuvieron a la misma temperatura entre medida y medida (desde 10 minutos a 48 horas de incubación, en intervalos variables en diferentes ensayos).

Los espectros de CD fueron utilizados para calcular las constantes de unión para los aductos formados de proteína-complejo de Ru, utilizando el programa PSEQUAD [65]. Las constantes de unión global  $\beta_{1n}$  fueron definidas en base a la siguiente ecuación:  $(\text{HSA}) + n (\text{C}) \rightarrow \{\text{HSA-C}_n\}$  donde (C) refiere a la concentración libre de complejo de Ru y (HSA) a la proteína libre. Estas constantes de unión son “constantes de estabilidad condicional” y son válidas en el medio utilizado, a  $\text{pH} = 7,4$ . Las incertidumbres calculadas en las constantes de estabilidad fueron tomadas como tres veces la desviación estándar (3SD) obtenida para cada uno de los valores. Los gráficos de distribución de concentración fueron obtenidos con el programa HySS [66,67] con las constantes de unión calculadas en PSEQUAD.

#### **3.5.4.2 FLUORESCENCIA**

Las medidas de fluorescencia fueron registradas a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro modelo Spex FL-1057 Tau 3 (Horiba Jobin Yvon). Para estas mediciones la concentración final de la proteína en las muestras (individualmente preparadas) fue de 1 o 5  $\mu\text{M}$ , y la concentración de complejo fue la respectiva para obtener relaciones molares de complejo de Ru-HSA desde 1:0,25 a 1:4 o 1:6. Las relaciones molares de complejo de Ru refieren a la fórmula del complejo dimérico  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{Cl}_2$ . Además, se prepararon muestras con la misma concentración de complejo pero sin proteína para una adecuada corrección del blanco. Las medidas

de intensidad de fluorescencia en estado estacionario se realizaron a 295 nm como longitud de onda de excitación.

La intensidad de emisión de fluorescencia fue corregida para el efecto de absorción y emisión del filtro interno [68], utilizando los resultados de los espectros de absorción de UV-Visible obtenidos para cada muestra.

El ancho de banda fue de 5 nm, tanto para la excitación como la emisión. Para las medidas en el tiempo mediante la técnica de conteo de fotón único, se utilizó nanoLED n-280 (Horiba Jobin Yvon) para la excitación de HSA y la longitud de onda de emisión fue de 340 nm con un ancho de banda de 15 nm.

### **3.5.5 ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

#### **3.5.5.1 ENSAYO DE ACTIVIDAD**

Debido a que se observaron altos niveles de unión de los complejos rutenio-*p*-cimeno al ADN, se realizaron ensayos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales. Los estudios de actividad antitumoral fueron realizados parte en el Institut de Biotecnologia i de Biomedicina por el grupo de la Dra. Julia Lorenzo, Barcelona, España, y parte por el grupo de la Dra. Fernanda Marques en la Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas, Instituto Superior Técnico, Sacavém, Portugal.

La eficacia antitumoral de los complejos Ru-*p*-cimeno fue medida en términos  $CI_{50}$  máxima (la concentración de complejo necesaria para alcanzar un 50% de muerte celular). La actividad citotóxica de los compuestos fue evaluada en cuatro líneas celulares tumorales humanas (A2780 ovario, HL-60 leucemia, MCF7 mama y PC3 próstata) dentro del rango de concentraciones de  $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M utilizando el ensayo colorimétrico, ya descrito, de MTT. El ensayo mide la cantidad de MTT que es reducido por la dehidrogenasa mitocondrial y asume que la viabilidad celular (correspondiente a la actividad reductiva) es proporcional a la producción de formazán que se mide espectrofotométricamente usualmente entre 500 y 600 nm [69]. Las células se cultivaron en 200  $\mu$ L (100  $\mu$ L en el caso de la línea HL-60) de medio en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37 °C previo al análisis para permitir una adhesión celular adecuada.



Siempre que pudo ser posible, la actividad citotóxica fue evaluada para el complejo  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]^{2+}$  y su correspondiente ligando libre. La solución stock (20 mM) en DMSO de cada compuesto se preparó en el momento del estudio y fue utilizada para diluciones seriadas en el medio. La concentración final de DMSO en el cultivo celular no excedió el 0,5%. Los grupos de control, con y sin DMSO (0,5%), fueron incluidos en los ensayos. El fármaco antitumoral de referencia, cisplatino, también fue incluido en el ensayo como control positivo para el caso de las líneas celulares tumorales humanas A2780 y HL-60. Las células provenientes de una monocapa confluyente fueron removidas de los pocillos mediante una solución de tripsina-EDTA. El análisis de supervivencia celular se realizó luego de 72 horas de exposición (24 horas de exposición para el caso de la línea HL-60) mediante el método colorimétrico de MTT [66]. Específicamente, se agregó a cada pocillo (200  $\mu\text{L}$ ) una solución de MTT disuelta en PBS (0,5 mg/mL) y éstos fueron incubados a 37 °C durante 3-4 horas. Luego, el medio se descartó y se repuso el volumen con 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para poder disolver los cristales de formazán. La absorbancia fue medida a 570 nm con un espectrofotómetro Power Wave Xs, Biotek. En el caso de la línea HL-60 se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de MTT soluble (Biomedica) a cada pocillo, y luego de 3 horas se midió la absorbancia a 450 nm. Cada experimento se repitió por triplicado y cada concentración fue analizada en, al menos, seis réplicas. Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia con respecto a las células control en ausencia de los compuestos. El valor de  $\text{Cl}_{50}$  fue calculado a partir de las gráficas de supervivencia celular vs concentración de compuesto con el software GraphPad Prism (versión 4.0).

### **3.5.5.2 ENSAYOS DE APOPTOSIS *IN VITRO***

La inducción de la apoptosis *in vitro* por los compuestos Ru-*p*-cimeno fue determinada mediante el ensayo de citometría de flujo con Anexina V-FITC a partir del kit de detección de apoptosis de Anexina V-FITC (Roche). Los crecimientos exponenciales de la línea celular HL-60 en placas de 6 pocillos ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) se expusieron, durante 24 horas, a concentraciones iguales a los  $\text{Cl}_{50}$  de los compuestos de rutenio. Las células ( $10^6$ ) fueron recolectadas, lavadas con PBS y resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de buffer. La coloración de la anexina V fue monitoreada según instrucciones (Roche).

Específicamente, se agregaron a las muestras 2  $\mu\text{L}$  de Anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 2  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (PI) y se dejan reposar durante 15 minutos en la oscuridad, temperatura ambiente. Finalmente, la cantidad de células apoptóticas fue analizada mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur).

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hodson E., Simpson S.J., Synthesis and characterisation of  $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{X}_2]$  compounds: single crystal X-ray structure of  $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{P}\{\text{OPh}\}_3)\text{Cl}_2]$  at 203 K, *Polyhedron* 2004, 23, 2695.
- [2] Aguirre G., Boiani L., Cerecetto H., Fernández M., González M., Denicola A., Otero L., Gambino D., Rigol C., Olea-Azar C., Faundez M., In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4885.
- [3] Geary, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.* 1971, 7, 81.
- [4] Dong C., Powder X: Windows-95-based program for powder X-ray diffraction data processing, *J. Appl. Crystallogr.* 1999, 32, 838.
- [5] Boultif D. Louer, Powder pattern indexing with the dichotomy method, *J. Appl. Crystallogr.* 2004, 37, 724.
- [6] Litterst C. L., Chemical reactions occurring between metal-containing antineoplastic drugs and biological molecules, *Pharm. Ther.* 1988, 35, 215.
- [7] Guo Z., Sadler P., Metals in Medicine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 112.
- [8] Farrell, N., Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, *Compreh. Coord. Chem. II* 2003, 9, 809.
- [9] Mestroni G., Alessio E., Sava G., Pacor S., Coluccia M., The development of tumor-inhibiting ruthenium dimethylsulfoxide complexes, in *Metal complexes in Cancer Chemotherapy*, Kepler, B., Ed., VCH: Weinheim, 1993, pp 159.
- [10] Olea-Azar C., Atria A. M., Di Maio R., Seoane G., Cerecetto H., Cyclic voltammetry and electron paramagnetic resonance studies of some analogues of Nifurtimox, *Spectroscopy Lett.* 1998, 31, 849.

- [11] Maya J. D., Bollo S., Núñez-Vergara L. J., Squella J. A., Repetto Y., Morello A., Périé J., Chauvière G., *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives, *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 999.
- [12] Rigol C., Olea-Azar C., Mendizábal F., Otero L., Gambino D., González M., Cerecetto H., Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs, *Spectrochim. Acta Part A* 2005, 61, 2933.
- [13] Huang L., Lee A., Ellman J. A., Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis, *J. Med. Chem.* 2002, 45, 676.
- [14] Cerecetto H., Di Maio, R., Ibarruri G., Seoane G., Denicola A., Quijano C., Peluffo G., Paulino M., Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives, *Il Farmaco* 1998, 53, 89.
- [15] Canavaci A.M., Bustamante J.M., Padilla A.M., Perez Brandan C.M., Simpson L.J., Xu D., Boehlke C.L., Tarleton R.L., *In vitro* and *in vivo* High-Throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds, *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e740.
- [16] Kavanagh K.L., Guo K., Dunford J.E., Wu X., Knapp S., Ebetino F.H., Rogers M.J., Russell R.G., Oppermann U., The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2006, 103, 7829.
- [17] Montalvetti A., Bailey B.N., Martin M.B., Severin G.W., Oldfield E., Docampo R., Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 33930.
- [18] Pannia-Espósito B., Najjar R., Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin, *Coord. Chem. Rev.* 2002, 232, 137.
- [19] Messori L., Orioli P., Vullo D., Alessio E., Iengo E., A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III) antineoplastic complex, with bovine serum albumin, *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 1206.
- [20] Kratz F., Interaction of antitumor metal complexes with serum proteins. Perspectives for anticancer drug development in *Metal complexes in cancer chemotherapy*; Keppler, B. K., Ed. VCH: Weinheim, 1993, pp 391.

- [21] Brener Z., Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1962, 4, 389.
- [22] Ferro E., de Arias A. R., Ferreira de Paredes M. E., Procedimiento cuantitativo para el micrométodo de hemoconcentración directa en la infección aguda con *T. cruzi*. *Veterinaria* 1987, 60, 34.
- [23] Fournet A., Ferreira, M. E., De Arias, A. R., Schinini, A., Nakayama H., Torres S., Sanabria R., Guinaudeau H., Bruneton J., The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice, *Int. J. Antimicrob. Agents* 1997, 8, 163.
- [24] Fournet, A., Rojas de Arias A., Ferreira M. E., Nakayama H., Torres de Ortiz S., Schinini A., Samudio M., Vera de Bilbao N., Lavault M., Bonte, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 13, 189.
- [25] Ferreira M. E., Nakayama H., Rojas de Arias A., Schinini A., Vera de Bilbao N., Serna E., Layoutte D., Soriano-Agatón F., Poupon E., Hocquemiller R., Fournet A., Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi* infected mice, *J. Ethnopharmacol.* 2007, 109, 258.
- [26] Maya J.D., Morello A., Repetto Y., Tellez R., Rodriguez A., Zelada U., Puebla P., Bontá M., Bollo S., San Feliciano A., Effects of 3-chloro-phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2000, 125, 103.
- [27] Cuellar M.A., Salas C., Cortés M.J., Morello A., Maya J.D., Preite M.D., Synthesis and in vitro trypanocide activity of several polycyclic drimane-quinone derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2489.
- [28] Muelas-Serrano S., Nogal-Ruiz J.J., Gómez-Barrio A., Setting a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Parasitol. Res.* 2000, 86, 999.
- [29] Faundez M., Pino L., Letelier P., Ortiz C., López R., Seguel C., Ferreira J., Pavani M., Morello A., Maya J.D., Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49, 126.

- [30] Biebinger S., Wirtz L.E., Lorenz P., Clayton C., Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997, 85, 99.
- [31] Hirumi H., Hirumi K., Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers, *J. Parasitol.* 1989, 75, 985.
- [32] Hawkins C. L., Davies M. J., Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals, *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 1071.
- [33] Olea-Azar C., Rigol C., Mendizabal F., Morello, A., Maya, J. D., Moncada C., Cabrera E., DiMaio R., González M., Cerecetto H., ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofuran derivative analogues of Nifurtimox by electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction, *Free Rad. Res.* 2003, 37, 993.
- [34] Makino K., Hagiwara T., Murakami A., A mini review: fundamental aspects of spin trapping with DMPO, *Radiat. Phys. Chem.* 1991, 37, 657.
- [35] Viodé C., Bettache N., Cenas N., Krauth-Siegel R. L., Chauvière G., Bakalara N., Périé J., Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles, *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57, 549.
- [36] Parussini F., García M., Mucci J., Agüero F., Sánchez D., Hellman U., Åslund L., Cazzulo J.J., Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 13, 11.
- [37] Siles R., Chen S., Zhou M., Pinney K., Trawick M., Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 4405.
- [38] Farrell N. P., Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents in Catalysis by Metal Complexes; James, B. R., Ugo, R., Ed.; Reidel-Kluwer Academic Press: Dordrecht, 1989; Vol. 11.
- [39] Otero L., Vieites M., Boiani L., Denicola A., Rigol C., Opazo L., Olea-Azar C., Maya J.D., Morello A., Krauth-Siegel R.L., Piro O.E., Castellano E., Gonzalez M., Gambino D., Cerecetto H., *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322.
- [40] Xiong Y., Ji L., Synthesis, DNA-binding and DNA-mediated luminescence quenching of Ru(II) polypyridine complexes, *Coord. Chem. Rev.* 1999, 185-186, 711.

- [41] Ramachandra R., 1990, [http://hdklab.wustl.edu/lab\\_manual/southern/southern8.html](http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/southern/southern8.html)
- [42] Zhang G., Guo J., Pan J., Chen X., Wang J., Spectroscopic studies on the interaction of morin–Eu(III) complex with calf thymus DNA, *J. Mol. Structure* 2009, 923, 114.
- [43] Bustamante C., Rivetti C., Keller D.J., Scanning force microscopy under aqueous solutions, *Curr. Op. Struct. Biol.* 1997, 7, 709.
- [44] Hansma H. G., Pietrasanta L., Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies, *Curr. Op. Chem. Biol.* 1998, 2, 579.
- [45] Fisher T. E., Marszalek P. E., Fernandez J. M., Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope, *Nature Struct. Biol.* 2000, 7, 719.
- [46] Golan R., Pietrasanta L. I., Hsieh W., Hansma H. G., DNA toroids: stages in condensation, *Biochemistry* 1999, 38, 14069.
- [47] Pietrasanta L. I., Thrower L., Hsieh W., Rao, S., Stemmann O., Lechner J., Carbon, J.; Hansma, H. Probing the *Saccharomyces cerevisiae* centromeric DNA (CEN DNA)-binding factor 3 (CBF3) kinetochore complex by using atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, 96, 3757.
- [48] Anselmetti D., Fritz J., Smith B., Fernández-Busqueta X., Single molecule DNA biophysics with atomic force microscopy, *Single Mol.* 2000, 1, 53.
- [49] Pietrasanta L. I., Smith B. L., MacLeod M. C., A novel approach for analyzing the structure of DNA modified by Benzopyrene diol epoxide at single-molecule resolution, *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 351.
- [50] Gómez-Segura J., Prieto M. J., Font M., Solans X., Moreno V., Crystal structure and DNA interaction of the facial-type *rac*-Tris[2-(aminomethyl)benzimidazole]cobalt(III) complex, *Inorg. Chem.* 2006, 45, 10031.
- [51] de Mier-Vinué J., Gay M., Montaña Á. M., Sáez R., Moreno V., Kasparkova J., Vrana O., Heringova P., Brabec V., Boccarelli A., Coluccia M., Natile G., Synthesis, biophysical studies, and antiproliferative activity of platinum(II) complexes having 1,2-bis(aminomethyl)carbocyclic ligands, *J. Med. Chem.* 2008, 51, 424.
- [52] Ruiz J., Cutillas N., Vicente C., Villa M. D., López G., Lorenzo J., Avilés F.X., Moreno V., Bautista D., New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model

nucleobase 1-methylcytosine: Antitumor activity and interactions with DNA, *Inorg. Chem.* 2005, 44, 7365.

[53] Benítez J., Guggeri L., Tomaz I., Costa Pessoa J., Moreno V., Lorenzo J., Avilés F.X., Garat B., Gambino D., A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: a potential anti-protozoa and anti-tumor agente, *J Inorg Biochem*, 2009, 103, 1386.

[54] Costa Pessoa J., Tomaz I., Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components, *Curr. Med. Chem.* 2010, 17, 3701.

[55] The U.S. Food and Drug Administration website, retrieved on November, 2016 <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/00n-1269-nfr0001-03.pdf>

[56] Colmenarejo G., *In silico* prediction of drug-binding strengths to human serum albumin, *Medicinal Research Reviews*, 2003, 23, 275.

[57] Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P., The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*, 2005, 57, 787.

[58] Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 2005, 353, 38.

[59] Berger I., Hanif M., Nazarov A., Hartinger C.H., John R.O., Kuznetsov M.L., Groessl M., Schmitt F., Zava O., Biba F., Arion V.B., Galanski M., Jakupec M.A., Juillerat-Jeanneret L., Dyson P.J., Keppler B.K., In Vitro Anticancer Activity and Biologically Relevant Metabolization of Organometallic Ruthenium Complexes with Carbohydrate-Based Ligands, *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 9046.

[60] Sanz-Medel A., Jakusch T., Hollender D., Enyedy E.A., Gonzalez C.S., Montes-Bayon M., Costa Pessoa J., Tomaz I., Kiss T., Biospeciation of various antidiabetic V<sup>IV</sup>O compounds in serum, *Dalton Trans.* 2009, 2428.

[61] Hirayama K., Akashi S., Furuya S., Fukuhara K., Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 1990, 173, 639.

[62] Vellenga L., Wensing T., Egberts H.J.A., Vandijk J.E., Mouwen J.M., Breukink H.J., Intestinal Permeability to Polyethylene Glycol 4000 and Porcine Albumin in Piglets Infected With Transmissible Gastroenteritis Virus, *Vet. Res. Commun.* 1989, 13, 467.

- [63] Yuan B., Murayama K., Yan H., Study of Thermal Dynamics of Defatted Bovine Serum Albumin in D<sub>2</sub>O Solution by Fourier Transform Infrared Spectra and Evolving Factor Analysis, *Appl Spectrosc.*, 2007, 5, 921.
- [64] Garbett N. C., Ragazzon P. A., Chaires J. B., Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand–DNA interactions, *Nature Protocols* 2007, 2, 3166.
- [65] Zekany L., Nagypal I., in Leggett D., (ed) *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*; Plenum Press, York, 1985, 291.
- [66] Alderighi L., Gans P., Ienco A., Peters D., Sabatini A., Vacca A., A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): A utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 311.
- [67] HySSHyperquad Simulation and Speciation website, <http://www.hyperquad.co.uk/hyss.htm>
- [68] Valeur B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [69] Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol. Methods*, 1983, 65, 55.



# Capítulo 4

# Complejos metálicos con bisfosfonatos bioactivos frente a *T. cruzi*

## 4.1 Generalidades

- 4.1.1 Actividad biológica de los bisfosfonatos
- 4.1.2 Bisfosfonatos como ligandos
- 4.1.3 Antecedentes de complejos metálicos con bisfosfonatos

## 4.2 Resultados y discusión

- 4.2.1 Discusión general de los procedimientos ensayados
- 4.2.2 Caracterización estructural y fisicoquímica
  - 4.2.2.1 Caracterización en estado sólido
    - 4.2.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos
    - 4.2.2.1.2 Análisis termogravimétrico
    - 4.2.2.1.3 Estudio de espectroscopía infrarroja
    - 4.2.2.1.4 Resolución de estructuras cristalinas obtenidas mediante difracción de rayos X en monocristal
    - 4.2.2.1.5 Estudios de difracción de rayos X en polvo para los complejos MAle
  - 4.2.2.2 Caracterización estructural en solución
    - 4.2.2.2.1 Estudio de voltametría cíclica
- 4.2.3 Actividad biológica de los complejos obtenidos
  - 4.2.3.1 Estudios *in vitro*
    - 4.2.3.1.1 Actividad anti *T. cruzi* *in vitro*
      - 4.2.3.1.1.1 Inhibición del crecimiento de epimastigotas y amastigotas intracelulares de *T. cruzi* y estudio de citotoxicidad en células Vero
  - 4.2.3.2 Estudio de mecanismo de acción
    - 4.2.3.2.1 Interacción con proteínas
    - 4.2.3.2.2 Inhibición de actividad de farnesil difosfato sintasa FPPS de *T. cruzi* (TcFPPS) y humana (HsFPPS)

## 4.3 Conclusiones

## 4.4 Bibliografía

## 4.1 GENERALIDADES

Como ya se ha descrito previamente, la hipótesis general de este Trabajo de Tesis implica, entre otras actividades, la síntesis, caracterización de compuestos metálicos con ligandos que presentan actividad contra *Trypanosoma cruzi* y su estudio comparativo (frente al ligando libre) de su actividad biológica y su mecanismo de acción.

En este capítulo en particular, los ligandos bioactivos seleccionados para la síntesis de compuestos metálicos son los bisfosfonatos. Como se verá más adelante, desde el punto de vista químico, los bisfosfonatos constituyen una clase muy versátil de ligandos. Son compuestos análogos sintéticos, metabólicamente estables, a los pirofosfatos (Figura 1), en los cuales el puente de oxígeno entre los dos átomos de fósforo ha sido reemplazado por un carbono con distintas cadenas laterales. La estructura P-C-P en los bisfosfonatos asegura una baja toxicidad y una buena estabilidad ante cambios de temperatura y diversos agentes químicos, además de una completa resistencia a la hidrólisis enzimática [1-5].

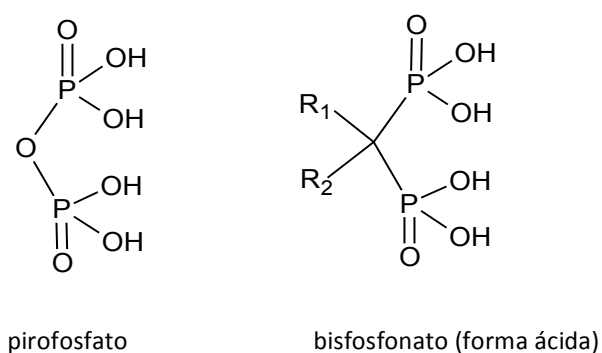


Figura 1: Estructura genérica de un bisfosfonato y del pirofosfato.

### 4.1.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS BISFOSFONATOS

Alguno de los ácidos bisfosfónicos con la estructura P-C-P, fueron utilizados inicialmente como agentes antiescalantes y anticorrosivos, pero además como agentes complejantes en la industria textil y aceitera [6]. Posteriormente, los intentos de encontrar agentes con similitud estructural al pirofosfato como regulador de la

calcificación y de la resorción ósea resultaron en el descubrimiento de las propiedades de inhibición de la resorción ósea de los bisfosfonatos [7]. Gran parte de la importancia de los bisfosfonatos en su uso para el tratamiento de patologías óseas deriva de la fuerte afinidad de los mismos por los iones metálicos. En particular, la interacción con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , resulta de vital importancia para su actividad [1].

Los primeros bisfosfonatos utilizados exitosamente en la clínica fueron el etidronato y el clodronato (Figura 2).

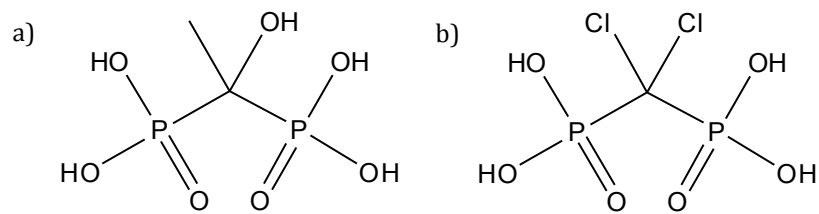


Figura 2: Estructura de a) etidronato y b) clodronato. Se muestran las formas ácidas.

De forma similar al pirofosfato, estos bisfosfonatos presentan una alta afinidad por el mineral del hueso, y a altas dosis modulan la calcificación tanto *in vitro* como *in vivo* [4].

La naturaleza de las cadenas laterales,  $R_1$  y  $R_2$ , en los bisfosfonatos es fundamental para su actividad biológica. En el caso de los bisfosfonatos utilizados en la terapéutica,  $R_1$  suele ser un OH y participa en la unión del bisfosfonato al mineral óseo, en cuanto a  $R_2$  suele ser responsable de los efectos biológicos. Por ejemplo, los bisfosfonatos conteniendo un átomo básico de nitrógeno en  $R_2$ , resultaron ser de 10-100 veces más potentes, mientras que los que presentan un átomo de nitrógeno perteneciente a un anillo heterocíclico, resultaron ser 10000 veces más potentes comparados con etidronato [3-5,8-14].

En la Figura 3 se muestran los principales bisfosfonatos de uso comercial, y los más potentes.

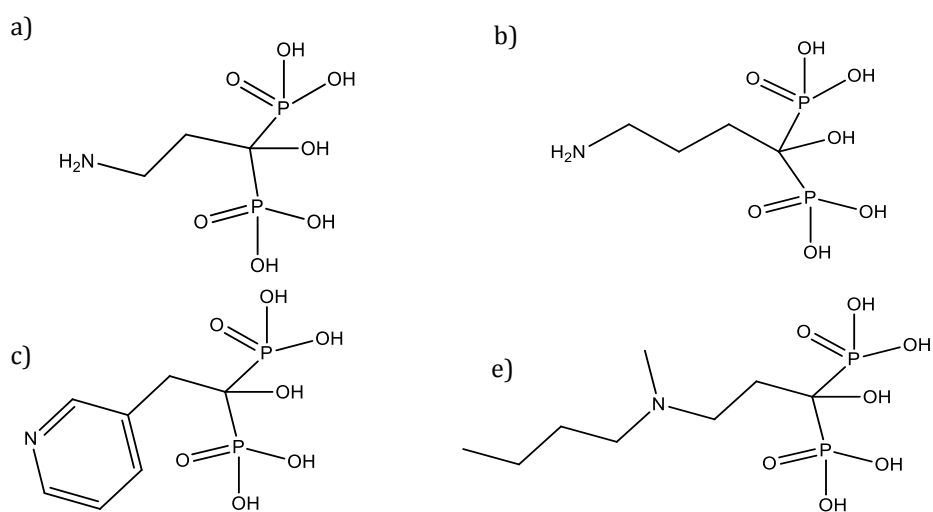


Figura 3: Estructura de los bisfosfonatos más potentes: a) pamidronato (Aredia<sup>®</sup>, 3-amino-1-hidroxipropano-1,1-bisfosfonato), b) alendronato (Fosamax<sup>®</sup>, 4-amino-1-hidroxi-butano-1,1-bisfosfonato), c) risedronato (Actonel<sup>®</sup>, 2-(3-piridil)-1-hidroxietano-1,1-bisfosfonato) y d) ibandronato (Bonviva<sup>®</sup>, (1-hidroxi-3-(metilpentilamino)propilidenebisfosfonato). Se muestran las formas ácidas.

Como puede observarse en la Figura 3, en todos estos derivados, uno de los sustituyentes es un grupo hidroxilo y además, contienen un átomo de nitrógeno en la restante cadena lateral. Estas características estructurales se relacionan con su mecanismo de acción anti-osteoclástica, que involucra la acumulación de los bisfosfonatos en el tejido óseo mineralizado y la inhibición enzimática que genera la apoptosis del osteoclasto. De esa manera, el bisfosfonato reduce el recambio óseo [5,15-16]. Algunos bisfosfonatos, como clodronato, son metabólicamente incorporados por su analogía a la molécula de ATP y una vez dentro de la célula se convierten en citotóxicos. Los bisfosfonatos nitrogenados (NBPs) inhiben la vía del mevalonato, reducen la prenilación de proteínas que son esenciales para el normal funcionamiento celular. Independientemente del mecanismo de acción molecular, el uso terapéutico de los bisfosfonatos genera inhibición de la actividad osteoclástica [3,17].

Por otro lado, una de las alternativas que se ha utilizado para intentar solucionar la falta de fármacos efectivos para combatir la enfermedad de Chagas, ha sido encontrar fármacos activos contra *T. cruzi* que hayan sido desarrollados para otros usos en

humanos y que, por lo tanto, tengan baja toxicidad. Un ejemplo de esta aproximación, denominada reposicionamiento de fármacos, lo ofrece el uso potencial como agentes antichagásicos de los bisfosfonatos [3]. En este marco, los bisfosfonatos conteniendo nitrógeno (NBP) han mostrado actividad antiparasitaria, y más específicamente, demostraron ser activos contra *T. cruzi*. En particular risedronato, pamidronato, y alendronato (Figura 3) no sólo son los inhibidores de resorción ósea más potentes, sino que también demostraron ser inhibidores efectivos del crecimiento, tanto *in vitro* como *in vivo*, de *T. cruzi*, sin mostrar toxicidad aparente sobre las células del huésped [18,19]. Pamidronato y alendronato resultaron activos frente a la forma amastigota de *T. cruzi*, con valores similares de  $CI_{50}$  de 65  $\mu$ M, y sin observarse toxicidad sobre las células mamíferas hasta una concentración mayor de 300  $\mu$ M [3,20]. El risedronato es uno de los bisfosfonatos que resultó menos efectivo, *in vitro*, contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* [19-21]. Sin embargo, en los estudios *in vivo*, en un modelo murino de Chagas agudo, el risedronato aplicado en una dosis diaria de 1 mg/Kg durante 7 días, induce más del 90% de reducción de la parasitemia e incrementa sustancialmente la supervivencia de los animales tratados [5]. No se observa recaída en la parasitemia luego de discontinuado el tratamiento, lo que sugiere una acción tripanosomicida, más que tripanostática [5].

El mecanismo de acción antiparasitaria de los NBPs se relaciona con el bloqueo de la síntesis de poliisoprenoides por inhibición competitiva de la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS). La FPPS cataliza la síntesis de farnesil difosfato (FPP) a partir de isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP). Esta reacción es considerada como el paso limitante para la generación de esteroides como el colesterol y ergosterol, ubiquinonas, dolicoles y grupos hemo. Además, la FPPS está directamente involucrada en la prenilación de proteínas, siendo éste, uno de los procesos esenciales para la vida de este parásito en particular (Figura 4) [11,12]. El gen que codifica la FPPS de *T. cruzi* ha sido clonado y su expresión en *E. coli* genera una enzima que es inhibida por NBPs y en particular por risedronato [19]. Se ha determinado, además, el efecto de la inhibición de la FPPS por risedronato, sobre el perfil de esteroides del parásito [20].

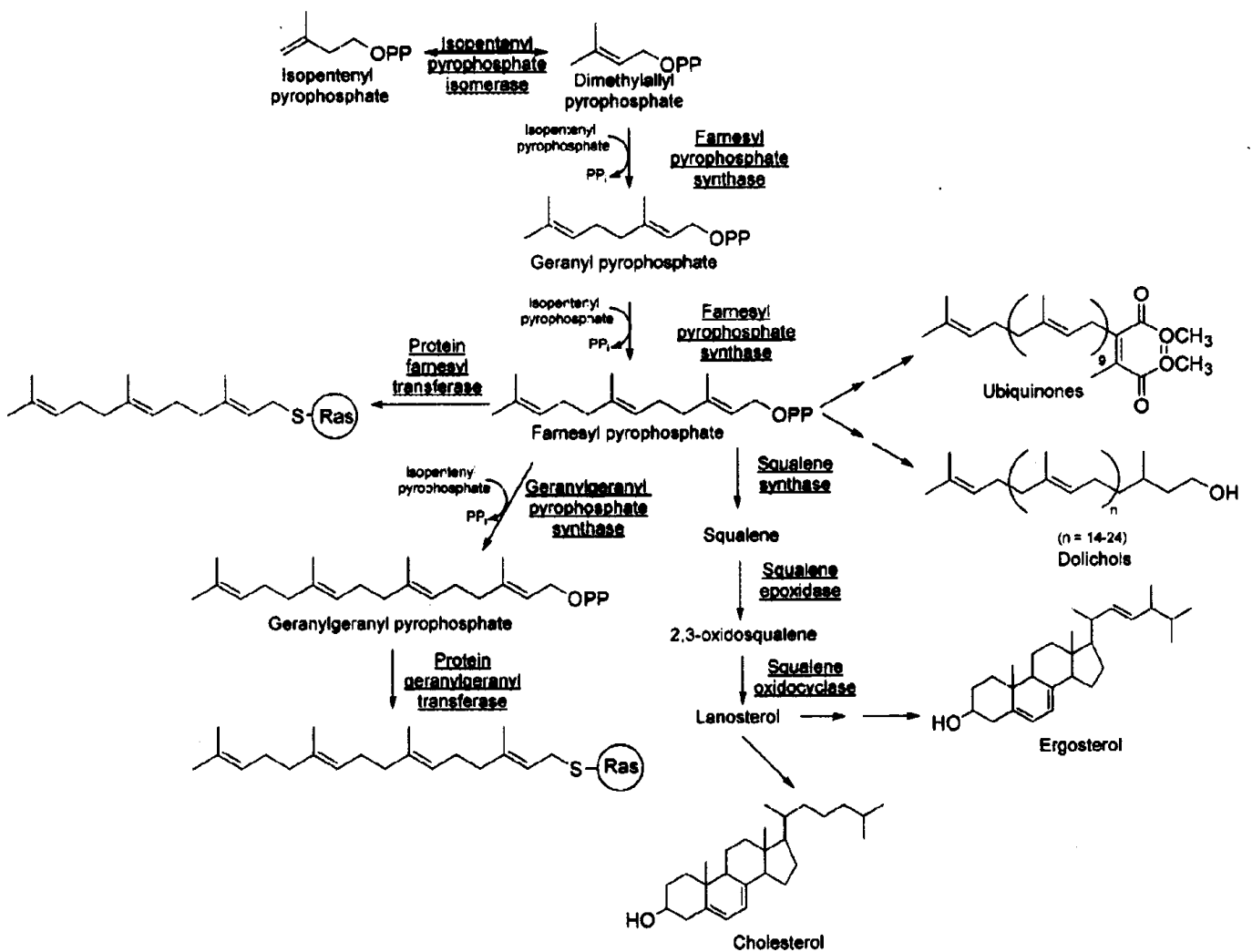


Figura 4: Vía biosintética de la generación de poli-isoprenoides y esteroides.

Por otro lado, se postula que la actividad antiparasitaria selectiva de los NBPs podría relacionarse (de forma similar a lo que ocurre con la actividad antiosteoclástica) con la acumulación preferencial de estos compuestos en el parásito debido a la presencia de organelos ricos en calcio, magnesio y fosfatos inorgánicos. Estos organelos, llamados acidocalcisomas, se encargan de distintas funciones: metabolismo de polifosfatos, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH homeostático intracelular y osmorregulación, incluyendo almacenamiento de calcio y fósforo [19,20,22]. Grandes cantidades de pirofosfato inorgánico han sido encontradas en los acidocalcisomas del *T. cruzi* durante la etapa proliferativa, lo que conlleva a considerar que el crecimiento

del parásito se pueda inhibir en presencia de algún compuesto análogo del pirofosfato [2,3,5].

Es importante destacar que la búsqueda de un mejor perfil terapéutico en el uso de los bisfosfonatos para las patologías óseas ha fomentado el desarrollo de nuevos derivados. Sin embargo, una de las principales limitaciones de los bisfosfonatos es su baja biodisponibilidad por vía oral causada por la ionización de los grupos fosfonato a pH fisiológico, determinando una alta hidrofilia [3,11,23]. Como solución se ha intentado administrar estos compuestos como profármacos desarrollando distintos tipos de ésteres [3]. Por otro lado, la complejación de los grupos fosfonato con metales de transición podría también suponer una estrategia efectiva en este sentido. Además, la participación de estos compuestos en un complejo metálico podría permitir la modulación de su lipofilia, por ejemplo, con la presencia de distintos coligandos [11,23].

#### 4.1.2 BISFOSFONATOS COMO LIGANDOS

Los bisfosfonatos constituyen una clase muy versátil de ligandos orgánicos bifuncionales de fórmula general,  $\text{PO}_3^{2-}\text{-X-PO}_3^{2-}$ , en el cual cada grupo fosfonato puede proveer uno, dos o tres átomos de oxígeno capaces de coordinarse a un ion metálico. En la Figura 5 se detallan los modos de coordinación más habituales.

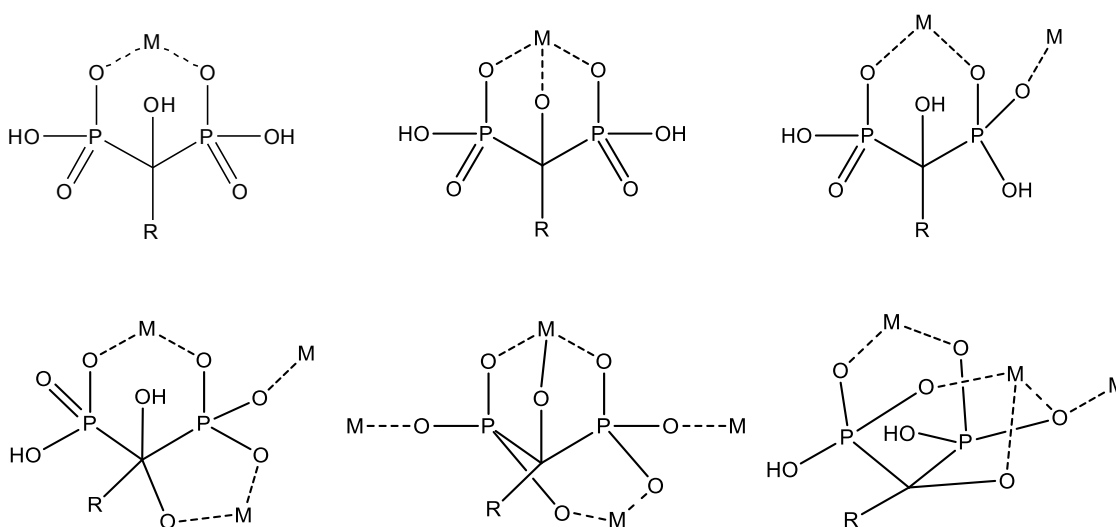


Figura 5: Principales modos de coordinación de los bisfosfonatos.



La química de estas moléculas puede, a su vez, ser modificada mediante la variación en la longitud de la cadena que une ambos grupos fosfonato, y/o mediante la incorporación de grupos funcionales adicionales. Por ejemplo, si los sustituyentes presentan átomos dadores su capacidad coordinante aumenta [24].

Los ácidos bisfosfónicos simples, sin ningún grupo funcional adicional, presentan cuatro protones disociables ( $H_4L$ ), dos en cada uno de los grupos fosfónicos. Los valores de  $\log K$  para estos protones son:  $\log K_{HL} > 10$ ,  $\log K_{H_2L} \approx 6-7$ ,  $\log K_{H_3L} \approx 2,5$  y  $\log K_{H_4L} \approx 1$ .

El grupo hidroxilo, cuando se encuentra presente, posee un carácter ácido muy débil y no se deprotona a valores de pH menores a 13. Por otro lado, la presencia de un átomo de nitrógeno en la molécula del bisfosfonato, generalmente, incrementa la acidez de ambos grupos  $PO_3H^-$  [25]. La presencia del grupo amino en alguno de los sustituyentes aporta otro sitio de protonación en la molécula; uno muy básico ( $\log K_{NH_2}$  pamidronato = 13,06,  $\log K_{NH_2}$  alendronato = 12,68) [23]. La fuerte basicidad del grupo amino es probablemente la razón por la cual el nitrógeno no participa (o es despreciable) en la coordinación de estos complejos a los iones metálicos [25].

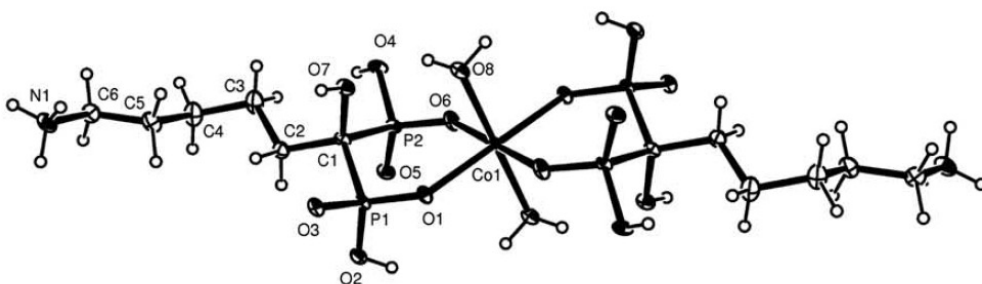
La forma de coordinación, así como también la posible estructura de los complejos es marcadamente dependiente de las condiciones de síntesis y fundamentalmente del pH, magnitud que determina el grado de protonación de los grupos fosfonato [24]. Cabe destacar, además, que la gran versatilidad de coordinación de los bisfosfonatos y su capacidad de formar diferentes tipos de puentes entre iones metálicos, determina que, en estado sólido, se formen muchas veces estructuras oligo y poliméricas [24].

#### **4.1.3 ANTECEDENTES DE COMPLEJOS METÁLICOS CON BISFOSFONATOS**

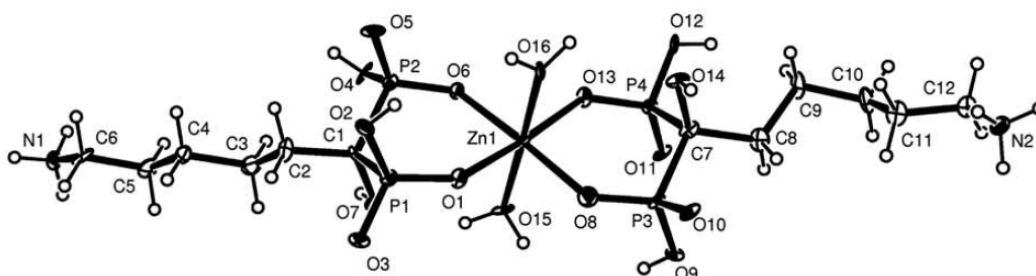
Tal como fue descrito previamente, los bisfosfonatos presentan una interesante capacidad de coordinación a cationes metálicos, por lo que existen numerosos antecedentes en este sentido [26,27]. Se detallan a continuación algunos ejemplos representativos, en particular, de aminobisfosfonatos y otros bisfosfonatos conteniendo nitrógeno en su cadena lateral, similares los que se estudiarán en este trabajo de Tesis.

Siud Pui Man y colaboradores describen la obtención de compuestos de coordinación con ácidos bisfosfónicos como 4-amino-1-hidroxi-1,1-butilidenbisfónico ( $H_4L^2$ ) y 6-amino-1-hidroxi-1,1-hexilidenbisfónico ( $H_4L^3$ ) y una amplia variedad de nitratos de metales de transición divalentes, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Cd y sulfato de vanadilo [28]. Las estructuras de los compuestos 1-6 se muestran en la Figura 6. En los compuestos desarrollados se observan las formas de coordinación más típicas para estos ligandos.

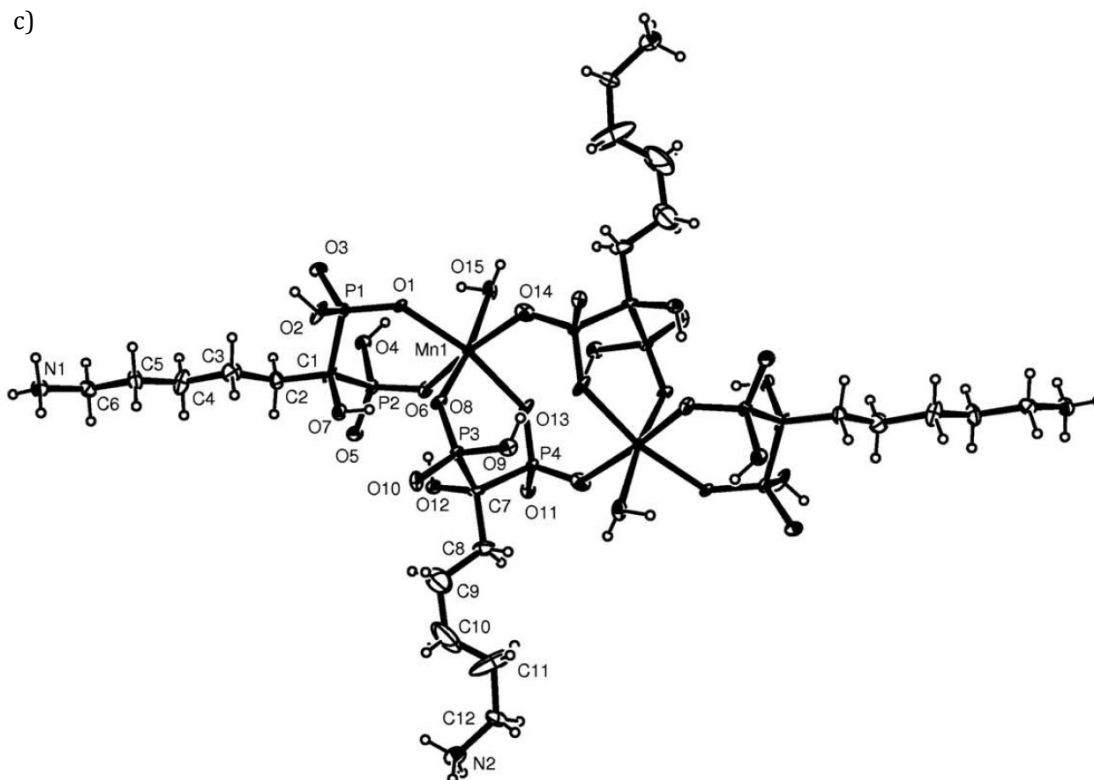
a)



b)



c)



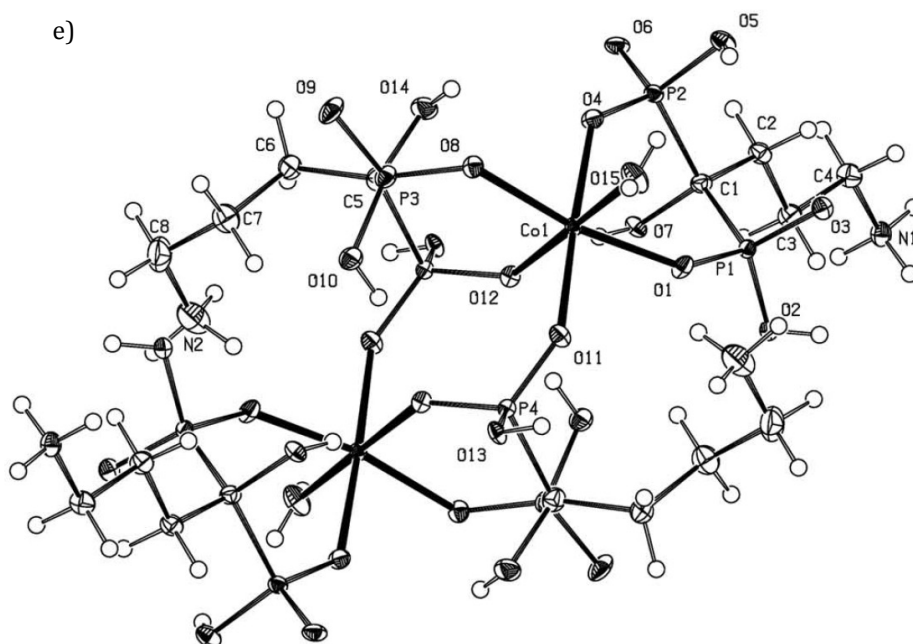
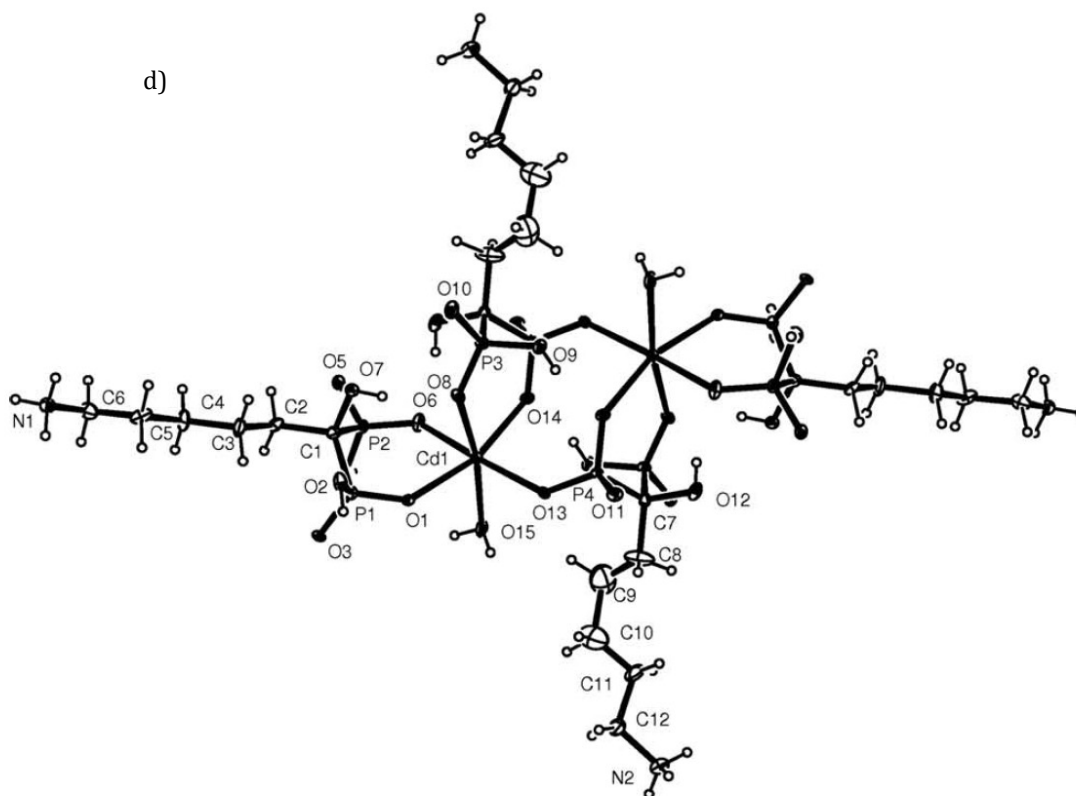


Figura 6: Estructuras cristalinas de a) diacua-bis(6-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-cobalto dihidrato (1), b) diacua-bis(6-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-níquel dihidrato (2), c) diacua-bis(6-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-zinc dihidrato (3), d) bis( $m_2$ -6-amino-1-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-diacua-bis(4-amino-1-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-di-manganeso dihidrato (4), e) bis( $m_2$ -6-amino-1-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-diacua-bis(4-amino-1-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfonato)-di-cadmio dihidrato (5).

En todos los casos se puede apreciar la deprotonación de un segundo grupo fosfonato lo que da lugar a un ligando bidentado con carga -2 que se presenta en la forma  $\approx\text{P}=\text{O}(\text{O}^-)(\text{OH})$ . Sin embargo, los ligandos aparecen con un comportamiento zwitteriónico presentando una carga positiva en el amino terminal que balancea la de uno de los dos oxígenos de los grupos fosfonato. Se puede observar la típica coordinación bidentada simple en los compuestos 1-6 mientras que también puede observarse la formación de puentes en los compuestos 4-6. De esta manera, los compuestos 1-3 son monoméricos mientras que los 4-6 forman dímeros. En todos los casos, la relación metal:ligando es 1:2 y la geometría alrededor del ion metálico es prácticamente octaédrica. Es importante destacar que se observan notorias diferencias entre las estructuras dinucleares de los derivados de  $\text{H}_4\text{L}^3$  y aquellos derivados de  $\text{H}_4\text{L}^2$  dependientes del largo de la cadena carbonada. Las esferas de coordinación son esencialmente las mismas con entornos metálicos pseudo-octaédricos ocupados por moléculas de agua, quelatos de bisfosfonatos terminales y bisfosfonatos puente. En el caso de los ligandos puente, la cadena  $\text{C}_4$  en el complejo 6 se distorsiona en la dirección del centro dinuclear, facilitando así, los enlaces de hidrógeno entre el amino terminal y el ligando, así como los átomos no coordinantes de oxígeno de los grupos fosfonato. A diferencia con los ligandos puente de cadena  $\text{C}_6$  en los complejos 4 y 5 se alejan del centro dinuclear (así como los ligandos terminales) restringiendo los enlaces de hidrógeno intramoleculares con el amino terminal. Es importante destacar que para los complejos 4 y 5 se observa una mayor distorsión en las cadenas  $\text{C}_6$  de los ligandos puente en comparación con los ligandos terminales. Esta diferencia estructural entre los complejos metálicos dinucleares de  $\text{L}_4\text{H}^2$  y  $\text{L}_4\text{H}^3$  resulta en patrones de enlaces de hidrógeno intramoleculares y así, diferentes arreglos de enlaces de hidrógeno extendidos a lo largo de las estructuras de los complejos [28].

Otro ejemplo que muestra la versatilidad de coordinación de los aminobisfosfonatos fue descrito por Hesham A. Habib y colaboradores [29]. En este artículo, se muestra nuevamente la ya descrita coordinación bidentada simple pero en este caso para el complejos  $[\text{Cu}(\text{L})_2]$  con  $\text{L} = 5\text{-amino-1-hidroxipentiliden-1,1-bisfosfonato}$ , de geometría cuadrada. Además, con este mismo ligando se describe una estructura en cadena en el complejo  $1\text{D}-\{[\text{Fe}(\text{L})]\cdot\text{H}_2\text{O}\}$  cadena. En este caso, a diferencia del anterior

el ligando bifosfonato presenta carga -2. La esfera de coordinación de cada ion Fe(II) está formada por cinco oxígenos de bisfosfonatos puente y un oxígeno del grupo C-OH. Cada ligando bisfosfonato conecta tres iones metálicos diferentes (Figura 7).

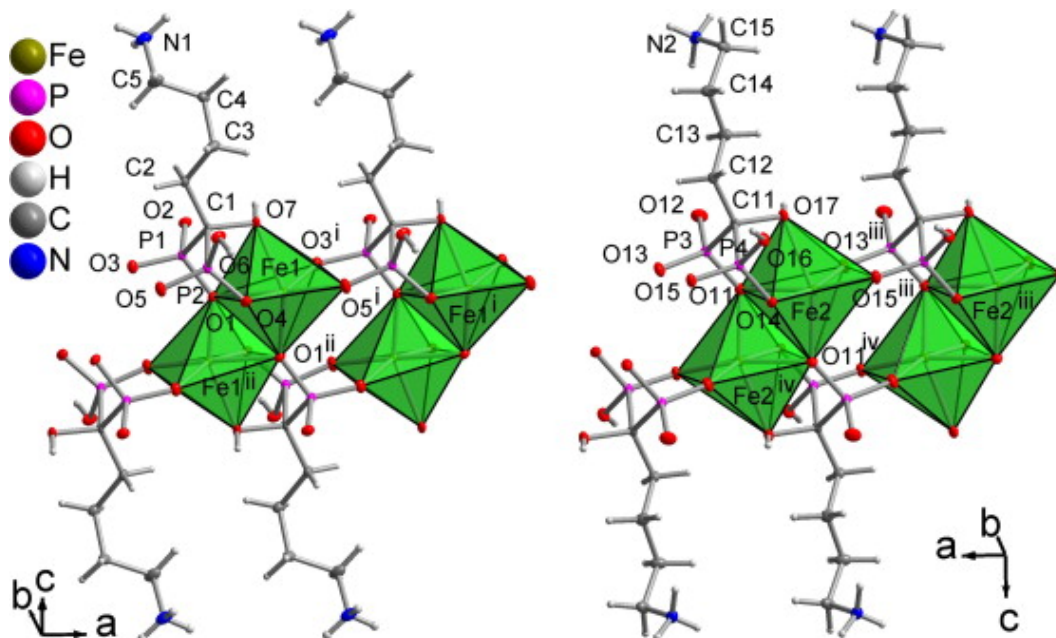


Figura 7: Modelo de representación (elipsoides térmicas (50%)) de las dos simetrías de coordinación Fe(II)-bisfosfonato independientes con la representación polihédrica alrededor del átomo de hierro.

Yun Gong y col. describen la síntesis de varios complejos con el ligando pamidronato y diferentes iones metálicos [30]. En este trabajo se muestra el cambio en la dimensionalidad de las estructuras obtenidas en función de los diferentes iones metálicos y tipo de coordinación del bisfosfonato. Los complejos obtenidos son:  $\text{Ni}_2(\text{C}_3\text{NH}_{10}\text{P}_2\text{O}_7)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1),  $\text{M}(\text{C}_3\text{NH}_9\text{P}_2\text{O}_7) \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{M} = \text{Co}$  (2),  $\text{Mn}$  (3),  $\text{Zn}$  (4)) y  $\text{Cu}_3(\text{C}_3\text{NH}_8\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5). Se puede observar, en cada caso, el diferente grado de protonación del pamidronato.

El complejo de níquel corresponde a una estructura dimérica con dos tipos de coordinación del ligando bisfosfonato: bidentada simple para los bisfosfonatos terminales y tridentada puente para los restantes (Figura 8a). Para los complejos se observa una estructura en cadena unidimensional similar (Figura 8b) a la previamente descrita para el complejo de hierro con otro ligando aminobifosfonato [29]. Al igual que en el caso del hierro, el ion cobalto presenta una coordinación octaédrica,

coordinando con seis átomos de oxígeno de tres ligandos diferentes. Uno de ellos coordina a través de dos oxígenos de dos grupos fosfonato y el O del grupo C-OH, el segundo a través de dos oxígenos de dos grupos fosfonato y el tercero a través de sólo uno de ellos. De esta manera, cada grupo fosfonato tiene dos de sus tres oxígenos participando de la coordinación, cada uno de ellos con un ion cobalto diferente. En el complejo de cobre existen dos cobres con entornos químicos diferentes. En uno de ellos, la coordinación es octaédrica a través de un oxígeno de una agua coordinada y cinco oxígenos de tres moléculas de bisfosfonato diferentes: un hidroxilo y dos oxígenos de dos grupos fosfonato de un ligando y un oxígeno de un grupo fosfonato de otros dos ligandos. En el otro caso, el Cu(II) presenta una geometría cuadrada plana y coordina con cuatro oxígenos de cuatro grupos fosfonato de dos ligandos diferentes (Figura 8c).

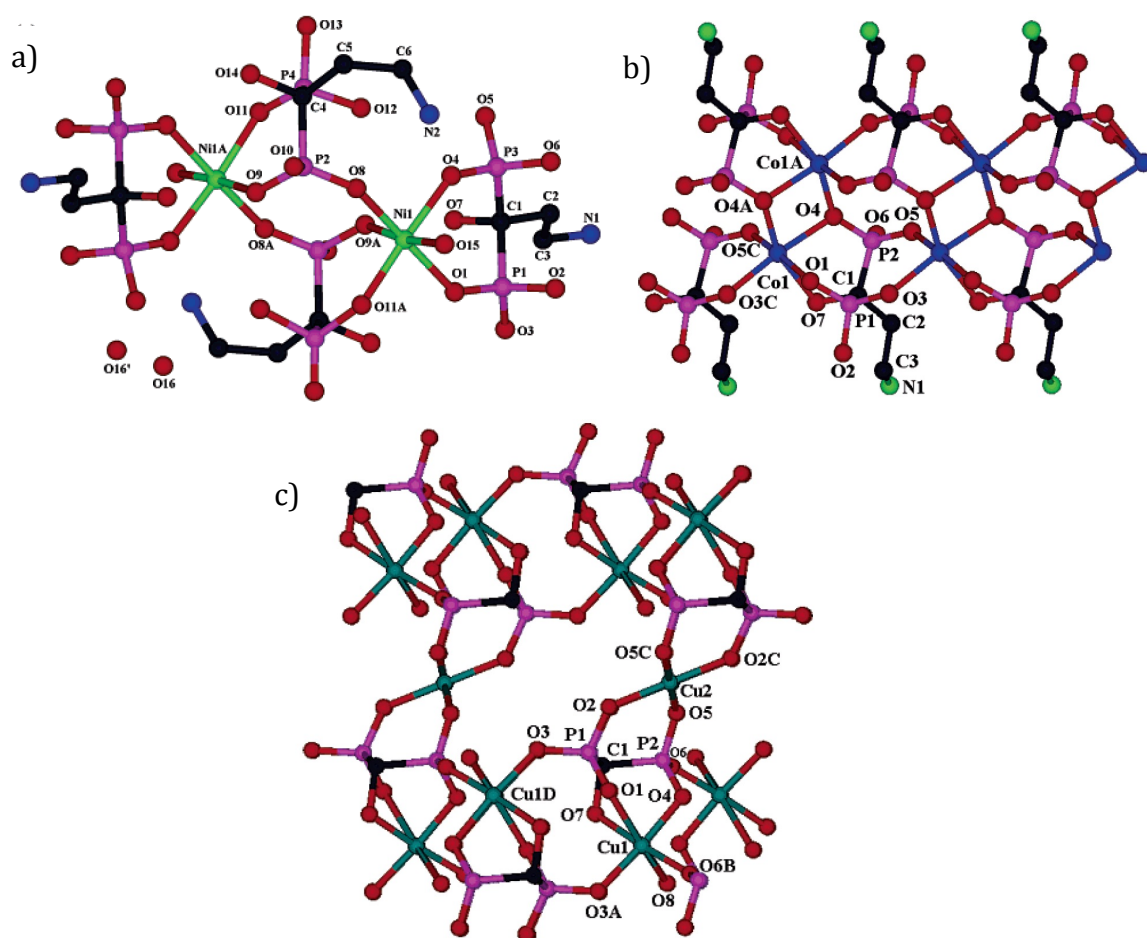


Figura 8: Representación de a)  $\text{Ni}_2(\text{C}_3\text{NH}_{10}\text{P}_2\text{O}_7)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , b)  $\text{Co}(\text{C}_3\text{NH}_9\text{P}_2\text{O}_7) \cdot \text{H}_2\text{O}$ , c)  $\text{Cu}_3(\text{C}_3\text{NH}_8\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

También han sido descritos complejos en cadena de fórmula  $\{[M(\text{Ale})]\cdot\text{H}_2\text{O}\}$  con  $M=\text{Co}$  o  $\text{Mn}$  cuya estructura es idéntica a la descrita previamente para los complejos en cadena desarrollados por Yun Gong y col [30].

Por otro lado, se han descrito también complejos con el ligando 1-hidroxi-2-(3-piridil)etiliden-1,1-difosfonato ( $\text{hpyedpH}_4$ ). Utilizando cobalto como metal central, se ha obtenido el complejo  $[\text{Co}_3(\text{hpyedpH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$  trimérico que presenta una estructura en capas (Figura 9) [31].

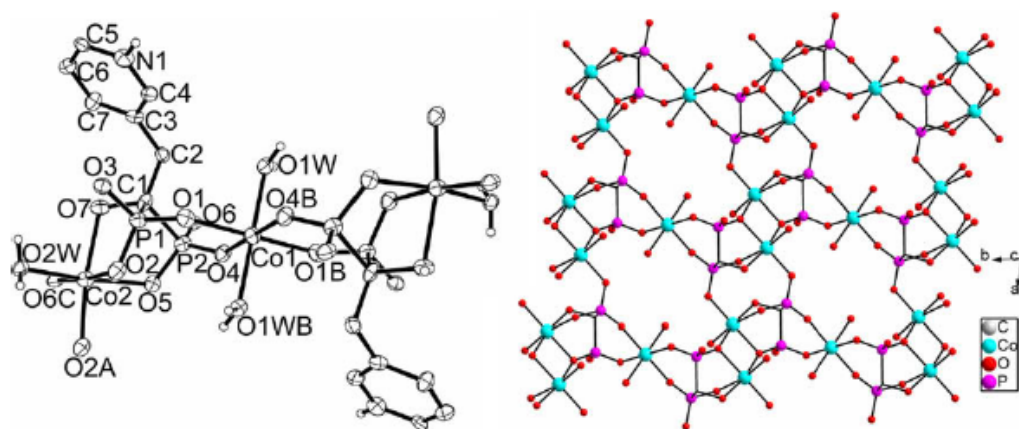


Figura 9: Representación de  $\text{Cu}_3(\text{C}_3\text{NH}_8\text{P}_2\text{O}_7)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

En este complejo, existen dos iones cobalto con entornos químicos diferentes. Uno de ellos,  $\text{Co}(1)$ , está coordinado con cuatro oxígenos de grupos fosfonatos de dos ligandos y dos moléculas de agua. El otro,  $\text{Co}(2)$ , coordina con cuatro oxígenos de grupos fosfonatos y un oxígeno del grupo  $\text{C-OH}$  de tres ligandos diferentes. La sexta posición de coordinación está ocupada por una molécula de agua. El trímero es del tipo  $\text{Co}(2)\text{-Co}(1)\text{-Co}(2)$ .

#### *Complejos metálicos con bisfosfonatos con actividad biológica*

La excepcional afinidad que presentan los bisfosfonatos por la hidroxiapatita ha sido explotada en la imagenología y en la terapéutica a través de la generación de radiofármacos. Los radiofármacos son moléculas marcadas con un radionucleido que pueden ser visualizadas luego de distribuirse y llegar a un sitio específico, o bien pueden dirigir un radionucleido específico hacia un tejido tumoral determinado. En el

caso de los bisfosfonatos, la superficie ósea es un blanco de acción establecido. En la actualidad, los complejos de  $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$  con HEDP (HEDP = etidronato) y de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con MDP (MDP = metilendibisfosfonato) se utilizan en la imagenología de tumores, ya sea primarios o metastásicos [32]. En la Figura 10 se observa la estructura cristalina del complejo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP [33].

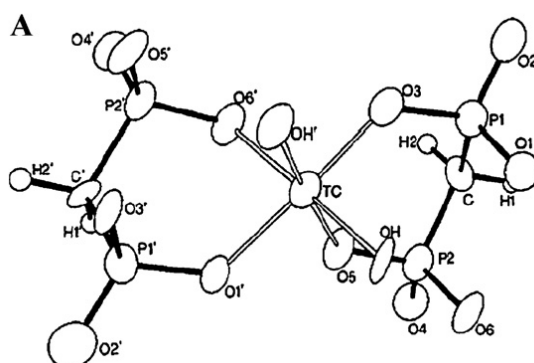
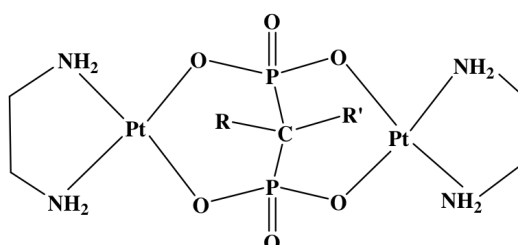


Figura 10: Representación del polímero  $[\text{Tc}(\text{MDP})(\text{OH})_2]$ .

Continuando en la línea de los antecedentes de complejos metálicos con bisfosfonato con aplicaciones biomédicas se puede citar el trabajo de Margiotta et al. Este grupo, recientemente, ha propuesto complejos dinucleares de platino con bisfosfonatos puente (a y b en Figura 11) como novedosos compuestos antitumorales con actividad potenciada en la superficie ósea [34,35]. Los complejos de Pt dinucleares fueron, además, cargados en xerogeles de silica preparados a partir del método sol-gel, así como en nanocristales de hidroxiapatita sintética, a efectos de obtener un material inorgánico capaz de liberar las especies antitumorales luego de ser implantado localmente en la superficie del tumor.



(a) =  $\text{R} = \text{R}' = \text{H}$

(b) =  $\text{R} = \text{OH}, \text{R}' = \text{CH}_2\text{-NH}_3^+$

Figura 11: a) y b) esquemas de los complejos dinucleares de platino.



En este trabajo, los autores han sintetizado y caracterizado completamente, mediante espectroscopía multinuclear RMN, un bisfosfonato geminal (1) análogo del fármaco actualmente comercializado y utilizado en este trabajo de Tesis, risedronato, además de su correspondiente complejo de platino (2). Los cristales de 1 fueron obtenidos mediante el método de sol-gel y caracterizados mediante difracción de rayos X.

El complejo de platino conteniendo el nuevo ligando demostró tener una estructura dinuclear con el bisfosfonato puente uniendo dos grupos de platino en una conformación de tipo "W". Estudios de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  a diferentes valores de pH permitieron determinar las constantes de acidez de los bisfosfonatos libres y además estimar la estabilidad del complejo de platino (estable a valores de pH no mayores a 11,5).

Es importante destacar que si bien se presentan amplios antecedentes de complejos metálicos con ligandos bisfosfonato, la aplicación de complejos metálicos para el tratamiento de enfermedades parasitarias como tripanosomiasis, malaria o leishmaniasis es un área poco desarrollada y, no se han descrito aún, complejos con potencial actividad antiparasitaria, específicamente antichagásica.

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1 DISCUSIÓN GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS**

Para todos los complejos metálicos con bisfosfonatos obtenidos los centros metálicos se presentan como átomos divalentes. La selección de los bisfosfonatos como ligandos bioactivos para la síntesis de compuestos metálicos en este trabajo de Tesis se centró no sólo en su actividad antiparasitaria, sino además en su habilidad para coordinarse con estos iones metálicos; ambos aspectos justificados en puntos anteriores. Por otro lado, la elección de metales de la primera serie de transición se basó en diferentes razones químicas y biológicas. Tal como fue previamente explicado, se intentó coordinar los ligandos bioactivos a través de los oxígenos de los grupos bisfosfonato para obtener especies con una mejor biodisponibilidad. De esta manera, se seleccionaron los iones  $\text{M(II)}$  intermedios o duros según la clasificación de Pearson,

como Cu(II), Co(II), Ni(II) y Mn(II) que podrían unirse a átomos donores duros, como los de oxígeno. Además, la selección de estos iones metálicos esenciales fue basada en la asunción de que los metales endógenos podrían resultar menos tóxicos que los no esenciales. Por otro lado, dado que los iones Mg(II) son necesarios para la unión de los bisfosfonatos a la FPPS [36], los iones metálicos divalentes podrían mejorar la habilidad de los bisfosfonatos para unirse, resultando en una mayor inhibición enzimática y, de esa manera, una mayor actividad antiparasitaria.

En este sentido, han sido utilizadas diversas estrategias para la síntesis de compuestos de coordinación con metales de la primera serie de transición. Dentro de las alternativas ensayadas se puede describir diferentes condiciones experimentales, ya sea modulando pH, temperatura, solvente, relación molar, así como el uso de diferentes sales de los metales (Cu(II), Co(II), Ni(II) y Mn(II)) ya sea nitratos o sulfatos, en lugar de los cloruros de partida. Además, se consideró la síntesis hidrotérmica como otro proceso para la obtención de compuestos de coordinación o para favorecer la obtención de monocristales aptos para la resolución de su estructura mediante difracción de rayos X.

Finalmente, todos los complejos se sintetizaron de manera similar. Mediante síntesis directa se disuelve la sal sódica del bisfosfonato, NaBP, (BP = risedronato, alendronato, pamidronato e ibandronato) en agua y se ajusta el pH entre 2-4 (a excepción del ibandronato, pH=5-6). A la solución resultante se le agrega la cantidad correspondiente del cloruro del metal (Cu, Co, Ni, Mn). Luego de 24 horas a temperatura ambiente se filtra el sólido obtenido. Cabe destacar que para el sistema NiRis, se obtuvieron dos complejos diferentes:  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$ , análogo a los de la serie MRis, y  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ . De este último sólo se obtuvieron un pequeño número de cristales como producto de la evaporación del solvente en una solución de la que ya había cristalizado el complejo  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$ .

El pH es la variable que tiene el efecto más significativo sobre las diferentes especies a obtener. A valores de pH menores que 2, el grado de protonación del ligando no permite la formación de cantidades significativas de ninguna especie compleja y en estas condiciones cristaliza el ligando en su forma anhidra [37]. Por otro lado, a valores de pH mayores que 7, la hidrólisis de los iones metálicos compite con la formación de las especies complejas. Sin embargo, a valores de pH entre 2 y 6, el comportamiento

de los complejos de Ale, Pam y Ris es diferente a los de Iba. En el caso de los primeros, no se detectaron, en el espectro visible, especies complejas en solución acuosa en todo este rango de pH. Sin embargo, luego de 24 horas, por evaporación a temperatura ambiente, cristalizan distintas especies complejas. A valores de pH entre 2 y 4 se obtienen las especies neutras que fueron caracterizadas. A valores de pH mayores, se obtienen mezclas que no pudieron ser caracterizadas. Por otro lado, en el caso de los complejos de Iba, a valores de pH menores que 3, se detecta la presencia de especies complejas en solución, pero las mismas son extremadamente solubles y no pudieron ser aisladas. Cuando se trabaja a valores mayores de pH entre 5 y 6, las especies presentes en solución son diferentes a las anteriores mencionadas y luego de cierto tiempo, cristalizan las especies poliméricas que se han caracterizado para este ligando. Para el sistema Culba, no se logró obtener ninguna especie en estado sólido. Se obtuvieron dieciséis complejos de iones metálicos de la primera serie de transición (Cu(II), Co(II), Ni(II), Mn(II)) con los bisfosfonatos risedronato (Ris), alendronato (Ale), pamidronato (Pam), e ibandronato (Iba) como ligandos. En la Figura 12 se muestra un esquema del método de síntesis, en solución acuosa, de los complejos y las fórmulas propuestas.

$MCl_2 \cdot xH_2O$	+	NaBP	→	M-BP
M = Cu, Co, Ni, Mn X = 4, 6, 6, 2, respectivamente		BP = Ris, Ale, Pam (pH = 2-4)		$[M^{II}(\text{Ris})_2] \cdot 4H_2O$ , $[Ni^{II}(\text{Ris})_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ $[M^{II}_2(\text{Ale})_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ $([Cu^{II}(\text{Pam})] \cdot H_2O)_n$ , $[M^{II}(\text{Pam})_2(H_2O)_2] \cdot 3H_2O$
		Iba (pH = 5-6)		$\{[M^{II}(\text{Iba})] \cdot 6H_2O\}_n$

Figura 12: Esquema de síntesis general para los complejos metálicos con ligandos bisfosfonato.

La mayoría de los compuestos fue obtenida con buenos rendimientos y pureza adecuada para su uso sin posterior purificación. Además, se ha resuelto la estructura de cinco de ellos por difracción de rayos X en monocristal y los resultados de la

caracterización analítica y espectroscópica, que se discutirán a continuación, confirman la fórmula propuesta para el resto de los complejos.

Algunas características de los complejos obtenidos se listan en la Tabla 1, a continuación:

<b>Compuesto</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Aspecto morfológico</b>
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	34	Sólido celeste microcristalino
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	46	Sólido rosado pálido microcristalino
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	67	Sólido verde microcristalino
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50	Sólido blanco microcristalino
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	Sólido verde claro microcristalino
$[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37	Monocristales celestes
$[\text{Co}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	46	Sólido rosado microcristalino
$[\text{Ni}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40	Sólido verde microcristalino
$[\text{Mn}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	49	Sólido rosado microcristalino
$([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Pam})] \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	46	Monocristales celestes
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	55	Sólido rosado microcristalino
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	41	Sólido verde microcristalino
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	46	Sólido blanco microcristalino
$\{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	58	Sólido rosado microcristalino

$\{[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Iba})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	49	Sólido verde microcristalino
$\{[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Iba})]\cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	56	Sólido blanco microcristalino

Tabla 1: Características principales de los complejos metálicos obtenidos.

### 4.3.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FISICOQUÍMICA

#### 4.3.2.1 CARACTERIZACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

##### 4.3.2.1.1 ANÁLISIS ELEMENTAL DE ELEMENTOS LIVIANOS

Las fórmulas propuestas para los complejos metálicos con bisfosfonatos obtenidos, así como los resultados del análisis elemental de C, H y N correspondientes se presentan en la Tabla 2.

Complejo	Fórmula propuesta	Teórico			Experimental		
		%C	%H	%N	%C	%H	%N
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}_4\text{Cu}$	24,0	4,0	4,0	24,1	4,1	4,0
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}_4\text{Co}$	24,2	4,0	4,0	24,1	4,1	4,1
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}_4\text{Ni}$	24,2	4,0	4,0	24,1	4,1	4,0
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}_4\text{Mn}$	24,3	4,0	4,0	24,3	4,1	4,1
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{P}_4\text{Ni}$	24,2	4,0	4,0	24,1	4,1	4,0
$[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{32}\text{P}_8\text{Cu}_2$	16,2	4,4	4,7	16,0	4,3	4,5
$[\text{Co}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{32}\text{P}_8\text{Co}_2$	16,3	4,4	4,8	16,2	4,6	4,9
$[\text{Ni}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{32}\text{P}_8\text{Ni}_2$	16,3	4,4	4,8	16,2	4,4	5,0
$[\text{Mn}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{32}\text{P}_8\text{Mn}_2$	16,4	4,4	4,8	16,3	4,3	4,6
$([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Pam})]\cdot \text{H}_2\text{O})_n$	$\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Cu}$	11,5	3,5	4,5	11,4	3,4	4,7
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{P}_4\text{Co}$	11,7	4,9	4,5	11,5	4,7	4,7
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{P}_4\text{Ni}$	11,7	4,9	4,5	11,5	4,8	4,5
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{P}_4\text{Mn}$	11,7	4,9	4,6	11,6	5,0	4,7

$\{\text{Co}^{\text{II}}(\text{lba})\cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	$\text{C}_9\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{P}_2\text{Co}$	22,3	6,8	2,9	21,9	6,6	2,8
$\{\text{Ni}^{\text{II}}(\text{lba})\cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	$\text{C}_9\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{P}_2\text{Ni}$	22,3	6,8	2,9	21,8	6,5	2,7
$\{\text{Mn}^{\text{II}}(\text{lba})\cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	$\text{C}_9\text{H}_{33}\text{NO}_{13}\text{P}_2\text{Mn}$	22,5	6,8	2,9	22,7	6,7	2,7

Tabla 2: Resultados del análisis elemental de C, H y N para los complejos metálicos con los ligandos bisfosfonato.

Los resultados experimentales están de acuerdo con las fórmulas propuestas. La técnica, puesta a punto en este trabajo conduce a la obtención de los complejos deseados con una alta pureza.

#### 4.3.2.1.2 ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Se realizó el análisis termogravimétrico de los compuestos metálicos obtenidos con el fin de constatar la cantidad de moléculas de agua de hidratación en la fórmula de los mismos. Los resultados obtenidos están de acuerdo con las fórmulas propuestas y con los resultados de los estudios de difracción de rayos X. Para los complejos de la serie MRis se realizó un análisis más exhaustivo de los resultados del TGA en base a datos descritos previamente para el ligando libre [37]. Todos los complejos obtenidos de la serie  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  mostraron una única pérdida de masa, correspondiente a las cuatro moléculas de agua de cristalización. Este resultado concuerda con que en el espectro infrarrojo de estos compuestos se observa una única señal intensa en  $3500\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento del enlace OH proveniente de una única población de moléculas de agua unidas en forma similar en la red [37]. El complejo  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  mostró una señal intensa correspondiente a pérdida de masa de 10,1%, a  $131,3\text{ }^\circ\text{C}$ . Sin embargo, para el resto de los complejos, la correspondiente pérdida de masa fue observada como un hombro ancho en el rango de  $80\text{-}140\text{ }^\circ\text{C}$ . Esta diferencia puede ser relacionada tanto a una diferencia en el grado de cristalinidad de los complejos o con la presencia de diferentes tipos de hidratos. En el caso del complejo de cobre, se trataría de un hidrato en el que las moléculas de agua están fuertemente unidas en posiciones fijas de la red y en el caso de los otros miembros de

la serie podría tratarse de un hidrato con las moléculas de agua dispuestas en canales de la red [37].

Es importante destacar que se observa, para todos los complejos, una pérdida de masa por encima de los 260 °C que podría corresponder a la descomposición de los mismos.

#### 4.3.2.1.3 ESTUDIO DE ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

Los espectros IR se registraron en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  para todos los complejos metálicos obtenidos y sus respectivos ligandos libres. Los mismos se presentan en el Anexo I.

Los espectros en la región del infrarrojo de risedronato, alendronato, pamidronato e ibandronato y los correspondientes a sus respectivos complejos fueron analizados a efectos de asignar las bandas de vibración infrarroja más significativas con el fin de relacionarlas con los distintos modos de coordinación de los bisfosfonatos en los complejos obtenidos. El análisis del espectro Raman realizado a los complejos MRis permitió complementar la asignación de las bandas en la región del infrarrojo.

Es importante destacar que, tanto para cada uno de los compuestos obtenidos de las series  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{M}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\{[\text{M}^{\text{II}}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$ , los espectros IR resultaron prácticamente idénticos entre sí, mostrando que dentro de cada serie, los complejos con la misma fórmula molecular, son también isoestructurales. En la Figura 13 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de la serie MRis.

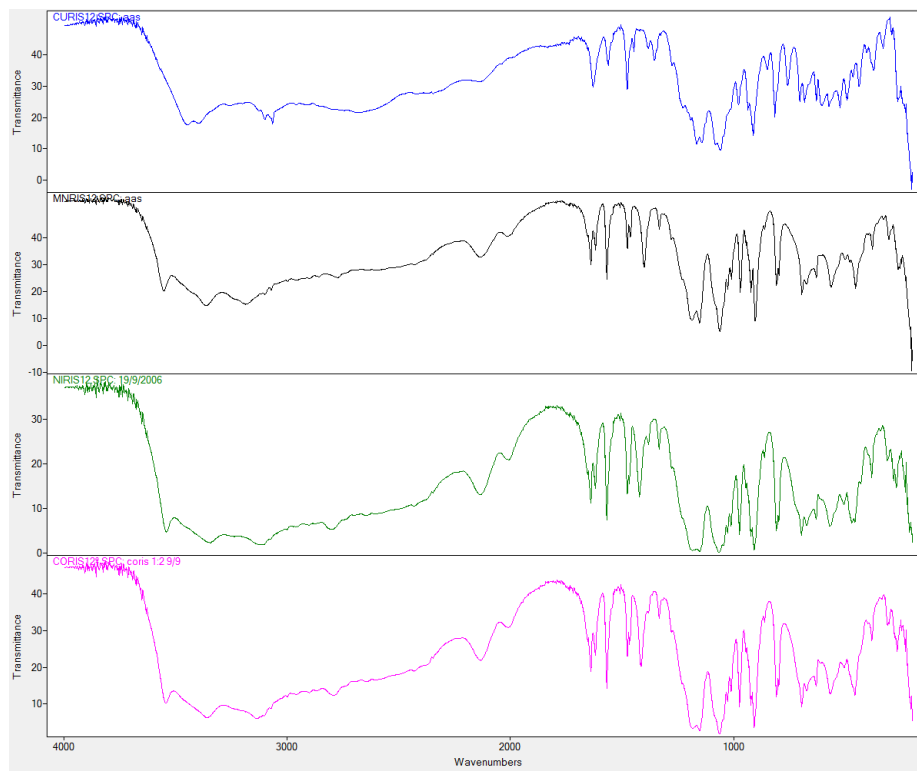


Figura 13: Espectros infrarrojos ( $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ) de la serie de complejos  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuRis azul, MnRis negro, NiRis verde y CoRis fucsia).

En este sentido, el espectro del compuesto  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  es diferente a la serie de los restantes complejos de risedronato debido a que presenta una esfera de coordinación diferente. Lo mismo ocurre con el espectro IR de la cadena  $([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Pam})]\cdot \text{H}_2\text{O})_n$ .

Los ligandos, y todos los complejos mostraron bandas típicas de los derivados del ácido bisfosfónico en la región de  $900\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ . En el caso de risedronato, estas señales se superponen con las correspondientes a la deformación del anillo piridínico, dificultando la asignación inequívoca de las bandas correspondientes, tanto en el espectro infrarrojo como Raman. Además, en esta región, las modificaciones en los números de onda luego de la coordinación no son consecuencia solamente de la unión al metal sino que, como se describió previamente para los distintos hidratos del risedronato, la formación de enlaces de hidrógeno que involucran los grupos P-O y P-O-H en sí misma afecta el espectro vibracional de los compuestos [37].

A pesar de ello, algunas de las bandas características de los espectros del ligando y los complejos fueron asignadas tentativamente. En la Tabla 3 se muestran dichas asignaciones en forma general para cada serie de complejos isoestructurales.



Compuesto	$\nu_{as}(POO^-)$ $cm^{-1}$	$\nu_s(POO^-)$ $cm^{-1}$	$\nu$ (C-P) $cm^{-1}$	$\nu$ (P-OH) $cm^{-1}$
NaRis·2,5H <sub>2</sub> O	1210	1134	1385	2150
[M <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1187-1166	1153-1143	1354-1334	2139-2132
[Ni <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1179	1121	1376	2137
NaAle·3H <sub>2</sub> O	1233	1129	1477	2229
[M <sup>II</sup> <sub>2</sub> (Ale) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	1233-1237	1137-1146	1458-1476	2327-2344
Na <sub>2</sub> Pam	1178	1063	1387	2759
[M <sup>II</sup> (Pam) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	1147	1033	1387	<sup>a</sup> 2798
[(Cu <sup>II</sup> (Pam)) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O] <sub>n</sub>	1156	1074	1388	2759
NaIba·H <sub>2</sub> O	1201	1039	1384	2965
{[M <sup>II</sup> (Iba)] <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	1154	1064	1384	2965

<sup>a</sup>Señal débil en forma de hombro, solapada con  $\nu(OH)$  del agua.  
 $\nu_{as}$ : estiramiento asimétrico;  $\nu_s$ : estiramiento simétrico

Tabla 3: Bandas vibracionales seleccionadas para los complejos obtenidos.

En la región de 1100-1250  $cm^{-1}$ , se observan las bandas de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo  $POO^-$  [38]. Estas bandas presentan un corrimiento hacia frecuencias menores para las series MRis y MPam. Esto es consistente con el mismo tipo de coordinación bidentada simple de los grupos bisfosfonato en todos estos complejos monoméricos obtenidos [39]. El modo de coordinación tipo puente en los ligandos bisfosfonato en las cadenas de CuPam fue evidenciado a partir de la disminución de la frecuencia de  $\nu_{as}(POO^-)$  acompañado de un aumento de  $\nu_s(POO^-)$ . Estas señales se encuentran mucho menos resueltas que en los respectivos ligandos libres. Para la serie de complejos MIba, se observan cambios muy similares en el espectro infrarrojo como consecuencia de la coordinación, lo que estaría de acuerdo con la estructura en cadena propuesta para esta serie de compuestos. Los complejos  $[M^{II}_2(Ale)_4(H_2O)_2]$  presentan dos moléculas de ligando bisfosfonato coordinando de dos formas distintas: una bidentada (igual que para la serie MRis y MPam) y otra tipo puente (ver sección 4.3.2.1.4). En el espectro infrarrojo esta forma de coordinación se traduce en un pequeño corrimiento a valores de frecuencia mayores en el

estiramiento simétrico del enlace  $\text{POO}^-$ , pero prácticamente no se observan cambios, o ligeros corrimientos a menores valores de frecuencia, en el estiramiento asimétrico.

