

UCH-FC
DOC-Q
P473
C.1



**ROMPIMIENTO DE ENLACES S-H EN TIOLES Y EN
MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO POR
COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS DE HIERRO Y
RUTENIO.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Química

Facultad de Ciencias

por

Alejandra Pesce Gómez



Directores de tesis: Dr. Carlos Díaz Valenzuela, Universidad de Chile.

**Dr. Gustavo Zúñiga Navarro, Universidad de Santiago
de Chile.**

2007

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Alejandra Pesce Gómez

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el 22 de Enero de 2007.

Directores de Tesis:

Dr. Carlos Díaz

Dr. Gustavo Zúñiga



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Claudio Olea (Presidente)

Dr. Sergio Moya

Dra. Bárbara Loeb

Dra. Carla Delporte

Dra. María Antonieta Valenzuela



DEDICATORIA

"La luz de la razón disipa las tinieblas de la ignorancia"

(Anónimo)

[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

A mi amado Carlos...

" sin ti no hubiese logrado la meta".





Nací el 11 de Febrero de 1976, en Santiago. Soy la tercera de cinco hermanos. Viví con mis padres hasta el año 2003, cuando decidí que era hora de emprender el vuelo. Hoy vivo, felizmente con mi novio Carlos.

Me gusta viajar, conocer gente nueva y otras culturas. Tengo la suerte de haber viajado mucho junto a mi novio y haber recorrido muchas partes hermosas, tanto de Chile como del extranjero.

Disfruto mucho escuchar música, ver una buena película y conversar con los que me rodean.

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis Dr. Carlos Díaz y Dr. Gustavo Zúñiga, por creer en mi, por su apoyo y dedicación, por guiarme y darme las herramientas necesarias para hacer realidad esta tesis.

- A todos los integrantes del laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Dr. Guillermo González, Dr. Nicolás Yutronic y en especial al Dr. Juan Merchan por su apoyo incondicional y por creer siempre en mi.

- A todos los integrantes del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, que me recibieron con una excelente disposición y me aportaron todos sus conocimientos.

- A los integrantes de la Comisión de Evaluación de mi Tesis: Dr. Claudio Olea, Dra. Bárbara Loeb, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Carla Delporte y Dr. Sergio Moya, por sus valiosos aportes y apoyo.

- A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por la beca doctoral y Beca de Apoyo de Tesis (AT-4040081).



- A mis padres, hermanos, sobrinos y cuñado, por haberme apoyado y brindado fuerzas durante todo estos largos años de estudio y por creer siempre en mí.

- A mis suegros, cuñados y sobrinos que siempre me han apoyado y han dado fuerza.

- A mis amigos Saddys Rodríguez, Hernán Ahumada, María Luisa Valenzuela, Rodrigo Montecinos y Carolina Rigol por su amistad incondicional, apoyo y ayuda.

- A Belén, Hugo, Alexis y tantos otros por estar ahí y darme ideas frescas para mi tesis.

- A todas las personas que de una u otra forma estuvieron conmigo en estos años.



RESUMEN

En los últimos años, la química de los ligantes que contienen sulfuro orgánico ha alcanzado gran relevancia, esto debido a la importancia de los sistemas biológicos que contiene metales y utilizan organo-sulfuros como grupo funcional coordinante. De estos, los más importantes son las metaloproteínas de Fe-S. Estas proteínas contienen sitios activos de coordinación tetraédrica de Fe (II) o Fe (III), con átomos de azufre provenientes de ligantes cisteína (Cys). Muchas de las transformaciones químicas de los procesos biológicos involucran procesos de transferencia de electrones a través del enlace Fe-S, por lo cual el comportamiento del enlace metal-tiolato (M-S) es esencial para el entendimiento de estos procesos.

Las cisteínas proteasas (Cys proteasas) son una importante clase de enzimas en las cuales el grupo reactivo del sitio activo involucrado en la catálisis es un tiol. Ellas están ubicadas en la naturaleza y poseen papeles vitales en numerosos procesos fisiológicos. Se han utilizado muchos compuestos orgánicos como inhibidores de estas enzimas, buscando un método de modulación de su actividad, sin embargo, hasta hoy no se han utilizado complejos organometálicos como inhibidores de ellas.

Algunos de los compuestos orgánicos capaces de inhibir las Cys proteasas, son utilizados como agentes terapéuticos, los cuales interaccionan con la enzima a través de una unión débil, como lo puede ser un puente de hidrógeno o una interacción de Van der Waals. Estos compuestos poseen efectos secundarios debido al corto tiempo de permanencia que tienen en la molécula blanco, permitiendo más interacciones con otras moléculas. Una alternativa podría ser el uso de complejos organometálicos, los que podrían resultar buenos inhibidores de las Cys proteasas y de baja toxicidad.

La reactividad de compuestos organometálicos del tipo $CpFe(dppe)I$ hacia tioles modelos sugiere que estos podrían modificar la actividad de enzimas cisteínas proteasas tales como la papaína.

En la presente tesis doctoral se realiza un estudio del efecto que poseen ciertos complejos organometálicos de Fe (II) y Ru (II) del tipo $Cp^{(*)}(L_1L_2)M^{(II)}X$ sobre la actividad de la papaína.

Específicamente, se trabajó en:

1. - Síntesis y caracterización de los compuestos organometálicos: $Cp(dppe)M^{(II)}X$ ($M = Fe, Ru; X = I, Cl$, respectivamente), $Cp^*Ru(dppe)Cl$ y $CpRu(PPh_3)_2Cl$.
2. - Estudio del rompimiento del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos, y caracterización los complejos resultantes.
3. - Estudio del efecto de los derivados organometálicos sobre la actividad de la papaína (Cys proteasa).

Se encontró que los compuestos organometálicos de Ru (II) no reaccionan ni con los tioles modelos ni con sistemas más complejos como la papaína. Por otra parte, se encontró que el compuesto organometálico de Fe (II), $Cp(dppe)FeI$ si reacciona con los tioles modelos y con la papaína, produciendo una disminución de su actividad a tiempos largos. Las diferencias de las reactividades de estos compuestos se discuten en base a diferencia en las densidades electrónicas del metal en cada compuesto. Se discute una posible aplicación de estos resultados en sistemas biológicos.

ABSTRACT

In recent years, the chemistry of ligands that contains organic sulfur has reached great relevance due to the importance of biological systems that have metals and use an organic sulfur like functional coordinate group. Of these, the most important are the metalloproteins of Fe-S. These proteins contain active sites of tetrahedral coordination of Fe (II) or Fe (III) with sulfur atoms that arise from cystein ligands. Many chemical transformations of biological processes involve electronic transfer through Fe-S bond, and for this reason, the behavior of metal-sulfur bond is essential to understand of these processes.

Cystein proteases (Cys proteases) are an important class of enzymes in which the reactive group at the active site involved in catalysis is a thiol group. They are very common in nature and have vital roles in numerous physiological processes. Many organics compounds have been used as inhibitors of these enzymes, looking for method of modulation of their activity. However, until now, organometallics complexes have not been used as inhibitors of Cys proteases.

Some organic compounds are able to inhibit cys proteases and are used as therapeutics agents, which interact with enzymes through a weak union, like a hydrogen bond or a Van der Waals interaction. These compounds have secondary effects due to the short time of permanency that they have in the target, allowing more interaction with other molecules.

The reactivity of organometallic compounds like Cp (dppe)FeI towards thiol models suggest that it could modify the activity of cys proteases like papain.

The intent of this doctoral thesis is to study of the effects that some organometallics complexes of Fe (II) and Ru (II) like $\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(II)}\text{X}$ have on the activity of papain.

Specifically it worked in:

1. Synthesis and characterization of the organometallic compounds: $\text{Cp}(\text{dppe})\text{M}^{(\text{II})}\text{X}$ ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Ru}$; $\text{X} = \text{I}, \text{Cl}$, respectively), $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{Ru}^{(\text{II})}\text{Cl}$ and $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^{(\text{II})}\text{Cl}$.
2. The study of S-H bond cleavage in thiols with organometallic complexes and the characterization of resulting complexes.
3. The study of the effect of organometallic complexes on the activity of papain.

We found that organometallics compounds of Ru (II) do not react neither with thiol models nor with complex systems like papain. On the other hand, we found that the organometallic compound of Fe (II), $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ reacts with thiols and papain, producing a decrease in its activity to long time of reaction.

The differences of reactivities of these compounds are discussed on the basis of differences in the electronic densities on the metals in each compound.

A possible application of these results in biological systems is discussed.

ÍNDICE DE LAS MATERIAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes bibliográficos	1
1.2 Rompimiento de enlace S-H.	2
1.3 Cisteínas Proteasas	8
1.4 Hipótesis	21
1.5 Objetivos generales y específicos	21
2. PARTE EXPERIMENTAL	23
2.1 Reactivos	23
2.2 Técnicas Instrumentales	24
2.3 Procedimientos experimentales	26
2.3.1 Síntesis y caracterización de los complejos organometálicos	26
2.3.1.1 Síntesis del complejo Cp(dppe)FeI	26
2.3.1.2 Síntesis del complejo Cp(dppe)RuCl	27
2.3.1.3 Síntesis del complejo Cp*(dppe)RuCl	28
2.3.1.4 Síntesis del complejo CpRu(PPh ₃) ₂ Cl.	29
2.3.2 Estudio de la activación del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos.	30
2.3.3 Estudio del efecto de los derivados organometálicos sobre la Papaína.	33
2.3.3.1 Estudio de la actividad enzimática.	33

2.3.3.2	Efecto del complejo organometálico Cp(dppe)FeI sobre la actividad de la papaína.	34
2.3.3.3	Efecto de la concentración del complejo organometálico en la actividad de la papaína.	35
2.3.3.4	Efecto del tiempo de interacción entre el complejo organometálico Cp(dppe)FeI y papaína en la actividad de la enzima.	36
2.3.3.5	Efecto de complejos organometálicos de rutenio sobre la actividad de la papaína.	37
2.3.3.6	Cálculo del IC ₅₀ .	38
2.3.3.7	EPR de la reacción de la enzima con los compuestos organometálicos.	39
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1	Síntesis y caracterización de los complejos organometálicos	40
3.2	Estudio de la activación del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos.	44
3.3	Estudio del efecto de los derivados organometálicos sobre la actividad de la papaína.	53
3.4	Discusión General.	71
4.	CONCLUSIONES	77