Para todos los complejos obtenidos se presenta, en la región de  $3000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ , una banda ancha correspondiente al estiramiento del OH, tanto del agua coordinada y/o de cristalización, así como del grupo CO-H. Además, en esa misma región se observan las señales correspondientes al estiramiento de los enlaces N-H, pertenecientes al grupo amino, para los sistemas con alendronato y pamidronato como ligandos. Para los complejos con risedronato como ligando, se pudo asignar la señal correspondiente al estiramiento O-H del grupo C-OH [37]. Esta señal, a  $3350\text{ cm}^{-1}$ , se mueve ligeramente como consecuencia de la coordinación y/o de los enlaces de hidrógeno presentes en los complejos  $[\text{M}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , mientras que para el complejo de  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se mueve a menores números de onda ( $3242\text{ cm}^{-1}$ ) lo que estaría de acuerdo con que, en este último complejo, ese grupo hidroxilo no participa de la coordinación. En la serie MIba sólo se observa una banda ancha en la región de  $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ .

Para los complejos que presentan agua coordinada (serie MAle, MPam y  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) se observan señales débiles en la región de  $590$  y  $470\text{ cm}^{-1}$  que podrían ser atribuidas a las moléculas de agua coordinadas.

#### **4.3.2.1.4 RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALINAS OBTENIDAS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL**

Se obtuvieron monocristales adecuados de los complejos  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  y  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  para la resolución de su estructura mediante difracción de rayos X. A continuación se exponen los resultados obtenidos de cada uno de ellos.

##### *Estructura cristalina de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$*

Por evaporación lenta durante 24 horas, a temperatura ambiente, de una solución acuosa del complejo se obtuvieron monocristales adecuados del complejo  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  para la recolección de datos por difracción de rayos X. La Tabla 4

resume los datos del cristal, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento.

Fórmula empírica	$C_{14}H_{28}CuN_2O_{18}P_4$
Peso fórmula	699,81
Sistema cristalino	triclínico
Grupo especial	P-1
Dimensiones de la celda unidad <sup>a)</sup>	
a (Å)	7,6505(4)
b (Å)	8,5866(5)
c(Å)	10,2793(6)
$\alpha$ (°)	65,952(1)
$\beta$ (°)	84,968(1)
$\gamma$ (°)	78,875(1)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	605,04(6)
Unidades de fórmula por celda unidad/Z	1
Densidad calculada (mg/mm <sup>3</sup> )	1,921
Coefficiente de absorción $\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,260
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,17 x 0,11 x 0,05
Color/forma del cristal	celeste/prismático
Rango de $\theta$ para recolección de datos	2,17 a 28,27°
Rangos de índices de Miller	-10, 10/-11, 11/-13, 13
Reflexiones recolectadas/independientes	8056/2990
Máx. y mín. de transmitancia	0,94 y 0,81
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en $F^2$
Pesos, w	$[W= 1/s^2(F_o^2) + (0,0306 P)^2 + 0,4761P,$ $P= (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ $P=[Max(F_o^2,0)+2F_c^2]/3$
Datos de refinamiento/parámetros	2740/0/210
Bondad del ajuste en $F^2$	1,053
Índices R finales, $R_w [1 > 2\sigma(I)]$	$R_1=0,0243, wR_2=0,0629$

<sup>a)</sup> Refinamiento de mínimos cuadrados para los parámetros angulares de 19487 reflexiones en el rango  $2,44 < \theta < 26,00^\circ$ .

Tabla 4: Datos de resolución de la estructura de  $[Cu^{II}(Ris)_2] \cdot 4H_2O$  mediante difracción de rayos X.

En la Tabla 5 se muestran algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados. Los resultados cristalográficos completos (lista completa de ángulos y distancias de enlace, parámetros atómicos de anisotropía térmica, coordenadas de los átomos de hidrógeno, factores de amplitud estructural calculados y observados) se incluyen en el Anexo I, y también se encuentran disponibles en el Cambridge CDC, CCDC 733164.

<i>Distancias de enlace (Å)</i>		<i>Ángulos de enlace (°)</i>	
Cu-O3	1,946(1)	O5-Cu-O3	89,74(5)
Cu-O5	1,956(1)	O5-Cu-O3a	90,26(5)
Cu-O7	2,655(1)	O5-Cu-O7	77,60(5)
		O5-Cu-O7a	102,00(5)
		O3-Cu-O7	78,20(5)
		O3-Cu-O7a	101,80(5)
		O3-Cu-O3a	180
		O5-Cu-O5a	180
		O7-Cu-O7a	180

Tabla 5: Algunas distancias y ángulos de enlace seleccionados para el complejo  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

La Figura 14 muestra una representación de la molécula con la numeración asignada a los átomos principales.

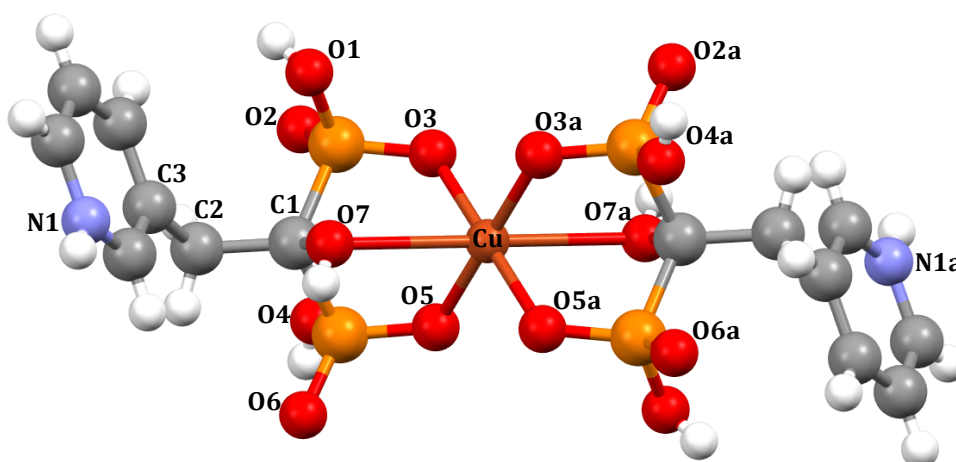


Figura 14: Representación de la estructura molecular de  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Las moléculas de agua de hidratación fueron omitidas para mayor claridad.

El estudio de difracción de rayos X mostró que el complejo  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$  consiste en unidades monoméricas discretas. Ambos ligandos risedronato coordinan al átomo de cobre de forma tridentada a través de dos átomos de oxígeno, uno de cada grupo fosfonato, y el sitio restante a través del átomo de oxígeno perteneciente al grupo C-OH que permanece protonado. Adicionalmente, el nitrógeno piridínico se protona, resultando en una carga neta de -1 para cada ligando. Ambos ligandos son equivalentes; el átomo metálico se encuentra en un centro de inversión.

La geometría alrededor del átomo de cobre, de acuerdo a las distancias y ángulos de enlace obtenidos, podría ser descrita como un intermedio entre una geometría octaédrica y una cuadrada plana. Con respecto a los átomos de oxígeno ecuatoriales (O3, O3a, O5 y O5a) se encuentran de manera coplanar con el átomo metálico, mientras que O7 se desvia  $12^\circ$  del eje octaédrico. En este caso se puede observar que la posición de O7 se encuentra restringida por la coordinación tridentada del ligando. Además, en concordancia con el efecto Jahn-Teller característico de los iones con una configuración electrónica  $d^9$ , ambas distancias axiales de Cu-O7 son mayores que sus correspondientes ecuatoriales.

Un complejo de cobre trinuclear relacionado, catena-(piperazin bis (1-hidroxiethylidenediphosphonato)-tetraacuo-tri-cobre) muestra un octaedro más regular como ejemplo de la distorsión del efecto Jahn-Teller (Cu-O= 2,46 Å) cuando se comparó con el compuesto en cuestión (2,655(1) a), y con una distorsión menos regular al presentar el ángulo más abierto de O-Cu-O con  $97,7^\circ$  y  $101,8(5)^\circ$ , respectivamente.

Una compleja red de enlaces de hidrógeno intermoleculares estabiliza la estructura cristalina. Dos poblaciones diferentes de moléculas de agua de cristalización participan en diferentes enlaces de hidrógeno intermoleculares. Adicionalmente, los enlaces O4...O6 y O7...O2 completan la red. El efecto de la participación de los grupos C-OH (O7...O2) y el grupo N-H (O1w...N') en estos enlaces de hidrógeno también resultó evidente a través del análisis de los espectros IR y Raman.

*Estructura cristalina de [Ni<sup>II</sup>(Ris)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O*

Por evaporación lenta durante 48 horas, a temperatura ambiente, se obtuvieron monocristales adecuados del complejo [Ni<sup>II</sup>(Ris)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O para la recolección de datos por difracción de rayos X. La Tabla 6 resume los datos del cristal, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento.

Fórmula empírica	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> NiO <sub>18</sub> P <sub>4</sub>
Peso fórmula	694,95
Sistema cristalino	triclínico
Grupo especial	P-1
Dimensiones de la celda unidad <sup>a)</sup>	
a (Å)	6,6792(3)
b (Å)	9,6383(4)
c(Å)	9,7242(5)
α(°)	97,695(1)
β(°)	93,744(1)
γ(°)	99,829(1)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	608,77(5)
Unidades de fórmula por celda unidad/Z	1
Densidad calculada (mg/mm <sup>3</sup> )	1,896
Coeficiente de absorción μ (mm <sup>-1</sup> )	1,152
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,24 x 0,20 x 0,15
Color/forma del cristal	verde pálido/prismático
Rango de θ para recolección de datos	1,152 a 28,28°
Rangos de índices de Miller	-8, 8/-12, 12/-12, 12
Reflexiones recolectadas/independientes	8010/3001
Máx. y mín. de transmitancia	0,84 y 0,77
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>
Pesos, w	[W= 1/s <sup>2</sup> (Fo <sup>2</sup> ) + (0,0338 P) <sup>2</sup> + 0,6134P, P= (Fo <sup>2</sup> + 2Fc <sup>2</sup> )/3 P=[Max(Fo <sup>2</sup> ,0)+2Fc <sup>2</sup> ]/3
Datos de refinamiento/parámetros	2901/0/208
Bondad del ajuste en F <sup>2</sup>	1,089

---

Índices R finales, Rw [ $1 > 2\sigma(I)$ ]

R1=0,0265, wR2=0,0705

---

<sup>a)</sup> Refinamiento de mínimos cuadrados para los parámetros angulares de 19487 reflexiones entre  $2,44 < \theta < 26,00^\circ$ .

---

Tabla 6: Datos de resolución de la estructura de  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  mediante difracción de rayos X.

En la Tabla 7 se muestran algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados. Los resultados cristalográficos completos (lista completa de ángulos y distancias de enlace, parámetros atómicos de anisotropía térmica, coordenadas de los átomos de hidrógeno, factores de amplitud estructural calculados y observados) se incluyen en el Anexo I, y también se encuentran disponibles en el Cambridge CDC, CCDC 733165.

<i>Distancias de enlace (Å)</i>		<i>Ángulos de enlace (°)</i>	
Ni-O1	2,063(1)	O1-Ni-O4	90,82(4)
Ni-O4	2,040(1)	O1-Ni-O8	88,85(5)
Ni-O8	2,071(1)	O1-Ni-O4a	89,18(4)
		O1-Ni-O8a	91,15(5)
		O4-Ni-O8	88,31(5)
		O4-Ni-O8a	91,69(5)
		O1-Ni-O1a	180
		O4-Ni-O4a	180
		O8-Ni-O8a	180

Tabla 7: Algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados para  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

La Figura 15 muestra una representación de la molécula con la numeración asignada a los átomos principales.

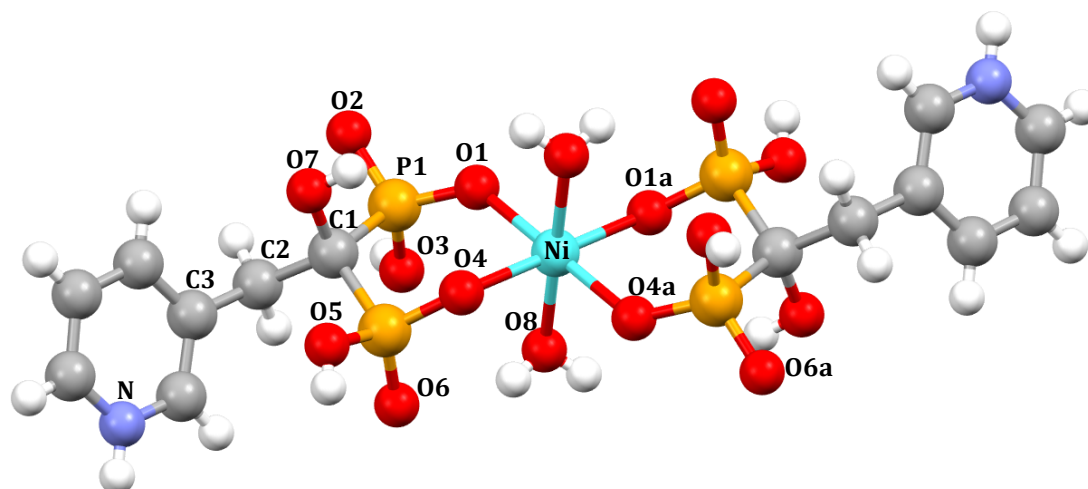


Figura 15: Representación de la estructura molecular de  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con elipsoides térmicos al 50% de probabilidad. Las moléculas de agua no coordinada fueron omitidas para mayor claridad.

El estudio de difracción de rayos X mostró que el complejo  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  consiste en unidades monoméricas discretas. Ambos ligandos risedronato coordinan al átomo de níquel de forma bidentada a través de dos átomos de oxígeno, uno de cada grupo fosfonato. Los sitios restantes de la esfera de coordinación se completan por dos átomos de oxígeno provenientes de dos moléculas de agua en posición *trans*.

El grupo C-OH del risedronato no participa de la unión al metal, en contraste con el complejo de Cu recién descrito. Ambos átomos de oxígeno de los grupos fosfonato que coordinan al átomo central se encuentran deprotonados, mientras que el nitrógeno piridínico permanece protonado, resultando esto en una carga de -1 para cada ligando.

Tal como fue observado para el complejo de Cu ambos ligandos son equivalentes, con un átomo de níquel ubicado en un centro de inversión. Las distancias y ángulos de enlace alrededor del átomo de níquel se encuentran en concordancia con una geometría octaédrica regular. Una compleja red 3D de enlaces de hidrógeno estabiliza el compuesto en el cristal. En esta red participan moléculas de agua de coordinación y de cristalización en los enlaces de hidrógeno intramolecular. Las moléculas de agua de cristalización también participan en los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Los enlaces de hidrógeno  $\text{N} \cdots \text{O}4''$  completan la red. Como se describió previamente, el



efecto de estos enlaces de hidrógeno pudo ser evidenciado en el estudio de los espectros IR y Raman.

Cabe destacar que se encuentran sólo dos complejos de risedronato en la base de datos CSD, ellos son, catena-((1-hidroxi-1-(hidroxifosfinato)-2-piridin-3-il-etil)fosfonato)-acua-cobalto), donde el anión risedronato presenta una carga de -2, y catena-(dihidrogeno-1-hidroxi-2-(3-piridinio)etiliden-1,1-difosfonato)-(hidrógeno-1-hidroxi-2-(3-piridil-nio)etiliden-1,1-difosfonato)-gadolinio dihidrato) [40,41].

Los complejos de Co y Gd difieren notoriamente de los complejos de Cu y Ni descriptos aquí. Esto se debe a que el ligando risedronato apunta a dos centros metálicos diferentes estabilizando la especie polinuclear, mientras que los complejos reportados en este trabajo de Tesis muestran una coordinación en un solo centro metálico definiendo así, arreglos mononucleares.

#### *Estructura cristalina de $[Cu^{II}_2(Ale)_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$*

Por evaporación lenta durante 48 horas, a temperatura ambiente, de una solución acuosa del complejo se obtuvieron monocristales adecuados del complejo  $[Cu^{II}_2(Ale)_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$  para la recolección de datos por difracción de rayos X. La Tabla 8 resume los datos del cristal, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento.

Fórmula empírica	$C_{16}H_{52}Cu_2N_4O_{30}P_8 \cdot 2H_2O$
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo especial	$P2_1/c$
Dimensiones de la celda unidad <sup>a)</sup>	
Temperatura (K)	125(2)
Longitud de Onda (Å)	0,71073
a (Å)	12,5988(14)
b (Å)	13,3968(15)
c (Å)	12,5122(14)
$\beta$ (°)	110,935(1)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	1972,4(4)

Unidades de fórmula por celda unidad/Z	2
Densidad calculada (mg/mm <sup>3</sup> )	1,999
Coefficiente de absorción $\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,518
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,12 x 0,06 x 0,06
Color/forma del cristal	inoloro/bloque
Rango de $\theta$ para recolección de datos	1,73 a 30,42°
Rangos de índices de Miller	-17, 17/-18, 18/-17, 17
Reflexiones recolectadas/independientes	0,0615
Máx. y mín. de transmitancia	0,91 y 0,84
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>
Pesos, w	$[W = 1/s^2(F_o^2) + (0,0306 P)^2 + 0,4761P,$ $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$ $P = [\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2]/3$
Datos de refinamiento/parámetros	4218/288
Bondad del ajuste en F <sup>2</sup>	1,023
Índices R finales, Rw [ $1 > 2\sigma(I)$ ] <sup>b</sup>	R1=0,0462, wR2=0,1239

a) Refinamiento de mínimos cuadrados para los parámetros angulares de 19487 reflexiones en el rango  $2,44 < \theta < 26,00^\circ$ .

b) Los índices R se definen como:  $R1 = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ ,  $wR2 = [\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2 / \sum w(|F_o|^2)^2]^{1/2}$

Tabla 8: Datos de resolución de la estructura de  $[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  mediante difracción de rayos X.

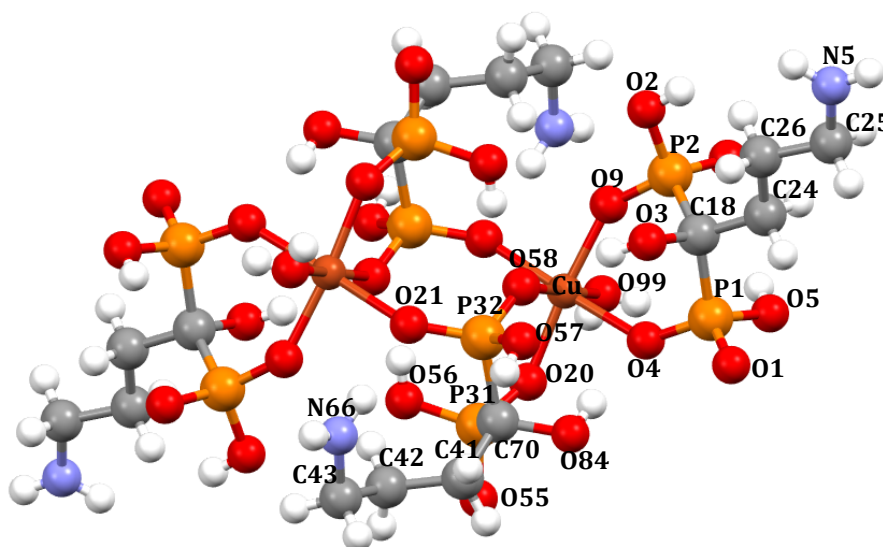
En la Tabla 9 se muestran algunas distancias y ángulos de enlace seleccionados. Los resultados cristalográficos completos (lista completa de ángulos y distancias de enlace, parámetros atómicos de anisotropía térmica, coordenadas de los átomos de hidrógeno, factores de amplitud estructural calculados y observados) se incluyen en el Anexo I, y también se encuentran disponibles en el Cambridge CDC, CCDC 799811.

<i>Distancias de enlace (Å)</i>		<i>Ángulos de enlace (°)</i>	
Cu-O4	2,023(2)	O9-Cu-O20/O21(#1)- Cu-O4	174,6(1)/176,5(1)
Cu-O9	1,941(2)	O99-Cu-O58	178,2(1)
Cu-O20	1,946(2)	O20-Cu-O21(#1)/O(9)-	98,7(1)/91,3(1)

		Cu-O(4)	
Cu-O21(#1)	2,002(2)	O20-Cu-O4/O9-Cu-O99	83,5(1)/88,8(1)
Cu-O58	2,405(2)	O20-Cu-O99/O21(#1)-	90,0(1)/88,7(1)
		Cu-O99	
Cu-O99	2,289(3)	O4-Cu-O99/O9-Cu-O58	94,0(1)/95,1(1)
		O20-Cu-O58/O21(#1)-	89,9(1)/89,5(1)
		Cu-O58	
		O4-Cu-O58/O(9)-Cu-	87,8(1)/86,5(1)
		O(21)#1	

Tabla 9: Algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados para  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

La Figura 16 muestra una representación de la molécula con la numeración asignada a los átomos principales.



En este sentido, la especie de Cu-alendronato es un complejo dinuclear donde el anillo central de 8 miembros está formado por 2 átomos de Cu, 2 de P y 4 de O. El metal se encuentra rodeado por 6 átomos de O, dos de ellos provenientes de un bisfosfonato quelato, otros tres átomos de oxígeno (también de los grupos fosfonato) se encuentran formando parte de un puente hacia al otro centro de Cu (formando así, un arreglo del tipo Cu-O-P-O) y las moléculas de agua completan la esfera de coordinación octaédrica.

Los átomos de oxígeno ecuatoriales (O4, O9, O20 y O21) se presentan casi de manera coplanar con respecto al centro metálico y el rango de distancia de enlace de Cu-O va desde 1.941(2)-2.023(3) Å, mientras que los enlaces axiales de Cu-O se presentan con una elongación [Cu-O(acuo)= 2,289(3) Å, Cu-O(58)= 2,405(3) Å] en concordancia con el efecto Jahn-Teller característico de los iones con una configuración electrónica  $d^9$ .

Todos los ligandos alendronato coordinados son monoaniónicos. Los grupos fosfonato no son equivalentes, la mitad de ellos, los terminales, se presentan coordinando al metal en una forma bidentada simple y la otra mitad se presentan como entidades puente. Ambos tipos de ligandos, presentan un grupo P-OH (protonado) y dos átomos de oxígeno (deprotonado) que coordinan al metal. Los fosfonatos quelantes forman una unión *cis* y presentan un grupo P=O. Dado que los fosfonato puente definen un arreglo del tipo Cu-O-P-O-Cu el grupo P=O no se presenta en el mismo. El ligando acuo se encuentra en posición *trans* al fosfonato puente, mientras que se encuentra un grupo terminal  $\text{NH}_3^+$ .

El grupo P-OH no interactúa con el metal; tampoco participa en los enlaces de H. De hecho, existe una extensa red de enlaces de hidrógeno intra e intermolecular entre las unidades moleculares, las cuales incluyen ambas especies de agua, tanto coordinada (acuo) como de cristalización (hidrato).

#### *Estructura cristalina de $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ y $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$*

Por evaporación lenta durante 48 horas, a temperatura ambiente, de una solución acuosa del complejo se obtuvieron monocristales adecuados de los complejos de  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  y  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  para la recolección de datos por difracción de rayos X.

La Tabla 10 resume los datos de ambos cristales, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento. Las figuras 17 y 18 muestran una representación de las moléculas con la numeración asignada a los átomos principales (a excepción de los H) y los elipsoides vibracionales al 50% de probabilidad.

Fórmula empírica	C <sub>6</sub> H <sub>24</sub> CoN <sub>2</sub> O <sub>16</sub> P <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> NiO <sub>16</sub> P <sub>4</sub>
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo especial	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>
Temperatura (K)	125(2)	125(2)
Longitud de Onda (Å)	0,71073	0,71073
Dimensiones de la celda unidad <sup>a)</sup>		
a (Å)	7,350(6)	7,338(2)
b (Å)	10,851(9)	10,831(4)
c (Å)	10,908(9)	10,907(4)
β(°)	94,407(11)	94,356(4)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	867,3(13)	864,4(5)
Unidades de fórmula por celda unidad/Z	2	2
Densidad calculada (mg/mm <sup>3</sup> )	2,156	2,163
Coefficiente de absorción μ (mm <sup>-1</sup> )	1,451	1,586
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,21 x 0,07 x 0,04	0,15 x 0,14 x 0,05
Color/forma del cristal	Rosado/aguja	Rosado/cuadrado
Rango de θ para recolección de datos	2,65 a 22,21°	2,65 a 28,28°
Rangos de índices de Miller	-7, 7/-11, 11/-11, 11	-9, 9/-14, 14/-14, 14
Reflexiones recolectadas/independientes	6487/1097/0,0669	11 028/2150/0,0446
Máx. y mín. de transmitancia	0,94 y 0,75	0,92/0,80
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>	
Pesos, w	[W= 1/s <sup>2</sup> (Fo <sup>2</sup> ) + (0,0306 P) <sup>2</sup> + 0,4761P, P= (Fo <sup>2</sup> + 2Fc <sup>2</sup> )/3 P=[Max(F <sub>o</sub> <sup>2</sup> ,0)+2F <sub>c</sub> <sup>2</sup> ]/3]	
Datos de refinamiento/parámetros	887/113	1773/118
Bondad del ajuste en F <sup>2</sup>	1,190	1,212

Índices R finales, Rw [1>2σ(I)]<sup>b</sup>

R1=0,0399, wR2=0,1096

R1=0,0397, wR2=0,1143

<sup>a</sup>) Refinamiento de mínimos cuadrados para los parámetros angulares de 19487 reflexiones en el rango 2,44<θ<26,00°.

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

Tabla 10: Datos de resolución de la estructura de [Co<sup>II</sup>(Pam)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] y [Ni<sup>II</sup>(Pam)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] mediante difracción de rayos X.

En la Tabla 11 se muestran algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados. Los resultados cristalográficos completos (lista completa de ángulos y distancias de enlace, parámetros atómicos de anisotropía térmica, coordenadas de los átomos de hidrógeno, factores de amplitud estructural calculados y observados) se incluyen en el Anexo I, y también se encuentran disponibles en el Cambridge CDC, CCDC 799812 y 799813.

<i>Distancias de enlace (Å)</i>		<i>Ángulos de enlace (°)</i>	
Co-O7/Co-O7'	2,133(5)/2,133(5)	O4-Co-O7/O4-Co-O7'	87,1(2)/92,9(2)
Co-O1/Co-O1'	2,128(4)/2,128(4)	O7-Co-O1/O7-Co-O1'	90,0(2)/90,0(2)
Co-O4/Co-O4'	2,056(4)/2,056(4)	O1-Co-O4/O1-Co-O4'	87,1(2)/92,9(2)
		O1-Co-O1'/O4-Co-O4'/O7-Co-O7'	180/180/180
Ni1-O3/Ni1-O3'	2,082(2)/2,082(2)	O1-Ni-O2'/O1-Ni-O2	86,74(8)/93,26(9)
Ni1-O2/Ni1-O2'	2,110(2)/2,110(2)	O1-Ni-O3'/O1-Ni-O3	88,03(9)/91,97(9)
Ni1-O1/Ni1-O1'	2,029(2)/2,029(2)	O2-Ni-O3/O2-Ni-O3	89,98(9)/90,02(9)

O1-Ni-O1'/O2- 180/180/180  
Ni-O2'/O3-Ni-  
O3'

---

Tabla 11: Algunas distancias y algunos ángulos de enlace seleccionados para  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  y  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

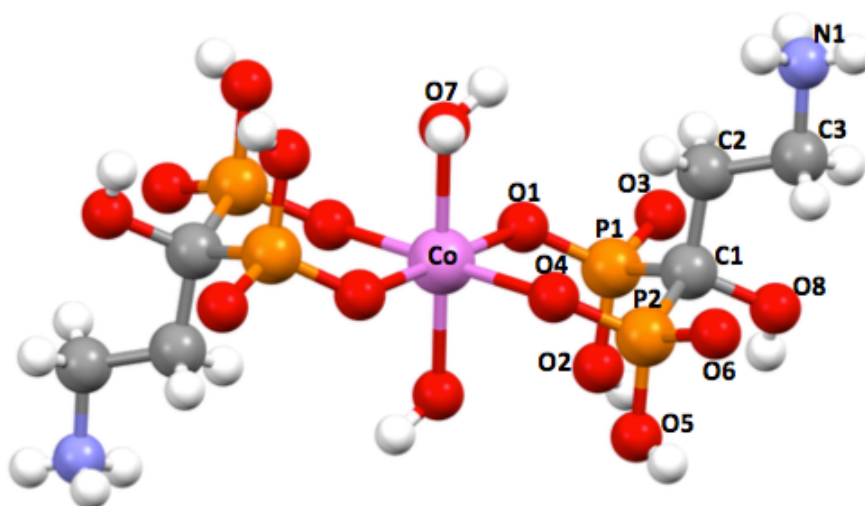


Figura 17: Representación de la estructura molecular de  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

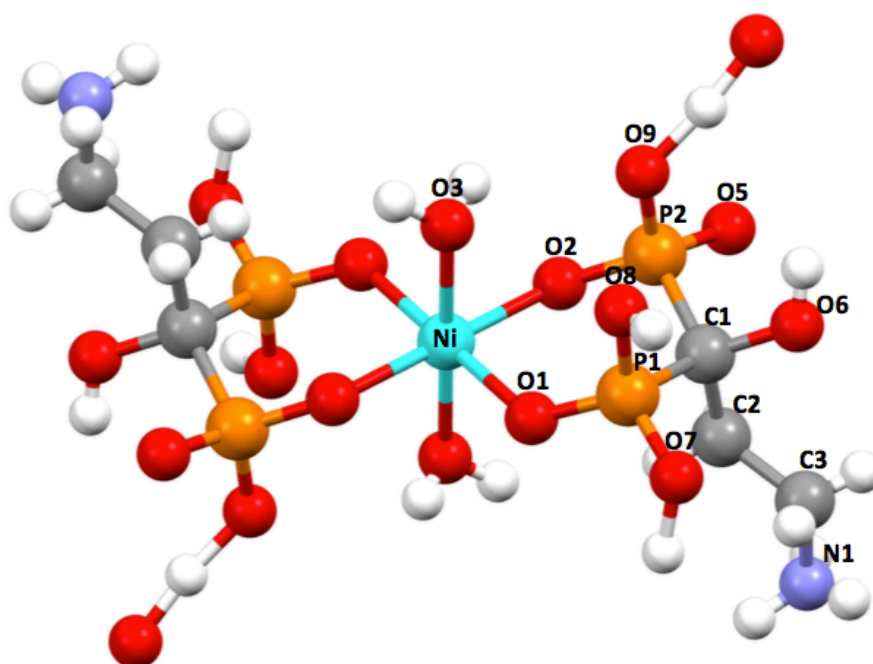


Figura 18: Representación de la estructura molecular de  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

Como se puede observar en ambas figuras, el estudio de difracción de rayos X muestra que para ambos compuestos de pamidronato se presentan esferas de coordinación muy similares. Además, en ambos casos se encontró al centro metálico ubicándose en un centro de inversión, determinando de esa manera, que estos complejos son centrosimétricos.

En ambos complejos se observan dos ligandos que coordinan de forma bidentada al centro metálico a través de dos átomos de oxígeno quedando así, los dos pamidronato en posición *trans*; dos moléculas de agua completan la esfera de coordinación octaédrica. Ambos átomos de oxígeno de los grupos fosfonato coordinantes se encuentran deprotonados mientras que el nitrógeno de la amina se encuentra protonado, resultando en una carga neta de -1 para cada ligando pamidronato.

En el complejo de Ni, el anillo quelato de pamidronato presenta distancias de enlace de Ni-O1 y Ni-O2 que son significativamente diferentes [2,029(2) Å y 2,110(2) Å respectivamente]; la distancia de enlace Ni-O (del agua) resulta en un valor intermedio [Ni-O3=2,082(2) Å]. En el complejo de CoPam, la asimetría del ligando se confirma [Co-O4=2,056(4), Co-O1=2,128(4)] pero el enlace Co-O (del agua) [Co-O7=2,133(5) Å] es equivalente al de mayor longitud entre los enlaces Co-O (del pam).

El ángulo de mordida en los complejos de Co y Ni con pamidronato son similares [92,9(1)° y 93,26(8)° respectivamente]; estos ángulos son ligeramente mayores a los encontrados para las especies de Cu-alendronato [91,3(1)°]. En conclusión, la esfera de coordinación del cobalto en el complejo de pamidronato se presenta expandida en comparación con la de su análogo de níquel. En ambos complejos se presenta una extensa red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares.

#### **4.3.2.1.5 ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO PARA LOS COMPLEJOS MAle**

Como se mencionó anteriormente, los ácidos bisfosfónicos son buenos agentes quelantes de cationes divalentes (M) [28]. En particular para el alendronato, de acuerdo a la Base de Datos de Estructuras Cristalográficas de Cambridge (CCSD), solamente algunos compuestos de coordinación han sido reportados. Entre ellos se



puede distinguir dos tipos de estructuras: bis ( $\mu_2$  -4-amonio-1-hidroxitiliden-1,1-bisfosfonato)-diacua-bis(4-amonio-1-hidroxitiliden-1,1-bisfosfonato)-di-M(II)dihidrato (M= Co y Zn), y caten-(4-amino-1-hidroxitiliden-1,1-bisfosfonato)-M monohidrato (M= Mn y Cd) [27,28,42].

En este sentido, otros compuestos de coordinación de M-alendronato obtenidos podrían cristalizar en una de estas dos estructuras generales. El análisis de los resultados muestra que estos compuestos presentan un patrón de difracción de rayos X en polvo muy similar. Luego de la rutina de indexado de picos, involucrando a veinte señales en todos los casos, se determinó que todas las estructuras presentan el grupo espacial monoclinico  $P2_1/c$ ; con parámetros estructurales muy similares al análogo  $C_{16}H_{52}CO_2N_4O_{30}P_8 \cdot 2H_2O$  (ver Tabla 12).

Estructura	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\beta$ (°)
CuAle (Rietveld)	12,617(1)	13,474(1)	12,533(1)	111,01(1)
CuAle	12,623(3)	13,467(2)	12,529(2)	110,95(1)
MnAle	12,698(2)	13,691(4)	12,446(3)	109,81(2)
CoAle	12,579(3)	13,601(3)	12,429(2)	109,92(1)
NiAle	12,509(1)	13,537(2)	12,509(2)	109,542(2)

Tabla 12: Parámetros de celda refinados para todos los compuestos en el grupo espacial  $P2_1/c$ .

Este compuesto de cobalto, presenta los siguientes parámetros de celda:  $a= 12,556(8)$  Å,  $b= 13,501(5)$  Å,  $c= 12,423(5)$  Å,  $\alpha= 90,00^\circ$ ,  $\beta= 109,92(8)^\circ$ ,  $\gamma= 90,00^\circ$ . Como ya se ha descrito, es un complejo dinuclear, con un entorno pseudo-octaédrico alrededor del centro metálico, formado por el ligando alendronato y completado por dos moléculas de agua. En esta estructura, existen dos grupos de ligandos fosfonatos que adoptan o bien una disposición en la coordinación de quelato simple o de quelato puente. Ambos grupos se encuentran deprotonados, aportando un grupo dianiónico bidentado, donde cada fosfonato se encuentra en la forma  $-P=O(O^-)(OH)$  [28].

Los estudios realizados confirman, por un lado, que se obtuvo el compuesto de fórmula  $C_{16}H_{52}Co_2N_4O_{30}P_8 \cdot 2H_2O$  previamente descrito y por otro, que se ha obtenido una nueva serie de complejos isoestructurales de fórmula  $C_{16}H_{52}M_2N_4O_{30}P_8 \cdot 2H_2O$ . Los resultados fueron confirmados, además, a partir de un ajuste del patrón completo de señales, usando el método Rietveld, mediante el EXPGUI-GSAS suite [42-44]. En la Figura 19 se exponen los resultados finales para el compuesto  $[Cu_2(Alc)_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ , en el grupo espacial  $P2_1/c$ , confirmando así, la estructura cristalina de la serie.

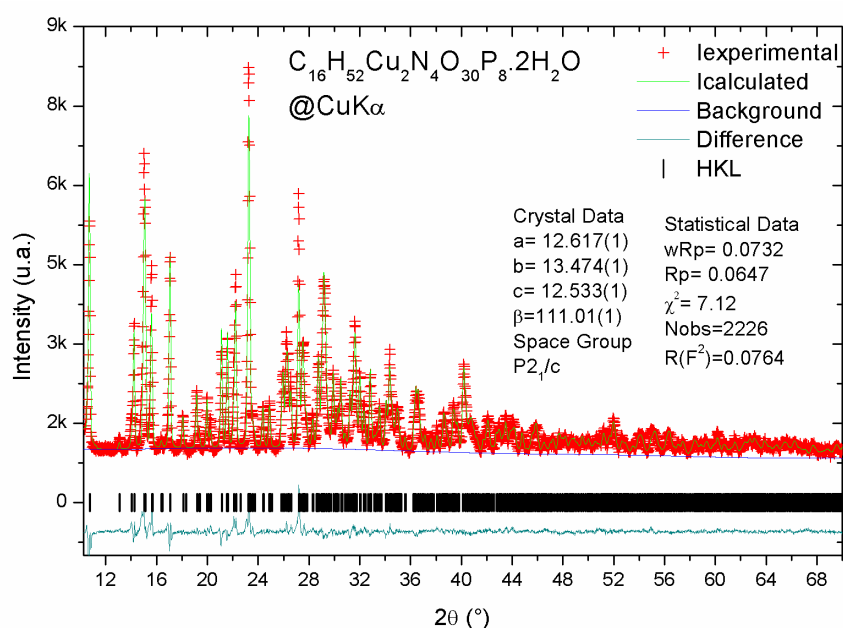


Figura 19: Patrón de señales por método Rietveld para el compuesto  $[Cu_2(Alc)_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ .

En resumen, los resultados obtenidos a partir de la difracción de rayos X permitieron concluir que todos los compuestos obtenidos de alendronato en este trabajo de Tesis son isoestructurales.

#### 4.3.2.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL EN SOLUCIÓN

##### 4.3.2.2.1 ESTUDIO DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

El objetivo de estos estudios fue determinar si en solución acuosa, al valor de pH al que se realizarán los estudios biológicos, es posible detectar la presencia de especies

complejas que incluyan el ligando activo. Para ello se estudiaron los complejos obtenidos y las sales de los iones metálicos correspondientes por voltametría cíclica utilizando un electrodo de gota colgante de mercurio (HDME) en solución de buffer fosfato, pH=7. Los resultados obtenidos para el sistema CuRis se muestra en la Figura 20. En las condiciones experimentales ensayadas, todos los compuestos metálicos de risedronato (M-Ris) mostraron un comportamiento similar. Los mismos muestran en el barrido catódico un proceso de reducción, el cual puede ser atribuido a la reducción del ión metálico central. Además, no se observan señales para el ligando libre en ese mismo rango de potenciales. Por otro lado, el comportamiento electroquímico de las sales de los metales es similar pero el potencial al que aparece la señal de reducción del metal es diferente a la que se observa para las soluciones de los complejos MRis.

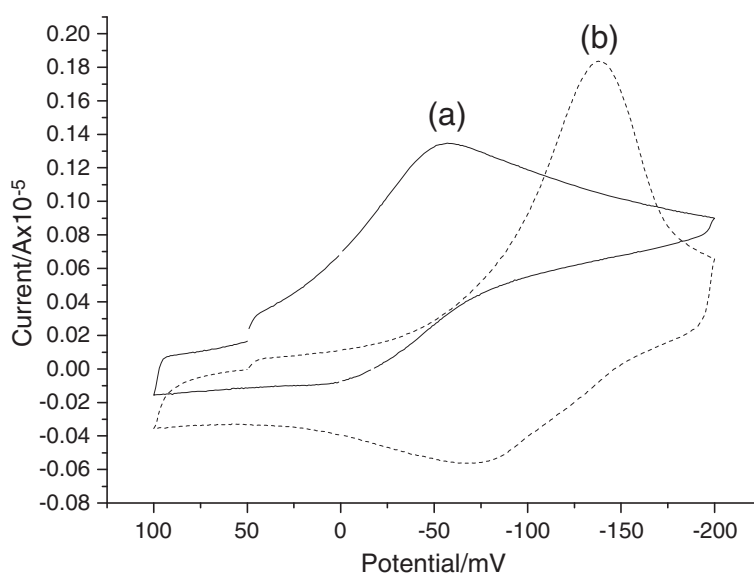


Figura 20: Voltagramas cíclicos de a)  $\text{CuCl}_2$  0,5 mM b)  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$  0,5 mM en soluciones acuosas (buffer fosfato 0,1 M, pH = 7) a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los valores de potencial obtenidos para los picos de reducción de los complejos de M-Ris y de las sales de sus metales correspondientes se presentan en la Tabla 13.

Compuesto	E (V)
[Mn <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ]	-0,210
MnCl <sub>2</sub>	-0,083
[Co <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ]	-0,163
CoCl <sub>2</sub>	-0,080
[Ni <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ]	-0,091
NiCl <sub>2</sub>	-0,077
[Cu <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ]	-0,138
CuCl <sub>2</sub>	-0,057

Tabla 13: Valores de potencial de reducción, en V, correspondientes a soluciones acuosas (buffer fosfato 0,1 M, pH = 7), a una velocidad de escaneo  $v = 100$  mV/s, de los complejos metálicos de risedronato y sus correspondientes sales metálicas. Los valores fueron medidos en las condiciones reportadas para los experimentos.

Los resultados obtenidos muestran que, en las condiciones del experimento, existen especies complejas metal-risedronato en solución. Además, no se observan cambios en la señal electroquímica, dentro de los cinco días necesarios para la realización de los estudios biológicos, mostrando que las especies metálicas de risedronato presentes en la solución resultan estables en este período de tiempo.

### 4.3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS

#### 4.3.3.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

##### 4.3.3.1.1 ACTIVIDAD ANTI *T. cruzi* *IN VITRO*

###### 4.3.3.1.1.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTAS Y AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *T. cruzi* Y ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS VERO

La evaluación biológica se realizó en primera instancia en la forma epimastigota de *T. cruzi*. Además, se estudió la inhibición de crecimiento de la forma amastigota, como etapa intracelular obligada en mamíferos [45,46]. Adicionalmente, se evaluó, en

ausencia de infección parasitaria, el efecto citotóxico de los complejos ensayados en las células Vero de mamífero.

Los compuestos fueron evaluados *in vitro* en la forma epimastigota del parásito (cepa Tulahuen 2) como screening primario de la actividad potencial de los mismos. A concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  los complejos obtenidos con risedronato resultaron tóxicos para la forma epimastigota del parásito siendo, la mayoría de ellos, más activos que el risedronato libre. Por otro lado, todos los complejos metálicos de alendronato y pamidronato resultaron, a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , más activos contra esta forma del parásito que sus correspondientes ligandos libres.

Basándose en estos resultados, todos los complejos fueron seleccionados para evaluar su actividad contra la forma intracelular amastigota del parásito. A partir de las curvas dosis-respuesta se determinaron las concentraciones de complejos que inhiben el 50% del crecimiento intracelular del parásito ( $\text{CI}_{50}$ ). Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 14.

Compuesto	$\text{PIC}_{50 \mu\text{M}} (\%)^{\text{a}}$ (epimastigotas)	$\text{CI}_{50} (\mu\text{M})^{\text{b}}$ (amastigotas)
NaRis	19	$55,1 \pm 5,2$
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	32	$23,2 \pm 7,1$
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	26	>50
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	24	$34,4 \pm 10,0$
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	15	$14,5 \pm 4,3$
NaAle	0	$38,3 \pm 2,3$
$[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	10	$13,9 \pm 5,7$
$[\text{Co}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	24	$26,5 \pm 9,0$
$[\text{Ni}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	19	$19,9 \pm 7,7$
$[\text{Mn}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	1	$14,3 \pm 6,2$
NaPam	0	$38,8 \pm 5,0$
$([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Pam})] \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	32	$11,2 \pm 3,3$
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	26	$11,2 \pm 3,3$

$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	24	$12,5 \pm 2,8$
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	15	$17,0 \pm 0,4$
NaIba	No realizado	>100
$\{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	No realizado	$10,4 \pm 1,6$
$\{[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	No realizado	$5,2 \pm 3,8$
$\{[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$	No realizado	$16,8 \pm 7,5$
Benznidazol	-	$2,0 \pm 0,3$

<sup>a</sup>: PIC: Porcentaje de inhibición de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* a la dosis especificada de 50  $\mu\text{M}$ . El error en estas determinaciones fue menor al 10 %.

<sup>b</sup>: Concentración de complejo capaz de inhibir el 50 % del crecimiento de amastigotas de *T. cruzi* ( $\text{Cl}_{50}$   $\mu\text{M}$ )

Tabla 14: Actividad biológica *in vitro* de los complejos metálicos con ligandos bisfosfonatos. Se incluyen para comparación valores de  $\text{Cl}_{50}$  en *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2) de los ligandos libres.

Todos los complejos de MRis, a excepción de CoRis fueron muy activos sobre la forma amastigota de *T. cruzi*, presentando valores de  $\text{Cl}_{50}$  del orden micromolar. Los complejos metálicos de risedronato presentaron valores de  $\text{Cl}_{50}$  comprendidos entre 14-23  $\mu\text{M}$  mientras que la  $\text{Cl}_{50}$  del ligando libre es de 55  $\mu\text{M}$ . El complejo de Mn resultó ser el más activo de la serie.

Para los compuestos de alendronato, los resultados también mostraron una mejora de la actividad anti *T. cruzi* como consecuencia de la coordinación metálica (excepto para CoAle que prácticamente no se modifica). En este caso, CuAle y MnAle resultaron ser los compuestos más activos contra la forma amastigota del parásito. Los valores de  $\text{Cl}_{50}$  obtenidos son del mismo orden que los de los complejos de la serie MRis.

En ambas series de complejos, MRis y MAle, se observa una clara correlación entre la naturaleza del centro metálico y la actividad biológica de los complejos, siendo los complejos de manganeso los más activos en ambas series y los de cobalto los menos activos. Como se verá a continuación, el efecto del centro metálico en la serie de pamidronato e ibandronato no presenta la misma tendencia.

Con respecto a los complejos metálicos de pamidronato, mostraron una actividad bastante similar entre sí pero, al igual que para las series de complejos MRis y MAle, los complejos fueron hasta 4 veces más activos que el ligando libre.

Los complejos MIba obtenidos resultaron también muy activos frente a la forma amastigota de *T. cruzi* a pesar de que el ligando libre no mostró actividad a las dosis ensayadas. En este caso, los valores de  $CI_{50}$  obtenidos fueron similares para todos los complejos de la serie.

Es importante destacar que para todos los complejos obtenidos, no se observó toxicidad sobre las células Vero de mamífero en concentraciones de hasta 50  $\mu M$ , lo que implicaría en buenos a moderados índices de selectividad.

En la Figura 21 se exponen los valores de  $CI_{50}$  en amastigotas de *T. cruzi* para todos los complejos y sus respectivos ligandos libres.

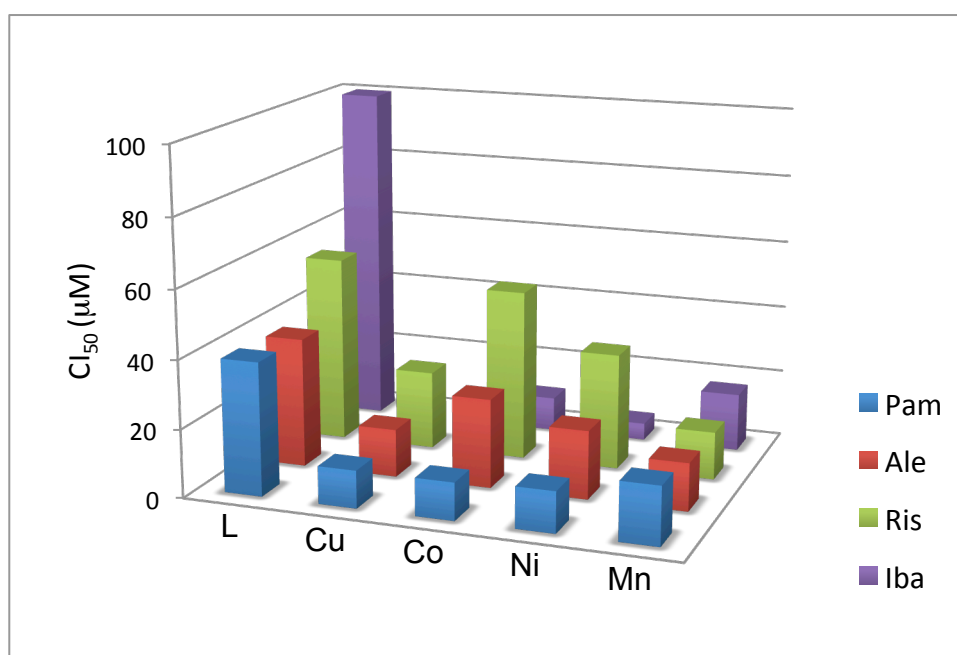


Figura 21: Gráfico comparativo de los valores de  $CI_{50}$  en amastigotas para todos los complejos metálicos obtenidos y sus respectivos ligandos libres.

### 4.3.3.2 ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN

#### 4.3.3.2.1 INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

El estudio de interacción con proteínas realizado a los complejos metálicos es particularmente relevante para el desarrollo de los metalofármacos debido a que estas biomoléculas presentan una variedad importante de opciones para coordinarse con complejos metálicos. La interacción de un fármaco con las proteínas plasmáticas podría jugar un rol fundamental en la determinación de su biodisponibilidad. Por ejemplo, las proteínas plasmáticas podrían transportarlos a los sitios de acción correspondientes y diversos ejemplos se presentan reportados en literatura, incluyendo fármacos que actualmente están siendo evaluados en fase clínica [47,48]. Por lo tanto, se estudió la interacción de los complejos metálicos obtenidos con albúmina sérica bovina (BSA, en inglés), como proteína plasmática modelo y los resultados se exponen en la Tabla 15.

Compuesto	Complejo unido a BSA (%)
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	64
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	87
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	91
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	67
$[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	94
$[\text{Co}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	54
$[\text{Ni}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	88
$[\text{Mn}^{\text{II}}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	52



$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Pam})].\text{H}_2\text{O}_n$	98
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	76
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	91
$[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	0

Tabla 15: Porcentajes de unión a BSA de los complejos obtenidos luego de 48 horas de incubación.

Los resultados mostraron, en la mayoría de los casos, que los complejos metálicos obtenidos presentan altos niveles de unión a BSA (de 52 a 98%) en las condiciones ensayadas. Este hecho podría favorecer la actividad biológica *in vivo* de los complejos, al compensar la baja solubilidad de los mismos en solución acuosa (a pH = 7, se logró alcanzar la concentración máxima de 0,5 mM) mientras las proteínas plasmáticas los transportan a sus sitios objetivo correspondientes. Se realizarán estudios posteriores para evaluar el rol real de las proteínas en el comportamiento biológico de los complejos.

#### 4.3.3.2.2 INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FARNESIL DIFOSFATO SINTASA DE *T. cruzi* ( $T_c\text{FPPS}$ ) Y HUMANA ( $H_s\text{FPPS}$ )

La inhibición selectiva de la actividad de farnesil difosfato sintasa de *T. cruzi* ( $T_c\text{FPPS}$ ) ha sido reportada como un punto clave en el mecanismo de acción fundamental en los bisfosfonatos con actividad anti *T. cruzi*.

Se estudió la habilidad de los complejos de inhibir tanto la  $T_c\text{FPPS}$ , así como la  $H_s\text{FPPS}$  y los resultados y los valores de  $\text{CI}_{50}$  para la inhibición de las mismas se exponen en la Tabla 16.

Compuesto	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> ( $T_c\text{FPPS}$ )	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup> ( $H_s\text{FPPS}$ )
NaRis	$0,027 \pm 0,009$	$0,030 \pm 0,026$
$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	$0,0260 \pm 0,0048$	$0,479 \pm 0,116$
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	>0,1	>0,1
$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{Ris})_2]$	$0,0029 \pm 0,0012$	$0,034 \pm 0,008$

[Mn <sup>II</sup> (Ris) <sub>2</sub> ]	0,0027 ± 0,0014	0,037 ± 0,004
NaAle	4,40 ± 0,48	>10
[Cu <sup>II</sup> <sub>2</sub> (Ale) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,717 ± 0,137	>10
[Co <sup>II</sup> <sub>2</sub> (Ale) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	>50	>10
[Ni <sup>II</sup> <sub>2</sub> (Ale) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,167 ± 0,020	>10
[Mn <sup>II</sup> <sub>2</sub> (Ale) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,128 ± 0,031	>10
NaPam	1,340 ± 0,013	>10
[(Cu <sup>II</sup> (Pam)]·H <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	0,095 ± 0,020	>10
[Co <sup>II</sup> (Pam) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,215 ± 0,049	>10
[Ni <sup>II</sup> (Pam) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,328 ± 0,080	>10
[Mn <sup>II</sup> (Pam) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	0,161 ± 0,089	>10
NaIba	0,19 ± 0,04	0,96 ± 0,09
{[Co <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	0,83 ± 0,16	>10
{[Ni <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	0,15 ± 0,02	11,70 ± 1,82
{[Mn <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	0,11 ± 0,02	>10

<sup>a</sup>: Concentración de complejo capaz de inhibir el 50 % de la actividad de *Tc*FPFS.

<sup>b</sup>: Concentración de complejo capaz de inhibir el 50 % de la actividad de *Hs*FPFS.

Tabla 16: Actividad biológica *in vitro* de los complejos metálicos con ligandos bisfosfonatos. Se incluyen para comparación valores de Cl<sub>50</sub> en *Hs*FPFS de los compuestos y la actividad *Tc*FPFS y *Hs*FPFS de los ligandos libres.

Los complejos de la serie MRis, MAle y MPam (a excepción de CoRis y CoAle) resultaron ser potentes inhibidores de *Tc*FPFS, donde la inhibición resultó mayor que la de sus respectivos ligandos libres. Sus valores de Cl<sub>50</sub> fueron, en la mayoría de los casos, de 10 a 40 veces menores para los complejos obtenidos en comparación con sus ligandos libres. Fue posible encontrar una correlación entre la eficacia de los complejos metálicos como inhibidores de la *Tc*FPFS y la actividad frente a la forma amastigota de *T. cruzi* observada. En el caso de los compuestos metálicos de risedronato y alendronato, el complejo de manganeso, además de ser el más activo de la serie frente a *T. cruzi*, presentó los valores más bajos de Cl<sub>50</sub> para la inhibición de *Tc*FPFS. Por otro lado, los complejos de cobalto, que fueron los menos activos en ambas series, no

presentaron capacidad de inhibición de la enzima. Es importante destacar, como ya fue mencionado, que ha sido descrito que son necesarios iones magnesio para la unión de los bisfosfonatos a la FPPS [36]. Los iones metálicos divalentes presentes en los complejos podrían ser los responsables del incremento en la capacidad de unión de los mismos a la enzima, y por ende, de la mejoría observada en la actividad inhibitoria. Tal como fue observado previamente para la actividad anti *T. cruzi*, la serie de complejos de pamidronato no presentó variaciones significativas en los valores de inhibición de la TcFPPS pero la misma fue 10 veces mayor que la del ligando libre.

Por otro lado, los complejos de la serie MIba no resultaron mejores inhibidores de la TcFPPS que el ligando libre. Por lo tanto, para esta serie de compuestos no existe una correlación entre la actividad anti *T. cruzi* y la actividad inhibitoria de la TcFPPS como la observada para el resto de las series. En la búsqueda de una explicación para el aumento de la actividad anti *T. cruzi* de esta serie de compuestos se estudió la inhibición de la actividad de la enzima solanesil difosfato sintasa de *T. cruzi* (TcSPPS). Esta enzima también ha sido descrita como un punto clave en el mecanismo de acción de los bisfosfonatos con actividad anti *T. cruzi* [49]. En este caso, el ensayo de inhibición de actividad de la TcSPPS fue realizado a los compuestos de ibandronato y los resultados presentados en la Tabla 17 determinan que los compuestos obtenidos no resultaron ser mejores inhibidores de TcSPPS en comparación con el ligando libre. Por lo tanto, el aumento de la actividad anti *T. cruzi* de la serie de compuestos de ibandronato tampoco pudo ser explicado a través de la inhibición de esta enzima.

Compuesto	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> (TcSPPS)
NaIba	1,22 ± 0,51
{[Co <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	5,38 ± 2,51
{[Ni <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	2,58 ± 0,55
{[Mn <sup>II</sup> (Iba)]·6H <sub>2</sub> O} <sub>n</sub>	4,37 ± 0,84

<sup>a</sup>: Concentración de complejo capaz de inhibir el 50 % de la actividad de TcSPPS.

Tabla 17: Resultados obtenidos a partir del estudio de inhibición de solanesil difosfato sintasa SPPS de *T. cruzi* (TcSPPS).

Todos los complejos fueron ensayados, además, como inhibidores de la actividad de la HsFPPS. Los complejos de alendronato, pamidronato e ibandronato no inhiben la actividad de la HsFPPS en las dosis ensayadas, mostrando índices de selectividad mayores a 100 en algunos casos. Los complejos metálicos de risedronato muestran inhibición de la actividad de la HsFPPS pero la inhibición de la misma es 10 veces menor que la encontrada para la TcFPPS.

Es importante destacar que los resultados obtenidos a partir del estudio de la actividad biológica *in vitro* de los compuestos, así como los índices de selectividad que los mismos presentaron frente a las enzimas parasitarias como blanco de acción ameritaron pasar a etapas avanzadas de estudios de actividad *in vivo* en modelos murinos. Si bien los primeros resultados de los ensayos realizados para el complejo de MnRis no resultaron alentadores debido, principalmente, a la baja solubilidad de los mismos, los estudios de actividad biológica *in vivo* siguen en curso.

#### 4.4 CONCLUSIONES

Se sintetizaron dieciséis complejos metálicos utilizando bisfosfonatos como ligandos bioactivos frente a *T. cruzi*. Los complejos de fórmula general  $[M^{II}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Ni}^{II}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[M^{II}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con  $M = \text{Cu}, \text{Co}, \text{Mn}$  y  $\text{Ni}$ ,  $[\text{Cu}^{II}(\text{Pam})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $[M^{II}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con  $M = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$ , y  $\{[M^{II}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$  con  $M = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$  se caracterizaron analítica, fisicoquímica y estructuralmente de forma exhaustiva incluyendo la resolución de la estructura de cinco de ellos por difracción de rayos X en monocristal.

Desde el punto de vista de la actividad biológica, para todos los complejos obtenidos (excepto CoRis y CoAle) se observó un aumento significativo en la actividad sobre la forma amastigota intracelular de *T. cruzi* como consecuencia de la complejación, presentando valores de  $\text{CI}_{50}$  en el rango micromolar.

El principal mecanismo de acción antiparasitaria de los bisfosfonatos, la inhibición de TcFPPS, permanece en la mayoría de los complejos metálicos obtenidos. Además, se observa, a excepción de la serie de complejos MIba, un aumento en los niveles de inhibición enzimática luego de la coordinación. Además, el aumento de la actividad

anti *T. cruzi* pudo ser correlacionado con la alta inhibición de esta enzima. Para los complejos MIba se estudió la inhibición de la actividad de la TcSPPS, pero estos resultados tampoco pudieron ser correlacionados con la actividad anti *T. cruzi* para esta serie de complejos.

Por otro lado, todos los complejos obtenidos que demostraron ser inhibidores selectivos de TcFPPS mostraron prácticamente ninguna, o una muy baja, inhibición de la HsFPPS.

En concordancia con estudios previos del grupo de investigación, los resultados de este trabajo de Tesis muestran que la coordinación de compuestos orgánicos con actividad anti-tripanosoma con iones metálicos puede ser una estrategia adecuada para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas contra la Tripanosomiasis americana. Sin embargo, los resultados de los estudios *in vivo* realizados para el complejo MnRis no fueron los esperados.

#### 4.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gumienna-Kontecka E., Jezierska J., Lecouvey M., Leroux Y., Kozlowski H., Bisphosphonate chelating agents. Coordination ability of 1-phenyl-1-hydroxymethylene bisphosphonate towards Cu<sup>2+</sup> ions, *J. Inorg. Biochem.* 2002, 89, 13.
- [2] Sigman L., Muriel Sánchez V., Turjanski A. G., Characterization of the farnesyl pyrophosphate synthase of Trypanosoma cruzi by homology modeling and molecular dynamics, *J. Mol. Graph. Mod.* 2006, 25, 345.
- [3] Docampo R., Moreno S. N. J., Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites, *Curr. Drug Targets.* 2001,1, 1.
- [4] Matczak-Jon E., Videnova-Adrabska V., Supramolecular chemistry and complexation abilities of diphosphonic acids, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, 249, 2458.
- [5] Garzoni R. L., Waghbi M. C., Baptista M. M., De Castro S. L., Meirelles M. L., Britto C. C., Docampo R., Oldfield E., Urbina J. A., Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas disease, *Int. J. Antimicrob. Agents* 2004, 23, 286.
- [6] Blomen L.J.M.J, Bijvoet O.L.M., Fleish H.A., Canfield R.E., Russel R.G.G., The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action, (Eds.), *Elsevier*, Amsterdam, (1995), p. 111.

- [7] Fleisch H., Russel R.G.G., Straumann F., Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis, *Nature* 1966, 215, 901.
- [8] Rodan G.A., Balena R., Bisphosphonates in the treatment of metabolic bone diseases, *Ann. Med.* 1993, 25, 373.
- [9] Russel R.G.G., The bisphosphonate odyssey. A journey from chemistry to the clinic, *Phosphorus Sulfur Silicon* 1999, 793, 144.
- [10] Rodan G.A., Martin T.J., Therapeutic approaches to bone diseases, *Science* 2000, 289, 1508.
- [11] Widler L., Jaeggi K.A., Glatt M., Muller K., Bachmann R., Bisping M., Born A.R., Cortesi R., Guiglia G., Jeker H., Klein R., Ramseier U., Schmid J., Schreiber G., Seltenmeyer Y., Green J.R., Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa), *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3721.
- [12] Russel R.G.G., Croucher P.I., Rogers M.J., Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses, *Osteoporosis 2 (Suppl.)* 1999, S66.
- [13] Rogers M.J., Frith J.C., Luckman S.P., Cox F.P., Benford H.L., Moönkkönen J., Auriola S., Chilton K.M., Russell R.G.G., Molecular mechanisms of action of bisphosphonates, *Bone* 1999, 24, 73s.
- [14] Dombrecht E. J., Cos P., Vanden Berghe D., Van Offel J. F., Schuerwegh A. J., Bridts C. H., Stevens W. J., De Clerck L. S., Selective in vitro antioxidant properties of bisphosphonates, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2004, 314, 675.
- [15] Goodman & Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 10<sup>a</sup> edición, Ed. McGraw Hill Interamericana, Méjico, (2003).
- [16] Sanders J. M., Song Y., J. Chan M. W., Zhang Y., Jennings S., Kosztowski T., Odeh S., Flessner R., Schwerdtfeger C., Kotsikorou E., Meints G. A., Gomez A. O., Gonzalez-Pacanowska D., Raker A. M., Wang H., Beek E. R. v., Papapoulos S. E., Morita C. T., Oldfield E., Pyridinium-1-yl bisphosphonates are potent inhibitors of farnesyl diphosphate synthase and bone resorption, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 2957.
- [17] Urbina A. J., Chemotherapy of Chagas disease, *Curr. Pharm. Des.* 2002, 8, 287.
- [18] Szajnman S. H., Ravaschino E. L., Docampo R., Rodriguez J. B., Synthesis and biological evaluation of 1-amino-1,1-bisphosphonates derived from fatty acids against *Trypanosoma cruzi* targeting farnesyl pyrophosphate synthase, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 2005, 15, 4685.

- [19] Montalvetti A., Bailey B. N., Martin M. B., Severin G. W., Oldfield E., Docampo R., Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 33930.
- [20] Martin M. B., Grimley J.S., Lewis J.C., Heath H.T., Bailey B.N., Kendrick H., Yardley V., Caldera A., Lira R., Urbina J. A., Moreno S. N. J., Docampo R., Croft S. L., Oldfield E., Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy, *J. Med. Chem.* 2001, 44, 909.
- [21] Urbina J. A., Moreno B., Vierkotter S., Oldfield E., Payares G., Sanoja C., Bailey B. N., Yan W., Scott D. A., Moreno S. N. J., Docampo R., *Trypanosoma cruzi* Contains Major Pyrophosphate Stores, and Its Growth *in Vitro* and *in Vivo* Is Blocked by Pyrophosphate Analogs, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 33609.
- [22] Docampo R., De Souza W., Miranda K., Rohloff P., Moreno S.N.J., Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man, *Nature Rev.- Microbiol.* 2005, 3, 251.
- [23] Kubicek V., Kotek J., Hermann P., Lukes I., Aminoalkylbis(phosphonates): Their Complexation Properties in Solution and in the Solid State, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007, 333.
- [24] Galezowska J., Gumienna-Kontecka E., Phosphonates, their complexes and bio applications: A spectrum of surprising diversity, *Coord. Chem. Rev.* 2012, 256, 105.
- [25] Matczak-Jon E., B. Kurzak, A. Kamecka, P. Kafarski, Interactions of zinc(II), magnesium(II) and calcium(II) with aminomethane-1,1-diphosphonic acids in aqueous solutions, *Polyhedron* 2002, 21, 321.
- [26] Fernandez D., Polla G., Vega D., Ellena J.A., The Zn<sup>2+</sup> salt of pamidronate: a role for water in the metal-cation binding properties of bisphosphonates, *Acta Crystallogr., Section C, Cryst. Struct. Commun.* 2004, 60, M73.
- [27] Dufau C., Benramdane M., Leroux Y., El Manouni D., Neuman A., Prange T., Silvestre J.P., Gillier H., Study on the complexation of cadmium and zinc with (4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonic acid) alendronate, *Relat. Elem.* 1995, 107, 145.
- [28] Pui Man S., Motevalli M., Gardiner S., Sullivan A., Wilson J., Structural studies on new metal derivatives of osteoporosis therapeutic

aminohidroxyalkylidenebisphosphonic acids with C<sub>4</sub> and C<sub>6</sub> aminoalkyl chains, *Polyhedron* 2006, 25, 1017.

[29] Habib H.A., Gil-Hernández B., Abu-Shandi K., Sanchiz J., Janiak C., Iron, copper and zinc ammonium-1-hidroxyalkylidene-diphosphonates with zero-, one- and two-dimensional covalent metal-ligand structures extended into three-dimensional supramolecular networks by charge-assisted hydrogen-bonding, *Polyhedron* 2010, 29, 12, 2537.

[30] Gong Y., Tang W., Hou W., Zha Z., Hu C., Transformational from a low-dimensional framework to a high-dimensional architecture based on different metal ions: syntheses, structures, and photoluminescences, *Inorg. Chem.* 2006, 45, 4987.

[31] Zhang Z.C., Zheng L.M., A layered cobalt phosphonate exhibiting ferrimagnetism and slow magnetic relaxation, *Inorg. Chem. Comm.* 2008, 11, 1243.

[32] Zhang G., Ganhal H., Uludag H., 'Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents, *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 507.

[33] Libson K., Deutsch E., Barnett B.L., Structural characterization of a technetium-99-diphosphonate complex. Implications for the chemistry of technetium-99m skeletal imaging agents, *J. Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 2476.

[34] Palazzo B., Iafisco M., Laforgia M., Margiotta N., Natile G., Bianchi C.L., D. Walsh, N. Roveri, Structural characterization of a technetium-99-diphosphonate complex. Implications for the chemistry of technetium-99m skeletal imaging agents, *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 2180.

[35] Margiotta N., Ostuni R., Teoli D., Morpurgo M., Realdon N., Palazzo B., Natile G., Bisphosphonate complexation and calcium doping in silica xerogels as a combined strategy for local and controlled release of active platinum antitumor compounds, *Dalton Trans.* 2007, 3131.

[36] Rogers M.J., Crockett J.C., Coxon F.P., Mönkkönen J., Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates, *Bone* 2011, 49, 34.

[37] Redman-Furey N., Dicks M., Bigalow-Kern A., Thomas Cambron R., Lubey G., Lester C., Vaughn D., Structural and analytical characterization of three hydrates and an anhydrate form of risedronate, *J. Pharm. Sci.* 2005, 94, 893.

[38] Juribašić M., Tušek-Božić L., Spectroscopic and DFT study of 3-quinolyl- $\alpha$ -



- aminophosphonates, *J. Mol. Struct.* 2009, 924–926, 66.
- [39] Nakamoto K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th ed. Wiley & Sons, Inc, New York, 1997.
- [40] Zhang Z.C., Bao S.S., Zheng L.M., Chin. J., Syntheses, crystal structure and luminescent properties of lanthanide diphosphonates, *Inorg. Chem.* 2007, 23, 1851.
- [41] Zhang Z.C., Gao S., Zheng L.M., Cobalt diphosphonate with a new double chain structure exhibiting field-induced magnetic transition, *Dalton Trans.* 2007, 4681.
- [42] Rietveld H.M., A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, *J. Appl. Crystallogr.* 1969, 2, 65.
- [43] Larson A.C., Von Dreele R.B., *General Structure Analysis System (GSAS)*, LAUR Report, 86-748, Los Alamos National Laboratory, Nuevo Mexico, 2000.
- [44] Toby B.H., EXPGUI, EXPGUI, a graphical user interface for GSAS, *J. Appl. Crystallogr.* 2001, 34, 210.
- [45] Arán V. J., Ochoa C., Boiani L., Buccino P., Cerecetto H., Gerpe A., González M., Montero D., Nogal J. J., Gómez-Barrio A.; Azqueta, A.; López de Ceraín, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E., Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3197.
- [46] Tyler, K. M., Engman, D. M., The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited, *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 472.
- [47] Dolman G., Deacon B., Hambley T.W., Studies of the binding of a series of platinum (IV) complexes to plasma proteins, *J. Inorg. Biochem.* 2002, 88, 260.
- [48] Espósito B.P., Najjar R., Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin, *Coord. Chem. Rev.* 2002, 232, 137.
- [49] Ferella M., Montalvetti A., Rohloff P., Miranda K., Fang J., Reina S., Kawamukai M., Búa J., Nilsson D., Pravia C., Katzin A., Cassera M.B., Åslund L., Andersson B., Docampo R., Bontempi E.J., Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin, *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 39339.

# Capítulo 5

# Complejos rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbonas derivadas de 5-nitrofurano

## 5.1 Generalidades

- 5.1.1 Potencialidad del rutenio para el desarrollo de agentes antiparasitarios
- 5.1.2 Tiosemicarbonas
- 5.1.3 Antecedentes de complejos rutenio-areno con tiosemicarbonas
- 5.1.4 Complejos metálicos con tiosemicarbonas derivadas de 5-nitrofurano

## 5.2 Resultados y discusión

- 5.2.1 Discusión general de los procedimientos ensayados
- 5.2.2 Caracterización estructural y fisicoquímica
  - 5.2.2.1 Caracterización estructural al estado sólido
    - 5.2.2.1.1 Análisis elemental de elementos livianos
    - 5.2.2.1.2 Estudio de espectroscopía infrarroja
    - 5.2.2.1.3 Resolución de estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X en monocristal
  - 5.2.2.2 Caracterización estructural en solución
    - 5.2.2.2.1 Espectroscopía ESI-MS
    - 5.2.2.2.2 Estudio de RMN
    - 5.2.2.2.3 Estudio de estabilidad
    - 5.2.2.2.4 Estudio de voltametría cíclica
- 5.2.3 Actividad biológica de los complejos obtenidos
  - 5.2.3.1 Estudios *in vitro*
    - 5.2.3.1.1 Actividad anti *T. cruzi*
      - 5.2.3.1.1.1 Inhibición del crecimiento de las formas epimastigota y tripomastigota.
    - 5.2.3.1.2 Actividad anti *T. brucei*
    - 5.2.3.1.3 Citotoxicidad inespecífica en macrófagos.
- 5.2.4 Estudio de mecanismo de acción
  - 5.2.4.1 Producción de radicales libres en *T. cruzi*
  - 5.2.4.2 Inhibición de la cruzipaína
  - 5.2.4.3 Estudio de interacción con ADN
    - 5.2.4.3.1 Resultados de AFM
    - 5.2.4.3.2 Resultado de las medidas de viscosidad

5.2.4.4 Estudio de unión a proteínas

5.2.4.4.1 Albúmina sérica humana

5.2.5 Estudio de actividad antitumoral

5.3 Conclusiones

5.4 Bibliografía

## 5.1 GENERALIDADES

Como ya se ha descrito, la hipótesis general de este trabajo de Tesis implica la síntesis y caracterización de compuestos metálicos con ligandos que muestran actividad contra *Trypanosoma cruzi* y su estudio tanto químico-estructural como biológico. En particular, este capítulo trata los estudios de síntesis, fisicoquímico-estructurales, biológicos y de mecanismo de acción realizados a los compuestos rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro-2-furaldehído, HL (siendo HL la forma neutra, y L la forma monoaniónica deprotonada) (Figura 1).

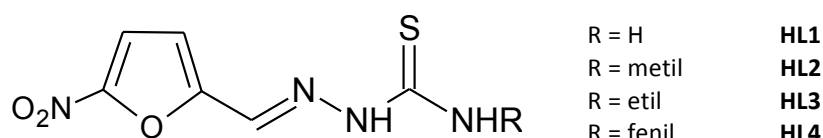


Figura 1: Tiosemicarbazonas bioactivas derivadas de 5-nitro-2-furaldehído.

### 5.1.1 POTENCIALIDAD DEL RUTENIO PARA EL DESARROLLO DE AGENTES ANTIPARASITARIOS

Los compuestos de rutenio han sido ampliamente explorados con respecto a sus usos potenciales en medicina como agentes quimioterápicos contra diferentes enfermedades. En particular, han demostrado su mayor potencial como candidatos para fármacos antitumorales, siendo alternativas promisorias a los complejos de platino. El interés en el rutenio se basa en el hecho de que muestra propiedades químicas y biológicas que hacen que sus compuestos sean particularmente adecuados para el desarrollo de potenciales fármacos [1-7]. Estas propiedades relevantes se describen a continuación. Algunas de ellas se relacionan con la potencial actividad antitumoral de los complejos, sin embargo, como se explica más adelante, podrían ser de interés también en el desarrollo de agentes antiparasitarios.

- Ambos estados de oxidación del rutenio biológicamente relevantes (II y III) muestran una gran versatilidad de coordinación, mostrando mayor preferencia

- por donores como nitrógeno o azufre, los cuales se presentan comúnmente en biomoléculas, como ADN, proteínas celulares y séricas, así como enzimas.
- Los compuestos de rutenio usualmente exhiben potenciales Ru(III)/Ru(II) comprendidos en el rango de potenciales redox compatibles a nivel biológico, permitiendo la biorreducción de los compuestos de Ru(III) por diferentes bioligandos y enzimas celulares.
  - En el medio biológico los agentes reductores como glutatión, ascorbato y algunas proteínas son capaces de reducir Ru(III) a Ru(II). Por otro lado, el oxígeno molecular y la citocromo oxidasa son capaces de revertir el proceso, oxidando Ru(II) a Ru(III). Los potenciales de reducción pueden, de esta manera, ser explorados para poder obtener profármacos de rutenio que podrían ser activados en los tejidos tumorales hipóxicos mediante la biorreducción, otorgándoles selectividad mediante la reoxidación en células sanas normalmente oxigenadas [8].
  - Ru(II) y Ru(III) forman compuestos hexacoordinados, de geometría octaédrica, permitiendo la interconversión *in vivo* entre ambos estados de oxidación sin requerimientos extra de energía para los rearrreglos estructurales. Esta geometría octaédrica ofrece mayores posibilidades de coordinación a los blancos moleculares relevantes que el centro de platino(II) tetracoordinado.
  - Estos sitios de coordinación adicionales podrían ser usados para permitir un ajuste fino de las propiedades farmacológicas relevantes de los compuestos, por ejemplo, introduciendo coligandos adecuados.
  - Los compuestos de rutenio muestran baja toxicidad en humanos, probablemente debido a las similitudes metabólicas que presenta el rutenio con el hierro. En particular, al simular su comportamiento, logra unirse a proteínas séricas (como albúmina y transferrina) que contribuyen a disminuir la toxicidad de los compuestos de rutenio y a transportarlos selectivamente a las células tumorales. Las células tumorales presentan mayores demandas de hierro que las células normales, y de esa manera, presentan un mayor número de receptores de transferrina en la superficie celular lo que lleva a una mayor selectividad por los compuestos de rutenio [9].

Los caminos metabólicos de las células altamente proliferativas, como las células tumorales o parasitarias, presentan similitudes que permiten establecer una correlación entre las actividades antitumorales y antiparasitarias. Muchos agentes antitumorales orgánicos e inorgánicos han presentado, a su vez, actividad antiparasitaria y viceversa. El cisplatino y la cloroquina son claros ejemplos de ello [10-15].

Por otro lado, así como para las células tumorales altamente proliferativas, los parásitos muestran mayores demandas de hierro (en comparación con las células huésped normales) para poder llevar a cabo sus funciones biológicas esenciales. La adquisición efectiva de hierro es un pre-requisito para la supervivencia de todos los organismos, incluyendo el parásito protozoario de interés en este Trabajo de Tesis. Por ejemplo, ha sido previamente demostrado que la forma amastigota de *T. cruzi* posee receptores para transferrina humana (principal proteína transportadora de hierro en plasma). Se ha planteado que el hierro que es esencial para el crecimiento intracelular de las amastigotas es adquirido por las mismas a través de endocitosis mediada por receptores de transferrina [16]. De esta manera, al simular el metabolismo del hierro se facilitaría la internalización de los compuestos de rutenio por parte del parásito. En este mismo sentido, el ingreso de ligandos orgánicos antiparasitarios coordinados a rutenio podría actuar como un “caballo de Troya”, que permitiría sortear los mecanismos de resistencia del parásito a estos compuestos orgánicos bioactivos logrando el ingreso al mismo.

Dentro de los compuestos de rutenio que han demostrado actividad antiparasitaria, con posterioridad al inicio de este Trabajo de tesis, aquellos que contienen el fragmento *p*-cimeno presentaron resultados promisorios. Estos complejos se obtuvieron a partir del precursor  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\textit{p}\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ . En la Figura 2 se muestra la estructura genérica del fragmento Ru-*p*-cimeno, donde X, Y y Z son los átomos donores de ligandos monodentados o quelantes que ocupan los tres sitios de coordinación restantes adoptando la forma conocida como “taburete” de piano. La naturaleza de estos ligandos juega un rol crucial en la actividad biológica del complejo formado [17].

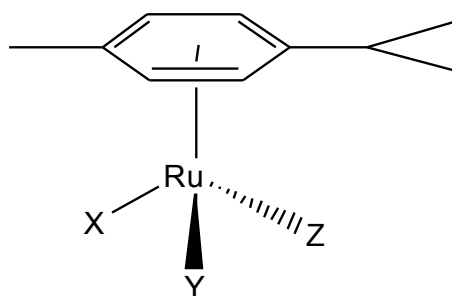


Figura 2: Estructura genérica de los complejos Ru-*p*-cimeno con X, Y, Z como posibles ligandos monodentados o quelantes.

Tal como fue mencionado en el Capítulo 1, la línea de investigación llevada a cabo por Sánchez-Delgado y colaboradores sobre complejos de rutenio y clotrimazol (CTZ), permitió determinar que de todos los complejos desarrollados por ese grupo el complejo conteniendo al centro organometálico Ru-*p*-cimeno mostró los mejores resultados antiparasitarios. Este complejo,  $[Ru^{II}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})Cl_2(CTZ)]$ , resultó 58 veces más activo contra *T. cruzi* que el CTZ libre, mostrando valores de  $DL_{50}$  en el rango submicromolar. Además, mostró excelentes índices de selectividad, mayores que 500 y 75 para *L. major* y *T. cruzi*, respectivamente, lo que lo convierte en un buen candidato para el estudio de su mecanismo de acción y realización de estudios *in vivo*. [18].

Es importante destacar que la síntesis de complejos de rutenio semi-sandwich conteniendo el fragmento areno ha tomado un interés creciente debido a sus potenciales aplicaciones a nivel de síntesis química [19,20], así como de terapéutica [21]. Los antecedentes reportados [17] llevan a suponer que la presencia del fragmento lipofílico *p*-cimeno facilitaría la difusión de los complejos a través de la membrana celular lipofílica, mejorando así, las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los complejos que lo contienen.

### 5.1.2 TIOSEMICARBAZONAS

Las tiosemicarbazonas (Figura 3) son compuestos orgánicos que presentan una amplia variedad de bioactividades, y sus aplicaciones químicas y biológicas han sido extensamente investigadas.



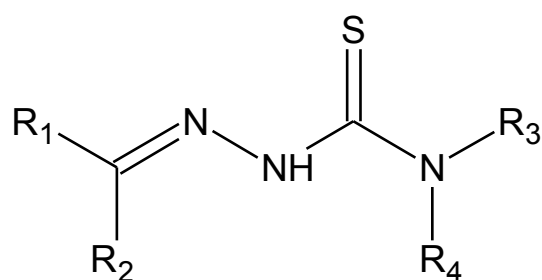


Figura 3: Estructura general de las tiosemicarbazonas.  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser grupos alquilo o arilo y  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser grupos alquilo o arilo o hidrógeno.

La literatura investigada contiene revisiones de muchos aspectos de la química de estos compuestos, como los métodos preparativos, estereoquímica, coordinación en complejos metálicos, características espectrales y estructuras cristalinas [22-26].

Las tiosemicarbazonas tienen un amplio espectro de propiedades farmacológicas y representan una clase importante de compuestos cuyas propiedades han sido intensamente estudiadas en la Química Medicinal, y en particular, en la Química Inorgánica Medicinal, debido a su capacidad quelante y al papel que juega la coordinación a metales en su mecanismo de acción farmacológica. Las tiosemicarbazonas muestran actividad como agentes antitumorales, antivirales, antifúngicos, antibacterianos y antimaláricos, entre otras. Sin embargo, la actividad antitumoral ha sido la más estudiada. Como ejemplo relevante, la Tiaprina (3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona) ha ingresado a fases clínicas como potencial antileucémico hace algunos años [27,28]. Este fármaco actúa como un quelante del hierro y como potente inhibidor de la ribonucleótido reductasa, enzima que cataliza la conversión de ribonucleótidos en desoxiribonucleótidos requerida para la biosíntesis del ADN y, por lo tanto, indispensable para la supervivencia, crecimiento y proliferación celular [29]. Además, algunos complejos metálicos de estos ligandos tienen la capacidad de mimetizar la acción de ciertas enzimas [30]. Por ejemplo, algunos complejos de cobre (II) imitan la acción de la superóxido dismutasa [31]. También, los complejos de tiosemicarbazonas, particularmente los de Cu, Tc y Re, tienen la posibilidad de utilizarse como radiofármacos, tanto con fines de diagnóstico como para radioterapia [30].

### Tiosemicarbazonas como agentes antiparasitarios

En relación a la actividad antiparasitaria, ha sido descrito que algunos derivados tiosemicarbazona exhiben una potente actividad inhibitoria de la cruzipaína así como actividad tripanosomicida contra parásitos en cultivos celulares. Como ya fue mencionado en el Capítulo 1, esta proteasa se expresa en todas las etapas del ciclo de vida del parásito y es esencial para la replicación de la forma intracelular [32]. Esta enzima está también involucrada en la alimentación del parásito a partir de las proteínas del huésped, en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y en el ingreso del parásito a las células, entre otras funciones [33-35]. Por este motivo, la cruzipaína resulta un blanco atractivo para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la Tripanosomiasis americana. En particular, para el caso de las tiosemicarbazonas, los estudios mecanísticos sugieren el ataque covalente de la Cys25 de la enzima al carbono tiocarbonílico de la tiosemicarbazona asistido por la transferencia del protón His159 al azufre tiocarbonílico (Figura 4) [36].

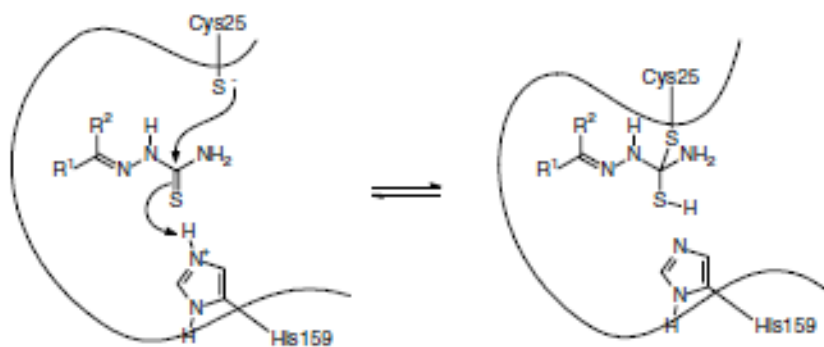


Figura 4: Mecanismo de inhibición de la cruzipaína por los derivados tiosemicarbazona.

Por otro lado, Cerecetto y col. desarrollaron en colaboración con nuestro grupo una serie de tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano (Figura 5). Estos compuestos presentan en su estructura, al grupo 5-nitrofurano, que es el grupo farmacóforo del nifurtimox. Se esperaba que estas tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano presentaran un mecanismo de acción similar al nifurtimox, generando reciclaje redox a

través de la reducción intraparasitaria del grupo nitro. Además, debido a la presencia del grupo tiosemicarbazona, podrían actuar inhibiendo la cruzipaina [36].

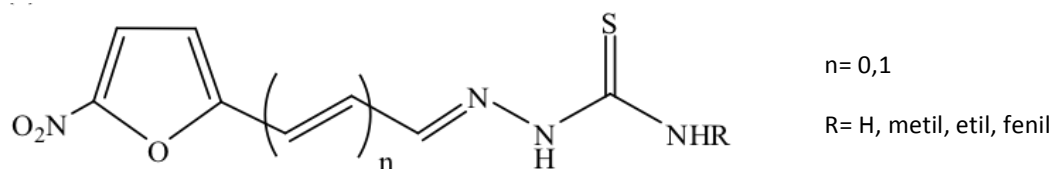


Figura 5: Tiosemicarbazonas bioactivas derivadas de 5-nitrofurano (n = 0: 5-nitrofuraldehído, n = 1: 3-(5-nitrofuril) acroleína).