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Protocolo para el estudio de la actividad enzimática	33
2. Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico Cp(dppe)FeI sobre la actividad enzimática.	34
3. Protocolo para el estudio de la variación de la concentración del complejo organometálico.	35
4. Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico sobre la actividad de la enzima. Reacción por 24 hrs.	37
5. Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico de rutenio sobre la actividad de la enzima.	38
6. Protocolo para el cálculo del IC ₅₀ .	39
7. Rendimiento de las síntesis de los complejos organometálicos.	40
8. IR de los complejos obtenidos.	49
9. Análisis Elemental de Los Complejos [Cp(dppe)Fe-SR]PF ₆ .	51
10. EPR y UV-visible de los complejos [Cp(dppe)Fe-SR]PF ₆ .	52
11. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tiempo de reacción t _{Rx} (min).	55
12. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.	57
13. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.	58
14. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.	60
15. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.	62
16. Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Reacción del complejo organometálico Cp(dppe)FeI con tioles.	4
2. Reacción de inhibición de cys proteasa con peptidil nitrilos.	8
3. Reacción de inhibición de cys proteasa con epoxisuccinil compuestos.	9
4. Estructura terciaria de la papaína.	12
5. Par tiolato-himidazol del sitio activo de cys proteasas.	14
6. Mecanismo catalítico de cys proteasas.	15
7. Tioles modelos a utilizados en la reacciones con complejos organometálicos.	32
8. Espectro RMN ³¹ P del complejo Cp(PPh ₃) ₂ RuCl.	41
9. Espectro RMN ³¹ P del complejo Cp*(dppe)RuCl.	42
10. Espectro IR del complejo Cp*(dppe)RuCl.	42
11. Espectro NMR ³¹ P del Compuesto Cp(dppe)RuCl en CDCl ₃ .	44
12. Espectro IR del Complejo [Cp(dppe)Fe-DTT ⁺], en pastilla de KBr.	47
13. Espectro IR del Complejo [Cp*(dppe)Ru-DTT ⁺], en pastilla de KBr.	47
14. Espectro RMN de ³¹ P para productos de las reacciones de Cp*(dppe)Ru ⁺ + DTT (a) y Cp*(dppe)RuCl (b) .	50
15. Espectro EPR del Complejo (3) , a temperatura ambiente y en solución de CH ₂ Cl ₂ .	52
16. Espectro UV-visible del Complejo (1) , a temperatura ambiente y en solución de CH ₂ Cl ₂ .	53
17. Gráfico de la cinética enzimática de la papaína .	55
18. Gráfico del efecto del Cp(dppe)Fe ⁺ sobre la actividad de la papaína.	56

19.	Gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ sobre la actividad de la enzima.	58
20.	Gráfico del efecto del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ sobre la actividad de la enzima.	60
21.	Gráfico del efecto de diversos Complejos Organometálicos sobre la actividad de la enzima.	62
22.	Gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ sobre la actividad de la papaína (IC_{50}).	63
23.	Aproximación potencial del gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ sobre la actividad de la papaína.	64
24.	Gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Ru}^+$ sobre la actividad de la enzima.	65
25.	Aproximación exponencial del gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Ru}^+$ sobre la actividad de la enzima.	66
26.	Efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$ sobre la actividad de la enzima.	67
27.	Aproximación polinomial de 4º orden del gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$ sobre la actividad de la enzima.	68
28.	Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$.	70
29.	Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Ru}^+$.	70
30.	Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$.	71

31.	Intermediario del rompimiento de el enlace SH	72
32.	Diagrama de orbitales moleculares (OM) de la reacción del complejo $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ con un tiol RSH.	73
33.	Diferencia en las densidades electrónicas presentes sobre el metal en cada complejo del tipo $\text{Cp}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^+$ (M= Fe y Ru).	74
34.	Diagrama de OM simplificado para los fragmentos $\text{CpFe}(\text{PPh}_3)^{2+}$ y $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)^{2+}$.	75
35.	Inhibición de una cys proteasa por acción de la formación del complejo estable $\text{Ru}(\text{edta})\text{-CP}$ [R=Sustituyente; CP= Cys proteasa].	76
36.	Diagrama esquemático de coordenada de reacción para la reacción de adición oxidativa del complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ con un tiol.	79

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
1. Inhibidores que actúan con el sitio activo.	18
2. Síntesis del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$.	27
3. Síntesis del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{RuCl}$.	28
4. Síntesis del $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{RuCl}$.	29
5. Estructura del complejo $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$.	29
6. Reacción general de un fragmento organometálico con tioles.	31
7. Tioles modelos a utilizados en la reacciones con complejos organometálicos.	32
8. Reacción de $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$ con dppe.	43
9. Productos probables en la reacción de un complejo organometálico con un tiol.	45

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Cys	Cisteína
Cp	Ciclopentadienilo
Cp*	Pentametilciclopentadienilo
Dppe	Difenilfosfinoetano
PPh ₃	Trifenilfosfino
ΔA	Variación de la absorbancia
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
RMN	Resonancia magnética nuclear
IR	Espectroscopía infrarroja
t_{RX}	Tiempo de reacción
DTT	Ditiotreitol
GSH	Glutati6n reducido
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
DMSO	Dimetilsulf6xido
MB	Magnet6n de Bohor
Nm	Nan6metro (10^{-9} metros)
His	Histidina
Asn	Asparragina
Mmol	Milimol (10^{-3} mol)

EDTA	Etilendiaintetraacetato
TCA	Ácido tricloroacético
E	Enzima
Act.	Solución activadora
RSH	Tiol modelo
$[\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{II})}\text{X}]$	Complejo organometálico
L_n	Ligantes
U	Unidad
V	Velocidad
RSSR	Disulfuro
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
LUMO	Orbital molecular desocupado de más baja energía
SOMO	Orbital molecular semi-ocupado

1.

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes bibliográficos

La bioorganometálica es un campo de investigación emergente, la que comprende la síntesis, reacción y aplicación de los complejos organometálicos con ligantes de interés biológico^[1].

En los últimos años, la química de los ligantes que contienen sulfuro orgánico ha alcanzado gran relevancia, debido a la importancia de los sistemas biológicos que contienen metales y utilizan órgano-sulfuros como grupo funcional coordinante. De estos, los más importantes son las metaloproteínas de Fe-S. Estas proteínas contienen sitios activos de coordinación tetraédrica de Fe(II) o Fe(III), con átomos de azufre provenientes de ligantes cisteína (cys)^[1].

Las cisteínas proteasas (cys Proteasas) son una importante clase de enzimas en las cuales el grupo reactivo del sitio activo involucrado en la catálisis es un tiol (SH). Las cys proteasas desempeñan papeles vitales en numerosos procesos fisiológicos^[2,5]. Muchos compuestos orgánicos han sido utilizados como inhibidores de estas enzimas, buscando un método de modulación de su actividad. Sin embargo, hasta hoy no se han utilizado complejos organometálicos como inhibidores de las cys proteasas^[1-5].

1. (a) Severin, K.; Berg, R.; Beck, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1998, **37**, 1084.
(b) Krämer, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1996, **35**, 1197.
2. Hans-Hartwig O, Schirmeister T. *Chem. Rev.* 1997; **97**: 133.
3. Roush, W. R.; Gwaltney, S. L.; Cheng, I.; Scheidt, K. A.; Mckenow, J. H.; Henseel, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 10994.
4. Sudir, A. K. *Biochem. Educ.* 1990, **18**, 67.
5. Schirmeister, T. *J. Med. Chem.* 1999, **42**, 560.

Algunos de los compuestos orgánicos capaces de inhibir las cys proteasas, son utilizados como agentes terapéuticos, los cuales interaccionan con la enzima a través de una unión débil, como lo puede ser un puente de hidrógeno o una interacción de van der Waals [5,6]. Estos compuestos poseen efectos secundarios debido al corto tiempo de permanencia que tiene en la molécula blanco (la enzima), permitiendo más interacciones con otras moléculas. La capacidad de coordinación de los metales apoya la posibilidad que puedan formar uniones fuertes a través de enlaces covalentes e iónicos con la molécula blanco, en este caso la enzima, regulando su actividad.

1.2 Rompimiento de enlaces S-H.

Un aspecto importante de la química de los tiolatos radica en el diseño de modelos de sitios activos de muchas enzimas, tales como citocromos, proteínas Fe-S, clusters Fe-S, ferredoxinas, etc [7]. Muchas de las transformaciones químicas de los procesos biológicos involucran procesos de transferencia de electrones a través del enlace Fe-S, por lo cual caracterizar el comportamiento del enlace metal-tiolato (M-S) es esencial para el entendimiento de estos procesos [8].

6. Louie, A. Y.; Made, T. J. *Chem. Rev.* 1999, **99**, 2711.
7. Kuehn, Ch. G; Isled, S. *Prog. Inorg. Chem.* 1990, **27**, 153.
8. Díaz C, Araya E, Santa Ana M. A. *Polyhedron.* 1998, **17**, 2225.

El rompimiento del enlace S-H por un centro metálico es una reacción clave en muchos procesos bioquímicos, así como en procesos industriales, como lo es la hidrodesulfuración del petróleo y del carbón ^[9-10].

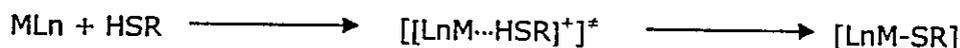
1.2.1 Compuestos Organometálicos.

El rompimiento del enlace S-H, generalmente ocurre con fragmentos organometálicos en bajo estado de oxidación y, en algunos casos este rompimiento es promovido por temperatura o radiación UV. En general, han sido descritos dos caminos para el rompimiento del enlace S-H por complejos organometálicos ^[10-11]:

- a) Mecanismo Radicalario.
- b) Mecanismo de desplazamiento nucleofílico.

1.2.1.1 Mecanismo Radicalario.

En este caso el enlace S-H es roto por un fragmento organometálico radical de 17 electrones, generando un estado de transición $[[LnM...HSR]^+]$ [‡], donde M representa al fragmento organometálico.



- 9. Díaz, C. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 1998, **43**, 477.
- 10. Díaz, C. *Polyhedron* 1997, **16**, 999.
- 11. Díaz, C.; Leal, C.; Yutronic, N. *J. Organomet. Chem.* 1996, **516**, 59.

1.2.1.2 Mecanismo de desplazamiento Nucleofílico.

En este caso el enlace S-H es roto por un fragmento organometálico de 16 electrones, y el estado de transición postulado es $[\text{LnM-HSR}]^+$ (este ha sido aislado, en algunos casos ^[9-10]).

El complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, reacciona con tioles (RSH), originando complejos azules paramagnéticos. Así por ejemplo los tioles y ditio-éteres reaccionan con el compuesto organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, vía adición oxidativa, en presencia de metanol y NH_4PF_6 , como abstractor de haluros, formando un complejo tiolato $[\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe-SR}]^+$ según la siguiente reacción ^[10-11]:

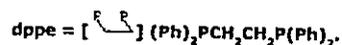
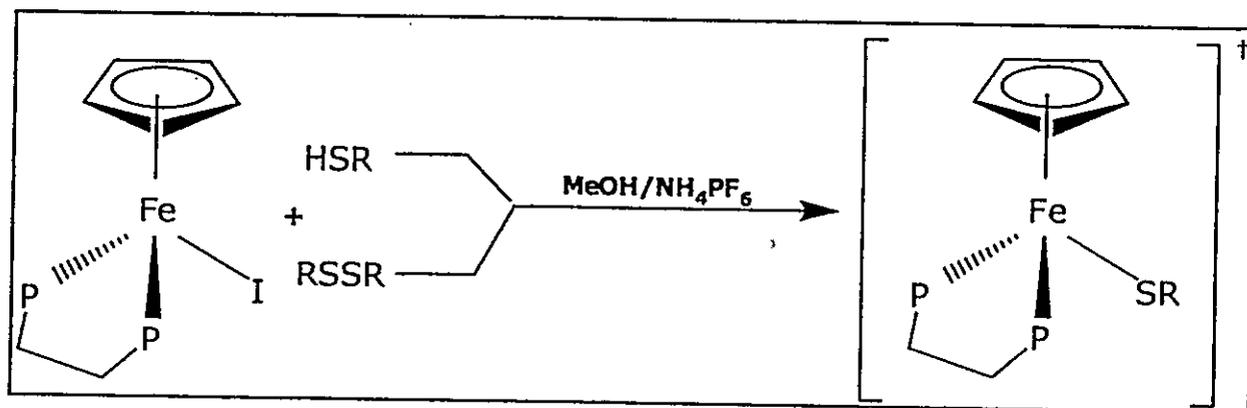


Figura N° 1: Reacción del complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ con tioles.

En esta reacción no se ha logrado aislar el producto conteniendo el hidrógeno del tiol, pero probablemente sea hidrógeno molecular [H₂], aunque no hay evidencia alguna de esto ^[10].

Los complejos Fe-tiolatos oxidados son de color azul oscuro ó azul-violáceo, moderadamente estables en estado sólido. Los sólidos que se obtienen, generalmente son paramagnéticos (de 17 electrones), con valores de μ entre 1,5 y 2,3 MB, valores típicos de complejos de Fe (III) d⁵ bajo spin. El color azul característico exhibido por estos compuestos, esta asociado con su naturaleza paramagnética y presenta una banda de absorción UV-visible característica entre los 550 y 600 nm. Los complejos diamagnéticos Fe (II) d⁶ bajo spin, son de color rojo o marrón ^[11].

Los complejos organometálicos de Fe (III) de 17 electrones son escasos y constituyen una excepción a la regla de los 16 y 18 electrones, no así los complejos de coordinación de Fe (II), los cuales son comunes. En este caso la estabilización de los complejos organometálicos de 17 electrones, requiere de dos condiciones:

- 1) La presencia de ligantes en torno al átomo de Fe, que posean sustituyentes voluminosos.
- 2) Ligantes donantes π ó σ , para compensar el estado de oxidación formal del Fe (+3). (El dppe cumpliría este papel ya que es un sustituyente voluminoso y es dador σ).

Estudios preliminares en moléculas de interés biológico han mostrado que el enlace S-H se rompe selectivamente por el compuesto organometálico Cp(dppe)FeI, dejando inalterado los otros grupos que coordinan la molécula [12-13].

Los factores que influyen para que este compuesto organometálico reaccione selectivamente con tioles no están aun claros, pero se postula que la densidad electrónica sobre el átomo de hierro es un factor importante [12-13]. Una forma de comprobar esto sería modificar la densidad electrónica sobre el átomo de hierro por ejemplo usando un grupo más dador de electrones como Cp* en vez de Cp.

La naturaleza del metal también puede ser un factor importante en la ruptura del enlace SH en tioles. Una forma de averiguar este efecto sería cambiar el metal por uno similar del mismo grupo, por ejemplo rutenio (Ru), no se conocen estudios de rompimiento de enlace SH en tioles por complejos organometálicos de Ru (II).

Por otra parte se ha encontrado que otros compuestos organometálicos también rompen el enlace SH; sin embargo no se informan estudios de selectividad. Estos son:

- a) $[MM'(CO)_3(dppm)_2]$ ($MM' = Rh_2, Ir_2, RhIr$). [15].
- b) *trans*- $[IrCl(CO)(PPh_3)_2]$ [16].

12. Díaz, C.; Gómez, A. J. *Coord. Chem.* 2001, **54**, 261.
13. Díaz, C.; Pesce, A. *Appl. Organomet. Chem.* 2000, **14**, 557.
14. Carrillo, D. *Coord. Chem. Rev.* 1992, **119**, 137.
15. Mc Donald, R.; Cowle, M. *Inorg. Chem.* 1993, **32**, 1671.
16. Mueting, A. M.; Boyle, P.; Pignolet, L. H. *Inorg. Chem.* 1984, **23**, 44.

1.2.2 Metales de Transición.

Existen ligantes orgánicos que contienen grupos disulfuros (RSSR), sulfidrilo (SH⁻) ó tiolato (SR⁻), que son reducidos vía adición oxidativa, por reacción con iones metálicos (Mⁿ⁺) en bajo estado de oxidación, incorporándose el tiolato (SR⁻) como ligante puente o terminal ^[14].

En otros casos, los ligantes disulfuros como Me₂S₂, Et₂S₂, etc. forman complejos estables con iones metálicos de bajo estado de oxidación, así como también se forman los sulfuros o tioles del tipo RSH, provenientes de L-Cisteína (L-Cys), Glutación (GSH), etc. Algunos ejemplos específicos son:

- i) Cu⁺¹ → Cu⁽⁺²⁾SR {SR proveniente de la Cys} ^[18].
- ii) Pt⁺² → [{Pt⁽⁺⁴⁾ (en)(μ-SR)}₂]²⁺ ^[17].
- iii) Hg⁺¹ → [Hg⁽⁺²⁾Cl₂*Me₂S₂] ^[19].

Muchas rutas sintéticas para coordinar este tipo de grupo involucran coordinación directa del ión metálico con quelación del disulfuro o sustitución del ligante, así como otras involucran, entre otras la oxidación del ligante coordinado y posterior transferencia electrónica ^[14].

17. Kratochwil, N.A.; Guo, Z.; Murdock, P.; Parkinson, J.A.; Bednarski, P.J.; Sadler, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 8253.
18. Stricks, W.; Kolthoff, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, **73**, 1723.
19. van Boon, S.S.G.E.; Wei Chen, B.; Teuben, J.M.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* 1999, **38**, 1450.

1.2.3 Compuestos orgánicos.

La inhibición de las enzimas Cys Proteasas muchas veces resulta de la ruptura del enlace SH de la cisteína (Cys) que corresponden al grupo reactivo que se encuentra en el sitio activo de la enzima y que esta involucrado en la catálisis.

Muchas estrategias han sido empleadas en el diseño de inhibidores de Cys Proteasa. Se ha desarrollado un gran número de inhibidores selectivos de estas enzimas. La mayoría de ellos muestra segmentos peptídicos para el reconocimiento de la enzima y una parte electrofílica para reaccionar con la Cys del sitio activo ^[2 y 5]. Ejemplos de estos inhibidores son:

→ Inhibidores Reversibles: compuestos que forman hemitioacetales, peptidil cetales y tioimidatos con el tior de la Cys del sitio activo, son peptidil aldehídos, diamina cetonas y nitrilos, respectivamente ^[2-3].

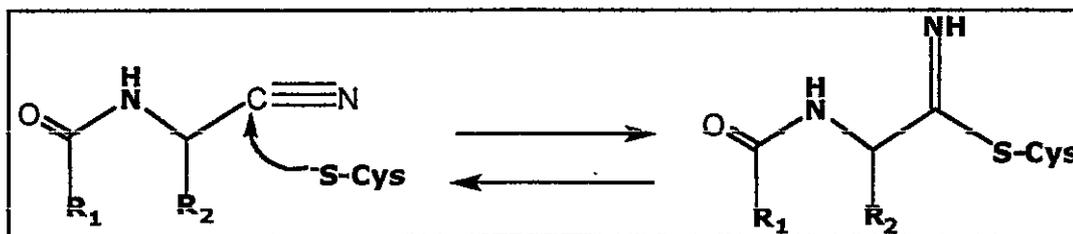


Figura N° 2: Reacción de inhibición de cys proteasa con peptidil nitrilos.

→ Inhibidores irreversibles: que inactivan irreversiblemente a estas enzimas vía alquilación de la Cys del sitio activo, ejemplos de estos son epoxisuccinil derivados, (aciloxi) metil cetonas y halometilcetonas [2-3].

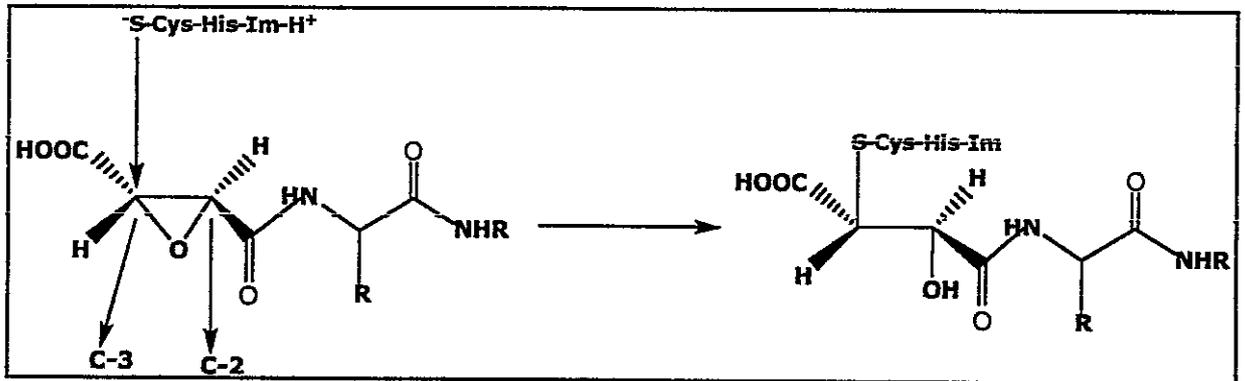


Figura N° 3: Reacción de inhibición de cys proteasa con epoxisuccinil compuestos.