Con el fin de comprobar el mecanismo propuesto, esta familia de tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano fue estudiada por voltametría cíclica para determinar el potencial de reducción del grupo nitro en el nitrofurano. Este valor es indicativo de si es posible que estos compuestos sean reducidos en los rangos de potencial existentes en el medio biológico. Estos derivados mostraron menores potenciales de reducción del grupo nitro  $E_{1/2}$  que el nifurtimox, lo que implicó la posibilidad de que desarrollaran una actividad antitripanosomal promisorio. La capacidad donador/aceptor de los sustituyentes en  $N^4$  (H, metil, etil, fenil) no pareció afectar significativamente los potenciales de reducción de los derivados [37].

Por otro lado, la capacidad de los compuestos de generar especies radicalarias en el parásito fue estudiada por EPR utilizando la técnica de "spin trapping" y se realizaron experimentos de medida del consumo de oxígeno para evaluar si los compuestos producen reciclaje redox en el parásito [37,38]. Los resultados de los estudios biológicos y los experimentos de EPR en el sistema *T. cruzi* indicaron que todos los derivados de 5-nitrofurano (incluyendo los que se estudiaron en este trabajo de Tesis, HL1-HL4, Figura 1) pueden actuar por producción de estrés oxidativo [38].

#### *Tiosemicarbazonas como ligandos*

Las tiosemicarbazonas se obtienen por condensación de un aldehído o una cetona con tiosemicarbazidas ( $H_2N-NH-C(S)-NH_2$ ), sustituidas o no. Desde el punto de vista Químico Inorgánico, son ligandos versátiles y flexibles que coordinan,

fundamentalmente, de forma bidentada, uniéndose al átomo central a través del azufre tiocarbonílico y del nitrógeno azometínico, formando complejos de adecuada estabilidad (Figura 6, I) [31,33,38-41].

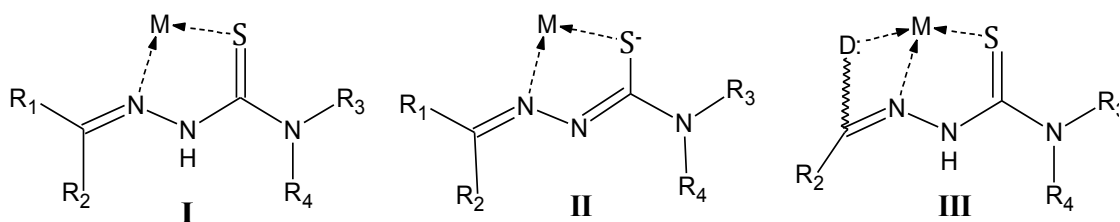


Figura 6: Modos de coordinación de las tiosemicarbazonas: **I**) bidentada, neutra, **II**) bidentada, monoaniónica, **III**) potencialmente tridentada.

La pérdida, en solución, del protón hidrazínico (N-H) da lugar a un ligando monoaniónico que coordina también en forma bidentada (Figura 6, II). Los ligandos adoptan una u otra forma de coordinación dependiendo de la naturaleza del metal y de las condiciones de preparación del complejo, aunque se han aislado complejos en los que aparecen ambas formas simultáneamente. Las posibilidades de coordinación de estos ligandos se ven incrementadas si  $R_1$  o  $R_2$  incluyen átomos donores adicionales (Figura 6, III), pudiendo comportarse como ligandos tridentados. Si estos sustituyentes poseen, además, grupos que puedan deprotonarse (fenoles, por ejemplo), se pueden generar aniones de mayor carga negativa [42]. Los modos de coordinación descritos son los más frecuentes aunque existen otros. Otras formas de coordinación menos frecuentes son, por ejemplo, monodentada (o bidentada si existe otro átomo donador en  $R_1$  o  $R_2$ ) por el nitrógeno azometínico cuando el azufre está sustituido o actuando como puente [43], monodentada por el azufre [44,45], bidentada por el azufre y el nitrógeno hidrazínico [46,47] entre otras. Se ha descrito, además, que algunas tiosemicarbazonas favorecen la formación de enlaces metal-carbono (ortometalación) [46-52].

Considerando las tiosemicarbazonas seleccionadas para este Trabajo de Tesis, si la coordinación se da, como puede esperarse, de la forma bidentada más frecuente, el residuo de 5-nitrofurano (farmacóforo responsable de la actividad antichagásica de estos compuestos) no resultaría directamente implicado en la coordinación, asegurando, en un principio, la permanencia de la actividad biológica.

### 5.1.3 ANTECEDENTES DE COMPLEJOS RUTENIO-ARENO CON TIOSEMICARBAZONAS

El número de complejos rutenio-areno con ligandos tiosemicarbazona que ha sido descrito ha crecido en la última década, pero el desarrollo de la química de este centro de rutenio con este tipo de ligandos es todavía escaso [23, 53-56].

Dentro de estos antecedentes se puede citar el trabajo de Beckford y col. donde describen el desarrollo de complejos Ru-areno semi-sandwich [57]. Este grupo sintetizó una serie de complejos (1-3) de fórmula general  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{R}(\text{A-TSC})\text{Cl}]\text{X}$  con ATSC = tiosemicarbazona de antraldehído,  $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$  y  $\text{C}_6\text{H}_5$  y  $\text{X} = \text{Cl}^-$  o  $\text{PF}_6^-$  (Figura 7). El complejo  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{R}(\text{MeATSC})\text{Cl}]\text{Cl}$  representó el primer complejo Ru-areno semi-sandwich con tiosemicarbazona en ser estructuralmente caracterizado. Se evaluó la actividad citotóxica de los complejos obtenidos y éstos presentaron buenos perfiles contra las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) así como HCT-116 y HT-29 (carcinoma colorrectal).

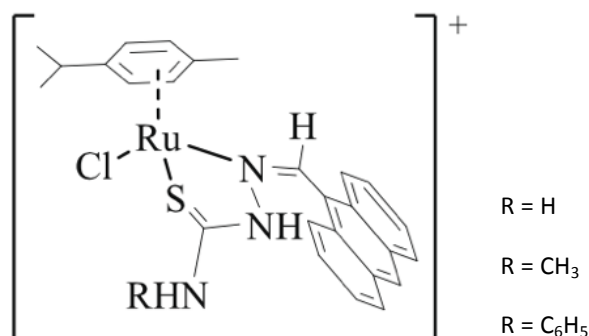


Figura 7: Representación de la especie catiónica de los complejos 1-3.

En trabajos posteriores, este mismo grupo describió la síntesis y caracterización de otros complejos Ru-areno semi-sandwich, entre ellos, complejos Ru-*p*-cimeno con una serie de tiosemicarbazonas derivadas de piperonal [58]. Dentro de esta línea, se describe a modo de ejemplo, los complejos  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{pPhTSC})\text{Cl}]\text{Cl}$  y  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{pEtTSC})\text{Cl}]\text{Cl}$  con pPhTSC = piperonal-*N*(4)-feniltiosemicarbazona. Ambos presentan una estructura como la ya descrita, tipo “*taburete de piano*” con el ligando tiosemicarbazona coordinando de forma bidentada, a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico (Figura 8).

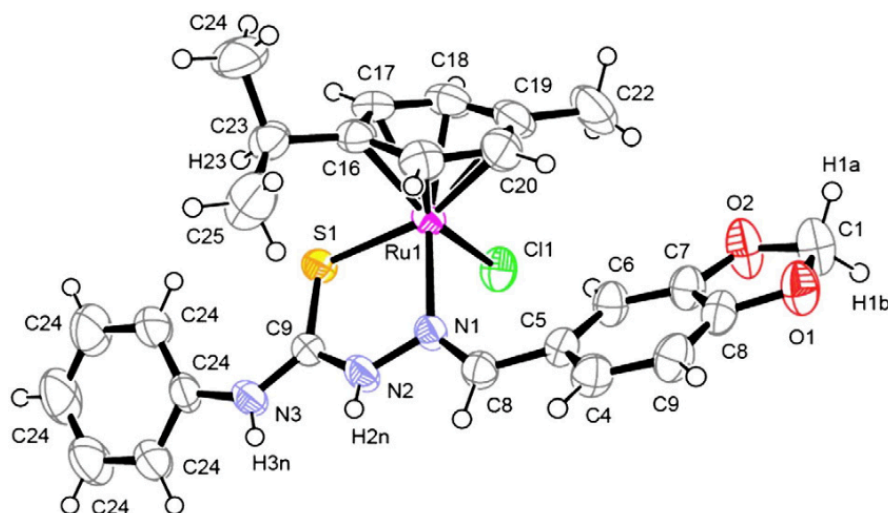


Figura 8: Representación ORTEP con las elipsoides al 50% de probabilidad del catión  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(p\text{PhTSC})\text{Cl}]^+$ . Los átomos de hidrógeno y el contraión  $\text{Cl}^-$  fueron omitidos para mayor claridad.

Además, se estudió la unión a la albúmina, así como la interacción con ADN y la actividad anticancerígena de los mismos. Los complejos interactúan con ADN y se unen fuertemente a la proteína plasmática. Los resultados obtenidos de la actividad antitumoral (frente a las líneas celulares tumorales humanas de cáncer colorrectal, HCT-116 y Caco-2) muestran valores discretos y buena selectividad (citotoxicidad notoriamente menor en células no cancerígenas en comparación con las células tumorales).

Este mismo grupo continuó la línea de complejos Ru-areno con tiosemicarbazonas describiendo, en este caso, la síntesis mediante microondas de un par de complejos Ru-areno de fórmula  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{TSC})\text{Cl}]\text{PF}_6$  con TSC derivadas de 9-antraldehído = 2-(antracén-9-ilmetilén)-hidrazincarbotoamida y 2-(antracén-9-ilmetilén)-*N*-etilhidrazincarbotoamida (Figura 9) [59].

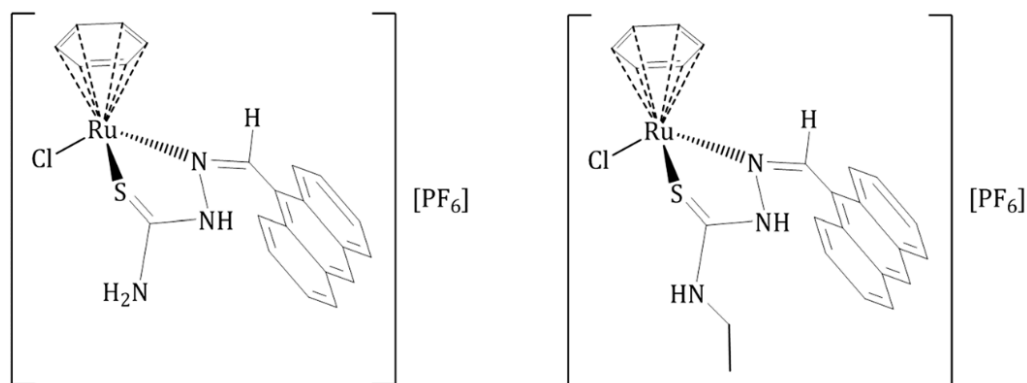


Figura 9: Representación de la especie catiónica de los complejos con TSC derivadas de 9-antraldehído.

Se estudió la actividad antitumoral en las líneas celulares tumorales humanas Caco-2 y HCT-116 (cáncer colorrectal) y la actividad antimicrobiana de los mismos. Estos complejos no presentaron actividad antibacteriana contra los patógenos gram(+) *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* y gram(-) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*. Sin embargo, sí presentaron resultados promisorios como agentes antitumorales mostrando resultados tan efectivos como el fármaco de referencia, etopósido.

Por otro lado, W. Su et al. publicaron la síntesis y caracterización de una nueva serie de compuestos Ru(II)-areno con tiosemicarbazonas [60]. En particular, se describe la estructura resulta por difracción de rayos X de dos complejos  $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})(L^{\prime})\text{Cl}]\text{Cl}$ , donde  $L^{\prime} = L1$  y  $L2$ , siendo  $L1 = N^4$ -feniltiosemicarbazona derivada de 4-fluorobenzaldehído y  $L2 =$  tiosemicarbazona derivada de benzaldehído. En ambos, el Ru adopta la geometría de “taburete de piano”, en la cual el centro metálico se encuentra coordinado al fragmento *p*-cimeno, un cloro y un ligando quelante N-S. Además, se pueden identificar las mismas interacciones de T-stacking (borde-cara) e interacciones de  $\pi$ -stacking en comparación con las interacciones no enlazantes entre el anillo areno y el anillo aromático. En la Figura 10 se puede observar la estructura del complejo Ru-*p*-cimeno-L2 [19].

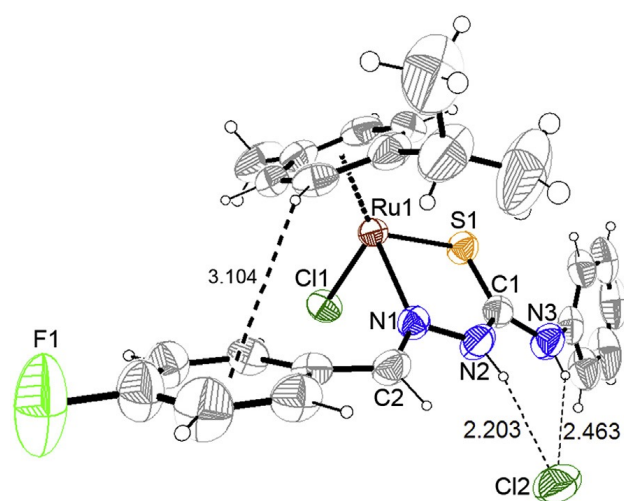


Figura 10: Representación ORTEP del complejo  $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})(L2)\text{Cl}]\text{Cl}$  donde las elipsoides térmicas se representan al 50% de probabilidad.

Este mismo grupo describe también una serie de compuestos Ru(II)-areno semi-sandwich de fórmula,  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{R-BzTSC})\text{Cl}]\text{Cl}$ , con BzTSC = tiosemicarbazona derivada de benzaldehído y R = H, CH<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Figura 11) [61].

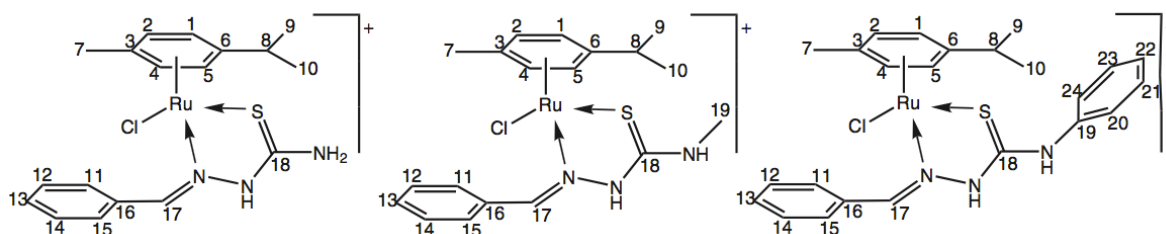


Figura 11: Representación de la estructura de los complejos.

Para los tres complejos, la coordinación del ligando tiosemicarbazona se presenta de la misma forma, a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico y los demás sitios de coordinación se encuentran ocupados por un átomo de Cl y el fragmento *p*-cimeno. Por otro lado, se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* de estos complejos contra líneas celulares tumorales humanas (carcinoma nasofaríngeo (CNE), carcinoma de pulmón (H292), carcinoma de mama (SKBR3) y carcinoma de ovario (Hey 1-B)). El complejo con el sustituyente fenilo, mostró ser un inhibidor eficiente y el más efectivo de los tres.

Continuando con los antecedentes descritos por W. Sun y colaboradores también describieron una serie de compuestos de la misma fórmula,  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{TSC})\text{Cl}]^{+/0}$ , con *N*<sup>4</sup>-cetonas de tiosemicarbazonas [62]. La Tabla 1 muestra la fórmula de los complejos mononucleares obtenidos (1-9), así como la de sus respectivos ligandos libres.

TSC	Complejo	R1	R2	R3
L1	1	Me	Me	H
L2	2	Me	Me	Me
L3	3	Me	Me	Ph
L4	4	Ph	Me	H
L5	5	Ph	Me	Me
L6	6	Ph	Me	Ph



L7	7	Ph	Ph	H
L8	8	Ph	Ph	Me
L9	9	Ph	Ph	Ph

Tabla 1: Sustituyentes presentes en los complejos 1-9 y ligandos L1-L9 utilizados.

En todos estos casos, la coordinación del ligando tiosemicarbazona se presenta de la misma forma que para los complejos anteriormente mencionados, bidentada a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico (Figura 12). En este trabajo, también se estudió la actividad *in vitro* en líneas celulares tumorales humanas, específicamente SGC-7901 (cáncer gástrico), BEL-7404 (cáncer de hígado) y una línea no tumoral HEK-293T y se comparó con cisplatino, oxaliplatino y carboplatino como fármacos de referencia. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios demostraron que varios de los complejos Ru-areno mostraron valores de citotoxicidad  $Cl_{50}$ , similares a los de cisplatino y oxaliplatino. En comparación con los ligandos TSC, la mayoría de estos complejos presentaron una mayor citotoxicidad frente a la línea celular no cancerígena HEK-293T, indicando que estos complejos no resultaron selectivos.

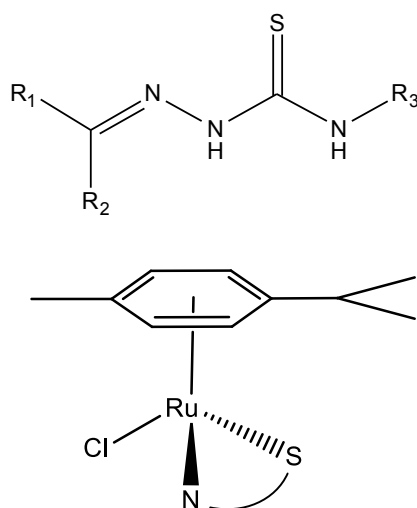


Figura 12: Representación genérica de los complejos obtenidos (R = 1-9).

M.U. Raja y col. desarrollaron una serie de complejos semi-sandwich de fórmula general  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})Cl(L)]Cl$  con diversos derivados de feniltiosemicarbazonas

[63]. Es importante destacar que la fórmula general resultó similar a los antecedentes previamente descritos (Figura 13); presentaron la estructura de “*taburete de piano*” con una geometría pseudo-octaédrica donde los ligandos tiosemicarbazona presentaron el mismo modo de coordinación ya expuesto en los casos anteriores (Figura 14).

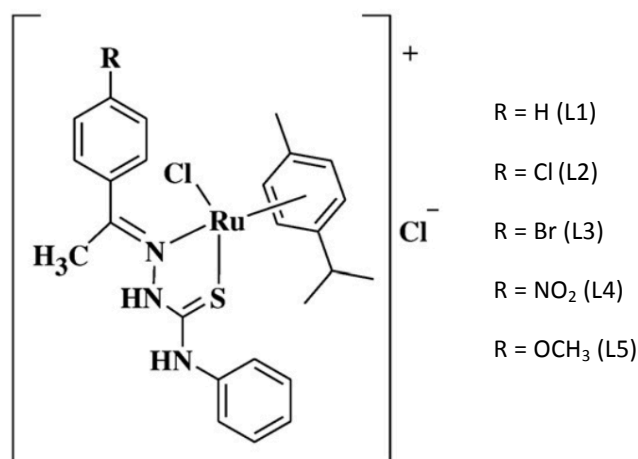


Figura 13: Representación de la especie catiónica de los complejos obtenidos.

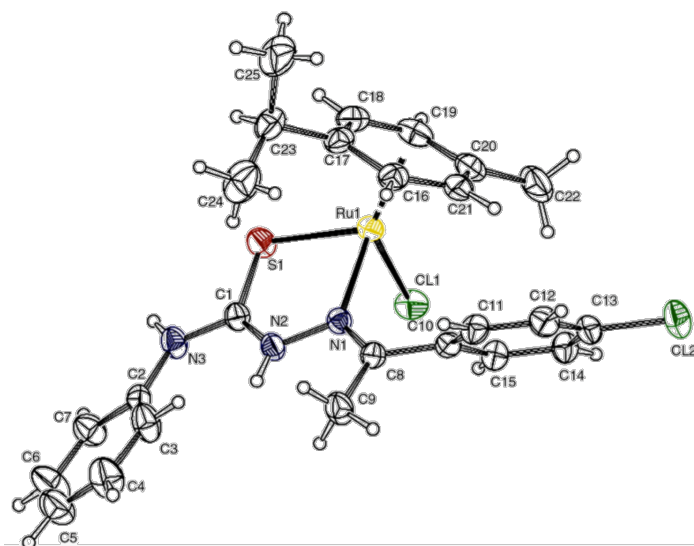


Figura 14: Representación ORTEP del complejo [Ru( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(L2)Cl]Cl.

Yildirim y col. continuaron en la línea de complejos semi-sandwich de organorutenio(II), sintetizando un complejo de fórmula [Ru( $\eta^6$ -*p*-cimeno)(TSC)Cl]Cl con TSC = tiofen-2-carboxaldehído tiosemicarbazona [64]. En este compuesto el ligando

tiosemicarbazona se encuentra coordinando de la misma forma previamente descrita, siendo ocupados el resto de los sitios de coordinación por un átomo de cloro y el fragmento *p*-cimeno (Figura 15). Además, para este complejo se estudió su potencial actividad antimicrobiana, evidenciándose que el mismo presenta una interesante capacidad de controlar el crecimiento de distintas cepas de patógenos como *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, entre otros. El comportamiento biológico reveló que este complejo muestra una significativa actividad contra los organismos Gram(+) y una moderada actividad contra los Gram(-) seleccionados.

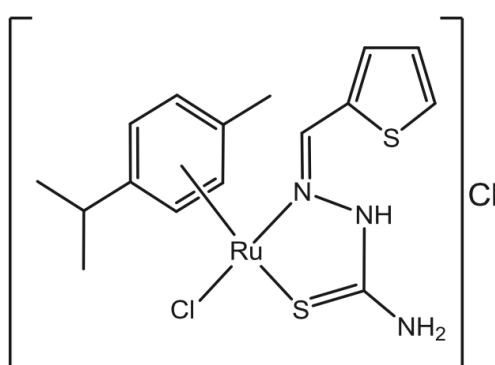


Figura 15: Representación del complejo  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(TSC)Cl]Cl$ , donde TSC = tiofen-2-carboxaldehído tiosemicarbazona.

Dentro de los antecedentes de complejos Ru-areno con tiosemicarbazonas, pero en este caso específicamente dinucleares, se encuentra el trabajo de Stringer y colaboradores. Este grupo ha descrito la síntesis de compuestos mono y dinucleares de Ru-areno con la monotiosemicarbazona y la ditiosemicarbazona derivada de benzaldehído [65]. Los complejos de fórmula  $[Ru(\eta^6\text{-areno})(\mu\text{-Cl})Cl]_2$ , con areno (Ar) =  $p\text{-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me}$  (1 y 3) o  $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_3\text{H}_6\text{COOH}$  (2 y 4) (Figura 16) fueron caracterizados exhaustivamente. La estructura molecular del complejo mononuclear se determinó a partir de difracción de rayos X, y su análisis reveló, nuevamente, una conformación de “*taburete de piano*” pseudo-tetraédrica y el ligando tiosemicarbazona coordinando en modo bidentado, tipo N,S (Figura 17).

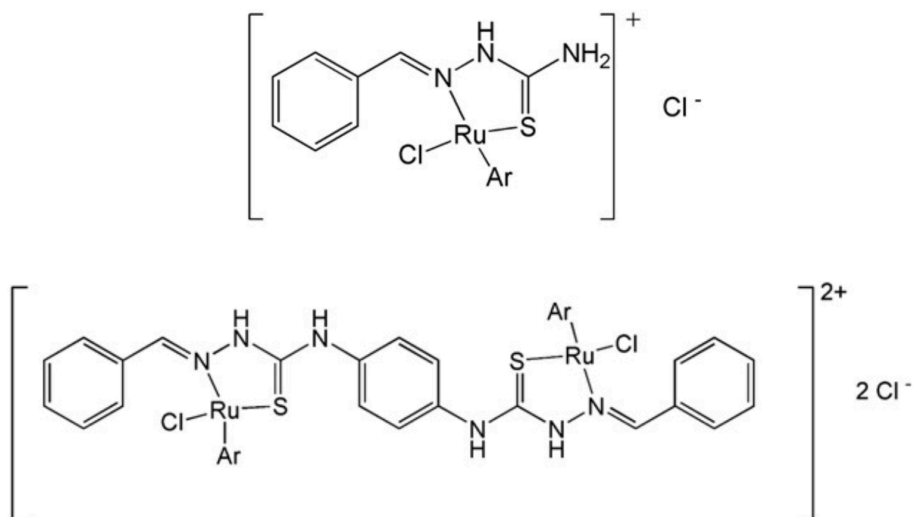


Figura 16: Representación de los complejos 1-4.

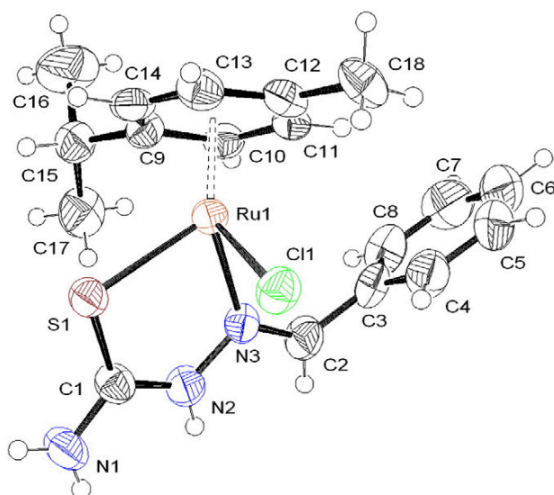


Figura 17: Representación ORTEP del catión 1 con elipsoides al 50% de probabilidad.

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de todos los complejos obtenidos (1-4), así como de sus respectivos ligandos libres (L1 y L2) frente a la línea celular de cáncer esofágico WHCO1. Los complejos 1 y 4 mostraron una citotoxicidad moderada contra esta línea celular en particular. El complejo 4 fue el que presentó mejor actividad, sin embargo, la misma es menor en comparación con la de su respectivo ligando libre.

#### 5.1.4 COMPLEJOS METÁLICOS CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO

En los últimos 20 años, el grupo en el que he realizado este trabajo de Tesis, ha desarrollado varias series de complejos de metales de transición (Pd, Pt, Ru) con las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano que se expusieron en la Figura 1.

En la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas para la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) el grupo de la Dra Gambino ha reportado la síntesis de treinta y dos complejos de fórmula  $[MCl_2(HL)]$  y  $[M(L)_2]$  con  $M = Pd(II), Pt(II)$  y L1-L4 = tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro-2-furaldehído, L5-L8 = tiosemicarbazonas derivadas de 3(5-nitrofuril)acroleína (Figuras 5 y 18) [66]. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados exhaustivamente desde el punto de vista analítico, fisicoquímico y estructural. También, se estudiaron propiedades fisicoquímicas, potencialmente relacionadas con la actividad biológica, como el comportamiento electroquímico, de estos compuestos. Se determinó la actividad biológica *in vitro* de los mismos y se incursionó en el estudio de su probable mecanismo de acción (formación de radicales libres, interacción con ADN e inhibición de la tripanotona reductasa de *T. cruzi*).

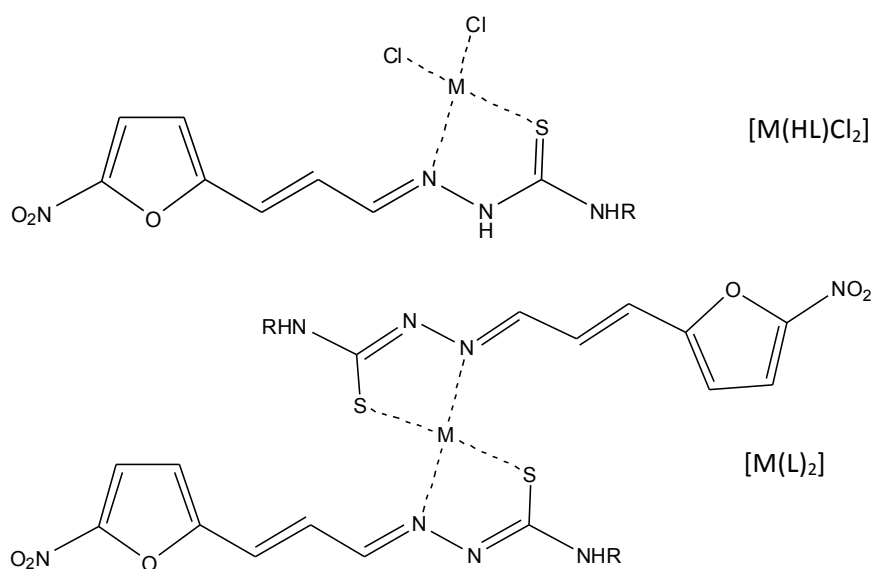


Figura 18: Representación de las dos series de compuestos de  $M = Pd(II)$  y  $Pt(II)$  con las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano descritas.

Los estudios de conductividad mostraron que todos los complejos obtenidos son neutros y no conductores. Los resultados analíticos, así como los espectros vibracionales IR y Raman, apoyados por estudios teóricos de estos espectros, mostraron que en los complejos  $[MCl_2(HL)]$  el átomo central (Pd(II) o Pt(II)) está enlazado a dos átomos de cloro y a una molécula de ligando HLn no deprotonado a través del azufre tiocarbonílico y del nitrógeno azometínico [67]. En los complejos  $[M(L)_2]$  el ion metálico se encuentra coordinado a dos moléculas de ligando deprotonado, a través del azufre tiocarbonílico y del nitrógeno azometínico. Los estudios ESI y de RMN realizados a los complejos más solubles mostraron que la estructura en solución es similar a la descrita en estado sólido. Los estudios de difracción de rayos X del complejo  $[Pd(L5)_2] \cdot 3DMSO$  mostraron que el complejo es monomérico y confirmaron la estructura propuesta para los demás complejos de Pd y Pt (Figura 19) [66].

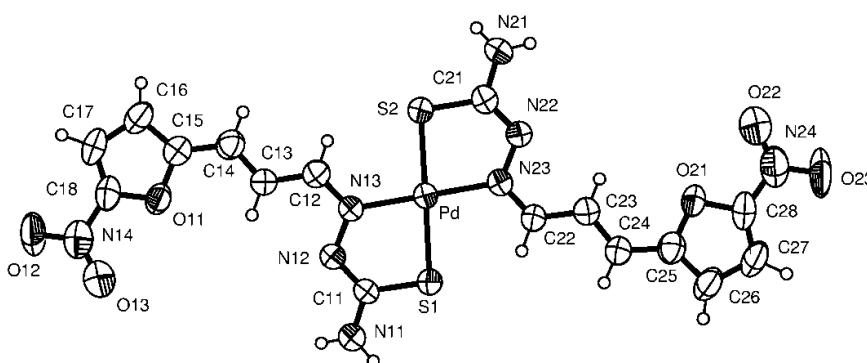


Figura 19: Representación ORTEP del complejo  $[Pd(L5)_2] \cdot 3DMSO$ .

Los estudios del comportamiento electroquímico de los complejos por voltametría cíclica se enfocaron especialmente en el estudio del efecto de la coordinación al centro metálico sobre el potencial de reducción del grupo nitro del ligando. Este potencial de reducción resultó similar en los complejos y en sus respectivos ligandos. Es de hacer notar que se observaron valores de  $E_{1/2}$  mayores que el correspondiente al Nifurtimox. Esto demostró una mayor capacidad de los compuestos de ser biorreducidos para generar especies radicalarias potencialmente tóxicas para el parásito [66].

En cuanto a su actividad antiparasitaria, la mayoría de los compuestos mostraron valores de  $Cl_{50}$  en el rango  $\mu M$ , siendo igual o más activos frente al parásito que los

ligandos y el fármaco de referencia, nifurtimox. Los compuestos de paladio resultaron hasta 1,7 veces más activos que el nifurtimox a la misma dosis (excepto los complejos para los ligandos HL4 y HL8) [66]. Los efectos de los complejos sobre la viabilidad de epimastigotas (Tulahuen 2) se presentan en la Tabla 2.

Compuesto	Cl <sub>50</sub> epimastigota (Cepa Tulahuen 2)
L1	2,7
[PdCl <sub>2</sub> (HL1)]	2,4
[Pd(L1) <sub>2</sub> ]	4,5
[PtCl <sub>2</sub> (HL1)]	>25
[Pt(L1) <sub>2</sub> ]	>25
L2	5,0
[PdCl <sub>2</sub> (HL2)]	4,3
[Pd(L2) <sub>2</sub> ]	4,7
[PtCl <sub>2</sub> (HL2)]	13,1
[Pt(L2) <sub>2</sub> ]	6,9
L3	4,9
[PdCl <sub>2</sub> (HL3)]	5,9
[Pd(L3) <sub>2</sub> ]	>25
[PtCl <sub>2</sub> (HL3)]	27,5
[Pt(L3) <sub>2</sub> ]	0,8
L4	>25
[PdCl <sub>2</sub> (HL4)]	>25
[Pd(L4) <sub>2</sub> ]	>25
[PtCl <sub>2</sub> (HL4)]	15
[Pt(L4) <sub>2</sub> ]	>25
L5	3,5
[PdCl <sub>2</sub> (HL5)]	6,4

[Pd(L5) <sub>2</sub> ]	4,3
[PtCl <sub>2</sub> (HL5)]	8,6
[Pt(L5) <sub>2</sub> ]	25
<hr/>	
L6	4,5
[PdCl <sub>2</sub> (HL6)]	2,7
[Pd(L6) <sub>2</sub> ]	4,3
[PtCl <sub>2</sub> (HL6)]	10,0
[Pt(L6) <sub>2</sub> ]	9,1
<hr/>	
L7	4,1
[PdCl <sub>2</sub> (HL7)]	2,4
[Pd(L7) <sub>2</sub> ]	5,2
[PtCl <sub>2</sub> (HL7)]	13,7
[Pt(L7) <sub>2</sub> ]	>25
<hr/>	
L8	3,6
[PdCl <sub>2</sub> (HL8)]	>>25
[Pd(L8) <sub>2</sub> ]	>>25
[PtCl <sub>2</sub> (HL'8)]	>25
[Pt(L'8) <sub>2</sub> ]	>25
<hr/>	
Benznidazol	7,4
Nifurtimox	6,1
<hr/>	

Tabla 2: Resultados de los complejos de Pd(II) y Pt(II) sobre la forma epimastigota de *T. cruzi*.

Para la línea de compuestos de platino se observó, también, aumentos en la actividad antiparasitaria. En particular, la coordinación de L3 (4-etil-1-(5-nitrofurfurilideno) tiosemicarbazida) a Pt(II) obteniendo [Pt(L3)<sub>2</sub>] derivó en un aumento de la actividad en casi cinco veces con respecto al ligando libre. De acuerdo a los valores de Cl<sub>50</sub>, [PtCl<sub>2</sub>(HL5)] y ambos complejos de L6 fueron los complejos de Pt más activos, mostrando valores de Cl<sub>50</sub> similares a los de nifurtimox y benznidazol. Es importante destacar que los resultados obtenidos para la serie de compuestos con 3(5-



nitrofuril)acroleína, a diferencia de la serie con 5-nitro-2-furaldehído, no muestran una correlación o tendencia clara con la actividad anti *T. cruzi* al cambiar el largo de cadena de los ligandos (L1-L4 a L5-L8) [68].

Cuando se comparan los resultados de las dos series de platino con los respectivos ligandos libres y los compuestos análogos de paladio, se puede determinar que el patrón de actividad se ve significativamente modificado al cambiar el átomo central. La actividad de los complejos de Pd sigue la tendencia general: [PdCl<sub>2</sub>(HL)]>ligando libre>[Pd(L)<sub>2</sub>]. Sin embargo, esta tendencia regular no se observó para los análogos de Pt. Esta diferencia en el comportamiento podría estar relacionada con diferencias en la biodisponibilidad, toxicidad inespecífica y/o el mecanismo de acción de ambas series de complejos metálicos [68].

Para estos complejos se estudiaron diferentes aspectos potencialmente relacionados con el mecanismo propuesto que involucraría un modo de acción dual o incluso múltiple. Los estudios de EPR en *T. cruzi* incubado con complejos activos de Pd mostraron las señales típicas del aducto DMPO-OH<sup>•</sup> y del aducto DMPO-nitroheterociclo. Se observó una buena correlación entre las intensidades de las señales de EPR, y por lo tanto la concentración de especies radicalarias, y los valores de Cl<sub>50</sub> en *T. cruzi*. Además, algunos de los complejos de la serie [PdCl<sub>2</sub>(HL)] inhibieron irreversiblemente la tripanotona reductasa, enzima parasitaria ausente en el mamífero huésped y fundamental para la defensa del parásito frente al estrés oxidativo.

Los estudios de interacción primaria de los complejos con ADN de timo de ternera mostraron que existe una fuerte interacción de los complejos con esta biomolécula comparable a la descrita en bibliografía para otros compuestos de Pd con actividad antitumoral. Eso permite postular que estos compuestos podrían interactuar con el ADN de *T. cruzi* [66,69].

En resumen, el mecanismo principal de acción de los compuestos desarrollados parece transcurrir principalmente a través de su biorreducción en el parásito, lo que produce especies químicas radicalarias desencadenantes de daño celular irreversible que conduce a la muerte del parásito (estrés oxidativo). Algunos de los compuestos inhiben irreversiblemente la tripanotona reductasa, enzima propia del parásito y participante de su mecanismo de protección contra radicales libres. Los resultados indican que los

compuestos interactúan con el ADN, donde la serie de paladio presenta una interacción más intensa en comparación con su análoga de platino. En suma, se reafirma la hipótesis de trabajo, donde la inclusión en una misma molécula del farmacóforo 5-nitrofurano y de un metal de importancia farmacológica, como Pd o Pt, condujo a compuestos activos contra *T. cruzi* que actúan por un mecanismo al menos dual [68].

Más recientemente, el grupo ha reportado el desarrollo de ocho nuevos complejos neutros de fórmula  $[MCl(L)(PTA)]$  con  $M = Pd$  o  $Pt$ , a partir de las sales correspondientes  $[MCl_4]^{2-}$ , con las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitro-2-furaldehído HL, Figura 1) como ligandos y la fosfina hidrofílica PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano, Figura 20) como coligando [70]. Ésta sería capaz de modular la solubilidad de los compuestos obtenidos, y por ende, capaz de mejorar la biodisponibilidad de los mismos. El PTA fue incluido no sólo con el objetivo de modular la solubilidad y la lipofilia en los complejos, sino además de favorecer la interacción con ADN como consecuencia de la N-protonación en condiciones fisiológicas. Este último hecho ya ha sido previamente reportado [71,72]. En este sentido, el ADN también podría ser un blanco potencial para estos compuestos.

Estos complejos, presentaron un entorno de coordinación cuadrado-plano en el cual L actúa como ligando monoaniónico bidentado coordinando a través del nitrógeno de la imina y el azufre tiocarbonílico, y el PTA enlazando de forma monodentada a través del átomo de fósforo, y la posición restante es ocupada por un átomo de cloro.

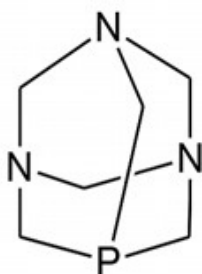


Figura 20: Estructura del PTA (1,3,5-7-fosfaadamantano).

En este caso también se podría esperar dos potenciales mecanismos de acción, debido a la presencia de las tiosemicarbazonas como ligandos bioactivos: la producción de

especies radicalarias de oxígeno (ROS) capaces de causar daño en el parásito [36] y la inhibición de la cruzipaina [73]. La mayoría de estos complejos mostraron actividades en la forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c) similares a las de las correspondientes tiosemicarbonas libres. Sin embargo, los complejos [MCl(L4)(PTA)] resultaron más activos ( $CI_{50} = 9,8 \pm 0,3$  y  $4,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$  para  $\text{Pd}^{2+}$  y  $\text{Pt}^{2+}$ , respectivamente) que el fármaco de referencia nifurtimox ( $CI_{50} = 20,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) y que el derivado feniltiosemicarbona libre HL4 ( $CI_{50} = 22,7 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ). Es importante resaltar que los complejos obtenidos resultaron poco tóxicos en células mamíferas, mostrando índices de selectividad de 10-20. La habilidad de estos complejos para reducirse en el parásito generando radicales libres tóxicos, fue confirmada por la detección de las especies radicalarias  $\text{OH}^{\bullet}$  y del nitroanión mediante experimentos de espectroscopía ESR. Los experimentos de electroforesis en gel y de fluorescencia (desplazamiento de bromuro de etidio) fueron consistentes con la interacción con ADN del tipo intercalante, pero la interacción con ADN no pareció ser el principal mecanismo de acción anti *T. cruzi* para estos compuestos.

Nuestro grupo también reportó la síntesis y caracterización de tres nuevas series de complejos de rutenio de fórmula  $[\text{RuCl}_2(\text{HL})_2]$ ,  $[\text{RuCl}_3(\text{dmsO})(\text{HL})]$  y  $[\text{RuCl}(\text{PPh}_3)(\text{L})_2]$  con las mismas tiosemicarbonas derivadas del 5-nitrofurano utilizadas en este trabajo de Tesis [74]. Es importante destacar que cuando se utilizó el complejo precursor  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ , se produjo la oxidación del átomo central y se obtuvieron complejos de rutenio(III) de fórmula  $[\text{RuCl}(\text{PPh}_3)(\text{L})_2]$  con  $\text{L} = \text{L1}, \text{L3}$  y  $\text{L4}$ . Todos los compuestos de estas tres series fueron caracterizados exhaustivamente [68,75]. En los complejos de las series  $[\text{RuCl}_2(\text{HL})_2]$  y  $[\text{RuCl}_3(\text{dmsO})(\text{HL})]$  los ligandos tiosemicarbona coordinan al metal en forma neutra y bidentada a través del azufre tiocarbonílico y el nitrógeno imínico. La espectroscopía IR corrobora la presencia de la señal  $\nu(\text{NH})$  evidenciando que el ligando se encuentra protonado en estos complejos neutros. Por otro lado, también se constató un modo de coordinación monoaniónico para los complejos de la serie  $[\text{RuCl}(\text{PPh}_3)(\text{L})_2]$ ; el patrón de corrimiento en las señales es muy similar al de los complejos  $[\text{ML}_2]$  (con  $\text{M} = \text{Pd}$  o  $\text{Pt}$ ) [66,67,68]. Además, la señal correspondiente a  $\nu(\text{NH})$  no se observa en estos complejos, reafirmando la deprotonación del ligando.

Los complejos obtenidos fueron ensayados *in vitro* contra la forma epimastigota de *T. cruzi*. Los porcentajes de inhibición de crecimiento para los complejos y los ligandos [36] se exponen en la Tabla 3.

Compuesto	<sup>a</sup> rPIC <sub>nfx</sub>
HL1	1,5
[RuCl <sub>2</sub> (HL1) <sub>2</sub> ]	0,5
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL1)]	0,4
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L1) <sub>2</sub> ]	0,8
HL2	1,1
[RuCl <sub>2</sub> (HL2) <sub>2</sub> ]	0,3
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL2)]	0,3
HL3	1,1
[RuCl <sub>2</sub> (HL3) <sub>2</sub> ]	0,3
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL3)]	ND
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L3) <sub>2</sub> ]	0,6
HL4	0,3
[RuCl <sub>2</sub> (HL4) <sub>2</sub> ]	ND
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL4)]	0,3
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L4) <sub>2</sub> ]	0,4

<sup>a</sup> rPIC<sub>nfx</sub>: Relación de porcentaje de inhibición de crecimiento de células epimastigotas de *T. cruzi* a 5 µM (para ligandos) y 25 µM (para complejos) en comparación con Nfx (PIC de Nfx fue tomado como 1.0)

ND: No determinado

Tabla 3: Actividad anti *T. cruzi in vitro* de los complejos de rutenio con sus respectivos ligandos.

En general, todos los complejos obtenidos mostraron una pobre a moderada actividad contra *T. cruzi* siendo, la mayoría de ellos, menos activos que el correspondiente ligando tiosemicarbazona libre y que el fármaco de referencia nifurtimox (Nfx). Por otro lado, se pudo observar una correlación aceptable entre la lipofilia de los complejos y su actividad *in vitro*. Los complejos que contienen el ligando *N*-fenil tiosemicarbazona resultaron ser los más lipofílicos y también los más activos. Tal como

era de esperar, la inclusión de un ligando voluminoso y apolar como PPh<sub>3</sub>, contribuyó a que el complejo en la serie [RuCl(PPh<sub>3</sub>)(L)<sub>2</sub>], sea el más lipofílico y, nuevamente, el más activo.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado también una serie de complejos de fórmula [RuCl<sub>2</sub>(HL)(HPTA)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> con HL = tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano y PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano [76]. En este caso, nuevamente, el ligando PTA fue incluido en la esfera de coordinación del rutenio a efectos de modular la solubilidad en agua de los complejos obtenidos, y de hecho, todos los complejos obtenidos resultaron muy solubles en agua (S > 10 mM). Sin embargo, los complejos resultaron menos activos en las formas epimastigota y tripomastigota del parásito que el Nifurtimox y que los ligandos libres [76].

Continuando la línea de trabajo con rutenio el grupo reportó recientemente la síntesis y caracterización de tres nuevos compuestos organometálicos Ru(II)-ciclopentadienilo, [Ru(η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(PPh<sub>3</sub>)L], con las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano HL2-HL4 (Figura 21) [77].

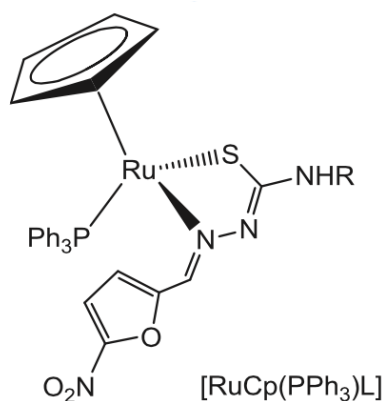


Figura 21: Estructura de los complejos [Ru(η<sup>5</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(PPh<sub>3</sub>)L].

Cuando se compararon los espectros IR de los complejos y los respectivos ligandos libres se comprobó la coordinación de los ligandos a través del azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico. El análisis del espectro IR y de RMN permite constatar la deprotonación de los ligandos tiosemicarbazona. Los compuestos resultaron activos *in vitro* en la forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Dm28c), con valores de Cl<sub>50</sub> en el rango micromolar o submicromolar siendo mucho más activos que los compuestos de Ru(II) con estos mismos ligandos previamente desarrollados por el grupo (Tabla 4).

Compuesto	CI <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> (μM)	CI <sub>50</sub> Macrófagos (μM)
	(Dm28c)	(J774)
HL2	17,4	36,4
[RuCp(PPh <sub>3</sub> )L2]	4,14	>20
HL3	18,5	34
[RuCp(PPh <sub>3</sub> )L3]	0,41	>20
HL4	22,7	>100
[RuCp(PPh <sub>3</sub> )L4]	>20	>20

Tabla 4: Actividad anti *T. cruzi in vitro* en tripomastigotas de *T. cruzi* y citotoxicidad en macrófagos murinos J774 de los complejos de rutenio y sus respectivos ligandos.

A excepción del complejo [RuCp(PPh<sub>3</sub>)L4], los compuestos presentaron un aumento en la actividad de 4 a 45 veces comparado con sus respectivas tiosemicarbazonas libres. Es importante destacar que los complejos [RuCp(PPh<sub>3</sub>)L2] y [RuCp(PPh<sub>3</sub>)L3] resultaron 5 y 49 veces, respectivamente, más activos que el fármaco tripanomicida de referencia, nifurtimox (CI<sub>50</sub> = 20,1 μM). Además, el complejo [RuCp(PPh<sub>3</sub>)L3] presentó un excelente índice de selectividad (IS = 49). Los resultados expuestos muestran a este compuesto como el complejo metálico con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano más activo contra *T. cruzi*, hasta la fecha [84]. Además, se estudió el mecanismo de acción mediante ESR, constatando que el complejo mantendría el mecanismo de acción del farmacóforo 5-nitrofurano produciendo especies radicalarias tóxicas de forma intraparasitaria y, también, sería capaz de interactuar con el ADN como segundo blanco.

## 5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.2.1 DISCUSIÓN GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS ENSAYADOS

Para la síntesis de compuestos de coordinación clásicos de rutenio, se suele utilizar, como fuente del metal, la sal  $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  o diversos precursores de fórmula general  $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2\text{L}_x]$  o  $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2\text{L}_x]^+$  con  $\text{L} = \text{NH}_3$  ( $x=4$ ), etilendiamina ( $x=2$ ), bipyridina ( $x=2$ ), trifenilfosfina ( $x=3$ ), dmsó ( $x=4$ ), entre otros [78-84]. Para la síntesis de compuestos organometálicos, se suele partir de complejos precursores adecuados. En este trabajo de Tesis se utilizó el compuesto dimérico  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\textit{p}\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$  (Figura 22) como precursor de síntesis. Este dímero, en presencia de un ligando coordinante se rompe dando lugar a los complejos con el *core* Ru-*p*-cimeno del tipo ya mencionado “*taburete de piano*” [57-65]. Este complejo precursor presenta como ventajas que se obtiene fácilmente y con un buen rendimiento y es soluble en una amplia gama de disolventes [85].

Para la síntesis de complejos se ensayaron distintas condiciones experimentales (distintos disolventes, temperatura ambiente o reflujo, atmósfera inerte, distintas relaciones molares metal-ligando). La temperatura y el tiempo de reacción se ajustaron tomando en cuenta sistemas similares que ya fueron reportados [68,75]. Finalmente, los complejos se sintetizaron en solución metanólica a temperatura ambiente, a excepción del complejo con HL1 para el que se utilizó diclorometano a reflujo como solvente de reacción. Para el complejo con HL3 fue necesario el agregado de  $\text{NaPF}_6$  como contraión para lograr su cristalización mientras que el complejo con HL2 fue obtenido con ambos contraiones (cloruro y hexafluorofosfato). Los detalles de cada una de las síntesis se muestran en el Figura 22.

Los resultados de la caracterización analítica y estructural, que se discutirán más adelante, permitieron determinar que el producto de la sustitución son complejos diméricos de fórmula  $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$  donde L es la forma deprotonada de los ligandos HL;  $\text{X} = \text{Cl}$  para HL= HL1, HL2 y HL4 y  $\text{X} = \text{PF}_6$  para HL= HL2 y HL3.

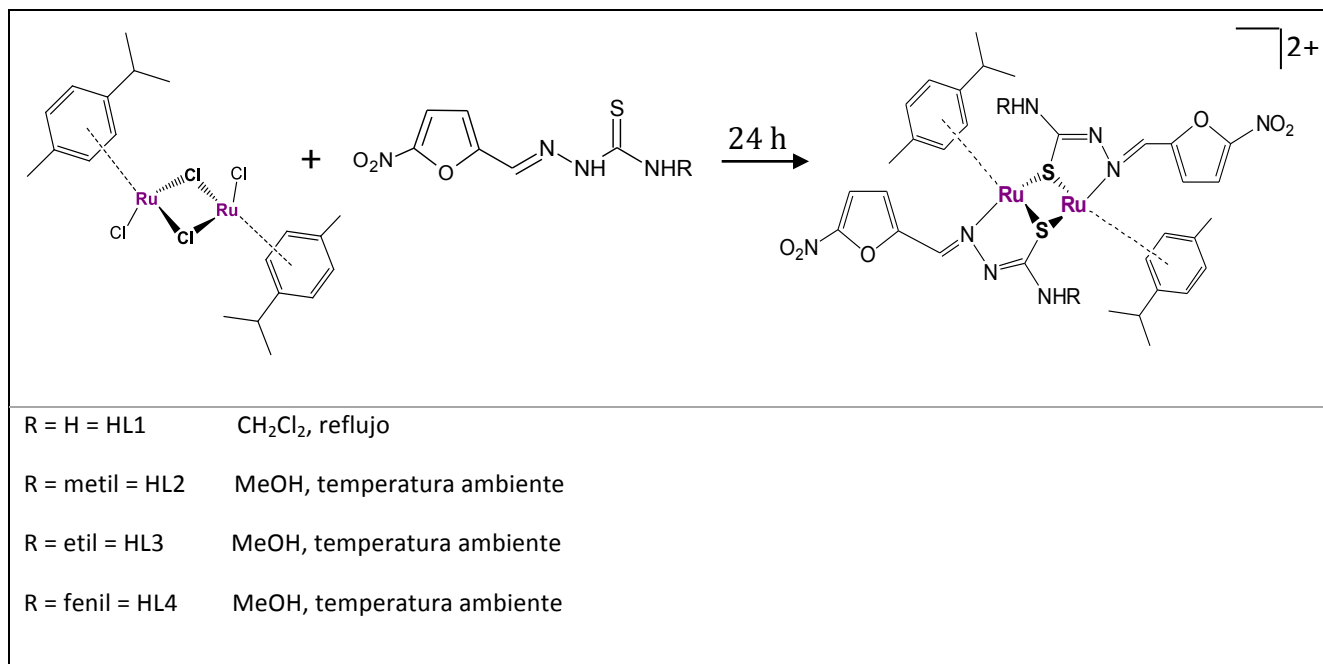


Figura 22: Esquema de síntesis general para los complejos de rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano.

La mayoría de los compuestos fueron obtenidos con buenos rendimientos y purezas adecuadas para su uso sin posterior purificación.

Algunas características de los complejos obtenidos se listan en la Tabla 5, a continuación:

Compuesto	Fórmula global propuesta	Rendimiento (%)	Aspecto morfológico
[Ru <sup>II</sup> <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	Ru <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	58	Monocristales rojos
[Ru <sup>II</sup> <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Ru <sub>2</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub> C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	86	Monocristales rojos
[Ru <sup>II</sup> <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	Ru <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	28	Monocristales rojos
[Ru <sup>II</sup> <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Ru <sub>2</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub> C <sub>36</sub> H <sub>46</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	80	Monocristales rojos
[Ru <sup>II</sup> <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	Ru <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> C <sub>44</sub> H <sub>46</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	65	Sólido rojo microcristalino

Tabla 5: Características principales de los complejos metálicos obtenidos.



## 5.2.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FISCOQUÍMICA

### 5.2.2.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL AL ESTADO SÓLIDO

#### 5.2.2.1.1 ANÁLISIS ELEMENTAL DE ELEMENTOS LIVIANOS

Los resultados del análisis elemental de C, H, N y S correspondientes se presentan en la Tabla 6.

Complejo	Teórico				Experimental			
	%C	%H	%N	%S	%C	%H	%N	%S
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$	39,62	4,12	11,62	6,63	39,26	3,95	11,58	6,40
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L2})_2](\text{PF}_6)_2$	33,55	3,65	9,29	5,23	33,46	3,51	9,03	5,35
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2$	41,01	4,22	11,25	6,44	40,96	4,27	11,16	6,40
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$	34,73	3,86	9,00	5,16	34,80	3,78	8,84	5,08
$[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$	47,10	4,28	9,99	5,73	47,16	4,15	9,89	5,66

Tabla 6: Resultados del análisis elemental de C, H, N y S para los complejos  $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(\text{p-cimeno})(\text{L})_2]\text{X}_2$ .

Los resultados experimentales están de acuerdo con las fórmulas propuestas. La técnica, puesta a punto en este trabajo conduce a la obtención de los complejos deseados con una alta pureza.

#### 5.2.2.1.2 ESTUDIO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los espectros IR se registraron en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  para todos los complejos rutenio-*p*-cimeno con las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitro-2-furaldehído y las respectivas tiosemicarbazonas sin coordinar (Anexo I). Como se verá más adelante (ver estructuras por difracción de rayos X), los ligandos tiosemicarbazona coordinan al centro metálico en su forma usual bidentada monoaniónica a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico. De esta manera, el núcleo central

queda formado por dos átomos de Ru y dos de S. El poliedro formado por la coordinación metálica adopta la forma de taburete, en la cual sus patas se encuentran definidas por un átomo de N y dos átomos de S.

Los espectros de las tiosemicarbazonas (HL1-HL4) y sus respectivos complejos fueron analizados a efectos de asignar las bandas de vibración infrarroja más significativas que fueron relacionadas con el modo de coordinación de las tiosemicarbazonas en los complejos obtenidos. Sobre la base de espectros experimentales y de estudios de DFT realizados previamente, se pudo definir el patrón espectroscópico vibracional IR de las tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano utilizadas como ligandos. Estas asignaciones resultaron de utilidad para el análisis de los espectros de los complejos objeto de este trabajo de Tesis. Además, se comparó el comportamiento espectroscópico en el IR de los cuatro complejos rutenio-*p*-cimeno con otros compuestos de coordinación de paladio(II), platino(II), y rutenio (II y III) con estos mismos ligandos obtenidos previamente por el grupo [67,69,75,86,92].

La complejidad de los espectros IR de los ligandos tiosemicarbazona y, consecuentemente, de los espectros de sus complejos de rutenio obtenidos aumenta a medida que aumenta la complejidad del grupo sustituyente R. Sin embargo, esta familia de complejos de rutenio muestra un patrón espectral en común. Algunas conclusiones generales surgen del análisis comparativo de estos espectros, especialmente en relación a los cambios detectados luego de la coordinación.

Las señales de vibración más significativas de los compuestos de rutenio que constatan el modo de coordinación de los ligandos, pudieron ser asignadas de forma tentativa y se muestran en la Tabla 7.

Compuesto	$\nu$ (C=N) cm <sup>-1</sup>	$\nu_s$ (NO <sub>2</sub> ) cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (N-N) cm <sup>-1</sup>	$\delta$ (NO <sub>2</sub> ) + furano <sup>a</sup> cm <sup>-1</sup>	Otras bandas cm <sup>-1</sup>
HL1 <sup>b</sup>	1602	1356	1108	811	
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	1605	1349	1160	809	
HL2 <sup>b</sup>	1599	1354	1114	808	
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	1588	1351	1168	813	$\nu_a$ (PF): 847 $\nu_a$ (FPF): 558
HL3 <sup>b</sup>	1602	1352	1104	805	

$[\text{Ru}_2(\rho\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$	1586	1351	1172	813	$\nu_a(\text{PF})$ : 847 $\delta_a(\text{FPF})$ : 558
$\text{HL4}^b$	1595	1344	1104	811	
$[\text{Ru}_2(\rho\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$	1602	1338	1166	809	
v: estiramiento; $\delta$ : flexión; $\nu_s$ : asimétrico; $\delta^a$ ( $\text{NO}_2$ ) + modos wagging de furano o hidrógenos del furano, $\delta^b$ : [67]					

Tabla 7: Bandas IR de interés de los complejos  $[\text{Ru}_2(\rho\text{-cimeno})_2(\text{L}_2)]\text{X}_2$ .

A pesar de que los ligandos tiosemicarbazona son potencialmente capaces de interactuar con los centros metálicos de diferentes maneras, por lo general coordinan a los metales como ligandos bidentados a través del N azometínico y del S tiocarbonílico. Hay por lo menos tres vibraciones de estiramiento que presentan valor diagnóstico importante en relación con el modo de unión de estos ligandos:  $\nu(\text{C}=\text{N})$ ,  $\nu(\text{C}=\text{S})$  y  $\nu(\text{N}-\text{N})$ . Como se informó anteriormente, para las tiosemicarbazonas seleccionadas que contienen el grupo 5-nitrofurano estas bandas se encuentran en regiones espectrales que muestran señales de un patrón complicado, que ha hecho difícil la tarea de asignación [67]. En particular, los estiramientos  $\text{C}=\text{N}$  y  $\text{C}=\text{S}$  de las tiosemicarbazonas se encuentran en las regiones de número de onda donde ocurren las vibraciones de otras partes de los ligandos, como ser  $\nu_{as}(\text{NO}_2)$ , entre otras. En la región de estiramiento  $\text{C}=\text{N}$  ( $1650$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) y de estiramiento  $\text{C}=\text{S}$  ( $850$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ ) ocurren las vibraciones de tijereteo del furano y modos de “wagging” simétrico de hidrógenos del furano y sus combinaciones.

Luego de la coordinación, se observan modificaciones en la señal de  $\nu(\text{C}=\text{N})$  de los ligandos libres tiosemicarbazona, a aproximadamente  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , como consecuencia de la coordinación. Además, las señales  $\nu(\text{C}=\text{S})$ , alrededor de  $820\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ , deberían correrse a menores números de onda cuando las tiosemicarbazonas actúan como ligandos bidentados N,S. Sin embargo, tal como fue previamente reportado, estas señales no pudieron ser asignadas inequívocamente para los compuestos metálicos debido a la complejidad del espectro en esta región [67]. No obstante, se observaron cambios significativos en esta región luego de la coordinación. Estas modificaciones son consistentes con la coordinación de los ligandos tiosemicarbazonas a través del azufre tiocarbonílico y el nitrógeno azometínico. La

señal correspondiente al estiramiento del enlace N-H, a aproximadamente 3120-3150  $\text{cm}^{-1}$ , no se observa en los complejos evidenciando a los ligandos en su forma deprotonada. En este sentido, los resultados son consistentes con la coordinación monoaniónica y bidentada de los ligandos. Además de las modificaciones descritas, la señal correspondiente a  $\nu(\text{N-N})$  también se desplaza a mayores números de onda, en concordancia con la coordinación del ligando tiosemicarbazona a través del nitrógeno azometínico [75]. Por otro lado, las señales intensas de  $\nu_a(\text{PF})$  y  $\delta(\text{FPF})$  del contraión  $\text{PF}_6^-$ , alrededor de 840  $\text{cm}^{-1}$  (como una banda ancha prominente característica) y 560  $\text{cm}^{-1}$  (señal tipo hombro de menor intensidad), respectivamente, también fueron observadas para los complejos con HL2 y HL3, RuL2 y RuL3, respectivamente [87]. Las vibraciones metal-ligando suelen ocurrir a números de onda bajos (usualmente por debajo de 500  $\text{cm}^{-1}$ ) donde también se presentan vibraciones débiles de los ligandos. Además, los modos inactivos del ligando en esta región de frecuencias podrían ser activados a través de la coordinación, dificultando aún más la asignación de los modos rutenio-ligando [67]. Esto dificultó la asignación de las mismas.

### 5.2.2.1.3 RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALINAS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL

*Estructuras cristalinas de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$*

Por evaporación lenta durante 24 horas, a temperatura ambiente, de una solución del complejo en diclorometano se obtuvieron monocristales adecuados para la recolección de datos por difracción de rayos X de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Los monocristales de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se obtuvieron a partir de soluciones metanólicas de los complejos. En el caso del complejo  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  fue necesario el agregado de  $\text{NaPF}_6$ . La Tabla 8 resume los datos de los cristales, los procedimientos de recolección de datos y los resultados del refinamiento. Los átomos de hidrógeno fueron incluidos en el modelo molecular en posiciones estereoquímicas.

	[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O	[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O
Fórmula empírica	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>14</sub> Ru <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> Ru <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> F <sub>12</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
Peso fórmula	1095,88	1029,94	1261,04
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c	C2/c	Cc
Dimensiones de la celda unidad <sup>a)</sup>			
a (Å)	19,809(7)	20,9221(12)	21,639(8)
b (Å)	25,120(8)	12,2472(7)	11,066(4)
c(Å)	19,115(6)	17,0856(10)	21,408(12)
β(°)	108,286(4)	108,254(1)	113,206(4)
Volumen (Å <sup>3</sup> )	9031(5)	4157,7(4)	4712(4)
Unidades de fórmula por celda unidad/Z	8	4	4
Densidad calculada (mg/mm <sup>3</sup> )	1,612	1,642	1,778
Coefficiente de absorción μ (mm <sup>-1</sup> )	0,948	1,013	0,901
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,17 x 0,17 x 0,13	0,29 x 0,25 x 0,24	0,10 x 0,08 x 0,08
Color/forma del cristal	rojo oscuro/prismático	violeta/prismático	marrón/prismático
Rango de θ para recolección de datos	1,35 a 24,41°	1,95 a 28,70°	2,05 a 26,73°
Rangos de índices de Miller	-23, 23/-29, 29/-22, 22	-28, 28/-16, 16/-23, 22	-27, 27/-14, 14/-27, 27
Reflexiones recolectadas/independientes	85246/14865	20103/5375	26397/9984
Máx. y mín. de transmitancia	0,86 y 0,83	0,79 y 0,74	0,93 y 0,91
Método de refinamiento	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>	matriz de mínimos cuadrados en F <sup>2</sup>
Pesos, w	[W= 1/s <sup>2</sup> (Fo <sup>2</sup> ) + (0,0306 P) <sup>2</sup> + 0,4761 + 2Fc <sup>2</sup> ]/3	[W= 1/s <sup>2</sup> (Fo <sup>2</sup> ) + (0,0306 P) <sup>2</sup> + 0,4761P, P= (Fo <sup>2</sup> + 2Fc <sup>2</sup> )/3	[W= 1/s <sup>2</sup> (Fo <sup>2</sup> ) + (0,0306 P) <sup>2</sup> + 0,4761P, P= (Fo <sup>2</sup> + 2Fc <sup>2</sup> )/3
	P=[Max(Fo <sup>2</sup> ,0)+2Fc <sup>2</sup> ]/3	P=[Max(Fo <sup>2</sup> ,0)+2Fc <sup>2</sup> ]/3	P=[Max(Fo <sup>2</sup> ,0)+2Fc <sup>2</sup> ]/3
Datos de refinamiento/parámetros	10119/1152	4582/261	8246/677
Bondad del ajuste en F <sup>2</sup>	1,002	1,008	0,988
Índices R final <sup>a)</sup> , Rw [1>2σ	R1=0,0457, wR2=0,0842	R1=0,0365, wR2=0,1019	R1=0,0425, wR2=0,0798

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

Tabla 8: Datos cristalográficos y del refinamiento de la estructura de los complejos [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L1)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L2)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L3)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O.

En la tabla 9 se muestran algunas de las distancias y ángulos de enlace seleccionados. Los resultados cristalográficos completos (lista completa de ángulos y distancias de

enlace, parámetros atómicos de anisotropía térmica, coordenadas de los átomos de hidrógeno, factores de amplitud estructural calculados y observados) se encuentran en el Anexo II o disponibles en el banco de datos de Cambridge bajo el número CCDC 819342, 819344 y 819343, respectivamente.

	$[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$	$[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2$	$[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$
<b>Ru1-Ru2</b>	3,565, [3,537]	3,530	3,557
<b>Ru1-S1, Ru1-S2</b>	2,350, 2,428 (Ru3) [2,344, 2,417]	2,424, 2,347	2,352, 2,431
<b>Ru2-S1, Ru2-S2</b>	2,418, 2,347 (Ru4) [2,420, 2,349]	2,424, 2,347	2,349, 2,401
<b>Ru-N</b>	2,077, 2,077 (Ru3) [2,081, 2,093] (Ru4)	2,088, 2,088	2,085, 2,092
<b>Rango Ru-C (aromático)</b>	2,162–2,275	2,193, 2,251	2,178-2,277
<b>Centroide Ru-areno</b>	1,701, 1,707 (Ru3) [1,719, 1,706] (Ru4)	1,702	1,711, 1,705
<b>Stacking N'-N''</b>	3,285, [3,387]	3,314	3,401
<b>S2-Ru-N</b>	80,6, [80,5]	80,7	80,8
<b>S1-Ru-S2</b>	83,5, [82,5]	84,0	82,4
<b>S1-Ru-N</b>	88,9, [89,4]	90,8	90,3
<b>Diedro Ru1-S1-S2, Ru2-S1-S2</b>	14,0, [12,1]	10,7	12,7
<b>Diedro furil-furil</b>	7,5, [13,7]	4,6	13,9

Las distancias se presentan en Å, los valores en [ ] son la selección de datos geométricos para la segunda molécula en la unidad asimétrica de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$ .

Tabla 9: Algunos parámetros geométricos seleccionados incluyendo distancias de enlace, separación para átomos no enlazados, ángulos del diedro y ángulo de enlace para los complejos  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

En las figuras 23, 24 y 25 se muestran las representaciones de las especies catiónicas  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]^{2+}$  y  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2]^{2+}$  con la numeración asignada a los átomos principales (a excepción de los H) y los elipsoides vibracionales al 50% de probabilidad.

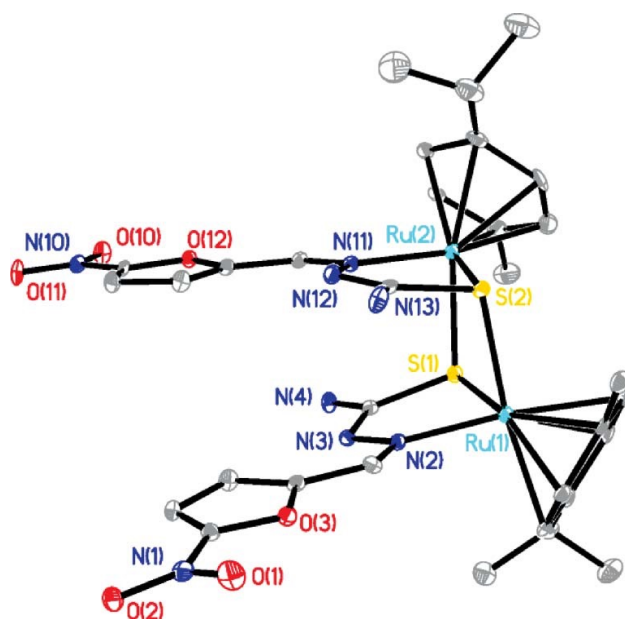


Figura 23: Representación de la estructura de la especie catiónica  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]^{2+}$  en  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$  con elipsoides térmicos al 50% de probabilidad. Las moléculas de agua, los aniones cloruro y los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad.

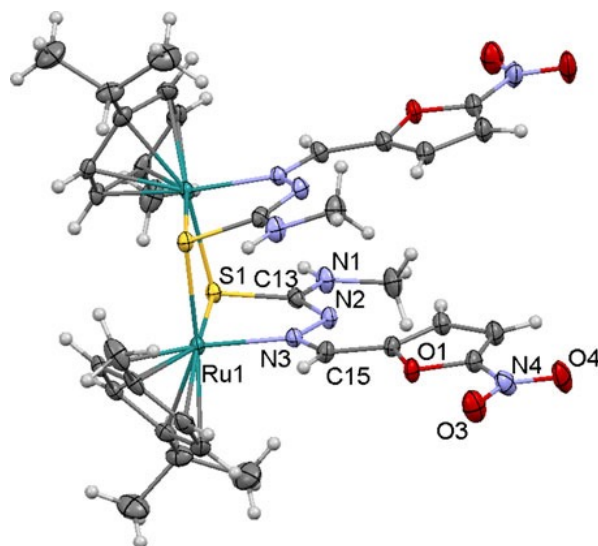


Figura 24: Representación de la estructura de la especie catiónica  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]^{2+}$  en  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Las moléculas de agua, los aniones cloruro y los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad.

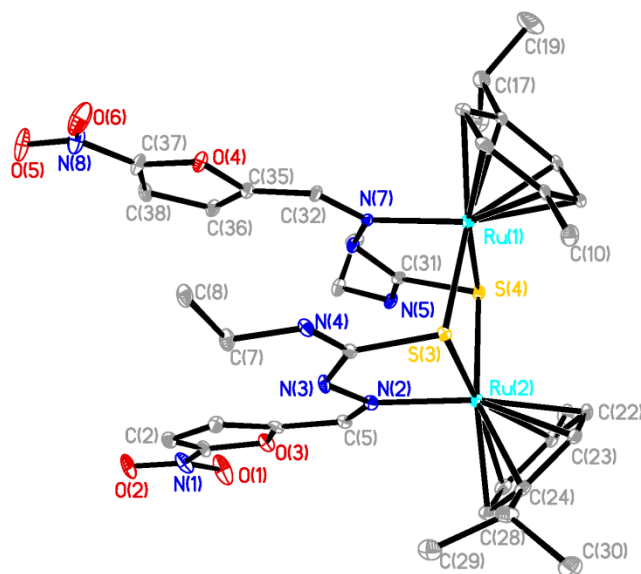


Figura 25: Representación de la estructura de la especie catiónica  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2]^{2+}$  en  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$  con elipsoides térmicos al 50% de probabilidad. La molécula de agua, los aniones hexafluorofosfato y los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad.

El estudio de difracción de rayos X para los tres complejos mostró que todos ellos consisten en unidades binucleares, dicatiónicas presentando un núcleo central formado por dos átomos de rutenio y dos átomos de azufre. Este anillo de cuatro miembros no es planar debido a que el ángulo diedro entre los planos Ru1-S1-S2 y Ru2-S1-S2 se encuentra entre los 4,6 y 13,7° (Tabla 9).

Cada átomo de rutenio presenta una geometría pseudo-octaédrica, encontrándose coordinado de forma  $\eta^6$  a un anillo *p*-cimeno (ocupando así, tres posiciones de coordinación), un átomo de N y dos restantes de S, adoptando así, la típica estructura de “*taburete de piano*” (Tabla 9) [88].

Comparando los tres complejos, se puede determinar que el par de distancias Ru-S no es sensible a los sustituyentes de los ligandos tiosemicarbazona. En todos los casos una de las distancias es sistemáticamente más larga que la otra (2,40-2,43 Å y 2,34-2,35 Å, respectivamente). La misma equivalencia se puede observar en las distancias del enlace Ru-N, de aproximadamente 2,08-2,09 Å, y la distancia del centroide Ru-areno, alrededor de 1,70-1,71 Å. Sin embargo, se presenta una diferencia en la separación del



stacking N---N, desde 3,28 a 3,40 Å, la cual puede deberse a las fuerzas que participan en el empaquetamiento.

Es importante destacar que en la base de datos cristalográficos CSD se encuentran algunos compuestos conteniendo la unidad Ru-S areno. Aproximadamente el 40% de ellos muestra interacciones de enlace entre los centros metálicos (distancias Ru-Ru cercana a 3 Å) y el resto presenta distancias Ru-Ru comprendidas en el rango de 3,3-3,70 Å. En este caso, los complejos obtenidos presentan distancias Ru-Ru mayores a 3,53 Å. Tal como se puede observar en los datos de CSD y para estos complejos, una mayor separación entre metales se asocia también con ángulos diedros pequeños entre los planos Ru1-S1-S2 y Ru2-S1-S2. Entre las moléculas de tiosemicarbazona se observa un apilamiento que define un prisma pentagonal como se muestra en la Figura 26 para el complejo  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimen})_2(\text{L3})_2]^{2+}$ , RuL3. Hasta el momento, en base a la información recabada, la única estructura reportada que presenta una característica similar es la del compuesto bis( $\mu_2$ -N-ciano-N'-metiltiourea)-bis(*p*-cimen)-di-rutenio(II) [89] donde un anillo de secuencia Ru-S-C-N reemplaza el anillo de 5 miembros de la unidad Ru-S-C-N-N.

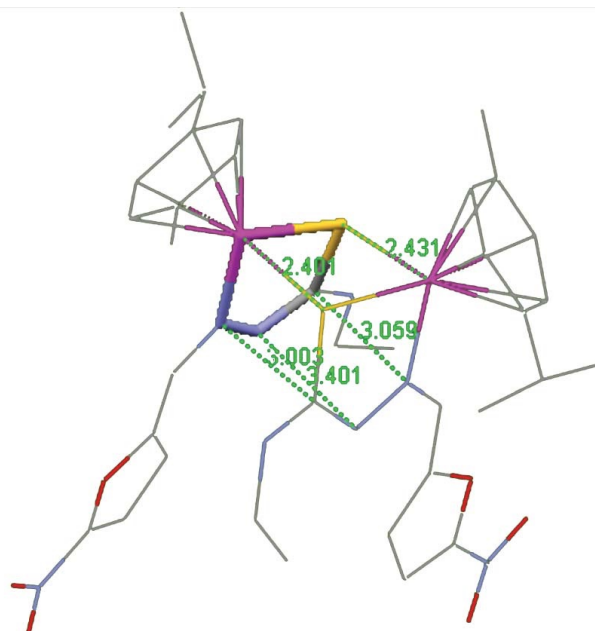


Figura 26: Representación del prisma pentagonal de la especie catiónica de  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimen})_2(\text{L3})_2]^{2+}$  en el cual sus caras laterales están definidas por dos distancias de enlace Ru-S (2,401 Å, 2,431 Å) y tres separaciones adicionales (C---N, N---N y N---C) 3,509 Å, 3,401 y 3,003 Å, respectivamente. Los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad.

Entre el anillo furilo y el grupo nitro se observa una desviación de la planaridad de 13° representada en el ángulo del diedro entre ambos planos. Además, ambos anillos furilo son prácticamente coplanares (Tabla 9), a pesar de que éstos no están uno encima del otro.

Cabe destacar que para el complejo  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$ , existen dos unidades asimétricas por celda unidad. Los datos geométricos para ambas moléculas de la unidad asimétrica son prácticamente equivalentes. Sin embargo, se presenta la excepción de la separación de Ru---Ru en un complejo, 3,565(1) Å (Ru1---Ru2), la cual es ligeramente mayor en comparación con Ru3---Ru4, 3,537(1) Å en el otro. Además, el empaquetamiento de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$  muestra una gran cantidad de moléculas de agua en un canal (Figura 27), ocupando la parte central de la red cristalina a lo largo de la dirección  $a$ .

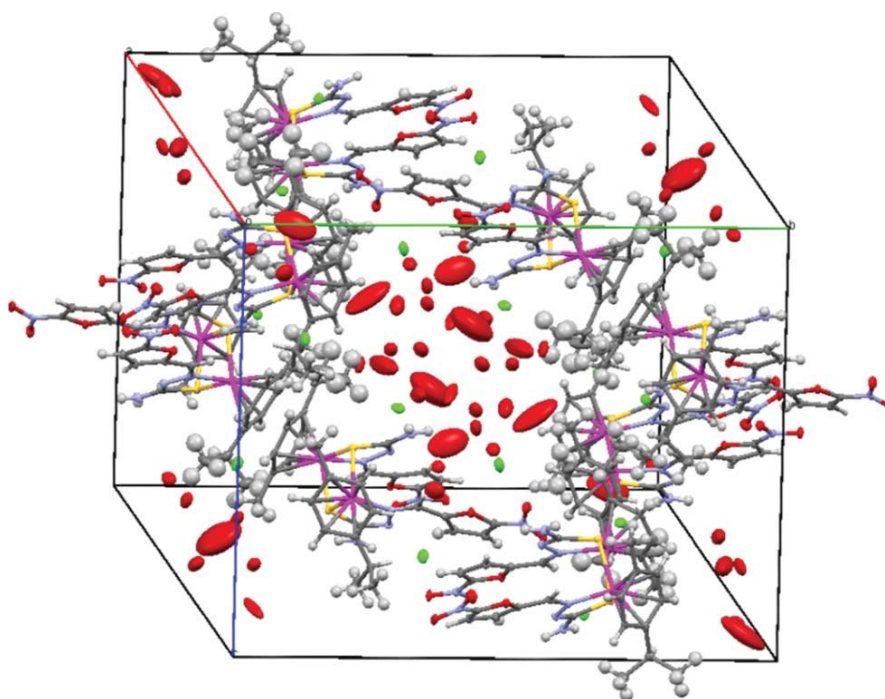


Figura 27: Representación en modelo de elipsoides del empaquetamiento de  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$  mostrando el canal de agua desordenada (oxígenos en rojo) paralelo al eje  $a$ . Los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad.

Algunas de estas moléculas de agua establecen enlaces de hidrógeno con el átomo N23, el grupo nitro (O31) y el cloruro. También en este caso es importante destacar

que, en la base de datos de CSD, se encuentran 5 octahidratos de rutenio, uno de ellos, ( $\mu_2$ -oxo)-bis((oxalato)-(2,2',5,2'-terpiridina))-di-rutenio(III) octahidrato [90], muestra un canal de agua de un diámetro de aproximadamente 8 Å a través del centro de la celda cristalográfica. Este diámetro es más angosto que el que fue encontrado para el octahidrato de este complejo, presentando un canal de agua con un diámetro de aproximadamente 12 Å.

## 5.2.2.2 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL EN SOLUCIÓN

### 5.2.2.2.1 ESPECTROSCOPIA ESI-MS

Los resultados de los estudios de espectrometría de masas (ESI-MS) para las soluciones metanólicas de los complejos de rutenio-*p*-cimeno se muestran en la Tabla 10.

Complejo	<i>m/z</i> [Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>			
	Teórico(+)	Experimental(+)	Teórico(-)	Experimental(-)
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	449,0	449,1	-	-
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	463,0	463,1	144,9	144,8
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	477,0	477,1	144,9	144,8
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	525,1	525,2	-	-

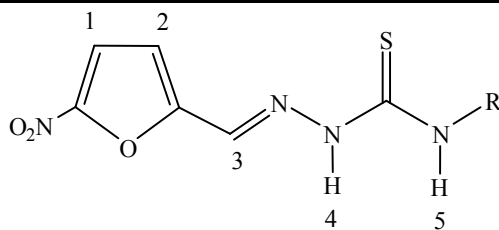
Tabla 10: Relación *m/z* de los picos obtenidos por espectrometría de masas (ESI-MS) para los complejos rutenio-*p*-cimeno estudiados.

En todos los casos, los espectros de ESI-MS en el modo positivo mostraron el pico más intenso que pudo ser asignado mediante simulación del espectro al dímero [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. Además, el patrón isotópico para esta señal es consistente con esta asignación. Los complejos RuL2 y RuL3 mostraron en el modo negativo un pico correspondiente al *m/z* del contraión hexafluorofosfato. Cabe destacar que, todos los espectros ESI(+)-MS de soluciones de los compuestos luego de 24 horas continuaron exhibiendo la señal predominante del compuesto original dimérico con una carga

formal de +2, indicando que el complejo original aún se encontraba presente en solución. Los resultados obtenidos por espectrometría de masas ESI-MS resultaron en un apoyo fundamental para establecer la estructura de los complejos en solución, pudiéndose establecer que presentan en solución la misma estructura dimérica que en estado sólido.

#### 5.2.2.2.2 ESTUDIO DE RMN

Los complejos se caracterizaron por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN. Los espectros obtenidos permitieron confirmar las estructuras propuestas de los complejos sintetizados y se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos por medio de las otras espectroscopías. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN mostraron señales finas y bien definidas, típicas de los complejos diamagnéticos de Ru(II). Además, las integraciones, así como la multiplicidad de las señales  $^1\text{H}$ -RMN también se encuentran en concordancia con las fórmulas propuestas (Anexo II). Cabe destacar que las señales correspondientes al fragmento *p*-cimeno se encuentran duplicadas en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los complejos debido a la presencia de moléculas no equivalentes de *p*-cimeno en el dímero. Los complejos mostraron desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  similares para las porciones comunes del ligando tiosemicarbazona y además para el fragmento *p*-cimeno. Los resultados más relevantes se presentan en la Tabla 11 donde, además, se puede observar el esquema de numeración correspondiente. Se incluyen los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de los complejos y sus correspondientes ligandos en ppm, y las diferencias de estos desplazamientos expresadas como  $\Delta\delta$ . En la Figura 28 se expone, a modo de ejemplo, el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del complejo  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$  (Figura 28).



H	HL1 <sup>b</sup>	RuL1	$\Delta\delta_{RuL1}$	HL2 <sup>b</sup>	RuL2	$\Delta\delta_{RuL2}$	HL3 <sup>b</sup>	RuL3	$\Delta\delta_{RuL3}$	HL4 <sup>b</sup>	RuL4	$\Delta\delta_{RuL4}$
1	7,76	7,87	0,11	7,79	7,80	0,01	7,79	7,79	0,00	7,82	8,21	0,39
2	7,37	7,49	0,12	7,31	7,27	-0,04	7,31	7,21	-0,04	7,49	7,86	0,37
3	8,00	8,35	0,35	7,98	8,46	0,48	7,98	8,43	0,45	8,08	8,80	0,72
4	11,87	-	-	11,87	-	-	11,82	-	-	12,20	-	-
5	8,52	7,94	-0,58	8,52	8,43	-0,09	8,54	8,46	-0,08	10,16	9,70	-0,46

<sup>a</sup>  $\Delta\delta = (\delta_{Complejo} - \delta_{Ligando})$ ; <sup>b</sup> [34].

Tabla 11: Valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm, más relevantes de la porción L en  $[Ru_2(p\text{-cimeno})_2(L)_2]X_2$ , RuL1-RuL4, y de los ligandos HL a 303 K en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

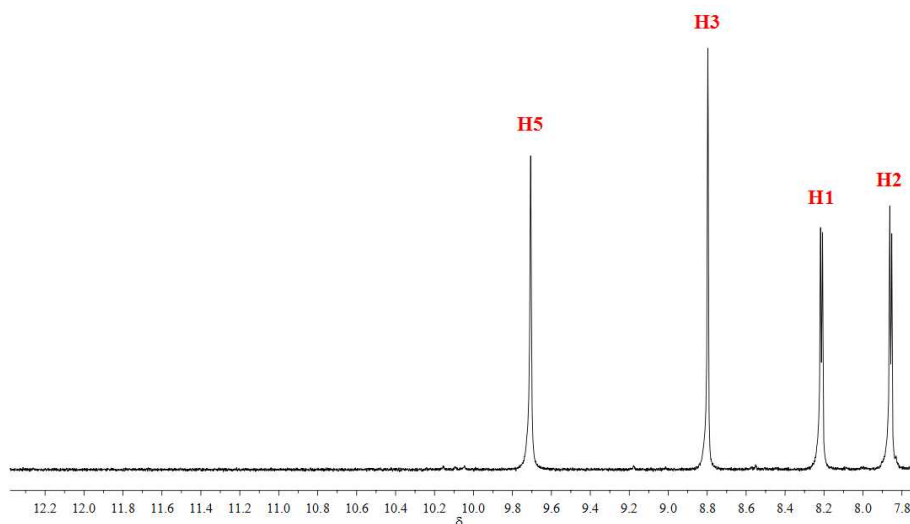


Figura 28: Espectro <sup>1</sup>H-RMN de complejo  $[Ru_2(p\text{-cimeno})_2(L4)_2]Cl_2$ .

Es posible apreciar el efecto, no sólo de la coordinación del ligando al ion metálico, sino también de su deprotonación, sobre los desplazamientos de los protones cercanos a los átomos coordinantes (el nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbónico). Luego de la coordinación, la característica más sobresaliente en el

espectro es el cambio en el desplazamiento químico del protón ilidénico ( $\Delta\delta = 0,35$ ;  $0,48$ ;  $0,43$  y  $0,72$  ppm para RuL1-RuL4 respectivamente), en este caso, etiquetado con el número 3 (H3). Es importante destacar que para todos los complejos, la señal de este protón se encuentra significativamente desplazada hacia valores de campo menores. Además, la ausencia de la señal correspondiente al protón 4 constata, nuevamente, la coordinación de los ligandos en su forma deprotonada.

### 5.2.2.2.3 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

La realización de un estudio de estabilidad a un fármaco o un compuesto bioactivo permite conocer el comportamiento químico del mismo en determinadas condiciones establecidas. Además, estos estudios son necesarios para poder evaluar si el compuesto permanece como una especie única en condiciones similares a las fisiológicas, o en su defecto, cómo los cambios fisicoquímicos desarrollados repercuten sobre su comportamiento biológico.