1.3 Cisteínas proteasas.

Las proteínas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos reciben el nombre de *Peptidasas* ó *Proteasas*, y pueden ser catalogadas, según el punto en el que rompen la cadena peptídica en endopeptidasas ó exopeptidasas.

También, estas enzimas se pueden ordenar según el mecanismo de catálisis, es decir según el grupo reactivo del sitio activo involucrado en la catálisis, en serina, cisteína, aspártico, treonina y metalo proteasas [2, 5, 20]. De estas, las más estudiadas son las Cys Proteasas, presentes en mamíferos, vegetales, bacterias y virus [20]. Todas las Cys Proteasas tienen un sitio activo común formado por en una Cys, histidina (His) y asparragina (Asn) [2 y 5].

En general, las cisteínas proteasas están divididas en [2 y 5]:

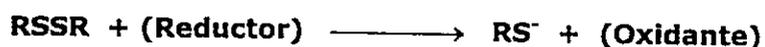
- i) Las cisteínas proteasas pertenecientes a la familia de la papaína, probablemente están todas involucradas con la misma estructura básica de endopeptidasa [2, 5, 20].

- ii) Las enzimas que poseen actividad de exopeptidasa corresponden a la familia de las enzimas denominadas *Semejantes a la Papaína*, y han sido encontradas en virus y bacterias, así como en mamíferos, ejemplo de estas es la catepsina B [2, 5, 20].

20. Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. *Chem. Rev.* 2002, **102**, 4459.

1.3.1 Papaína.

Extraída del látex de la papaya, la papaína es un polipéptido cuya masa molecular es 23406 Da. Consiste en una cadena de 212 aminoácidos, con tres puentes disulfuro (Cys²²-Cys⁶³, Cys⁵⁶-Cys⁹⁵ y Cys¹⁵³-Cys²⁰⁰). La papaína es aislada como una forma inactiva, en la cual la cisteína (Cys) del sitio activo está bloqueada por un enlace disulfuro entre la cys 22 y la 63. La activación es posible por intercambio molecular de disulfuro con un reactivo tiol o un agente reductor ^[20].



La papaína es la Cys proteasa mas estudiada, por el hecho de poseer una cinética fácil de analizar, además al ser homóloga con las cys proteasas presentes en mamíferos y que están involucradas en una serie e enfermedades relacionas con la degeneración del tejido ^[11], se utiliza como un modelo adecuado para estudiar la reactividad de moléculas que puedan ser utilizadas por ejemplo, con fines terapéuticos. En la figura N° 4 se puede observar la estructura tridimensional propuesta para la papaína:

1.3.1.1 Cisteínas Proteasas Semejantes a la Papaína.

Las cisteínas proteasas semejantes a la papaína, son una familia de las cisteínas proteasas, y están presentes en el reino animal, en el vegetal y también han sido encontradas en virus y bacterias [20]. Son reconocidas por sus funciones vitales en la regulación de muchos procesos biológicos y su participación en una serie de enfermedades.

En general constituyen un blanco atractivo para el desarrollo de inhibidores como potenciales agentes terapéuticos. Las proteasas, en general tienen función restringida a la degradación de proteínas en lisosomas o compartimentos celulares equivalentes. Estas poseen funciones específicas en la matriz extracelular y pueden representar un blanco viable para drogas diseñadas para enfermedades tales como osteoporosis, artritis, arterioesclerosis, cáncer y una serie de infecciones parasitarias [2 y 20].

Esta clase de cys proteasas es expresada como pro enzimas y son sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso. La localización no es estrictamente lisosomal, ya que las enzimas trafican entre fagosomas, endosomas y lisosomas; además, diferentes proteasas se pueden acumular en diferentes organelos [2, 5, 20].

1.3.2 Mecanismo catalítico de las cys proteasas.

El sitio catalítico de las cys proteasas es altamente conservado, lo que quiere decir que es igual para todas las cys proteasas y esta formado por tres residuos: Cys²⁵, His¹⁵⁹ y Asn¹⁷⁵, de acuerdo al número de la papaína. La Cys²⁵ y la His¹⁵⁹ forman un par iónico, el cual está estabilizado por la Asn¹⁷⁵ vía puente de hidrógeno.

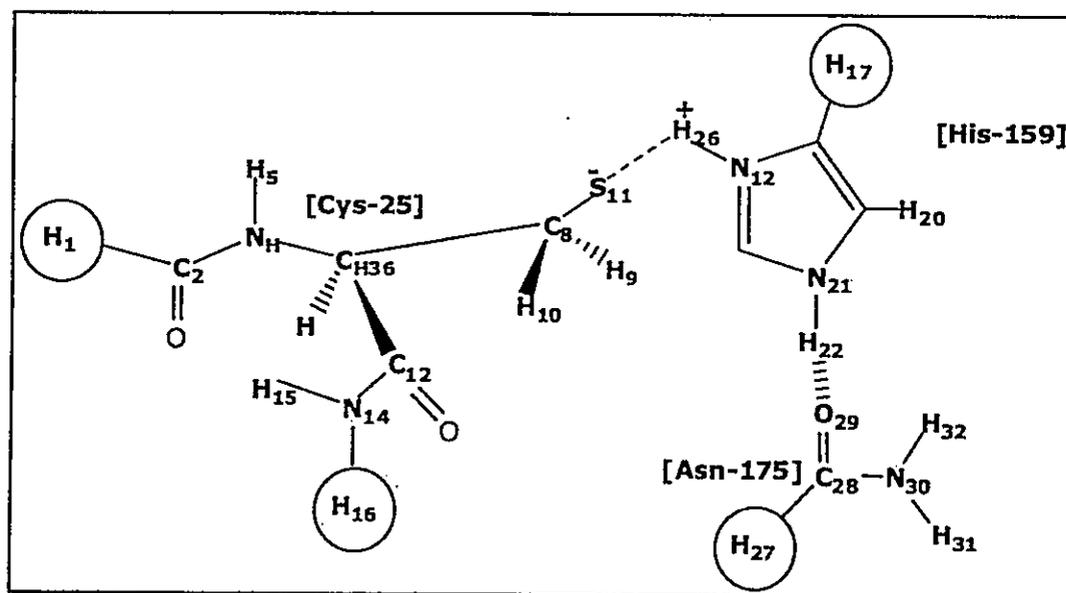


Figura N° 5: Par tiolato-imidazol del sitio activo de cys proteasas.

El grupo imidazol de la His polariza al SH de la Cys realizándose así la deprotonación, aún a valores de pH neutro o débilmente ácido. Un par iónico tiolato-imidazol es producido el cual es altamente nucleofílico. El *mecanismo par iónico* explica la inusual alta reactividad de las Cys proteasas frente a reactantes electrofílicos, en comparación con la nucleofilia del sulfuro (S^-) de la Cys o del glutatión. Durante la hidrólisis del péptido, el nucleófilo tiolato de la cys ataca al carbono (C) carbonílico del enlace peptídico del sustrato enlazado, para romper el enlace peptídico y se forma un intermediario tetraédrico (esto para redistribuir la carga). La formación de este par iónico no solo hace al tiol un buen nucleófilo, sino que también lo hace un buen grupo saliente.

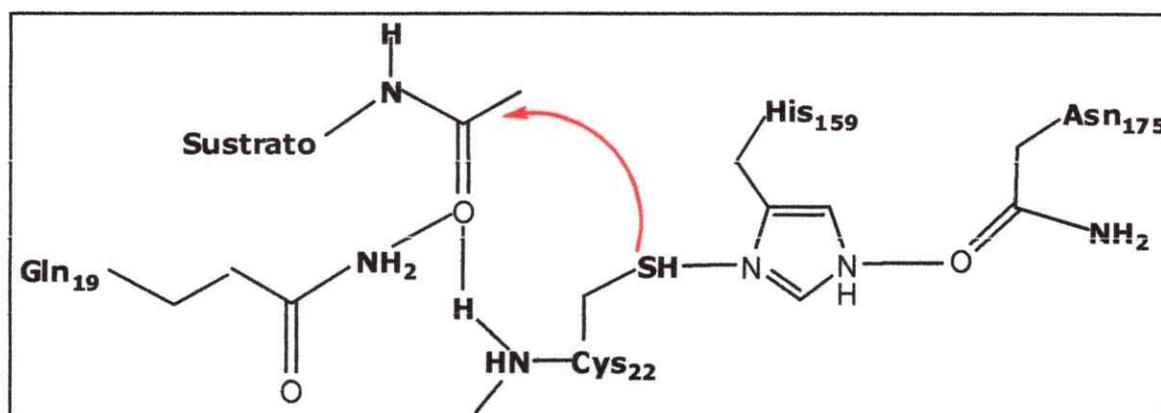


Figura N° 6: Mecanismo catalítico de cys proteasas.

1.3.3 Implicaciones biológicas de las Cys Proteasas.

El entendimiento de las funciones de las cys proteasas en procesos fisiológicos y patológicos, podría conducir al diseño de agentes terapéuticos selectivos. Las cys proteasas de parásitos han sido involucradas en numerosos procesos fisiológicos tales como: replicación, crecimiento y diferenciación celular, entre otros. Esto las convierte en blancos certeros para el diseño de inhibidores de su actividad a fin de controlar una serie de enfermedades parasitarias [2-5].

Por otra parte, el desorden en la regulación natural de la actividad de ciertas enzimas provoca en el ser humano algunas enfermedades.

Algunas enfermedades en las que están involucradas las cys proteasas, son [2]:

- Osteoporosis.
- Artritis Reumatoide.
- Arteriosclerosis.
- Cáncer.
- Procesos Inflamatorios y Traumatológicos.
- Infecciones Parasitarias.

1.3.4 Inhibición de las cisteínas proteasas.

Las Cys Proteasas pueden ser moduladas en su actividad, con la ayuda de inhibidores, sean naturales o sintéticos [3, 4, 6].

Existe una serie de inhibidores endógenos de naturaleza proteica. Estos se dividen, principalmente, en dos clases de inhibidores:

- Familia de las Cistatinas.

Las Cistatinas son proteínas constituidas por entre 110 a 120 aminoácidos y su peso molecular fluctúa entre los 12 a 13 kDa.

- Familia de las Serpinas.

Las Serpinas son proteínas que aún siendo inhibidores de las serina proteasas, recientemente han mostrado actividad cruzada con las catepsinas.

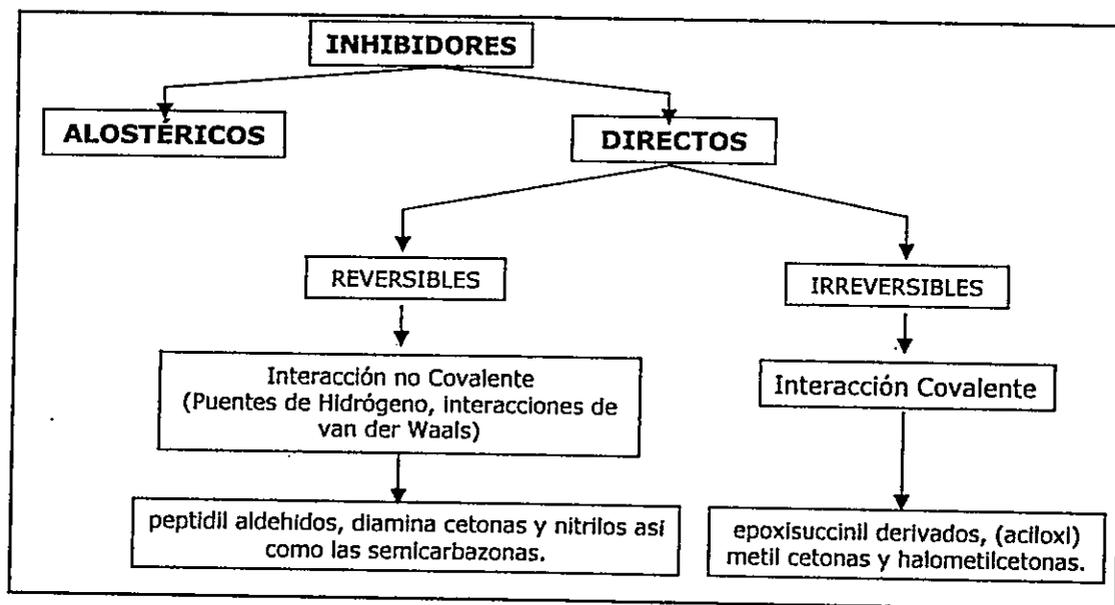
1.3.4.1 Clasificación de los inhibidores.

Una clasificación inicial está basada en el lugar donde el inhibidor interactúa: con el sitio activo (Inhibidor directo) o si ataca a otro sitio de la enzima (efecto alostérico).

Los inhibidores que atacan al sitio activo pueden ser divididos de acuerdo al tipo de interacción en covalentes/no covalentes e irreversibles/reversibles.

Los inhibidores irreversibles (inactivadores) y reversibles, se pueden diferenciar al bajar la concentración del inhibidor, al diluir la solución, por filtración en gel o por diálisis, ya que en el caso de un inhibidor reversible, la actividad de la enzima se vuelve a recuperar.

- Inhibidores que interactúan con el sitio activo.



Esquema Nº 1: Inhibidores que actúan con el sitio activo.

El diseño y síntesis de inhibidores de cys proteasas tiene una larga historia y ha sido extensivamente estudiada en los recientes años [3, 4, 6 y 24].

El desarrollo de inhibidores de cys proteasas provee herramientas para el estudio de la actividad de estas enzimas, facilitando el desarrollo de drogas inhibidoras de Cys Proteasas. Este desarrollo ha permitido un mejor entendimiento de las Cys Proteasas como blancos farmacéuticos [3, 4 y 6].

- *Complejos Metálicos como Inhibidores de Cys Proteasas.*

La especificidad de la enzima por el sustrato, la cual a menudo reconoce sólo una molécula, ofrece la oportunidad de sintetizar un inhibidor con uso terapéutico, con un comportamiento definido. Las enzimas parecen ser un blanco natural para compuestos inorgánicos que puedan aplicarse terapéuticamente [6]. Alguno de los complejos metálicos que inhiben a las cys proteasas son: Al^{3+} , como ión libre; B, Fe y Cu, como complejo [6].

Un gran problema en el diseño de inhibidores de Cys Proteasas es la suficiente selectividad, debido al desconocimiento de la especificidad en todas las Cys Proteasas de humanos y sus funciones fisiológicas [2 y 20].

No hay referencia alguna del uso de compuestos organometálicos como inhibidores de estas enzimas, sin embargo su alta selectividad hacia ciertos grupos presentes en la molécula como -O, -SH, -NH, etc. ^[12-13] los hace buenos candidatos para el uso terapéutico de la inhibición de ciertas cys proteasas. Otra ventaja que poseen complejos organometálicos es que pueden ser detectados selectivamente aún en pequeñas cantidades, además de presentar bandas de absorción características en distintas regiones según el complejo formado.

La capacidad de coordinación de los metales en fragmentos organometálicos apoya la posibilidad que puedan formar uniones fuertes a través de enlaces iónicos y covalentes con la enzima, regulando su actividad. Sin embargo, hasta hoy no se han utilizado complejos organometálicos como inhibidores de enzimas como la papaína.

1.4 Hipótesis.

La presente tesis se basa en la evidencia existente de la efectividad que posee el fragmento organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, para el rompimiento de los enlaces S-H y S-S en compuestos tioles modelos, dejando inalterados los otros grupos presentes en la molécula. Se propone que:

1. Compuestos organometálicos similares de rutenio, poseen un comportamiento análogo sobre el enlace S-H en tioles modelos.
2. Algunos parámetros relacionados al metal tales como la densidad electrónica sobre él y efectos estéricos de los ligantes auxiliares influyen en este comportamiento.
3. Debido al rompimiento de los enlaces S-H en tioles y ditioéteres sencillos, y a su alta reactividad encontrada en modelos de moléculas de interés biológico, los compuestos organometálicos propuestos de hierro y rutenio podrían romper el enlace SH del residuo de cisteína involucrada directamente en la catálisis de las enzimas Cys Proteasas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

El objetivo es sintetizar complejos organometálicos capaces de romper el enlace S-H presente en tioles modelos y en tioles mas complejos de interés biológico como las Cys proteasas, además de examinar su posible actividad como inhibidores de estas enzimas.

1.5.2 Objetivos Específicos

Esta Tesis Doctoral propone, específicamente:

- 1.** - Sintetizar y caracterizar los compuestos organometálicos: $CpM(dppe)X$ ($M = Fe, Ru; X = I, Cl$, respectivamente), $Cp^*Ru(dppe)Cl$ y $CpRu(PPh_3)_2Cl$.
- 2.** - Estudiar el rompimiento del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos, y caracterizar los complejos resultantes.
- 3.** - Estudiar el efecto de los derivados organometálicos sobre la actividad de la papaína (Cys proteasa).

2.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos

2.1.1 Sólidos y Líquidos

Yoduro de ciclopentadienilo dicarbonil hierro (II) [$\text{Cp}(\text{CO})_2\text{FeI}$].

Bis-difenilfosfinoetano [dppe].

Ditiotreitol [DTT], Sigma-Aldrich p.a.

L-Cisteína [L-Cys], Riedel de Haënanng Seelze-Hannover p.a.

Glutati3n reducido [GSH], Sigma-Aldrich p.a.

Cloruro de pentametil ciclopentadienilo rutenio [$(\text{CpRuCl})_n$], Sigma-Aldrich p.a

Cloruro de ciclopentadienilo bis-fenilfosfina rutenio (II) [$\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{RuCl}$], Sigma-Aldrich p.a.

Hexafluoro fosfato de amonio [NH_4PF_6], Sigma-Aldrich p.a.

Papaína, Sigma-Aldrich p.a.

Azocaseína, Sigma-Aldrich p.a.

Tris, Merck.

2-Mercaptoetanol, Sigma-Aldrich p.a. (Líquido)

2.1.2 Solventes

Tolueno, Merck p.a.

Éter dietílico, Merck p.a.

Diclorometano, Merck p.a.

Hexano, Merck p.a.

Metanol, Merck p.a.

Etanol, Merck p.a.

Ácido Clorhídrico, HCl, Merck p.a.

Ácido tricloro acético, Merck p.a.

Dimetilsulfóxido, Merck p.a.

2.2 Técnicas instrumentales.

2.2.1 Espectroscopia Infrarroja (IR).

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro Bruker Vector 22, en pastilla de KBr seco de calidad analítica. Se obtuvieron registros en la zona comprendida entre 4000 y 450 cm^{-1} . Las intensidades relativas están expresadas en inglés (m, s, vs, w, vw, br).

2.2.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN ^1H y ^{31}P , se obtuvieron en el espectrómetro Brucker AC-300, usando CDCl_3 como disolvente. Todos los valores de los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm).

2.2.3 Análisis Elemental.

Los análisis de carbono, hidrógeno y nitrógeno (% peso), fueron obtenidos mediante un microanalizador Fissons CE instruments modelo AE-1108.

2.2.4 Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).

Los espectros EPR se realizaron en un espectrofotómetro Brucker ECS 106, banda X (9.79 GHz). Como solvente se uso diclorometano en los compuestos de Fe y para la enzima, buffer tris-HCl.