Como fue mencionado en varias oportunidades en este trabajo, la sustitución de ligandos lábiles por agua en condiciones fisiológicas ha sido descrita para el cisplatino, sus derivados y otros complejos metálicos con actividad antitumoral [45-47].

En los complejos de rutenio  $[\text{Ru}^{\text{II}}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$  sintetizados en este trabajo se espera determinar si las especies originales son capaces de permanecer en solución, o en su defecto, si los ligandos bioactivos y/o el fragmento *p*-cimeno permanecen coordinados al rutenio.

Se estudió la estabilidad de los complejos de rutenio obtenidos en este Trabajo de Tesis frente a la posible hidrólisis o descomposición. Para ello se siguió espectrofotométricamente la variación del espectro electrónico de los complejos con el tiempo en diferentes condiciones experimentales. Estas condiciones fueron seleccionadas con el objetivo de, no sólo acercarse a las condiciones de los ensayos biológicos, sino también de establecer las condiciones adecuadas para el almacenamiento de las soluciones de los complejos. Es importante destacar que no fue posible disolver los complejos exclusivamente en solución acuosa de buffer fosfato. Sin embargo, todos ellos resultaron muy solubles en DMSO, y la presencia de 1-2% de DMSO demostró ser suficiente para la disolución de los mismos, tanto en buffer

fosfato pH = 7,4 como en buffer fosfato salino. Por lo tanto se estudió la estabilidad a la hidrólisis o descomposición en diferentes condiciones experimentales, a soluciones de los complejos en DMSO y en un sistema DMSO:buffer fosfato pH = 7,4 (2% v/v DMSO en la mezcla). La estabilidad de las soluciones de los complejos en DMSO y DMSO/buffer fosfato pH = 7,4 fueron evaluadas en condiciones de temperatura ambiente y luz, temperatura ambiente y oscuridad y, finalmente, temperatura de 4 °C y oscuridad. Los complejos RuL1-RuL4 exhiben una banda de absorción en el rango UV a 291, 288, 287 y 311 nm, respectivamente, y una banda ancha en la región visible con  $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $414 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $417 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y  $426 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 17100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), respectivamente. Los cambios observados en los espectros de las soluciones en sus primeras 24 horas en todas las condiciones ensayadas son despreciables, indicando que la estabilidad de los mismos en solución acuosa es adecuada. Además, tal como se observó en el estudio de espectrometría de masas (ESI(+)-MS) para los complejos RuL1-RuL4, los mismos exhibieron su señal más significativa asignada a la especie dimérica original en soluciones metanólicas con hasta 24 horas de reposo, reafirmando la estabilidad de los mismos.

#### **5.2.2.2.4 ESTUDIO DE VOLTAMETRÍA CÍCLICA**

Como fue mencionado previamente, estos compuestos son capaces de formar radicales libres tóxicos intraparasitarios debido a que incluyen en su estructura al grupo 5-nitrofurano. Este mecanismo incluye una etapa inicial de biorreducción del grupo nitro. En este sentido, se estudió el comportamiento electroquímico de los complejos obtenidos por voltametría cíclica de barrido lineal no solamente con el fin de caracterizar las nuevas especies organometálicas sino como un estudio preliminar para evaluar su capacidad de actuar a través del mecanismo de acción mencionado. Esta técnica permite determinar si los complejos podrían generar radicales libres por biorreducción y analizar el efecto de la complejación sobre el potencial de reducción del grupo nitro.

Todos los compuestos rutenio-*p*-cimeno mostraron un comportamiento electroquímico similar en solución de DMSO. Los voltamogramas de los complejos metálicos presentaron dos señales bien definidas en el barrido catódico alrededor de -1,6 y -0,7 V vs el electrodo de referencia de calomel saturado (SCE) (Figura 29).

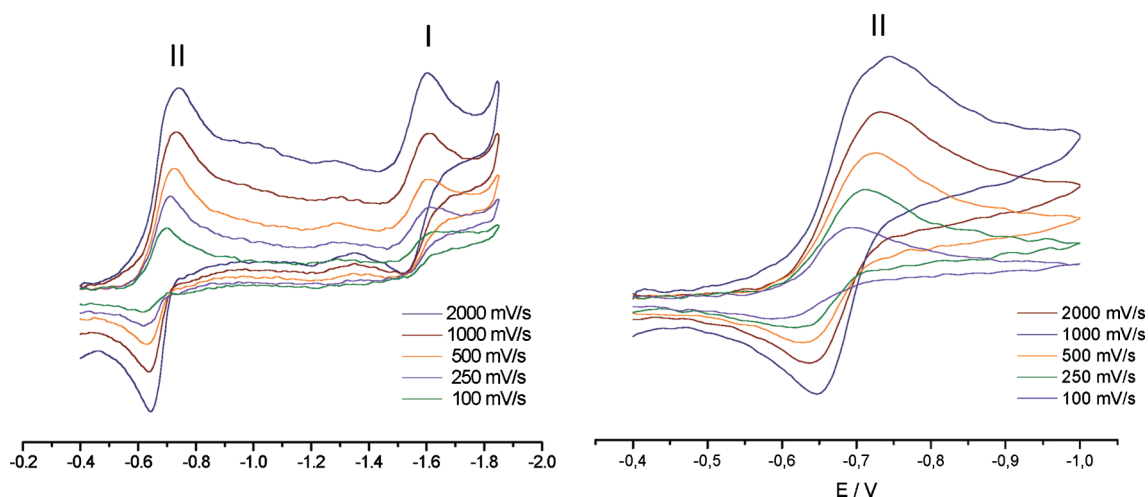


Figura 29: Resultados de voltametría cíclica para  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$ . Las condiciones experimentales incluyeron soluciones 1 mM de DMSO, un electrodo de trabajo de gota colgante de mercurio, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de calomel saturado (SCE) en presencia de perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) 0,1 M como electrolito soporte.

Como ha sido descrito previamente para otros complejos Ru-*p*-cimeno estudiados y para otros nitrofuranos relacionados, la cupla I pudo ser asignada al proceso de reducción del centro metálico [91]. Además, no se observaron cambios significativos en el potencial del pico respectivo para los diferentes compuestos estudiados. Tal como fue previamente observado, y reportado por el grupo, para los ligandos tiosemicarbazona y sus complejos de paladio, platino y rutenio, la cupla II corresponde al proceso quasi reversible que involucra la transferencia de un electrón para generar el anión radical  $\text{RNO}_2^{\cdot-}$  por reducción del grupo nitro [66,68,92]. Se estudió el efecto de la complejación con rutenio sobre el potencial de reducción de este pico. La Tabla 12 muestra los potenciales de reducción del grupo nitro para los cuatro compuestos rutenio-*p*-cimeno. Se incluye, además, el potencial previamente reportado para los ligandos correspondientes y algunos compuestos de coordinación de rutenio con estos mismos ligandos para poder establecer una comparación [92].



Compuesto	$E_{pc}^c$	$E_{pa}^d$
HL1 <sup>a</sup>	-0,84	-0,75
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	-0,80	-0,66
[RuCl <sub>2</sub> (HL1) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-0,98	-0,77
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL1)] <sup>b</sup>	-0,99	-0,74
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L1) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-1,09	-0,72
HL2 <sup>a</sup>	-0,79	-0,71
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	-0,84	-0,68
[RuCl <sub>2</sub> (HL2) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-1,02	-0,77
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL2)] <sup>b</sup>	-0,92	-0,73
HL3 <sup>a</sup>	-0,79	-0,71
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	-0,84	-0,68
[RuCl <sub>2</sub> (HL3) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-1,12	-0,69
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL3)] <sup>b</sup>	-0,96	-0,69
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L3) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-0,87	-0,73
HL4 <sup>a</sup>	-0,78	-0,70
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	-0,74	-0,65
[RuCl <sub>2</sub> (HL4) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-0,94	-0,77
[RuCl <sub>3</sub> (dmsO)(HL4)] <sup>b</sup>	-1,01	-0,72
[RuCl(PPh <sub>3</sub> )(L4) <sub>2</sub> ] <sup>b</sup>	-1,03	-0,72

<sup>a</sup>Referencia [66], <sup>b</sup>Referencia [92], <sup>c</sup>Potencial de pico catódico, <sup>d</sup>Potencial de pico anódico. Los potenciales se reportan en V vs. SCE

Tabla 12: Potenciales de reducción del grupo nitro obtenidos para los compuestos rutenio-*p*-cimeno y sus correspondientes ligandos, medidos en DMSO a 2000 mV/s. Se incluyen, además, los potenciales de los complejos de coordinación rutenio 5-nitrofuriltiosemicarbazona previamente reportados.

Como consecuencia de la coordinación al rutenio, fue posible observar una reducción en los potenciales del grupo nitro del ligando. Es decir, los compuestos rutenio-*p*-cimeno mostraron menores valores absolutos de potencial que sus respectivos ligandos libres, lo cual puede resultar en un efecto positivo en la actividad biológica de los nuevos compuestos, al poder ser biorreducidos con mayor facilidad.

En este sentido, la generación de estos nuevos dímeros Ru-*p*-cimeno incluyendo tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano como ligandos podría derivar en un

cambio favorable en el comportamiento de biorreducción, con respecto a los compuestos de coordinación con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano previamente reportados, que presentaban valores mayores de potenciales de reducción [92].

### **5.2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPLEJOS OBTENIDOS**

#### **5.2.3.1 ESTUDIOS *IN VITRO***

##### **5.2.3.1.1 ACTIVIDAD ANTI *T. cruzi***

###### **5.2.3.1.1.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS FORMAS EPIMASTIGOTA Y TRIPOMASTIGOTA**

Los compuestos obtenidos fueron evaluados *in vitro* contra la forma epimastigota del parásito (cepa Dm28c) como un screening primario de la actividad potencial de los mismos. En este sentido, los compuestos RuL1-RuL3 mostraron valores de  $CI_{50}$  mayores que 100  $\mu$ M. Sin embargo,  $[Ru_2(p\text{-cimeno})(L4)_2]Cl_2$  mostró una moderada actividad ( $86,1 \pm 14,11 \mu$ M), pero menor que para los ligandos tiosemicarbazona libres. Por otro lado, se evaluó el efecto de los compuestos RuL1-RuL4 sobre la forma tripomastigota (cepa Dm28c y cepa Y) del parásito. Es importante destacar, que ya es sabido que la actividad de un compuesto contra una forma en particular del ciclo de vida del parásito no garantiza una actividad similar contra las otras formas. Para poder explicar este hecho, es necesario considerar los cambios morfológicos que ocurren durante la transformación entre las diferentes formas a lo largo del ciclo biológico del parásito, los cuales implican cambios metabólicos importantes y cambios en el contenido macromolecular que terminan alterando la sensibilidad de los mismos a los diferentes fármacos.

En la Tabla 13 se exponen los resultados obtenidos de las concentraciones de complejos obtenidos que inhiben el 50% del crecimiento intracelular del parásito ( $CI_{50}$ ) a partir de las curvas dosis-respuesta, tanto contra la forma epimastigota (cepa Dm28c), así como para la tripomastigota (cepas Y y Dm28c).

Compuesto	Cl <sub>50</sub> μM cepa Y (tripomastigota)	<i>T. cruzi</i>	
		Cl <sub>50</sub> μM cepa Dm28c (tripomastigota)	Cl <sub>50</sub> μM cepa Dm28c (epimastigota)
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	59,42 ± 1,12	116,9 ± 1,085	>100
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	193,4 ± 1,13	231,3 ± 1,108	>100
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	75,96 ± 1,10	14,30 ± 1,065	ND
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	87,21 ± 1,06	130,9 ± 1,051	>100
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	11,69 ± 1,08	8,681 ± 1,008	86,10 ± 14,11 <sup>a</sup>
HL1	ND	9,76 ± 1,47	11,77 ± 2,91 <sup>a</sup>
HL2	ND	17,38 ± 1,98	11,87 ± 1,66 <sup>a</sup>
HL3	ND	18,48 ± 1,71	15,88 ± 2,83 <sup>a</sup>
HL4	ND	22,72 ± 1,64	9,52 ± 1,59 <sup>a</sup>
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	ND	63,67 ± 2,64	>100 <sup>a</sup>

Los resultados para los ligandos libres y para el complejo precursor [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> fueron incluidos a modo de comparación.

ND: no determinado

<sup>a</sup>: Diferencias significativas entre la cepa Dm28c de epimastigotas y de tripomastigotas (p<0,001)

Tabla 13: Actividad biológica *in vitro* de los complejos metálicos de rutenio-*p*-cimeno contra la forma epimastigota (Dm28c) y las dos cepas de tripomastigotas de *T. cruzi* (Y y Dm28c).

Los compuestos ensayados resultaron, en general, más activos contra la forma tripomastigota de *T. cruzi* comparado con la forma epimastigota. Estos resultados son significativos dado que la forma epimastigota se encuentra presente en el tracto digestivo del insecto vector, sin embargo, la forma tripomastigota es la forma infectiva en el huésped mamífero. En particular, el complejo [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L4)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> resultó 10 veces más activo en la forma tripomastigota que en la epimastigota con una Cl<sub>50</sub> incluso menor que la del fármaco de referencia nifurtimox (Cl<sub>50</sub> = 20,0 μM para tripomastigotas de la cepa Y y 24,7 μM para la cepa Dm28c). El complejo [Ru<sub>2</sub>(*p*-cimeno)<sub>2</sub>(L2)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> mostró también una muy buena actividad sobre la forma tripomastigota (cepa Dm28c) del parásito.

Las compuestos originalmente desarrollados como sales cloruro  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]^{2+}$ , resultaron más activos que sus análogos de hexafluorofosfato (Tabla 13). Las diferencias en la solubilidad podrían explicar las amplias e inesperadas diferencias en la actividad antitripanosomal de esta serie de compuestos estructuralmente relacionados. Para corroborar esta hipótesis, se sintetizó y evaluó  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L}2)_2]\text{Cl}_2$ . Este compuesto mostró una actividad de 2 a 17 veces mayor ( $\text{Cl}_{50} = 75,96 \mu\text{M}$  para la cepa Y y  $\text{Cl}_{50} = 14,30 \mu\text{M}$  para la cepa Dm28c) en comparación con su análogo de hexafluorofosfato,  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L}2)_2](\text{PF}_6)_2$  (Tabla 13).

#### 5.2.3.1.2 ACTIVIDAD ANTI *T. brucei*

Como se describió en el Capítulo 1, la Tripanosomiasis africana, en conjunto con la Tripanosomiasis americana y la Leishmaniasis representan las tres NTDs más mortales [93]. La Tripanosomiasis africana humana (Enfermedad del sueño), causada por el parásito *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*; *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*) es, actualmente, una enfermedad reemergente con carácter epidémico en diversas regiones de África, siendo fatal si no es tratada. La falta de vigilancia, asistencia sanitaria y nuevos tratamientos, así como desarrollo de resistencia por parte del parásito a los fármacos tradicionales favoreció la reaparición de esta enfermedad [93,94].

Los fármacos que se encuentran actualmente disponibles para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana humana, pentamidina, suramina, eflornitina y melarsoprol, mostraron problemas de toxicidad y variabilidad en la eficacia dependiendo del tipo y etapa de la enfermedad [94,95].

Hace algunos años, fueron decodificados los genomas de los parásitos tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major* encontrándose un alto grado de similitud entre ellos [96]. *T. cruzi* y *T. brucei* podrían presentar blancos enzimáticos y rutas metabólicas comunes lo que llevaría a pensar que fármacos que son activos frente a un parásito, pueden serlo también frente al otro. En este sentido, el fármaco anti *T. cruzi* nifurtimox combinado con eflornitina fue incluido por la OMS en la lista de fármacos recomendados para el tratamiento de la Tripanosomiasis africana [97].

En función de esos antecedentes, los compuestos RuL1-RuL4 fueron evaluados *in vitro* contra la cepa 427 de *T. brucei brucei*, mostrando actividad inhibitoria del crecimiento e induciendo un efecto antiproliferativo dosis dependiente para los parásitos tratados durante 24 horas. En la Tabla 14 se exponen las actividades *in vitro* contra *T. brucei brucei* de los compuestos RuL1-RuL4, sus respectivos ligandos tiosemicarbazona libres y el complejo precursor de síntesis.

Compuesto	<i>T. brucei brucei</i>
	CI <sub>50</sub> μM cepa 427
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	2,9
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	10,6
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	17,3
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	0,5
HL1	1,1
HL2	11,0
HL3	17,3
HL4	>100
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	>100

Tabla 14: Actividad biológica *in vitro* de los complejos metálicos de rutenio-*p*-cimeno en la cepa 427 de *T. brucei brucei*.

En este estudio, RuL1 y RuL4 han demostrado ser los más activos, con valores de CI<sub>50</sub> de 2,9 y 0,5 μM, respectivamente. La inhibición de crecimiento de *T. brucei brucei* de RuL2 y RuL3 fue de 6 a 30 veces más baja en comparación con los compuestos de RuL1 y RuL4. Es interesante destacar que, a diferencia de otros complejos de rutenio, la exposición de los parásitos a una concentración 1 μM de RuL4 por 24 horas adicionales, causó una muerte celular significativa (una caída de dos órdenes en el número de células). Estos resultados sugieren, para RuL4, un mecanismo de acción que podría involucrar un metabolismo lento del compuesto en productos más activos, o acumulativos generando un daño celular irreversible. Es importante destacar que este compuesto mostró un aumento significativo de la inhibición de crecimiento comparado con su respectivo ligando libre, HL4 (CI<sub>50</sub> > 100 μM).

Por otro lado, el complejo precursor  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2\text{Cl}_2]_2$  no presentó actividad inhibitoria del crecimiento del parásito ( $\text{Cl}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Los ligandos tiosemicarbazona HL1-HL3 *per se*, presentaron un efecto citotóxico comparable a sus complejos rutenio-*p*-cimeno (Tabla 14).

Cabe destacar que el compuesto RuL4 resultó el más activo en ambos parásitos lo que, de alguna manera, valida la hipótesis propuesta. Debe tenerse en cuenta que este complejo que contiene la tiosemicarbazona con el sustituyente fenilo, sería también el complejo más lipofílico, lo que podría estar afectando favorablemente la actividad antiparasitaria.

#### 5.2.3.1.3 CITOTOXICIDAD INESPECÍFICA EN MACRÓFAGOS

La especificidad de la actividad antitripanosomal de los compuestos RuL1 y RuL4, que presentan los mejores valores de actividad antiparasitaria, fue evaluada analizando la citotoxicidad contra la línea celular J774 de macrófagos de origen murino. El complejo RuL1 no resultó tóxico en macrófagos  $\text{Cl}_{50} > 100 \mu\text{M}$  mientras que RuL4 presentó una  $\text{Cl}_{50} = 26,2 \pm 1,7 \mu\text{M}$ . A partir de estos valores y los de la actividad biológica se calcularon los índices de selectividad correspondientes ( $\text{IS} = \text{Cl}_{50} \text{ en macrófagos} / \text{Cl}_{50} \text{ en el parásito}$ ). En relación a *T. cruzi*, el complejo RuL4 mostró una selectividad moderada ( $\text{IS} = 2\text{-}3$  dependiendo de la cepa de *T. cruzi*) mientras que para *T. brucei*, el índice de selectividad del complejo RuL4 es 52. El compuesto RuL1 no es selectivo para *T. cruzi* pero presenta una buena selectividad ( $\text{IS} > 35$ ) en *T. brucei brucei*.

En definitiva, la estrategia de conjugar en un mismo compuesto las tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitro-2-furaldehído con el *core* Ru-*p*-cimeno resultó mucho más efectiva para *T. brucei* que para *T. cruzi*.

#### 5.2.4 ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN

Como ya fue previamente descrito estos compuestos rutenio-areno fueron diseñados y desarrollados para presentar un mecanismo de acción múltiple, siendo capaces de afectar diferentes blancos o procesos biológicamente significativos para el parásito. Estos compuestos podrían actuar mediante la generación intraparasitaria de radicales

libres tóxicos para el mismo a través del fragmento 5-nitrofurilo y/o mediante la inhibición de la enzima cruzipaina a través del farmacóforo tiosemicarbazona. Por otro lado, estos compuestos podrían interactuar, complementariamente, con el ADN principalmente a través del grupo Ru-areno. En este sentido, en este Trabajo de Tesis se realizaron varios estudios con el objetivo de validar los blancos propuestos y, de esa manera, poder profundizar en el mecanismo de acción más probable para los nuevos compuestos Ru-*p*-cimeno.

#### **5.2.4.1 PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN *T. cruzi***

El mecanismo de acción establecido de los ligandos tiosemicarbazona conteniendo el grupo 5-nitrofurano, así como de sus complejos metálicos, involucra la producción de especies radicalarias libres tóxicas para el parásito por biorreducción intraparasitaria. En este sentido, la capacidad de producción de radicales libres de los compuestos rutenio-areno fue estudiada utilizando resonancia paramagnética electrónica (EPR) incubando los compuestos Ru-*p*-cimeno con epimastigotas intactas (cepa Dm28c) de *T. cruzi*. Debido a que las posibles especies radicalarias intracelulares generadas por la biorreducción (radical hidroxilo, por ejemplo) presentan tiempos de vida media muy cortos, se agregó *N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina (DMPO) como un agente atrapador de spin.

La Figura 30 muestra el espectro EPR para  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$ . El patrón de líneas obtenido y las constantes de acoplamiento hiperfino correspondientes ( $a_N = 15,0$  G,  $a_H = 22,5$  G) están de acuerdo con el atrapamiento de un radical centrado en carbono por el DMPO [97,98].

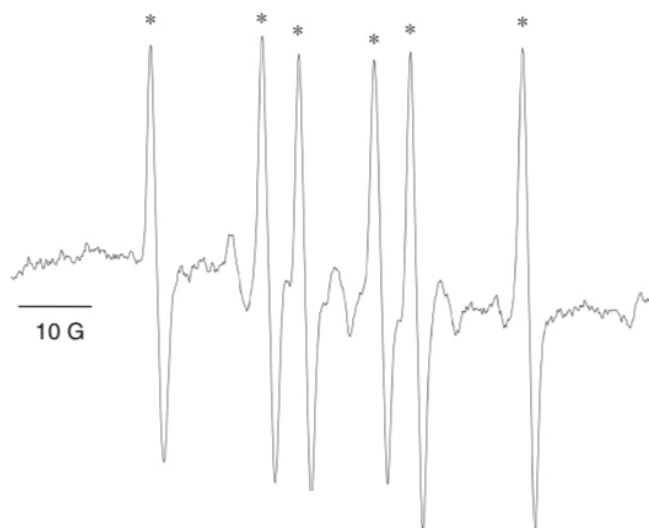


Figura 30: Espectro EPR de  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$  (1 mM) obtenido luego de 5 minutos de incubación con epimastigotas (cepa Dm28c; concentración de proteína final de 4-8 mg/mL), NADPH (1 mM), y DMPO (100 mM). En la imagen se pueden observar las señales características del aducto de spin DMPO-nitrocompuesto. Las señales no asignadas corresponden a la degradación del DMPO, las cuales también fueron observadas en ausencia de los complejos metálicos [99,100].

Este aducto podría ser relacionado con la biorreducción de los complejos y la formación de especies radicalarias nitroheterocíclicas-DMPO. Es importante destacar que este aducto fue detectado en todos los complejos estudiados. Además, el radical hidroxilo intracelular pudo ser observado en la etapa inicial de los experimentos. El aducto DMPO-OH presentó un patrón hiperfino 1:2:2:1 con  $a_N = a_H = 14,5$  G. Sin embargo sólo el aducto nitrocompuesto-DMPO es el que se estabiliza y permanece durante varios minutos.

A pesar de que los compuestos fueron capaces de producir radicales libres en el parásito intacto, no se observó una correlación entre la intensidad de las señales de EPR y la actividad anti *T. cruzi* observada. En este sentido, los compuestos de rutenio obtenidos mantienen el mecanismo de acción del ligando tiosemicarbazona libre incluyendo al 5-nitrofurano como farmacóforo [101]. Sin embargo, no parece ser el mecanismo de acción tripanomicida principal de los mismos.



#### 5.2.4.2 INHIBICIÓN DE LA CRUZIPAÍNA

El estudio de la actividad inhibitoria de la cruzipaína se realizó como parte de los estudios de elucidación del mecanismo de los compuestos rutenio-*p*-cimeno. Se estudió la inhibición de la enzima cruzipaína por los complejos en un rango de concentraciones inhibitorias de 10 a 50  $\mu\text{M}$ . En base a los resultados obtenidos, expuestos en la Tabla 15, estos compuestos presentan una potencia baja a moderada, como inhibidores de la cruzipaína.

Compuesto	IA (%) <sup>a</sup> a 50 $\mu\text{M}$
$[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$	69 $\pm$ 1
$[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2](\text{PF}_6)_2$	83 $\pm$ 1
$[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$	78 $\pm$ 2
$[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$	94 $\pm$ 1

Los valores expuestos representan la media de dos valores obtenidos

<sup>a</sup>IA: inhibición de actividad de cruzipaína expresada en porcentaje

Tabla 15: Actividad inhibitoria de la cruzipaína de los compuestos rutenio-*p*-cimeno.

Los compuestos RuL2 y RuL4 fueron los que presentaron el mayor efecto inhibitorio de la actividad de la enzima. Cabe destacar que estos complejos también presentaron la mayor actividad anti *T. cruzi*.

#### 5.2.4.3 ESTUDIO DE INTERACCIÓN CON ADN

Como ya se indicó en el capítulo introductorio, el ADN es un blanco particularmente importante de los compuestos metálicos bioactivos. Los nucleótidos presentan diferentes sitios de coordinación a iones metálicos, principalmente con N y/o O como átomos donores, pudiéndose generar uniones covalentes intra- o interhebras. Los efectos debidos al metal pueden sumarse a habilidades particulares de los ligandos presentes en su esfera de coordinación como intercalación entre pares de bases y la habilidad de producir cortes en una o ambas hebras del ADN. También, son posibles enlaces de hidrógeno o uniones electrostáticas [102].

En consecuencia, se llevaron a cabo estudios de interacción con ADN para los complejos de rutenio obtenidos, para poder dilucidar si la interacción podría formar parte del mecanismo de acción de los complejos obtenidos. En este sentido se realizaron los ensayos primarios de interacción con ADN de timo de ternera. La unión de los compuestos rutenio-*p*-cimeno al ADN fue estudiada mediante determinaciones de absorción atómica (para determinar metal unido al ADN) y mediciones de absorbancia en la región UV para la cuantificación del ADN. Los compuestos obtenidos presentaron una unión muy pobre al ADN (Tabla 16).

Compuesto	nmol Ru / mg base de ADN	Ru/base <sup>a</sup>	Base/Ru
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L1) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	42,7	0,014	71
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L2) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	28,2	0,009	108
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L3) <sub>2</sub> ](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	22,7	0,008	134
[Ru <sub>2</sub> ( <i>p</i> -cimeno) <sub>2</sub> (L4) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	37,5	0,013	80

<sup>a</sup> mol de rutenio por mol de pares de base de ADN

Tabla 16: Interacción de los compuestos de rutenio-*p*-cimeno con CT-ADN luego de 96 horas de incubación a 37 °C.

Los niveles de unión rutenio-ADN observados fueron aproximadamente 10 veces más bajos en comparación con los complejos de paladio(II) con tiosemicarbazonas de 5-nitrofurano previamente desarrollados por el grupo [66]. Estos resultados se encuentran en concordancia con la estructura de los complejos que aparentemente no permiten una unión del tipo covalente a las bases de ADN debido a la falta de enlaces débiles como los Ru-Cl.

Con el objetivo de adentrarse aún más en el mecanismo de interacción con ADN, estos compuestos fueron testeados en ADN plasmídico utilizando microscopía de fuerzas atómicas (AFM) y en ADN de timo de ternero utilizando medidas de viscosidad.

#### 5.2.4.3.1 RESULTADOS DE AFM

Las medidas de AFM y de viscosidad han demostrado ser herramientas útiles para el estudio del ADN, así como de las interacciones de los complejos metálicos con ADN a partir de las alteraciones producidas en la conformación del mismo [69,103]. En particular, la metodología de AFM se utiliza para visualizar moléculas individuales de ADN y puede ser utilizada para analizar los efectos inducidos por la interacción de los complejos metálicos sobre la conformación general de las moléculas de ADN. Se pueden medir los cambios de longitud de contorno y la distancia de extremo a extremo de las moléculas de ADN individuales en función de la concentración de los nuevos compuestos. Es así, que la técnica ha sido utilizada para obtener imágenes de una sola cadena de ADN, ADN de doble cadena, complejos ADN-proteínas y complejos ADN-compuesto metálico [104]. Entonces, en este Trabajo de Tesis se llevaron a cabo experimentos de AFM para proporcionar una visión más profunda del probable mecanismo de interacción de los complejos rutenio-*p*-cimeno con el ADN.

En este sentido, los complejos organometálicos de rutenio fueron incubados con el plásmido de ADN pBR322. Las imágenes de AFM obtenidas se presentan en la Figura 31. Se puede observar claramente que todos los complejos lograron modificar la estructura terciaria del plásmido luego de 24 horas de incubación a 37 °C en concentraciones que corresponden a una relación molar de compuesto: pares de base de ADN  $r_i = 1,5$ . Esto es constatado a partir de los cambios que sufre el ADN, como pliegues, entrecruzamientos y superenrollado.

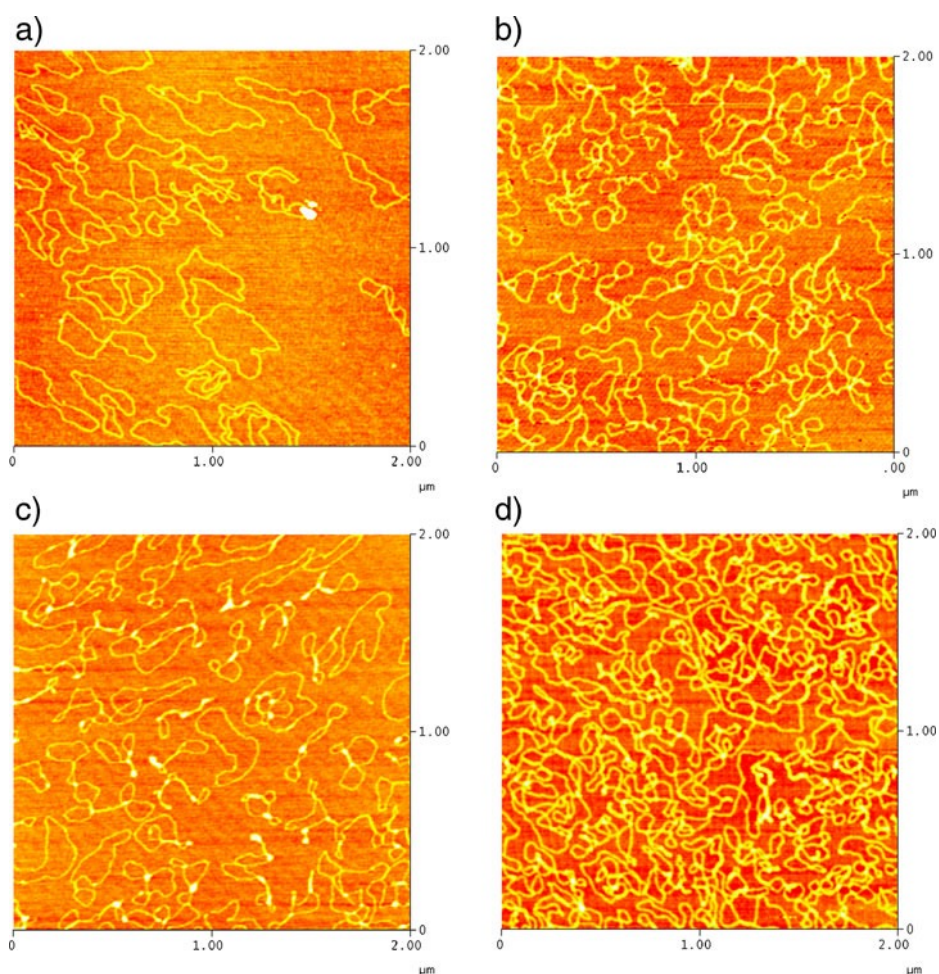


Figura 31: Imágenes de AFM mostrando las modificaciones presentadas en el plásmido pBR322 de ADN debido a la interacción del mismo con los compuestos Ru-*p*-cimeno:  $[\text{Ru}(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$  (a),  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2](\text{PF}_6)_2$  (b),  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L3})_2](\text{PF}_6)_2$  (c), y  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$  (d) en una relación molar compuesto:pares de base de ADN 1:5 y 24 horas de incubación a 37 °C.

El efecto observado es ligeramente dependiente de la naturaleza del ligando tiosemicarbazona. El complejo  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$  parece presentar la interacción más evidente de los cuatro nuevos compuestos de rutenio-*p*-cimeno. Se puede constatar que su efecto pudo ser visualizado como modificaciones más intensas en la estructura terciaria del ADN en conjunto con un aumento del espesor del ADN (Figura 31).

### 5.2.4.3.2 RESULTADO DE LAS MEDIDAS DE VISCOSIDAD

Las mediciones hidrodinámicas que son sensibles a los aumentos de longitud de la doble hélice del ADN, como por ejemplo la medida de viscosidad de soluciones de esta biomolécula, se consideran como las menos ambiguas y la prueba más crítica de un modelo de unión en solución al ADN en ausencia de datos cristalográficos y de datos estructurales de RMN [105-109]. Un modelo clásico de intercalación resulta en el alargamiento de la hélice debido a que los pares de bases se separan con el fin de acomodar el ligando unido, lo que lleva a un aumento de la viscosidad del ADN [105]. Por ejemplo, el intercalante bromuro de etidio aumenta la viscosidad relativa específica, como se esperaría para una interacción de intercalación [106,110]. Por otro lado, la disminución de la viscosidad relativa específica del ADN se observa en los casos de interacción covalente, como la del cisplatino, que produce dobleces o torceduras en la hélice del ADN [111].

Con el fin de elucidar el modo de unión de los compuestos de rutenio obtenidos se llevaron a cabo las mediciones de viscosidad de soluciones de ADN de timo de ternero (CT-ADN) en función de la variación de los valores de  $r_i$ . En la figura 32 se exponen, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos a partir de las medidas de viscosidad para  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$ .

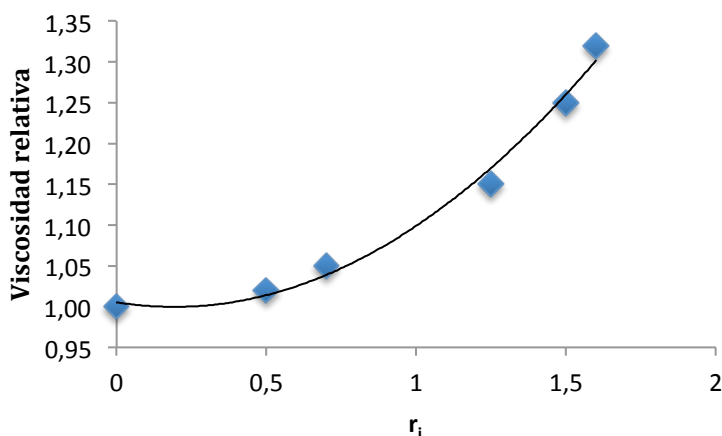


Figura 32: Gráfico de viscosidad relativa vs  $r_i$  para el compuesto  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L1})_2]\text{Cl}_2$  ( $r_i$  = mol de complejo/mol de pares de base de ADN)

Todos los complejos aumentaron la viscosidad de las soluciones de CT-ADN, siendo este aumento dependiente de la concentración para los valores de  $r_i$  ensayados. Como ya se indicó, este comportamiento se atribuye usualmente a una interacción de tipo intercalante [86,112,113]. Es importante mencionar que se han reportado estudios exhaustivos de otros complejos rutenio(II)-areno que mostraron importantes efectos distorsivos del ADN, pero se pudo descartar la intercalación en la doble hélice del ADN a través del fragmento areno para los complejos de rutenio con grupos *p*-cimeno y benceno [114]. Otros tipos de interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, contactos hidrofóbicos e interacciones electrostáticas podrían ser las responsables de los efectos observados [115].

#### **5.2.4.4 ESTUDIO DE UNIÓN A PROTEÍNAS**

##### **5.2.4.4.1 ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

La albúmina sérica humana (HSA en inglés) consiste de una cadena única de polipéptidos de 585 aminoácidos [116], organizada en tres dominios, I, II y III. Es la proteína más abundante en plasma, representando alrededor del 60% del total de las proteínas plasmáticas (aproximadamente 40 mg/mL o su equivalente a 600 mM). Esta proteína es el mayor transportador no específico en el sistema circulatorio, siendo caracterizada por su extraordinaria capacidad de unión a una amplia variedad de compuestos, tanto compuestos metabólicos endógenos, como agentes terapéuticos exógenos. La unión a HSA afecta la concentración de los fármacos libres en plasma, actuando como un depósito para el agente terapéutico. Es importante destacar que esta unión juega un rol decisivo en la biodisponibilidad *in vivo* de cualquier fármaco, pudiendo incrementar su solubilidad, extender su vida media o retardar o evitar su ingreso a los tejidos. Además, puede facilitar el ingreso a los tejidos inflamados o tumorales que presentan una permeabilidad incrementada a macromoléculas, como se explicará más adelante con mayor detalle [117-120]. De esta manera, el estudio de la unión a la albúmina sérica humana sería el primer acercamiento a la farmacocinética de cualquier potencial fármaco. La unión de los complejos rutenio-*p*-cimeno a las proteínas plasmáticas es ampliamente reconocida como un paso crucial para la

biodisponibilidad de los mismos [121]. La determinación de la unión a HSA es requerida para los estudios de potenciales agentes terapéuticos por la FDA [116].

La unión de los compuestos RuL1 y RuL4 a la albúmina sérica fue estudiada mediante métodos de espectroscopía electrónica (absorción Ultravioleta-Visible, Dicroísmo Circular y Fluorescencia). Se seleccionó estos compuestos ya que como se verá más adelante, el complejo RuL4 presenta actividad antitumoral promisorio. Por otro lado, el complejo RuL1 es el complejo más simple y se estudió con fines comparativos.

La selección de las dos primeras técnicas se basa en que éstas permiten obtener información de los cambios producidos en el entorno del complejo estudiando las transiciones electrónicas del mismo. La técnica de fluorescencia de HSA ofrece información de cambios en la proteína siguiendo cambios en las propiedades fotofísicas del residuo Trp214 responsable de la fluorescencia de la HSA.

#### *Estudio de unión a proteínas mediante Dicroísmo Circular*

La espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC) es una poderosa técnica frecuentemente utilizada para monitorear las interacciones entre proteínas y fármacos a partir del seguimiento de los cambios en el espectro de la proteína en el rango de longitudes de onda de 190-300 nm. El espectro DC en el rango de 200-250 nm es capaz de brindar información de la estructura secundaria de la proteína y los cambios que acontecen luego de la coordinación a un compuesto. La necesidad de utilizar DMSO para solubilizar los complejos de rutenio en este estudio excluyó la posibilidad de utilizar la espectroscopía de absorción UV y DC por debajo de 270 nm (debido a la propia absorción del DMSO). De todas formas, el dicroísmo circular puede ser una técnica muy informativa si se observa una señal de dicroísmo circular inducido (DCI) que resulta de la quiralidad que es transmitida a las transiciones electrónicas de un compuesto silencioso al DC (no quiral) si se une en proximidad de los grupos quirales de la proteína.

Los complejos RuL1 a RuL4 resultaron especies silenciosas al DC y ninguno de ellos posee centros quirales. Sin embargo, presentan diversas bandas de absorción para  $\lambda > 270$  nm, región en la cual la HSA no absorbe la radiación. Entonces, la observación de señales DC mayores a 320 nm representarían una clara evidencia de la unión del

compuesto a la proteína. Este es el caso para los compuestos RuL1 y RuL4 y su interacción con HSA que puede ser monitoreada mediante las señales de DCI medidas (Figura 33). Dado que en esa región espectral tanto el complejo como la proteína son silenciosos el espectro DCI observado es reflejo exclusivo de la interacción entre ambos. En este sentido se estudió la variación de esta interacción entre los complejos metálicos y la proteína en función del tiempo a efectos de determinar las condiciones de equilibrio para ambos sistemas. Se estableció que luego de 20 horas de incubación los sistemas alcanzaron el equilibrio. Para tiempos de incubación mayores, los cambios en el espectro de DC se tornaron despreciables. Las Figuras 33 a 37 incluyen los datos de DC obtenidos para RuL1 y RuL4. La Figura 33 muestra una señal de DCI débil (consistiendo en dos bandas negativas a  $\approx 400$  nm (396 nm, banda I) y  $\approx 500$  nm (494 nm, banda II)) detectadas luego de 1 hora y correspondientes a la unión de RuL1 a HSA. El hecho de que la señal de DCI es observada luego de un tiempo de incubación pequeño sugiere que el complejo no se disocia en las especies monoméricas, y tampoco pierde ninguno de sus ligandos coordinados, y es más factible que la unión de RuL1 a HSA involucre a la especie dimérica original. Esta hipótesis es reafirmada por el espectro UV-Visible del complejo RuL1 luego de 1 hora de incubación con HSA, mostrando un corrimiento batocrómico de aproximadamente  $\approx 25$  nm en la banda de absorción, desde 415 nm (en el complejo libre) a 440 nm (en la especie unida a HSA). Además, el espectro UV-Visible de RuL1 (para  $\lambda > 350$  nm) no se modifica en presencia de la proteína durante un tiempo de 24 horas. La intensidad relativa de las dos bandas de DCI I y II se modifica con el tiempo de incubación creciente (Figura 33.A y 33.B), con un concomitante corrimiento al azul (hipsocrómico) (aproximadamente 10 nm) en  $\lambda_{\text{max}}$  para ambos. La intensidad relativa de las bandas I y II de DCI en condiciones de equilibrio (Figura 33.C) parece ser dependiente de la concentración: mientras que la banda I se intensifica con concentraciones crecientes de complejo, sólo se observan cambios pequeños para la banda II luego de superar la relación molar RuL1:proteína de 1:1.



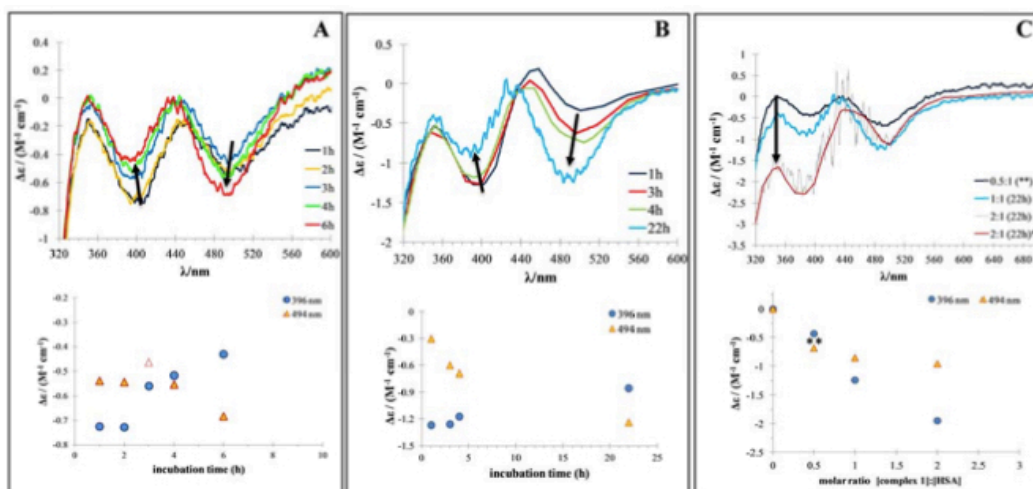


Figura 33: La unión del complejo RuL1 a HSA monitoreada mediante espectroscopía DC: a) Tiempo-dependiente: señal de DCI registrada para la solución de HSA 100 mM con una relación molar proteína:complejo de 1:0,5 (las flechas indican los cambios observados a tiempos de incubación crecientes); en la parte inferior se observa la evolución correspondiente de los valores diferenciales de absorción molar ( $\Delta\epsilon$ ) para la banda I de DCI (círculos) y la banda II (triángulos) con tiempos de incubación crecientes; C) Espectro de DCI en condiciones de equilibrio: Cambios en la señal de DCI con concentraciones crecientes de RuL1 (\*: espectro para la relación molar proteína:complejo 1:2; \*\*: Espectro de DCI para un tiempo de incubación de 6 horas): Cambios en  $\Delta\epsilon$  observados para la banda I (círculos) y para la banda II (triángulos) con concentraciones crecientes de complejo RuL1.

Las observaciones pueden ser explicadas de forma tentativa suponiendo la existencia de dos sitios de coordinación diferentes para el complejo RuL1 en HSA, cada uno correspondiente a cada señal de DC. Uno de los sitios probablemente se satura a una relación molar de 1:1 en condiciones de equilibrio. La dependencia con el tiempo de la intensidad relativa de las dos bandas sugiere una preferencia cinética por uno de los sitios de acción (posiblemente más accesible al solvente), resultando, en el debido tiempo, en una interacción termodinámica más estable. Luego de la adición de un segundo mol equivalente de complejo (Figura 33.C), el patrón de las señales de DC cambia: la banda I (a aproximadamente 385 nm) aumenta su intensidad, mientras que la banda II (a aproximadamente 500 nm) se corre al rojo. De esta manera, está claro que el complejo 1 se une a HSA, y esta unión ocurre bastante rápido. Si se agrega un exceso de complejo (probablemente esto no sea extrapolable a condiciones *in vivo*), se puede observar que un segundo sitio de unión más débil (correspondiente a una señal de DC diferente) se encuentra disponible.

La unión de RuL4 a HSA fue estudiada con mayor detalle. Los espectros de DCI en soluciones conteniendo HSA y RuL4 son mucho más intensos que sus análogos para RuL1, exhibiendo un patrón bastante diferente que también cambia con tiempos de incubación crecientes (Figura 34). Las señales fuertes de DCI son registradas luego de un corto período de incubación de 10 minutos (Figura 34.A1) mostrando diversas señales: una intensa señal positiva a  $\approx 500$  nm (503 nm), una negativa menos intensa a  $\approx 400$  nm (416 nm) y una tercera negativa a aproximadamente 340 nm (posiblemente también se presente otra señal, también negativa, enmascarada a menores longitudes de onda). Con los tiempos de incubación crecientes, de hasta 1 hora, la intensidad de todas las bandas de DCI aumentan ligeramente con un concomitante corrimiento al azul de 10 nm, luego de eso la intensidad de las señales positivas comienza a disminuir (Figura 34. A2 y 34.A3). En condiciones de equilibrio (luego de 24 horas) se observa un espectro DC completamente diferente con una inversión de las dos señales principales de DCI de menor energía (Figura 34.B).

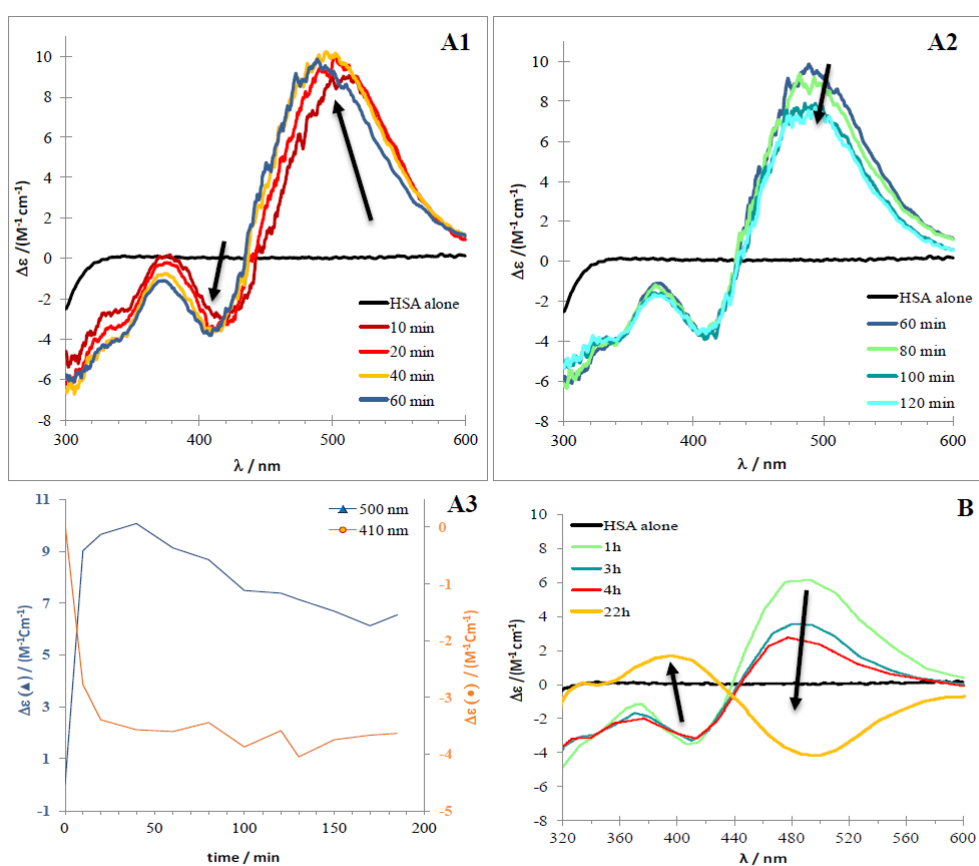


Figura 34: Dependencia con el tiempo de la unión de RuL4 con HSA: A1/A2) Señal de DCI para una solución de HSA 100  $\mu$ M incubada hasta 2 horas a  $32 \pm 2$  °C con RuL4 con una relación molar de

proteína:complejo 1:2, y A3) Evolución correspondiente de los valores diferenciales de absorción molar ( $\Delta\epsilon$ ) para las señales positivas a 500 nm (triángulos, eje E izquierda) y negativas a 410 nm (círculos, eje Y derecha) con tiempos de incubación crecientes; B) Evolución de la señal de DCI para mayores tiempo de incubación resaltando la inversión del efecto Cotton en condiciones de equilibrio (señal registrada a temperatura ambiente para una solución de HSA 100  $\mu$ M incubada con RuL4 con una relación molar 1:1 con agitación constante ( $37 \pm 0,5$  °C) entre mediciones). Las flechas resaltan los cambios observados con los tiempos crecientes en todos los espectros de DCI.

La señal fuerte de DCI observada luego del período de incubación corto de 10 minutos indica que el complejo se está uniendo a la proteína como una entidad única. Además, como ya fue descrito en el estudio de ESI(+)-MS, el complejo dimérico de partida pudo ser observado en soluciones con 24 horas de reposo. Esto también se puede reafirmar con los espectros UV-Vis de RuL4 en ausencia y presencia de la proteína (Figura 35). Las señales de menor energía muestran un corrimiento hacia el rojo de  $\approx 30$  nm luego de 10 minutos (a  $32 \pm 2$  °C), seguido por una pérdida de intensidad y un pequeño corrimiento hacia el azul ( $\approx 3$  nm) con tiempos de incubación crecientes de 1 hora, luego de la cual la absorbancia aumenta ligeramente hasta 2 horas. Luego de 22 horas de incubación, el espectro del complejo RuL4 unido a HSA muestra un  $\lambda_{\text{max}}$  a 455 nm (corrimiento al rojo (batocrómico) de 25 nm) y un hipsocromismo de 23% cuando se lo compara con el espectro del complejo libre.

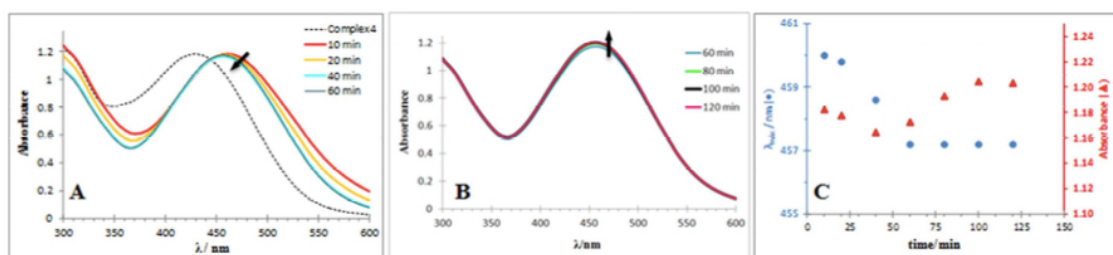


Figura 35: Dependencia con el tiempo de la unión de HSA con el complejo RuL4: A + B) Espectro UV-Visible registrado para el complejo 4 (200  $\mu$ M, línea punteada negra) y para la solución de HSA:4 a una relación molar de 1:2 (100 mM: 200  $\mu$ M, líneas continuas de colores) registrados en el tiempo, hasta 2 horas a; C) cambio en  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\bullet$ ), y en la absorbancia correspondiente ( $\blacktriangle$ ) en el espectro de RuL4-HSA en función del tiempo (hasta 2 horas). Las muestras fueron incubadas a  $32 \pm 2$  °C en PBS pH= 7,4/ 1% DMSO; los espectros de DC fueron registrados a la misma temperatura.

La dependencia de la señal de DCI con el tiempo sugiere que el complejo RuL4 dimérico y voluminoso se encuentra uniéndose a la proteína posiblemente a través de su fragmento más hidrofóbico en primer lugar, y luego se reacomoda espacialmente dando una orientación más favorable a sus ligandos (es importante remarcar que la albúmina es una proteína bastante flexible). Otra posible explicación es la unión del complejo a diferentes sitios de la proteína, con una preferencia cinética por uno de los sitios de unión, y un rearrreglo, con el paso del tiempo, a otro(s) sitio(s) generando una interacción más estable. Wang & Dyson (y colaboradores) observaron que la interacción del derivado *p*-cimeno  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\text{en})][\text{PF}_6]$  (en= etilendiamina) con albúmina mostró una preferencia por diferentes sitios de unión en función del tiempo, siendo la unión a Cys-34 favorecida cinéticamente sobre la unión a los residuos His y Met que fueron preferidos termodinámicamente, en particular el residuo His-128, más accesible al solvente [122].

A pesar que los resultados de DC por sí solos no permitieron establecer la ubicación exacta del complejo en la proteína, nuestros resultados indican que la interacción del complejo RuL4 con albúmina involucra, indudablemente, alguna movilidad del compuesto, tanto en la superficie de la proteína como su reacomodo en algún sitio específico, dando lugar al arreglo preferido, en lugar de la primera y muy rápida interacción. En condiciones de equilibrio los espectros de DC de RuL4 muestran dos señales de DCI,  $\lambda(+)$  a  $\approx 400$  nm y  $\lambda(-)$  a  $\approx 494$  nm, las cuales aumentan de intensidad con concentraciones crecientes de complejo (Figura 36.A). Por encima de una relación molar de 1:1 se puede observar una señal ancha y débil centrada en  $\lambda(-) \approx 325$  nm (Figura 36.B). La intensidad de las tres bandas aumenta con el agregado adicional de RuL4 a la proteína hasta alcanzar excesos en las relaciones molares de 1,75-2 (Figura 36.C), y luego de superar un exceso molar de hasta 3, solamente la banda de  $\approx 325$  nm se vuelve más intensa.

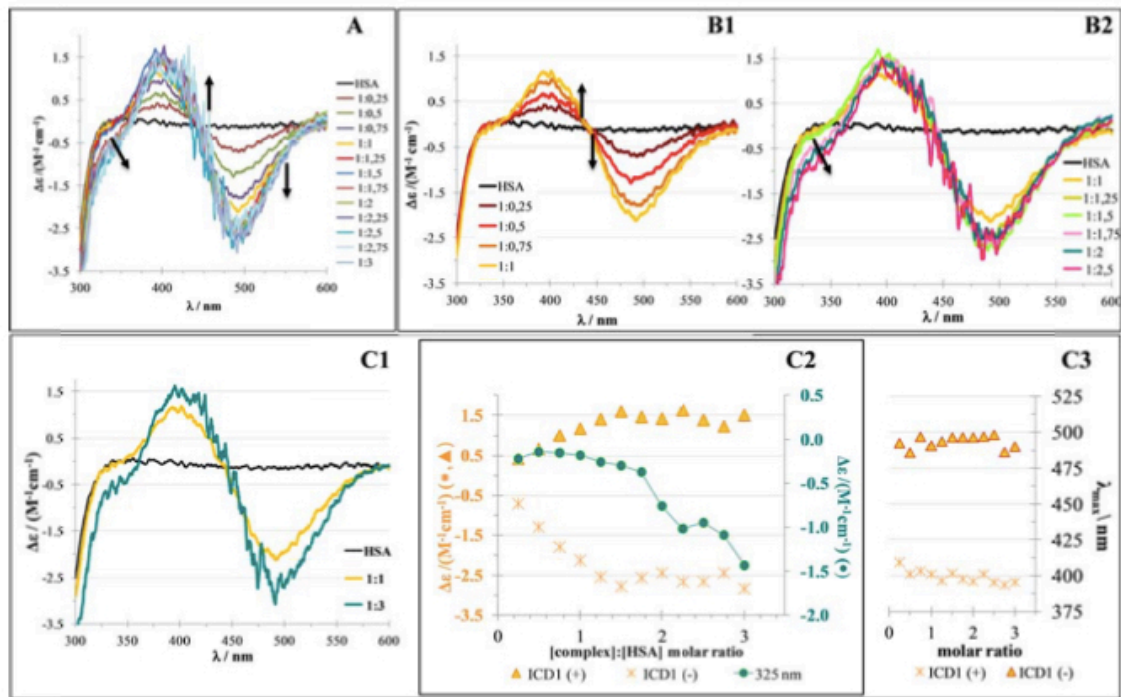


Figura 36: Señal de DCI observada para la unión de RuL4 con HSA en condiciones de equilibrio. A) Espectro de DC registrado a temperatura ambiente para HSA en ausencia y en presencia de RuL4 (las flechas indican los cambios con el aumento creciente de la relación molar proteína:complejo); B) Dependencia de la señal de DCI con la concentración de RuL4: La intensidad de las dos señales de DCI observadas aumenta hasta una relación molar de 1:1 (B1) y para mayores concentraciones (B2), se hace visible una tercer señal negativa. C) Evidencia de los dos sitios de unión para RuL4 en HSA: el primer sitio a una relación molar de 1:1 (exhibiendo dos señales de DCI) se encuentra ocupado en un gran porcentaje (C1), mientras que a una saturación de 1:2 se observa el segundo sitio de acción (con una señal adicional de DCI a  $\approx 325$  nm); C2. La representación de  $\Delta\epsilon$  con concentraciones crecientes de complejo resalta los cambios en la señal de DCI inducido para  $\lambda_{\max}(+)$ ,  $\lambda_{\max}(-)$  y  $\lambda(-) = 325$  nm; C3. Los cambios de  $\lambda_{\max}(+)/\lambda_{\max}(-)$  con una concentración de RuL4 100  $\mu\text{M}$ . ( $C_{\text{HSA}} = 100$   $\mu\text{M}$ , 22 horas de incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  en PBS pH=7,4/1% DMSO).

El límite de solubilidad de RuL4 en presencia de HSA en buffer fosfato salino pH = 7,4/ 1% DMSO resultó de 300  $\mu\text{M}$ , el cual no permitió recolectar información en condiciones de saturación de la unión. Sin embargo, nuestros datos de DC indican la existencia de dos especies de unión RuL4-HSA diferentes, uno con señales de DCI<sub>1</sub>(+) y DCI<sub>1</sub>(-), y un segundo sitio de unión con señales de DCI correspondientes a la nueva banda a 325 nm (Figura 36.C2).

Las constantes de unión para estos dos aductos fueron calculadas a partir de los datos de DC obtenidos utilizando el programa PSEQUAD [123], y considerando que el

complejo de partida no se disocia. Los resultados se exponen en la Tabla 17. Fue posible refinar las constantes de unión para estas dos especies distintas de Ru-HSA, designadas como {HSA-C} y {HSA-C<sub>2</sub>} (C se refiere al complejo RuL4), con un buen ajuste a los datos experimentales.

Modelo	Datos de DC	
	<sup>c</sup> log β (± 3DS)	<sup>d</sup> log K'
HSA-C	log β <sub>11</sub> = 5,14 (± 0,06)	log K' <sub>1</sub> = 5,14
HSA-C <sub>2</sub>	log β <sub>12</sub> = 9,64 (± 0,21)	log K' <sub>2</sub> = 4,50

<sup>a</sup>En el modelo de especiación se asume que el complejo se une como una entidad dimérica.  
<sup>b</sup>Refiere al complejo RuL4 y HSA-C y HSA-C<sub>2</sub> son las dos especies formadas de {HSA-Complejo}.  
<sup>c</sup>β<sub>1n</sub> es la constante de formación (o unión) global definida como β<sub>1n</sub>= [HSA-C<sub>n</sub>]/[HSA][C]<sup>n</sup>; DS es la desviación estándar  
<sup>d</sup>K' son las constantes parciales de formación definidas como: K'<sub>1</sub>= [HSA-C]/[HSA][C]; K'<sub>2</sub>= [HSA-C<sub>2</sub>]/[HSA-C][C]. La distribución de la concentración de las especies formadas en este sistema se representa en la Figura 37 para las condiciones de las mediciones de DC.

Tabla 16: Constantes de unión a la albúmina calculadas para las especies formadas en los sistemas HSA-RuL4 (22 horas de incubación a 37 C en PBS/1%DMSO) calculado a partir de los espectros con PSEQUAD<sup>a,b</sup>.

La distribución de la concentración de las especies formadas en este sistema se representa en la Figura 37 para las condiciones utilizadas en las medidas de DC, y también incluye el espectro individual calculado para el aducto {HSA-C}, Δε<sub>11</sub>, y para el aducto {HSA-C<sub>2</sub>}, Δε<sub>12</sub>, los cuales son consistentes con los espectros de DCI experimentales observados y por lo tanto validan el modelo propuesto.

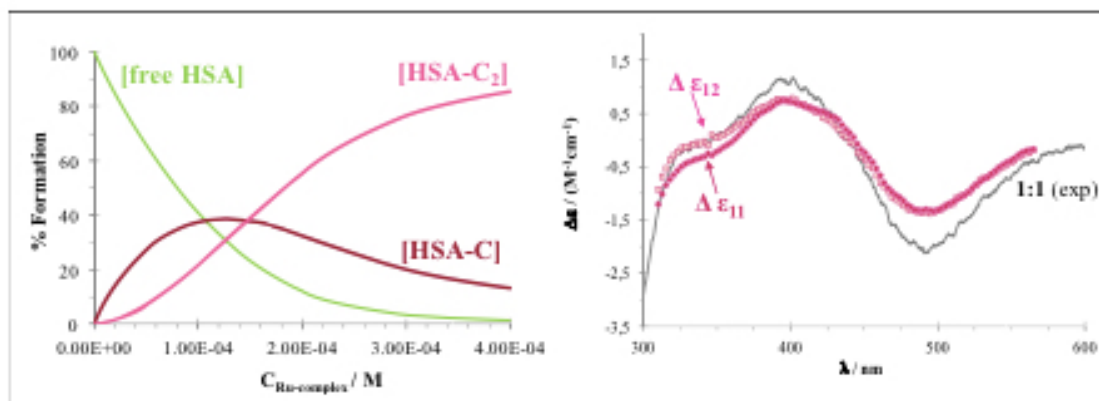


Figura 37: Los aductos de proteína-complejos son detectados en el sistema HSA-complejo mediante espectroscopía de DC. Izquierda: Diagrama de distribución de concentración obtenido para el sistema con las constantes condicionales de unión tomadas de la tabla 17 y el programa HySS, donde HSA-C y HSA-C<sub>2</sub> son los dos aductos formados con el complejo RuL4 ( $C_{\text{HSA}} = 100 \mu\text{M}$  (constante),  $C_{\text{RuL4}} = 0 \leftrightarrow 400 \mu\text{M}$ , con 22 horas de incubación a 37 °C y PBS pH = 7,4/1%DMSO); derecha: espectro de DCI calculado para las especies {HSA-C},  $\Delta\epsilon_{11}$ , y para {HSA-C<sub>2</sub>},  $\Delta\epsilon_{12}$ , con PSEQUAD, y la señal experimental de DCI para este sistema de complejo de Rutenio-HSA a una relación molar de 1:1

De esta manera, los datos obtenidos a partir de la espectroscopía de absorción electrónica pueden proveer una clara evidencia de la interacción para ambos complejos RuL1 y RuL4 con HSA. La unión ocurre de forma rápida para ambos y es de carácter fuerte, dando lugar en ambos casos a espectros de DCI dependientes del tiempo, sugiriendo que estos complejos sufren un rearrreglo espacial mientras se acomodan con la proteína. Los cambios espectrales observados en ambos espectros isotrópicos de DC de estos dos sistemas indican que la unión del complejo RuL4 a HSA es más fuerte que la misma para RuL1. De esta manera, se puede inducir que la presencia del sustituyente fenilo en el primero podría aumentar las interacciones hidrofóbicas con la proteína.

#### *Estudio de unión a proteínas mediante Fluorescencia*

Con el objetivo de poder entender de una forma más profunda las interacciones entre RuL1 y RuL4 con la albúmina sérica humana, se llevaron a cabo estudios de espectroscopía de fluorescencia utilizando la fluorescencia intrínseca de la HSA debido al residuo individual de triptófano, Trp214, cuando ocurre una excitación a 295 nm y/o

se observa emisión a 340 nm (o longitudes de onda mayores). Este residuo yace entre dos sitios de unión estructuralmente selectivos (sitios de unión I y II de Sudlkw) [124] y es muy sensible a los cambios que pueden ocurrir en el entorno ya sea por la unión de un fármaco o por las alteraciones estructurales de la proteína.

En la Figura 38 se puede observar el espectro de emisión de la proteína en presencia de concentraciones crecientes del complejo RuL4. En ausencia del complejo, el máximo de intensidad de emisión para Trp214 se observa a 334 nm, mostrando que este residuo se encuentra protegido del solvente acuoso, donde el Trp podría tener un máximo de emisión de aproximadamente 350 nm.

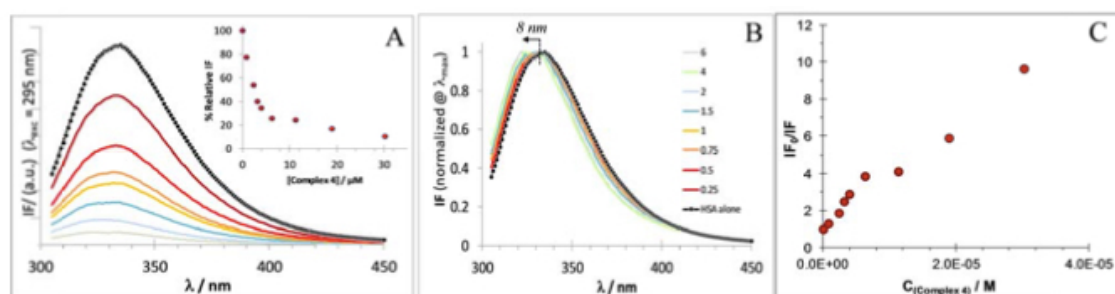


Figura 38: Resultados de fluorescencia en estado estacionario para la unión de RuL4 con HSA. A) Quenching de emisión de fluorescencia de Trp214 ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) observado luego de la unión a RuL4; inset: % relativo de intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{em} = 340$  nm con concentraciones crecientes de complejo. B) Espectro de emisión de fluorescencia de HSA ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) normalizado a  $\lambda_{em}^{max}$  con relaciones molares de complejo:proteína variables. El complejo RuL4 induce un corrimiento hacia el azul en el espectro de emisión del Trp214 de HSA. C) Curva de Stern-Volmer obtenida para las mediciones de fluorescencia en estado estacionario de este sistema. ( $C_{HSA} = 5,2 \mu M$ , constante, muestras preparadas en medio 2%DMSO/PBS, con 20 horas de incubación a 37 °C, las medidas de  $I_f$  se tomaron a temperatura ambiente de  $\approx 23$  °C).

El complejo RuL4 induce un corrimiento significativo hacia el azul (hipsocrómico) en la emisión de la proteína, la cual se hace más pronunciada a medida que aumenta la concentración de RuL4 (el corrimiento máximo observado es de 8-9 nm, Figura 38.B). Esto indica que el microambiente alrededor de Trp214 se ve enmascarado del ambiente acuoso, y la incorporación del complejo RuL4 en las proximidades del residuo de Trp214 podría ser la causa de este corrimiento. Es importante destacar que este complejo presenta un fragmento hidrofóbico que probablemente sea capaz de



incorporarse a la proteína, direccionando así, sus ligandos más hidrofílicos hacia el exterior. Además, el complejo presenta un tamaño importante por lo que dificultaría la accesibilidad de las moléculas de agua al Trp214. Este efecto contrasta con la unión de moléculas más pequeñas incluyendo diversos ácidos grasos y bilirrubina, los cuales inducen ligeros cambios estructurales en el plegado de la proteína sin corrimientos apreciables de las longitudes de onda de los máximos de emisión de Trp214 [125]. El corrimiento hacia el azul (hipsocrómico) observado indica que el complejo de rutenio no se encuentra induciendo una denaturalización de la proteína, lo cual sería consistente si se observara un corrimiento hacia el rojo (batocrómico) en la  $\lambda_{em}^{max}$  (dado que el desplegamiento de la proteína podría aumentar la exposición de Trp214 a las moléculas de agua, y no lo opuesto como fue observado).

Luego de corregir los datos de  $I_{F_0}/I_F$  para el corrimiento espectral, se constataron los cambios en la intensidad de fluorescencia de Trp214 como consecuencia de la interacción de la proteína con el complejo RuL4. El análisis cuantitativo de esos datos puede proveer información acerca de los mecanismos de interacción y las constantes de unión, las cuales pueden brindar un mayor aporte al modelo de unión propuesto a partir del análisis de los datos de DC.

La intensidad emitida a 340 nm fue utilizada para construir la curva de Stern-Volmer representada en la figura 38.C. Esta longitud de onda fue la elegida dado que se encuentra cerca de la longitud de onda del máximo de emisión (de esa manera la sensibilidad es cercana a la del máximo), pero se encuentra en longitudes de onda más cercanas al rojo en relación a la señal de scattering Raman del agua, y de esa manera la relación de señal/base es mucho más favorable que la que sería si se hubiese utilizado la longitud de onda del máximo de emisión. Se puede observar claramente que la curva de Stern-Volmer para la disminución (quenching) de HSA a partir de la unión con el complejo RuL4 presenta una desviación negativa de su linealidad en el rango de concentración baja y media. Esto fue confirmado a partir del ajuste a un modelo cuadrático, recuperando un coeficiente cuadrático negativo, el cual no posee un significado físico. Además, la espectroscopía de fluorescencia en función del tiempo pudo ser utilizada para poder esclarecer los mecanismos detrás de la inusual curva de Stern-Volmer obtenida para la disminución de la intensidad de fluorescencia (quenching) de HSA luego de la coordinación con RuL4. En la curva de Stern-Volmer

para los resultados expuestos en la Figura 39, la desviación negativa de la linealidad es aún más clara. La media del tiempo de vida de fluorescencia también fue representada como una función de la concentración de complejo. Conforme ocurre la unión de RuL4 con la proteína, la vida media de fluorescencia tiende a valores infinitos. Estos resultados son consistentes con que en el sistema opera un mecanismo de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) [126,127]. Existe una superposición significativa entre la emisión de HSA-Trp214 y la absorción de RuL4 (Figura 40), y es posible que un proceso, sin radiación, de transferencia de energía de excitación desde un donador D (en este caso HSA-Trp214) a una molécula aceptora A (en este caso el compuesto RuL4) pueda ocurrir. Este mecanismo de disminución (quenching) fue propuesto para otras especies que unidas a HSA eran absorbentes, como la bilirrubina [125] y derivados fluorescentes de 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD) de ácidos biliares [126].

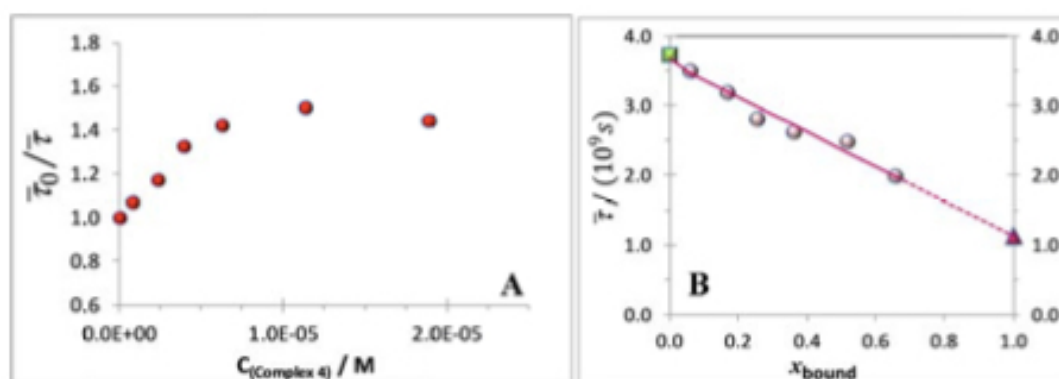


Figura 39: Resultados obtenidos a partir de la fluorescencia resuelta en función del tiempo para la unión del complejo RuL4 con HSA. A) Curva de Stern-Volmer para el tiempo de vida de fluorescencia del Trp214 de HSA con concentraciones crecientes de RuL4 en PBS/2%DMSO ( $\lambda_{\text{exc}} = 279$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340$  nm, temperatura ambiente). B) Tiempo de vida de fluorescencia de Trp214 de HSA como una función de la fracción molar relativa de {HSA-C} al HSA libre definido por la ecuación (2), donde  $\blacksquare$  es  $\tau_0 = \tau_{\text{libre}} = 3,71$  ns y  $\blacktriangle$   $\tau_{\text{unido}} = \tau_{(\text{HSA-C})} = (1,1 \pm 0,2)$  ns. La línea es el mejor ajuste a los datos tomando en cuenta la primer constante de unión  $\beta_{11}$  determinada a partir de los datos de DC.

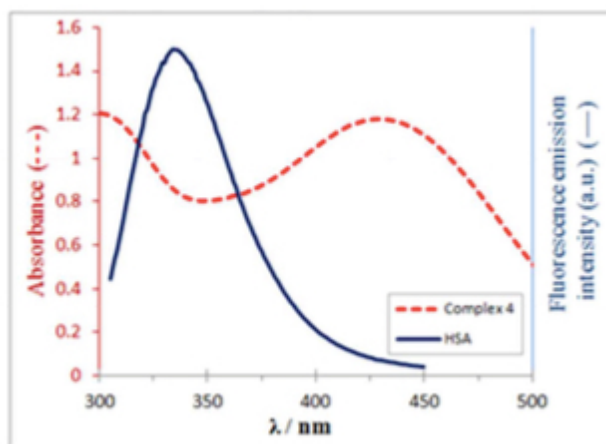


Figura 40: Superposición espectral de los espectros de emisión y de absorción de fluorescencia para el complejo RuL4 con HSA en PBS/2%DMSO: la línea roja punteada representa el espectro de absorción obtenido para una solución 200  $\mu$ M de RuL4 (celdas de cuarzo con longitud óptica de 0,5 cm); la línea continua azul representa el espectro de emisión del Trp214 de HSA ( $\lambda_{exc}= 295$ ).

Estudios más avanzados fueron realizados por el grupo de Biofísica de la Universidad de Lisboa y permitieron calcular la distancia R entre Trp214 y RuL4 en el aducto {HSA-C}. Este valor es cercano a los valores determinados para las moléculas que se unen a sitios de unión específicos de I o II de la HSA a valores de pH = 7,4 (por ejemplo, 24,4 Å para bilirrubina [125], 27-30 Å para los derivados NBD de ácidos biliares [126]. Teniendo en cuenta el tamaño voluminoso del complejo es posible esperar que el compuesto se una al HSA en la proximidad del Trp214, con el RuL4 orientado de tal manera que el fragmento responsable de la banda de absorción que se superpone con la emisión de Trp214 se posicione lejos de este residuo aminoacídico.

En suma, los estudios de espectroscopía de fluorescencia indican que existe una interacción fuerte y específica del complejo RuL4 con HSA, involucrando dos sitios de unión diferentes, el primero a una distancia de 2,5 nm del Trp214 y el otro dentro del radio de van der Waals del indol de cadena lateral del Trp214.

La interacción de RuL1 con HSA también fue estudiada mediante espectroscopía de fluorescencia. El espectro de emisión de Trp214 (Figura 41) sufre un corrimiento hacia el azul de 5 nm conforme aumenta la concentración del complejo RuL1. Este corrimiento es menor que el observado para RuL4 en iguales concentraciones, indicando que la interacción de HSA con RuL1 no se encuentra afectando tanto el entorno cercano de Trp214 como lo hace RuL4.

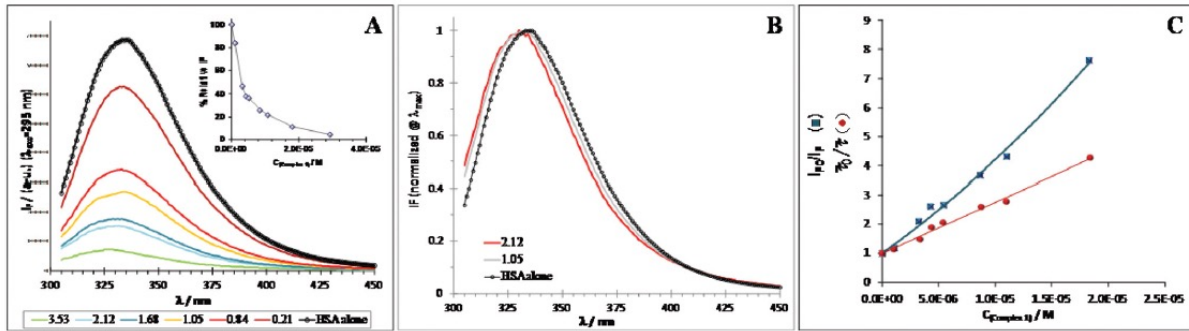


Figura 41: Resultados de fluorescencia para la unión de RuL1 con HSA: A) Quenching de fluorescencia de emisión de Trp214 ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) observado luego de la unión de RuL1; inset: % relativo de intensidad de fluorescencia a  $\lambda = 340$  nm con concentraciones crecientes de complejo (los valores indican relación molar complejo-proteína). B) Espectro de emisión de fluorescencia de HSA ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) normalizado a  $\lambda_{em}^{max}$  con relaciones molares de proteína:complejo variables. Luego de la unión, el complejo RuL1 induce un corrimiento hacia el azul de 5 nm en el espectro de emisión de Trp214 de HSA. C) Curva de Stern-Volmer obtenida para las mediciones de fluorescencia en el estado estacionario ( $I_{F0}/I_F$ , ■) y en función del tiempo ( $\tau_0/\tau$ , ●); el mejor ajuste para los datos experimentales resultó en:  $I_{F0}/I_F = 1 + (2,77 \times 10^5) C_{RuL1} + (4,35) \times 10^9 C_{RuL1}^2$  ( $R^2 = 0,9927$ ) y  $\tau_0/\tau = (0,99 \pm 0,06) + (176 \pm 2) \times 10^2 C_{RuL1}$  ( $R^2 = 0,9914$ ). ( $C_{HSA} = 5,2 \mu M$  constante, las muestras fueron preparadas en PBS/2%DMSO, con 20 horas de incubación a  $37^\circ C$  y las medidas de  $I_F$  fueron tomadas a  $\approx 23^\circ C$ ).

La curva de Stern-Volmer construida a partir de las mediciones obtenidas del estado estacionario y en función del tiempo para el quenching de HSA con RuL1 se muestran en la Figura 41. A diferencia de RuL4, la curva de Stern-Volmer del estado estacionario para el complejo RuL1 está bien descrita por una ecuación cuadrática, la cual muestra nuevamente que existe más de un mecanismo de quenching. Si uno de los procesos de quenching afecta además el tiempo de vida de fluorescencia, entonces el mecanismo involucrará tanto procesos de quenching estáticos como dinámicos.

En suma, los resultados espectroscópicos definitivamente constatan una rápida interacción de ambos complejos RuL1 y RuL4 con la albúmina sérica humana alcanzando el equilibrio luego de un período de  $\approx 20$  horas de incubación a  $37^\circ C$ . Fue posible analizar los resultados experimentales de forma cuantitativa, calculando las constantes de unión para los procesos de formación de aductos en estos sistemas. Además, los resultados espectroscópicos de fluorescencia combinados con los de

dicroísmo circular permitieron obtener un acercamiento al modo de interacción con HSA de los complejos.

### 5.2.5 ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Como ya fue mencionado previamente, ha sido demostrado un paralelismo entre la actividad antiparasitaria y antitumoral de diversos compuestos. En este sentido, luego de estudiar la actividad antiparasitaria de los compuestos Ru-*p*-cimeno desarrollados, se analizó su potencial como antitumorales.

Se estudió la actividad antitumoral de los complejos de rutenio en las líneas celulares tumorales humanas A2780 (adenocarcinoma de ovario), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF7 (adenocarcinoma mamario) y PC3 (carcinoma prostático grado IV con potencial metastásico). Se utilizó como compuesto de referencia al metalofármaco de uso clínico, cisplatino, que presenta actividades conocidas en las líneas celulares tumorales descritas, siendo PC3 una línea celular tumoral resistente al tratamiento con este fármaco. Las células fueron incubadas con cada compuesto durante un período de 24 horas y/o 72 horas y fueron ensayadas subsecuentemente utilizando el ensayo de punto final con MTT (determinación colorimétrica de viabilidad). Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos para los ligandos HL1 a HL4, así como para los complejos RuL1 a RuL4 y cisplatino frente a las líneas celulares A2780, HL-60, MCF7 y PC3 se muestran en la Tabla 17.

Compuesto	A2780 (72 h)	HL-60		MCF-7 (72 h)	PC-3 (72 h)
		(24 h)	(72 h)		
[Ru( <i>p</i> -cimeno)Cl] <sub>2</sub>	>300	-	-	>300	>300
HL1	18,0 ± 5,0	-	-	3,3 ± 1,0	43,0 ± 8,5
RuL1	34 ± 10	48,84 ± 6,28	23,73 ± 3,18	30,0 ± 4,7	297 ± 73
HL2	18,0 ± 5,5	-	-	7,6 ± 1,5	50 ± 11
RuL2	15,0 ± 2,0	-	>200	65 ± 19	238 ± 44
HL3	8,3 ± 2,0	-	-	2,3 ± 0,5	47 ± 19
RuL3	23,0 ± 3,5	-	>200	23,0 ± 4,7	103 ± 14
HL4	134 ± 16	-	-	62,0 ± 9,8	>500

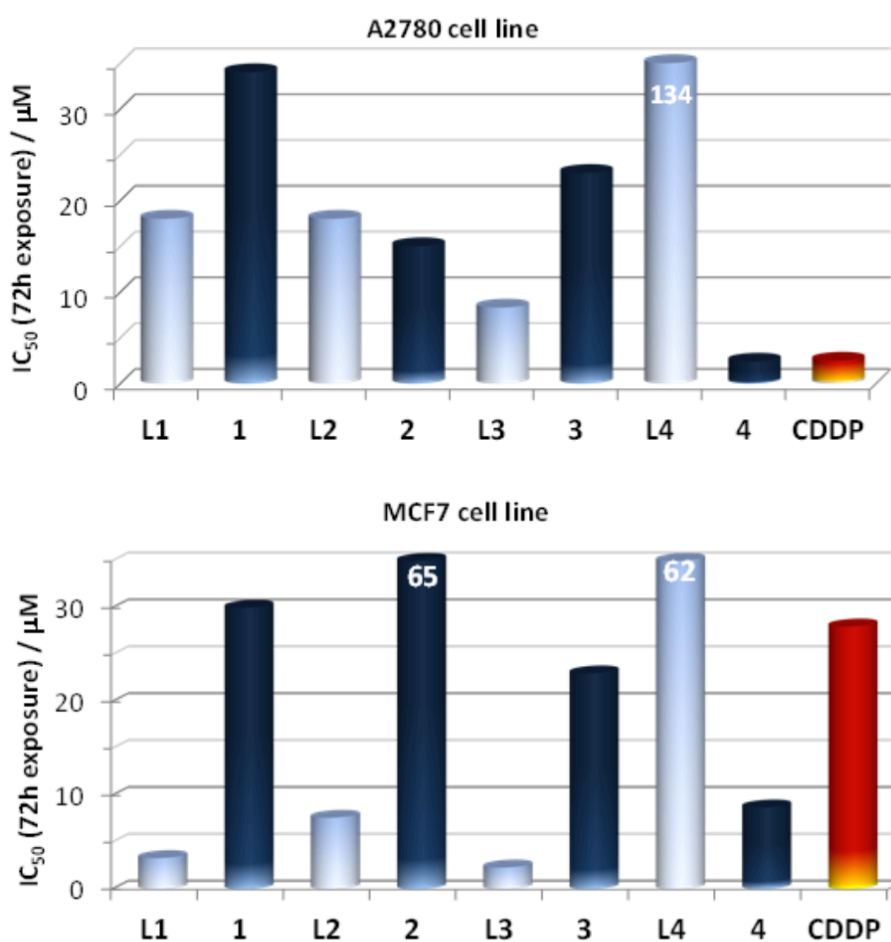
RuL4	2,4 ± 0,5	3,88 ± 0,11	4,11 ± 0,76	8,7 ± 1,9	4,6 ± 0,8
cisplatino	2,5 ± 0,3	15,61 ± 1,15	2,15 ± 0,10	28 ± 6 <sup>a</sup>	51 ± 7 <sup>a</sup>

Los valores de  $IC_{50}$  se reportan en  $\mu M$  ( $\pm SD$ ), y se indican los tiempos de incubación. El metalofármaco de referencia, en uso clínico, cisplatino fue incluido como control positivo.

<sup>a</sup>Valores tomados de [128], obtenidos con la misma metodología experimental, incluidos a modo de comparación.

Tabla 17: Citotoxicidad *in vitro* medida como la concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento celular ( $IC_{50}$ ) para la serie de complejos de  $[Ru_2(p\text{-cimeno})_2(L)_2]^{2+}$  contra cuatro líneas celulares de cáncer humano: A2780 (adenocarcinoma de ovario), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y PC-3 (carcinoma de próstata grado IV). Los valores de  $IC_{50}$  están reportados en  $\mu M$  ( $\pm SD$ ), con los tiempos de incubación indicados.

Los complejos presentaron valores de  $IC_{50}$  de moderados a bajos, lo que indica que presentan una actividad antiproliferativa o citotóxica interesante. Tal como se puede observar en la Tabla 17, Figuras 42 y 43, los complejos RuL1 (1) a RuL3 (3) exhibieron una actividad citotóxica moderada (15-65  $\mu M$ ) contra las líneas celulares A2780 y MCF7.