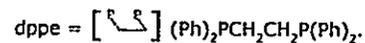
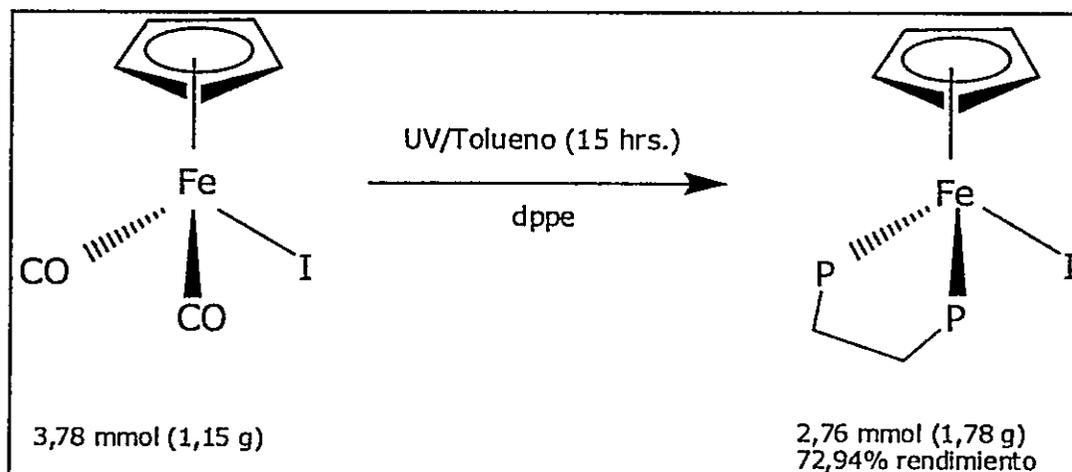
2.3 Procedimientos Experimentales

2.3.1 Síntesis y caracterización de los complejos organometálicos.

2.3.1.1 Síntesis del complejo $Cp(dppe)FeI^{[11]}$.

Este compuesto organometálico fue sintetizado mezclando 1,15g (3,78mmol) de $Cp(CO)_2FeI$ en 80 mL de tolueno con 1,50 g (3,76 mmol) de bis-difenfosfinoetano (dppe), en presencia de nitrógeno (N_2) e irradiando con una lámpara UV por 15 hrs., agitando constantemente.

La solución es de color café verdoso con presencia de precipitado. Esta solución se filtró a través de Celite (Kieselghur) y se evaporó el solvente a sequedad en el rotavapor, obteniéndose un sólido negro, al cual se le realizó una cromatografía en columna, utilizando como base alúmina neutra y eluyendo con CH_2Cl_2 . Se recoge la banda negra. El solvente se evaporó 1/3 de su volumen original y se agregó 5 mL, aproximadamente de hexano y posteriormente, se llevó a $-18^\circ C$ por tres días, luego de lo cual se observaron cristales negros los que fueron secados alternando vacío con N_2 . El complejo fue caracterizado por IR y análisis elemental.



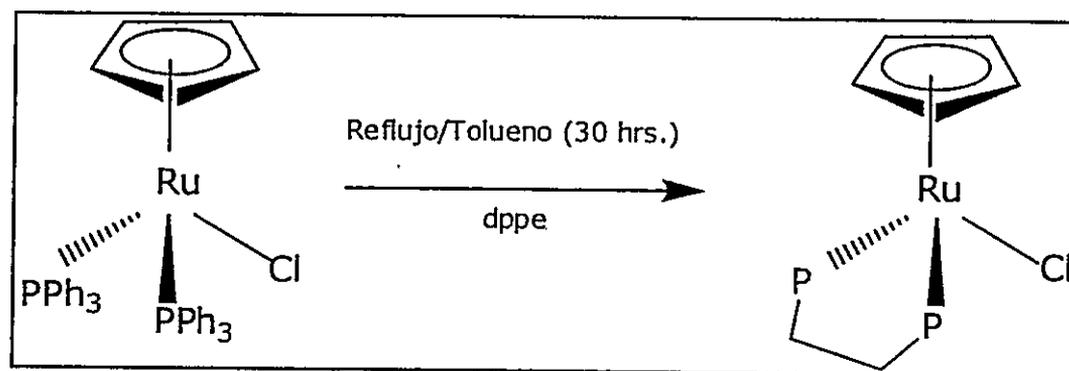
Esquema N° 2: Síntesis del $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$.

2.3.1.2 Síntesis del complejo $\text{Cp}(\text{dppe})\text{RuCl}$ ^[21].

Para sintetizar este compuesto, se mezclaron 0,50g (0,69 mmol) de $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{RuCl}$ con 0,83g (2,07 mmol) de dppe en 30 mL de Tolueno y se reflujo por 30 hrs. Posteriormente, se evaporó el solvente obteniéndose un sólido amarillo, al cual se le realiza una cromatografía en columna, con alúmina neutra eluyendo con CH_2Cl_2 y se recoge la banda anaranjada.

21. Treichel, P. M.; Komar, D. A.; Vicenti, P. J. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 1984, **14** (3), 383.

El solvente se evaporó a sequedad y el sólido resultante se lavo con 15 mL de hexano tres veces. El producto se seco al vacío y se obtuvo un sólido amarillo. El complejo fue caracterizado por IR, NMR y análisis elemental.



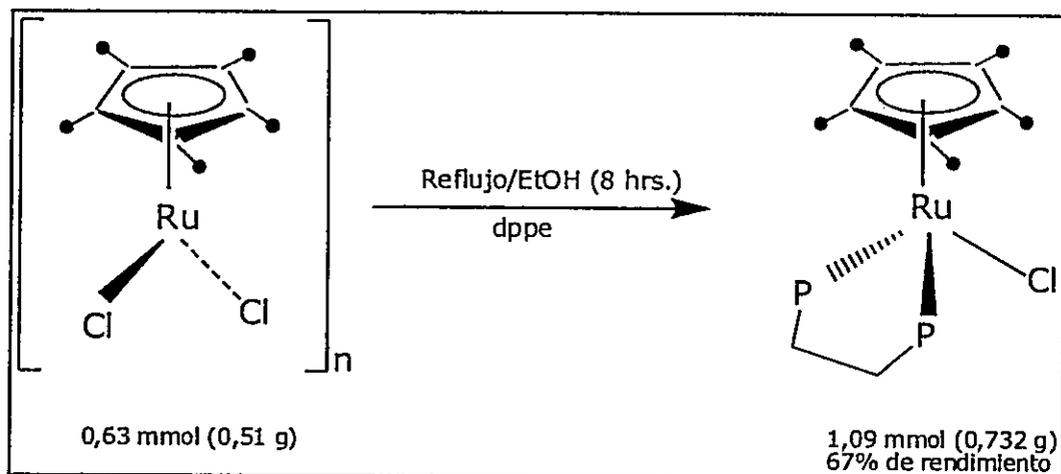
Esquema N°3: Síntesis del Cp(dppe)RuCl.

2.3.1.3 Síntesis del complejo Cp*(dppe)RuCl ^[22].

Este complejo se sintetizó mezclando 0,50g (1,63 mmol) de [Cp*RuCl₂]_n con 0,74g (1,77 mmol) de dppe en 30 mL de Etanol y se reflujo por 30 hrs. A continuación, se concentró el producto a presión reducida, y el sólido obtenido se extrajo con CH₂Cl₂ y se filtró a través de celite y se purificó mediante cromatografía en columna, con alúmina neutra eluyendo con CH₂Cl₂, se recoge la banda amarilla-anaranjada.

22. Oshima, N.; Suzuki, H.; Moro-Oka, Y. *Chem. Lett.* 1984, 1161.

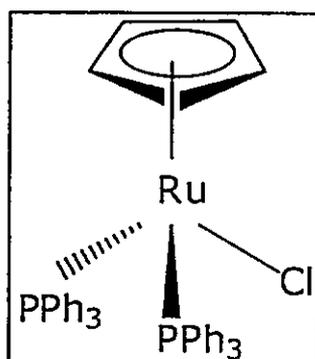
El solvente se evaporó a sequedad y el sólido resultante se lavó con 15 mL de hexano tres veces. Se secó el producto al vacío y se obtuvo un sólido anaranjado. El complejo fue caracterizado por IR y análisis elemental.



Esquema N°4: Síntesis del $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{RuCl}$.

2.3.1.4 Síntesis del complejo $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$.

Este compuesto está disponible comercialmente y se usó sin purificación adicional.



Esquema N° 5: Estructura del complejo $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$.

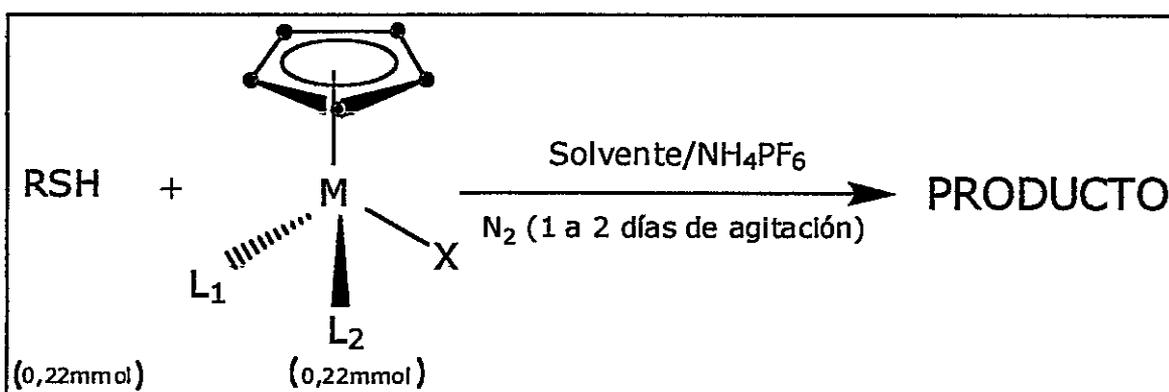
2.3.2 Estudio del rompimiento del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos.

El estudio de la reacción de los compuestos organometálicos sintetizados con los enlaces SH de los tioles modelos, se realizó agregando en un schlenk las cantidades adecuadas de cada reactivo (0,22 mmol de tior, 0,22 mmol de compuesto organometálico, 0,44 mmol de NH_4PF_6 y 30 mL de solvente), en constante burbujeo de N_2 . La solución resultante se dejó por un día, en atmósfera inerte, protegida de la luz, en constante agitación y a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo necesario de reacción, se evaporó el solvente a presión reducida y el sólido obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 , para posteriormente filtrar a través de Celite.

El filtrado se concentró mediante presión reducida. Finalmente, se evaporó el solvente a sequedad para obtener un producto cristalino.

La reacción de los complejos organometálicos con los tioles modelos, se realizó según el siguiente esquema:



- + • = CH_3 ó H.
- + M = Fe Ru.
- + X = I (complejos de Fe) ó Cl (complejos de Ru).
- + L_1, L_2 = dppe ó PPh_3 .
- + Solvente = MeOH (complejos de Fe) ó EtOH (complejos de Ru).

ESQUEMA N° 6: Reacción general de un fragmento organometálico con tioles.

Los complejos obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia IR, UV visible y RMN o EPR según corresponda.

Los tioles modelos utilizados fueron: mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), L-cisteína (L-Cys) y glutatión reducido (GSH), los que se muestran en la figura N° 7.

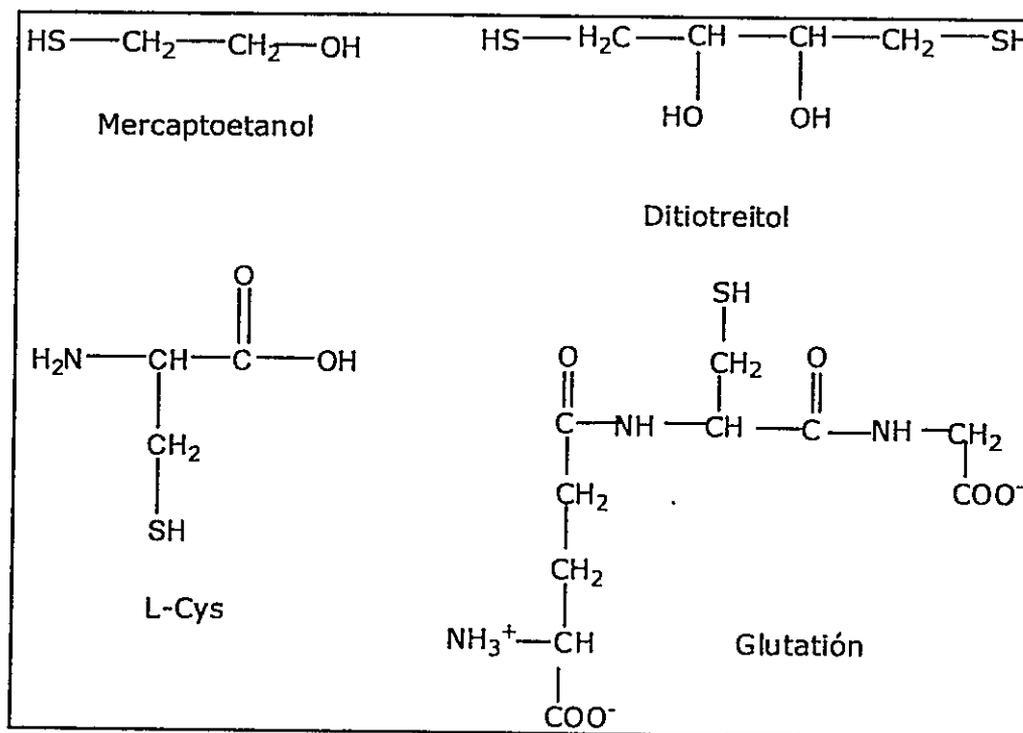


Figura N° 7: Tioles modelos utilizados en la reacciones con complejos organometálicos.

2.3.3 Estudio del efecto de los derivados organometálicos sobre la Papaina.

2.3.3.1 *Estudio de la actividad enzimática.*

La actividad enzimática se midió mediante la hidrólisis de la azocaseína, la cual reacciona con la enzima a 37°C. La enzima se preincubó por 10 min, a 37°C con buffer de activación (0,05 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,05M Cys; 0,01M EDTA; 0,03M mercaptoetanol). Una vez activada la enzima, se le agregó el volumen indicado de sustrato (0,5%) y de buffer Tris-HCl (5 mM, pH = 8,0).

Posteriormente, se dejó reaccionar por intervalos de tiempos (5, 10, 20 y 30 min), para determinar cual es el tiempo en el cual se alcanza la velocidad inicial (v_0). Terminado el tiempo de reacción, se agregaron 300 μ L de ácido tricloro acético (TCA) al 10% para detener la reacción. Posteriormente, se adicionaron tres gotas, aproximadamente de NaOH 0,25 M. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se midió la absorbancia a 440 nm.

Tabla N° 1: Protocolo para el estudio de la actividad enzimática.

	Volumen de E (μ L)	Volumen de Solución Activante (μ L)	Volumen de Buffer (μ L)	Volumen de Sustrato Azocaseína (μ L)	Volumen de Ácido Tricloro Acético (TCA) (μ L)
Control (t_0)	30	40	480	150	300
Reacción	30	40	480	150	300

2.3.3.2 Efecto del complejo organometálico $Cp(dppe)FeI$ sobre la actividad de la papaína.

Para determinar el efecto que produce el fragmento organometálico $Cp(dppe)Fe^+$ sobre la actividad de la enzima, se realizó un ensayo en el cual se activa la enzima por 10 min con buffer de activación y posteriormente se agrega el volumen de solución de fragmento organometálico [$Cp(dppe)FeI$, 1mg/mL (1,55 mM)], sustrato y buffer, se deja reaccionar por 5 min, a 37°C. Luego, se agrega TCA y NaOH. La concentración de complejo organometálico utilizada en la reacción es $1,55 \times 10^{-2}$ mM.

Tabla N° 2: Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico $Cp(dppe)FeI$ sobre la actividad enzimática.

	Volumen de E (μ L)	Volumen de Solución Activante (μ L)	Volumen de $Cp(dppe)Fe^+$ (μ L)	Volumen de Buffer (μ L)	Volumen de Sustrato (μ L)	Volumen de TCA (μ L)
Control (t_0)	30	40	10	470	150	300
Reacción	30	40	-	480	150	300
Efecto del Organometal	30	40	10	470	150	300

2.3.3.3 Efecto de la concentración del complejo organometálico sobre la actividad de la papaína.

Se varió la concentración del complejo organometálico Cp(dppe)FeI, para determinar el efecto que este produce sobre la actividad de la enzima. La reacción se realizó de la misma forma que la descrita con anterioridad.

Tabla N° 3: Protocolo para el estudio de la variación de la concentración del complejo organometálico.

	Volumen de E (μL)	Volumen de Solución Activante (μL)	Volumen de Cp(dppe)Fe ⁺ (μL)	Volumen de Buffer (μL)	Volumen de Sustrato (μL)	Volumen de TCA (μL)
Control (t_0)	30	40	10	470	150	300
Reacción	30	40	-	480	150	300
$1,5 \times 10^{-2} \text{mM}$	30	40	10	470	150	300
$3,0 \times 10^{-2} \text{mM}$	30	40	20	460	150	300
$4,5 \times 10^{-2} \text{mM}$	30	40	30	450	150	300
$6,0 \times 10^{-2} \text{mM}$	30	40	40	440	150	300
$7,5 \times 10^{-2} \text{mM}$	30	40	50	430	150	300

2.3.3.4 Efecto del tiempo de interacción entre el complejo organometálico $Cp(dppe)FeI$ y papaína en la actividad de la enzima..

Se dejó reaccionar la enzima con el fragmento organometálico durante 24 hrs. Los ensayos que se realizaron en esta etapa, se indican a continuación:

- i) **E activada + Fragmento:** En este caso, primero se activó la enzima, como se describió en el punto 2.3.3.1, y luego se adicionó el fragmento organometálico. La mezcla se dejó reaccionar por 24 hrs, a temperatura ambiente.
- ii) **E + Fragmento:** En este caso, no se activó la enzima, sólo se adicionó el fragmento organometálico y se dejó reaccionar por 24 hrs, a temperatura ambiente.
- iii) **E + Act. + Fragmento:** Este ensayo se realizó mezclando, al mismo tiempo, enzima (E), activador (A) y fragmento organometálico, lo cual se dejó reaccionar por 24 hrs.

Donde:

- E → es enzima
- Act. → Solución activadora

Al cabo de este tiempo se determinó la actividad de la enzima, siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.3.3.1. Las cantidades utilizadas de cada reacción, se muestran en la tabla N° 4.

Tabla N° 4: Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico sobre la actividad de la enzima. Reacción por 24 hrs.

	Volumen de E (μL)	Volumen de Solución Activante (μL)	Volumen de Cp(dppe)Fe ⁺ (μL)	Volumen de Buffer (μL)	Volumen de Sustrato (μL)	Volumen de TCA (μL)
Control (t ₀)	30	40	50	430	150	300
Reacción	30	40	-	480	150	300
E activada + Fragmento	30	40	50	430	150	300
E + Fragmento	30	-	50	470	150	300
E+Act. + Fragmento	30	40	50	430	150	300

2.3.3.5 Efecto de complejos organometálicos de rutenio sobre la actividad de la papaína.

Para determinar que efecto producen distintos complejos organometálicos sobre la actividad de la enzima, se realizó un ensayo en el cual se incubó la enzima, activada y no activada, con complejos organometálicos de rutenio. Los complejos a utilizar, de concentración 1,55mM, son:

i) **Cp(PPh₃)₂RuCl**: Se disolvieron $1,55 \times 10^{-3}$ mmol (0,0011 g) de compuesto en 1 mL de Buffer Tris-HCl pH = 8.

ii) **Cp(dppe)RuCl**: Se disolvieron $1,55 \times 10^{-3}$ mmol (0,0009 g) de compuesto en 1 mL de Buffer Tris-HCl pH = 8.

Tabla N° 5: Protocolo para el estudio del efecto del complejo organometálico de rutenio sobre la actividad de la enzima.

	Volumen de E (μL)	Volumen de Solución Activante (μL)	Volumen de Complejo Organomet. (μL)	Volumen de Buffer (μL)	Volumen de Sustrato (μL)	Volumen de TCA (μL)
Control (t ₀)	30	40	50	430	150	300
Reacción	30	40	-	480	150	300
Cp(PPh ₃) ₂ RuCl	30	40	50	430	150	300
Cp(dppe)RuCl	30	40	50	430	150	300
Cp (dppe)FeI	30	40	50	430	150	300

2.3.3.6 Cálculo del IC₅₀.

Para determinar la concentración del fragmento organometálico que reduce la actividad de la enzima en un 50% (IC₅₀), se realizaron ensayos en los cuales se vario la concentración del fragmento incubado con la enzima previa evaluación de la actividad. Las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla siguiente:

Tabla N° 6: Protocolo para el cálculo del IC₅₀.

	Volumen de E (μL)	Volumen de Solución Activante (μL)	Volumen de Complejo Organometálico (μL)	Volumen de Buffer (μL)	Volumen de Sustrato (μL)	Volumen de TCA (μL)
Control (t ₀)	30	40	10	470	150	300
Reacción	30	40	-	480	150	300
3,1X10 ⁻³ mM	30	40	2	478	150	300
6,2X10 ⁻³ mM	30	40	4	476	150	300
9,3X10 ⁻³ mM	30	40	6	474	150	300
1,2X10 ⁻² mM	30	40	8	472	150	300
1,5X10 ⁻² mM	30	40	10	470	150	300

Para determinar el IC₅₀, es necesario hacer una aproximación que se adecue al gráfico obtenido. Una vez obtenida la ecuación que representa esta tendencia se puede interpolar el valor en el cual se obtiene la disminución en un 50%.