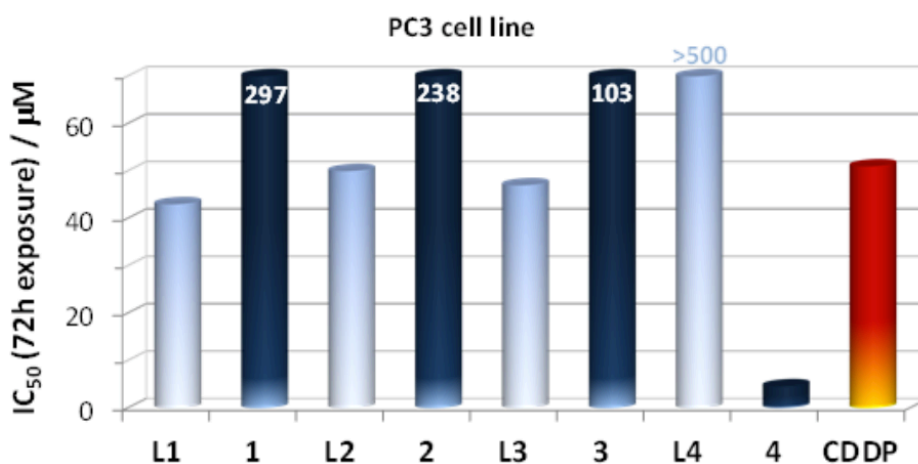


Figura 42: Gráficos de citotoxicidad *in vitro* de todos los compuestos de rutenio-*p*-cimeno con HL1-HL4, RuL1 a RuL4, y sus respectivas tiosemicarbazonas libres en las líneas celulares tumorales humanas A2780 (adenocarcinoma de ovario), MCF-7 (adenocarcinoma mamario) y PC-3 (carcinoma prostático grado IV). Los valores de  $CI_{50}$  se reportan en  $\mu M$  para un período de incubación de 72 horas. El cisplatino, CDDP, es incubado en las mismas condiciones (los valores se obtuvieron de [128] para las líneas celulares MCF7 y PC3 obtenidos con la misma metodología experimental).

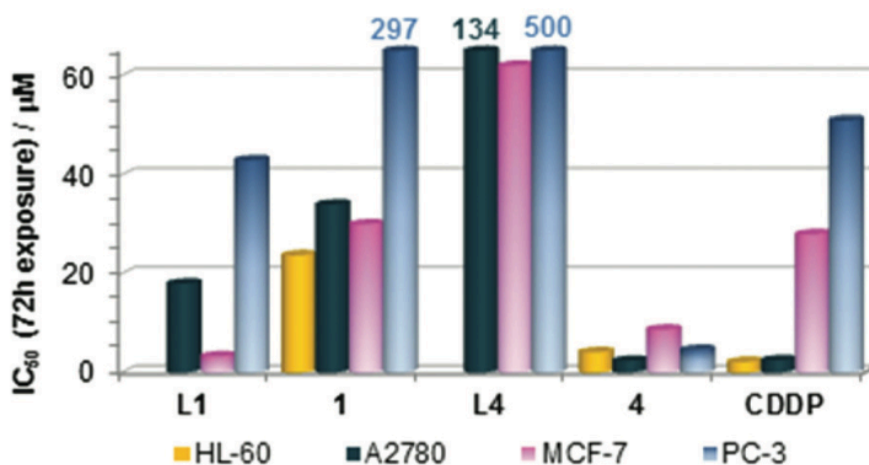


Figura 43: Citotoxicidad *in vitro* de los complejos de  $[Ru_2(p\text{-cimeno})_2(L)_2]^{2+}$  más activos, RuL1 y RuL4, contra todas las líneas celulares tumorales humanas estudiadas y comparados con sus respectivos ligandos tiosemicarbazonas libres (HL) y contra el cisplatino (CDDP). Los valores de  $CI_{50}$  se reportan en  $\mu M$  para un período de incubación de 72 horas (los valores de  $CI_{50}$  para CDDP en las líneas celulares MCF7 y PC3 se obtuvieron de [128] con la misma metodología experimental).

En contraste, los correspondientes ligandos libres exhibieron una actividad citotóxica mayor (2-18  $\mu\text{M}$ ), tal como se puede apreciar en la Tabla 17 y la Figura 44. Es importante destacar que para el complejo RuL4 se obtiene el valor de  $\text{CI}_{50}$  más promisorio de todos,  $2,4\pm 0,5 \mu\text{M}$ , siendo el valor correspondiente para el control con cisplatino de  $2,5\pm 0,3 \mu\text{M}$  bajo las mismas condiciones experimentales.

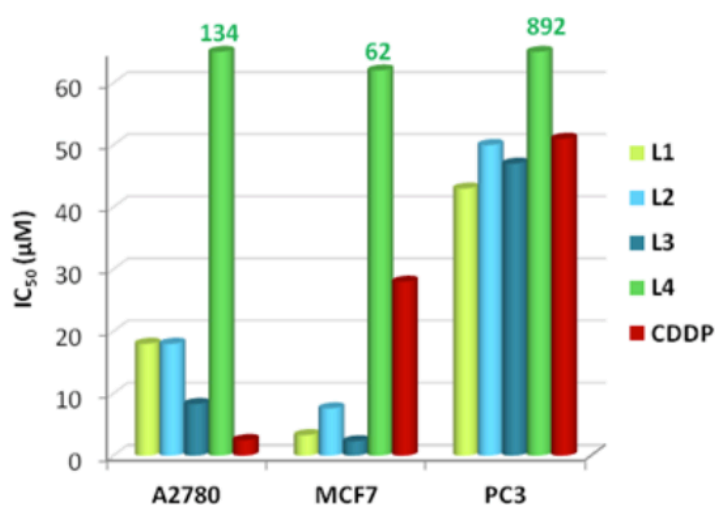


Figura 44: Citotoxicidad *in vitro* de los ligandos tiosemicarbazona HL1-HL4 contra las líneas celulares A2780, MCF-7 y PC-3. El cisplatino (CDDP) fue incluido a modo de comparación utilizando las mismas condiciones experimentales (datos de CDDP contra las líneas MCF7 y PC-3 obtenidos de [120]). Los valores de  $\text{CI}_{50}$  se reportan en  $\mu\text{M}$  para un período de incubación de 72 horas.

Si bien la mayoría de los compuestos mostraron una actividad pobre contra la línea celular PC3 (línea resistente a cisplatino con potencial metastásico), el complejo RuL4 exhibió una actividad casi 10 veces mayor en la línea PC3 ( $\text{CI}_{50} = 4,6\pm 0,8 \mu\text{M}$ ) que el cisplatino ( $\text{CI}_{50} = 51\pm 7 \mu\text{M}$ ). Además, este complejo de rutenio mostró un perfil altamente citotóxico en todas las líneas celulares humanas testeadas, con valores de  $\text{CI}_{50}$  menores que cisplatino bajo las mismas condiciones experimentales, y resultó especialmente activo contra el adenocarcinoma prostático y mamario (Figuras 42, 43 y Tabla 17). Por lo tanto, este complejo RuL4 resultó ser el más promisorio de la línea de los compuestos ensayados debido a que presentó un amplio espectro de actividad y



una alta citotoxicidad *in vitro* especialmente contra la línea celular PC3 resistente a cisplatino (carcinoma prostático grado IV con potencial metastásico). Por ese motivo, fue seleccionado para estudios posteriores. Dado que el complejo RuL1 es el que presenta el ligando tiosemicarbazona más simple y, a su vez, es el que exhibe una toxicidad moderada, también fue incluido en otros estudios.

#### *Mecanismo de muerte celular cuantificado mediante la unión a Anexina V y citometría de flujo*

La apoptosis es considerada como el mecanismo fisiológico de remoción celular por excelencia, durante el cual los remanentes de la célula muerta son fagocitados sin ruptura de la membrana celular y pérdida de contenido celular hacia los tejidos del entorno [129]. Las células HL-60 de leucemia pueden ser utilizadas como un modelo para evaluar los potenciales agentes anticancerígenos en lo que concierne a su acción en la ruta de apoptosis mediante el método de Anexina V-PI, el cual se basa en la evaluación de la integridad de la membrana celular. Las células HL-60 crecen en suspensión y la tripsinización no interfiere durante la determinación de la apoptosis cuando se utiliza este método. En este sentido, los complejos RuL1 y RuL4 fueron seleccionados para los ensayos de inducción de apoptosis con el fin de evaluar el principal mecanismo de muerte celular involucrado en la actividad de los mismos.

Se analizó, mediante Anexina V-PI y citometría de flujo, la capacidad de estos complejos de rutenio de inducir la apoptosis en la línea celular HL-60 luego de 24 horas de incubación a concentraciones equitóxicas (valores de  $CI_{50}$ ). La Anexina V se une a los residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran simétricamente distribuidos hacia la membrana plasmática interna pero migran hacia la parte exterior del plasma cuando ocurre la apoptosis [130]. Tal como se puede observar en la Tabla 18, ambos complejos de rutenio indujeron la muerte celular principalmente por apoptosis prácticamente en la misma extensión que lo hizo el cisplatino, dado que la cantidad de células dañadas se encontraron en el mismo rango (o menor) que CDDP.

Tratamiento (CI <sub>50</sub> )	Células vitales (%)	Células apoptóticas (%)	Células muertas (%)	Células dañadas (%)
24 horas)				
Control	89,22	5,48	4,75	0,56
1 (48,84 μM)	49,79	33,89	14,57	1,75
4 (3,88 μM)	57,08	28,27	14,13	0,51
cisplatino (15,6 μM)	52,78	34,33	10,66	2,23

Tabla 18: Cantidad relativa de células HL-60 en cada estadio luego de 24 horas de tratamiento con los complejos de rutenio en sus valores de CI<sub>50</sub> (24 h), en comparación con el metalofármaco de referencia en uso clínico cisplatino.

En suma, este mecanismo de muerte celular programada resultó, entonces, el proceso principal de muerte.

*Proteínas como blancos celulares: interacción con tubulina e integrina monitoreada mediante AFM*

El ADN representa un blanco biológico clásico para los metalofármacos en general y por ese motivo, se lo propuso inicialmente como un posible blanco para la actividad biológica de la línea de complejos rutenio-*p*-cimeno obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, fue encontrado, que estos complejos exhibieron una afinidad pobre por el ADN de timo de ternera, sugiriendo así, que otros blancos biológicos deberían encontrarse involucrados. De hecho, se ha reportado de forma consistente en la literatura que los blancos proteicos son típicamente más relevantes que el ADN en el mecanismo de acción de los compuestos de rutenio [131,132]. Las proteínas involucradas en el ciclo celular, como la tubulina, o en la formación del citoesqueleto, como la integrina, o aquellas presentes en el medio extracelular, pueden ser blancos importantes para los metalofármacos. Los cambios en la estructura de la integrina podrían producir alteraciones notorias en el citoesqueleto que deriven en la muerte celular mediante procesos apoptóticos. Por otro lado, es sabido que la polimerización de la tubulina ocurre durante el ciclo celular formando microtúbulos. Considerando esto, es importante resaltar que la interacción de los complejos metálicos con tubulina

puede producir la inhibición de su polimerización y de esa manera causar la interrupción del ciclo celular [133-136]. En este sentido, se evaluó la interacción de los complejos RuL1 a RuL4 con las dos proteínas mencionadas utilizando Microscopía de Fuerzas Atómicas.

En la figura 45 se puede observar la comparación realizada de las imágenes obtenidas para cada proteína sola, y también cuando éstas se pre-incuban con los complejos RuL1 a RuL4 a 37 °C durante 24 horas. Luego de la pre-incubación con los complejos de rutenio se observa una clara modificación en el patrón de las proteínas lo que indica una fuerte interacción entre los complejos metálicos y el esqueleto de aminoácidos de las proteínas.

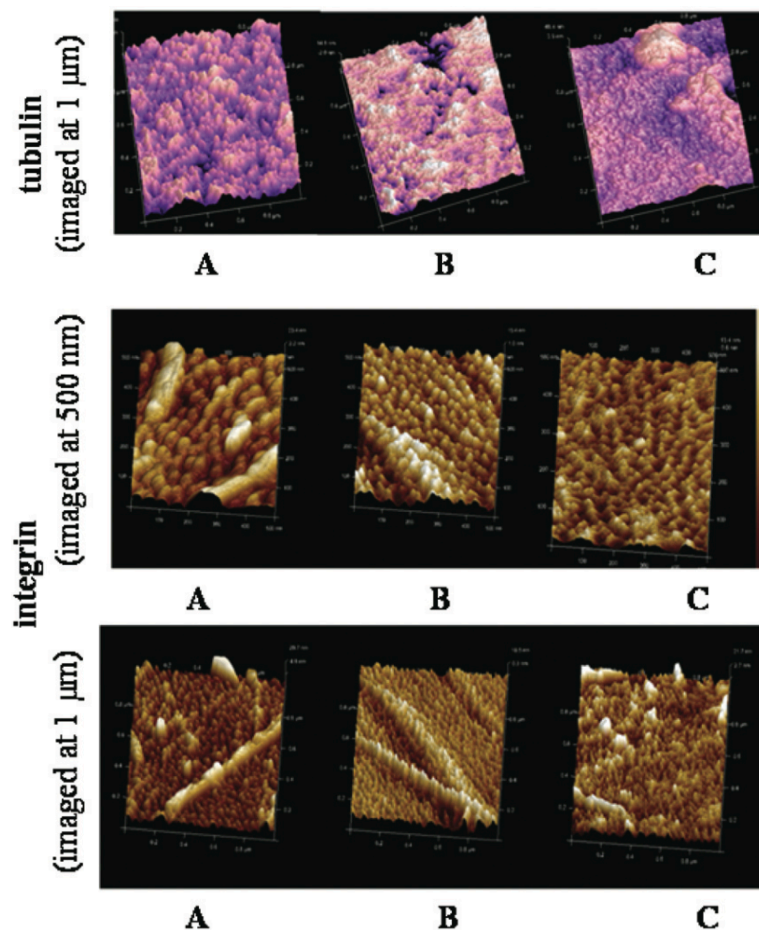


Figura 45: Imágenes de AFM obtenidas para la tubulina (imagen superior), la integrina (imágenes inferiores) en sus formas libres (A), pre-incubadas durante 24 horas a 37 °C con el complejo RuL4 (B) y con el complejo RuL1 (C).

Estos resultados indican que la integrina y la tubulina podrían ser blancos importantes para los compuestos RuL1 a RuL4.

#### *Efecto de la unión a la albúmina sobre la actividad citotóxica*

El efecto de permeabilidad y retención incrementadas (EPR: Enhanced Permeability and Retention effect), involucra dos componentes principales. En primer lugar, se ha demostrado que las células tumorales presentan, a diferencia de las células normales, una permeabilidad incrementada para compuestos de alto peso molecular, en particular macromoléculas. Por otro lado, también se ha comprobado que luego del ingreso a las células tumorales estos compuestos son retenidos. Esto determina que estas moléculas se dirijan preferencialmente a las células tumorales y sean retenidas por éstas. Cuando se presenta el efecto EPR, la concentración del fármaco en el tumor suele ser de 7 a 10 veces mayor en comparación con una dosis equivalente del mismo fármaco en una forma de bajo peso molecular (sin unirse a una macromolécula). En particular, el efecto que podría generar la unión de una macromolécula como la albúmina sobre la biodisponibilidad de los fármacos en general se encuentra bien establecido, pero el rol que ésta podría jugar en el mecanismo de acción citotóxico es un aspecto que usualmente se ha dejado de lado. Es importante resaltar que la mayoría de los agentes terapéuticos basados en compuestos metálicos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer son administrados de forma intravenosa, y la interacción con un transportador sanguíneo es usualmente el primer proceso que ocurre [121]. Tal como se mencionó previamente, ha sido propuesto que las proteínas séricas albúmina y transferrina están involucradas en el mecanismo de acción antitumoral de los complejos basados en rutenio. En el caso de la albúmina, ésta actúa como un vehículo transportador mayoritario y posiblemente como un depósito de reserva, y en el caso de la transferrina ésta es la responsable de la remoción celular, mediada por endocitosis, a través del receptor de transferrina (TfR) [131].

Tomando en consideración estos antecedentes, se estudió el efecto sobre la actividad citotóxica de la unión a la albúmina de los compuestos de rutenio desarrollados en este Trabajo de tesis.

La actividad citotóxica de RuL4 se ve aumentada (aproximadamente 20%) en la

presencia de HSA a bajas concentraciones proteicas, de 1,25  $\mu\text{M}$  hasta 5  $\mu\text{M}$ , correspondientes a relaciones molares de complejo:proteína de 0,5:1, 1:1 y 2:1. Es de destacar que las relaciones de complejo:proteína de 2:1 y de 1:1, respectivamente, corresponden a las condiciones óptimas de formación de los aductos {HSA-C<sub>2</sub>} y {HSA-C}, los cuales ya fueron identificados y caracterizados. Estos resultados muestran que la unión a la HSA fortalece la eficacia citotóxica del complejo RuL4 *in vitro* (en comparación con el complejo libre) a concentraciones de proteína relativamente bajas, y sugiere así, que el aducto RuL4 - proteína es más activo contra esta línea celular que su respectivo complejo libre. Esto podría resultar interesante para dirigir los compuestos desarrollados hacia los tejidos tumorales, dado el hecho que la albúmina se acumula en los tumores sólidos como una consecuencia del ya mencionado efecto EPR [137].

El efecto proliferativo inducido por altas concentraciones de HSA (observado en los controles negativos en la Figura 46) que muestran un incremento de la viabilidad de la línea celular A2780 de 15 a 25% en presencia de un gran exceso de HSA sola) es posiblemente la causa principal del incremento en la viabilidad encontrado para las respectivas muestras complejo-proteína e indica una ligera disminución (aproximadamente de 1/4) en la citotoxicidad de RuL4.

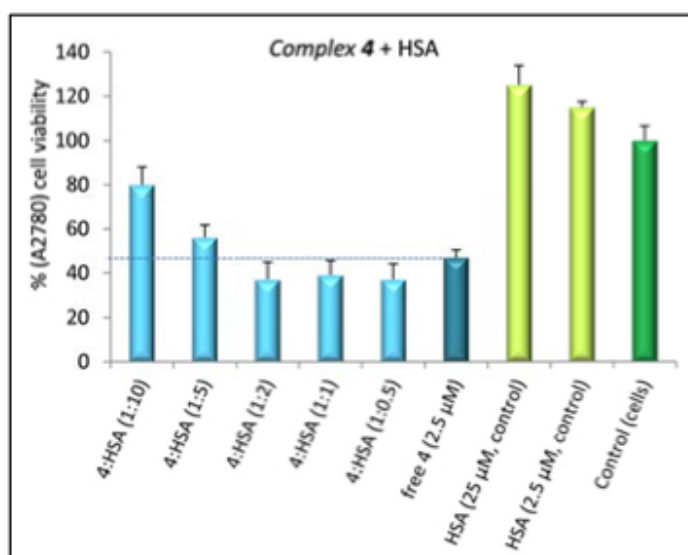


Figura 46: Efecto de la unión del complejo RuL4 (complejo 4) a HSA en la viabilidad de la línea celular A2780. Las células fueron tratadas durante 72 horas con RuL4 a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  en

presencia de albúmina a diferentes relaciones molares complejo:proteína, desde 1:0,5 a 1:10 (■). Se utilizaron diversos controles: células sin tratamiento (control negativo, identificado como control (cells) ■), células tratadas sólo con HSA (concentración de proteína de 2,5 y 25  $\mu\text{M}$ , control negativo ■) y células tratadas con RuL4 en ausencia de HSA (RuL4 libre, control positivo, 2,5  $\mu\text{M}$ , ■).

En suma, estos resultados *in vitro* sugieren que la unión a albúmina del complejo RuL4 hace a éste más citotóxico que su respectivo complejo libre, con una pequeña desactivación cuando se presentan grandes excesos de proteína, anticipando así, que el complejo RuL4 puede ser efectivamente transportado en el plasma sanguíneo y liberado en los tejidos blancos. Considerando el rol principal de esta proteína como transportador en sangre, este es un hecho muy importante para el desarrollo del complejo RuL4 como potencial metalofármaco antitumoral.

#### 5.4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron cuatro nuevos complejos diméricos rutenio-areno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano como coligandos bioactivos. Los complejos de fórmula  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ , donde  $\text{X} = \text{Cl}$  o  $\text{PF}_6$ , fueron sintetizados y caracterizados analítica, fisicoquímica y estructuralmente de forma exhaustiva y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas potencialmente relacionadas con la actividad biológica, como el comportamiento electroquímico. También se determinó su actividad antiparasitaria y antitumoral, así como su mecanismo de acción probable. Los estudios de caracterización realizados demostraron que los compuestos de esta serie presentan una coordinación similar entre el centro rutenio-*p*-cimeno y los ligandos tiosemicarbazona.

En cuanto a los ensayos de actividad contra *T. cruzi* todas las sales de contraíón cloruro de los complejos mostraron una actividad *in vitro* contra la forma tripomastigota infectiva de *T. cruzi*, y los compuestos  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$  y  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L2})_2]\text{Cl}_2$  resultaron ser más activos que el fármaco de referencia, nifurtimox. No se observó una tendencia regular en la actividad anti *T. cruzi* al incrementar la longitud de la cadena de los ligandos (HL1-HL4). La mayoría de los compuestos rutenio-*p*-cimeno resultaron más activos contra la forma infecciosa tripomastigota que contra

la forma epimastigota del parásito. Este resultado es importante teniendo en cuenta que la tripomastigota es la forma infectiva en el hospedero mamífero.

Dos de ellos mostraron junto a una actividad *in vitro* contra *T. brucei brucei* interesante altos índices de selectividad ( $CI_{50}$  células mamífero/ $CI_{50}$  células parásito) para este parásito. Los estudios preliminares sugieren la potencialidad de los complejos como inhibidores de ambos parásitos.

Los experimentos realizados a efectos de poder entender el probable mecanismo de acción tripanomicida mostraron que todos los complejos generan, mediante biorreducción en el parásito, radicales libres tóxicos, a través del grupo nitro, lo que indica que estos complejos podrían mantener el mecanismo de acción del farmacóforo 5-nitrofurano. Estos compuestos son capaces de interactuar con el ADN, y muestran una baja a moderada inhibición de la cruzipaína, la cisteín-proteasa que juega un rol fundamental en el ciclo biológico del parásito. Sin embargo, no se ha detectado una correlación entre el efecto en los blancos mencionados y la actividad biológica observada. De esta manera, los resultados no permiten comprobar el blanco principal de estos compuestos, sugiriendo la posibilidad de un mecanismo de acción “multi-blanco”. De hecho, otros blancos potenciales no pueden ser descartados.

Los resultados obtenidos en este trabajo son ampliamente promisorios para considerar a los compuestos rutenio - areno como buenos candidatos para posteriores desarrollos como potenciales fármacos organometálicos antitripanosomales.

Por otro lado, estos compuestos no sólo mostraron ser potenciales agentes antiparasitarios, sino que también resultaron ser agentes prometedores para la quimioterapia contra el cáncer. Si bien la coordinación de HL1 y HL3 al fragmento  $\{Ru(p\text{-cimeno})\}$  resulta bastante perjudicial para la actividad citotóxica, el derivado fenil-tiosemicarbazona, HL4 (el menos activo de los ligandos) generó el complejo rutenio-*p*-cimeno más activo contra todas las líneas celulares testeadas; sus valores de  $CI_{50}$  resultaron hasta 10 veces menores que los del cisplatino en las líneas celulares testeadas. De hecho, el complejo precursor  $[Ru_2(p\text{-cimeno})Cl_2]_2$  fue inactivo y el coligando HL4 exhibió, solamente, una moderada actividad en la línea celular MCF7, mientras que el complejo RuL4 es mucho más activo y fue capaz de inducir la apoptosis en la línea celular HL-60, indicando un mecanismo de muerte celular biológicamente controlado. En cuanto al mecanismo de acción antitumoral estudiado para los

complejos, se detectó, mediante AFM, una fuerte interacción con la tubulina (involucrada en el ciclo celular) y con la integrina (involucrada en la formación del citoesqueleto).

En lo que refiere a la unión a la albúmina humana, los complejos estudiados, RuL1 y RuL4, se unen fuertemente a HSA de una manera específica, probablemente involucrando dos sitios diferentes de acción. Las constantes de unión correspondientes fueron calculadas y se encuentran en el mismo orden de magnitud que para aquellas obtenidas para KP1019, uno de los dos complejos de Ru(III) que actualmente se encuentra en ensayos clínicos [2,121,131]. Esto indica que RuL1 y RuL4 pueden ser transportados en sangre a través de la albúmina. La pre-incubación de RuL4 con HSA no resultó perjudicial para su efecto en la viabilidad celular de A2780. Para bajas relaciones proteína:complejo, la citotoxicidad aumentó alrededor de un 20%, sugiriendo que la especie unida a la proteína es 4 veces más activa que el complejo libre. Consecuentemente, el complejo RuL4 podría ser transportado en el torrente sanguíneo por la HSA para ser liberado en los tejidos blanco. Dado el hecho de que la albúmina se acumula en los tejidos tumorales como una consecuencia del efecto EPR, esta característica puede proveer una ruta para la selectividad de este complejo de rutenio hacia las células tumorales.

Los resultados en este trabajo de Tesis podrían ser considerados como una contribución significativa para el desarrollo de nuevos metalofármacos al reafirmar que el complejo  $[\text{Ru}_2(p\text{-cimeno})_2(\text{L4})_2]\text{Cl}_2$ , que incluye a la  $N^4$ -fenil tiosemicarbazona derivada de 5-nitrofurano como ligando, resultó un promisorio agente antitumoral mostrando un gran potencial como posible metalofármaco para la quimioterapia contra el cáncer.

#### **5.4 BIBLIOGRAFÍA**

[1] Gambino D, Otero L, Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs, *Inorg Chim Acta* 2012, 393, 103.



- [2] Bergamo A, Gaiddon C, Schellens J.H.M, Beijnen J.H, Sava G, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *J Inorg Biochem* 2012, 106,90.
- [3] Bratsos E., Jedner S., Gianferrara T., Alessio E., Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations, *Chim. Int. J. Chem.* 2007, 61, 692.
- [4] van Rijt H., Sadler P., Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discov. Today* 2009, 23, 1089.
- [5] J.C. García Ramos, L. Ruiz Azuara, V. Moreno, en: D. Gambino, M. Navarro, V. Moreno (Eds.), *Aplicaciones de Compuestos Metálicos en Medicina*, Editorial Académica Española, Saarbrücken, Alemania, 2012, pp. 1–79, ISBN: 978-3-8484-7138-6.
- [6] Allardyce C.S., Dorcier A., Scolaro C., Dyson P.J., Development of organometallic (organo transition metal) pharmaceuticals, *Appl. Organomet. Chem.* 2005, 19 1.
- [7] Antonarakis S., Emadi A., Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010, 66, 1
- [8] Reisner E., Arion V.B., Keppler B.K., Pombeiro A.J.L., Electron transfer activated metal-based anticancer drugs, *Inorg. Chim. Acta* 2008, 361, 1569.
- [9] Ang H., Dyson P.J., Classical and non-classical ruthenium based anti-cancer drugs: towards targeted chemotherapy, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006, 4003
- [10] Navarro M., Gabbiani G., Messori L., Gambino D., Metal based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives, *Drug Discov. Today* 2010, 15, 1070.
- [11] Gambino D., Potentiality of vanadium compounds as antiparasitic agents, *Coord. Chem. Rev.* 2011, 255, 2193.
- [12] Sánchez-Delgado R.A., Anzellotti A., Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 159.
- [13] Sánchez-Delgado R.A., Anzellotti A., Suárez L., en: Sigel H., Sigel A. (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems 41: Metal Ions and Their Complexes in Medication*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 379.
- [14] Kinnamon K., Steck E.A., Rane E.S., Activity of antitumor drugs against African trypanosomes, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 157.

- [15] Farrell N.P., Williamson J., McLaren D.J.M., Trypanocidal and antitumour activity of platinum metal and platinum metal drug dual function complexes, *Biochem. Pharmacol.* 1984, 961.
- [16] Lima M.F., Villalta F., *Trypanosoma cruzi* trypomastigote differentially express a parasite cell adhesion molecule, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989, 33, 159.
- [17] Kandioller W., Hartinger C.G., Nazarov A.A., Bartel C., Skocic M., Jakupec M.A., Arion V.B., Keppler B.K., Maltol derived ruthenium cymene complexes with tumor inhibiting properties: the impact of ligand metal bond stability on anticancer activity in vitro, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 12283.
- [18] Martínez A., Carreon T., Iniguez E., Anzellotti A., Sanchez A., Tyan M., Sattler A., Herrera L., Maldonado R., Sanchez-Delgado R.A., †Searching for New Chemotherapies for Tropical Diseases: Ruthenium–Clotrimazole Complexes Display High in Vitro Activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and Low Toxicity toward Normal Mammalian Cells, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 3867.
- [19] Singha A.K., Pandey D.S., Xu Q., Braunstein P., Recent advances in supramolecular and biological aspects of arene ruthenium(II) complexes, *Coord. Chem. Rev.* 2014, 270, 31.
- [20] Carreon M.C., Sepúlveda F., Jalón F.A., Manzano B.R., Rodríguez A.M., Arene ruthenium(II) complexes containing bispyrazolylmethane ligands: effect of the ligand substituents on the formation of an isomer and on the fluxional behavior, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013, 217.
- [21] Kurzwernhart A., Kandioller W., Enyedy E.A., Novak M., Jakupec M.A., Keppler B.K., Hartinger C.G., 3-Hydroxyflavones vs. 3-hydroxyquinolinones: structure–activity relationships and stability studies on Ru<sup>II</sup>(arene) anticancer complexes with biologically active ligands, *Dalton Trans.* 2013, 42, 6193.
- [22] Campbell M J., Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazone, *Coord. Chem. Rev.* 1975, 15, 279.
- [23] Padhyé S. B., Kauffman G.B., Nickel(II), copper(I) and copper(II) complexes of bidentate heterocyclic thiosemicarbazones, *Coord. Chem. Rev.* 1985, 63, 127.
- [24] West D. X., Liberta A., Padhye S. B., Chikate R. C., Sonawane P.B., Kumbhar A. S., Yerande R.G., Thiosemicarbazone complexes of copper(II): Structural and biological studies, *Coord. Chem. Rev.*, 1993, 123, 49.

- [25] West D. X., Padhye S. B., Sonawane P. B., en *Structure and Bonding*, Springer-Verlag: New York, 1991, Vol. 76, pp 1.
- [26] Casas J. S., García-Tesende M. S., Sordo J., West D. X., Liberta A., Padhye S. B., Chikate R. C., Sonawane P. B., Kumbhar A. S., Yerande R. G., Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones: A structural review, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 209, 197.
- [27] Giles F.J., Fracasso P.M., Kantarjian H. M., Phase I and pharmacodynamic study of Triapine, a novel ribonucleotide reductase inhibitor, in patients with advanced leukemia. *Leuk. Res.* 2003, 27,1077.
- [28] Yee K.W.L., Cortes J., Ferrajoli A., Garcia-Manero G., Verstovsek S., Wierda W., Thomas D., Faderl S., King, I., O'Brien S. M., Jeha S., Andreeff M., Cahill A., Sznol M., Giles F.J., Triapine and cytarabine is an active combination in patients with acute leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 2006, 30, 813.
- [29] Cory J. G., Cory A. H., Rappa G., Inhibitors of ribonucleotide reductase. Comparative effects of amino- and hydroxy-substituted pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones, *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 335.
- [30] Beraldo H., Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos, *Quim. Nova* 2004, 27, 461.
- [31] Beraldo H., Gambino D., Wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2004, 4, 159.
- [32] Fricker S. P., Mosi R. M., B. R. Cameron B. R., Baird I., Zhu Y., Anastassov V., Cox J., Doyle P. S., Hansell E., Lau G., Langille J., Olsen M., Qin L., Skerlj R., Wong R. S.Y., Santucci Z., McKerrow J.H., Metal compounds for the treatment of parasitic diseases, *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1839.
- [33] Otero L., Maya J. D., Morello A., Rigol C., Barriga G., Rodríguez J., Folch C., Norambuena E., González M., Olea Azar C., Cerecetto H., Gambino D., Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Med. Chem.* 2008, 4, 11.
- [34] Cazzulo, J. J., Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease, *Curr. Topics Med. Chem.* 2002, 2, 1261.
- [35] Greenbaum D. C., Mackey Z., Hansell E., Doyle P., Gut J., Caffrey C. R., Lehrman J., Rosenthal P. J., McKerrow J. H., Chibale K., Synthesis and structure activity

relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *P.falciparum*, *T. brucei* and *T. cruzi*, *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3212.

[36] Aguirre G., Boiani L., Cerecetto H., Fernández M., González M., Denicola A., Otero L., Gambino D., Rigol C., Olea-Azar C., Faundez M., In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones, *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4885.

[37] Rigol C., Olea-Azar C., Mendizábal F., Otero L., Gambino D., González M., Cerecetto H., Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *Spectrochim. Acta Part A* 2005, 61, 2933.

[38] Campbell M. J. M., Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones. *Coord. Chem. Rev.* 1975, 15, 279.

[39] Padhye S., Kauffman G. B., Transition metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. *Coord. Chem. Rev.* 1985, 63, 127.

[40] West D. X., Liberta, A., Padhye S. B., Chikate R. C., Sonawane P. B., Kumbhar A. S., Yerande R. G., Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coord. Chem. Rev.* 1993, 123, 49.

[41] Casas S., García-Tasende M. S., Sordo J., Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones, A structural review. *Coord. Chem. Rev.* 2000, 209, 197.

[42] Pedrido R., Romero M.J., Bermejo M.R., Martinez-Calvo M., Gonzalez-Noya A.M., Zaragoza G., Coordinative trends of a tridentate thiosemicarbazone ligand: synthesis, characterization, luminescence studies and desulfurization processes, *Dalton Trans.* 2009, 8329.

[43] Temperini M. L. A., DosSantos M. R., Monteiro V. R. P., Spectroscopic study of the isomerization of Z - to E-pyridine-2-formyl thiosemicarbazone, *Spectrochim. Acta Part A* 1995, 51, 1517.

[44] Cerecetto H., Maio R. D., González M., Risso M., Sagrera G., Seoane G., Denicola A., Peluffo G., Quijano C., Basombrio M. A., Paulino M., Olea-Azar C., Synthesis and anti-trypanosomal evaluation of E- isomers of 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazones derivatives. Structure-activity relationships, *Eur. J. Med. Chem.* 2000, 35, 343.

[45] Guo Z., Sadler P., Metals in Medicine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 112.

- [46] Farrell N., Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, *Compreh. Coord. Chem. II* 2003, 9, 809.
- [47] Litterst C. L., Chemical reactions occurring between metal containing antineoplastic drugs and biological molecules, *Pharm. Ther.* 1988, 35, 215.
- [48] Gómez Quiroga A., Navarro Ranninger C., Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 119.
- [49] Clarke M. J., Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.* 2003, 236, 209.
- [50] Clarke M. J., Ruthenium complexes: potential roles in anticancer pharmaceuticals in *Metal complexes in cancer chemotherapy*; Keppler, B., Ed.; VCH: Weinheim, 1993, pp 129.
- [51] Messori L., Orioli P., Vullo D., Alessio E., Iengo E., A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III) anti neoplastic complex, with bovine serum albumin, *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 1206.
- [52] Brabec V., DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2002, 71, 1.
- [53] Campbell M. J. M., Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones, *Coord. Chem. Rev.* 1975, 15, 279.
- [54] Chattopadhyay S. K., Ghosh S., A study of Ru(II) complexes of some selected N-S donors, *Inorg. Chim. Acta* 1987, 131, 15.
- [55] Hossain, M.; Chattopadhyay, S. K.; Ghosh, S., Synthesis and characterization of bis(2,2'-thiosemicarbazide) ligands: unique redox series, *Polyhedron* 1997, 16, 4313.
- [56] Mazumder U. K., Gupta M., Karki S. S., Bhattacharya S., Rathinasamy S., Thagavel S., Synthesis, anticancer and antibacterial activity of some novel mononuclear Ru(II) complexes, *Chem. Pharm. Bull.* 2004, 52, 178.
- [57] Beckford F., Leblanc G., Thessing J., Shalowski M.Jr., Frost B.J., Li L., Seeram N., Organometallic ruthenium complexes with thiosemicarbazone ligands: Synthesis, structure and cytotoxicity of  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{NS})\text{Cl}]^+$  (NS = 9-anthraldehyde thiosemicarbazones) *Inorg. Chem. Comm.* 2009, 12, 1094.

- [58] Floyd Beckford F., Deidra Dourth D., Michael Shaloski M.Jr., Jacob Didion J., Jeffrey Thessing J., Jason Woods J., Vernon Crowell V., Nikolay Gerasimchuk N., Antonio Gonzalez-Sarrías A., Navindra P. Seeram N.P., Half-sandwich ruthenium–arene complexes with thiosemicarbazones: Synthesis and biological evaluation of [(h<sup>6</sup>-p-cymene)Ru(piperonal thiosemicarbazones)Cl]Cl complexes, *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 1019.
- [59] Beckford F., Stott A., Gonzalez-Sarrías A., Navindra P. S., Novel microwave synthesis of half-sandwich [(h<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)Ru] complexes and an evaluation of the biological activity and biochemical reactivity, *Appl. Organometal. Chem.* 2013, 27, 425.
- [60] Su W., Tang Z., Xiao Q., Li P., Qian Q., Lei X., Huang S., Peng B., Cui J., Huang C., Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium(II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands *J. Organomet. Chem.* 2015, 783, 10.
- [61] Su W., Zhou Q., Huang Y., Huang Q., Huo L., Xiao Q., Huang S., Huang C., Chen R., Qian Q., Liu L., Li P., Synthesis, crystal and electronic structure, anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes with thiosemicarbazones *Appl. Organometal. Chem.* 2013.
- [62] Su W., Qian Q., Li P., Lei X., Xiao Q., Huang S., Huang C., Cui J., Synthesis, Characterization, and Anticancer Activity of a Series of Ketone-N<sup>4</sup>-Substituted Thiosemicarbazones and Their Ruthenium(II) Arene Complexes, *Inorg Chem.* 2013, 52, 12440.
- [63] Raja U.M., Sindhuja E., Ramesh R., Arene ruthenium(II) p-chloroacetophenone phenylthiosemicarbazone complex mediated transfer hydrogenation of ketones *Inorg. Chem. Comm.* 2010, 13, 1321.
- [64] Yildirim H., Guler E., Yavuz M., Ozturk N., Yaman P.K., Subasi E., Sahin E., Timur S., Ruthenium (II) complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, biosensor applications and evaluation as antimicrobial agents *Materials Science and Engineering* 2014,C 44, 1.
- [65] Stringer T, Therrien B., Hendricks D., Guzgay H., Smith G., Mono- and dinuclear (h<sup>6</sup>-arene) ruthenium(II) benzaldehyde thiosemicarbazone complexes: Synthesis, characterization and cytotoxicity *Inorg. Chem. Comm.* 2011, 14, 956.
- [66] Otero L., Vieites M., Boiani L., Denicola A., Rigol C., Opazo L., Olea-Azar C., Maya J. D., Morello A., Krauth-Siegel R. L., Piro O. E., Castellano E., González M., Gambino D., Cerecetto H., Novel antitrypanosomal agents based on palladium

nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3322

[67] Gambino D., Otero L., Vieites M., Boiani M., González M., Baran E. J., Cerecetto H., Vibrational spectra of palladium 5-nitrofuryl thiosemicarbazone complexes: Experimental and theoretical study. *Spectrochim. Acta Part A* 2007, 68, 341.

[68] Vieites M., Otero L., Santos D., Toloza J., Figueroa R., Norambuena E., Olea-Azar C., Aguirre G., Cerecetto H., Gonzalez M., Morello A., Maya J.D., Garat B., Gambino D., Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1033.

[69] Vieites M., Smircich P., Pagano M., Otero L., Luane Fischer F., Terenzi H., Prieto M. J., Moreno V., Garat B., Gambino D., DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: a comparative study. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 1704.

[70] Cipriani M., Toloza J., Bradford L., Putzu E., Vieites M., Curbelo E., Tomaz A. I., Garat B., Guerrero J., Gancheff J. S., Maya J. D., Olea Azar C., Gambino D., Otero L., Effect of the metal ion on the anti *T. cruzi* activity and the mechanism of action of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazone metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2014, 27, 4677.

[71] Phillips A.D., Gonsalvi L., Romerosa A., Vizza F., Peruzzini M., Coordination chemistry of 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA): transition metal complexes and related catalytic, medicinal and photoluminiscent applications, *Coord. Chem. Rev.* 2004, 248, 955.

[72] Bravo J., Bolaño S., Gonsalvi L., Peruzzini M., Coordination chemistry of 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) and derivatives (Part II). The quest for tailored ligands, complexes and related applications, *Coord. Chem. Rev.* 2010, 254, 555.

[73] Cazzulo J.J., Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: Potential targets for the chemotherapeutic of Chagas disease, *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 1261–1271.

[74] Norambuena E., Gambino D., Otero L., Effect of ruthenium complexation on trypanocidal activity of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44, 4937-4943.

[75] Vieites M., Otero L., Santos D., Olea-Azar C., Norambuena E., Aguirre G., Cerecetto H., González M., Kemmerling U., Morello A., Maya J.D., Gambino G., Platinum-based

complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-Trypanosoma cruzi activity, *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 411.

[76] Sarniguet C., Toloza J., Cipriani M., Lapier M., Vieites M., Toledano-Magaña Y., García-Ramos J.C., Ruiz-Azuara L., Moreno V., Maya J.D., Olea Azar C., Gambino D., Otero L., Water-Soluble Ruthenium Complexes Bearing Activity Against Protozoan Parasites, *Biol. Trace Elem. Res.* 2014, 158, 379.

[77] Fernández M., Rodríguez Arce E., Sarniguet C., Morais T., Tomaz A.I., Olea Azar C., Figueroa R., Maya J.D., Medeiros A., Comini M., Garcia H., Otero L., Gambino D., Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites, *J. Inorg. Biochem.* 2015, 153, 306.

[78] Basuli F., Peng S., Bhattacharya S., Unusual coordination mode of thiosemicarbazone ligands. A search for the origin, *Inorg. Chem.* 2000, 39, 1120.

[79] Basuli F., Peng S., Bhattacharya S., Chemical control on the coordination mode of benzaldehyde semicarbazone ligands. Synthesis, structures, redox properties of ruthenium complexes, *Inorg. Chem.* 2001, 40, 1126.

[80] Sakai K., Yamada Y., Tsubomura T., Synthesis and crystal structure of ruthenium complexes of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, tris(2-aminoethyl)amine (tren) and bis(2-aminoethyl)(iminomethyl)amine. A microporous layered structure consisting of  $[K(tren)]_2[RuCl_6]_n^{n-}$  and  $[H_5O_2]_4[RuCl_6]_n^{n+}$ , *Inorg. Chem.* 1996, 35, 3163.

[81] Alessio, E., Synthesis and reactivity of Ru-, Os-, Rh- and Ir-halide-sulfoxide complexes, *Chem. Rev.* 2004, 104, 4203.

[82] Stephenson J. A., Wilkinson G., New complexes of ruthenium(II) and (III) with triphenylfosfine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1966, 28, 945.

[83] Evans I.; Spencer A.; Wilkinson G., Dichlorotetrakis(dimethylsulfoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1973, 204.

[84] Alessio E., Balducci G., Lutman A., Mestroni G., Calligaris M., Attia W. M., Synthesis and characterization of two new classes of ruthenium(III) sulfoxide complexes with nitrogen donor ligands (L):  $Na[trans-RuCl_4(R_2SO)(L)]$  and  $mer, cis-RuCl_3(R_2SO)(R_2SO)(L)$ . The crystal structure of  $Na[trans-RuCl_4(DMSO)(NH_3)] \cdot 2DMSO$ ,  $Na[trans-$



RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)]·H<sub>2</sub>O, Me<sub>2</sub>CO and *mer, cis*-RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(DMSO)(NH<sub>3</sub>), *Inorg. Chim. Acta* 1993, 203, 205.

[85] Hodson E., Simpson S.J., Synthesis and characterisation of [(h<sup>6</sup>-cymene)Ru(L)X<sub>2</sub>] compounds: single crystal X-ray structure of [(h<sup>6</sup>-cymene)Ru(P{OPh}<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>] at 203 K, *Polyhedron* 2004, 23, 2695.

[86] Biebinger S., Wirtz L.E., Lorenz P., Clayton C., Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997, 85, 99.

[87] Heyns A.M., The IR and Raman spectra of sodium hexafluorophosphate monohydrate, NaPF<sub>6</sub>·6H<sub>2</sub>O, *Spectrochim. Acta, Part A*, 1977, 33, 315.

[88] Sivagamasundari M., Ramesh R., Luminiscent property and catalytic activity of Ru(II) carbonyl complexes containing N,O donor of 2-hydroxy-1naphthylidenimines, *Spectrochim. Acta Part A* 2007, 66, 427.

[89] Henderson W., Nicholson B.K., Dinger M.B., Bennett R.L., Thiourea monoanion and dianion complexes of rhodium(III) and ruthenium(II), *Inorg. Chim. Acta* 2002, 338, 210.

[90] Lebeau E.L., Ajao Adeyemi S., Meyer T.J., Water Oxidation by [(tpy)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>Ru<sup>III</sup>ORu<sup>III</sup>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(tpy)]<sup>4+</sup>, *Inorg. Chem.* 1998, 37, 6476.

[91] Sumiyoshi T., Gunnoe T.B., Petersen J.L., Boyle P.D., Ruthenium complexes possessing the h<sup>6</sup>-*p*-cymene ligand, *Inorg. Chim. Acta* 2008, 361, 3254.

[92] Pagano M., Demoro B., Toloza J., Boiani L., Gonzalez M., Cerecetto H., Olea-Azar C., Norambuena E., Gambino D., Otero L., *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4937–4943.

[93] Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Kumaresan J., Ehrlich Sachs S., Sachs J.D., Savioli L., Control of neglected tropical diseases, *N. Engl. J. Med.* 2007, 357, 1018.

[94] Delespaux V., de Koning H.P., Drugs and drug resistance in *African trypanosomiasis*, *Drug Resist. Updates* 2007, 10, 30.

[95] Croft S., Barret M., Urbina J., Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis, *Trends Parasitol.* 2005, 21, 508.

[96] El-Sayed N.M. *et al.*, Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa, *Science* 2005, 309, 404.

[97] [http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/research/combo\\_treatment/en/index.html](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/research/combo_treatment/en/index.html).

- [98] van Rijt S.H., Sadler P.J., Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discov. Today* 2009, 23, 1089.
- [99] Makino K, Hagiwara T, Murakami A, A mini review: fundamental aspects of spin trapping with DMPO. *Radiat. Phys. Chem.* 1991, 37, 657.
- [100] Veerapen N, Taylor SA, Walsby CJ, Pinto BM, A mild Pummerer-like reaction of carbohydrate-based selenoethers and thioethers involving linear ozonide acetates as putative intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 227.
- [101] Otero L, Folch C, Barriga G, Rigol C, Opazo L, Vieites M, Gambino D, Cerecetto H, Norambuena E, Olea-Azar C., ESR, electrochemical and reactivity studies of antitrypanosomal palladium thiosemicarbazone complexes. *Spectrochim. Acta Part A Mol Biomol Spect* 2008, 70, 519.
- [102] Mancin F., Scrimin P., Tecilla P., Tonellato U., Artificial metallonucleases. *Chem. Comm.* 2005, 2540.
- [103] Onoa GB, Cervantes G, Moreno V, Prieto MJ, Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 1473.
- [104] Onoa G. B., Cervantes G., Moreno V., Prieto M. J., Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucl. Acids Res.* 1998, 26, 1473.
- [105] Liu J. G., Zhang Q. L., Ji L. N., Cao Y. Y., Shi X. F., Synthesis, characterization and interaction of mixed polypyridyl ruthenium(II) complexes with calf thymus DNA. *Trans. Met. Chem.* 2001, 26, 733.
- [106] Satyanarayana S., Dabrowiak J. C., Chaires J. B., Neither delta- nor lambda-tris(phenanthroline) ruthenium(II) binds to DNA by classical intercalation. *Biochemistry* 1992, 31, 9319.
- [107] Lerman L. S. J., Structural considerations in the interactions of deoxyribonucleic acid and acridines. *Mol. Biol.* 1961, 3, 18.
- [108] Dougherty G., Pilbrow J. R., Physico-chemical probes of intercalation, *Int. J. Biochem.* 1984, 16, 1179.
- [109] Wilson W. D., Jones R. L., in *Intercalation Chemistry* 1982, pp. 445-501, Academic Press, New York.

- [110] Cohen G., Eisenberg H., Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes, *Biopolymers* 1969, 8, 45.
- [111] Kapicak L., Gabbay E. J., Topography of nucleic acid helices in solutions. XXXIII. Effect of aromatic cations on the tertiary structures of deoxyribonucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 403.
- [112] Hirumi H., Hirumi K., Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers, *J. Parasitol.* 1989, 75, 985.
- [113] Mahnken R. E., Billadeau M. A., Nikonowicz E. P., Morrison H., Development of photo cis-platinum reagents. Reaction of cis-dichloro bis(1,10-phenanthroline) rhodium(II) with calf thymus DNA, nucleotides and nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9253.
- [114] Novakova O., Chen H., Vrana O., Rodger A., Sadler P.J., Brabec V., DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 2003, 42, 11544.
- [115] Gill M.R., Thomas J.A., Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics., *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41,3179.
- [116] The U.S. Food and Drug Administration website, (fecha de búsqueda: 11/2016) <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/00n-1269-nfr0001-03.pdf>
- [117] Colmenarejo G., In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin, *Med. Res. Rev.* 2003, 23, 275.
- [118] Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P., The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life* 2005, 57, 787.
- [119] Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.*, 2005, 353, 38.
- [120] Berger I., Hanif M., Nazarov A., Hartinger C.H., John R.O., Kuznetsov M.L., Groessl M., Schmitt F., Zava O., Biba F., Arion V.B., Galanski M., Jakupec M.A., Juillerat-Jeanneret M., Dyson P.J., Keppler B.K., In vitro anticancer activity and biologically relevant metabolism of organometallic ruthenium complexes with carbohydrate-based ligands, *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 9046.

- [121] Costa Pessoa J., Tomaz I., Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components, *Curr. Med. Chem.*, 2010, 17, 3701.
- [122] Hu W., Luo Q., Ma X., Wu K., Liu J., Chen Y., Xiong S., Wang J., Sadler P.J., Wang F., Arene control over thiolate to sulfinato oxidation in albumin by organometallic ruthenium anticancer complexes, *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 6586.
- [123] Zekany L., Nagypal I., in D. Leggett, (ed) *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*; Plenum Press, York, 1985, 291–353.
- [124] Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N., The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol Pharmacol.* 1975, 11, 824.
- [125] Honore B., Pedersen A.O., Conformational changes in human serum albumin studied by fluorescence and absorption spectroscopy. Distance measurements as a function of pH and fatty acids, *Biochem. J.* 1989, 258, 199.
- [126] Rohacova J., Luisa Marin M., Miranda M.A., Complexes between fluorescent cholic acid derivatives and human serum albumin. A photophysical approach to investigate the binding behavior, *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 4710.
- [127] Lakowicz R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd Ed., Springer, 2006.
- [128] Gama S., Mendes F., Marques F., Santos I.C., Carvalho M.F., Correia I., Costa Pessoa J., Santos I., Paulo A., Copper (II) complexes with tridentate pyrazole-based ligands: synthesis, characterization, DNA cleavage activity and cytotoxicity, *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 637.
- [129] Israels L.G., Israels E.D., Apoptosis, *Oncologist*, 1999, 4, 332.
- [130] Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V, *J. Immunol. Methods* 1995, 184, 39.
- [131] Levina A., Mitra A., Lay P.A., Recent developments in ruthenium anticancer drugs, *Metallomics* 2009, 1, 458.
- [132] Bruijninx P.C.A., Sadler P.J., New trends for metal complexes with anticancer activity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008, 12, 197.
- [133] Dumontet C., Jordan M.A., Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics, *Drug Discovery* 2010, 9, 790.
- [134] Cox D., Brennan M., Moran N., Integrins as therapeutic targets:

lessons and opportunities, *Drug Discovery* 2010, 9, 804.

[135] Mitra A.K., Sawada K., Tiwari P., Mui K., Gwin K., Lengyel E., Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis, *Oncogene* 2011, 30, 1566.

[136] Janssen A., Medema R.H., Mitosis as an anti-cancer target, *Oncogene* 2011, 30, 2799.

[137] Maeda H., Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 797.

# Capítulo 6

# Conclusiones generales y perspectivas

## 6.1 Conclusiones generales

## 6.2 Perspectivas

6.2.1 Complejos metálicos con ligandos bisfosfonato bioactivos frente a *T. cruzi*

6.2.2 Complejos Rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas de 5-nitrofurano

6.2.3 Consideraciones finales

## 6.1 CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados generados en este Trabajo de Tesis pueden ser analizados desde dos puntos de vista: uno puramente Químico Inorgánico, relacionado con la síntesis y la caracterización de nuevos compuestos de coordinación, y otro Químico Medicinal, relacionado con la potencialidad de dichos compuestos como agentes terapéuticos para combatir, principalmente, la enfermedad de Chagas.

Desde el punto de vista Químico Inorgánico, se desarrollaron dos nuevas familias de compuestos con ligandos bioactivos. En conjunto, se obtuvieron dieciséis nuevos complejos con ligandos bisfosfonato (risedronato, pamidronato, alendronato e ibandronato) de fórmula general  $[M^{II}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $[M^{II}_2(\text{Ale})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con  $M = \text{Cu}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Mn}$  y  $\text{Ni}$ ,  $[M^{II}(\text{Pam})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con  $M = \text{Mn}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Ni}$ , y  $\{[M^{II}(\text{Iba})] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$  con  $M = \text{Mn}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Ni}$ , así como  $[\text{Ni}^{II}(\text{Ris})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $([\text{Cu}^{II}(\text{Pam})] \cdot \text{H}_2\text{O})_n$  y cuatro nuevos complejos diméricos Rutenio-areno de fórmula  $[\text{Ru}_2(\textit{p}\text{-cimen})_2(\text{L})_2]\text{X}_2$ , donde  $\text{X} = \text{Cl}$  o  $\text{PF}_6$  y HL = tiosemicarbazonas bioactivas derivadas de 5-nitrofurano como coligandos (tiosemicarbazona de 5-nitro-2-furaldehído y sus  $N^4$ -fenil,  $N^4$ -etil y  $N^4$ -metil derivados). Todos los complejos se caracterizaron analítica, fisicoquímica y estructuralmente de forma exhaustiva y se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas potencialmente relacionadas con la actividad biológica, como el comportamiento electroquímico. Los estudios de caracterización realizados demostraron que los nuevos complejos con ligandos bisfosfonatos bioactivos desarrollados resultaron, dentro de cada línea, isoestructurales entre sí. Todos los compuestos Rutenio-*p*-cimen presentaron un mismo modo de coordinación a través del nitrógeno azometínico y el azufre tiocarbonílico. Además, es de resaltar que el desarrollo de estos compuestos Rutenio-areno constituyó el inicio del trabajo con compuestos organometálicos por parte del grupo que integra el tesista. Antes se había trabajado únicamente con compuestos de coordinación clásicos. Además, cabe destacar que la química organometálica de ligandos tiosemicarbazona bioactivos había sido escasamente estudiada al momento del inicio de este Trabajo de Tesis. También, debe resaltarse que de este trabajo surge la descripción de las primeras estructuras cristalinas de complejos metálicos con



bisfosfonatos bioactivos. Por lo tanto, la información aportada resulta relevante y novedosa.

Desde el punto de vista de la Química Inorgánica Medicinal, se realizó, para ambas familias, el estudio de la actividad biológica *in vitro* sobre *T. cruzi*. Además, para la serie Rutenio-*p*-cimeno se determinó su actividad en *T. brucei*, y su actividad como potenciales fármacos contra el cáncer. Para ambas familias de compuestos se estudió el mecanismo de acción probable.

En relación a la actividad anti *T. cruzi* los complejos metálicos obtenidos con los ligandos bisfosfonatos mostraron una muy buena actividad sobre las formas epimastigota y amastigota intracelular de *T. cruzi* siendo, la mayoría de ellos, más activos que sus correspondientes ligandos libres en ambas formas.

Por otro lado, los complejos Rutenio-*p*-cimeno mostraron actividad *in vitro* contra las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, y dos de ellos resultaron ser más activos que el fármaco de referencia Nifurtimox. Algunos de estos compuestos también resultaron activos en *T. brucei*, parásito responsable de la Tripanosomiasis africana.

Para el caso de los complejos metálicos con ligandos bisfosfonatos los estudios sugieren que la actividad en *T. cruzi* podría ser debida principalmente a la inhibición selectiva de la enzima TcFPPS.

Por otro lado, para la familia Rutenio-*p*-cimeno el mecanismo estaría basado principalmente en la generación, mediante biorreducción en el parásito, de radicales libres tóxicos. No pueden descartarse otros blancos de acción ya que se constató su capacidad de interaccionar con el ADN y su capacidad de inhibir la enzima parasitaria cruzipaína. En ambos casos, no se puede descartar la existencia de otros blancos adicionales que podrían contribuir para explicar el aumento de la actividad observada respecto al ligando libre.

La actividad varió al cambiar el centro metálico en el caso de la serie de bisfosfonatos y en el caso de los complejos Rutenio-*p*-cimeno al cambiar el ligando tiosemicarbazona. Sin embargo, no fue posible encontrar una justificación a la tendencia observada en el cambio de las actividades en función del centro metálico de los complejos

bisfosfonato, ni de los ligandos tiosemicarbazona en la línea de los complejos Rutenio-*p*-cimeno.

Todos los compuestos metálicos de los bisfosfonatos mostraron una baja citotoxicidad en células mamíferas modelo y, por lo tanto, altos índices de selectividad para el parásito. Esto determinó que en particular el compuesto  $[\text{Mn}(\text{Ris})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  pasara en esta instancia a la fase de estudios *in vivo*. Los compuestos Ru-*p*-cimeno mostraron bajos índices de selectividad para *T. cruzi* y mayores selectividades para *T. brucei*.

Por otro lado, los compuestos Rutenio-*p*-cimeno con tiosemicarbazonas derivadas del 5-nitrofurano no sólo mostraron ser potenciales agentes antiparasitarios, sino que también resultaron ser agentes prometedores para la quimioterapia contra el cáncer. Como resultado global se puede constatar que el derivado con sustituyente fenilo de la serie de tiosemicarbazonas, prácticamente inactivo en su forma libre, generó el complejo Rutenio-*p*-cimeno más activo contra todas las líneas tumorales testeadas; sus valores de  $\text{Cl}_{50}$  resultaron hasta 10 veces menores que los del cisplatino. En cuanto al estudio del mecanismo de acción probable de estos complejos, se detectó, mediante AFM, una fuerte interacción con proteínas involucradas en el ciclo celular (tubulina), así como en la formación del citoesqueleto (integrina).

Todos los complejos desarrollados presentaron una importante unión a la albúmina. Esto puede tener importantes consecuencias en el comportamiento biológico de ambas familias. Debido a que uno de los inconvenientes principales en los complejos metálicos con bisfosfonatos resultó ser su baja solubilidad en medio fisiológico, la interacción con albúmina podría, eventualmente, favorecer la biodisponibilidad de estos complejos metálicos al actuar como transportador de los mismos. Además, dado el hecho de que la albúmina se acumula en los tejidos tumorales como una consecuencia del efecto EPR (Enhanced permeability and retention effect), esto demostró ser beneficioso para los complejos de la línea Rutenio-*p*-cimeno obtenidos. La unión a albúmina puede proveer a estos compuestos de una selectividad aumentada hacia las células tumorales.

En suma, los resultados de este Trabajo de Tesis muestran que la coordinación de compuestos orgánicos, que han presentado actividad tripanosomicida o antitumoral, a metales de interés farmacológico puede resultar una estrategia adecuada para

desarrollar nuevas herramientas terapéuticas contra enfermedades tropicales producidas por tripanosomátidos, en particular la Tripanosomiasis americana, así como contra el cáncer. En forma general, reafirman la importancia de la Química Inorgánica Medicinal en el desarrollo de nuevos potenciales fármacos.

La experiencia adquirida en los sistemas estudiados servirá como base para generar nuevos complejos potencialmente activos. Éstos se diseñarán realizando modificaciones racionales a los anteriores complejos, que permitan superar algunos inconvenientes presentados por ellos. Algunas de estas modificaciones se indican en la sección 6.2.

Como resultado de gran significación tanto para la formación personal como para el grupo que integro, he adquirido experiencia e independencia en el desarrollo e interpretación de los estudios de caracterización, así como de evaluación biológica de los mismos. De esta forma este grupo de Química Inorgánica Medicinal expande sus posibilidades de desarrollar nuevos compuestos y realizar profundos estudios de mecanismo de acción de nuevos complejos metálicos bioactivos.

Parte del trabajo informado en esta tesis se plasmó en las publicaciones siguientes:

1. *Risedronate metal complexes potentially active against Chagas disease*, B. Demoro, F. Caruso, Miriam Rossi, D. Benitez, M. González, H. Cerecetto, M. Galizzi, R. Docampo, L. Otero, D. Gambino, *Journal of Inorganic Biochemistry* 2010, 104, 12, 1252.

2. *New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents*, B. Demoro, C. Sarniguet, R. Sánchez-Delgado, M. Rossi, D. Liebowitz, F. Caruso, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. D. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, A. Medeiros, M. A. Comini, L. Otero, D. Gambino, *Dalton Transactions* 2012, 41, 1534.

3. *Bisphosphonate metal complexes as selective inhibitors of Trypanosoma cruzi farnesyl diphosphate synthase*, B. Demoro, F. Caruso, M. Rossi, D. Benítez, M. Gonzalez, H. Cerecetto, M. Galizzi, L. Malayil, R. Docampo, R. Faccio, A.W. Mombrú, D. Gambino, L. Otero, *Dalton Transactions* 2012, 41, 6468.

4. *Potential mechanism of the anti-trypanosomal activity of organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones*, B. Demoro, M. Rossi, F. Caruso, D. Liebowitz, C. Olea-Azar, U. Kemmerling, J. D. Maya, H. Guiset, V. Moreno, C. Pizzo, G. Mahler, L. Otero, D. Gambino, *Biological Trace Elements Research* 2013, 153, 371.

5. *Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism*, B. Demoro, R. F. M. de Almeida, F. Marques, C. P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodriguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino, A. I. Tomaz, *Dalton Transactions* 2013, 42 7131.

## **6.2 PERSPECTIVAS**

### **6.2.1 COMPLEJOS METÁLICOS CON LIGANDOS BISFOSFONATO BIOACTIVOS FRENTE *A T. cruzi***

A partir de los resultados obtenidos surgen nuevas alternativas en cuanto a estrategias sintéticas que permitan obtener complejos que tengan la posibilidad de actuar por un mecanismo de acción múltiple, pero que no presenten los inconvenientes relacionados con la biodisponibilidad que mostraron los complejos desarrollados (baja solubilidad). En este sentido, se plantean las siguientes actividades futuras:

- I) Obtener compuestos metálicos con los ligandos bioactivos elegidos, pero incluyendo en la esfera de coordinación un coligando. Se seleccionarán coligandos que contribuyan a incrementar la solubilidad y/o modular la lipofilia, a efectos de mejorar la biodisponibilidad (por ejemplo, algún aminoácido), o coligandos que permitan la unión del complejo a nuevos blancos en el parásito, como por ejemplo coligandos de estructura planar capaces de intercalar la doble hebra de ADN (1,10-fenantrolina y derivados).

- II) Utilizar ciclodextrinas como sistemas de inclusión de los compuestos desarrollados. Las ciclodextrinas (CDs) han sido utilizadas y estudiadas en química supramolecular para el desarrollo de sistemas “anfitrión-huésped” con el fin de controlar la solubilidad y estabilidad (hasta inclusive la liberación modificada en el organismo). Se propone incluir estos compuestos con el fin de estudiar el efecto de esta inclusión sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los mismos. Es importante destacar que existen escasos antecedentes en relación a la inclusión de compuestos inorgánicos poco solubles y bioactivos en CDs.

#### **6.2.1 COMPLEJOS RUTENIO-*p*-CIMENO CON TIOSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE 5-NITROFURANO**

- I) Estudiar la importancia del centro organometálico utilizando los mismos ligandos bioactivos y diferentes centros o *cores*, ya que los diferentes centros pueden aportar nuevos blancos de acción, nuevos modos de unión a blancos ya descritos, así como modificar propiedades relevantes para la aplicación biológica como la lipofilia. En este sentido, el grupo que integro ya ha iniciado trabajos de desarrollo de nuevos complejos con otros centros Rutenio-areno, en particular Ru-ciclopentadienilo, y otros *cores* como *fac*- $\text{Re}^{\text{I}}(\text{CO})_3$  y centros derivados del ferroceno .
- II) También se encuentra en curso, la exploración de la estrategia de desarrollo de sistemas de inclusión de los complejos Ru-*p*-cimeno obtenidos en ciclodextrinas.

#### **6.2.3 CONSIDERACIONES FINALES**

Con estas propuestas se pretende avanzar hacia el desarrollo de compuestos metálicos con actividad contra *T. cruzi* que ameriten la realización de estudios *in vivo*. Todo el conocimiento en Química Inorgánica y en Química Medicinal generado incentivará a la comunidad científica del área a desarrollar nuevos complejos según la estrategia

planteada por el grupo que integro y, en particular, en este Trabajo de Tesis. Se espera que el esfuerzo realizado conduzca, en un futuro, a algún compuesto metálico con potencialidad para ser introducido en fases clínicas o incluso en el mercado farmacéutico.

# **Anexo I**

**Material suplementario de Capítulo 4**

### 4.2.2.1.3 ESTUDIO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

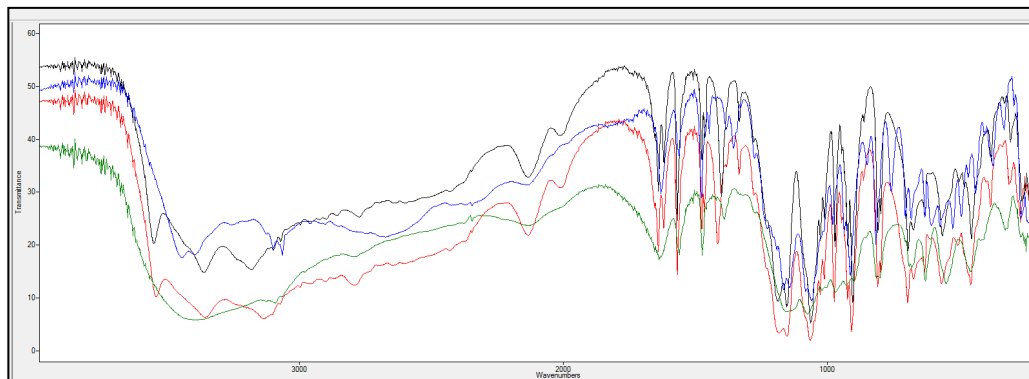


Figura 1: Espectros infrarrojo de CuRis (azul), CoRis (rojo), NiRis (verde), MnRis (negro).

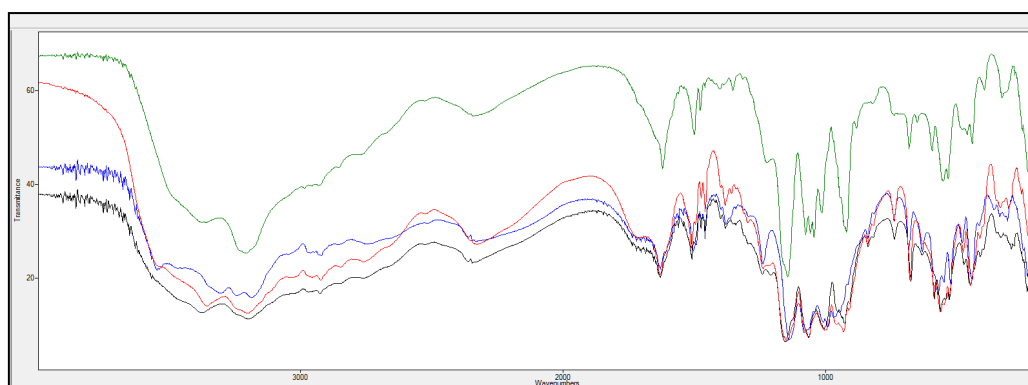


Figura 2: Espectros infrarrojo de CuAle (azul), CoAle (rojo), NiAle (verde), MnAle (negro).

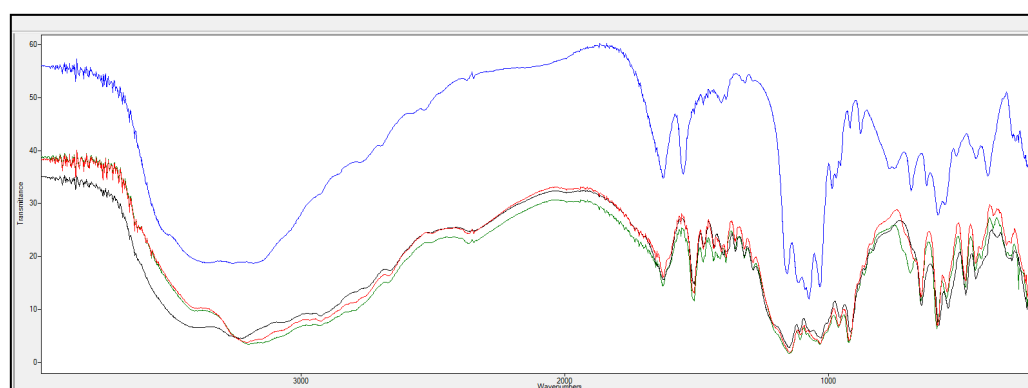


Figura 3: Espectros infrarrojo de CuPam (azul), CoPam (rojo), NiPam (verde), MnPam (negro).



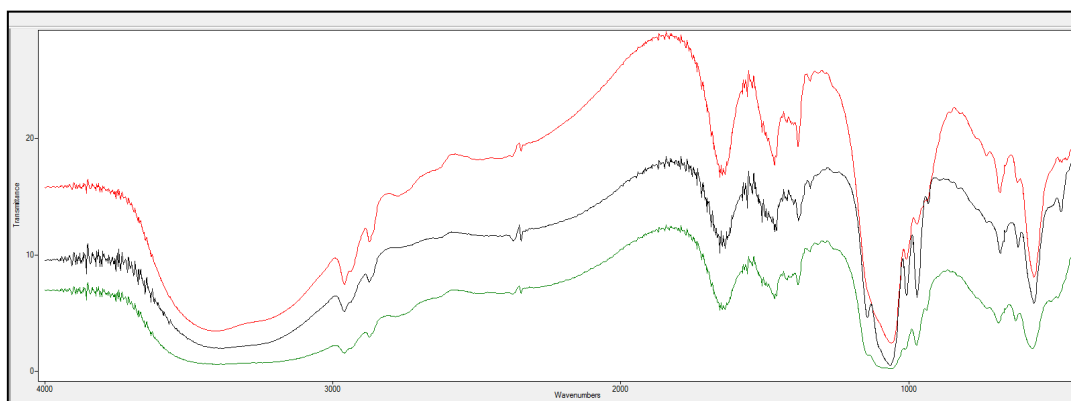


Figura 4: Espectros infrarrojo de CuRis (azul), Colba (rojo), Nilba (verde), Mnlba (negro).

#### 4.2.2.1.4 RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALINAS OBTENIDAS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL

Tabla 1: Datos cristalográficos para CuRis

Identification code	copper-risedronate	
Empirical formula	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> Cu N <sub>2</sub> O <sub>18</sub> P <sub>4</sub>	
Formula weight	699.81	
Temperature	125(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 7.6505(4) Å	α = 65.952(1)°.
	b = 8.5866(5) Å	β = 84.968(1)°.
	c = 10.2793(6) Å	γ = 78.875(1)°.
Volume	605.04(6) Å <sup>3</sup>	
Z	1	
Density (calculated)	1.921 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.260 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	359	
Crystal size	0.17 x 0.11 x 0.05 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.17 to 28.27°.	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10, -11 ≤ k ≤ 11, -13 ≤ l ≤ 13	
Reflections collected	8056	
Independent reflections	2990 [R(int) = 0.0198]	

Completeness to theta = 28.27°	99.5 %
Absorption correction	Empirical
Max. and min. transmission	0.9387 and 0.8116
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	2990 / 0 / 210
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.053
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0243, wR2 = 0.0629
R indices (all data)	R1 = 0.0271, wR2 = 0.0647
Largest diff. peak and hole	0.504 and -0.291 e.Å <sup>-3</sup>

Table 2. Atomic coordinates (x 10<sup>4</sup>) and equivalent isotropic displacement parameters (Å<sup>2</sup>x 10<sup>3</sup>) for Cu-Ris2. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U<sup>ij</sup> tensor.

	x	y	z	U(eq)
Cu	5000	5000	5000	8(1)
P(1)	2478(1)	2842(1)	4663(1)	8(1)
P(2)	4646(1)	4819(1)	2138(1)	8(1)
O(1)	3132(2)	1298(2)	4212(1)	12(1)
O(2)	646(2)	2782(2)	5316(1)	12(1)
O(3)	3859(2)	2976(2)	5580(1)	12(1)
O(4)	4551(2)	6668(2)	903(1)	11(1)
O(5)	5902(2)	4664(2)	3272(1)	10(1)
O(6)	5106(2)	3435(2)	1568(1)	11(1)
O(7)	2148(2)	6250(2)	3352(1)	10(1)
O(1W)	5219(2)	8(2)	1992(1)	16(1)
O(2W)	1796(2)	8561(2)	5577(2)	16(1)
N(1)	-2204(2)	8979(2)	433(2)	13(1)
C(1)	2423(2)	4784(2)	2975(2)	8(1)
C(2)	962(2)	4800(2)	2008(2)	12(1)
C(3)	121(2)	6556(2)	951(2)	10(1)
C(4)	735(2)	7324(2)	-447(2)	13(1)
C(5)	-134(2)	8924(2)	-1375(2)	15(1)
C(6)	-1627(2)	9749(2)	-907(2)	15(1)
C(7)	-1391(2)	7435(2)	1354(2)	12(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for Cu-Ris2.

---

Cu-O(3)	1.9457(11)
Cu-O(3)#1	1.9458(11)
Cu-O(5)	1.9597(11)
Cu-O(5)#1	1.9597(11)
P(1)-O(2)	1.5008(12)
P(1)-O(3)	1.5261(12)
P(1)-O(1)#2	1.5583(12)
P(1)-O(1)	1.5583(12)
P(1)-C(1)	1.8492(16)
P(2)-O(6)#2	1.5006(12)
P(2)-O(6)	1.5006(12)
P(2)-O(5)	1.5232(12)
P(2)-O(4)	1.5707(12)
P(2)-C(1)	1.8367(16)
O(1)-H(10)	0.73(3)
O(4)-H(4A)	0.75(3)
O(7)-C(1)	1.4355(18)
O(7)-H(70)	0.79(3)
O(1W)-H(1W)	0.79(3)
O(1W)-H(2W)	0.79(3)
O(2W)-H(3W)	0.80(3)
O(2W)-H(4W)	0.77(3)
N(1)-C(6)	1.339(2)
N(1)-C(7)	1.343(2)
N(1)-H(1)	0.88(3)
C(1)-C(2)	1.554(2)
C(2)-C(3)	1.510(2)
C(2)-H(2B)	0.9900
C(2)-H(2A)	0.9900
C(3)-C(7)	1.383(2)
C(3)-C(4)	1.396(2)
C(4)-C(5)	1.390(2)
C(4)-H(4)	0.9500
C(5)-C(6)	1.381(3)
C(5)-H(5)	0.9500
C(6)-H(6)	0.9500

C(7)-H(7)	0.9500
O(3)-Cu-O(3)#1	180.000(1)
O(3)-Cu-O(5)	89.74(5)
O(3)#1-Cu-O(5)	90.26(5)
O(3)-Cu-O(5)#1	90.26(5)
O(3)#1-Cu-O(5)#1	89.74(5)
O(5)-Cu-O(5)#1	180.000(1)
O(2)-P(1)-O(3)	114.19(7)
O(2)-P(1)-O(1)#2	111.48(7)
O(3)-P(1)-O(1)#2	111.03(7)
O(2)-P(1)-O(1)	111.48(7)
O(3)-P(1)-O(1)	111.03(7)
O(2)-P(1)-C(1)	109.77(7)
O(3)-P(1)-C(1)	105.49(7)
O(1)#2-P(1)-C(1)	104.21(7)
O(1)-P(1)-C(1)	104.21(7)
O(6)#2-P(2)-O(5)	114.89(7)
O(6)-P(2)-O(5)	114.89(7)
O(6)#2-P(2)-O(4)	110.97(7)
O(6)-P(2)-O(4)	110.97(7)
O(5)-P(2)-O(4)	108.43(7)
O(6)#2-P(2)-C(1)	110.72(7)
O(6)-P(2)-C(1)	110.72(7)
O(5)-P(2)-C(1)	105.60(7)
O(4)-P(2)-C(1)	105.71(7)
P(1)-O(1)-H(10)	116(2)
P(1)-O(3)-Cu	122.39(7)
P(2)-O(4)-H(4A)	110(2)
P(2)-O(5)-Cu	121.48(7)
C(1)-O(7)-H(70)	116.8(18)
H(1W)-O(1W)-H(2W)	107(3)
H(3W)-O(2W)-H(4W)	110(3)
C(6)-N(1)-C(7)	122.96(15)
C(6)-N(1)-H(1)	120.9(16)
C(7)-N(1)-H(1)	116.2(16)
O(7)-C(1)-C(2)	114.66(13)
O(7)-C(1)-P(2)	103.25(10)

C(2)-C(1)-P(2)	113.29(11)
O(7)-C(1)-P(1)	106.68(10)
C(2)-C(1)-P(1)	108.74(10)
P(2)-C(1)-P(1)	109.91(8)
C(3)-C(2)-C(1)	116.30(13)
C(3)-C(2)-H(2B)	108.2
C(1)-C(2)-H(2B)	108.2
C(3)-C(2)-H(2A)	108.2
C(1)-C(2)-H(2A)	108.2
H(2B)-C(2)-H(2A)	107.4
C(7)-C(3)-C(4)	117.34(15)
C(7)-C(3)-C(2)	118.87(15)
C(4)-C(3)-C(2)	123.73(15)
C(5)-C(4)-C(3)	120.65(16)
C(5)-C(4)-H(4)	119.7
C(3)-C(4)-H(4)	119.7
C(6)-C(5)-C(4)	119.37(16)
C(6)-C(5)-H(5)	120.3
C(4)-C(5)-H(5)	120.3
N(1)-C(6)-C(5)	118.97(16)
N(1)-C(6)-H(6)	120.5
C(5)-C(6)-H(6)	120.5
N(1)-C(7)-C(3)	120.70(15)
N(1)-C(7)-H(7)	119.7
C(3)-C(7)-H(7)	119.7

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+1,-y+1,-z+1 #2 x,y,z

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for Cu-Ris2. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Cu	9(1)	9(1)	6(1)	-3(1)	1(1)	-3(1)
P(1)	8(1)	8(1)	8(1)	-3(1)	1(1)	-2(1)
P(2)	9(1)	8(1)	6(1)	-3(1)	1(1)	-2(1)
O(1)	15(1)	8(1)	15(1)	-5(1)	5(1)	-4(1)
O(2)	11(1)	13(1)	14(1)	-6(1)	4(1)	-4(1)
O(3)	16(1)	11(1)	9(1)	-1(1)	-2(1)	-6(1)
O(4)	18(1)	9(1)	6(1)	-3(1)	2(1)	-4(1)
O(5)	9(1)	15(1)	9(1)	-6(1)	0(1)	-2(1)
O(6)	15(1)	10(1)	8(1)	-4(1)	2(1)	-2(1)
O(7)	10(1)	9(1)	13(1)	-7(1)	4(1)	-2(1)
O(1W)	22(1)	10(1)	12(1)	-4(1)	0(1)	0(1)
O(2W)	13(1)	11(1)	23(1)	-6(1)	-3(1)	-2(1)
N(1)	10(1)	14(1)	18(1)	-8(1)	-2(1)	-1(1)
C(1)	9(1)	7(1)	8(1)	-3(1)	0(1)	-1(1)
C(2)	13(1)	10(1)	13(1)	-2(1)	-5(1)	-2(1)
C(3)	10(1)	10(1)	12(1)	-4(1)	-3(1)	-4(1)
C(4)	10(1)	17(1)	13(1)	-8(1)	-1(1)	-3(1)
C(5)	16(1)	18(1)	10(1)	-3(1)	-1(1)	-7(1)
C(6)	16(1)	12(1)	15(1)	-2(1)	-6(1)	-4(1)
C(7)	12(1)	13(1)	11(1)	-5(1)	0(1)	-5(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for Cu-Ris2.

	x	y	z	U(eq)
H(2B)	1491	4086	1475	15
H(2A)	7	4234	2629	15
H(4)	1757	6747	-767	15
H(5)	294	9446	-2323	17
H(6)	-2235	10846	-1526	18
H(7)	-1859	6940	2292	14
H(1)	-3140(30)	9490(30)	770(30)	25(6)
H(10)	2750(40)	510(40)	4620(30)	39(8)
H(70)	1260(30)	6400(30)	3780(30)	26(6)
H(4A)	4660(40)	6600(30)	190(30)	32(7)
H(1W)	5080(30)	870(40)	2130(30)	32(7)
H(2W)	5320(40)	-770(40)	2740(30)	39(8)
H(3W)	2540(40)	7720(40)	5940(30)	27(7)
H(4W)	1080(40)	8340(30)	5230(30)	32(7)

Table 6. Torsion angles [°] for Cu-Ris2.

---

O(2)-P(1)-O(1)-O(1)#2	0.00(12)
C(1)-P(1)-O(1)-O(1)#2	0.00(14)
O(2)-P(1)-O(3)-Cu	-114.67(8)
O(1)#2-P(1)-O(3)-Cu	118.25(8)
O(1)-P(1)-O(3)-Cu	118.25(8)
C(1)-P(1)-O(3)-Cu	5.95(10)
O(5)-Cu-O(3)-P(1)	-58.58(9)
O(5)#1-Cu-O(3)-P(1)	121.42(9)
O(6)#2-P(2)-O(5)-Cu	-136.26(7)
O(6)-P(2)-O(5)-Cu	-136.26(7)
O(4)-P(2)-O(5)-Cu	98.97(8)
C(1)-P(2)-O(5)-Cu	-13.95(10)
O(3)-Cu-O(5)-P(2)	64.17(8)
O(3)#1-Cu-O(5)-P(2)	-115.83(8)
O(5)-P(2)-O(6)-O(6)#2	0.00(15)
O(4)-P(2)-O(6)-O(6)#2	0.00(14)
C(1)-P(2)-O(6)-O(6)#2	0.00(12)
O(6)#2-P(2)-C(1)-O(7)	-175.61(9)
O(6)-P(2)-C(1)-O(7)	-175.61(9)
O(5)-P(2)-C(1)-O(7)	59.45(11)
O(4)-P(2)-C(1)-O(7)	-55.36(11)
O(6)#2-P(2)-C(1)-C(2)	-51.00(13)
O(6)-P(2)-C(1)-C(2)	-51.00(13)
O(5)-P(2)-C(1)-C(2)	-175.94(10)
O(4)-P(2)-C(1)-C(2)	69.26(12)
O(6)#2-P(2)-C(1)-P(1)	70.87(9)
O(6)-P(2)-C(1)-P(1)	70.87(9)
O(5)-P(2)-C(1)-P(1)	-54.07(9)
O(4)-P(2)-C(1)-P(1)	-168.87(7)
O(2)-P(1)-C(1)-O(7)	70.85(11)
O(3)-P(1)-C(1)-O(7)	-52.62(11)
O(1)#2-P(1)-C(1)-O(7)	-169.64(10)
O(1)-P(1)-C(1)-O(7)	-169.64(10)
O(2)-P(1)-C(1)-C(2)	-53.31(12)
O(3)-P(1)-C(1)-C(2)	-176.78(10)
O(1)#2-P(1)-C(1)-C(2)	66.19(12)



O(1)-P(1)-C(1)-C(2)	66.19(12)
O(2)-P(1)-C(1)-P(2)	-177.85(7)
O(3)-P(1)-C(1)-P(2)	58.68(9)
O(1)#2-P(1)-C(1)-P(2)	-58.35(9)
O(1)-P(1)-C(1)-P(2)	-58.35(9)
O(7)-C(1)-C(2)-C(3)	33.4(2)
P(2)-C(1)-C(2)-C(3)	-84.76(16)
P(1)-C(1)-C(2)-C(3)	152.72(12)
C(1)-C(2)-C(3)-C(7)	-90.80(18)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	92.21(19)
C(7)-C(3)-C(4)-C(5)	1.2(2)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	178.22(15)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-0.5(2)
C(7)-N(1)-C(6)-C(5)	0.3(2)
C(4)-C(5)-C(6)-N(1)	-0.3(2)
C(6)-N(1)-C(7)-C(3)	0.4(2)
C(4)-C(3)-C(7)-N(1)	-1.2(2)
C(2)-C(3)-C(7)-N(1)	-178.34(15)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+1,-y+1,-z+1 #2 x,y,z

Table 7. Hydrogen bonds for Cu-Ris2 [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
N(1)-H(1)...O(1W)#3	0.88(3)	1.83(3)	2.676(2)	162(2)
O(1)-H(10)...O(2W)#4	0.73(3)	1.82(3)	2.5544(18)	178(3)
O(7)-H(70)...O(2)#5	0.79(3)	1.84(3)	2.6197(17)	167(3)
O(4)-H(4A)...O(6)#6	0.75(3)	1.81(3)	2.5663(17)	177(3)
O(1W)-H(1W)...O(6)#2	0.79(3)	2.04(3)	2.7782(18)	155(3)
O(1W)-H(1W)...O(1)#2	0.79(3)	2.61(3)	3.1174(18)	123(2)
O(1W)-H(2W)...O(3)#7	0.79(3)	2.00(3)	2.7734(18)	165(3)
O(2W)-H(3W)...O(5)#1	0.80(3)	2.03(3)	2.8252(18)	169(2)
O(2W)-H(4W)...O(2)#5	0.77(3)	2.01(3)	2.7669(18)	166(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x+1, -y+1, -z+1$  #2  $x, y, z$  #3  $x-1, y+1, z$  #4  $x, y-1, z$

#5  $-x, -y+1, -z+1$  #6  $-x+1, -y+1, -z$  #7  $-x+1, -y, -z+1$

Tabla 2: Datos cristalográficos para NiRis

Empirical formula	C14 H28 N2 Ni O18 P4	
Formula weight	694.95	
Temperature	125(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 6.6792(3) Å	$\alpha = 97.695(1)^\circ$ .
	b = 9.6383(4) Å	$\beta = 93.744(1)^\circ$ .
	c = 9.7242(5) Å	$\gamma = 99.829(1)^\circ$ .
Volume	608.77(5) Å <sup>3</sup>	
Z	1	
Density (calculated)	1.896 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.152 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	358	
Crystal size	0.24 x 0.20 x 0.15 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.12 to 28.28°.	
Index ranges	-8 ≤ h ≤ 8, -12 ≤ k ≤ 12, - 12 ≤ l ≤ 12	
Reflections collected	8010	
Independent reflections	3001 [R(int) = 0.0139]	
Completeness to theta = 28.28°	99.5 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.8352 and 0.7678	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	3001 / 0 / 208	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.089	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0265, wR2 = 0.0705	
R indices (all data)	R1 = 0.0274, wR2 = 0.0711	
Largest diff. peak and hole	0.951 and -0.409 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for Ni-RIS2.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ni(1)	0	0	10000	10(1)
P(1)	589(1)	3077(1)	9018(1)	11(1)
P(2)	3642(1)	1099(1)	8098(1)	12(1)
P(11)	-102(12)	2541(8)	8042(8)	15(2)
O(1)	-850(2)	1718(1)	9211(1)	14(1)
O(2)	1838(2)	3870(1)	10338(1)	18(1)
O(3)	-671(2)	4037(1)	8278(1)	17(1)
O(4)	2134(2)	-55(1)	8595(1)	14(1)
O(5)	5311(2)	1802(1)	9312(1)	17(1)
O(6)	4516(2)	624(1)	6774(1)	18(1)
O(7)	1079(2)	2067(1)	6404(1)	17(1)
O(8)	-2075(2)	-1338(1)	8520(1)	19(1)
O(1S)	2110(2)	270(2)	3939(1)	21(1)
N	2667(2)	7396(2)	7392(2)	19(1)
C(1)	2300(2)	2556(2)	7716(2)	14(1)
C(2)	3996(2)	3796(2)	7502(2)	14(1)
C(3)	3289(2)	5039(2)	6962(2)	14(1)
C(4)	2715(3)	5025(2)	5555(2)	16(1)
C(5)	2124(3)	6209(2)	5088(2)	20(1)
C(6)	2108(3)	7395(2)	6043(2)	21(1)
C(7)	3264(3)	6273(2)	7867(2)	17(1)

Table 3. Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for Ni-RIS2.

---

Ni(1)-O(4)	2.0405(11)
Ni(1)-O(4)#1	2.0405(11)
Ni(1)-O(1)#1	2.0629(11)
Ni(1)-O(1)	2.0630(11)
Ni(1)-O(8)	2.0707(13)
Ni(1)-O(8)#1	2.0707(13)
P(1)-O(2)	1.5195(13)
P(1)-O(1)	1.5286(12)
P(1)-O(3)	1.5643(12)
P(1)-C(1)	1.8370(17)
P(2)-O(6)	1.4959(12)
P(2)-O(4)	1.5200(12)
P(2)-O(5)	1.5660(13)
P(2)-C(1)	1.8548(17)
P(11)-O(1)	1.534(8)
P(11)-O(3)	1.545(8)
P(11)-C(1)	1.654(8)
P(11)-O(7)	1.860(8)
O(3)-H(6)	0.78(3)
O(5)-H(5)	0.78(3)
O(7)-C(1)	1.4443(19)
O(7)-H(7A)	0.8400
O(8)-H(1)	0.80(3)
O(8)-H(2)	0.78(3)
O(1S)-H(1W)	0.77(3)
O(1S)-H(2W)	0.80(3)
N-C(6)	1.340(2)
N-C(7)	1.342(2)
N-H(0)	0.8800
C(1)-C(2)	1.546(2)
C(2)-C(3)	1.504(2)
C(2)-H(2B)	0.9900
C(2)-H(2C)	0.9900
C(3)-C(7)	1.385(2)
C(3)-C(4)	1.395(2)
C(4)-C(5)	1.390(2)

C(4)-H(4A)	0.9500
C(5)-C(6)	1.375(3)
C(5)-H(5B)	0.9500
C(6)-H(6B)	0.9500
C(7)-H(7B)	0.9500
O(4)-Ni(1)-O(4)#1	180.00(4)
O(4)-Ni(1)-O(1)#1	90.82(4)
O(4)#1-Ni(1)-O(1)#1	89.18(4)
O(4)-Ni(1)-O(1)	89.18(4)
O(4)#1-Ni(1)-O(1)	90.82(4)
O(1)#1-Ni(1)-O(1)	180.00(6)
O(4)-Ni(1)-O(8)	88.31(5)
O(4)#1-Ni(1)-O(8)	91.69(5)
O(1)#1-Ni(1)-O(8)	91.15(5)
O(1)-Ni(1)-O(8)	88.85(5)
O(4)-Ni(1)-O(8)#1	91.69(5)
O(4)#1-Ni(1)-O(8)#1	88.31(5)
O(1)#1-Ni(1)-O(8)#1	88.85(5)
O(1)-Ni(1)-O(8)#1	91.15(5)
O(8)-Ni(1)-O(8)#1	179.999(1)
O(2)-P(1)-O(1)	114.76(7)
O(2)-P(1)-O(3)	112.69(7)
O(1)-P(1)-O(3)	108.51(7)
O(2)-P(1)-C(1)	109.77(7)
O(1)-P(1)-C(1)	106.75(7)
O(3)-P(1)-C(1)	103.61(7)
O(6)-P(2)-O(4)	114.25(7)
O(6)-P(2)-O(5)	113.19(7)
O(4)-P(2)-O(5)	109.72(7)
O(6)-P(2)-C(1)	105.45(7)
O(4)-P(2)-C(1)	108.83(7)
O(5)-P(2)-C(1)	104.79(7)
O(1)-P(11)-O(3)	109.3(5)
O(1)-P(11)-C(1)	116.2(5)
O(3)-P(11)-C(1)	113.7(5)
O(1)-P(11)-O(7)	134.1(5)
O(3)-P(11)-O(7)	116.4(4)

C(1)-P(11)-O(7)	48.1(2)
P(1)-O(1)-P(11)	40.2(3)
P(1)-O(1)-Ni(1)	125.70(7)
P(11)-O(1)-Ni(1)	132.9(3)
P(11)-O(3)-P(1)	39.6(3)
P(11)-O(3)-H(6)	146.5(19)
P(1)-O(3)-H(6)	111.9(19)
P(2)-O(4)-Ni(1)	132.87(7)
P(2)-O(5)-H(5)	116(2)
C(1)-O(7)-P(11)	58.5(2)
C(1)-O(7)-H(7A)	109.5
P(11)-O(7)-H(7A)	73.6
Ni(1)-O(8)-H(1)	111(2)
Ni(1)-O(8)-H(2)	117(2)
H(1)-O(8)-H(2)	106(3)
H(1W)-O(1S)-H(2W)	101(3)
C(6)-N-C(7)	122.55(15)
C(6)-N-H(0)	118.7
C(7)-N-H(0)	118.7
O(7)-C(1)-C(2)	107.98(13)
O(7)-C(1)-P(11)	73.4(3)
C(2)-C(1)-P(11)	130.7(3)
O(7)-C(1)-P(1)	107.61(11)
C(2)-C(1)-P(1)	113.22(11)
P(11)-C(1)-P(1)	34.6(3)
O(7)-C(1)-P(2)	107.13(10)
C(2)-C(1)-P(2)	105.49(11)
P(11)-C(1)-P(2)	121.5(3)
P(1)-C(1)-P(2)	115.08(9)
C(3)-C(2)-C(1)	116.03(13)
C(3)-C(2)-H(2B)	108.3
C(1)-C(2)-H(2B)	108.3
C(3)-C(2)-H(2C)	108.3
C(1)-C(2)-H(2C)	108.3
H(2B)-C(2)-H(2C)	107.4
C(7)-C(3)-C(4)	117.64(15)
C(7)-C(3)-C(2)	119.93(15)
C(4)-C(3)-C(2)	122.39(15)

C(5)-C(4)-C(3)	120.81(16)
C(5)-C(4)-H(4A)	119.6
C(3)-C(4)-H(4A)	119.6
C(6)-C(5)-C(4)	118.68(16)
C(6)-C(5)-H(5B)	120.7
C(4)-C(5)-H(5B)	120.7
N-C(6)-C(5)	119.94(16)
N-C(6)-H(6B)	120.0
C(5)-C(6)-H(6B)	120.0
N-C(7)-C(3)	120.37(16)
N-C(7)-H(7B)	119.8
C(3)-C(7)-H(7B)	119.8

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y,-z+2



Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for Ni-RIS2. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
Ni(1)	12(1)	9(1)	11(1)	3(1)	1(1)	2(1)
P(1)	11(1)	10(1)	11(1)	3(1)	1(1)	3(1)
P(2)	12(1)	11(1)	15(1)	4(1)	2(1)	4(1)
O(1)	12(1)	13(1)	18(1)	6(1)	3(1)	4(1)
O(2)	20(1)	16(1)	17(1)	0(1)	0(1)	5(1)
O(3)	19(1)	15(1)	20(1)	6(1)	2(1)	8(1)
O(4)	16(1)	11(1)	17(1)	4(1)	5(1)	4(1)
O(5)	13(1)	20(1)	18(1)	-1(1)	1(1)	4(1)
O(6)	19(1)	19(1)	16(1)	4(1)	4(1)	5(1)
O(7)	19(1)	18(1)	14(1)	3(1)	-1(1)	2(1)
O(8)	24(1)	16(1)	14(1)	4(1)	-2(1)	0(1)
O(1S)	22(1)	27(1)	15(1)	1(1)	2(1)	8(1)
N	23(1)	12(1)	22(1)	2(1)	4(1)	3(1)
C(1)	14(1)	14(1)	15(1)	3(1)	1(1)	3(1)
C(2)	13(1)	12(1)	19(1)	5(1)	2(1)	2(1)
C(3)	13(1)	12(1)	18(1)	5(1)	3(1)	1(1)
C(4)	17(1)	15(1)	17(1)	2(1)	3(1)	1(1)
C(5)	20(1)	21(1)	18(1)	8(1)	0(1)	2(1)
C(6)	22(1)	16(1)	27(1)	9(1)	2(1)	4(1)
C(7)	20(1)	14(1)	17(1)	4(1)	2(1)	1(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for Ni-RIS2.

	x	y	z	U(eq)
H(7A)	192	1359	6486	26
H(0)	2642	8163	7989	23
H(2B)	4818	4150	8404	17
H(2C)	4909	3416	6843	17
H(4A)	2728	4197	4908	20
H(5B)	1739	6198	4128	24
H(6B)	1702	8213	5747	25
H(7B)	3671	6325	8830	20
H(1)	-1980(40)	-2150(30)	8530(30)	36(7)
H(2)	-2020(40)	-1210(30)	7740(30)	31(7)
H(5)	6430(50)	1730(30)	9190(30)	47(9)
H(6)	-980(40)	4620(30)	8810(30)	26(6)
H(1W)	2390(50)	730(30)	4660(30)	45(8)
H(2W)	3190(50)	60(30)	3780(30)	33(7)

Table 6. Torsion angles [°] for Ni-RIS2.

---

O(2)-P(1)-O(1)-P(11)	-174.2(4)
O(3)-P(1)-O(1)-P(11)	58.7(4)
C(1)-P(1)-O(1)-P(11)	-52.4(4)
O(2)-P(1)-O(1)-Ni(1)	-57.59(10)
O(3)-P(1)-O(1)-Ni(1)	175.37(8)
C(1)-P(1)-O(1)-Ni(1)	64.26(10)
O(3)-P(11)-O(1)-P(1)	-60.4(4)
C(1)-P(11)-O(1)-P(1)	69.9(5)
O(7)-P(11)-O(1)-P(1)	125.9(9)
O(3)-P(11)-O(1)-Ni(1)	-158.2(2)
C(1)-P(11)-O(1)-Ni(1)	-27.9(7)
O(7)-P(11)-O(1)-Ni(1)	28.1(9)
O(4)-Ni(1)-O(1)-P(1)	-51.86(9)
O(4)#1-Ni(1)-O(1)-P(1)	128.14(9)
O(8)-Ni(1)-O(1)-P(1)	-140.18(9)
O(8)#1-Ni(1)-O(1)-P(1)	39.82(9)
O(4)-Ni(1)-O(1)-P(11)	0.2(4)
O(8)-Ni(1)-O(1)-P(11)	-88.2(4)
O(8)#1-Ni(1)-O(1)-P(11)	91.8(4)
O(1)-P(11)-O(3)-P(1)	59.4(4)
C(1)-P(11)-O(3)-P(1)	-72.2(5)
O(7)-P(11)-O(3)-P(1)	-125.6(7)
O(2)-P(1)-O(3)-P(11)	172.5(5)
O(1)-P(1)-O(3)-P(11)	-59.3(5)
C(1)-P(1)-O(3)-P(11)	53.9(5)
O(6)-P(2)-O(4)-Ni(1)	-163.72(9)
O(5)-P(2)-O(4)-Ni(1)	67.95(11)
C(1)-P(2)-O(4)-Ni(1)	-46.18(12)
O(1)#1-Ni(1)-O(4)-P(2)	-137.23(10)
O(1)-Ni(1)-O(4)-P(2)	42.77(10)
O(8)-Ni(1)-O(4)-P(2)	131.64(10)
O(8)#1-Ni(1)-O(4)-P(2)	-48.35(10)
O(1)-P(11)-O(7)-C(1)	-87.6(7)
O(3)-P(11)-O(7)-C(1)	99.1(5)
P(11)-O(7)-C(1)-C(2)	-128.2(3)
P(11)-O(7)-C(1)-P(1)	-5.7(3)

P(11)-O(7)-C(1)-P(2)	118.6(3)
O(1)-P(11)-C(1)-O(7)	126.9(5)
O(3)-P(11)-C(1)-O(7)	-104.9(5)
O(1)-P(11)-C(1)-C(2)	-133.4(4)
O(3)-P(11)-C(1)-C(2)	-5.2(7)
O(7)-P(11)-C(1)-C(2)	99.7(3)
O(1)-P(11)-C(1)-P(1)	-62.7(4)
O(3)-P(11)-C(1)-P(1)	65.5(4)
O(7)-P(11)-C(1)-P(1)	170.4(5)
O(1)-P(11)-C(1)-P(2)	26.6(6)
O(3)-P(11)-C(1)-P(2)	154.8(3)
O(7)-P(11)-C(1)-P(2)	-100.3(2)
O(2)-P(1)-C(1)-O(7)	-168.80(10)
O(1)-P(1)-C(1)-O(7)	66.24(11)
O(3)-P(1)-C(1)-O(7)	-48.22(12)
O(2)-P(1)-C(1)-C(2)	-49.55(13)
O(1)-P(1)-C(1)-C(2)	-174.51(11)
O(3)-P(1)-C(1)-C(2)	71.02(12)
O(2)-P(1)-C(1)-P(11)	-178.4(5)
O(1)-P(1)-C(1)-P(11)	56.6(5)
O(3)-P(1)-C(1)-P(11)	-57.8(5)
O(2)-P(1)-C(1)-P(2)	71.89(10)
O(1)-P(1)-C(1)-P(2)	-53.07(10)
O(3)-P(1)-C(1)-P(2)	-167.54(8)
O(6)-P(2)-C(1)-O(7)	47.10(12)
O(4)-P(2)-C(1)-O(7)	-75.88(11)
O(5)-P(2)-C(1)-O(7)	166.81(10)
O(6)-P(2)-C(1)-C(2)	-67.77(12)
O(4)-P(2)-C(1)-C(2)	169.24(10)
O(5)-P(2)-C(1)-C(2)	51.94(12)
O(6)-P(2)-C(1)-P(11)	127.8(3)
O(4)-P(2)-C(1)-P(11)	4.9(3)
O(5)-P(2)-C(1)-P(11)	-112.5(3)
O(6)-P(2)-C(1)-P(1)	166.68(9)
O(4)-P(2)-C(1)-P(1)	43.70(11)
O(5)-P(2)-C(1)-P(1)	-73.61(10)
O(7)-C(1)-C(2)-C(3)	56.77(18)
P(11)-C(1)-C(2)-C(3)	-26.6(4)

P(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-62.26(17)
P(2)-C(1)-C(2)-C(3)	171.05(12)
C(1)-C(2)-C(3)-C(7)	102.15(18)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-80.3(2)
C(7)-C(3)-C(4)-C(5)	-0.5(2)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-178.16(15)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-0.3(3)
C(7)-N-C(6)-C(5)	0.3(3)
C(4)-C(5)-C(6)-N	0.4(3)
C(6)-N-C(7)-C(3)	-1.1(3)
C(4)-C(3)-C(7)-N	1.2(2)
C(2)-C(3)-C(7)-N	178.90(15)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y,-z+2

Table 7. Hydrogen bonds for Ni-RIS2 [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
O(7)-H(7A)...O(1S)#2	0.84	1.98	2.7913(19)	162.2
N-H(0)...O(4)#3	0.88	1.83	2.6666(19)	157.0
O(8)-H(1)...O(2)#1	0.80(3)	2.12(3)	2.8363(18)	150(3)
O(8)-H(2)...O(1S)#2	0.78(3)	1.98(3)	2.7272(19)	160(3)
O(5)-H(5)...O(1)#4	0.78(3)	1.82(3)	2.5867(17)	170(3)
O(3)-H(6)...O(2)#5	0.78(3)	1.77(3)	2.5372(17)	167(3)
O(1S)-H(1W)...O(7)	0.77(3)	2.30(3)	2.9556(19)	143(3)
O(1S)-H(1W)...O(6)	0.77(3)	2.44(3)	3.0470(18)	136(3)
O(1S)-H(2W)...O(6)#6	0.80(3)	1.85(3)	2.6475(19)	172(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x, -y, -z+2$  #2  $-x, -y, -z+1$  #3  $x, y+1, z$  #4  $x+1, y, z$

#5  $-x, -y+1, -z+2$  #6  $-x+1, -y, -z+1$

Tabla 3: Datos cristalográficos para CuAle

Empirical formula	C16 H48 Cu2 N4 O32 P8	
Formula weight	1183.42	
Temperature	120(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub> /c	
Unit cell dimensions	a = 12.5975(14) Å	α = 90°.
	b = 13.3951(15) Å	β =
		110.9340(10)°.
	c = 12.5109(14) Å	γ = 90°.
Volume	1971.8(4) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	1.993 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.519 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1212	
Crystal size	0.12 x 0.06 x 0.06 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.73 to 28.28°.	
Index ranges	-16 ≤ h ≤ 16, -17 ≤ k ≤ 17, -	
	16 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	25168	
Independent reflections	4885 [R(int) = 0.0615]	
Completeness to theta = 28.28°	99.9 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9144 and 0.8388	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	4885 / 0 / 281	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.052	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0490, wR2 = 0.1294	
R indices (all data)	R1 = 0.0625, wR2 = 0.1397	
Largest diff. peak and hole	1.568 and -1.207 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for CuAle.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Cu	1958(1)	9537(1)	-300(1)	9(1)
P(2)	4028(1)	10996(1)	1142(1)	9(1)
P(52)	410(1)	9140(1)	1594(1)	9(1)
P(1)	4276(1)	8811(1)	1756(1)	10(1)
P(51)	138(1)	7807(1)	-506(1)	10(1)
O(6)	5050(2)	11058(2)	782(2)	12(1)
O(2)	5298(2)	8710(2)	1330(2)	14(1)
O(55)	-786(2)	9516(2)	1287(2)	12(1)
O(3)	3154(2)	8633(2)	778(2)	13(1)
O(56)	1210(2)	9763(2)	1201(2)	12(1)
O(4)	3409(2)	10127(2)	2780(2)	12(1)
O(5)	3803(2)	12022(2)	1622(2)	12(1)
O(57)	1000(2)	9028(2)	2928(2)	13(1)
O(52)	-1013(2)	8351(2)	-1126(2)	13(1)
O(7)	2938(2)	10693(2)	204(2)	14(1)
O(53)	1100(2)	8301(2)	-746(2)	12(1)
O(1)	4460(2)	8107(2)	2748(2)	14(1)
C(1)	4300(3)	10083(3)	2310(3)	10(1)
O(51)	-57(2)	6728(2)	-881(2)	16(1)
C(2)	5444(3)	10220(3)	3311(3)	13(1)
N(1)	6850(3)	11998(2)	5815(3)	15(1)
C(3)	5516(3)	11103(3)	4112(3)	14(1)
C(4)	6708(3)	11146(3)	5006(3)	14(1)
O(1W)	2623(3)	9342(3)	-1769(3)	31(1)
O(54)	1598(2)	7501(2)	1594(2)	13(1)
C(52)	435(3)	7863(3)	1041(3)	11(1)
C(53)	-331(3)	7140(3)	1411(3)	14(1)
N(52)	-2308(3)	8113(3)	2029(3)	25(1)
C(55)	-2425(3)	7182(3)	1314(3)	21(1)
C(54)	-1610(3)	7196(3)	668(3)	16(1)
O(2W)	8727(6)	10105(5)	4098(6)	97(2)



Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for CuAle.

Cu-O(7)	1.940(3)
Cu-O(53)	1.947(3)
Cu-O(55)#1	2.003(2)
Cu-O(3)	2.025(2)
Cu-O(1W)	2.290(3)
Cu-O(56)	2.402(2)
P(2)-O(7)	1.509(3)
P(2)-O(6)	1.512(3)
P(2)-O(5)	1.565(3)
P(2)-C(1)	1.841(3)
P(52)-O(55)	1.502(3)
P(52)-O(56)	1.520(3)
P(52)-O(57)	1.572(3)
P(52)-C(52)	1.849(4)
P(1)-O(1)	1.509(3)
P(1)-O(3)	1.522(3)
P(1)-O(2)	1.566(3)
P(1)-C(1)	1.836(4)
P(51)-O(53)	1.502(2)
P(51)-O(51)	1.513(3)
P(51)-O(52)	1.560(3)
P(51)-C(52)	1.837(3)
O(2)-H(2)	0.8400
O(55)-Cu#1	2.003(2)
O(4)-C(1)	1.442(4)
O(4)-H(4)	0.8400
O(5)-H(5)	0.8400
O(57)-H(57)	0.8400
O(52)-H(52)	0.8400
C(1)-C(2)	1.546(5)
C(2)-C(3)	1.532(5)
C(2)-H(2A)	0.9900
C(2)-H(2B)	0.9900
N(1)-C(4)	1.493(5)
N(1)-H(1A)	0.8800
N(1)-H(1B)	0.8800

C(3)-C(4)	1.519(5)
C(3)-H(3A)	0.9900
C(3)-H(3B)	0.9900
C(4)-H(4A)	0.9900
C(4)-H(4B)	0.9900
O(1W)-H(1W)	0.69(7)
O(1W)-H(2W)	0.69(7)
O(54)-C(52)	1.461(4)
O(54)-H(54)	0.8400
C(52)-C(53)	1.550(5)
C(53)-C(54)	1.548(5)
C(53)-H(53A)	0.9900
C(53)-H(53B)	0.9900
N(52)-C(55)	1.511(6)
N(52)-H(52A)	0.8800
N(52)-H(52B)	0.8800
C(55)-C(54)	1.517(5)
C(55)-H(55A)	0.9900
C(55)-H(55B)	0.9900
C(54)-H(54A)	0.9900
C(54)-H(54B)	0.9900
O(7)-Cu-O(53)	174.74(11)
O(7)-Cu-O(55)#1	86.44(11)
O(53)-Cu-O(55)#1	98.64(10)
O(7)-Cu-O(3)	91.47(10)
O(53)-Cu-O(3)	83.53(10)
O(55)#1-Cu-O(3)	176.57(10)
O(7)-Cu-O(1W)	88.81(13)
O(53)-Cu-O(1W)	89.89(12)
O(55)#1-Cu-O(1W)	88.73(12)
O(3)-Cu-O(1W)	93.94(12)
O(7)-Cu-O(56)	91.52(10)
O(53)-Cu-O(56)	89.93(9)
O(55)#1-Cu-O(56)	89.59(9)
O(3)-Cu-O(56)	87.75(9)
O(1W)-Cu-O(56)	178.27(11)
O(7)-P(2)-O(6)	114.72(15)

O(7)-P(2)-O(5)	107.19(15)
O(6)-P(2)-O(5)	110.89(14)
O(7)-P(2)-C(1)	107.37(15)
O(6)-P(2)-C(1)	109.63(15)
O(5)-P(2)-C(1)	106.67(15)
O(55)-P(52)-O(56)	116.92(14)
O(55)-P(52)-O(57)	110.75(14)
O(56)-P(52)-O(57)	106.18(14)
O(55)-P(52)-C(52)	111.37(15)
O(56)-P(52)-C(52)	106.56(15)
O(57)-P(52)-C(52)	104.15(15)
O(1)-P(1)-O(3)	112.90(15)
O(1)-P(1)-O(2)	108.81(14)
O(3)-P(1)-O(2)	110.71(14)
O(1)-P(1)-C(1)	106.99(15)
O(3)-P(1)-C(1)	109.53(15)
O(2)-P(1)-C(1)	107.71(15)
O(53)-P(51)-O(51)	114.35(15)
O(53)-P(51)-O(52)	111.58(14)
O(51)-P(51)-O(52)	105.86(15)
O(53)-P(51)-C(52)	108.52(15)
O(51)-P(51)-C(52)	108.36(15)
O(52)-P(51)-C(52)	107.94(15)
P(1)-O(2)-H(2)	109.5
P(52)-O(55)-Cu#1	145.24(16)
P(1)-O(3)-Cu	134.24(15)
P(52)-O(56)-Cu	132.38(15)
C(1)-O(4)-H(4)	109.5
P(2)-O(5)-H(5)	109.5
P(52)-O(57)-H(57)	109.5
P(51)-O(52)-H(52)	109.5
P(2)-O(7)-Cu	139.82(16)
P(51)-O(53)-Cu	136.25(16)
O(4)-C(1)-C(2)	107.5(3)
O(4)-C(1)-P(1)	106.4(2)
C(2)-C(1)-P(1)	107.5(2)
O(4)-C(1)-P(2)	110.2(2)
C(2)-C(1)-P(2)	114.8(2)

P(1)-C(1)-P(2)	110.10(17)
C(3)-C(2)-C(1)	116.2(3)
C(3)-C(2)-H(2A)	108.2
C(1)-C(2)-H(2A)	108.2
C(3)-C(2)-H(2B)	108.2
C(1)-C(2)-H(2B)	108.2
H(2A)-C(2)-H(2B)	107.4
C(4)-N(1)-H(1A)	120.0
C(4)-N(1)-H(1B)	120.0
H(1A)-N(1)-H(1B)	120.0
C(4)-C(3)-C(2)	108.9(3)
C(4)-C(3)-H(3A)	109.9
C(2)-C(3)-H(3A)	109.9
C(4)-C(3)-H(3B)	109.9
C(2)-C(3)-H(3B)	109.9
H(3A)-C(3)-H(3B)	108.3
N(1)-C(4)-C(3)	112.1(3)
N(1)-C(4)-H(4A)	109.2
C(3)-C(4)-H(4A)	109.2
N(1)-C(4)-H(4B)	109.2
C(3)-C(4)-H(4B)	109.2
H(4A)-C(4)-H(4B)	107.9
Cu-O(1W)-H(1W)	123(6)
Cu-O(1W)-H(2W)	109(6)
H(1W)-O(1W)-H(2W)	102(8)
C(52)-O(54)-H(54)	109.5
O(54)-C(52)-C(53)	106.1(3)
O(54)-C(52)-P(51)	106.1(2)
C(53)-C(52)-P(51)	112.0(2)
O(54)-C(52)-P(52)	106.2(2)
C(53)-C(52)-P(52)	111.8(2)
P(51)-C(52)-P(52)	114.06(18)
C(54)-C(53)-C(52)	114.6(3)
C(54)-C(53)-H(53A)	108.6
C(52)-C(53)-H(53A)	108.6
C(54)-C(53)-H(53B)	108.6
C(52)-C(53)-H(53B)	108.6
H(53A)-C(53)-H(53B)	107.6

C(55)-N(52)-H(52A)	120.0
C(55)-N(52)-H(52B)	120.0
H(52A)-N(52)-H(52B)	120.0
N(52)-C(55)-C(54)	111.4(3)
N(52)-C(55)-H(55A)	109.4
C(54)-C(55)-H(55A)	109.4
N(52)-C(55)-H(55B)	109.4
C(54)-C(55)-H(55B)	109.4
H(55A)-C(55)-H(55B)	108.0
C(55)-C(54)-C(53)	115.9(3)
C(55)-C(54)-H(54A)	108.3
C(53)-C(54)-H(54A)	108.3
C(55)-C(54)-H(54B)	108.3
C(53)-C(54)-H(54B)	108.3
H(54A)-C(54)-H(54B)	107.4

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y+2,-z

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for CuAl<sub>5</sub>. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
Cu	6(1)	11(1)	9(1)	1(1)	2(1)	0(1)
P(2)	6(1)	11(1)	9(1)	1(1)	2(1)	-1(1)
P(52)	6(1)	12(1)	8(1)	1(1)	2(1)	0(1)
P(1)	8(1)	12(1)	10(1)	2(1)	4(1)	2(1)
P(51)	9(1)	12(1)	10(1)	0(1)	4(1)	-1(1)
O(6)	9(1)	18(1)	11(1)	-1(1)	5(1)	0(1)
O(2)	10(1)	18(1)	15(1)	3(1)	7(1)	3(1)
O(55)	7(1)	17(1)	11(1)	3(1)	3(1)	2(1)
O(3)	9(1)	12(1)	15(1)	0(1)	3(1)	2(1)
O(56)	10(1)	15(1)	12(1)	1(1)	5(1)	-2(1)
O(4)	5(1)	18(1)	12(1)	0(1)	4(1)	0(1)
O(5)	8(1)	14(1)	12(1)	-1(1)	1(1)	0(1)
O(57)	10(1)	18(1)	11(1)	2(1)	3(1)	-2(1)
O(52)	9(1)	16(1)	14(1)	0(1)	2(1)	0(1)
O(7)	9(1)	13(1)	14(1)	3(1)	-2(1)	-3(1)
O(53)	10(1)	15(1)	11(1)	0(1)	4(1)	-2(1)
O(1)	15(1)	14(1)	13(1)	4(1)	6(1)	4(1)
C(1)	7(1)	13(2)	8(2)	1(1)	2(1)	1(1)
O(51)	22(1)	12(1)	22(1)	-3(1)	15(1)	-3(1)
C(2)	9(2)	18(2)	11(2)	2(1)	2(1)	2(1)
N(1)	9(1)	21(2)	11(1)	-2(1)	0(1)	-3(1)
C(3)	9(2)	18(2)	13(2)	-1(1)	0(1)	-1(1)
C(4)	12(2)	21(2)	9(2)	0(1)	3(1)	1(1)
O(1W)	12(1)	63(3)	18(2)	3(2)	6(1)	2(2)
O(54)	7(1)	18(1)	15(1)	5(1)	4(1)	3(1)
C(52)	9(2)	13(2)	9(2)	1(1)	1(1)	1(1)
C(53)	10(2)	16(2)	17(2)	2(1)	5(1)	-1(1)
N(52)	17(2)	36(2)	26(2)	2(2)	11(2)	4(2)
C(55)	12(2)	30(2)	20(2)	7(2)	5(2)	-2(2)
C(54)	10(2)	23(2)	16(2)	1(1)	5(1)	-2(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for CuAl<sub>5</sub>.

	x	y	z	U(eq)
H(2)	5202	9099	777	20
H(4)	2776	10054	2252	18
H(5)	4397	12211	2148	18
H(57)	632	8622	3171	20
H(52)	-966	8946	-898	20
H(2A)	5608	9601	3773	16
H(2B)	6050	10298	2986	16
H(1A)	6276	12401	5738	18
H(1B)	7507	12096	6370	18
H(3A)	5344	11732	3669	17
H(3B)	4953	11019	4491	17
H(4A)	6871	10513	5443	17
H(4B)	7264	11215	4617	17
H(1W)	2360(60)	9050(50)	-2240(60)	46
H(2W)	3160(60)	9140(50)	-1560(60)	46
H(54)	2046	7873	1417	20
H(53A)	-63	6448	1384	17
H(53B)	-238	7286	2214	17
H(52A)	-1812	8575	2030	30
H(52B)	-2737	8193	2445	30
H(55A)	-3214	7131	762	25
H(55B)	-2269	6588	1818	25
H(54A)	-1743	7816	208	20
H(54B)	-1796	6627	128	20

Table 6. Torsion angles [°] for CuAle.

---

O(56)-P(52)-O(55)-Cu#1	14.9(3)
O(57)-P(52)-O(55)-Cu#1	136.7(3)
C(52)-P(52)-O(55)-Cu#1	-107.9(3)
O(1)-P(1)-O(3)-Cu	140.49(19)
O(2)-P(1)-O(3)-Cu	-97.2(2)
C(1)-P(1)-O(3)-Cu	21.4(3)
O(7)-Cu-O(3)-P(1)	10.3(2)
O(53)-Cu-O(3)-P(1)	-171.4(2)
O(1W)-Cu-O(3)-P(1)	99.2(2)
O(56)-Cu-O(3)-P(1)	-81.2(2)
O(55)-P(52)-O(56)-Cu	-105.3(2)
O(57)-P(52)-O(56)-Cu	130.53(18)
C(52)-P(52)-O(56)-Cu	19.9(2)
O(7)-Cu-O(56)-P(52)	-173.9(2)
O(53)-Cu-O(56)-P(52)	1.0(2)
O(55)#1-Cu-O(56)-P(52)	99.7(2)
O(3)-Cu-O(56)-P(52)	-82.5(2)
O(6)-P(2)-O(7)-Cu	103.6(3)
O(5)-P(2)-O(7)-Cu	-132.8(2)
C(1)-P(2)-O(7)-Cu	-18.5(3)
O(55)#1-Cu-O(7)-P(2)	165.1(3)
O(3)-Cu-O(7)-P(2)	-12.2(3)
O(1W)-Cu-O(7)-P(2)	-106.1(3)
O(56)-Cu-O(7)-P(2)	75.6(3)
O(51)-P(51)-O(53)-Cu	-167.8(2)
O(52)-P(51)-O(53)-Cu	72.1(3)
C(52)-P(51)-O(53)-Cu	-46.7(3)
O(55)#1-Cu-O(53)-P(51)	-75.1(2)
O(3)-Cu-O(53)-P(51)	102.2(2)
O(1W)-Cu-O(53)-P(51)	-163.8(2)
O(56)-Cu-O(53)-P(51)	14.5(2)
O(1)-P(1)-C(1)-O(4)	-58.6(2)
O(3)-P(1)-C(1)-O(4)	64.1(2)
O(2)-P(1)-C(1)-O(4)	-175.41(19)
O(1)-P(1)-C(1)-C(2)	56.4(3)
O(3)-P(1)-C(1)-C(2)	179.1(2)



O(2)-P(1)-C(1)-C(2)	-60.4(3)
O(1)-P(1)-C(1)-P(2)	-177.92(16)
O(3)-P(1)-C(1)-P(2)	-55.2(2)
O(2)-P(1)-C(1)-P(2)	65.2(2)
O(7)-P(2)-C(1)-O(4)	-63.6(3)
O(6)-P(2)-C(1)-O(4)	171.2(2)
O(5)-P(2)-C(1)-O(4)	51.1(3)
O(7)-P(2)-C(1)-C(2)	174.9(2)
O(6)-P(2)-C(1)-C(2)	49.7(3)
O(5)-P(2)-C(1)-C(2)	-70.5(3)
O(7)-P(2)-C(1)-P(1)	53.4(2)
O(6)-P(2)-C(1)-P(1)	-71.8(2)
O(5)-P(2)-C(1)-P(1)	168.09(15)
O(4)-C(1)-C(2)-C(3)	-49.2(4)
P(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-163.4(3)
P(2)-C(1)-C(2)-C(3)	73.8(3)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-177.6(3)
C(2)-C(3)-C(4)-N(1)	179.4(3)
O(53)-P(51)-C(52)-O(54)	-49.5(3)
O(51)-P(51)-C(52)-O(54)	75.2(2)
O(52)-P(51)-C(52)-O(54)	-170.6(2)
O(53)-P(51)-C(52)-C(53)	-164.9(2)
O(51)-P(51)-C(52)-C(53)	-40.2(3)
O(52)-P(51)-C(52)-C(53)	74.1(3)
O(53)-P(51)-C(52)-P(52)	67.0(2)
O(51)-P(51)-C(52)-P(52)	-168.33(17)
O(52)-P(51)-C(52)-P(52)	-54.1(2)
O(55)-P(52)-C(52)-O(54)	-168.03(19)
O(56)-P(52)-C(52)-O(54)	63.4(2)
O(57)-P(52)-C(52)-O(54)	-48.6(2)
O(55)-P(52)-C(52)-C(53)	-52.8(3)
O(56)-P(52)-C(52)-C(53)	178.6(2)
O(57)-P(52)-C(52)-C(53)	66.6(3)
O(55)-P(52)-C(52)-P(51)	75.5(2)
O(56)-P(52)-C(52)-P(51)	-53.1(2)
O(57)-P(52)-C(52)-P(51)	-165.10(17)
O(54)-C(52)-C(53)-C(54)	-163.5(3)
P(51)-C(52)-C(53)-C(54)	-48.1(4)

P(52)-C(52)-C(53)-C(54)	81.3(3)
N(52)-C(55)-C(54)-C(53)	66.5(4)
C(52)-C(53)-C(54)-C(55)	-136.9(3)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x, -y+2, -z$

Table 7. Hydrogen bonds for CuAle [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
N(52)-H(52B)...O(5)#2	0.88	2.60	3.287(4)	135.8
N(52)-H(52B)...O(2)#3	0.88	2.47	2.935(4)	113.8
N(52)-H(52A)...O(55)	0.88	2.23	3.057(5)	156.1
O(54)-H(54)...O(3)	0.84	2.10	2.934(3)	171.0
O(1W)-H(2W)...O(6)#4	0.69(7)	2.13(7)	2.796(4)	163(8)
O(1W)-H(1W)...O(54)#5	0.69(7)	2.52(7)	3.173(5)	160(7)
O(1W)-H(1W)...O(2W)#4	0.69(7)	2.51(7)	2.896(7)	118(7)
N(1)-H(1B)...O(54)#6	0.88	2.45	3.202(4)	143.8
N(1)-H(1B)...O(57)#6	0.88	2.32	2.942(4)	127.5
N(1)-H(1A)...O(6)#7	0.88	2.59	3.444(4)	163.7
O(52)-H(52)...O(56)#1	0.84	1.77	2.536(4)	149.9
O(57)-H(57)...O(51)#8	0.84	1.76	2.538(4)	152.1
O(5)-H(5)...O(1)#9	0.84	1.84	2.508(4)	134.9
O(4)-H(4)...O(56)	0.84	1.98	2.811(3)	170.5
O(2)-H(2)...O(6)#4	0.84	1.87	2.539(4)	135.2

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x, -y+2, -z$  #2  $-x, y-1/2, -z+1/2$  #3  $x-1, y, z$

#4  $-x+1, -y+2, -z$  #5  $x, -y+3/2, z-1/2$  #6  $-x+1, -y+2, -z+1$

#7  $x, -y+5/2, z+1/2$  #8  $x, -y+3/2, z+1/2$  #9  $-x+1, y+1/2, -z+1/2$

Tabla 4: Datos cristalográficos para CoPam

Empirical formula	C <sub>6</sub> H <sub>24</sub> Co N <sub>2</sub> O <sub>16</sub> P <sub>4</sub>	
Formula weight	563.08	
Temperature	296(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub> /n	
Unit cell dimensions	a = 7.350(6) Å	α = 90°.
	b = 10.851(9) Å	β = 94.407(11)°.
	c = 10.908(9) Å	γ = 90°.
Volume	867.3(13) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	2.156 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.451 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	578	
Crystal size	0.21 x 0.07 x 0.04 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.65 to 22.21°.	
Index ranges	-7 ≤ h ≤ 7, -11 ≤ k ≤ 11, - 11 ≤ l ≤ 11	
Reflections collected	6487	
Independent reflections	1097 [R(int) = 0.0669]	
Completeness to theta = 22.21°	100.0 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9442 and 0.7503	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	1097 / 0 / 161	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.135	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0364, wR2 = 0.0907	
R indices (all data)	R1 = 0.0519, wR2 = 0.0999	
Extinction coefficient	0.0000(18)	
Largest diff. peak and hole	0.479 and -0.421 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for CoPam.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Co(1)	0	5000	5000	14(1)
P(1)	1557(2)	5814(1)	7827(1)	11(1)
P(2)	3173(2)	7019(1)	5585(1)	10(1)
C(1)	3624(7)	6358(5)	7130(5)	12(1)
C(3)	6207(8)	5043(5)	8194(5)	15(1)
C(2)	4941(8)	5245(5)	7031(5)	15(1)
N(1)	7252(8)	3880(5)	8049(6)	19(1)
O(2)	345(5)	6980(4)	7986(4)	15(1)
O(1)	608(5)	4894(3)	6938(3)	15(1)
O(8)	4547(5)	7273(4)	7930(3)	16(1)
O(3)	2116(5)	5296(3)	9092(3)	13(1)
O(5)	1881(5)	8123(4)	5737(3)	15(1)
O(6)	5006(5)	7454(3)	5198(3)	14(1)
O(4)	2264(5)	6058(3)	4753(3)	13(1)
O(7)	1437(6)	3317(4)	4774(4)	17(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for CoPam.

---

Co(1)-O(4)	2.056(4)
Co(1)-O(4)#1	2.056(4)
Co(1)-O(1)	2.130(4)
Co(1)-O(1)#1	2.130(4)
Co(1)-O(7)	2.133(4)
Co(1)-O(7)#1	2.133(4)
P(1)-O(3)	1.517(4)
P(1)-O(1)	1.523(4)
P(1)-O(2)	1.565(4)
P(1)-C(1)	1.847(6)
P(1)-H(2)	1.92(7)
P(2)-O(4)	1.505(4)
P(2)-O(6)	1.518(4)
P(2)-O(5)	1.545(4)
P(2)-C(1)	1.838(6)
C(1)-O(8)	1.455(7)
C(1)-C(2)	1.556(8)
C(3)-N(1)	1.492(8)
C(3)-C(2)	1.531(8)
C(3)-H(32)	0.9700
C(3)-H(31)	0.9700
C(2)-H(21)	0.9700
C(2)-H(22)	0.9700
N(1)-H(12)	0.83(9)
N(1)-H(13)	0.93(8)
N(1)-H(11)	0.81(7)
O(2)-H(2)	0.69(6)
O(8)-H(8)	0.81(7)
O(5)-H(5)	0.84(8)
O(7)-H(71)	0.91(7)
O(7)-H(72)	0.81(8)
O(4)-Co(1)-O(4)#1	180.0
O(4)-Co(1)-O(1)	92.88(14)
O(4)#1-Co(1)-O(1)	87.12(14)
O(4)-Co(1)-O(1)#1	87.12(14)

O(4)#1-Co(1)-O(1)#1	92.88(14)
O(1)-Co(1)-O(1)#1	180.0
O(4)-Co(1)-O(7)	92.84(17)
O(4)#1-Co(1)-O(7)	87.15(17)
O(1)-Co(1)-O(7)	90.03(15)
O(1)#1-Co(1)-O(7)	89.97(15)
O(4)-Co(1)-O(7)#1	87.15(17)
O(4)#1-Co(1)-O(7)#1	92.85(17)
O(1)-Co(1)-O(7)#1	89.97(15)
O(1)#1-Co(1)-O(7)#1	90.03(15)
O(7)-Co(1)-O(7)#1	180.000(1)
O(3)-P(1)-O(1)	114.5(2)
O(3)-P(1)-O(2)	108.4(2)
O(1)-P(1)-O(2)	111.3(2)
O(3)-P(1)-C(1)	108.6(2)
O(1)-P(1)-C(1)	107.3(2)
O(2)-P(1)-C(1)	106.3(2)
O(3)-P(1)-H(2)	88.7(19)
O(1)-P(1)-H(2)	123.3(19)
O(2)-P(1)-H(2)	19.7(19)
C(1)-P(1)-H(2)	113(2)
O(4)-P(2)-O(6)	114.2(2)
O(4)-P(2)-O(5)	110.7(2)
O(6)-P(2)-O(5)	110.7(2)
O(4)-P(2)-C(1)	108.8(2)
O(6)-P(2)-C(1)	106.0(2)
O(5)-P(2)-C(1)	105.9(2)
O(8)-C(1)-C(2)	107.9(4)
O(8)-C(1)-P(2)	109.1(4)
C(2)-C(1)-P(2)	108.0(3)
O(8)-C(1)-P(1)	109.3(3)
C(2)-C(1)-P(1)	108.4(4)
P(2)-C(1)-P(1)	114.0(3)
N(1)-C(3)-C(2)	108.6(5)
N(1)-C(3)-H(32)	110.0
C(2)-C(3)-H(32)	110.0
N(1)-C(3)-H(31)	110.0
C(2)-C(3)-H(31)	110.0

H(32)-C(3)-H(31)	108.4
C(3)-C(2)-C(1)	113.3(4)
C(3)-C(2)-H(21)	108.9
C(1)-C(2)-H(21)	108.9
C(3)-C(2)-H(22)	108.9
C(1)-C(2)-H(22)	108.9
H(21)-C(2)-H(22)	107.7
C(3)-N(1)-H(12)	101(6)
C(3)-N(1)-H(13)	111(4)
H(12)-N(1)-H(13)	112(7)
C(3)-N(1)-H(11)	109(5)
H(12)-N(1)-H(11)	113(7)
H(13)-N(1)-H(11)	110(6)
P(1)-O(2)-H(2)	110(6)
P(1)-O(1)-Co(1)	130.4(2)
C(1)-O(8)-H(8)	109(5)
P(2)-O(5)-H(5)	123(5)
P(2)-O(4)-Co(1)	129.3(2)
Co(1)-O(7)-H(71)	122(4)
Co(1)-O(7)-H(72)	104(5)
H(71)-O(7)-H(72)	111(6)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y+1,-z+1



Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for CoPam. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Co(1)	18(1)	11(1)	12(1)	-1(1)	3(1)	-2(1)
P(1)	16(1)	10(1)	8(1)	0(1)	2(1)	-1(1)
P(2)	13(1)	8(1)	9(1)	1(1)	3(1)	-2(1)
C(1)	18(3)	12(3)	7(3)	-1(2)	-2(2)	0(2)
C(3)	19(3)	11(3)	17(3)	1(2)	3(3)	1(3)
C(2)	22(3)	11(3)	12(3)	3(2)	4(3)	1(2)
N(1)	15(3)	23(3)	18(3)	7(3)	1(3)	1(3)
O(2)	23(3)	16(2)	6(3)	1(2)	5(2)	3(2)
O(1)	21(2)	10(2)	14(2)	1(2)	2(2)	-5(2)
O(8)	20(2)	10(2)	16(2)	-1(2)	-2(2)	-1(2)
O(3)	20(2)	11(2)	8(2)	-1(2)	4(2)	-1(2)
O(5)	21(2)	6(2)	17(2)	1(2)	0(2)	1(2)
O(6)	14(2)	15(2)	14(2)	2(2)	1(2)	-1(2)
O(4)	18(2)	10(2)	13(2)	-2(2)	1(2)	-3(2)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for CoPam.

	x	y	z	U(eq)
H(32)	7042	5732	8317	19
H(31)	5496	4984	8905	19
H(21)	4225	4505	6864	18
H(22)	5676	5379	6342	18
H(12)	7770(110)	4030(80)	7420(80)	50(30)
H(13)	6480(90)	3210(70)	7950(60)	30(20)
H(11)	7950(90)	3780(60)	8650(70)	30(20)
H(71)	2670(100)	3290(60)	4850(60)	40(20)
H(72)	1010(100)	2850(70)	5250(70)	60(20)
H(8)	4060(90)	7930(70)	7800(60)	40(20)
H(2)	300(90)	7110(60)	8600(60)	20(20)
H(5)	2250(100)	8850(70)	5770(60)	40(20)

Table 6. Torsion angles [°] for CoPam.

---

O(4)-P(2)-C(1)-O(8)	178.5(3)
O(6)-P(2)-C(1)-O(8)	55.2(4)
O(5)-P(2)-C(1)-O(8)	-62.4(4)
O(4)-P(2)-C(1)-C(2)	61.5(4)
O(6)-P(2)-C(1)-C(2)	-61.7(4)
O(5)-P(2)-C(1)-C(2)	-179.4(4)
O(4)-P(2)-C(1)-P(1)	-59.0(3)
O(6)-P(2)-C(1)-P(1)	177.7(3)
O(5)-P(2)-C(1)-P(1)	60.0(3)
O(3)-P(1)-C(1)-O(8)	-57.5(4)
O(1)-P(1)-C(1)-O(8)	178.1(3)
O(2)-P(1)-C(1)-O(8)	58.9(4)
O(3)-P(1)-C(1)-C(2)	59.8(4)
O(1)-P(1)-C(1)-C(2)	-64.5(4)
O(2)-P(1)-C(1)-C(2)	176.3(4)
O(3)-P(1)-C(1)-P(2)	-179.9(3)
O(1)-P(1)-C(1)-P(2)	55.8(3)
O(2)-P(1)-C(1)-P(2)	-63.5(3)
N(1)-C(3)-C(2)-C(1)	173.7(5)
O(8)-C(1)-C(2)-C(3)	31.3(6)
P(2)-C(1)-C(2)-C(3)	149.0(4)
P(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-87.0(5)
O(3)-P(1)-O(1)-Co(1)	-167.0(2)
O(2)-P(1)-O(1)-Co(1)	69.6(3)
C(1)-P(1)-O(1)-Co(1)	-46.3(4)
O(4)-Co(1)-O(1)-P(1)	31.3(3)
O(4)#1-Co(1)-O(1)-P(1)	-148.7(3)
O(1)#1-Co(1)-O(1)-P(1)	35(8)
O(7)-Co(1)-O(1)-P(1)	124.1(3)
O(7)#1-Co(1)-O(1)-P(1)	-55.9(3)
O(6)-P(2)-O(4)-Co(1)	170.1(2)
O(5)-P(2)-O(4)-Co(1)	-64.1(3)
C(1)-P(2)-O(4)-Co(1)	51.9(3)
O(4)#1-Co(1)-O(4)-P(2)	-149(15)
O(1)-Co(1)-O(4)-P(2)	-33.7(3)
O(1)#1-Co(1)-O(4)-P(2)	146.3(3)

O(7)-Co(1)-O(4)-P(2)	-123.9(3)
O(7)#1-Co(1)-O(4)-P(2)	56.1(3)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y+1,-z+1

Table 7. Hydrogen bonds for CoPam [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(\text{DHA})$
N(1)-H(12)...O(1)#2	0.83(9)	2.38(8)	3.037(7)	137(7)
N(1)-H(12)...O(4)#3	0.83(9)	2.37(9)	3.105(8)	148(7)
N(1)-H(13)...O(2)#4	0.93(8)	2.10(7)	2.973(8)	157(6)
N(1)-H(13)...O(7)#5	0.93(8)	2.59(7)	3.123(8)	117(5)
N(1)-H(11)...O(6)#6	0.81(7)	2.37(7)	3.085(7)	148(6)
N(1)-H(11)...O(3)#7	0.81(7)	2.66(7)	3.243(8)	130(6)
O(7)-H(71)...O(6)#3	0.91(7)	1.89(7)	2.743(6)	156(6)
O(7)-H(72)...O(8)#4	0.81(8)	2.15(8)	2.891(6)	153(7)
O(7)-H(72)...O(5)#1	0.81(8)	2.53(8)	2.914(6)	110(6)
O(8)-H(8)...O(1)#8	0.81(7)	2.16(8)	2.850(6)	144(7)
O(8)-H(8)...O(5)	0.81(7)	2.67(7)	3.113(6)	116(6)
O(2)-H(2)...O(6)#9	0.69(6)	1.83(6)	2.520(6)	175(8)
O(5)-H(5)...O(3)#8	0.84(8)	1.64(8)	2.473(6)	176(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x, -y+1, -z+1$  #2  $x+1, y, z$  #3  $-x+1, -y+1, -z+1$

#4  $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$  #5  $x+1/2, -y+1/2, z+1/2$

#6  $-x+3/2, y-1/2, -z+3/2$  #7  $-x+1, -y+1, -z+2$  #8  $-x+1/2, y+1/2, -z+3/2$

#9  $x-1/2, -y+3/2, z+1/2$

Tabla 5: Datos cristalográficos para NiPam

Empirical formula	C <sub>6</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Ni O <sub>16</sub> P <sub>4</sub>	
Formula weight	564.88	
Temperature	296(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	?	
Space group	?	
Unit cell dimensions	a = 7.338(2) Å b = 10.831(4) Å c = 10.907(4) Å	α = 90°. β = 94.356(4)°. γ = 90°.
Volume	864.4(5) Å <sup>3</sup>	
Z	2	
Density (calculated)	2.170 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.586 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	584	
Crystal size	0.15 x 0.14 x 0.05 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.65 to 28.28°.	
Index ranges	-9 ≤ h ≤ 9, -14 ≤ k ≤ 14, - 14 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected	11028	
Independent reflections	2150 [R(int) = 0.0446]	
Completeness to theta = 28.28°	99.9 %	
Max. and min. transmission	0.9249 and 0.7969	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	2150 / 0 / 181	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.974	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0398, wR2 = 0.1169	
R indices (all data)	R1 = 0.0531, wR2 = 0.1278	
Largest diff. peak and hole	0.634 and -1.123 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for NiPam.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ni(1)	0	10000	0	12(1)
P(1)	3178(1)	8005(1)	584(1)	9(1)
P(2)	1534(1)	9197(1)	2816(1)	10(1)
O(9)	328(3)	8024(2)	2984(2)	14(1)
O(3)	1415(3)	11642(2)	-219(2)	15(1)
O(2)	589(3)	10111(2)	1921(2)	14(1)
O(1)	2254(3)	8974(2)	-250(2)	12(1)
O(5)	2075(3)	9723(2)	4086(2)	14(1)
C(1)	3625(4)	8659(3)	2138(3)	11(1)
O(6)	4525(3)	7727(2)	2932(2)	15(1)
C(3)	6191(5)	9963(3)	3219(3)	16(1)
C(2)	4939(5)	9765(3)	2049(3)	14(1)
O(7)	5028(3)	7583(2)	189(2)	13(1)
O(8)	1890(3)	6883(2)	730(2)	14(1)
N(1)	7260(5)	11128(3)	3065(3)	18(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for NiPam.

---

Ni(1)-O(1)	2.029(2)
Ni(1)-O(1)#1	2.029(2)
Ni(1)-O(3)	2.083(2)
Ni(1)-O(3)#1	2.083(2)
Ni(1)-O(2)#1	2.110(2)
Ni(1)-O(2)	2.110(2)
P(1)-O(1)	1.515(2)
P(1)-O(7)	1.526(2)
P(1)-O(8)	1.555(2)
P(1)-C(1)	1.843(3)
P(2)-O(2)	1.520(2)
P(2)-O(5)	1.523(2)
P(2)-O(9)	1.566(2)
P(2)-C(1)	1.847(3)
C(1)-O(6)	1.456(4)
C(1)-C(2)	1.545(4)
C(3)-N(1)	1.502(4)
C(3)-C(2)	1.531(5)
O(1)-Ni(1)-O(1)#1	180.00(12)
O(1)-Ni(1)-O(3)	91.94(9)
O(1)#1-Ni(1)-O(3)	88.06(9)
O(1)-Ni(1)-O(3)#1	88.06(9)
O(1)#1-Ni(1)-O(3)#1	91.94(9)
O(3)-Ni(1)-O(3)#1	180.0
O(1)-Ni(1)-O(2)#1	86.73(9)
O(1)#1-Ni(1)-O(2)#1	93.27(9)
O(3)-Ni(1)-O(2)#1	90.07(9)
O(3)#1-Ni(1)-O(2)#1	89.93(9)
O(1)-Ni(1)-O(2)	93.27(9)
O(1)#1-Ni(1)-O(2)	86.73(9)
O(3)-Ni(1)-O(2)	89.93(9)
O(3)#1-Ni(1)-O(2)	90.07(9)
O(2)#1-Ni(1)-O(2)	179.999(1)
O(1)-P(1)-O(7)	113.87(13)
O(1)-P(1)-O(8)	110.79(13)



O(7)-P(1)-O(8)	110.82(13)
O(1)-P(1)-C(1)	109.06(14)
O(7)-P(1)-C(1)	105.95(13)
O(8)-P(1)-C(1)	105.91(13)
O(2)-P(2)-O(5)	114.54(13)
O(2)-P(2)-O(9)	111.67(13)
O(5)-P(2)-O(9)	107.93(13)
O(2)-P(2)-C(1)	107.44(14)
O(5)-P(2)-C(1)	108.37(13)
O(9)-P(2)-C(1)	106.55(13)
P(2)-O(2)-Ni(1)	130.53(13)
P(1)-O(1)-Ni(1)	129.11(13)
O(6)-C(1)-C(2)	108.5(2)
O(6)-C(1)-P(1)	108.8(2)
C(2)-C(1)-P(1)	108.0(2)
O(6)-C(1)-P(2)	109.5(2)
C(2)-C(1)-P(2)	108.8(2)
P(1)-C(1)-P(2)	113.21(16)
N(1)-C(3)-C(2)	108.1(3)
C(3)-C(2)-C(1)	113.2(3)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,-y+2,-z

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for NiPam. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Ni(1)	15(1)	10(1)	11(1)	1(1)	2(1)	1(1)
P(1)	10(1)	7(1)	8(1)	-1(1)	1(1)	1(1)
P(2)	13(1)	8(1)	8(1)	-1(1)	2(1)	1(1)
O(9)	18(1)	13(1)	12(1)	-2(1)	2(1)	-4(1)
O(3)	16(1)	12(1)	19(1)	0(1)	4(1)	1(1)
O(2)	19(1)	12(1)	10(1)	3(1)	3(1)	6(1)
O(1)	16(1)	11(1)	11(1)	2(1)	2(1)	3(1)
O(5)	18(1)	12(1)	11(1)	-2(1)	2(1)	-2(1)
C(1)	12(1)	11(1)	10(1)	-1(1)	2(1)	1(1)
O(6)	19(1)	10(1)	15(1)	2(1)	-2(1)	2(1)
C(3)	15(2)	14(2)	18(2)	-2(1)	0(1)	-1(1)
C(2)	17(2)	12(1)	11(1)	2(1)	0(1)	-4(1)
O(7)	12(1)	15(1)	12(1)	-4(1)	4(1)	2(1)
O(8)	16(1)	10(1)	17(1)	-2(1)	2(1)	-1(1)
N(1)	16(1)	17(1)	22(2)	-7(1)	2(1)	-1(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for NiPam.

	x	y	z	U(eq)
H(3)	990(70)	12160(50)	100(50)	32(14)
H(5)	4210(50)	10370(30)	1760(30)	-2(7)
H(7)	5460(50)	10100(30)	3900(30)	-2(7)
H(6)	5590(60)	9770(40)	1330(40)	23(11)
H(8)	7040(60)	9370(40)	3340(30)	15(10)
H(11)	6520(60)	11780(50)	2990(40)	22(10)
H(10)	7890(70)	11060(60)	3510(50)	41(17)
H(9)	7850(60)	10990(40)	2360(50)	28(12)
H(12)	2700(60)	11760(40)	-80(40)	24(11)
H(13)	4180(80)	6980(60)	2820(50)	54(17)
H(14)	200(100)	7880(60)	3890(60)	70(20)
H(15)	2470(80)	5770(60)	900(60)	67(19)

# **Anexo II**

**Material suplementario de Capítulo 5**

### 5.2.2.1.2 ESTUDIO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

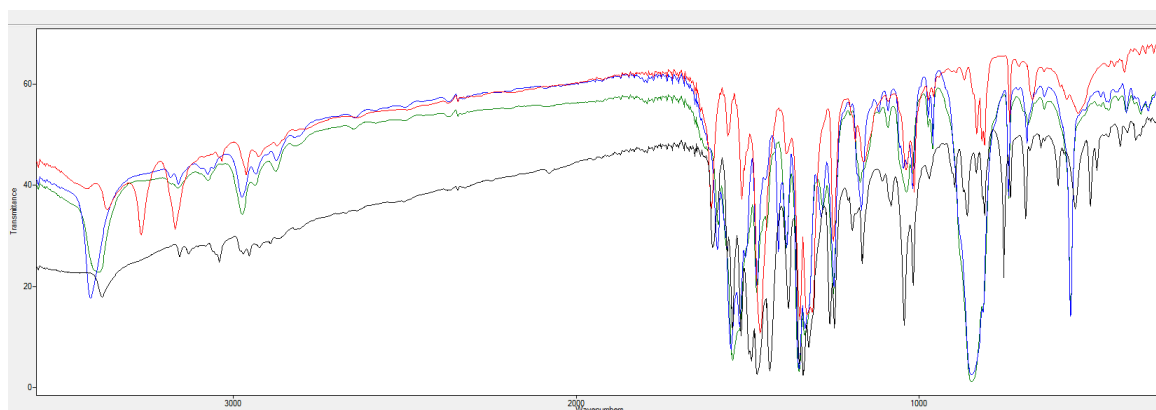


Figura 1: Espectros infrarrojo de RuL1 (azul), RuL2 (rojo), RuL3 (verde), RuL4 (negro).

### 5.2.2.1.3 RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALINAS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN MONOCRISTAL

Tabla 1: Datos cristalográficos para RuL1

Empirical formula	C <sub>64</sub> H <sub>74</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>16</sub> O <sub>28</sub> Ru <sub>4</sub>	
	S <sub>4</sub>	
Formula weight	2189.75	
Temperature	125(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 <sub>1</sub> /c	
Unit cell dimensions	a = 19.809(7) Å	α = 90°.
	b = 25.120(8) Å	β = 108.286(4)°.
	c = 19.115(6) Å	γ = 90°.
Volume	9031(5) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.610 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.948 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	4408	
Crystal size	0.17 x 0.17 x 0.13 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.35 to 24.41°.	
Index ranges	-23 ≤ h ≤ 23, -29 ≤ k ≤ 29, -22 ≤ l ≤ 22	
Reflections collected	85246	
Independent reflections	14865 [R(int) = 0.0883]	

Completeness to theta = 24.41°	100.0 %
Absorption correction	Empirical
Max. and min. transmission	0.8635 and 0.8268
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	14865 / 0 / 1152
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.002
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0458, wR2 = 0.0991
R indices (all data)	R1 = 0.0843, wR2 = 0.1177
Largest diff. peak and hole	0.990 and -0.852 e.Å <sup>-3</sup>

---

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL1.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ru(1)	10923(1)	1742(1)	6967(1)	20(1)
Ru(2)	9277(1)	1951(1)	7282(1)	26(1)
Ru(3)	5876(1)	2869(1)	7732(1)	23(1)
Ru(4)	4169(1)	3068(1)	7945(1)	20(1)
S(1)	9754(1)	1960(1)	6263(1)	24(1)
S(2)	10381(1)	1571(1)	7921(1)	27(1)
S(3)	4756(1)	3182(1)	7020(1)	24(1)
S(4)	5336(1)	2899(1)	8703(1)	23(1)
O(1)	12139(2)	-1133(2)	7289(3)	43(1)
O(2)	11438(2)	-1643(2)	6451(3)	39(1)
O(3)	11336(2)	-309(2)	6811(2)	24(1)
O(10)	6304(2)	213(2)	4949(2)	33(1)
O(11)	6534(2)	-638(2)	5078(2)	36(1)
O(12)	7508(2)	463(2)	5901(2)	22(1)
O(20)	8279(2)	5708(2)	9596(2)	36(1)
O(21)	8625(2)	4889(2)	9890(2)	30(1)
O(22)	7464(2)	4506(1)	8973(2)	22(1)
O(30)	3400(2)	6419(2)	8552(3)	39(1)
O(31)	2789(3)	5952(2)	7607(3)	45(1)
O(32)	3614(2)	5127(2)	8052(2)	26(1)
N(1)	11591(3)	-1216(2)	6774(3)	29(1)
N(2)	10587(2)	1000(2)	6513(3)	21(1)
N(3)	9956(2)	916(2)	5953(3)	23(1)
N(4)	8917(2)	1301(2)	5267(3)	27(1)
N(10)	6688(2)	-170(2)	5230(3)	26(1)
N(11)	9024(2)	1152(2)	7068(3)	24(1)
N(12)	9465(3)	740(2)	7426(3)	26(1)
N(13)	10567(3)	532(2)	8194(3)	35(1)
N(20)	8191(3)	5219(2)	9542(3)	25(1)
N(21)	6060(2)	3684(2)	7851(3)	22(1)
N(22)	5607(2)	4061(2)	7414(3)	24(1)
N(23)	4495(3)	4187(2)	6574(3)	32(1)
N(30)	3299(3)	6016(2)	8170(3)	32(1)

N(31)	4451(2)	3840(2)	8340(3)	23(1)
N(32)	5059(2)	3946(2)	8917(3)	23(1)
N(33)	6093(2)	3602(2)	9678(3)	30(1)
C(1)	11094(3)	-787(2)	6533(3)	24(1)
C(2)	10422(3)	-774(3)	6072(4)	30(2)
C(3)	10217(3)	-239(3)	6047(4)	29(2)
C(4)	10782(3)	36(2)	6503(3)	23(1)
C(5)	10957(3)	572(2)	6741(3)	24(1)
C(6)	9539(3)	1331(2)	5802(3)	23(1)
C(7)	11564(3)	2391(3)	7619(4)	27(1)
C(8)	11296(3)	2554(2)	6888(4)	27(2)
C(9)	11399(3)	2245(2)	6306(3)	27(1)
C(10)	11809(3)	1771(2)	6508(3)	26(1)
C(11)	12092(3)	1620(2)	7252(3)	25(1)
C(12)	11976(3)	1917(2)	7821(3)	26(1)
C(13)	12240(3)	1739(3)	8607(3)	33(2)
C(14)	11071(3)	2419(3)	5509(3)	32(2)
C(15)	11529(4)	2846(3)	5323(4)	52(2)
C(16)	10950(4)	1955(3)	4968(4)	45(2)
C(20)	7364(3)	-59(2)	5758(3)	23(1)
C(21)	7900(3)	-384(2)	6150(3)	29(2)
C(22)	8426(4)	-35(3)	6564(4)	31(2)
C(23)	8183(3)	473(2)	6407(3)	24(1)
C(24)	8425(3)	1009(2)	6604(3)	25(1)
C(25)	10097(3)	892(3)	7829(3)	27(1)
C(26)	8938(3)	2150(3)	8240(4)	37(2)
C(27)	9433(3)	2544(3)	8138(4)	46(2)
C(28)	9321(4)	2823(3)	7487(5)	48(2)
C(29)	8709(4)	2740(3)	6896(4)	43(2)
C(30)	8219(3)	2352(3)	6960(4)	29(2)
C(31)	8329(3)	2061(2)	7613(3)	27(1)
C(32)	9102(4)	1853(3)	8950(4)	58(2)
C(33)	8599(5)	3045(3)	6198(5)	68(3)
C(34)	8666(5)	1378(4)	8905(5)	81(3)
C(35)	9056(5)	2236(4)	9558(4)	73(3)
C(40)	7538(3)	5036(2)	9044(3)	23(1)
C(41)	6962(3)	5304(3)	8625(3)	28(2)
C(42)	6476(3)	4911(2)	8255(3)	25(1)



C(43)	6789(3)	4431(2)	8465(3)	23(1)
C(44)	6621(3)	3879(2)	8333(3)	23(1)
C(45)	4988(3)	3868(2)	7014(3)	26(1)
C(46)	6472(3)	2126(2)	8270(4)	34(2)
C(47)	6959(3)	2512(2)	8186(4)	28(1)
C(48)	6874(3)	2741(3)	7496(4)	28(2)
C(49)	6321(3)	2601(2)	6853(3)	30(2)
C(50)	5826(3)	2219(3)	6951(4)	35(2)
C(51)	5895(3)	1991(2)	7631(4)	36(2)
C(52)	6544(4)	1875(3)	8998(4)	49(2)
C(53)	6275(4)	2827(3)	6104(4)	42(2)
C(54)	6548(6)	3391(3)	6140(5)	84(3)
C(55)	5564(4)	2762(5)	5548(5)	98(4)
C(60)	3808(3)	5598(2)	8394(4)	29(2)
C(61)	4450(3)	5589(3)	8897(4)	33(2)
C(62)	4707(3)	5063(3)	8894(4)	31(2)
C(63)	4181(3)	4785(2)	8375(3)	26(1)
C(64)	4053(3)	4251(2)	8100(3)	24(1)
C(65)	5499(3)	3546(2)	9120(3)	23(1)
C(66)	3455(3)	2472(2)	7200(3)	28(2)
C(67)	3790(3)	2237(2)	7883(3)	24(1)
C(68)	3754(3)	2479(2)	8548(3)	25(1)
C(69)	3376(3)	2960(2)	8536(3)	25(1)
C(70)	3031(3)	3184(3)	7826(3)	25(1)
C(71)	3071(3)	2955(2)	7179(3)	26(1)
C(72)	3521(3)	2237(3)	6504(3)	37(2)
C(73)	3361(3)	3252(3)	9222(3)	25(1)
C(74)	4001(3)	3138(3)	9898(3)	33(2)
C(75)	2667(3)	3136(3)	9392(4)	34(2)
CI(1)	2459(1)	6991(1)	9949(1)	35(1)
CI(2)	3113(1)	3621(1)	5451(1)	47(1)
CI(3)	4593(1)	3975(1)	2351(1)	62(1)
CI(4)	857(1)	3636(1)	7989(1)	50(1)
O(1W)	2657(3)	4279(2)	6622(3)	58(1)
O(2W)	4213(3)	3699(2)	4528(3)	79(2)
O(3W)	4390(3)	5345(2)	6396(4)	74(2)
O(4W)	2931(3)	5342(2)	6318(3)	73(2)
O(5W)	3514(3)	4191(2)	3191(4)	77(2)

O(6W)	385(3)	9367(2)	7985(3)	81(2)
O(7W)	4672(4)	5491(3)	5038(4)	97(2)
O(8W)	1710(4)	742(3)	9555(4)	132(4)
O(9W)	1874(5)	9692(3)	9947(4)	124(3)
O(10W)	10503(6)	1063(9)	216(9)	353(12)
O(11W)	1370(4)	3929(3)	6670(4)	116(3)
O(12W)	3703(6)	5293(3)	3603(5)	131(3)
O(13W)	1988(10)	9439(5)	8611(7)	258(9)
O(14W)	9532(8)	554(11)	466(10)	438(18)
O(15W)	2414(15)	218(15)	8256(16)	570(20)
O(16W)	10860(50)	90(40)	1110(50)	1350(90)

---

Table 3. Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for RuL1.

---

Ru(1)-N(2)	2.076(5)
Ru(1)-C(8)	2.191(6)
Ru(1)-C(10)	2.194(6)
Ru(1)-C(7)	2.197(6)
Ru(1)-C(9)	2.198(6)
Ru(1)-C(11)	2.227(6)
Ru(1)-C(12)	2.252(6)
Ru(1)-S(1)	2.3493(16)
Ru(1)-S(2)	2.4276(17)
Ru(2)-N(11)	2.077(5)
Ru(2)-C(27)	2.161(6)
Ru(2)-C(31)	2.179(6)
Ru(2)-C(26)	2.197(6)
Ru(2)-C(28)	2.224(7)
Ru(2)-C(30)	2.232(6)
Ru(2)-C(29)	2.285(7)
Ru(2)-S(2)	2.3471(17)
Ru(2)-S(1)	2.4185(17)
Ru(3)-N(21)	2.080(5)
Ru(3)-C(48)	2.186(6)
Ru(3)-C(50)	2.192(6)
Ru(3)-C(51)	2.214(6)
Ru(3)-C(49)	2.233(6)
Ru(3)-C(47)	2.234(6)
Ru(3)-C(46)	2.274(6)
Ru(3)-S(3)	2.3440(17)
Ru(3)-S(4)	2.4172(16)
Ru(4)-N(31)	2.092(5)
Ru(4)-C(68)	2.189(6)
Ru(4)-C(67)	2.210(6)
Ru(4)-C(70)	2.212(6)
Ru(4)-C(69)	2.221(6)
Ru(4)-C(71)	2.226(6)
Ru(4)-C(66)	2.238(6)
Ru(4)-S(4)	2.3489(16)
Ru(4)-S(3)	2.4196(16)

S(1)-C(6)	1.792(6)
S(2)-C(25)	1.788(6)
S(3)-C(45)	1.784(6)
S(4)-C(65)	1.795(6)
O(1)-N(1)	1.233(6)
O(2)-N(1)	1.226(6)
O(3)-C(1)	1.340(7)
O(3)-C(4)	1.378(6)
O(10)-N(10)	1.240(6)
O(11)-N(10)	1.225(6)
O(12)-C(20)	1.351(7)
O(12)-C(23)	1.383(6)
O(20)-N(20)	1.240(6)
O(21)-N(20)	1.228(6)
O(22)-C(40)	1.341(7)
O(22)-C(43)	1.396(7)
O(30)-N(30)	1.228(6)
O(31)-N(30)	1.233(7)
O(32)-C(60)	1.348(7)
O(32)-C(63)	1.395(7)
N(1)-C(1)	1.435(7)
N(2)-C(5)	1.295(7)
N(2)-N(3)	1.384(6)
N(3)-C(6)	1.306(7)
N(4)-C(6)	1.334(7)
N(4)-H(4A)	0.8600
N(4)-H(4B)	0.8600
N(10)-C(20)	1.428(7)
N(11)-C(24)	1.291(7)
N(11)-N(12)	1.388(7)
N(12)-C(25)	1.304(7)
N(13)-C(25)	1.328(8)
N(13)-H(13A)	0.8600
N(13)-H(13B)	0.8600
N(20)-C(40)	1.420(7)
N(21)-C(44)	1.297(7)
N(21)-N(22)	1.389(6)
N(22)-C(45)	1.319(7)

N(23)-C(45)	1.336(7)
N(30)-C(60)	1.427(8)
N(31)-C(64)	1.292(7)
N(31)-N(32)	1.380(6)
N(32)-C(65)	1.307(7)
N(33)-C(65)	1.324(7)
N(33)-H(33A)	0.8600
N(33)-H(33B)	0.8600
C(1)-C(2)	1.346(8)
C(2)-C(3)	1.402(9)
C(2)-H(2)	0.99(5)
C(3)-C(4)	1.369(8)
C(3)-H(3)	0.85(7)
C(4)-C(5)	1.429(8)
C(5)-H(5)	0.90(5)
C(7)-C(8)	1.393(9)
C(7)-C(12)	1.427(9)
C(7)-H(7)	0.87(5)
C(8)-C(9)	1.422(9)
C(8)-H(8)	0.87(6)
C(9)-C(10)	1.425(8)
C(9)-C(14)	1.520(9)
C(10)-C(11)	1.407(8)
C(10)-H(10)	0.9300
C(11)-C(12)	1.396(8)
C(11)-H(11)	0.9300
C(12)-C(13)	1.495(8)
C(13)-H(13C)	0.9600
C(13)-H(13D)	0.9600
C(13)-H(13E)	0.9600
C(14)-C(15)	1.517(9)
C(14)-C(16)	1.526(9)
C(14)-H(14)	0.99(6)
C(15)-H(15A)	0.9600
C(15)-H(15B)	0.9600
C(15)-H(15C)	0.9600
C(16)-H(16A)	0.9600
C(16)-H(16B)	0.9600

C(16)-H(16C)	0.9600
C(20)-C(21)	1.362(8)
C(21)-C(22)	1.402(9)
C(21)-H(21)	0.9300
C(22)-C(23)	1.365(8)
C(22)-H(22)	0.83(5)
C(23)-C(24)	1.438(8)
C(24)-H(24)	0.9300
C(26)-C(31)	1.426(9)
C(26)-C(27)	1.448(10)
C(26)-C(32)	1.493(10)
C(27)-C(28)	1.385(11)
C(27)-H(27)	0.9300
C(28)-C(29)	1.388(10)
C(28)-H(28)	0.9300
C(29)-C(30)	1.407(9)
C(29)-C(33)	1.496(10)
C(30)-C(31)	1.405(9)
C(30)-H(30)	1.07(6)
C(31)-H(31)	0.9300
C(32)-C(34)	1.459(11)
C(32)-C(35)	1.534(10)
C(32)-H(32)	0.9800
C(33)-H(33C)	0.9600
C(33)-H(33D)	0.9600
C(33)-H(33E)	0.9600
C(34)-H(34A)	0.9600
C(34)-H(34B)	0.9600
C(34)-H(34C)	0.9600
C(35)-H(35A)	0.9600
C(35)-H(35B)	0.9600
C(35)-H(35C)	0.9600
C(40)-C(41)	1.350(8)
C(41)-C(42)	1.404(8)
C(41)-H(41)	0.89(6)
C(42)-C(43)	1.358(8)
C(42)-H(42)	0.91(6)
C(43)-C(44)	1.431(8)

C(44)-H(44)	0.9300
C(46)-C(47)	1.410(8)
C(46)-C(51)	1.427(9)
C(46)-C(52)	1.494(9)
C(47)-C(48)	1.400(9)
C(47)-H(47)	0.9300
C(48)-C(49)	1.410(9)
C(48)-H(48)	0.82(5)
C(49)-C(50)	1.427(9)
C(49)-C(53)	1.516(9)
C(50)-C(51)	1.386(10)
C(50)-H(50)	0.95(6)
C(51)-H(51)	0.9300
C(52)-H(52A)	0.9600
C(52)-H(52B)	0.9600
C(52)-H(52C)	0.9600
C(53)-C(55)	1.483(10)
C(53)-C(54)	1.512(10)
C(53)-H(53)	0.9800
C(54)-H(54A)	0.9600
C(54)-H(54B)	0.9600
C(54)-H(54C)	0.9600
C(55)-H(55A)	0.9600
C(55)-H(55B)	0.9600
C(55)-H(55C)	0.9600
C(60)-C(61)	1.332(8)
C(61)-C(62)	1.416(9)
C(61)-H(61)	0.9300
C(62)-C(63)	1.382(8)
C(62)-H(62)	1.11(7)
C(63)-C(64)	1.434(8)
C(64)-H(64)	0.94(5)
C(66)-C(67)	1.396(9)
C(66)-C(71)	1.427(8)
C(66)-C(72)	1.499(8)
C(67)-C(68)	1.431(8)
C(67)-H(67)	0.9300
C(68)-C(69)	1.419(8)

C(68)-H(68)	0.9300
C(69)-C(70)	1.430(8)
C(69)-C(73)	1.511(8)
C(70)-C(71)	1.388(8)
C(70)-H(70)	0.87(5)
C(71)-H(71)	0.9300
C(72)-H(72A)	0.9600
C(72)-H(72B)	0.9600
C(72)-H(72C)	0.9600
C(73)-C(74)	1.527(8)
C(73)-C(75)	1.535(8)
C(73)-H(73)	0.94(5)
C(74)-H(74A)	0.9600
C(74)-H(74B)	0.9600
C(74)-H(74C)	0.9600
C(75)-H(75A)	0.9600
C(75)-H(75B)	0.9600
C(75)-H(75C)	0.9600
O(10W)-O(16W)	2.94(10)
O(14W)-O(16W)	2.79(9)
N(2)-Ru(1)-C(8)	151.4(2)
N(2)-Ru(1)-C(10)	93.1(2)
C(8)-Ru(1)-C(10)	67.2(2)
N(2)-Ru(1)-C(7)	162.9(2)
C(8)-Ru(1)-C(7)	37.0(2)
C(10)-Ru(1)-C(7)	79.1(2)
N(2)-Ru(1)-C(9)	114.6(2)
C(8)-Ru(1)-C(9)	37.8(2)
C(10)-Ru(1)-C(9)	37.9(2)
C(7)-Ru(1)-C(9)	67.9(2)
N(2)-Ru(1)-C(11)	98.72(19)
C(8)-Ru(1)-C(11)	78.3(2)
C(10)-Ru(1)-C(11)	37.1(2)
C(7)-Ru(1)-C(11)	65.9(2)
C(9)-Ru(1)-C(11)	67.6(2)
N(2)-Ru(1)-C(12)	125.5(2)
C(8)-Ru(1)-C(12)	67.2(2)



C(10)-Ru(1)-C(12)	67.0(2)
C(7)-Ru(1)-C(12)	37.4(2)
C(9)-Ru(1)-C(12)	80.7(2)
C(11)-Ru(1)-C(12)	36.3(2)
N(2)-Ru(1)-S(1)	80.82(13)
C(8)-Ru(1)-S(1)	92.08(17)
C(10)-Ru(1)-S(1)	122.08(16)
C(7)-Ru(1)-S(1)	116.25(17)
C(9)-Ru(1)-S(1)	93.44(16)
C(11)-Ru(1)-S(1)	159.17(16)
C(12)-Ru(1)-S(1)	153.14(16)
N(2)-Ru(1)-S(2)	89.73(13)
C(8)-Ru(1)-S(2)	117.06(17)
C(10)-Ru(1)-S(2)	154.63(16)
C(7)-Ru(1)-S(2)	91.02(17)
C(9)-Ru(1)-S(2)	154.73(16)
C(11)-Ru(1)-S(2)	117.57(16)
C(12)-Ru(1)-S(2)	90.98(15)
S(1)-Ru(1)-S(2)	83.26(6)
N(11)-Ru(2)-C(27)	141.5(3)
N(11)-Ru(2)-C(31)	90.2(2)
C(27)-Ru(2)-C(31)	68.0(2)
N(11)-Ru(2)-C(26)	105.4(2)
C(27)-Ru(2)-C(26)	38.8(3)
C(31)-Ru(2)-C(26)	38.0(2)
N(11)-Ru(2)-C(28)	168.7(2)
C(27)-Ru(2)-C(28)	36.8(3)
C(31)-Ru(2)-C(28)	79.3(2)
C(26)-Ru(2)-C(28)	68.5(3)
N(11)-Ru(2)-C(30)	103.6(2)
C(27)-Ru(2)-C(30)	78.3(2)
C(31)-Ru(2)-C(30)	37.1(2)
C(26)-Ru(2)-C(30)	67.7(2)
C(28)-Ru(2)-C(30)	65.4(2)
N(11)-Ru(2)-C(29)	135.3(2)
C(27)-Ru(2)-C(29)	65.5(3)
C(31)-Ru(2)-C(29)	66.5(2)
C(26)-Ru(2)-C(29)	79.8(3)

C(28)-Ru(2)-C(29)	35.8(3)
C(30)-Ru(2)-C(29)	36.3(2)
N(11)-Ru(2)-S(2)	80.64(14)
C(27)-Ru(2)-S(2)	89.9(2)
C(31)-Ru(2)-S(2)	130.37(17)
C(26)-Ru(2)-S(2)	97.93(18)
C(28)-Ru(2)-S(2)	109.3(2)
C(30)-Ru(2)-S(2)	165.62(17)
C(29)-Ru(2)-S(2)	143.61(19)
N(11)-Ru(2)-S(1)	88.94(13)
C(27)-Ru(2)-S(1)	127.2(2)
C(31)-Ru(2)-S(1)	145.42(17)
C(26)-Ru(2)-S(1)	165.6(2)
C(28)-Ru(2)-S(1)	97.4(2)
C(30)-Ru(2)-S(1)	110.11(17)
C(29)-Ru(2)-S(1)	90.54(18)
S(2)-Ru(2)-S(1)	83.50(6)
N(21)-Ru(3)-C(48)	91.6(2)
N(21)-Ru(3)-C(50)	140.9(2)
C(48)-Ru(3)-C(50)	66.5(2)
N(21)-Ru(3)-C(51)	169.3(2)
C(48)-Ru(3)-C(51)	78.1(2)
C(50)-Ru(3)-C(51)	36.7(3)
N(21)-Ru(3)-C(49)	106.3(2)
C(48)-Ru(3)-C(49)	37.2(2)
C(50)-Ru(3)-C(49)	37.6(2)
C(51)-Ru(3)-C(49)	67.2(2)
N(21)-Ru(3)-C(47)	103.8(2)
C(48)-Ru(3)-C(47)	36.9(2)
C(50)-Ru(3)-C(47)	78.4(2)
C(51)-Ru(3)-C(47)	66.0(2)
C(49)-Ru(3)-C(47)	67.3(2)
N(21)-Ru(3)-C(46)	135.2(2)
C(48)-Ru(3)-C(46)	66.2(2)
C(50)-Ru(3)-C(46)	66.6(3)
C(51)-Ru(3)-C(46)	37.1(2)
C(49)-Ru(3)-C(46)	79.7(2)
C(47)-Ru(3)-C(46)	36.4(2)

N(21)-Ru(3)-S(3)	80.47(13)
C(48)-Ru(3)-S(3)	132.99(19)
C(50)-Ru(3)-S(3)	91.26(19)
C(51)-Ru(3)-S(3)	108.81(18)
C(49)-Ru(3)-S(3)	100.91(17)
C(47)-Ru(3)-S(3)	168.07(16)
C(46)-Ru(3)-S(3)	143.19(17)
N(21)-Ru(3)-S(4)	89.43(13)
C(48)-Ru(3)-S(4)	144.11(18)
C(50)-Ru(3)-S(4)	127.57(19)
C(51)-Ru(3)-S(4)	97.02(18)
C(49)-Ru(3)-S(4)	164.18(17)
C(47)-Ru(3)-S(4)	108.45(16)
C(46)-Ru(3)-S(4)	88.35(16)
S(3)-Ru(3)-S(4)	82.50(6)
N(31)-Ru(4)-C(68)	122.6(2)
N(31)-Ru(4)-C(67)	160.6(2)
C(68)-Ru(4)-C(67)	38.0(2)
N(31)-Ru(4)-C(70)	93.6(2)
C(68)-Ru(4)-C(70)	66.7(2)
C(67)-Ru(4)-C(70)	78.5(2)
N(31)-Ru(4)-C(69)	94.7(2)
C(68)-Ru(4)-C(69)	37.5(2)
C(67)-Ru(4)-C(69)	68.2(2)
C(70)-Ru(4)-C(69)	37.6(2)
N(31)-Ru(4)-C(71)	116.8(2)
C(68)-Ru(4)-C(71)	79.0(2)
C(67)-Ru(4)-C(71)	66.4(2)
C(70)-Ru(4)-C(71)	36.4(2)
C(69)-Ru(4)-C(71)	67.6(2)
N(31)-Ru(4)-C(66)	153.4(2)
C(68)-Ru(4)-C(66)	67.4(2)
C(67)-Ru(4)-C(66)	36.6(2)
C(70)-Ru(4)-C(66)	66.6(2)
C(69)-Ru(4)-C(66)	80.5(2)
C(71)-Ru(4)-C(66)	37.3(2)
N(31)-Ru(4)-S(4)	81.12(13)
C(68)-Ru(4)-S(4)	90.68(16)

C(67)-Ru(4)-S(4)	96.54(16)
C(70)-Ru(4)-S(4)	149.37(17)
C(69)-Ru(4)-S(4)	112.32(16)
C(71)-Ru(4)-S(4)	162.08(17)
C(66)-Ru(4)-S(4)	125.05(17)
N(31)-Ru(4)-S(3)	91.09(13)
C(68)-Ru(4)-S(3)	144.19(16)
C(67)-Ru(4)-S(3)	107.80(15)
C(70)-Ru(4)-S(3)	128.10(17)
C(69)-Ru(4)-S(3)	164.90(16)
C(71)-Ru(4)-S(3)	97.40(15)
C(66)-Ru(4)-S(3)	88.09(16)
S(4)-Ru(4)-S(3)	82.35(6)
C(6)-S(1)-Ru(1)	96.67(19)
C(6)-S(1)-Ru(2)	107.12(19)
Ru(1)-S(1)-Ru(2)	95.76(6)
C(25)-S(2)-Ru(2)	97.1(2)
C(25)-S(2)-Ru(1)	107.18(19)
Ru(2)-S(2)-Ru(1)	95.57(6)
C(45)-S(3)-Ru(3)	97.4(2)
C(45)-S(3)-Ru(4)	107.62(19)
Ru(3)-S(3)-Ru(4)	96.88(6)
C(65)-S(4)-Ru(4)	96.66(19)
C(65)-S(4)-Ru(3)	107.95(19)
Ru(4)-S(4)-Ru(3)	96.82(6)
C(1)-O(3)-C(4)	104.9(4)
C(20)-O(12)-C(23)	104.9(4)
C(40)-O(22)-C(43)	104.7(4)
C(60)-O(32)-C(63)	105.0(4)
O(2)-N(1)-O(1)	124.5(5)
O(2)-N(1)-C(1)	117.3(5)
O(1)-N(1)-C(1)	118.2(5)
C(5)-N(2)-N(3)	114.4(5)
C(5)-N(2)-Ru(1)	122.0(4)
N(3)-N(2)-Ru(1)	123.6(3)
C(6)-N(3)-N(2)	113.9(5)
C(6)-N(4)-H(4A)	120.0
C(6)-N(4)-H(4B)	120.0

H(4A)-N(4)-H(4B)	120.0
O(11)-N(10)-O(10)	124.6(5)
O(11)-N(10)-C(20)	117.6(5)
O(10)-N(10)-C(20)	117.8(5)
C(24)-N(11)-N(12)	115.6(5)
C(24)-N(11)-Ru(2)	121.2(4)
N(12)-N(11)-Ru(2)	123.2(3)
C(25)-N(12)-N(11)	114.4(5)
C(25)-N(13)-H(13A)	120.0
C(25)-N(13)-H(13B)	120.0
H(13A)-N(13)-H(13B)	120.0
O(21)-N(20)-O(20)	124.6(5)
O(21)-N(20)-C(40)	118.7(5)
O(20)-N(20)-C(40)	116.8(5)
C(44)-N(21)-N(22)	114.6(5)
C(44)-N(21)-Ru(3)	122.1(4)
N(22)-N(21)-Ru(3)	123.3(3)
C(45)-N(22)-N(21)	113.9(5)
O(30)-N(30)-O(31)	124.3(5)
O(30)-N(30)-C(60)	117.4(6)
O(31)-N(30)-C(60)	118.4(5)
C(64)-N(31)-N(32)	114.4(5)
C(64)-N(31)-Ru(4)	123.2(4)
N(32)-N(31)-Ru(4)	122.2(4)
C(65)-N(32)-N(31)	115.1(5)
C(65)-N(33)-H(33A)	120.0
C(65)-N(33)-H(33B)	120.0
H(33A)-N(33)-H(33B)	120.0
O(3)-C(1)-C(2)	113.3(5)
O(3)-C(1)-N(1)	114.9(5)
C(2)-C(1)-N(1)	131.8(6)
C(1)-C(2)-C(3)	105.1(6)
C(1)-C(2)-H(2)	124(3)
C(3)-C(2)-H(2)	131(3)
C(4)-C(3)-C(2)	107.0(6)
C(4)-C(3)-H(3)	125(5)
C(2)-C(3)-H(3)	128(5)
C(3)-C(4)-O(3)	109.7(5)

C(3)-C(4)-C(5)	138.3(6)
O(3)-C(4)-C(5)	112.1(5)
N(2)-C(5)-C(4)	128.2(6)
N(2)-C(5)-H(5)	117(3)
C(4)-C(5)-H(5)	115(3)
N(3)-C(6)-N(4)	119.4(5)
N(3)-C(6)-S(1)	124.0(4)
N(4)-C(6)-S(1)	116.5(4)
C(8)-C(7)-C(12)	121.5(6)
C(8)-C(7)-Ru(1)	71.2(4)
C(12)-C(7)-Ru(1)	73.4(3)
C(8)-C(7)-H(7)	116(4)
C(12)-C(7)-H(7)	122(4)
Ru(1)-C(7)-H(7)	125(4)
C(7)-C(8)-C(9)	121.4(6)
C(7)-C(8)-Ru(1)	71.7(4)
C(9)-C(8)-Ru(1)	71.4(3)
C(7)-C(8)-H(8)	118(4)
C(9)-C(8)-H(8)	121(4)
Ru(1)-C(8)-H(8)	128(4)
C(10)-C(9)-C(8)	116.9(6)
C(10)-C(9)-C(14)	122.7(6)
C(8)-C(9)-C(14)	120.4(6)
C(10)-C(9)-Ru(1)	70.9(3)
C(8)-C(9)-Ru(1)	70.8(3)
C(14)-C(9)-Ru(1)	128.0(4)
C(11)-C(10)-C(9)	120.8(6)
C(11)-C(10)-Ru(1)	72.7(3)
C(9)-C(10)-Ru(1)	71.2(3)
C(11)-C(10)-H(10)	119.6
C(9)-C(10)-H(10)	119.6
Ru(1)-C(10)-H(10)	128.8
C(12)-C(11)-C(10)	122.2(6)
C(12)-C(11)-Ru(1)	72.8(3)
C(10)-C(11)-Ru(1)	70.2(3)
C(12)-C(11)-H(11)	118.9
C(10)-C(11)-H(11)	118.9
Ru(1)-C(11)-H(11)	131.0

C(11)-C(12)-C(7)	117.0(6)
C(11)-C(12)-C(13)	122.2(6)
C(7)-C(12)-C(13)	120.7(6)
C(11)-C(12)-Ru(1)	70.8(3)
C(7)-C(12)-Ru(1)	69.2(3)
C(13)-C(12)-Ru(1)	128.5(4)
C(12)-C(13)-H(13C)	109.5
C(12)-C(13)-H(13D)	109.5
H(13C)-C(13)-H(13D)	109.5
C(12)-C(13)-H(13E)	109.5
H(13C)-C(13)-H(13E)	109.5
H(13D)-C(13)-H(13E)	109.5
C(15)-C(14)-C(9)	109.8(5)
C(15)-C(14)-C(16)	111.0(6)
C(9)-C(14)-C(16)	112.8(6)
C(15)-C(14)-H(14)	108(3)
C(9)-C(14)-H(14)	109(3)
C(16)-C(14)-H(14)	105(3)
C(14)-C(15)-H(15A)	109.5
C(14)-C(15)-H(15B)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15B)	109.5
C(14)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15B)-C(15)-H(15C)	109.5
C(14)-C(16)-H(16A)	109.5
C(14)-C(16)-H(16B)	109.5
H(16A)-C(16)-H(16B)	109.5
C(14)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16A)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16B)-C(16)-H(16C)	109.5
O(12)-C(20)-C(21)	113.0(5)
O(12)-C(20)-N(10)	115.1(5)
C(21)-C(20)-N(10)	131.8(5)
C(20)-C(21)-C(22)	104.5(5)
C(20)-C(21)-H(21)	127.8
C(22)-C(21)-H(21)	127.8
C(23)-C(22)-C(21)	108.1(6)
C(23)-C(22)-H(22)	126(4)

C(21)-C(22)-H(22)	125(4)
C(22)-C(23)-O(12)	109.5(5)
C(22)-C(23)-C(24)	138.8(6)
O(12)-C(23)-C(24)	111.7(5)
N(11)-C(24)-C(23)	126.9(6)
N(11)-C(24)-H(24)	116.6
C(23)-C(24)-H(24)	116.6
N(12)-C(25)-N(13)	119.9(6)
N(12)-C(25)-S(2)	123.4(5)
N(13)-C(25)-S(2)	116.7(4)
C(31)-C(26)-C(27)	115.1(6)
C(31)-C(26)-C(32)	124.8(7)
C(27)-C(26)-C(32)	120.1(7)
C(31)-C(26)-Ru(2)	70.3(3)
C(27)-C(26)-Ru(2)	69.3(4)
C(32)-C(26)-Ru(2)	127.4(5)
C(28)-C(27)-C(26)	122.9(6)
C(28)-C(27)-Ru(2)	74.0(4)
C(26)-C(27)-Ru(2)	71.9(3)
C(28)-C(27)-H(27)	118.6
C(26)-C(27)-H(27)	118.6
Ru(2)-C(27)-H(27)	127.7
C(27)-C(28)-C(29)	120.5(7)
C(27)-C(28)-Ru(2)	69.2(4)
C(29)-C(28)-Ru(2)	74.5(4)
C(27)-C(28)-H(28)	119.8
C(29)-C(28)-H(28)	119.8
Ru(2)-C(28)-H(28)	128.9
C(28)-C(29)-C(30)	119.0(7)
C(28)-C(29)-C(33)	119.6(7)
C(30)-C(29)-C(33)	121.4(7)
C(28)-C(29)-Ru(2)	69.7(4)
C(30)-C(29)-Ru(2)	69.8(4)
C(33)-C(29)-Ru(2)	130.7(5)
C(31)-C(30)-C(29)	121.2(6)
C(31)-C(30)-Ru(2)	69.4(3)
C(29)-C(30)-Ru(2)	73.9(4)
C(31)-C(30)-H(30)	123(3)



C(29)-C(30)-H(30)	116(3)
Ru(2)-C(30)-H(30)	130(3)
C(30)-C(31)-C(26)	121.3(6)
C(30)-C(31)-Ru(2)	73.5(3)
C(26)-C(31)-Ru(2)	71.7(3)
C(30)-C(31)-H(31)	119.3
C(26)-C(31)-H(31)	119.4
Ru(2)-C(31)-H(31)	127.7
C(34)-C(32)-C(26)	113.6(7)
C(34)-C(32)-C(35)	112.5(8)
C(26)-C(32)-C(35)	109.1(7)
C(34)-C(32)-H(32)	107.1
C(26)-C(32)-H(32)	107.1
C(35)-C(32)-H(32)	107.1
C(29)-C(33)-H(33C)	109.5
C(29)-C(33)-H(33D)	109.5
H(33C)-C(33)-H(33D)	109.5
C(29)-C(33)-H(33E)	109.5
H(33C)-C(33)-H(33E)	109.5
H(33D)-C(33)-H(33E)	109.5
C(32)-C(34)-H(34A)	109.5
C(32)-C(34)-H(34B)	109.5
H(34A)-C(34)-H(34B)	109.5
C(32)-C(34)-H(34C)	109.5
H(34A)-C(34)-H(34C)	109.5
H(34B)-C(34)-H(34C)	109.5
C(32)-C(35)-H(35A)	109.5
C(32)-C(35)-H(35B)	109.5
H(35A)-C(35)-H(35B)	109.5
C(32)-C(35)-H(35C)	109.5
H(35A)-C(35)-H(35C)	109.5
H(35B)-C(35)-H(35C)	109.5
O(22)-C(40)-C(41)	112.9(5)
O(22)-C(40)-N(20)	115.9(5)
C(41)-C(40)-N(20)	131.2(6)
C(40)-C(41)-C(42)	105.5(6)
C(40)-C(41)-H(41)	127(4)
C(42)-C(41)-H(41)	128(4)

C(43)-C(42)-C(41)	107.2(6)
C(43)-C(42)-H(42)	125(4)
C(41)-C(42)-H(42)	127(4)
C(42)-C(43)-O(22)	109.6(5)
C(42)-C(43)-C(44)	138.5(6)
O(22)-C(43)-C(44)	111.8(5)
N(21)-C(44)-C(43)	126.3(5)
N(21)-C(44)-H(44)	116.9
C(43)-C(44)-H(44)	116.8
N(22)-C(45)-N(23)	120.5(5)
N(22)-C(45)-S(3)	123.2(5)
N(23)-C(45)-S(3)	116.4(4)
C(47)-C(46)-C(51)	117.3(6)
C(47)-C(46)-C(52)	121.8(6)
C(51)-C(46)-C(52)	120.9(6)
C(47)-C(46)-Ru(3)	70.3(3)
C(51)-C(46)-Ru(3)	69.2(4)
C(52)-C(46)-Ru(3)	130.7(4)
C(48)-C(47)-C(46)	120.3(6)
C(48)-C(47)-Ru(3)	69.6(3)
C(46)-C(47)-Ru(3)	73.3(4)
C(48)-C(47)-H(47)	119.8
C(46)-C(47)-H(47)	119.8
Ru(3)-C(47)-H(47)	129.6
C(47)-C(48)-C(49)	123.3(6)
C(47)-C(48)-Ru(3)	73.4(3)
C(49)-C(48)-Ru(3)	73.2(3)
C(47)-C(48)-H(48)	113(3)
C(49)-C(48)-H(48)	122(4)
Ru(3)-C(48)-H(48)	115(3)
C(48)-C(49)-C(50)	115.5(6)
C(48)-C(49)-C(53)	122.0(6)
C(50)-C(49)-C(53)	122.4(6)
C(48)-C(49)-Ru(3)	69.6(3)
C(50)-C(49)-Ru(3)	69.6(3)
C(53)-C(49)-Ru(3)	132.6(4)
C(51)-C(50)-C(49)	122.1(6)
C(51)-C(50)-Ru(3)	72.5(4)

C(49)-C(50)-Ru(3)	72.8(3)
C(51)-C(50)-H(50)	120(4)
C(49)-C(50)-H(50)	118(4)
Ru(3)-C(50)-H(50)	122(4)
C(50)-C(51)-C(46)	121.4(6)
C(50)-C(51)-Ru(3)	70.8(4)
C(46)-C(51)-Ru(3)	73.7(4)
C(50)-C(51)-H(51)	119.3
C(46)-C(51)-H(51)	119.3
Ru(3)-C(51)-H(51)	128.4
C(46)-C(52)-H(52A)	109.5
C(46)-C(52)-H(52B)	109.5
H(52A)-C(52)-H(52B)	109.5
C(46)-C(52)-H(52C)	109.5
H(52A)-C(52)-H(52C)	109.5
H(52B)-C(52)-H(52C)	109.5
C(55)-C(53)-C(54)	112.3(8)
C(55)-C(53)-C(49)	113.4(6)
C(54)-C(53)-C(49)	113.1(6)
C(55)-C(53)-H(53)	105.7
C(54)-C(53)-H(53)	105.7
C(49)-C(53)-H(53)	105.7
C(53)-C(54)-H(54A)	109.5
C(53)-C(54)-H(54B)	109.5
H(54A)-C(54)-H(54B)	109.5
C(53)-C(54)-H(54C)	109.5
H(54A)-C(54)-H(54C)	109.5
H(54B)-C(54)-H(54C)	109.5
C(53)-C(55)-H(55A)	109.5
C(53)-C(55)-H(55B)	109.5
H(55A)-C(55)-H(55B)	109.5
C(53)-C(55)-H(55C)	109.5
H(55A)-C(55)-H(55C)	109.5
H(55B)-C(55)-H(55C)	109.5
C(61)-C(60)-O(32)	113.5(5)
C(61)-C(60)-N(30)	130.9(6)
O(32)-C(60)-N(30)	115.6(5)
C(60)-C(61)-C(62)	106.0(6)

C(60)-C(61)-H(61)	127.0
C(62)-C(61)-H(61)	127.0
C(63)-C(62)-C(61)	106.5(6)
C(63)-C(62)-H(62)	124(4)
C(61)-C(62)-H(62)	129(4)
C(62)-C(63)-O(32)	109.1(5)
C(62)-C(63)-C(64)	138.0(6)
O(32)-C(63)-C(64)	112.9(5)
N(31)-C(64)-C(63)	126.8(6)
N(31)-C(64)-H(64)	124(3)
C(63)-C(64)-H(64)	109(3)
N(32)-C(65)-N(33)	120.0(5)
N(32)-C(65)-S(4)	123.6(4)
N(33)-C(65)-S(4)	116.4(4)
C(67)-C(66)-C(71)	118.6(5)
C(67)-C(66)-C(72)	121.1(6)
C(71)-C(66)-C(72)	120.3(6)
C(67)-C(66)-Ru(4)	70.6(3)
C(71)-C(66)-Ru(4)	70.9(3)
C(72)-C(66)-Ru(4)	128.0(4)
C(66)-C(67)-C(68)	120.6(5)
C(66)-C(67)-Ru(4)	72.8(3)
C(68)-C(67)-Ru(4)	70.2(3)
C(66)-C(67)-H(67)	119.7
C(68)-C(67)-H(67)	119.7
Ru(4)-C(67)-H(67)	129.8
C(69)-C(68)-C(67)	121.4(6)
C(69)-C(68)-Ru(4)	72.4(3)
C(67)-C(68)-Ru(4)	71.8(3)
C(69)-C(68)-H(68)	119.3
C(67)-C(68)-H(68)	119.3
Ru(4)-C(68)-H(68)	128.8
C(68)-C(69)-C(70)	116.3(5)
C(68)-C(69)-C(73)	123.7(5)
C(70)-C(69)-C(73)	120.0(5)
C(68)-C(69)-Ru(4)	70.0(3)
C(70)-C(69)-Ru(4)	70.9(3)
C(73)-C(69)-Ru(4)	126.3(4)

C(71)-C(70)-C(69)	122.6(6)
C(71)-C(70)-Ru(4)	72.3(3)
C(69)-C(70)-Ru(4)	71.5(3)
C(71)-C(70)-H(70)	118(3)
C(69)-C(70)-H(70)	119(3)
Ru(4)-C(70)-H(70)	122(3)
C(70)-C(71)-C(66)	120.4(6)
C(70)-C(71)-Ru(4)	71.2(3)
C(66)-C(71)-Ru(4)	71.8(3)
C(66)-C(71)-H(71)	119.8
Ru(4)-C(71)-H(71)	129.6
C(66)-C(72)-H(72A)	109.5
C(66)-C(72)-H(72B)	109.5
H(72A)-C(72)-H(72B)	109.5
C(66)-C(72)-H(72C)	109.5
H(72A)-C(72)-H(72C)	109.5
H(72B)-C(72)-H(72C)	109.5
C(69)-C(73)-C(74)	113.9(5)
C(69)-C(73)-C(75)	110.8(5)
C(74)-C(73)-C(75)	110.2(5)
C(69)-C(73)-H(73)	107(3)
C(74)-C(73)-H(73)	105(3)
C(75)-C(73)-H(73)	110(3)
C(73)-C(74)-H(74A)	109.5
C(73)-C(74)-H(74B)	109.5
H(74A)-C(74)-H(74B)	109.5
C(73)-C(74)-H(74C)	109.5
H(74A)-C(74)-H(74C)	109.5
H(74B)-C(74)-H(74C)	109.5
C(73)-C(75)-H(75A)	109.5
C(73)-C(75)-H(75B)	109.5
H(75A)-C(75)-H(75B)	109.5
C(73)-C(75)-H(75C)	109.5
H(75A)-C(75)-H(75C)	109.5
H(75B)-C(75)-H(75C)	109.5
O(14W)-O(16W)-O(10W)	51.2(17)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL1. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Ru(1)	14(1)	22(1)	25(1)	-5(1)	6(1)	-2(1)
Ru(2)	16(1)	27(1)	37(1)	-13(1)	11(1)	-5(1)
Ru(3)	17(1)	20(1)	33(1)	-7(1)	11(1)	-4(1)
Ru(4)	15(1)	22(1)	23(1)	-5(1)	7(1)	-4(1)
S(1)	17(1)	23(1)	31(1)	-4(1)	6(1)	0(1)
S(2)	19(1)	35(1)	27(1)	-7(1)	9(1)	-7(1)
S(3)	20(1)	27(1)	25(1)	-5(1)	9(1)	-6(1)
S(4)	19(1)	24(1)	26(1)	-4(1)	7(1)	-1(1)
O(1)	34(3)	37(3)	51(3)	4(2)	4(2)	15(2)
O(2)	54(3)	16(3)	56(3)	1(2)	29(3)	0(2)
O(3)	20(2)	20(2)	31(2)	2(2)	8(2)	3(2)
O(10)	20(2)	26(3)	44(3)	3(2)	-2(2)	5(2)
O(11)	36(3)	20(3)	42(3)	0(2)	-1(2)	-13(2)
O(12)	16(2)	21(2)	28(2)	-2(2)	5(2)	-1(2)
O(20)	41(3)	21(3)	42(3)	0(2)	6(2)	-12(2)
O(21)	23(2)	30(3)	35(3)	1(2)	4(2)	-1(2)
O(22)	20(2)	16(2)	28(2)	-1(2)	5(2)	-1(2)
O(30)	48(3)	19(3)	58(3)	2(2)	28(2)	2(2)
O(31)	44(3)	41(3)	44(3)	1(2)	7(3)	16(2)
O(32)	22(2)	22(2)	33(2)	-1(2)	4(2)	4(2)
N(1)	38(3)	20(3)	34(3)	10(2)	19(3)	3(2)
N(2)	14(2)	21(3)	26(3)	-1(2)	6(2)	0(2)
N(3)	16(3)	25(3)	27(3)	-7(2)	7(2)	-2(2)
N(4)	21(3)	22(3)	32(3)	-2(2)	0(2)	0(2)
N(10)	17(3)	30(3)	28(3)	0(2)	5(2)	-4(2)
N(11)	19(3)	28(3)	28(3)	-6(2)	11(2)	-4(2)
N(12)	24(3)	25(3)	31(3)	-2(2)	9(2)	-3(2)
N(13)	28(3)	34(3)	38(3)	6(3)	3(3)	-10(3)
N(20)	25(3)	24(3)	27(3)	0(2)	11(2)	-7(2)
N(21)	19(3)	17(3)	30(3)	-5(2)	8(2)	-2(2)
N(22)	20(3)	22(3)	30(3)	1(2)	6(2)	-2(2)
N(23)	25(3)	38(3)	30(3)	6(3)	3(2)	3(2)
N(30)	29(3)	31(3)	41(4)	6(3)	20(3)	1(3)

N(31)	17(3)	26(3)	25(3)	0(2)	6(2)	-2(2)
N(32)	15(3)	26(3)	23(3)	-4(2)	0(2)	-2(2)
N(33)	24(3)	26(3)	35(3)	-5(2)	0(2)	6(2)
C(1)	30(4)	19(3)	27(3)	1(3)	14(3)	3(3)
C(2)	32(4)	23(4)	37(4)	-4(3)	14(3)	-7(3)
C(3)	23(4)	27(4)	33(4)	2(3)	4(3)	2(3)
C(4)	14(3)	27(3)	28(3)	1(3)	7(3)	4(3)
C(5)	17(3)	31(4)	20(3)	-4(3)	2(3)	4(3)
C(6)	20(3)	27(4)	22(3)	1(3)	8(3)	2(3)
C(7)	24(3)	25(4)	31(4)	-7(3)	9(3)	-8(3)
C(8)	20(3)	14(3)	46(4)	-2(3)	12(3)	-7(3)
C(9)	16(3)	26(4)	37(4)	-3(3)	6(3)	-5(3)
C(10)	15(3)	33(4)	31(4)	-7(3)	10(3)	-10(3)
C(11)	15(3)	27(4)	35(4)	-3(3)	9(3)	-4(3)
C(12)	12(3)	34(4)	30(4)	-1(3)	5(3)	-12(3)
C(13)	23(3)	42(4)	31(4)	0(3)	3(3)	-7(3)
C(14)	27(4)	40(4)	28(4)	3(3)	6(3)	-1(3)
C(15)	49(5)	73(6)	34(4)	19(4)	13(4)	-12(4)
C(16)	39(4)	56(5)	31(4)	-2(3)	-1(3)	4(4)
C(20)	21(3)	21(3)	27(3)	2(3)	10(3)	-5(3)
C(21)	28(4)	20(3)	37(4)	2(3)	7(3)	0(3)
C(22)	25(4)	29(4)	33(4)	6(3)	2(3)	2(3)
C(23)	15(3)	30(4)	25(3)	-3(3)	4(3)	-4(3)
C(24)	18(3)	26(3)	33(4)	-3(3)	11(3)	-3(3)
C(25)	24(3)	38(4)	23(3)	-2(3)	13(3)	-4(3)
C(26)	32(4)	50(5)	32(4)	-14(3)	13(3)	6(3)
C(27)	20(4)	53(5)	64(5)	-47(4)	9(3)	-6(3)
C(28)	39(4)	42(5)	72(6)	-21(4)	31(4)	-7(4)
C(29)	45(5)	23(4)	74(6)	-10(4)	37(4)	4(3)
C(30)	19(3)	34(4)	37(4)	-14(3)	12(3)	7(3)
C(31)	18(3)	32(4)	32(4)	-9(3)	10(3)	0(3)
C(32)	54(5)	68(6)	53(5)	-14(4)	20(4)	12(4)
C(33)	101(7)	28(4)	101(7)	8(5)	70(6)	6(4)
C(34)	109(8)	83(7)	48(6)	21(5)	19(5)	-10(6)
C(35)	58(6)	112(8)	48(5)	-8(5)	16(4)	24(5)
C(40)	22(3)	18(3)	29(4)	2(3)	7(3)	-3(3)
C(41)	35(4)	18(4)	31(4)	-3(3)	10(3)	-2(3)
C(42)	15(3)	27(4)	30(4)	3(3)	2(3)	1(3)

C(43)	19(3)	24(3)	28(3)	-4(3)	11(3)	-5(3)
C(44)	17(3)	23(3)	32(4)	-1(3)	11(3)	3(3)
C(45)	25(3)	28(4)	29(4)	-9(3)	15(3)	-7(3)
C(46)	36(4)	19(3)	58(5)	-3(3)	31(4)	2(3)
C(47)	24(3)	25(4)	38(4)	-8(3)	16(3)	4(3)
C(48)	20(3)	22(4)	47(4)	-12(3)	18(3)	-5(3)
C(49)	22(3)	32(4)	37(4)	-17(3)	14(3)	-2(3)
C(50)	27(4)	28(4)	49(5)	-24(3)	11(3)	-6(3)
C(51)	28(4)	22(4)	69(5)	-13(3)	30(4)	-7(3)
C(52)	60(5)	28(4)	70(6)	10(4)	36(4)	11(4)
C(53)	37(4)	54(5)	35(4)	-22(3)	13(3)	-6(3)
C(54)	158(10)	46(6)	42(5)	9(4)	21(6)	-16(6)
C(55)	50(6)	199(13)	41(5)	4(7)	8(4)	-9(7)
C(60)	23(3)	23(4)	44(4)	2(3)	15(3)	3(3)
C(61)	28(4)	28(4)	40(4)	-3(3)	6(3)	-7(3)
C(62)	22(3)	31(4)	38(4)	-4(3)	8(3)	-3(3)
C(63)	21(3)	30(4)	26(3)	5(3)	8(3)	8(3)
C(64)	13(3)	28(4)	28(4)	0(3)	4(3)	2(3)
C(65)	17(3)	27(3)	24(3)	-5(3)	5(3)	1(3)
C(66)	19(3)	27(4)	39(4)	-15(3)	12(3)	-12(3)
C(67)	19(3)	18(3)	38(4)	-10(3)	14(3)	-5(2)
C(68)	22(3)	26(4)	31(4)	-3(3)	15(3)	-9(3)
C(69)	19(3)	30(4)	28(3)	-6(3)	11(3)	-5(3)
C(70)	16(3)	24(4)	34(4)	-9(3)	8(3)	-3(3)
C(71)	18(3)	38(4)	20(3)	-7(3)	2(3)	-14(3)
C(72)	27(4)	53(5)	37(4)	-20(3)	18(3)	-15(3)
C(73)	26(3)	24(4)	27(3)	-2(3)	13(3)	-4(3)
C(74)	28(3)	48(4)	24(3)	-4(3)	11(3)	1(3)
C(75)	34(4)	43(4)	33(4)	-13(3)	21(3)	0(3)
CI(1)	20(1)	38(1)	46(1)	-2(1)	7(1)	-2(1)
CI(2)	37(1)	65(1)	33(1)	0(1)	3(1)	-11(1)
CI(3)	59(1)	45(1)	88(2)	20(1)	31(1)	17(1)
CI(4)	39(1)	38(1)	66(1)	-10(1)	6(1)	-8(1)
O(1W)	45(3)	70(4)	52(3)	1(3)	5(3)	3(3)
O(2W)	98(5)	67(4)	86(5)	5(3)	51(4)	0(4)
O(3W)	72(4)	52(4)	107(5)	12(3)	40(4)	4(3)
O(4W)	76(4)	75(4)	58(4)	0(3)	6(3)	9(3)
O(5W)	87(5)	63(4)	94(5)	13(3)	45(4)	-8(3)



O(6W)	94(5)	45(4)	85(5)	16(3)	3(4)	-18(3)
O(7W)	116(6)	89(5)	104(6)	26(4)	60(5)	9(4)
O(8W)	143(7)	110(6)	78(5)	50(4)	-59(5)	-70(5)
O(9W)	134(7)	100(6)	105(6)	14(5)	-10(5)	-30(5)
O(10W)	111(10)	600(40)	275(18)	140(20)	-38(10)	-58(15)
O(11W)	105(6)	133(7)	126(7)	6(5)	56(5)	-25(5)
O(12W)	232(11)	70(5)	116(7)	-1(5)	87(7)	-19(6)
O(13W)	440(20)	186(12)	135(10)	17(9)	81(13)	164(15)
O(14W)	192(15)	760(50)	310(20)	370(30)	0(13)	0(20)
O(15W)	460(40)	770(60)	440(40)	-360(40)	90(30)	-50(40)

---

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for RuL1.

	x	y	z	U(eq)
H(4A)	8794	1010	5025	32
H(4B)	8639	1573	5165	32
H(13A)	10455	200	8165	42
H(13B)	10984	631	8461	42
H(33A)	6189	3902	9906	36
H(33B)	6384	3339	9812	36
H(10)	11889	1558	6144	31
H(11)	12366	1313	7368	30
H(13C)	12296	1359	8626	49
H(13D)	11904	1840	8852	49
H(13E)	12690	1905	8849	49
H(15A)	11573	3142	5651	78
H(15B)	11311	2962	4824	78
H(15C)	11991	2703	5375	78
H(16A)	11398	1795	4997	67
H(16B)	10725	2083	4477	67
H(16C)	10650	1695	5090	67
H(21)	7913	-754	6143	35
H(24)	8116	1280	6372	30
H(27)	9845	2611	8526	56
H(28)	9657	3069	7445	57
H(31)	7999	1804	7638	33
H(32)	9597	1734	9078	69
H(33C)	8310	3352	6196	101
H(33D)	8366	2823	5785	101
H(33E)	9051	3158	6164	101
H(34A)	8189	1481	8868	122
H(34B)	8861	1165	9339	122
H(34C)	8660	1175	8478	122
H(35A)	9316	2555	9538	109
H(35B)	9255	2069	10029	109
H(35C)	8567	2324	9486	109

H(44)	6945	3637	8621	28
H(47)	7338	2614	8591	33
H(51)	5558	1745	7672	44
H(52A)	6851	1570	9065	74
H(52B)	6085	1765	9012	74
H(52C)	6744	2127	9384	74
H(53)	6600	2611	5925	50
H(54A)	6495	3516	5651	127
H(54B)	7041	3401	6429	127
H(54C)	6281	3616	6363	127
H(55A)	5213	2932	5722	147
H(55B)	5455	2390	5471	147
H(55C)	5564	2923	5093	147
H(61)	4683	5871	9190	40
H(67)	4039	1920	7906	29
H(68)	3984	2317	8998	30
H(71)	2847	3118	6729	31
H(72A)	3935	2014	6618	56
H(72B)	3564	2518	6180	56
H(72C)	3106	2028	6267	56
H(74A)	3985	2775	10047	49
H(74B)	3989	3370	10294	49
H(74C)	4431	3198	9780	49
H(75A)	2269	3221	8970	52
H(75B)	2649	3348	9804	52
H(75C)	2651	2765	9510	52
H(41)	6890(30)	5660(20)	8610(30)	21(16)
H(48)	7120(30)	3010(20)	7520(30)	2(13)
H(73)	3390(20)	3620(20)	9130(30)	7(13)
H(22)	8810(30)	-120(20)	6860(30)	12(15)
H(2)	10160(30)	-1090(20)	5820(30)	14(14)
H(30)	7760(30)	2300(20)	6480(30)	25(15)
H(8)	11050(30)	2850(20)	6790(30)	26(17)
H(7)	11440(30)	2580(20)	7940(30)	17(15)
H(14)	10590(30)	2570(20)	5440(30)	25(16)
H(70)	2840(30)	3500(20)	7800(30)	10(14)
H(42)	6020(30)	4960(20)	7950(30)	23(16)
H(62)	5240(40)	4900(30)	9190(40)	50(20)

H(64)	3640(30)	4240(20)	7690(30)	12(14)
H(3)	9810(40)	-100(30)	5820(40)	50(20)
H(50)	5410(30)	2150(20)	6540(40)	38(18)
H(5)	11380(30)	610(19)	7100(30)	9(13)

---

Table 6. Torsion angles [°] for RuL1.

---

N(2)-Ru(1)-S(1)-C(6)	-6.9(2)
C(8)-Ru(1)-S(1)-C(6)	145.2(3)
C(10)-Ru(1)-S(1)-C(6)	81.0(3)
C(7)-Ru(1)-S(1)-C(6)	174.4(3)
C(9)-Ru(1)-S(1)-C(6)	107.4(2)
C(11)-Ru(1)-S(1)-C(6)	83.5(5)
C(12)-Ru(1)-S(1)-C(6)	-176.5(4)
S(2)-Ru(1)-S(1)-C(6)	-97.75(19)
N(2)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	101.11(13)
C(8)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-106.72(17)
C(10)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-170.94(19)
C(7)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-77.51(19)
C(9)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-144.56(16)
C(11)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-168.5(4)
C(12)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	-68.4(3)
S(2)-Ru(1)-S(1)-Ru(2)	10.29(5)
N(11)-Ru(2)-S(1)-C(6)	7.5(2)
C(27)-Ru(2)-S(1)-C(6)	173.1(3)
C(31)-Ru(2)-S(1)-C(6)	-81.3(4)
C(26)-Ru(2)-S(1)-C(6)	-175.3(7)
C(28)-Ru(2)-S(1)-C(6)	-163.1(3)
C(30)-Ru(2)-S(1)-C(6)	-96.6(3)
C(29)-Ru(2)-S(1)-C(6)	-127.8(3)
S(2)-Ru(2)-S(1)-C(6)	88.2(2)
N(11)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	-91.34(14)
C(27)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	74.3(3)
C(31)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	179.9(3)
C(26)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	85.9(7)
C(28)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	98.1(2)
C(30)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	164.59(18)
C(29)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	133.37(19)
S(2)-Ru(2)-S(1)-Ru(1)	-10.64(5)
N(11)-Ru(2)-S(2)-C(25)	-7.9(2)
C(27)-Ru(2)-S(2)-C(25)	134.7(3)
C(31)-Ru(2)-S(2)-C(25)	74.3(3)
C(26)-Ru(2)-S(2)-C(25)	96.6(3)

C(28)-Ru(2)-S(2)-C(25)	166.6(3)
C(30)-Ru(2)-S(2)-C(25)	100.5(7)
C(29)-Ru(2)-S(2)-C(25)	-179.9(4)
S(1)-Ru(2)-S(2)-C(25)	-97.85(19)
N(11)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	100.28(14)
C(27)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-117.2(2)
C(31)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-177.5(2)
C(26)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-155.26(19)
C(28)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-85.3(2)
C(30)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-151.4(7)
C(29)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	-71.7(3)
S(1)-Ru(2)-S(2)-Ru(1)	10.29(5)
N(2)-Ru(1)-S(2)-C(25)	7.8(2)
C(8)-Ru(1)-S(2)-C(25)	177.5(3)
C(10)-Ru(1)-S(2)-C(25)	-88.9(4)
C(7)-Ru(1)-S(2)-C(25)	-155.1(3)
C(9)-Ru(1)-S(2)-C(25)	172.4(4)
C(11)-Ru(1)-S(2)-C(25)	-91.9(3)
C(12)-Ru(1)-S(2)-C(25)	-117.7(3)
S(1)-Ru(1)-S(2)-C(25)	88.6(2)
N(2)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	-91.39(13)
C(8)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	78.3(2)
C(10)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	171.8(4)
C(7)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	105.71(17)
C(9)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	73.1(4)
C(11)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	168.91(17)
C(12)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	143.09(16)
S(1)-Ru(1)-S(2)-Ru(2)	-10.60(5)
N(21)-Ru(3)-S(3)-C(45)	9.2(2)
C(48)-Ru(3)-S(3)-C(45)	-74.1(3)
C(50)-Ru(3)-S(3)-C(45)	-132.4(3)
C(51)-Ru(3)-S(3)-C(45)	-165.2(3)
C(49)-Ru(3)-S(3)-C(45)	-95.8(2)
C(47)-Ru(3)-S(3)-C(45)	-103.0(8)
C(46)-Ru(3)-S(3)-C(45)	176.9(3)
S(4)-Ru(3)-S(3)-C(45)	99.87(19)
N(21)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	-99.67(14)
C(48)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	177.1(2)

C(50)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	118.76(19)
C(51)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	85.90(19)
C(49)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	155.36(17)
C(47)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	148.2(8)
C(46)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	68.0(3)
S(4)-Ru(3)-S(3)-Ru(4)	-8.99(5)
N(31)-Ru(4)-S(3)-C(45)	-9.9(2)
C(68)-Ru(4)-S(3)-C(45)	-171.3(3)
C(67)-Ru(4)-S(3)-C(45)	174.7(3)
C(70)-Ru(4)-S(3)-C(45)	85.5(3)
C(69)-Ru(4)-S(3)-C(45)	102.5(6)
C(71)-Ru(4)-S(3)-C(45)	107.2(3)
C(66)-Ru(4)-S(3)-C(45)	143.4(3)
S(4)-Ru(4)-S(3)-C(45)	-90.8(2)
N(31)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	90.15(13)
C(68)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-71.2(3)
C(67)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-85.19(17)
C(70)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-174.4(2)
C(69)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-157.4(6)
C(71)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-152.67(17)
C(66)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	-116.49(17)
S(4)-Ru(4)-S(3)-Ru(3)	9.26(5)
N(31)-Ru(4)-S(4)-C(65)	7.8(2)
C(68)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-115.2(2)
C(67)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-152.8(2)
C(70)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-74.3(4)
C(69)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-83.7(3)
C(71)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-169.5(5)
C(66)-Ru(4)-S(4)-C(65)	-177.7(3)
S(3)-Ru(4)-S(4)-C(65)	100.1(2)
N(31)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	-101.29(13)
C(68)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	135.78(16)
C(67)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	98.18(15)
C(70)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	176.6(3)
C(69)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	167.29(17)
C(71)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	81.4(5)
C(66)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	73.2(2)
S(3)-Ru(4)-S(4)-Ru(3)	-8.98(5)

N(21)-Ru(3)-S(4)-C(65)	-9.6(2)
C(48)-Ru(3)-S(4)-C(65)	82.4(4)
C(50)-Ru(3)-S(4)-C(65)	-175.8(3)
C(51)-Ru(3)-S(4)-C(65)	161.8(3)
C(49)-Ru(3)-S(4)-C(65)	166.3(6)
C(47)-Ru(3)-S(4)-C(65)	94.8(3)
C(46)-Ru(3)-S(4)-C(65)	125.7(3)
S(3)-Ru(3)-S(4)-C(65)	-90.0(2)
N(21)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	89.73(13)
C(48)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-178.3(3)
C(50)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-76.5(2)
C(51)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-98.89(19)
C(49)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-94.4(6)
C(47)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-165.89(16)
C(46)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	-134.99(17)
S(3)-Ru(3)-S(4)-Ru(4)	9.27(5)
C(8)-Ru(1)-N(2)-C(5)	113.5(6)
C(10)-Ru(1)-N(2)-C(5)	68.8(5)
C(7)-Ru(1)-N(2)-C(5)	6.6(10)
C(9)-Ru(1)-N(2)-C(5)	101.2(5)
C(11)-Ru(1)-N(2)-C(5)	31.9(5)
C(12)-Ru(1)-N(2)-C(5)	5.0(5)
S(1)-Ru(1)-N(2)-C(5)	-169.2(5)
S(2)-Ru(1)-N(2)-C(5)	-86.0(4)
C(8)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-67.0(6)
C(10)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-111.7(4)
C(7)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-173.9(6)
C(9)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-79.3(4)
C(11)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-148.6(4)
C(12)-Ru(1)-N(2)-N(3)	-175.5(4)
S(1)-Ru(1)-N(2)-N(3)	10.3(4)
S(2)-Ru(1)-N(2)-N(3)	93.5(4)
C(5)-N(2)-N(3)-C(6)	170.4(5)
Ru(1)-N(2)-N(3)-C(6)	-9.2(6)
C(27)-Ru(2)-N(11)-C(24)	110.9(5)
C(31)-Ru(2)-N(11)-C(24)	57.7(5)
C(26)-Ru(2)-N(11)-C(24)	93.0(5)
C(28)-Ru(2)-N(11)-C(24)	36.6(15)



C(30)-Ru(2)-N(11)-C(24)	22.8(5)
C(29)-Ru(2)-N(11)-C(24)	2.0(6)
S(2)-Ru(2)-N(11)-C(24)	-171.3(5)
S(1)-Ru(2)-N(11)-C(24)	-87.7(4)
C(27)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-66.6(5)
C(31)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-119.8(4)
C(26)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-84.5(4)
C(28)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-141.0(13)
C(30)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-154.8(4)
C(29)-Ru(2)-N(11)-N(12)	-175.5(4)
S(2)-Ru(2)-N(11)-N(12)	11.2(4)
S(1)-Ru(2)-N(11)-N(12)	94.8(4)
C(24)-N(11)-N(12)-C(25)	172.7(5)
Ru(2)-N(11)-N(12)-C(25)	-9.6(6)
C(48)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-58.6(5)
C(50)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-111.8(5)
C(51)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-41.5(15)
C(49)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-93.3(5)
C(47)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-23.3(5)
C(46)-Ru(3)-N(21)-C(44)	-1.6(6)
S(3)-Ru(3)-N(21)-C(44)	168.0(4)
S(4)-Ru(3)-N(21)-C(44)	85.5(4)
C(48)-Ru(3)-N(21)-N(22)	119.9(4)
C(50)-Ru(3)-N(21)-N(22)	66.7(5)
C(51)-Ru(3)-N(21)-N(22)	137.0(12)
C(49)-Ru(3)-N(21)-N(22)	85.2(4)
C(47)-Ru(3)-N(21)-N(22)	155.1(4)
C(46)-Ru(3)-N(21)-N(22)	176.9(4)
S(3)-Ru(3)-N(21)-N(22)	-13.5(4)
S(4)-Ru(3)-N(21)-N(22)	-96.0(4)
C(44)-N(21)-N(22)-C(45)	-169.4(5)
Ru(3)-N(21)-N(22)-C(45)	12.0(6)
C(68)-Ru(4)-N(31)-C(64)	-101.8(5)
C(67)-Ru(4)-N(31)-C(64)	-102.4(7)
C(70)-Ru(4)-N(31)-C(64)	-37.2(5)
C(69)-Ru(4)-N(31)-C(64)	-74.9(5)
C(71)-Ru(4)-N(31)-C(64)	-7.8(5)
C(66)-Ru(4)-N(31)-C(64)	3.2(7)

S(4)-Ru(4)-N(31)-C(64)	173.2(5)
S(3)-Ru(4)-N(31)-C(64)	91.1(5)
C(68)-Ru(4)-N(31)-N(32)	73.5(4)
C(67)-Ru(4)-N(31)-N(32)	72.9(7)
C(70)-Ru(4)-N(31)-N(32)	138.1(4)
C(69)-Ru(4)-N(31)-N(32)	100.4(4)
C(71)-Ru(4)-N(31)-N(32)	167.5(4)
C(66)-Ru(4)-N(31)-N(32)	178.5(4)
S(4)-Ru(4)-N(31)-N(32)	-11.5(4)
S(3)-Ru(4)-N(31)-N(32)	-93.6(4)
C(64)-N(31)-N(32)-C(65)	-173.8(5)
Ru(4)-N(31)-N(32)-C(65)	10.5(6)
C(4)-O(3)-C(1)-C(2)	-0.4(6)
C(4)-O(3)-C(1)-N(1)	179.3(5)
O(2)-N(1)-C(1)-O(3)	-168.9(5)
O(1)-N(1)-C(1)-O(3)	11.3(7)
O(2)-N(1)-C(1)-C(2)	10.7(9)
O(1)-N(1)-C(1)-C(2)	-169.1(6)
O(3)-C(1)-C(2)-C(3)	0.5(7)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-179.1(6)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.4(7)
C(2)-C(3)-C(4)-O(3)	0.1(7)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	179.7(7)
C(1)-O(3)-C(4)-C(3)	0.2(6)
C(1)-O(3)-C(4)-C(5)	-179.5(5)
N(3)-N(2)-C(5)-C(4)	-2.2(9)
Ru(1)-N(2)-C(5)-C(4)	177.4(5)
C(3)-C(4)-C(5)-N(2)	-6.0(12)
O(3)-C(4)-C(5)-N(2)	173.6(5)
N(2)-N(3)-C(6)-N(4)	179.4(5)
N(2)-N(3)-C(6)-S(1)	0.7(7)
Ru(1)-S(1)-C(6)-N(3)	5.9(5)
Ru(2)-S(1)-C(6)-N(3)	-92.2(5)
Ru(1)-S(1)-C(6)-N(4)	-172.8(4)
Ru(2)-S(1)-C(6)-N(4)	89.0(4)
N(2)-Ru(1)-C(7)-C(8)	130.5(7)
C(10)-Ru(1)-C(7)-C(8)	66.4(4)
C(9)-Ru(1)-C(7)-C(8)	28.6(4)

C(11)-Ru(1)-C(7)-C(8)	103.0(4)
C(12)-Ru(1)-C(7)-C(8)	132.6(6)
S(1)-Ru(1)-C(7)-C(8)	-54.1(4)
S(2)-Ru(1)-C(7)-C(8)	-137.1(4)
N(2)-Ru(1)-C(7)-C(12)	-2.1(9)
C(8)-Ru(1)-C(7)-C(12)	-132.6(6)
C(10)-Ru(1)-C(7)-C(12)	-66.2(4)
C(9)-Ru(1)-C(7)-C(12)	-104.1(4)
C(11)-Ru(1)-C(7)-C(12)	-29.7(3)
S(1)-Ru(1)-C(7)-C(12)	173.3(3)
S(2)-Ru(1)-C(7)-C(12)	90.3(3)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	2.4(9)
Ru(1)-C(7)-C(8)-C(9)	-53.4(5)
C(12)-C(7)-C(8)-Ru(1)	55.8(5)
N(2)-Ru(1)-C(8)-C(7)	-152.1(4)
C(10)-Ru(1)-C(8)-C(7)	-102.5(4)
C(9)-Ru(1)-C(8)-C(7)	-133.7(6)
C(11)-Ru(1)-C(8)-C(7)	-65.3(4)
C(12)-Ru(1)-C(8)-C(7)	-29.0(4)
S(1)-Ru(1)-C(8)-C(7)	133.4(4)
S(2)-Ru(1)-C(8)-C(7)	49.9(4)
N(2)-Ru(1)-C(8)-C(9)	-18.4(6)
C(10)-Ru(1)-C(8)-C(9)	31.2(3)
C(7)-Ru(1)-C(8)-C(9)	133.7(6)
C(11)-Ru(1)-C(8)-C(9)	68.4(4)
C(12)-Ru(1)-C(8)-C(9)	104.7(4)
S(1)-Ru(1)-C(8)-C(9)	-92.9(3)
S(2)-Ru(1)-C(8)-C(9)	-176.4(3)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-2.0(8)
Ru(1)-C(8)-C(9)-C(10)	-55.6(4)
C(7)-C(8)-C(9)-C(14)	177.0(5)
Ru(1)-C(8)-C(9)-C(14)	123.4(5)
C(7)-C(8)-C(9)-Ru(1)	53.6(5)
N(2)-Ru(1)-C(9)-C(10)	-60.7(4)
C(8)-Ru(1)-C(9)-C(10)	128.9(5)
C(7)-Ru(1)-C(9)-C(10)	100.9(4)
C(11)-Ru(1)-C(9)-C(10)	28.9(3)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(10)	64.2(3)

S(1)-Ru(1)-C(9)-C(10)	-142.2(3)
S(2)-Ru(1)-C(9)-C(10)	136.4(4)
N(2)-Ru(1)-C(9)-C(8)	170.4(3)
C(10)-Ru(1)-C(9)-C(8)	-128.9(5)
C(7)-Ru(1)-C(9)-C(8)	-28.0(4)
C(11)-Ru(1)-C(9)-C(8)	-100.0(4)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(8)	-64.6(4)
S(1)-Ru(1)-C(9)-C(8)	89.0(3)
S(2)-Ru(1)-C(9)-C(8)	7.5(6)
N(2)-Ru(1)-C(9)-C(14)	56.3(6)
C(8)-Ru(1)-C(9)-C(14)	-114.1(7)
C(10)-Ru(1)-C(9)-C(14)	117.0(7)
C(7)-Ru(1)-C(9)-C(14)	-142.1(6)
C(11)-Ru(1)-C(9)-C(14)	145.9(6)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(14)	-178.8(6)
S(1)-Ru(1)-C(9)-C(14)	-25.1(5)
S(2)-Ru(1)-C(9)-C(14)	-106.6(6)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	0.2(8)
C(14)-C(9)-C(10)-C(11)	-178.8(5)
Ru(1)-C(9)-C(10)-C(11)	-55.4(5)
C(8)-C(9)-C(10)-Ru(1)	55.6(4)
C(14)-C(9)-C(10)-Ru(1)	-123.5(5)
N(2)-Ru(1)-C(10)-C(11)	-100.3(4)
C(8)-Ru(1)-C(10)-C(11)	101.1(4)
C(7)-Ru(1)-C(10)-C(11)	64.3(4)
C(9)-Ru(1)-C(10)-C(11)	132.3(5)
C(12)-Ru(1)-C(10)-C(11)	27.2(3)
S(1)-Ru(1)-C(10)-C(11)	178.6(3)
S(2)-Ru(1)-C(10)-C(11)	-4.3(6)
N(2)-Ru(1)-C(10)-C(9)	127.4(3)
C(8)-Ru(1)-C(10)-C(9)	-31.2(3)
C(7)-Ru(1)-C(10)-C(9)	-68.0(4)
C(11)-Ru(1)-C(10)-C(9)	-132.3(5)
C(12)-Ru(1)-C(10)-C(9)	-105.1(4)
S(1)-Ru(1)-C(10)-C(9)	46.3(4)
S(2)-Ru(1)-C(10)-C(9)	-136.6(4)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	1.4(8)
Ru(1)-C(10)-C(11)-C(12)	-53.3(5)

C(9)-C(10)-C(11)-Ru(1)	54.7(5)
N(2)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-141.6(3)
C(8)-Ru(1)-C(11)-C(12)	67.3(4)
C(10)-Ru(1)-C(11)-C(12)	134.8(5)
C(7)-Ru(1)-C(11)-C(12)	30.5(3)
C(9)-Ru(1)-C(11)-C(12)	105.3(4)
S(1)-Ru(1)-C(11)-C(12)	131.3(4)
S(2)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-47.3(4)
N(2)-Ru(1)-C(11)-C(10)	83.6(4)
C(8)-Ru(1)-C(11)-C(10)	-67.5(4)
C(7)-Ru(1)-C(11)-C(10)	-104.3(4)
C(9)-Ru(1)-C(11)-C(10)	-29.4(3)
C(12)-Ru(1)-C(11)-C(10)	-134.8(5)
S(1)-Ru(1)-C(11)-C(10)	-3.4(7)
S(2)-Ru(1)-C(11)-C(10)	177.9(3)
C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	-1.1(8)
Ru(1)-C(11)-C(12)-C(7)	-53.2(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	176.2(5)
Ru(1)-C(11)-C(12)-C(13)	124.1(5)
C(10)-C(11)-C(12)-Ru(1)	52.1(5)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	-0.8(8)
Ru(1)-C(7)-C(12)-C(11)	54.0(4)
C(8)-C(7)-C(12)-C(13)	-178.2(5)
Ru(1)-C(7)-C(12)-C(13)	-123.4(5)
C(8)-C(7)-C(12)-Ru(1)	-54.8(5)
N(2)-Ru(1)-C(12)-C(11)	49.0(4)
C(8)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-101.6(4)
C(10)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-27.7(3)
C(7)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-130.3(5)
C(9)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-64.6(4)
S(1)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-143.8(3)
S(2)-Ru(1)-C(12)-C(11)	139.3(3)
N(2)-Ru(1)-C(12)-C(7)	179.2(3)
C(8)-Ru(1)-C(12)-C(7)	28.7(4)
C(10)-Ru(1)-C(12)-C(7)	102.5(4)
C(9)-Ru(1)-C(12)-C(7)	65.6(4)
C(11)-Ru(1)-C(12)-C(7)	130.3(5)
S(1)-Ru(1)-C(12)-C(7)	-13.5(6)

S(2)-Ru(1)-C(12)-C(7)	-90.4(3)
N(2)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-67.4(6)
C(8)-Ru(1)-C(12)-C(13)	142.1(6)
C(10)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-144.1(6)
C(7)-Ru(1)-C(12)-C(13)	113.4(7)
C(9)-Ru(1)-C(12)-C(13)	179.0(6)
C(11)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-116.4(7)
S(1)-Ru(1)-C(12)-C(13)	99.9(6)
S(2)-Ru(1)-C(12)-C(13)	23.0(6)
C(10)-C(9)-C(14)-C(15)	-100.3(7)
C(8)-C(9)-C(14)-C(15)	80.7(7)
Ru(1)-C(9)-C(14)-C(15)	169.3(5)
C(10)-C(9)-C(14)-C(16)	24.2(8)
C(8)-C(9)-C(14)-C(16)	-154.8(6)
Ru(1)-C(9)-C(14)-C(16)	-66.2(7)
C(23)-O(12)-C(20)-C(21)	0.9(6)
C(23)-O(12)-C(20)-N(10)	-178.8(5)
O(11)-N(10)-C(20)-O(12)	179.6(5)
O(10)-N(10)-C(20)-O(12)	0.6(7)
O(11)-N(10)-C(20)-C(21)	-0.1(9)
O(10)-N(10)-C(20)-C(21)	-179.1(6)
O(12)-C(20)-C(21)-C(22)	-0.8(7)
N(10)-C(20)-C(21)-C(22)	178.9(6)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	0.3(7)
C(21)-C(22)-C(23)-O(12)	0.2(7)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	-178.7(7)
C(20)-O(12)-C(23)-C(22)	-0.7(6)
C(20)-O(12)-C(23)-C(24)	178.6(5)
N(12)-N(11)-C(24)-C(23)	-2.2(8)
Ru(2)-N(11)-C(24)-C(23)	-179.9(4)
C(22)-C(23)-C(24)-N(11)	-2.2(12)
O(12)-C(23)-C(24)-N(11)	178.9(5)
N(11)-N(12)-C(25)-N(13)	-179.6(5)
N(11)-N(12)-C(25)-S(2)	0.1(7)
Ru(2)-S(2)-C(25)-N(12)	7.1(5)
Ru(1)-S(2)-C(25)-N(12)	-91.0(5)
Ru(2)-S(2)-C(25)-N(13)	-173.2(4)
Ru(1)-S(2)-C(25)-N(13)	88.6(5)

N(11)-Ru(2)-C(26)-C(31)	-69.6(4)
C(27)-Ru(2)-C(26)-C(31)	128.1(6)
C(28)-Ru(2)-C(26)-C(31)	100.2(4)
C(30)-Ru(2)-C(26)-C(31)	29.0(4)
C(29)-Ru(2)-C(26)-C(31)	64.8(4)
S(2)-Ru(2)-C(26)-C(31)	-152.0(4)
S(1)-Ru(2)-C(26)-C(31)	113.2(7)
N(11)-Ru(2)-C(26)-C(27)	162.3(4)
C(31)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-128.1(6)
C(28)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-27.9(4)
C(30)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-99.1(5)
C(29)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-63.4(4)
S(2)-Ru(2)-C(26)-C(27)	79.8(4)
S(1)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-14.9(10)
N(11)-Ru(2)-C(26)-C(32)	49.6(7)
C(27)-Ru(2)-C(26)-C(32)	-112.6(8)
C(31)-Ru(2)-C(26)-C(32)	119.2(8)
C(28)-Ru(2)-C(26)-C(32)	-140.5(7)
C(30)-Ru(2)-C(26)-C(32)	148.2(7)
C(29)-Ru(2)-C(26)-C(32)	-176.0(7)
S(2)-Ru(2)-C(26)-C(32)	-32.8(7)
S(1)-Ru(2)-C(26)-C(32)	-127.5(7)
C(31)-C(26)-C(27)-C(28)	1.4(9)
C(32)-C(26)-C(27)-C(28)	178.4(6)
Ru(2)-C(26)-C(27)-C(28)	56.3(6)
C(31)-C(26)-C(27)-Ru(2)	-54.9(5)
C(32)-C(26)-C(27)-Ru(2)	122.1(6)
N(11)-Ru(2)-C(27)-C(28)	-161.6(4)
C(31)-Ru(2)-C(27)-C(28)	-101.9(4)
C(26)-Ru(2)-C(27)-C(28)	-133.4(6)
C(30)-Ru(2)-C(27)-C(28)	-64.5(4)
C(29)-Ru(2)-C(27)-C(28)	-28.6(4)
S(2)-Ru(2)-C(27)-C(28)	123.7(4)
S(1)-Ru(2)-C(27)-C(28)	42.0(5)
N(11)-Ru(2)-C(27)-C(26)	-28.2(6)
C(31)-Ru(2)-C(27)-C(26)	31.5(4)
C(28)-Ru(2)-C(27)-C(26)	133.4(6)
C(30)-Ru(2)-C(27)-C(26)	68.9(4)

C(29)-Ru(2)-C(27)-C(26)	104.8(4)
S(2)-Ru(2)-C(27)-C(26)	-102.9(4)
S(1)-Ru(2)-C(27)-C(26)	175.4(3)
C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	0.9(10)
Ru(2)-C(27)-C(28)-C(29)	56.2(6)
C(26)-C(27)-C(28)-Ru(2)	-55.3(6)
N(11)-Ru(2)-C(28)-C(27)	89.0(14)
C(31)-Ru(2)-C(28)-C(27)	67.4(4)
C(26)-Ru(2)-C(28)-C(27)	29.3(4)
C(30)-Ru(2)-C(28)-C(27)	103.7(4)
C(29)-Ru(2)-C(28)-C(27)	132.0(6)
S(2)-Ru(2)-C(28)-C(27)	-61.8(4)
S(1)-Ru(2)-C(28)-C(27)	-147.5(4)
N(11)-Ru(2)-C(28)-C(29)	-43.0(15)
C(27)-Ru(2)-C(28)-C(29)	-132.0(6)
C(31)-Ru(2)-C(28)-C(29)	-64.6(4)
C(26)-Ru(2)-C(28)-C(29)	-102.7(5)
C(30)-Ru(2)-C(28)-C(29)	-28.2(4)
S(2)-Ru(2)-C(28)-C(29)	166.2(4)
S(1)-Ru(2)-C(28)-C(29)	80.6(4)
C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	-2.5(10)
Ru(2)-C(28)-C(29)-C(30)	51.2(5)
C(27)-C(28)-C(29)-C(33)	-179.8(6)
Ru(2)-C(28)-C(29)-C(33)	-126.1(6)
C(27)-C(28)-C(29)-Ru(2)	-53.7(6)
N(11)-Ru(2)-C(29)-C(28)	169.0(4)
C(27)-Ru(2)-C(29)-C(28)	29.3(4)
C(31)-Ru(2)-C(29)-C(28)	104.7(5)
C(26)-Ru(2)-C(29)-C(28)	67.3(4)
C(30)-Ru(2)-C(29)-C(28)	133.4(6)
S(2)-Ru(2)-C(29)-C(28)	-22.2(6)
S(1)-Ru(2)-C(29)-C(28)	-102.0(4)
N(11)-Ru(2)-C(29)-C(30)	35.6(5)
C(27)-Ru(2)-C(29)-C(30)	-104.1(4)
C(31)-Ru(2)-C(29)-C(30)	-28.7(4)
C(26)-Ru(2)-C(29)-C(30)	-66.1(4)
C(28)-Ru(2)-C(29)-C(30)	-133.4(6)
S(2)-Ru(2)-C(29)-C(30)	-155.6(3)



S(1)-Ru(2)-C(29)-C(30)	124.6(4)
N(11)-Ru(2)-C(29)-C(33)	-78.9(8)
C(27)-Ru(2)-C(29)-C(33)	141.4(8)
C(31)-Ru(2)-C(29)-C(33)	-143.2(8)
C(26)-Ru(2)-C(29)-C(33)	179.4(8)
C(28)-Ru(2)-C(29)-C(33)	112.0(9)
C(30)-Ru(2)-C(29)-C(33)	-114.6(9)
S(2)-Ru(2)-C(29)-C(33)	89.8(8)
S(1)-Ru(2)-C(29)-C(33)	10.1(7)
C(28)-C(29)-C(30)-C(31)	1.7(9)
C(33)-C(29)-C(30)-C(31)	179.0(6)
Ru(2)-C(29)-C(30)-C(31)	52.9(5)
C(28)-C(29)-C(30)-Ru(2)	-51.2(5)
C(33)-C(29)-C(30)-Ru(2)	126.1(6)
N(11)-Ru(2)-C(30)-C(31)	71.7(4)
C(27)-Ru(2)-C(30)-C(31)	-68.9(4)
C(26)-Ru(2)-C(30)-C(31)	-29.7(4)
C(28)-Ru(2)-C(30)-C(31)	-105.3(4)
C(29)-Ru(2)-C(30)-C(31)	-133.2(6)
S(2)-Ru(2)-C(30)-C(31)	-33.8(9)
S(1)-Ru(2)-C(30)-C(31)	165.6(3)
N(11)-Ru(2)-C(30)-C(29)	-155.1(4)
C(27)-Ru(2)-C(30)-C(29)	64.3(4)
C(31)-Ru(2)-C(30)-C(29)	133.2(6)
C(26)-Ru(2)-C(30)-C(29)	103.5(5)
C(28)-Ru(2)-C(30)-C(29)	27.9(4)
S(2)-Ru(2)-C(30)-C(29)	99.4(8)
S(1)-Ru(2)-C(30)-C(29)	-61.2(4)
C(29)-C(30)-C(31)-C(26)	0.7(9)
Ru(2)-C(30)-C(31)-C(26)	55.7(5)
C(29)-C(30)-C(31)-Ru(2)	-55.0(5)
C(27)-C(26)-C(31)-C(30)	-2.1(8)
C(32)-C(26)-C(31)-C(30)	-178.9(6)
Ru(2)-C(26)-C(31)-C(30)	-56.5(5)
C(27)-C(26)-C(31)-Ru(2)	54.3(5)
C(32)-C(26)-C(31)-Ru(2)	-122.4(7)
N(11)-Ru(2)-C(31)-C(30)	-112.6(4)
C(27)-Ru(2)-C(31)-C(30)	99.9(4)

C(26)-Ru(2)-C(31)-C(30)	132.0(6)
C(28)-Ru(2)-C(31)-C(30)	63.2(4)
C(29)-Ru(2)-C(31)-C(30)	28.0(4)
S(2)-Ru(2)-C(31)-C(30)	169.6(3)
S(1)-Ru(2)-C(31)-C(30)	-24.2(5)
N(11)-Ru(2)-C(31)-C(26)	115.4(4)
C(27)-Ru(2)-C(31)-C(26)	-32.1(4)
C(28)-Ru(2)-C(31)-C(26)	-68.8(4)
C(30)-Ru(2)-C(31)-C(26)	-132.0(6)
C(29)-Ru(2)-C(31)-C(26)	-104.0(4)
S(2)-Ru(2)-C(31)-C(26)	37.5(5)
S(1)-Ru(2)-C(31)-C(26)	-156.2(3)
C(31)-C(26)-C(32)-C(34)	12.5(10)
C(27)-C(26)-C(32)-C(34)	-164.1(7)
Ru(2)-C(26)-C(32)-C(34)	-78.3(9)
C(31)-C(26)-C(32)-C(35)	-113.8(8)
C(27)-C(26)-C(32)-C(35)	69.5(8)
Ru(2)-C(26)-C(32)-C(35)	155.4(6)
C(43)-O(22)-C(40)-C(41)	0.3(6)
C(43)-O(22)-C(40)-N(20)	179.6(5)
O(21)-N(20)-C(40)-O(22)	-2.7(7)
O(20)-N(20)-C(40)-O(22)	177.5(5)
O(21)-N(20)-C(40)-C(41)	176.5(6)
O(20)-N(20)-C(40)-C(41)	-3.3(9)
O(22)-C(40)-C(41)-C(42)	0.3(7)
N(20)-C(40)-C(41)-C(42)	-179.0(6)
C(40)-C(41)-C(42)-C(43)	-0.7(7)
C(41)-C(42)-C(43)-O(22)	0.9(7)
C(41)-C(42)-C(43)-C(44)	178.8(7)
C(40)-O(22)-C(43)-C(42)	-0.7(6)
C(40)-O(22)-C(43)-C(44)	-179.2(5)
N(22)-N(21)-C(44)-C(43)	2.5(8)
Ru(3)-N(21)-C(44)-C(43)	-178.9(4)
C(42)-C(43)-C(44)-N(21)	7.9(12)
O(22)-C(43)-C(44)-N(21)	-174.3(5)
N(21)-N(22)-C(45)-N(23)	179.1(5)
N(21)-N(22)-C(45)-S(3)	-0.9(7)
Ru(3)-S(3)-C(45)-N(22)	-7.8(5)

Ru(4)-S(3)-C(45)-N(22)	91.9(5)
Ru(3)-S(3)-C(45)-N(23)	172.2(4)
Ru(4)-S(3)-C(45)-N(23)	-88.1(4)
N(21)-Ru(3)-C(46)-C(47)	-37.4(5)
C(48)-Ru(3)-C(46)-C(47)	29.0(4)
C(50)-Ru(3)-C(46)-C(47)	102.5(4)
C(51)-Ru(3)-C(46)-C(47)	131.2(5)
C(49)-Ru(3)-C(46)-C(47)	65.5(4)
S(3)-Ru(3)-C(46)-C(47)	159.9(3)
S(4)-Ru(3)-C(46)-C(47)	-124.9(4)
N(21)-Ru(3)-C(46)-C(51)	-168.5(3)
C(48)-Ru(3)-C(46)-C(51)	-102.1(4)
C(50)-Ru(3)-C(46)-C(51)	-28.7(4)
C(49)-Ru(3)-C(46)-C(51)	-65.7(4)
C(47)-Ru(3)-C(46)-C(51)	-131.2(5)
S(3)-Ru(3)-C(46)-C(51)	28.8(5)
S(4)-Ru(3)-C(46)-C(51)	103.9(3)
N(21)-Ru(3)-C(46)-C(52)	78.1(7)
C(48)-Ru(3)-C(46)-C(52)	144.5(7)
C(50)-Ru(3)-C(46)-C(52)	-142.1(7)
C(51)-Ru(3)-C(46)-C(52)	-113.4(8)
C(49)-Ru(3)-C(46)-C(52)	-179.1(7)
C(47)-Ru(3)-C(46)-C(52)	115.4(8)
S(3)-Ru(3)-C(46)-C(52)	-84.6(7)
S(4)-Ru(3)-C(46)-C(52)	-9.5(6)
C(51)-C(46)-C(47)-C(48)	-1.0(8)
C(52)-C(46)-C(47)-C(48)	-179.8(6)
Ru(3)-C(46)-C(47)-C(48)	-53.4(5)
C(51)-C(46)-C(47)-Ru(3)	52.4(5)
C(52)-C(46)-C(47)-Ru(3)	-126.3(6)
N(21)-Ru(3)-C(47)-C(48)	-73.8(4)
C(50)-Ru(3)-C(47)-C(48)	66.1(4)
C(51)-Ru(3)-C(47)-C(48)	102.5(4)
C(49)-Ru(3)-C(47)-C(48)	28.4(4)
C(46)-Ru(3)-C(47)-C(48)	132.3(6)
S(3)-Ru(3)-C(47)-C(48)	36.0(10)
S(4)-Ru(3)-C(47)-C(48)	-167.9(3)
N(21)-Ru(3)-C(47)-C(46)	153.9(4)

C(48)-Ru(3)-C(47)-C(46)	-132.3(6)
C(50)-Ru(3)-C(47)-C(46)	-66.2(4)
C(51)-Ru(3)-C(47)-C(46)	-29.8(4)
C(49)-Ru(3)-C(47)-C(46)	-103.9(4)
S(3)-Ru(3)-C(47)-C(46)	-96.3(8)
S(4)-Ru(3)-C(47)-C(46)	59.8(4)
C(46)-C(47)-C(48)-C(49)	-1.1(9)
Ru(3)-C(47)-C(48)-C(49)	-56.2(5)
C(46)-C(47)-C(48)-Ru(3)	55.1(5)
N(21)-Ru(3)-C(48)-C(47)	111.1(4)
C(50)-Ru(3)-C(48)-C(47)	-102.3(4)
C(51)-Ru(3)-C(48)-C(47)	-65.7(4)
C(49)-Ru(3)-C(48)-C(47)	-133.5(6)
C(46)-Ru(3)-C(48)-C(47)	-28.7(4)
S(3)-Ru(3)-C(48)-C(47)	-170.4(3)
S(4)-Ru(3)-C(48)-C(47)	19.8(5)
N(21)-Ru(3)-C(48)-C(49)	-115.4(4)
C(50)-Ru(3)-C(48)-C(49)	31.2(4)
C(51)-Ru(3)-C(48)-C(49)	67.8(4)
C(47)-Ru(3)-C(48)-C(49)	133.5(6)
C(46)-Ru(3)-C(48)-C(49)	104.9(4)
S(3)-Ru(3)-C(48)-C(49)	-36.9(5)
S(4)-Ru(3)-C(48)-C(49)	153.4(3)
C(47)-C(48)-C(49)-C(50)	2.4(9)
Ru(3)-C(48)-C(49)-C(50)	-53.9(5)
C(47)-C(48)-C(49)-C(53)	-175.4(6)
Ru(3)-C(48)-C(49)-C(53)	128.3(6)
C(47)-C(48)-C(49)-Ru(3)	56.3(5)
N(21)-Ru(3)-C(49)-C(48)	70.3(4)
C(50)-Ru(3)-C(49)-C(48)	-128.9(6)
C(51)-Ru(3)-C(49)-C(48)	-100.6(4)
C(47)-Ru(3)-C(49)-C(48)	-28.2(4)
C(46)-Ru(3)-C(49)-C(48)	-64.0(4)
S(3)-Ru(3)-C(49)-C(48)	153.4(4)
S(4)-Ru(3)-C(49)-C(48)	-105.4(6)
N(21)-Ru(3)-C(49)-C(50)	-160.8(4)
C(48)-Ru(3)-C(49)-C(50)	128.9(6)
C(51)-Ru(3)-C(49)-C(50)	28.3(4)

C(47)-Ru(3)-C(49)-C(50)	100.7(4)
C(46)-Ru(3)-C(49)-C(50)	64.9(4)
S(3)-Ru(3)-C(49)-C(50)	-77.7(4)
S(4)-Ru(3)-C(49)-C(50)	23.5(8)
N(21)-Ru(3)-C(49)-C(53)	-45.0(6)
C(48)-Ru(3)-C(49)-C(53)	-115.3(7)
C(50)-Ru(3)-C(49)-C(53)	115.8(7)
C(51)-Ru(3)-C(49)-C(53)	144.1(6)
C(47)-Ru(3)-C(49)-C(53)	-143.4(6)
C(46)-Ru(3)-C(49)-C(53)	-179.3(6)
S(3)-Ru(3)-C(49)-C(53)	38.2(6)
S(4)-Ru(3)-C(49)-C(53)	139.3(5)
C(48)-C(49)-C(50)-C(51)	-1.6(9)
C(53)-C(49)-C(50)-C(51)	176.2(6)
Ru(3)-C(49)-C(50)-C(51)	-55.5(5)
C(48)-C(49)-C(50)-Ru(3)	53.9(5)
C(53)-C(49)-C(50)-Ru(3)	-128.3(6)
N(21)-Ru(3)-C(50)-C(51)	162.9(3)
C(48)-Ru(3)-C(50)-C(51)	102.1(4)
C(49)-Ru(3)-C(50)-C(51)	132.9(6)
C(47)-Ru(3)-C(50)-C(51)	65.3(4)
C(46)-Ru(3)-C(50)-C(51)	29.0(4)
S(3)-Ru(3)-C(50)-C(51)	-120.7(4)
S(4)-Ru(3)-C(50)-C(51)	-39.2(4)
N(21)-Ru(3)-C(50)-C(49)	30.0(6)
C(48)-Ru(3)-C(50)-C(49)	-30.9(4)
C(51)-Ru(3)-C(50)-C(49)	-132.9(6)
C(47)-Ru(3)-C(50)-C(49)	-67.7(4)
C(46)-Ru(3)-C(50)-C(49)	-104.0(4)
S(3)-Ru(3)-C(50)-C(49)	106.4(4)
S(4)-Ru(3)-C(50)-C(49)	-172.1(3)
C(49)-C(50)-C(51)-C(46)	-0.4(9)
Ru(3)-C(50)-C(51)-C(46)	-56.0(5)
C(49)-C(50)-C(51)-Ru(3)	55.6(5)
C(47)-C(46)-C(51)-C(50)	1.7(9)
C(52)-C(46)-C(51)-C(50)	-179.5(6)
Ru(3)-C(46)-C(51)-C(50)	54.6(5)
C(47)-C(46)-C(51)-Ru(3)	-52.9(5)

C(52)-C(46)-C(51)-Ru(3)	125.8(6)
N(21)-Ru(3)-C(51)-C(50)	-83.8(13)
C(48)-Ru(3)-C(51)-C(50)	-66.4(4)
C(49)-Ru(3)-C(51)-C(50)	-29.0(4)
C(47)-Ru(3)-C(51)-C(50)	-103.2(4)
C(46)-Ru(3)-C(51)-C(50)	-132.5(5)
S(3)-Ru(3)-C(51)-C(50)	65.3(4)
S(4)-Ru(3)-C(51)-C(50)	149.7(4)
N(21)-Ru(3)-C(51)-C(46)	48.7(14)
C(48)-Ru(3)-C(51)-C(46)	66.1(4)
C(50)-Ru(3)-C(51)-C(46)	132.5(5)
C(49)-Ru(3)-C(51)-C(46)	103.5(4)
C(47)-Ru(3)-C(51)-C(46)	29.3(3)
S(3)-Ru(3)-C(51)-C(46)	-162.3(3)
S(4)-Ru(3)-C(51)-C(46)	-77.8(3)
C(48)-C(49)-C(53)-C(55)	-162.9(7)
C(50)-C(49)-C(53)-C(55)	19.4(10)
Ru(3)-C(49)-C(53)-C(55)	-72.0(9)
C(48)-C(49)-C(53)-C(54)	-33.4(9)
C(50)-C(49)-C(53)-C(54)	148.9(7)
Ru(3)-C(49)-C(53)-C(54)	57.5(9)
C(63)-O(32)-C(60)-C(61)	1.0(7)
C(63)-O(32)-C(60)-N(30)	-178.3(5)
O(30)-N(30)-C(60)-C(61)	-11.6(10)
O(31)-N(30)-C(60)-C(61)	168.2(7)
O(30)-N(30)-C(60)-O(32)	167.6(5)
O(31)-N(30)-C(60)-O(32)	-12.6(8)
O(32)-C(60)-C(61)-C(62)	-0.5(8)
N(30)-C(60)-C(61)-C(62)	178.7(6)
C(60)-C(61)-C(62)-C(63)	-0.3(7)
C(61)-C(62)-C(63)-O(32)	0.9(7)
C(61)-C(62)-C(63)-C(64)	-176.9(7)
C(60)-O(32)-C(63)-C(62)	-1.1(6)
C(60)-O(32)-C(63)-C(64)	177.2(5)
N(32)-N(31)-C(64)-C(63)	-0.5(8)
Ru(4)-N(31)-C(64)-C(63)	175.2(5)
C(62)-C(63)-C(64)-N(31)	4.2(12)
O(32)-C(63)-C(64)-N(31)	-173.5(5)

N(31)-N(32)-C(65)-N(33)	-178.9(5)
N(31)-N(32)-C(65)-S(4)	-1.1(7)
Ru(4)-S(4)-C(65)-N(32)	-6.5(5)
Ru(3)-S(4)-C(65)-N(32)	93.0(5)
Ru(4)-S(4)-C(65)-N(33)	171.4(4)
Ru(3)-S(4)-C(65)-N(33)	-89.2(5)
N(31)-Ru(4)-C(66)-C(67)	-147.5(4)
C(68)-Ru(4)-C(66)-C(67)	-29.3(3)
C(70)-Ru(4)-C(66)-C(67)	-102.7(4)
C(69)-Ru(4)-C(66)-C(67)	-66.0(3)
C(71)-Ru(4)-C(66)-C(67)	-131.2(5)
S(4)-Ru(4)-C(66)-C(67)	44.6(4)
S(3)-Ru(4)-C(66)-C(67)	123.9(3)
N(31)-Ru(4)-C(66)-C(71)	-16.3(6)
C(68)-Ru(4)-C(66)-C(71)	101.9(4)
C(67)-Ru(4)-C(66)-C(71)	131.2(5)
C(70)-Ru(4)-C(66)-C(71)	28.6(3)
C(69)-Ru(4)-C(66)-C(71)	65.2(4)
S(4)-Ru(4)-C(66)-C(71)	175.9(3)
S(3)-Ru(4)-C(66)-C(71)	-104.9(3)
N(31)-Ru(4)-C(66)-C(72)	97.7(7)
C(68)-Ru(4)-C(66)-C(72)	-144.1(6)
C(67)-Ru(4)-C(66)-C(72)	-114.8(7)
C(70)-Ru(4)-C(66)-C(72)	142.5(6)
C(69)-Ru(4)-C(66)-C(72)	179.2(6)
C(71)-Ru(4)-C(66)-C(72)	114.0(7)
S(4)-Ru(4)-C(66)-C(72)	-70.2(6)
S(3)-Ru(4)-C(66)-C(72)	9.1(6)
C(71)-C(66)-C(67)-C(68)	-0.6(8)
C(72)-C(66)-C(67)-C(68)	176.8(5)
Ru(4)-C(66)-C(67)-C(68)	53.5(5)
C(71)-C(66)-C(67)-Ru(4)	-54.1(4)
C(72)-C(66)-C(67)-Ru(4)	123.3(5)
N(31)-Ru(4)-C(67)-C(66)	133.6(6)
C(68)-Ru(4)-C(67)-C(66)	132.7(5)
C(70)-Ru(4)-C(67)-C(66)	66.0(3)
C(69)-Ru(4)-C(67)-C(66)	103.9(4)
C(71)-Ru(4)-C(67)-C(66)	29.8(3)

S(4)-Ru(4)-C(67)-C(66)	-144.6(3)
S(3)-Ru(4)-C(67)-C(66)	-60.6(3)
N(31)-Ru(4)-C(67)-C(68)	0.8(8)
C(70)-Ru(4)-C(67)-C(68)	-66.7(4)
C(69)-Ru(4)-C(67)-C(68)	-28.8(3)
C(71)-Ru(4)-C(67)-C(68)	-102.9(4)
C(66)-Ru(4)-C(67)-C(68)	-132.7(5)
S(4)-Ru(4)-C(67)-C(68)	82.7(3)
S(3)-Ru(4)-C(67)-C(68)	166.7(3)
C(66)-C(67)-C(68)-C(69)	0.4(8)
Ru(4)-C(67)-C(68)-C(69)	55.1(5)
C(66)-C(67)-C(68)-Ru(4)	-54.7(5)
N(31)-Ru(4)-C(68)-C(69)	47.6(4)
C(67)-Ru(4)-C(68)-C(69)	-132.8(5)
C(70)-Ru(4)-C(68)-C(69)	-31.3(3)
C(71)-Ru(4)-C(68)-C(69)	-67.3(4)
C(66)-Ru(4)-C(68)-C(69)	-104.4(4)
S(4)-Ru(4)-C(68)-C(69)	127.5(3)
S(3)-Ru(4)-C(68)-C(69)	-154.7(3)
N(31)-Ru(4)-C(68)-C(67)	-179.7(3)
C(70)-Ru(4)-C(68)-C(67)	101.5(4)
C(69)-Ru(4)-C(68)-C(67)	132.8(5)
C(71)-Ru(4)-C(68)-C(67)	65.5(3)
C(66)-Ru(4)-C(68)-C(67)	28.3(3)
S(4)-Ru(4)-C(68)-C(67)	-99.8(3)
S(3)-Ru(4)-C(68)-C(67)	-22.0(5)
C(67)-C(68)-C(69)-C(70)	0.5(8)
Ru(4)-C(68)-C(69)-C(70)	55.3(4)
C(67)-C(68)-C(69)-C(73)	-175.8(5)
Ru(4)-C(68)-C(69)-C(73)	-121.0(5)
C(67)-C(68)-C(69)-Ru(4)	-54.8(5)
N(31)-Ru(4)-C(69)-C(68)	-141.4(3)
C(67)-Ru(4)-C(69)-C(68)	29.1(3)
C(70)-Ru(4)-C(69)-C(68)	128.7(5)
C(71)-Ru(4)-C(69)-C(68)	101.5(4)
C(66)-Ru(4)-C(69)-C(68)	65.0(4)
S(4)-Ru(4)-C(69)-C(68)	-59.1(3)
S(3)-Ru(4)-C(69)-C(68)	106.6(6)



N(31)-Ru(4)-C(69)-C(70)	89.9(4)
C(68)-Ru(4)-C(69)-C(70)	-128.7(5)
C(67)-Ru(4)-C(69)-C(70)	-99.6(4)
C(71)-Ru(4)-C(69)-C(70)	-27.2(3)
C(66)-Ru(4)-C(69)-C(70)	-63.7(4)
S(4)-Ru(4)-C(69)-C(70)	172.2(3)
S(3)-Ru(4)-C(69)-C(70)	-22.1(8)
N(31)-Ru(4)-C(69)-C(73)	-23.7(5)
C(68)-Ru(4)-C(69)-C(73)	117.7(7)
C(67)-Ru(4)-C(69)-C(73)	146.8(6)
C(70)-Ru(4)-C(69)-C(73)	-113.6(7)
C(71)-Ru(4)-C(69)-C(73)	-140.8(6)
C(66)-Ru(4)-C(69)-C(73)	-177.3(6)
S(4)-Ru(4)-C(69)-C(73)	58.6(5)
S(3)-Ru(4)-C(69)-C(73)	-135.7(5)
C(68)-C(69)-C(70)-C(71)	-1.4(8)
C(73)-C(69)-C(70)-C(71)	175.1(5)
Ru(4)-C(69)-C(70)-C(71)	53.5(5)
C(68)-C(69)-C(70)-Ru(4)	-54.9(4)
C(73)-C(69)-C(70)-Ru(4)	121.6(5)
N(31)-Ru(4)-C(70)-C(71)	132.4(4)
C(68)-Ru(4)-C(70)-C(71)	-103.5(4)
C(67)-Ru(4)-C(70)-C(71)	-65.6(4)
C(69)-Ru(4)-C(70)-C(71)	-134.7(6)
C(66)-Ru(4)-C(70)-C(71)	-29.2(4)
S(4)-Ru(4)-C(70)-C(71)	-148.9(3)
S(3)-Ru(4)-C(70)-C(71)	38.1(4)
N(31)-Ru(4)-C(70)-C(69)	-92.9(3)
C(68)-Ru(4)-C(70)-C(69)	31.2(3)
C(67)-Ru(4)-C(70)-C(69)	69.1(4)
C(71)-Ru(4)-C(70)-C(69)	134.7(6)
C(66)-Ru(4)-C(70)-C(69)	105.5(4)
S(4)-Ru(4)-C(70)-C(69)	-14.2(5)
S(3)-Ru(4)-C(70)-C(69)	172.8(3)
C(69)-C(70)-C(71)-C(66)	1.3(8)
Ru(4)-C(70)-C(71)-C(66)	54.4(5)
C(69)-C(70)-C(71)-Ru(4)	-53.2(5)
C(67)-C(66)-C(71)-C(70)	-0.2(8)

C(72)-C(66)-C(71)-C(70)	-177.7(5)
Ru(4)-C(66)-C(71)-C(70)	-54.2(5)
C(67)-C(66)-C(71)-Ru(4)	53.9(5)
C(72)-C(66)-C(71)-Ru(4)	-123.5(5)
N(31)-Ru(4)-C(71)-C(70)	-55.7(4)
C(68)-Ru(4)-C(71)-C(70)	65.4(4)
C(67)-Ru(4)-C(71)-C(70)	103.1(4)
C(69)-Ru(4)-C(71)-C(70)	28.0(4)
C(66)-Ru(4)-C(71)-C(70)	132.4(5)
S(4)-Ru(4)-C(71)-C(70)	121.3(5)
S(3)-Ru(4)-C(71)-C(70)	-150.7(4)
N(31)-Ru(4)-C(71)-C(66)	171.9(3)
C(68)-Ru(4)-C(71)-C(66)	-67.0(4)
C(67)-Ru(4)-C(71)-C(66)	-29.3(3)
C(70)-Ru(4)-C(71)-C(66)	-132.4(5)
C(69)-Ru(4)-C(71)-C(66)	-104.4(4)
S(4)-Ru(4)-C(71)-C(66)	-11.1(7)
S(3)-Ru(4)-C(71)-C(66)	76.9(3)
C(68)-C(69)-C(73)-C(74)	24.5(8)
C(70)-C(69)-C(73)-C(74)	-151.7(5)
Ru(4)-C(69)-C(73)-C(74)	-64.3(7)
C(68)-C(69)-C(73)-C(75)	-100.4(6)
C(70)-C(69)-C(73)-C(75)	83.4(7)
Ru(4)-C(69)-C(73)-C(75)	170.7(4)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Tabla 2: Datos cristalográficos para RuL2

Empirical formula	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> Ru <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Formula weight	1027.94	
Temperature	125(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	C2/c	
Unit cell dimensions	a = 20.9221(12) Å	α = 90°.
	b = 12.2472(7) Å	β =
	c = 17.0856(10) Å	108.2540(10)°.
		γ = 90°.
Volume	4157.7(4) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.642 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	1.013 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	2080	
Crystal size	0.29 x 0.25 x 0.24 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.95 to 28.70°.	
Index ranges	-28 ≤ h ≤ 28, -16 ≤ k ≤ 16, -	
	23 ≤ l ≤ 22	
Reflections collected	20103	
Independent reflections	5375 [R(int) = 0.0244]	
Completeness to theta = 28.70°	99.8 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.794 and 0.743	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	5375 / 0 / 257	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.108	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0373, wR2 = 0.0956	
R indices (all data)	R1 = 0.0471, wR2 = 0.1042	
Largest diff. peak and hole	2.346 and -0.897 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL2.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ru(1)	853(1)	892(1)	3117(1)	14(1)
S(1)	-250(1)	1027(1)	3292(1)	15(1)
O(1)	-1448(1)	4857(2)	657(1)	21(1)
O(3)	-1969(2)	6117(2)	-605(2)	36(1)
O(4)	-1738(2)	7585(2)	156(2)	39(1)
N(1)	-226(1)	2837(2)	4171(2)	23(1)
N(2)	-688(1)	3086(2)	2784(1)	19(1)
N(3)	-886(1)	2582(2)	2024(1)	16(1)
N(4)	-1734(2)	6593(2)	57(2)	28(1)
C(1)	958(2)	-793(2)	3606(2)	18(1)
C(2)	1210(2)	-741(2)	2934(2)	18(1)
C(3)	1719(2)	27(2)	2912(2)	20(1)
C(4)	1952(2)	748(2)	3583(2)	23(1)
C(5)	1705(2)	687(3)	4274(2)	24(1)
C(6)	1212(2)	-74(2)	4295(2)	22(1)
C(13)	-409(1)	2439(2)	3403(2)	18(1)
C(14)	-339(2)	3979(3)	4325(2)	29(1)
C(15)	-1109(2)	3235(2)	1396(2)	18(1)
C(16)	-1136(2)	4407(2)	1430(2)	19(1)
C(17)	-935(2)	5225(2)	2002(2)	21(1)
C(18)	-1124(2)	6223(3)	1571(2)	25(1)
C(19)	-1430(2)	5948(2)	776(2)	22(1)
C(27)	923(2)	-143(3)	4993(2)	32(1)
C(28)	1952(2)	42(3)	2159(2)	27(1)
C(29)	2248(2)	1132(4)	2020(3)	44(1)
C(30)	2436(2)	-909(4)	2207(3)	41(1)
Cl(1)	407(1)	7608(1)	1126(1)	34(1)
O(7)	3348(1)	2009(2)	4391(2)	39(1)

Table 3. Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for RuL2.

---

Ru(1)-N(3)#1	2.088(2)
Ru(1)-C(2)	2.190(3)
Ru(1)-C(4)	2.193(3)
Ru(1)-C(1)	2.211(3)
Ru(1)-C(3)	2.219(3)
Ru(1)-C(5)	2.224(3)
Ru(1)-C(6)	2.251(3)
Ru(1)-S(1)#1	2.3475(7)
Ru(1)-S(1)	2.4236(7)
S(1)-C(13)	1.783(3)
S(1)-Ru(1)#1	2.3475(7)
O(1)-C(19)	1.351(3)
O(1)-C(16)	1.391(3)
O(3)-N(4)	1.230(4)
O(4)-N(4)	1.227(4)
N(1)-C(13)	1.338(4)
N(1)-C(14)	1.456(4)
N(2)-C(13)	1.304(4)
N(2)-N(3)	1.379(3)
N(2)-H(2A)	0.8592
N(3)-C(15)	1.301(4)
N(3)-Ru(1)#1	2.088(2)
N(4)-C(19)	1.431(4)
C(1)-C(2)	1.406(4)
C(1)-C(6)	1.432(4)
C(1)-H(1)	0.9288
C(2)-C(3)	1.431(4)
C(2)-H(2)	0.9295
C(3)-C(4)	1.407(4)
C(3)-C(28)	1.513(4)
C(4)-C(5)	1.432(5)
C(4)-H(4)	0.9299
C(5)-C(6)	1.399(5)
C(5)-H(5)	0.9297
C(6)-C(27)	1.499(4)
C(14)-H(14A)	0.9600

C(14)-H(14B)	0.9600
C(14)-H(14C)	0.9600
C(15)-C(16)	1.438(4)
C(15)-H(15)	0.9300
C(16)-C(17)	1.371(4)
C(17)-C(18)	1.417(4)
C(17)-H(17)	0.9300
C(18)-C(19)	1.350(4)
C(18)-H(18)	0.9300
C(27)-H(27A)	0.9600
C(27)-H(27B)	0.9600
C(27)-H(27C)	0.9600
C(28)-C(29)	1.522(5)
C(28)-C(30)	1.529(5)
C(28)-H(28)	0.9800
C(29)-H(29A)	0.9600
C(29)-H(29B)	0.9600
C(29)-H(29C)	0.9600
C(30)-H(30A)	0.9600
C(30)-H(30B)	0.9600
C(30)-H(30C)	0.9600
N(3)#1-Ru(1)-C(2)	149.70(10)
N(3)#1-Ru(1)-C(4)	92.98(10)
C(2)-Ru(1)-C(4)	67.22(11)
N(3)#1-Ru(1)-C(1)	164.98(10)
C(2)-Ru(1)-C(1)	37.25(10)
C(4)-Ru(1)-C(1)	79.57(11)
N(3)#1-Ru(1)-C(3)	113.34(10)
C(2)-Ru(1)-C(3)	37.86(11)
C(4)-Ru(1)-C(3)	37.18(11)
C(1)-Ru(1)-C(3)	67.96(11)
N(3)#1-Ru(1)-C(5)	99.65(10)
C(2)-Ru(1)-C(5)	79.01(11)
C(4)-Ru(1)-C(5)	37.83(12)
C(1)-Ru(1)-C(5)	66.51(11)
C(3)-Ru(1)-C(5)	67.60(11)
N(3)#1-Ru(1)-C(6)	127.60(10)

C(2)-Ru(1)-C(6)	67.31(10)
C(4)-Ru(1)-C(6)	67.34(12)
C(1)-Ru(1)-C(6)	37.41(11)
C(3)-Ru(1)-C(6)	80.19(11)
C(5)-Ru(1)-C(6)	36.44(12)
N(3)#1-Ru(1)-S(1)#1	80.73(6)
C(2)-Ru(1)-S(1)#1	90.90(8)
C(4)-Ru(1)-S(1)#1	122.90(9)
C(1)-Ru(1)-S(1)#1	114.28(8)
C(3)-Ru(1)-S(1)#1	94.29(7)
C(5)-Ru(1)-S(1)#1	160.63(9)
C(6)-Ru(1)-S(1)#1	151.10(8)
N(3)#1-Ru(1)-S(1)	90.83(7)
C(2)-Ru(1)-S(1)	117.38(8)
C(4)-Ru(1)-S(1)	153.08(9)
C(1)-Ru(1)-S(1)	90.15(8)
C(3)-Ru(1)-S(1)	155.23(8)
C(5)-Ru(1)-S(1)	115.30(9)
C(6)-Ru(1)-S(1)	89.40(8)
S(1)#1-Ru(1)-S(1)	84.01(2)
C(13)-S(1)-Ru(1)#1	96.85(9)
C(13)-S(1)-Ru(1)	107.21(10)
Ru(1)#1-S(1)-Ru(1)	95.44(2)
C(19)-O(1)-C(16)	105.4(2)
C(13)-N(1)-C(14)	121.0(3)
C(13)-N(2)-N(3)	114.8(2)
C(13)-N(2)-H(2A)	122.6
N(3)-N(2)-H(2A)	122.6
C(15)-N(3)-N(2)	115.2(2)
C(15)-N(3)-Ru(1)#1	122.03(19)
N(2)-N(3)-Ru(1)#1	122.73(17)
O(4)-N(4)-O(3)	125.2(3)
O(4)-N(4)-C(19)	116.7(3)
O(3)-N(4)-C(19)	118.1(3)
C(2)-C(1)-C(6)	120.4(3)
C(2)-C(1)-Ru(1)	70.58(15)
C(6)-C(1)-Ru(1)	72.82(16)
C(2)-C(1)-H(1)	119.8

C(6)-C(1)-H(1)	119.8
Ru(1)-C(1)-H(1)	129.2
C(1)-C(2)-C(3)	121.6(3)
C(1)-C(2)-Ru(1)	72.17(16)
C(3)-C(2)-Ru(1)	72.16(16)
C(1)-C(2)-H(2)	119.3
C(3)-C(2)-H(2)	119.1
Ru(1)-C(2)-H(2)	128.9
C(4)-C(3)-C(2)	117.5(3)
C(4)-C(3)-C(28)	124.3(3)
C(2)-C(3)-C(28)	118.1(3)
C(4)-C(3)-Ru(1)	70.41(17)
C(2)-C(3)-Ru(1)	69.98(16)
C(28)-C(3)-Ru(1)	128.7(2)
C(3)-C(4)-C(5)	121.1(3)
C(3)-C(4)-Ru(1)	72.41(17)
C(5)-C(4)-Ru(1)	72.25(18)
C(3)-C(4)-H(4)	119.5
C(5)-C(4)-H(4)	119.4
Ru(1)-C(4)-H(4)	127.9
C(6)-C(5)-C(4)	121.0(3)
C(6)-C(5)-Ru(1)	72.84(17)
C(4)-C(5)-Ru(1)	69.92(16)
C(6)-C(5)-H(5)	119.6
C(4)-C(5)-H(5)	119.4
Ru(1)-C(5)-H(5)	130.7
C(5)-C(6)-C(1)	118.4(3)
C(5)-C(6)-C(27)	122.8(3)
C(1)-C(6)-C(27)	118.8(3)
C(5)-C(6)-Ru(1)	70.72(17)
C(1)-C(6)-Ru(1)	69.77(15)
C(27)-C(6)-Ru(1)	129.5(2)
N(2)-C(13)-N(1)	119.5(3)
N(2)-C(13)-S(1)	123.6(2)
N(1)-C(13)-S(1)	116.9(2)
N(1)-C(14)-H(14A)	109.5
N(1)-C(14)-H(14B)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14B)	109.5



N(1)-C(14)-H(14C)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14C)	109.5
H(14B)-C(14)-H(14C)	109.5
N(3)-C(15)-C(16)	126.0(3)
N(3)-C(15)-H(15)	117.0
C(16)-C(15)-H(15)	117.0
C(17)-C(16)-O(1)	109.6(2)
C(17)-C(16)-C(15)	138.7(3)
O(1)-C(16)-C(15)	111.7(2)
C(16)-C(17)-C(18)	106.7(3)
C(16)-C(17)-H(17)	126.6
C(18)-C(17)-H(17)	126.6
C(19)-C(18)-C(17)	105.9(3)
C(19)-C(18)-H(18)	127.1
C(17)-C(18)-H(18)	127.1
C(18)-C(19)-O(1)	112.4(3)
C(18)-C(19)-N(4)	132.0(3)
O(1)-C(19)-N(4)	115.6(3)
C(6)-C(27)-H(27A)	109.5
C(6)-C(27)-H(27B)	109.5
H(27A)-C(27)-H(27B)	109.5
C(6)-C(27)-H(27C)	109.5
H(27A)-C(27)-H(27C)	109.5
H(27B)-C(27)-H(27C)	109.5
C(3)-C(28)-C(29)	113.5(3)
C(3)-C(28)-C(30)	109.3(3)
C(29)-C(28)-C(30)	112.5(3)
C(3)-C(28)-H(28)	107.1
C(29)-C(28)-H(28)	107.1
C(30)-C(28)-H(28)	107.1
C(28)-C(29)-H(29A)	109.5
C(28)-C(29)-H(29B)	109.5
H(29A)-C(29)-H(29B)	109.5
C(28)-C(29)-H(29C)	109.5
H(29A)-C(29)-H(29C)	109.5
H(29B)-C(29)-H(29C)	109.5
C(28)-C(30)-H(30A)	109.5
C(28)-C(30)-H(30B)	109.5

H(30A)-C(30)-H(30B)	109.5
C(28)-C(30)-H(30C)	109.5
H(30A)-C(30)-H(30C)	109.5
H(30B)-C(30)-H(30C)	109.5

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x, y, -z + 1/2$

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL2. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Ru(1)	17(1)	10(1)	12(1)	0(1)	3(1)	0(1)
S(1)	19(1)	13(1)	13(1)	0(1)	5(1)	0(1)
O(1)	29(1)	12(1)	20(1)	3(1)	5(1)	2(1)
O(3)	50(2)	26(1)	26(1)	2(1)	4(1)	-2(1)
O(4)	51(2)	15(1)	40(1)	6(1)	-2(1)	-3(1)
N(1)	32(1)	19(1)	18(1)	-6(1)	7(1)	-1(1)
N(2)	24(1)	12(1)	19(1)	-3(1)	6(1)	1(1)
N(3)	18(1)	14(1)	16(1)	-1(1)	5(1)	0(1)
N(4)	31(1)	18(1)	29(1)	6(1)	3(1)	-4(1)
C(1)	23(1)	13(1)	18(1)	4(1)	7(1)	2(1)
C(2)	20(1)	14(1)	18(1)	1(1)	4(1)	4(1)
C(3)	20(1)	20(1)	19(1)	4(1)	4(1)	4(1)
C(4)	17(1)	20(1)	25(1)	3(1)	0(1)	-1(1)
C(5)	26(2)	22(1)	19(1)	-1(1)	-1(1)	6(1)
C(6)	33(2)	19(1)	14(1)	4(1)	6(1)	11(1)
C(13)	21(1)	16(1)	17(1)	-4(1)	8(1)	-2(1)
C(14)	45(2)	20(2)	25(2)	-8(1)	13(1)	-2(1)
C(15)	23(1)	15(1)	17(1)	-1(1)	5(1)	2(1)
C(16)	20(1)	14(1)	21(1)	2(1)	6(1)	2(1)
C(17)	26(2)	15(1)	24(1)	0(1)	8(1)	0(1)
C(18)	31(2)	15(1)	27(2)	-1(1)	6(1)	-1(1)
C(19)	25(2)	14(1)	26(2)	3(1)	8(1)	1(1)
C(27)	52(2)	30(2)	18(1)	6(1)	15(1)	14(2)
C(28)	23(2)	38(2)	23(1)	4(1)	10(1)	2(1)
C(29)	39(2)	51(2)	50(2)	16(2)	24(2)	0(2)
C(30)	37(2)	50(2)	44(2)	2(2)	23(2)	11(2)
Cl(1)	36(1)	36(1)	30(1)	-9(1)	11(1)	3(1)
O(7)	37(1)	45(2)	31(1)	2(1)	8(1)	-7(1)

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for RuL2.

	x	y	z	U(eq)
H(2A)	-743	3772	2845	22
H(1)	625	-1297	3603	21
H(2)	1041	-1217	2494	21
H(4)	2271	1274	3577	27
H(5)	1878	1158	4717	29
H(14A)	-217	4102	4909	44
H(14B)	-806	4154	4073	44
H(14C)	-69	4433	4096	44
H(15)	-1265	2914	878	22
H(17)	-716	5142	2563	26
H(18)	-1051	6924	1791	30
H(27A)	461	-370	4786	49
H(27B)	949	560	5250	49
H(27C)	1174	-665	5391	49
H(28)	1555	-90	1680	33
H(29A)	1943	1709	2039	66
H(29B)	2317	1129	1490	66
H(29C)	2671	1245	2442	66
H(30A)	2543	-955	1701	61
H(30B)	2228	-1578	2294	61
H(30C)	2841	-792	2657	61

Tabla 3: Datos cristalográficos para RuL3

Empirical formula	C36 H48 F12 N8 O7 P2 Ru2	
	S2	
Formula weight	1261.04	
Temperature	125(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	Cc	
Unit cell dimensions	a = 21.639(8) Å	$\alpha = 90^\circ$ .
	b = 11.066(4) Å	$\beta = 113.206(4)^\circ$ .
	c = 21.408(12) Å	$\gamma = 90^\circ$ .
Volume	4712(4) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.778 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.901 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	2536	
Crystal size	0.10 x 0.08 x 0.08 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	2.05 to 26.73°.	
Index ranges	-27<=h<=27, -14<=k<=14, - 27<=l<=27	
Reflections collected	26397	
Independent reflections	9984 [R(int) = 0.0653]	
Completeness to theta = 26.73°	100.0 %	
Absorption correction	Empirical	
Max. and min. transmission	0.9314 and 0.9153	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	9984 / 2 / 677	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.988	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0425, wR2 = 0.0738	
R indices (all data)	R1 = 0.0600, wR2 = 0.0798	
Absolute structure parameter	0.03(2)	
Largest diff. peak and hole	0.828 and -0.506 e.Å <sup>-3</sup>	

Table 2. Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL3.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Ru(1)	-594(1)	2718(1)	5387(1)	15(1)
Ru(2)	1130(1)	3053(1)	5666(1)	15(1)
S(3)	434(1)	1527(1)	5794(1)	16(1)
S(4)	80(1)	4078(1)	5089(1)	17(1)
P(2)	4224(1)	2822(2)	6300(1)	30(1)
P(1)	6386(1)	1550(1)	3596(1)	27(1)
F(1)	6758(2)	2221(4)	4309(2)	45(1)
F(2)	6364(2)	2796(3)	3206(2)	39(1)
F(6)	5679(2)	1842(4)	3635(2)	49(1)
F(4)	6001(2)	901(3)	2884(2)	46(1)
F(5)	6397(2)	305(3)	3986(2)	58(1)
F(3)	7091(2)	1246(4)	3573(2)	55(1)
F(8)	3652(2)	3785(3)	6243(2)	43(1)
F(12)	4618(2)	3189(4)	7071(2)	52(1)
F(7)	3825(2)	1798(3)	6511(2)	48(1)
F(9)	3819(2)	2454(4)	5525(2)	62(1)
F(11)	4788(2)	1875(4)	6343(3)	67(1)
F(10)	4618(2)	3859(3)	6082(2)	50(1)
O(2)	1261(2)	1512(4)	1721(2)	45(1)
O(1)	1505(3)	3274(4)	2236(2)	58(2)
N(1)	1331(3)	2213(5)	2195(3)	36(1)
C(1)	1192(3)	1714(5)	2744(3)	23(1)
O(3)	1242(2)	2469(3)	3248(2)	26(1)
C(3)	930(3)	632(5)	3451(3)	24(1)
C(2)	1015(3)	588(5)	2831(3)	26(1)
C(5)	1138(3)	2435(5)	4302(3)	17(1)
C(4)	1075(3)	1783(5)	3700(3)	19(1)
N(2)	979(2)	2045(4)	4791(2)	16(1)
C(6)	436(3)	574(5)	5113(3)	18(1)
N(3)	705(2)	907(4)	4694(2)	21(1)
N(4)	152(2)	-505(4)	5055(2)	21(1)
C(8)	-311(3)	-2429(5)	4513(3)	30(2)

C(7)	132(3)	-1370(5)	4531(3)	28(1)
C(10)	-229(3)	1616(5)	6978(3)	28(1)
C(9)	-682(3)	2320(5)	6379(3)	19(1)
C(13)	-1554(3)	3670(5)	5218(3)	19(1)
C(11)	-585(3)	3560(5)	6322(3)	21(1)
C(12)	-1017(3)	4226(5)	5741(3)	21(1)
C(16)	-1214(3)	1745(5)	5850(3)	23(1)
C(15)	-1631(3)	2400(5)	5278(3)	21(1)
C(18)	-1696(3)	5247(6)	4310(3)	36(2)
C(19)	-2513(4)	5031(7)	4857(4)	58(2)
C(17)	-2036(3)	4364(6)	4624(3)	31(2)
C(24)	2009(3)	2474(5)	6580(3)	21(1)
C(23)	1614(3)	3302(5)	6768(3)	21(1)
C(22)	1443(3)	4443(5)	6465(3)	21(1)
C(21)	1679(3)	4853(5)	5964(3)	23(1)
C(20)	1497(3)	6065(5)	5646(3)	29(1)
C(26)	2234(3)	2868(6)	6075(3)	24(1)
C(27)	2070(3)	4026(5)	5772(3)	23(1)
C(29)	2342(3)	292(5)	6495(3)	35(2)
C(28)	2151(3)	1241(6)	6913(3)	29(1)
C(30)	2676(4)	1345(8)	7630(4)	38(2)
C(31)	-221(2)	3679(4)	4206(3)	16(1)
N(6)	-628(2)	2786(4)	3948(2)	16(1)
N(5)	-20(2)	4390(4)	3827(2)	20(1)
N(7)	-813(2)	2131(4)	4397(2)	14(1)
C(32)	-1131(3)	1126(5)	4170(3)	20(1)
C(33)	-277(3)	4359(5)	3086(3)	25(1)
C(34)	-772(3)	5346(6)	2768(3)	32(2)
O(4)	-1605(2)	-509(3)	3448(2)	24(1)
C(35)	-1300(3)	612(5)	3514(3)	21(1)
C(36)	-1240(3)	899(5)	2916(3)	23(1)
C(37)	-1719(3)	-877(5)	2805(3)	26(1)
C(38)	-1508(3)	-66(5)	2469(3)	25(1)
N(8)	-2005(3)	-2053(5)	2614(3)	42(1)
O(6)	-2108(3)	-2671(5)	3035(3)	54(2)
O(5)	-2089(3)	-2370(4)	2032(2)	53(1)
O(1W)	2860(6)	4345(11)	4704(6)	202(5)

---

Table 3. Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for RuL3.

---

Ru(1)-N(7)	2.085(4)
Ru(1)-C(12)	2.178(5)
Ru(1)-C(15)	2.190(6)
Ru(1)-C(11)	2.201(5)
Ru(1)-C(13)	2.229(5)
Ru(1)-C(16)	2.232(5)
Ru(1)-C(9)	2.248(6)
Ru(1)-S(4)	2.3521(15)
Ru(1)-S(3)	2.4313(16)
Ru(2)-N(2)	2.092(4)
Ru(2)-C(23)	2.189(6)
Ru(2)-C(22)	2.199(5)
Ru(2)-C(26)	2.206(6)
Ru(2)-C(24)	2.219(6)
Ru(2)-C(27)	2.234(6)
Ru(2)-C(21)	2.277(5)
Ru(2)-S(3)	2.3495(15)
Ru(2)-S(4)	2.4009(16)
S(3)-C(6)	1.800(5)
S(4)-C(31)	1.795(5)
P(2)-F(11)	1.584(4)
P(2)-F(12)	1.585(4)
P(2)-F(7)	1.593(4)
P(2)-F(9)	1.593(4)
P(2)-F(8)	1.600(4)
P(2)-F(10)	1.605(4)
P(1)-F(3)	1.583(4)
P(1)-F(4)	1.593(4)
P(1)-F(6)	1.597(4)
P(1)-F(1)	1.600(4)
P(1)-F(2)	1.603(4)
P(1)-F(5)	1.606(4)
O(2)-N(1)	1.239(6)
O(1)-N(1)	1.225(6)
N(1)-C(1)	1.433(7)
C(1)-O(3)	1.336(6)



C(1)-C(2)	1.338(8)
O(3)-C(4)	1.385(6)
C(3)-C(4)	1.370(7)
C(3)-C(2)	1.412(8)
C(3)-H(3)	0.92(6)
C(2)-H(2)	0.9500
C(5)-N(2)	1.298(6)
C(5)-C(4)	1.435(7)
C(5)-H(5)	0.9500
N(2)-N(3)	1.373(6)
C(6)-N(3)	1.301(6)
C(6)-N(4)	1.327(6)
N(3)-H(3N)	0.8800
N(4)-C(7)	1.463(7)
N(4)-H(4)	0.8800
C(8)-C(7)	1.506(7)
C(8)-H(8A)	0.9800
C(8)-H(8B)	0.9800
C(8)-H(8C)	0.9800
C(7)-H(7A)	0.9900
C(7)-H(7B)	0.9900
C(10)-C(9)	1.491(7)
C(10)-H(10A)	0.9800
C(10)-H(10B)	0.9800
C(10)-H(10C)	0.9800
C(9)-C(11)	1.401(8)
C(9)-C(16)	1.409(8)
C(13)-C(12)	1.399(7)
C(13)-C(15)	1.427(8)
C(13)-C(17)	1.499(8)
C(11)-C(12)	1.431(7)
C(11)-H(11)	0.9500
C(12)-H(12)	0.9500
C(16)-C(15)	1.402(8)
C(16)-H(16)	1.13(5)
C(15)-H(15)	0.9500
C(18)-C(17)	1.529(8)
C(18)-H(18A)	0.9800

C(18)-H(18B)	0.9800
C(18)-H(18C)	0.9800
C(19)-C(17)	1.505(8)
C(19)-H(19A)	0.9800
C(19)-H(19B)	0.9800
C(19)-H(19C)	0.9800
C(17)-H(17)	0.97(6)
C(24)-C(23)	1.416(8)
C(24)-C(26)	1.420(8)
C(24)-C(28)	1.513(7)
C(23)-C(22)	1.401(8)
C(23)-H(23)	0.9500
C(22)-C(21)	1.430(8)
C(22)-H(22)	0.88(6)
C(21)-C(27)	1.414(8)
C(21)-C(20)	1.485(7)
C(20)-H(20A)	0.9800
C(20)-H(20B)	0.9800
C(20)-H(20C)	0.9800
C(26)-C(27)	1.416(8)
C(26)-H(26)	0.85(5)
C(27)-H(27)	0.86(5)
C(29)-C(28)	1.539(8)
C(29)-H(29A)	0.9800
C(29)-H(29B)	0.9800
C(29)-H(29C)	0.9800
C(28)-C(30)	1.511(9)
C(28)-H(28)	1.02(6)
C(30)-H(300)	0.96(6)
C(30)-H(301)	0.93(7)
C(30)-H(302)	0.98(7)
C(31)-N(6)	1.294(6)
C(31)-N(5)	1.321(6)
N(6)-N(7)	1.383(6)
N(6)-H(6)	0.8800
N(5)-C(33)	1.459(7)
N(5)-H(5A)	0.8800
N(7)-C(32)	1.298(7)

C(32)-C(35)	1.423(7)
C(32)-H(32)	0.91(6)
C(33)-C(34)	1.493(8)
C(33)-H(33A)	0.9900
C(33)-H(33B)	0.9900
C(34)-H(34A)	0.9800
C(34)-H(34B)	0.9800
C(34)-H(34C)	0.9800
O(4)-C(37)	1.361(6)
O(4)-C(35)	1.386(6)
C(35)-C(36)	1.374(8)
C(36)-C(38)	1.398(7)
C(36)-H(36)	0.85(5)
C(37)-C(38)	1.338(8)
C(37)-N(8)	1.430(7)
C(38)-H(38)	0.9500
N(8)-O(6)	1.220(7)
N(8)-O(5)	1.237(6)
N(7)-Ru(1)-C(12)	129.32(18)
N(7)-Ru(1)-C(15)	91.62(18)
C(12)-Ru(1)-C(15)	66.9(2)
N(7)-Ru(1)-C(11)	166.74(18)
C(12)-Ru(1)-C(11)	38.16(19)
C(15)-Ru(1)-C(11)	78.9(2)
N(7)-Ru(1)-C(13)	99.08(18)
C(12)-Ru(1)-C(13)	37.01(19)
C(15)-Ru(1)-C(13)	37.7(2)
C(11)-Ru(1)-C(13)	67.8(2)
N(7)-Ru(1)-C(16)	111.40(19)
C(12)-Ru(1)-C(16)	78.9(2)
C(15)-Ru(1)-C(16)	37.0(2)
C(11)-Ru(1)-C(16)	66.0(2)
C(13)-Ru(1)-C(16)	67.4(2)
N(7)-Ru(1)-C(9)	145.99(18)
C(12)-Ru(1)-C(9)	67.59(19)
C(15)-Ru(1)-C(9)	66.8(2)
C(11)-Ru(1)-C(9)	36.71(19)

C(13)-Ru(1)-C(9)	80.0(2)
C(16)-Ru(1)-C(9)	36.7(2)
N(7)-Ru(1)-S(4)	80.79(12)
C(12)-Ru(1)-S(4)	89.66(15)
C(15)-Ru(1)-S(4)	142.35(15)
C(11)-Ru(1)-S(4)	101.04(15)
C(13)-Ru(1)-S(4)	106.90(15)
C(16)-Ru(1)-S(4)	166.89(15)
C(9)-Ru(1)-S(4)	132.38(15)
N(7)-Ru(1)-S(3)	90.24(11)
C(12)-Ru(1)-S(3)	137.86(15)
C(15)-Ru(1)-S(3)	134.82(15)
C(11)-Ru(1)-S(3)	103.02(15)
C(13)-Ru(1)-S(3)	167.73(15)
C(16)-Ru(1)-S(3)	101.82(15)
C(9)-Ru(1)-S(3)	87.81(14)
S(4)-Ru(1)-S(3)	82.36(5)
N(2)-Ru(2)-C(23)	150.65(19)
N(2)-Ru(2)-C(22)	163.85(19)
C(23)-Ru(2)-C(22)	37.2(2)
N(2)-Ru(2)-C(26)	93.9(2)
C(23)-Ru(2)-C(26)	66.5(2)
C(22)-Ru(2)-C(26)	78.6(2)
N(2)-Ru(2)-C(24)	114.37(19)
C(23)-Ru(2)-C(24)	37.5(2)
C(22)-Ru(2)-C(24)	67.8(2)
C(26)-Ru(2)-C(24)	37.4(2)
N(2)-Ru(2)-C(27)	99.3(2)
C(23)-Ru(2)-C(27)	78.5(2)
C(22)-Ru(2)-C(27)	66.1(2)
C(26)-Ru(2)-C(27)	37.2(2)
C(24)-Ru(2)-C(27)	67.7(2)
N(2)-Ru(2)-C(21)	126.66(18)
C(23)-Ru(2)-C(21)	67.2(2)
C(22)-Ru(2)-C(21)	37.2(2)
C(26)-Ru(2)-C(21)	66.8(2)
C(24)-Ru(2)-C(21)	80.5(2)
C(27)-Ru(2)-C(21)	36.5(2)

N(2)-Ru(2)-S(3)	80.77(12)
C(23)-Ru(2)-S(3)	91.23(15)
C(22)-Ru(2)-S(3)	115.35(16)
C(26)-Ru(2)-S(3)	122.07(16)
C(24)-Ru(2)-S(3)	93.19(14)
C(27)-Ru(2)-S(3)	159.21(16)
C(21)-Ru(2)-S(3)	152.09(14)
N(2)-Ru(2)-S(4)	90.50(12)
C(23)-Ru(2)-S(4)	116.69(15)
C(22)-Ru(2)-S(4)	90.54(16)
C(26)-Ru(2)-S(4)	154.86(16)
C(24)-Ru(2)-S(4)	154.01(15)
C(27)-Ru(2)-S(4)	117.67(16)
C(21)-Ru(2)-S(4)	90.84(15)
S(3)-Ru(2)-S(4)	83.07(5)
C(6)-S(3)-Ru(2)	96.94(18)
C(6)-S(3)-Ru(1)	108.78(18)
Ru(2)-S(3)-Ru(1)	96.12(6)
C(31)-S(4)-Ru(1)	97.05(17)
C(31)-S(4)-Ru(2)	107.61(17)
Ru(1)-S(4)-Ru(2)	96.88(6)
F(11)-P(2)-F(12)	91.2(3)
F(11)-P(2)-F(7)	90.2(2)
F(12)-P(2)-F(7)	91.0(2)
F(11)-P(2)-F(9)	89.2(3)
F(12)-P(2)-F(9)	179.4(2)
F(7)-P(2)-F(9)	88.7(2)
F(11)-P(2)-F(8)	179.0(3)
F(12)-P(2)-F(8)	89.6(2)
F(7)-P(2)-F(8)	90.4(2)
F(9)-P(2)-F(8)	90.0(2)
F(11)-P(2)-F(10)	90.2(2)
F(12)-P(2)-F(10)	89.4(2)
F(7)-P(2)-F(10)	179.4(3)
F(9)-P(2)-F(10)	91.0(2)
F(8)-P(2)-F(10)	89.1(2)
F(3)-P(1)-F(4)	91.2(2)
F(3)-P(1)-F(6)	178.8(2)

F(4)-P(1)-F(6)	89.4(2)
F(3)-P(1)-F(1)	90.0(2)
F(4)-P(1)-F(1)	178.6(2)
F(6)-P(1)-F(1)	89.3(2)
F(3)-P(1)-F(2)	89.8(2)
F(4)-P(1)-F(2)	89.6(2)
F(6)-P(1)-F(2)	91.2(2)
F(1)-P(1)-F(2)	89.9(2)
F(3)-P(1)-F(5)	91.0(2)
F(4)-P(1)-F(5)	90.3(2)
F(6)-P(1)-F(5)	88.0(2)
F(1)-P(1)-F(5)	90.2(2)
F(2)-P(1)-F(5)	179.2(2)
O(1)-N(1)-O(2)	126.4(5)
O(1)-N(1)-C(1)	118.0(5)
O(2)-N(1)-C(1)	115.6(5)
O(3)-C(1)-C(2)	114.0(5)
O(3)-C(1)-N(1)	116.5(5)
C(2)-C(1)-N(1)	129.6(5)
C(1)-O(3)-C(4)	105.2(4)
C(4)-C(3)-C(2)	107.6(5)
C(4)-C(3)-H(3)	123(4)
C(2)-C(3)-H(3)	129(4)
C(1)-C(2)-C(3)	104.5(5)
C(1)-C(2)-H(2)	127.8
C(3)-C(2)-H(2)	127.8
N(2)-C(5)-C(4)	126.6(5)
N(2)-C(5)-H(5)	116.7
C(4)-C(5)-H(5)	116.7
C(3)-C(4)-O(3)	108.7(5)
C(3)-C(4)-C(5)	138.0(5)
O(3)-C(4)-C(5)	113.1(4)
C(5)-N(2)-N(3)	114.7(4)
C(5)-N(2)-Ru(2)	123.2(4)
N(3)-N(2)-Ru(2)	122.1(3)
N(3)-C(6)-N(4)	120.5(5)
N(3)-C(6)-S(3)	122.5(4)
N(4)-C(6)-S(3)	117.0(4)

C(6)-N(3)-N(2)	116.0(4)
C(6)-N(3)-H(3N)	122.0
N(2)-N(3)-H(3N)	122.0
C(6)-N(4)-C(7)	122.2(4)
C(6)-N(4)-H(4)	118.9
C(7)-N(4)-H(4)	118.9
C(7)-C(8)-H(8A)	109.5
C(7)-C(8)-H(8B)	109.5
H(8A)-C(8)-H(8B)	109.5
C(7)-C(8)-H(8C)	109.5
H(8A)-C(8)-H(8C)	109.5
H(8B)-C(8)-H(8C)	109.5
N(4)-C(7)-C(8)	110.7(5)
N(4)-C(7)-H(7A)	109.5
C(8)-C(7)-H(7A)	109.5
N(4)-C(7)-H(7B)	109.5
C(8)-C(7)-H(7B)	109.5
H(7A)-C(7)-H(7B)	108.1
C(9)-C(10)-H(10A)	109.5
C(9)-C(10)-H(10B)	109.5
H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5
C(9)-C(10)-H(10C)	109.5
H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5
H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5
C(11)-C(9)-C(16)	118.3(5)
C(11)-C(9)-C(10)	121.1(5)
C(16)-C(9)-C(10)	120.5(5)
C(11)-C(9)-Ru(1)	69.8(3)
C(16)-C(9)-Ru(1)	71.1(3)
C(10)-C(9)-Ru(1)	130.1(4)
C(12)-C(13)-C(15)	116.8(5)
C(12)-C(13)-C(17)	122.3(5)
C(15)-C(13)-C(17)	121.0(5)
C(12)-C(13)-Ru(1)	69.5(3)
C(15)-C(13)-Ru(1)	69.7(3)
C(17)-C(13)-Ru(1)	132.3(4)
C(9)-C(11)-C(12)	120.7(5)
C(9)-C(11)-Ru(1)	73.5(3)

C(12)-C(11)-Ru(1)	70.1(3)
C(9)-C(11)-H(11)	119.6
C(12)-C(11)-H(11)	119.6
Ru(1)-C(11)-H(11)	129.2
C(13)-C(12)-C(11)	121.4(5)
C(13)-C(12)-Ru(1)	73.5(3)
C(11)-C(12)-Ru(1)	71.8(3)
C(13)-C(12)-H(12)	119.3
C(11)-C(12)-H(12)	119.3
Ru(1)-C(12)-H(12)	127.6
C(15)-C(16)-C(9)	120.6(5)
C(15)-C(16)-Ru(1)	69.9(3)
C(9)-C(16)-Ru(1)	72.3(3)
C(15)-C(16)-H(16)	121(3)
C(9)-C(16)-H(16)	118(2)
Ru(1)-C(16)-H(16)	137(2)
C(16)-C(15)-C(13)	122.0(5)
C(16)-C(15)-Ru(1)	73.2(3)
C(13)-C(15)-Ru(1)	72.6(3)
C(16)-C(15)-H(15)	119.0
C(13)-C(15)-H(15)	119.0
Ru(1)-C(15)-H(15)	127.4
C(17)-C(18)-H(18A)	109.5
C(17)-C(18)-H(18B)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
C(17)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(17)-C(19)-H(19A)	109.5
C(17)-C(19)-H(19B)	109.5
H(19A)-C(19)-H(19B)	109.5
C(17)-C(19)-H(19C)	109.5
H(19A)-C(19)-H(19C)	109.5
H(19B)-C(19)-H(19C)	109.5
C(13)-C(17)-C(19)	108.1(5)
C(13)-C(17)-C(18)	113.9(5)
C(19)-C(17)-C(18)	110.2(6)
C(13)-C(17)-H(17)	108(4)



C(19)-C(17)-H(17)	109(4)
C(18)-C(17)-H(17)	108(4)
C(23)-C(24)-C(26)	116.4(5)
C(23)-C(24)-C(28)	118.9(5)
C(26)-C(24)-C(28)	124.6(5)
C(23)-C(24)-Ru(2)	70.1(3)
C(26)-C(24)-Ru(2)	70.8(3)
C(28)-C(24)-Ru(2)	128.3(4)
C(22)-C(23)-C(24)	122.0(5)
C(22)-C(23)-Ru(2)	71.7(3)
C(24)-C(23)-Ru(2)	72.4(3)
C(22)-C(23)-H(23)	119.0
C(24)-C(23)-H(23)	119.0
Ru(2)-C(23)-H(23)	129.4
C(23)-C(22)-C(21)	121.8(5)
C(23)-C(22)-Ru(2)	71.0(3)
C(21)-C(22)-Ru(2)	74.4(3)
C(23)-C(22)-H(22)	123(4)
C(21)-C(22)-H(22)	115(4)
Ru(2)-C(22)-H(22)	123(4)
C(27)-C(21)-C(22)	116.4(5)
C(27)-C(21)-C(20)	122.1(5)
C(22)-C(21)-C(20)	121.4(5)
C(27)-C(21)-Ru(2)	70.1(3)
C(22)-C(21)-Ru(2)	68.4(3)
C(20)-C(21)-Ru(2)	130.3(4)
C(21)-C(20)-H(20A)	109.5
C(21)-C(20)-H(20B)	109.5
H(20A)-C(20)-H(20B)	109.5
C(21)-C(20)-H(20C)	109.5
H(20A)-C(20)-H(20C)	109.5
H(20B)-C(20)-H(20C)	109.5
C(27)-C(26)-C(24)	121.8(6)
C(27)-C(26)-Ru(2)	72.4(3)
C(24)-C(26)-Ru(2)	71.8(3)
C(27)-C(26)-H(26)	127(4)
C(24)-C(26)-H(26)	111(4)
Ru(2)-C(26)-H(26)	124(4)

C(21)-C(27)-C(26)	121.5(5)
C(21)-C(27)-Ru(2)	73.4(3)
C(26)-C(27)-Ru(2)	70.4(3)
C(21)-C(27)-H(27)	114(3)
C(26)-C(27)-H(27)	124(3)
Ru(2)-C(27)-H(27)	125(3)
C(28)-C(29)-H(29A)	109.5
C(28)-C(29)-H(29B)	109.5
H(29A)-C(29)-H(29B)	109.5
C(28)-C(29)-H(29C)	109.5
H(29A)-C(29)-H(29C)	109.5
H(29B)-C(29)-H(29C)	109.5
C(30)-C(28)-C(24)	109.9(6)
C(30)-C(28)-C(29)	112.0(5)
C(24)-C(28)-C(29)	113.1(5)
C(30)-C(28)-H(28)	112(4)
C(24)-C(28)-H(28)	102(3)
C(29)-C(28)-H(28)	107(4)
C(28)-C(30)-H(300)	113(4)
C(28)-C(30)-H(301)	110(4)
H(300)-C(30)-H(301)	109(6)
C(28)-C(30)-H(302)	118(4)
H(300)-C(30)-H(302)	101(5)
H(301)-C(30)-H(302)	106(6)
N(6)-C(31)-N(5)	121.8(5)
N(6)-C(31)-S(4)	122.7(4)
N(5)-C(31)-S(4)	115.5(4)
C(31)-N(6)-N(7)	116.0(4)
C(31)-N(6)-H(6)	122.0
N(7)-N(6)-H(6)	122.0
C(31)-N(5)-C(33)	125.2(4)
C(31)-N(5)-H(5A)	117.4
C(33)-N(5)-H(5A)	117.4
C(32)-N(7)-N(6)	116.4(4)
C(32)-N(7)-Ru(1)	121.5(4)
N(6)-N(7)-Ru(1)	122.1(3)
N(7)-C(32)-C(35)	127.2(5)
N(7)-C(32)-H(32)	109(4)

C(35)-C(32)-H(32)	123(4)
N(5)-C(33)-C(34)	112.1(5)
N(5)-C(33)-H(33A)	109.2
C(34)-C(33)-H(33A)	109.2
N(5)-C(33)-H(33B)	109.2
C(34)-C(33)-H(33B)	109.2
H(33A)-C(33)-H(33B)	107.9
C(33)-C(34)-H(34A)	109.5
C(33)-C(34)-H(34B)	109.5
H(34A)-C(34)-H(34B)	109.5
C(33)-C(34)-H(34C)	109.5
H(34A)-C(34)-H(34C)	109.5
H(34B)-C(34)-H(34C)	109.5
C(37)-O(4)-C(35)	105.1(4)
C(36)-C(35)-O(4)	109.1(5)
C(36)-C(35)-C(32)	138.2(5)
O(4)-C(35)-C(32)	112.7(5)
C(35)-C(36)-C(38)	107.2(5)
C(35)-C(36)-H(36)	128(4)
C(38)-C(36)-H(36)	125(4)
C(38)-C(37)-O(4)	112.2(5)
C(38)-C(37)-N(8)	131.1(5)
O(4)-C(37)-N(8)	116.6(5)
C(37)-C(38)-C(36)	106.4(5)
C(37)-C(38)-H(38)	126.8
C(36)-C(38)-H(38)	126.8
O(6)-N(8)-O(5)	126.0(6)
O(6)-N(8)-C(37)	118.9(5)
O(5)-N(8)-C(37)	114.9(5)

---

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for RuL3. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [ h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12} ]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
Ru(1)	16(1)	15(1)	14(1)	-1(1)	7(1)	-1(1)
Ru(2)	16(1)	15(1)	15(1)	0(1)	7(1)	-1(1)
S(3)	20(1)	15(1)	17(1)	1(1)	10(1)	0(1)
S(4)	19(1)	15(1)	16(1)	-1(1)	6(1)	0(1)
P(2)	37(1)	26(1)	34(1)	-7(1)	20(1)	-10(1)
P(1)	27(1)	28(1)	29(1)	2(1)	14(1)	-6(1)
F(1)	37(2)	65(3)	28(2)	2(2)	7(2)	-22(2)
F(2)	46(2)	27(2)	41(2)	3(2)	14(2)	-1(2)
F(6)	32(2)	71(3)	52(3)	-28(2)	25(2)	-16(2)
F(4)	66(3)	40(2)	43(2)	-17(2)	32(2)	-20(2)
F(5)	72(3)	40(2)	65(3)	16(2)	32(3)	-12(2)
F(3)	40(2)	53(3)	83(3)	23(2)	36(2)	16(2)
F(8)	42(2)	32(2)	62(3)	-10(2)	28(2)	-6(2)
F(12)	45(2)	72(3)	36(2)	-11(2)	12(2)	-23(2)
F(7)	43(3)	42(2)	59(3)	8(2)	20(2)	-16(2)
F(9)	85(3)	67(3)	34(2)	-21(2)	25(2)	-12(2)
F(11)	54(3)	44(3)	116(4)	-10(3)	48(3)	-1(2)
F(10)	64(3)	48(2)	60(3)	-7(2)	47(2)	-16(2)
O(2)	76(4)	40(3)	30(3)	-3(2)	34(3)	16(3)
O(1)	121(5)	25(3)	57(3)	15(2)	65(4)	14(3)
N(1)	54(4)	31(3)	35(3)	10(3)	30(3)	17(3)
C(1)	31(3)	27(3)	15(3)	0(2)	12(3)	7(3)
O(3)	37(2)	20(2)	27(2)	6(2)	20(2)	5(2)
C(3)	25(3)	25(3)	22(3)	0(3)	11(3)	-4(3)
C(2)	27(3)	28(3)	29(3)	-4(3)	19(3)	-3(3)
C(5)	18(3)	14(3)	22(3)	4(2)	10(2)	2(2)
C(4)	17(3)	21(3)	22(3)	3(2)	11(2)	6(2)
N(2)	20(3)	9(2)	21(3)	4(2)	8(2)	1(2)
C(6)	18(3)	20(3)	15(3)	1(2)	7(2)	1(2)
N(3)	30(3)	15(2)	24(3)	-7(2)	16(2)	-4(2)
N(4)	27(3)	12(2)	33(3)	-2(2)	20(2)	-3(2)
C(8)	42(4)	15(3)	39(4)	-7(3)	24(3)	-6(3)
C(7)	40(4)	14(3)	32(4)	-5(3)	17(3)	-2(3)

C(10)	33(3)	28(3)	19(3)	1(3)	9(3)	1(3)
C(9)	20(3)	23(3)	15(3)	-2(2)	8(3)	5(2)
C(13)	18(3)	26(3)	16(3)	-5(2)	9(3)	1(2)
C(11)	16(3)	28(3)	19(3)	-11(2)	8(2)	-1(2)
C(12)	28(3)	21(3)	19(3)	-5(2)	15(3)	1(2)
C(16)	25(3)	23(3)	28(3)	2(3)	19(3)	1(3)
C(15)	16(3)	26(3)	23(3)	-2(3)	9(3)	1(2)
C(18)	40(4)	30(4)	27(4)	7(3)	1(3)	10(3)
C(19)	46(5)	80(6)	49(5)	17(4)	21(4)	45(4)
C(17)	30(4)	33(4)	26(3)	-1(3)	7(3)	9(3)
C(24)	18(3)	20(3)	19(3)	2(2)	3(2)	-5(2)
C(23)	18(3)	26(3)	17(3)	-3(2)	6(2)	-2(2)
C(22)	24(3)	15(3)	22(3)	-8(2)	7(3)	-1(2)
C(21)	28(3)	21(3)	17(3)	-4(2)	6(3)	-7(3)
C(20)	39(4)	18(3)	25(3)	3(2)	8(3)	-5(3)
C(26)	18(3)	25(4)	29(4)	0(3)	10(3)	-2(3)
C(27)	21(3)	28(3)	19(3)	3(3)	7(3)	-9(3)
C(29)	34(4)	21(3)	48(4)	6(3)	16(3)	3(3)
C(28)	23(3)	34(4)	29(4)	13(3)	7(3)	8(3)
C(30)	35(4)	48(5)	25(4)	12(4)	5(3)	14(4)
C(31)	15(3)	14(3)	15(3)	3(2)	1(2)	1(2)
N(6)	21(2)	19(2)	10(2)	-1(2)	6(2)	-4(2)
N(5)	24(3)	19(2)	17(2)	-2(2)	6(2)	-8(2)
N(7)	12(2)	12(2)	15(2)	-2(2)	3(2)	1(2)
C(32)	21(3)	21(3)	17(3)	-5(2)	7(3)	-7(2)
C(33)	35(4)	22(3)	19(3)	-1(2)	12(3)	-14(3)
C(34)	26(3)	47(4)	19(3)	7(3)	3(3)	-3(3)
O(4)	32(2)	19(2)	18(2)	-3(2)	7(2)	-10(2)
C(35)	21(3)	20(3)	23(3)	-5(2)	8(3)	-4(2)
C(36)	27(3)	23(3)	22(3)	-5(3)	12(3)	-11(3)
C(37)	34(3)	20(3)	17(3)	-2(2)	0(3)	-6(3)
C(38)	37(4)	24(3)	19(3)	-3(2)	15(3)	0(3)
N(8)	64(4)	23(3)	31(3)	-4(3)	10(3)	-8(3)
O(6)	76(4)	37(3)	35(3)	4(2)	7(3)	-28(3)
O(5)	86(4)	31(3)	31(3)	-15(2)	11(3)	-19(3)
O(1W)	224(12)	235(13)	177(10)	34(9)	112(9)	8(10)

---

Table 5. Hydrogen coordinates ( $\times 10^4$ ) and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$ ) for RuL3.

	x	y	z	U(eq)
H(2)	960	-88	2540	31
H(5)	1315	3231	4347	21
H(3N)	712	431	4367	25
H(4)	-31	-707	5342	26
H(8A)	-148	-2814	4962	44
H(8B)	-301	-3015	4174	44
H(8C)	-773	-2148	4393	44
H(7A)	593	-1660	4625	33
H(7B)	-41	-965	4082	33
H(10A)	-413	1617	7330	41
H(10B)	219	1985	7159	41
H(10C)	-196	782	6840	41
H(11)	-228	3964	6673	25
H(12)	-937	5064	5709	25
H(15)	-1974	1985	4919	26
H(18A)	-1440	5847	4650	54
H(18B)	-2039	5656	3922	54
H(18C)	-1390	4802	4155	54
H(19A)	-2757	4450	5020	87
H(19B)	-2834	5492	4476	87
H(19C)	-2259	5586	5226	87
H(23)	1459	3078	7111	25
H(20A)	1568	6083	5222	43
H(20B)	1781	6679	5958	43
H(20C)	1024	6233	5550	43
H(29A)	2758	541	6450	52
H(29B)	1980	223	6043	52
H(29C)	2412	-491	6726	52
H(6)	-779	2606	3513	20
H(5A)	294	4925	4038	24
H(33A)	-495	3569	2923	30
H(33B)	104	4439	2942	30

H(34A)	-1139	5295	2927	48
H(34B)	-956	5258	2272	48
H(34C)	-548	6131	2895	48
H(38)	-1536	-131	2017	30
H(27)	2170(20)	4270(40)	5440(30)	10(14)
H(26)	2440(30)	2310(50)	5960(30)	17(15)
H(16)	-1330(20)	770(40)	5920(20)	16(13)
H(36)	-1030(30)	1490(50)	2840(30)	18(15)
H(3)	810(30)	20(50)	3670(30)	36(18)
H(300)	2580(30)	1970(60)	7890(30)	30(17)
H(301)	2720(30)	620(70)	7860(30)	50(20)
H(28)	1690(30)	1000(50)	6910(30)	40(20)
H(32)	-1240(30)	780(50)	4500(30)	30(17)
H(17)	-2290(30)	3780(60)	4280(30)	41(19)
H(302)	3130(30)	1570(60)	7690(30)	50(20)
H(22)	1160(30)	4930(50)	6540(30)	38(19)

---

Table 6. Torsion angles [°] for RuL3.

---

N(2)-Ru(2)-S(3)-C(6)	8.8(2)
C(23)-Ru(2)-S(3)-C(6)	-142.8(2)
C(22)-Ru(2)-S(3)-C(6)	-172.3(2)
C(26)-Ru(2)-S(3)-C(6)	-80.0(3)
C(24)-Ru(2)-S(3)-C(6)	-105.4(2)
C(27)-Ru(2)-S(3)-C(6)	-83.2(5)
C(21)-Ru(2)-S(3)-C(6)	179.0(3)
S(4)-Ru(2)-S(3)-C(6)	100.43(18)
N(2)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	-101.04(12)
C(23)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	107.35(15)
C(22)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	77.91(18)
C(26)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	170.16(19)
C(24)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	144.78(15)
C(27)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	166.9(5)
C(21)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	69.2(3)
S(4)-Ru(2)-S(3)-Ru(1)	-9.39(5)
N(7)-Ru(1)-S(3)-C(6)	-9.2(2)
C(12)-Ru(1)-S(3)-C(6)	-170.8(3)
C(15)-Ru(1)-S(3)-C(6)	83.3(3)
C(11)-Ru(1)-S(3)-C(6)	170.5(2)
C(13)-Ru(1)-S(3)-C(6)	130.4(7)
C(16)-Ru(1)-S(3)-C(6)	102.7(2)
C(9)-Ru(1)-S(3)-C(6)	136.8(2)
S(4)-Ru(1)-S(3)-C(6)	-89.88(19)
N(7)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	90.28(12)
C(12)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-71.3(2)
C(15)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-177.2(2)
C(11)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-90.03(16)
C(13)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-130.1(7)
C(16)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-157.78(15)
C(9)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	-123.69(15)
S(4)-Ru(1)-S(3)-Ru(2)	9.60(5)
N(7)-Ru(1)-S(4)-C(31)	7.9(2)
C(12)-Ru(1)-S(4)-C(31)	-122.1(2)
C(15)-Ru(1)-S(4)-C(31)	-72.7(3)
C(11)-Ru(1)-S(4)-C(31)	-158.8(2)



C(13)-Ru(1)-S(4)-C(31)	-88.9(2)
C(16)-Ru(1)-S(4)-C(31)	-151.0(7)
C(9)-Ru(1)-S(4)-C(31)	179.3(2)
S(3)-Ru(1)-S(4)-C(31)	99.37(17)
N(7)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	-100.90(12)
C(12)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	129.09(15)
C(15)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	178.5(2)
C(11)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	92.44(15)
C(13)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	162.33(15)
C(16)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	100.2(7)
C(9)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	70.53(19)
S(3)-Ru(1)-S(4)-Ru(2)	-9.41(5)
N(2)-Ru(2)-S(4)-C(31)	-9.3(2)
C(23)-Ru(2)-S(4)-C(31)	-177.8(2)
C(22)-Ru(2)-S(4)-C(31)	154.6(2)
C(26)-Ru(2)-S(4)-C(31)	91.0(4)
C(24)-Ru(2)-S(4)-C(31)	-173.0(4)
C(27)-Ru(2)-S(4)-C(31)	91.5(3)
C(21)-Ru(2)-S(4)-C(31)	117.4(2)
S(3)-Ru(2)-S(4)-C(31)	-89.94(18)
N(2)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	90.37(12)
C(23)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-78.16(17)
C(22)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-105.76(16)
C(26)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-169.4(4)
C(24)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-73.3(3)
C(27)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-168.81(18)
C(21)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	-142.96(14)
S(3)-Ru(2)-S(4)-Ru(1)	9.73(5)
O(1)-N(1)-C(1)-O(3)	2.1(8)
O(2)-N(1)-C(1)-O(3)	-177.7(5)
O(1)-N(1)-C(1)-C(2)	-177.9(6)
O(2)-N(1)-C(1)-C(2)	2.2(10)
C(2)-C(1)-O(3)-C(4)	-0.9(6)
N(1)-C(1)-O(3)-C(4)	179.0(5)
O(3)-C(1)-C(2)-C(3)	1.3(7)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-178.6(6)
C(4)-C(3)-C(2)-C(1)	-1.2(6)
C(2)-C(3)-C(4)-O(3)	0.7(6)

C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-174.6(6)
C(1)-O(3)-C(4)-C(3)	0.1(6)
C(1)-O(3)-C(4)-C(5)	176.7(4)
N(2)-C(5)-C(4)-C(3)	-9.2(11)
N(2)-C(5)-C(4)-O(3)	175.7(5)
C(4)-C(5)-N(2)-N(3)	-2.1(8)
C(4)-C(5)-N(2)-Ru(2)	177.5(4)
C(23)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-116.7(5)
C(22)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-9.1(9)
C(26)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-70.6(4)
C(24)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-103.2(4)
C(27)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-33.6(5)
C(21)-Ru(2)-N(2)-C(5)	-6.8(5)
S(3)-Ru(2)-N(2)-C(5)	167.5(4)
S(4)-Ru(2)-N(2)-C(5)	84.6(4)
C(23)-Ru(2)-N(2)-N(3)	62.9(6)
C(22)-Ru(2)-N(2)-N(3)	170.5(6)
C(26)-Ru(2)-N(2)-N(3)	108.9(4)
C(24)-Ru(2)-N(2)-N(3)	76.4(4)
C(27)-Ru(2)-N(2)-N(3)	146.0(4)
C(21)-Ru(2)-N(2)-N(3)	172.7(4)
S(3)-Ru(2)-N(2)-N(3)	-13.0(4)
S(4)-Ru(2)-N(2)-N(3)	-95.8(4)
Ru(2)-S(3)-C(6)-N(3)	-7.3(5)
Ru(1)-S(3)-C(6)-N(3)	91.6(5)
Ru(2)-S(3)-C(6)-N(4)	172.2(4)
Ru(1)-S(3)-C(6)-N(4)	-88.9(4)
N(4)-C(6)-N(3)-N(2)	179.2(4)
S(3)-C(6)-N(3)-N(2)	-1.2(7)
C(5)-N(2)-N(3)-C(6)	-168.7(5)
Ru(2)-N(2)-N(3)-C(6)	11.8(6)
N(3)-C(6)-N(4)-C(7)	0.7(8)
S(3)-C(6)-N(4)-C(7)	-178.9(4)
C(6)-N(4)-C(7)-C(8)	-171.1(5)
N(7)-Ru(1)-C(9)-C(11)	-157.4(3)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(11)	-29.6(3)
C(15)-Ru(1)-C(9)-C(11)	-103.0(3)
C(13)-Ru(1)-C(9)-C(11)	-66.0(3)

C(16)-Ru(1)-C(9)-C(11)	-131.4(5)
S(4)-Ru(1)-C(9)-C(11)	37.8(4)
S(3)-Ru(1)-C(9)-C(11)	115.4(3)
N(7)-Ru(1)-C(9)-C(16)	-26.1(5)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(16)	101.8(3)
C(15)-Ru(1)-C(9)-C(16)	28.4(3)
C(11)-Ru(1)-C(9)-C(16)	131.4(5)
C(13)-Ru(1)-C(9)-C(16)	65.4(3)
S(4)-Ru(1)-C(9)-C(16)	169.2(3)
S(3)-Ru(1)-C(9)-C(16)	-113.3(3)
N(7)-Ru(1)-C(9)-C(10)	88.3(6)
C(12)-Ru(1)-C(9)-C(10)	-143.8(6)
C(15)-Ru(1)-C(9)-C(10)	142.8(6)
C(11)-Ru(1)-C(9)-C(10)	-114.2(6)
C(13)-Ru(1)-C(9)-C(10)	179.8(5)
C(16)-Ru(1)-C(9)-C(10)	114.4(6)
S(4)-Ru(1)-C(9)-C(10)	-76.4(5)
S(3)-Ru(1)-C(9)-C(10)	1.1(5)
N(7)-Ru(1)-C(13)-C(12)	-148.6(3)
C(15)-Ru(1)-C(13)-C(12)	130.6(5)
C(11)-Ru(1)-C(13)-C(12)	29.7(3)
C(16)-Ru(1)-C(13)-C(12)	101.9(4)
C(9)-Ru(1)-C(13)-C(12)	65.9(3)
S(4)-Ru(1)-C(13)-C(12)	-65.6(3)
S(3)-Ru(1)-C(13)-C(12)	72.4(8)
N(7)-Ru(1)-C(13)-C(15)	80.8(3)
C(12)-Ru(1)-C(13)-C(15)	-130.6(5)
C(11)-Ru(1)-C(13)-C(15)	-100.9(4)
C(16)-Ru(1)-C(13)-C(15)	-28.7(3)
C(9)-Ru(1)-C(13)-C(15)	-64.7(3)
S(4)-Ru(1)-C(13)-C(15)	163.8(3)
S(3)-Ru(1)-C(13)-C(15)	-58.2(8)
N(7)-Ru(1)-C(13)-C(17)	-33.1(6)
C(12)-Ru(1)-C(13)-C(17)	115.5(7)
C(15)-Ru(1)-C(13)-C(17)	-113.9(7)
C(11)-Ru(1)-C(13)-C(17)	145.2(6)
C(16)-Ru(1)-C(13)-C(17)	-142.6(6)
C(9)-Ru(1)-C(13)-C(17)	-178.6(6)

S(4)-Ru(1)-C(13)-C(17)	49.9(6)
S(3)-Ru(1)-C(13)-C(17)	-172.1(5)
C(16)-C(9)-C(11)-C(12)	0.1(8)
C(10)-C(9)-C(11)-C(12)	179.3(5)
Ru(1)-C(9)-C(11)-C(12)	53.8(4)
C(16)-C(9)-C(11)-Ru(1)	-53.8(4)
C(10)-C(9)-C(11)-Ru(1)	125.4(5)
N(7)-Ru(1)-C(11)-C(9)	110.7(8)
C(12)-Ru(1)-C(11)-C(9)	132.4(5)
C(15)-Ru(1)-C(11)-C(9)	65.9(3)
C(13)-Ru(1)-C(11)-C(9)	103.6(3)
C(16)-Ru(1)-C(11)-C(9)	29.4(3)
S(4)-Ru(1)-C(11)-C(9)	-152.5(3)
S(3)-Ru(1)-C(11)-C(9)	-67.9(3)
N(7)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-21.7(10)
C(15)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-66.6(3)
C(13)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-28.9(3)
C(16)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-103.0(3)
C(9)-Ru(1)-C(11)-C(12)	-132.4(5)
S(4)-Ru(1)-C(11)-C(12)	75.0(3)
S(3)-Ru(1)-C(11)-C(12)	159.6(3)
C(15)-C(13)-C(12)-C(11)	-2.8(7)
C(17)-C(13)-C(12)-C(11)	176.4(5)
Ru(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-55.7(4)
C(15)-C(13)-C(12)-Ru(1)	52.9(4)
C(17)-C(13)-C(12)-Ru(1)	-127.9(5)
C(9)-C(11)-C(12)-C(13)	1.0(8)
Ru(1)-C(11)-C(12)-C(13)	56.5(4)
C(9)-C(11)-C(12)-Ru(1)	-55.4(5)
N(7)-Ru(1)-C(12)-C(13)	41.6(4)
C(15)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-30.3(3)
C(11)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-132.1(5)
C(16)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-67.0(3)
C(9)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-103.6(4)
S(4)-Ru(1)-C(12)-C(13)	119.4(3)
S(3)-Ru(1)-C(12)-C(13)	-162.4(3)
N(7)-Ru(1)-C(12)-C(11)	173.7(3)
C(15)-Ru(1)-C(12)-C(11)	101.8(3)

C(13)-Ru(1)-C(12)-C(11)	132.1(5)
C(16)-Ru(1)-C(12)-C(11)	65.1(3)
C(9)-Ru(1)-C(12)-C(11)	28.5(3)
S(4)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-108.5(3)
S(3)-Ru(1)-C(12)-C(11)	-30.3(4)
C(11)-C(9)-C(16)-C(15)	0.7(8)
C(10)-C(9)-C(16)-C(15)	-178.5(5)
Ru(1)-C(9)-C(16)-C(15)	-52.5(5)
C(11)-C(9)-C(16)-Ru(1)	53.2(4)
C(10)-C(9)-C(16)-Ru(1)	-126.0(5)
N(7)-Ru(1)-C(16)-C(15)	-61.9(3)
C(12)-Ru(1)-C(16)-C(15)	66.1(3)
C(11)-Ru(1)-C(16)-C(15)	104.0(4)
C(13)-Ru(1)-C(16)-C(15)	29.2(3)
C(9)-Ru(1)-C(16)-C(15)	133.4(5)
S(4)-Ru(1)-C(16)-C(15)	95.7(7)
S(3)-Ru(1)-C(16)-C(15)	-156.9(3)
N(7)-Ru(1)-C(16)-C(9)	164.7(3)
C(12)-Ru(1)-C(16)-C(9)	-67.2(3)
C(15)-Ru(1)-C(16)-C(9)	-133.4(5)
C(11)-Ru(1)-C(16)-C(9)	-29.4(3)
C(13)-Ru(1)-C(16)-C(9)	-104.1(3)
S(4)-Ru(1)-C(16)-C(9)	-37.7(9)
S(3)-Ru(1)-C(16)-C(9)	69.7(3)
C(9)-C(16)-C(15)-C(13)	-2.6(8)
Ru(1)-C(16)-C(15)-C(13)	-56.1(5)
C(9)-C(16)-C(15)-Ru(1)	53.6(5)
C(12)-C(13)-C(15)-C(16)	3.5(8)
C(17)-C(13)-C(15)-C(16)	-175.7(5)
Ru(1)-C(13)-C(15)-C(16)	56.4(5)
C(12)-C(13)-C(15)-Ru(1)	-52.8(4)
C(17)-C(13)-C(15)-Ru(1)	128.0(5)
N(7)-Ru(1)-C(15)-C(16)	124.7(3)
C(12)-Ru(1)-C(15)-C(16)	-102.6(4)
C(11)-Ru(1)-C(15)-C(16)	-64.6(3)
C(13)-Ru(1)-C(15)-C(16)	-132.5(5)
C(9)-Ru(1)-C(15)-C(16)	-28.2(3)
S(4)-Ru(1)-C(15)-C(16)	-158.3(3)

S(3)-Ru(1)-C(15)-C(16)	32.8(4)
N(7)-Ru(1)-C(15)-C(13)	-102.8(3)
C(12)-Ru(1)-C(15)-C(13)	29.8(3)
C(11)-Ru(1)-C(15)-C(13)	67.9(3)
C(16)-Ru(1)-C(15)-C(13)	132.5(5)
C(9)-Ru(1)-C(15)-C(13)	104.3(3)
S(4)-Ru(1)-C(15)-C(13)	-25.9(4)
S(3)-Ru(1)-C(15)-C(13)	165.2(2)
C(12)-C(13)-C(17)-C(19)	-76.8(7)
C(15)-C(13)-C(17)-C(19)	102.4(7)
Ru(1)-C(13)-C(17)-C(19)	-167.7(5)
C(12)-C(13)-C(17)-C(18)	46.0(7)
C(15)-C(13)-C(17)-C(18)	-134.8(6)
Ru(1)-C(13)-C(17)-C(18)	-44.9(8)
N(2)-Ru(2)-C(24)-C(23)	-169.2(3)
C(22)-Ru(2)-C(24)-C(23)	28.3(3)
C(26)-Ru(2)-C(24)-C(23)	128.8(5)
C(27)-Ru(2)-C(24)-C(23)	100.5(4)
C(21)-Ru(2)-C(24)-C(23)	64.8(3)
S(3)-Ru(2)-C(24)-C(23)	-87.9(3)
S(4)-Ru(2)-C(24)-C(23)	-7.2(5)
N(2)-Ru(2)-C(24)-C(26)	62.0(4)
C(23)-Ru(2)-C(24)-C(26)	-128.8(5)
C(22)-Ru(2)-C(24)-C(26)	-100.5(4)
C(27)-Ru(2)-C(24)-C(26)	-28.4(3)
C(21)-Ru(2)-C(24)-C(26)	-64.1(3)
S(3)-Ru(2)-C(24)-C(26)	143.3(3)
S(4)-Ru(2)-C(24)-C(26)	-136.0(3)
N(2)-Ru(2)-C(24)-C(28)	-57.4(5)
C(23)-Ru(2)-C(24)-C(28)	111.7(6)
C(22)-Ru(2)-C(24)-C(28)	140.0(6)
C(26)-Ru(2)-C(24)-C(28)	-119.5(7)
C(27)-Ru(2)-C(24)-C(28)	-147.8(6)
C(21)-Ru(2)-C(24)-C(28)	176.5(5)
S(3)-Ru(2)-C(24)-C(28)	23.9(5)
S(4)-Ru(2)-C(24)-C(28)	104.6(5)
C(26)-C(24)-C(23)-C(22)	1.1(8)
C(28)-C(24)-C(23)-C(22)	-177.8(5)

Ru(2)-C(24)-C(23)-C(22)	-54.2(5)
C(26)-C(24)-C(23)-Ru(2)	55.3(5)
C(28)-C(24)-C(23)-Ru(2)	-123.6(5)
N(2)-Ru(2)-C(23)-C(22)	154.0(4)
C(26)-Ru(2)-C(23)-C(22)	102.5(4)
C(24)-Ru(2)-C(23)-C(22)	133.6(5)
C(27)-Ru(2)-C(23)-C(22)	65.4(4)
C(21)-Ru(2)-C(23)-C(22)	28.9(3)
S(3)-Ru(2)-C(23)-C(22)	-132.8(3)
S(4)-Ru(2)-C(23)-C(22)	-49.9(4)
N(2)-Ru(2)-C(23)-C(24)	20.4(6)
C(22)-Ru(2)-C(23)-C(24)	-133.6(5)
C(26)-Ru(2)-C(23)-C(24)	-31.1(3)
C(27)-Ru(2)-C(23)-C(24)	-68.2(3)
C(21)-Ru(2)-C(23)-C(24)	-104.6(4)
S(3)-Ru(2)-C(23)-C(24)	93.6(3)
S(4)-Ru(2)-C(23)-C(24)	176.5(3)
C(24)-C(23)-C(22)-C(21)	-2.2(9)
Ru(2)-C(23)-C(22)-C(21)	-56.7(5)
C(24)-C(23)-C(22)-Ru(2)	54.5(5)
N(2)-Ru(2)-C(22)-C(23)	-129.5(7)
C(26)-Ru(2)-C(22)-C(23)	-66.0(3)
C(24)-Ru(2)-C(22)-C(23)	-28.4(3)
C(27)-Ru(2)-C(22)-C(23)	-102.9(4)
C(21)-Ru(2)-C(22)-C(23)	-132.5(5)
S(3)-Ru(2)-C(22)-C(23)	54.3(4)
S(4)-Ru(2)-C(22)-C(23)	136.9(3)
N(2)-Ru(2)-C(22)-C(21)	3.0(9)
C(23)-Ru(2)-C(22)-C(21)	132.5(5)
C(26)-Ru(2)-C(22)-C(21)	66.5(3)
C(24)-Ru(2)-C(22)-C(21)	104.0(4)
C(27)-Ru(2)-C(22)-C(21)	29.6(3)
S(3)-Ru(2)-C(22)-C(21)	-173.3(3)
S(4)-Ru(2)-C(22)-C(21)	-90.7(3)
C(23)-C(22)-C(21)-C(27)	2.4(8)
Ru(2)-C(22)-C(21)-C(27)	-52.8(4)
C(23)-C(22)-C(21)-C(20)	-179.8(5)
Ru(2)-C(22)-C(21)-C(20)	125.0(5)

C(23)-C(22)-C(21)-Ru(2)	55.2(5)
N(2)-Ru(2)-C(21)-C(27)	-48.3(4)
C(23)-Ru(2)-C(21)-C(27)	101.7(4)
C(22)-Ru(2)-C(21)-C(27)	130.7(5)
C(26)-Ru(2)-C(21)-C(27)	28.6(3)
C(24)-Ru(2)-C(21)-C(27)	65.1(3)
S(3)-Ru(2)-C(21)-C(27)	143.8(3)
S(4)-Ru(2)-C(21)-C(27)	-139.5(3)
N(2)-Ru(2)-C(21)-C(22)	-179.0(3)
C(23)-Ru(2)-C(21)-C(22)	-29.0(3)
C(26)-Ru(2)-C(21)-C(22)	-102.1(4)
C(24)-Ru(2)-C(21)-C(22)	-65.6(3)
C(27)-Ru(2)-C(21)-C(22)	-130.7(5)
S(3)-Ru(2)-C(21)-C(22)	13.1(5)
S(4)-Ru(2)-C(21)-C(22)	89.8(3)
N(2)-Ru(2)-C(21)-C(20)	67.5(6)
C(23)-Ru(2)-C(21)-C(20)	-142.5(6)
C(22)-Ru(2)-C(21)-C(20)	-113.6(6)
C(26)-Ru(2)-C(21)-C(20)	144.4(6)
C(24)-Ru(2)-C(21)-C(20)	-179.2(5)
C(27)-Ru(2)-C(21)-C(20)	115.8(6)
S(3)-Ru(2)-C(21)-C(20)	-100.5(5)
S(4)-Ru(2)-C(21)-C(20)	-23.8(5)
C(28)-C(24)-C(26)-C(27)	178.6(6)
Ru(2)-C(24)-C(26)-C(27)	54.7(5)
C(23)-C(24)-C(26)-Ru(2)	-54.9(4)
C(28)-C(24)-C(26)-Ru(2)	123.9(6)
N(2)-Ru(2)-C(26)-C(27)	100.3(4)
C(23)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-102.3(4)
C(22)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-65.2(4)
C(24)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-133.4(5)
C(21)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-28.1(3)
S(3)-Ru(2)-C(26)-C(27)	-178.1(3)
S(4)-Ru(2)-C(26)-C(27)	0.8(6)
N(2)-Ru(2)-C(26)-C(24)	-126.3(3)
C(23)-Ru(2)-C(26)-C(24)	31.1(3)
C(22)-Ru(2)-C(26)-C(24)	68.2(3)
C(27)-Ru(2)-C(26)-C(24)	133.4(5)



C(21)-Ru(2)-C(26)-C(24)	105.3(4)
S(3)-Ru(2)-C(26)-C(24)	-44.7(4)
S(4)-Ru(2)-C(26)-C(24)	134.2(3)
C(22)-C(21)-C(27)-C(26)	-1.6(8)
C(20)-C(21)-C(27)-C(26)	-179.4(5)
Ru(2)-C(21)-C(27)-C(26)	-53.6(5)
C(22)-C(21)-C(27)-Ru(2)	51.9(4)
C(20)-C(21)-C(27)-Ru(2)	-125.8(5)
C(24)-C(26)-C(27)-C(21)	0.6(9)
Ru(2)-C(26)-C(27)-C(21)	54.9(5)
C(24)-C(26)-C(27)-Ru(2)	-54.3(5)
N(2)-Ru(2)-C(27)-C(21)	142.6(3)
C(23)-Ru(2)-C(27)-C(21)	-67.1(3)
C(22)-Ru(2)-C(27)-C(21)	-30.1(3)
C(26)-Ru(2)-C(27)-C(21)	-133.3(5)
C(24)-Ru(2)-C(27)-C(21)	-104.8(4)
S(3)-Ru(2)-C(27)-C(21)	-128.8(4)
S(4)-Ru(2)-C(27)-C(21)	47.1(4)
N(2)-Ru(2)-C(27)-C(26)	-84.1(4)
C(23)-Ru(2)-C(27)-C(26)	66.2(4)
C(22)-Ru(2)-C(27)-C(26)	103.2(4)
C(24)-Ru(2)-C(27)-C(26)	28.5(3)
C(21)-Ru(2)-C(27)-C(26)	133.3(5)
S(3)-Ru(2)-C(27)-C(26)	4.5(7)
S(4)-Ru(2)-C(27)-C(26)	-179.6(3)
C(23)-C(24)-C(28)-C(30)	-75.5(7)
C(26)-C(24)-C(28)-C(30)	105.7(7)
Ru(2)-C(24)-C(28)-C(30)	-162.2(5)
C(23)-C(24)-C(28)-C(29)	158.4(5)
C(26)-C(24)-C(28)-C(29)	-20.4(8)
Ru(2)-C(24)-C(28)-C(29)	71.7(7)
Ru(1)-S(4)-C(31)-N(6)	-6.5(4)
Ru(2)-S(4)-C(31)-N(6)	93.1(4)
Ru(1)-S(4)-C(31)-N(5)	170.9(4)
Ru(2)-S(4)-C(31)-N(5)	-89.6(4)
N(5)-C(31)-N(6)-N(7)	-178.4(4)
S(4)-C(31)-N(6)-N(7)	-1.2(6)
N(6)-C(31)-N(5)-C(33)	7.2(8)

S(4)-C(31)-N(5)-C(33)	-170.1(4)
C(31)-N(6)-N(7)-C(32)	-169.3(5)
C(31)-N(6)-N(7)-Ru(1)	10.7(6)
C(12)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-109.7(4)
C(15)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-48.7(4)
C(11)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-92.5(9)
C(13)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-85.8(4)
C(16)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-16.7(5)
C(9)-Ru(1)-N(7)-C(32)	-0.3(6)
S(4)-Ru(1)-N(7)-C(32)	168.4(4)
S(3)-Ru(1)-N(7)-C(32)	86.2(4)
C(12)-Ru(1)-N(7)-N(6)	70.3(4)
C(15)-Ru(1)-N(7)-N(6)	131.3(4)
C(11)-Ru(1)-N(7)-N(6)	87.5(9)
C(13)-Ru(1)-N(7)-N(6)	94.2(4)
C(16)-Ru(1)-N(7)-N(6)	163.4(3)
C(9)-Ru(1)-N(7)-N(6)	179.7(3)
S(4)-Ru(1)-N(7)-N(6)	-11.6(3)
S(3)-Ru(1)-N(7)-N(6)	-93.8(3)
N(6)-N(7)-C(32)-C(35)	1.3(8)
Ru(1)-N(7)-C(32)-C(35)	-178.7(4)
C(31)-N(5)-C(33)-C(34)	101.2(6)
C(37)-O(4)-C(35)-C(36)	0.3(6)
C(37)-O(4)-C(35)-C(32)	-178.8(5)
N(7)-C(32)-C(35)-C(36)	-2.5(12)
N(7)-C(32)-C(35)-O(4)	176.2(5)
O(4)-C(35)-C(36)-C(38)	-0.4(6)
C(32)-C(35)-C(36)-C(38)	178.4(7)
C(35)-O(4)-C(37)-C(38)	-0.1(6)
C(35)-O(4)-C(37)-N(8)	177.1(5)
O(4)-C(37)-C(38)-C(36)	-0.1(7)
N(8)-C(37)-C(38)-C(36)	-176.8(6)
C(35)-C(36)-C(38)-C(37)	0.3(7)
C(38)-C(37)-N(8)-O(6)	174.0(7)
O(4)-C(37)-N(8)-O(6)	-2.6(9)
C(38)-C(37)-N(8)-O(5)	-1.9(10)
O(4)-C(37)-N(8)-O(5)	-178.5(5)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

### 5.2.2.1.2 ESTUDIO DE RMN

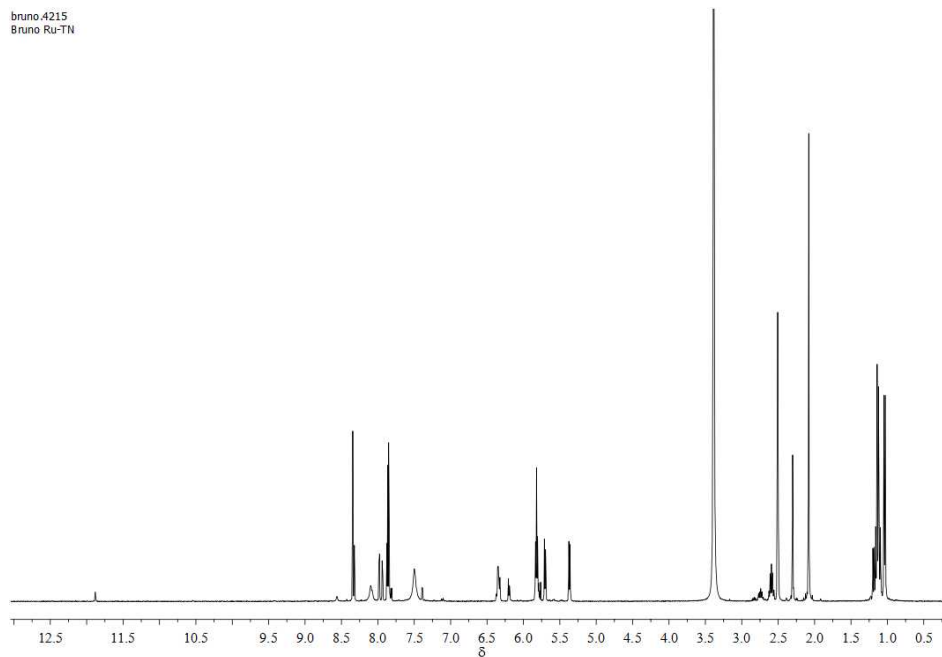


Figura 2: Espectro <sup>1</sup>H-RMN de RuL1.

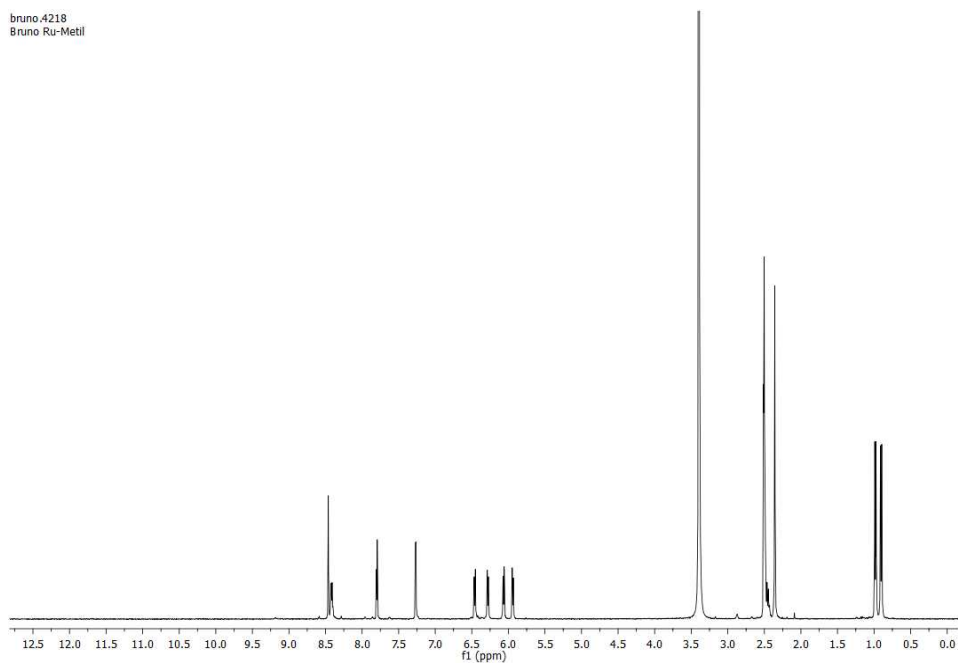


Figura 3: Espectro <sup>1</sup>H-RMN de RuL2.

bruno.4216  
Bruno Ru-Etil

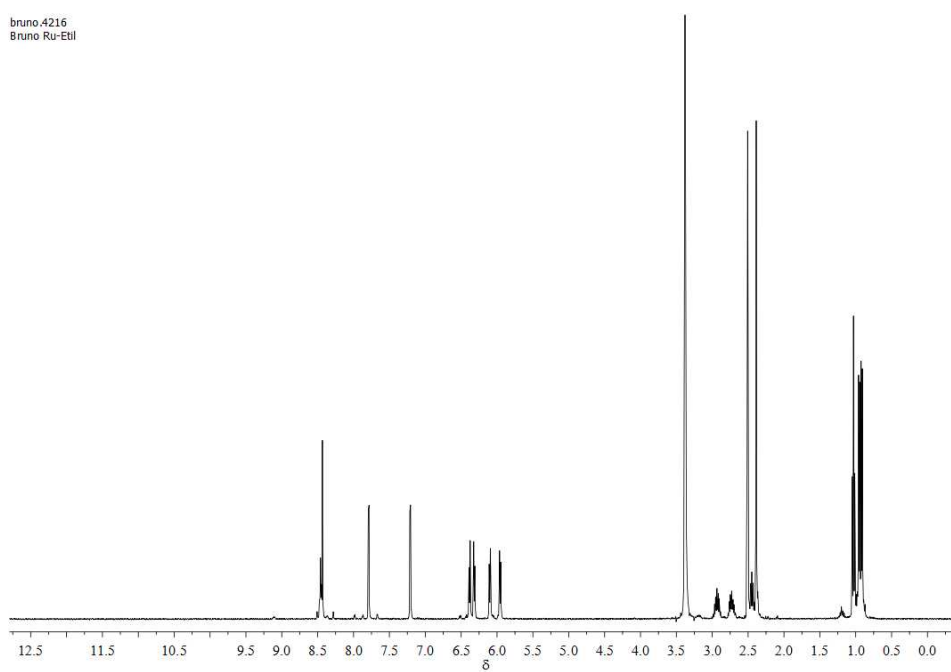


Figura 4: Espectro <sup>1</sup>H-RMN de RuL3.

bruno.4217  
Bruno Ru-Fenil

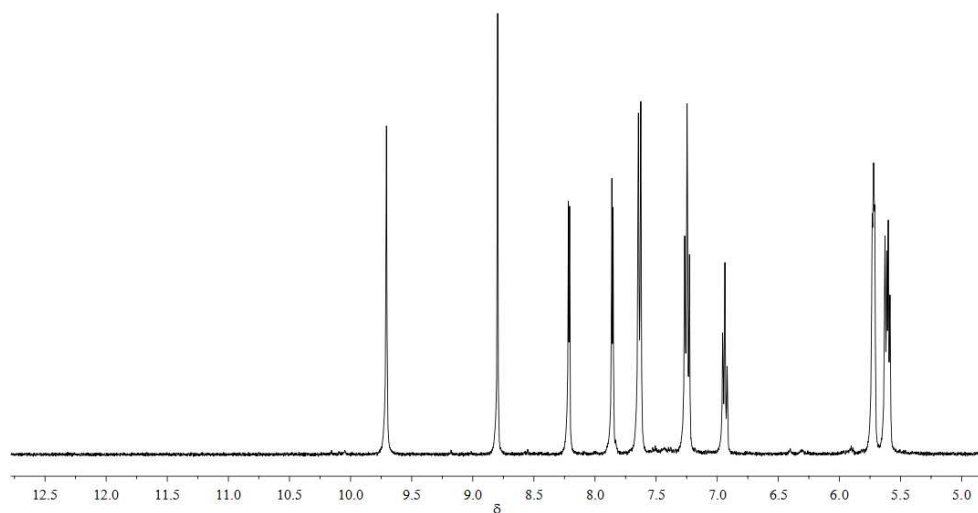


Figura 5: Espectro <sup>1</sup>H-RMN de RuL4.