2.3.3.7 EPR de la reacción de la enzima con los compuestos organometálicos.

Para determinar si la reacción de la enzima con los complejos organometálicos es por interacción directa con el enlace SH, lo cual originaría un complejo del tipo Cp^(*)(L₁L₂)M^(III)-SR, el cual sería paramagnético y, por lo tanto se podría observar una señal en el EPR. Para esto, se incubó la enzima previamente activada con 50 μL (7,5X10⁻² mM) de complejo organometálico por 24 hrs.

3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis y caracterización de los complejos organometálicos.

Los complejos organometálicos del tipo $Cp^{(*)}(L_1L_2)M^{(III)}X$ (M: Fe, Ru; L_1L_2 : dppe, PPh_3 ; X: I, Cl), se sintetizaron utilizando técnicas descritas en la literatura, como se explicó anteriormente, y se caracterizaron utilizando técnicas espectroscópicas: IR y NMR, en las cuales se pueden observar las señales esperadas para los ligantes de cada compuesto.

En la tabla N° 7 se indican algunas características de los complejos sintetizados:

Tabla N° 7: Rendimiento de las síntesis de los complejos organometálicos.

COMPUESTO	FORMA Y COLOR	CANTIDAD DE COMPUESTO OBTENIDO	RENDIMIENTO
Cp(dppe)FeI	Cristales Café oscuro	1,78 g (2,76 mmol)	72,94%
Cp(dppe)RuCl	Polvo fino amarillo	Se obtiene mezcla de productos	
Cp*(dppe)RuCl	Polvo Anaranjado	0,732 g (1,09 mmol)	67,00%
Cp(PPh_3)₂RuCl	Cristales café claro	Disponible Comercialmente	

En las figuras N° 8 y 9 se muestran algunos espectros RMN ³¹P y en la figura N° 10 se muestra un espectro IR para algunos de los productos sintetizados.

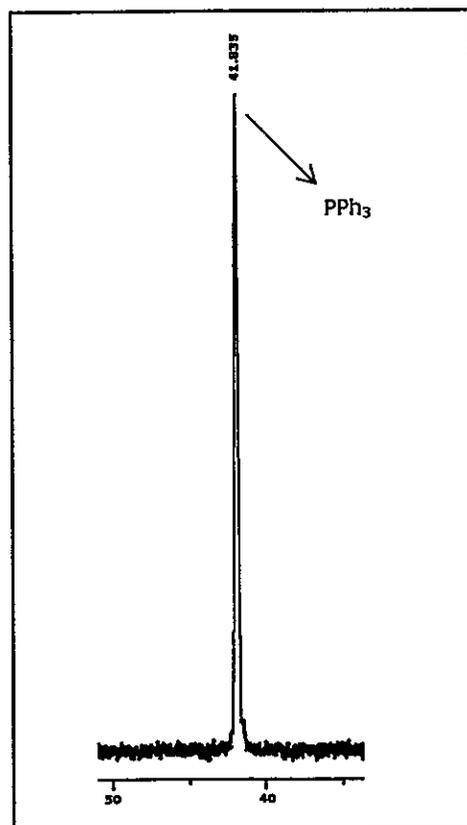


Figura N° 8: Espectro RMN ^{31}P del complejo $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{RuCl}$

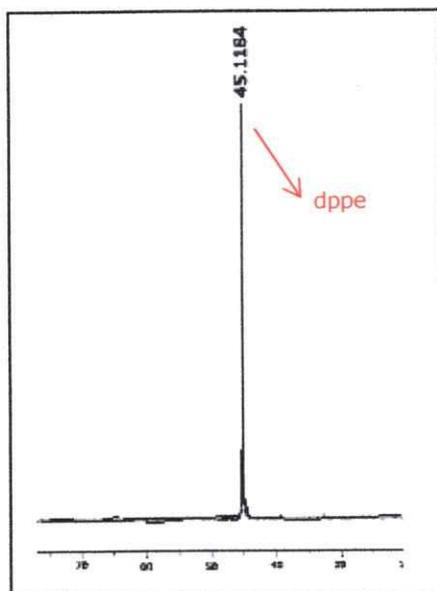


Figura N° 9: Espectro RMN ^{31}P del complejo $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{RuCl}$

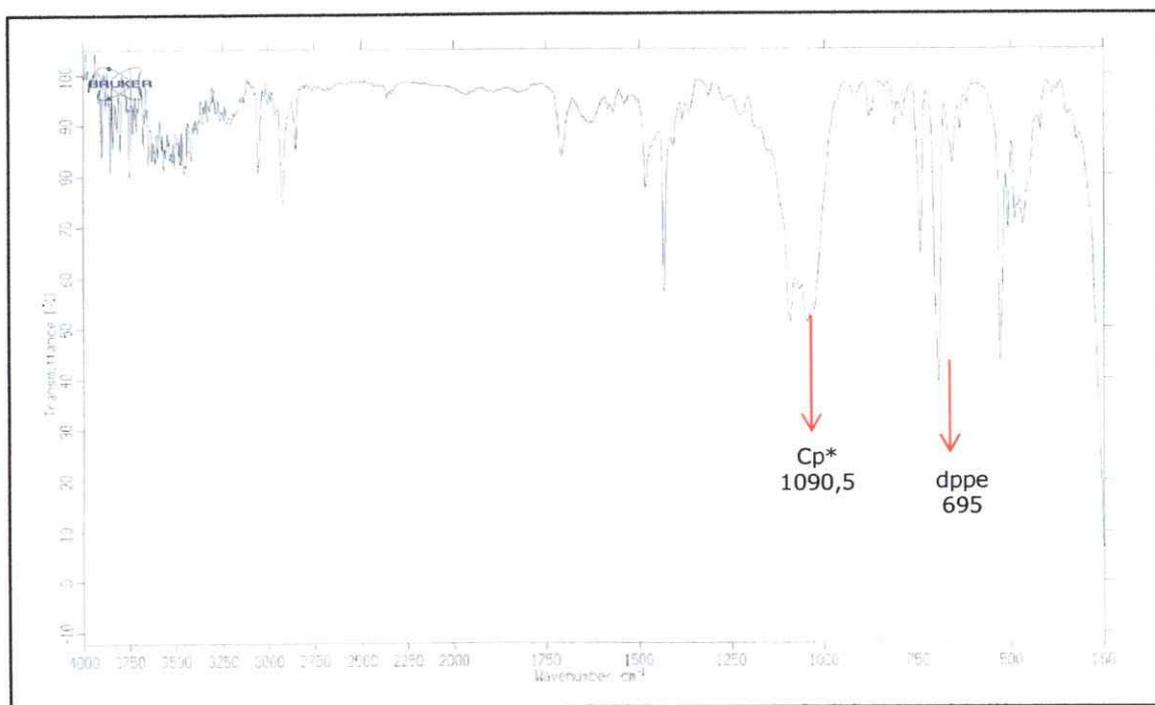
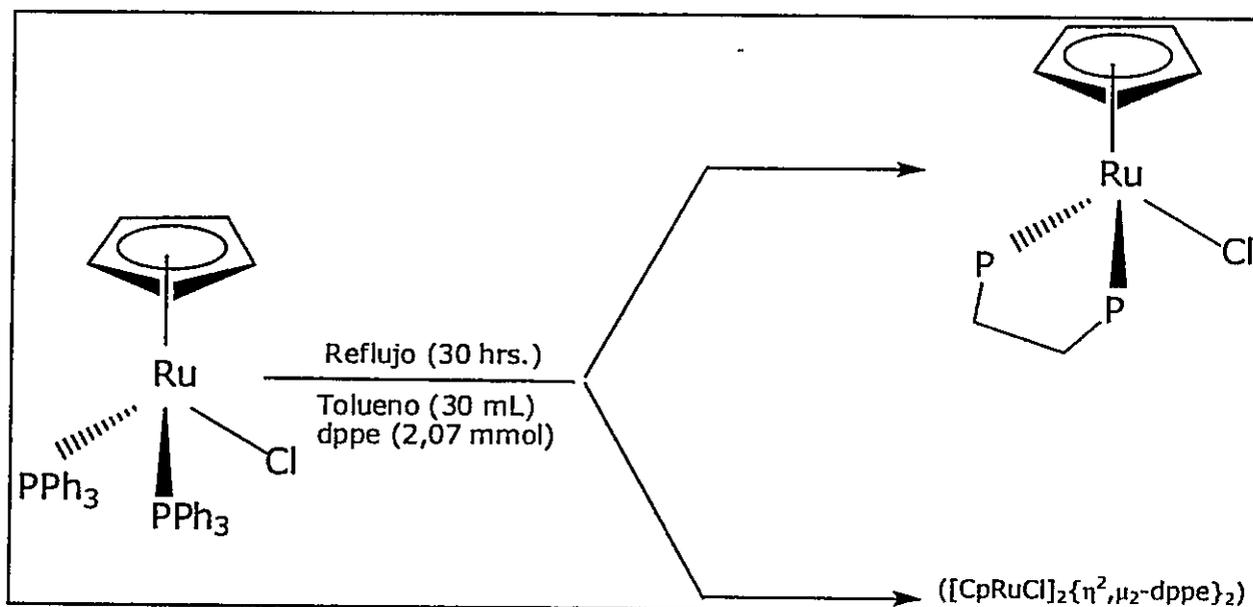


Figura N° 10: Espectro IR del complejo $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{RuCl}$

Un problema adicional se encontró en la síntesis del compuesto $\text{Cp}(\text{dppe})\text{RuCl}$. El método de síntesis original ^[21], consiste en la reacción de $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{RuCl}$ con dppe en tolueno y reflujo por 30 hrs. Sin embargo, tal como se informa en una referencia reciente ^[23] se obtiene de la reacción realmente una mezcla de dos productos de difícil separación (esquema N° 8), lo que se puede observar claramente en el espectro RMN ³¹P del producto de la reacción, mostrado en la figura N° 11.



Esquema N° 8: Reacción de $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{RuCl}$ con dppe.

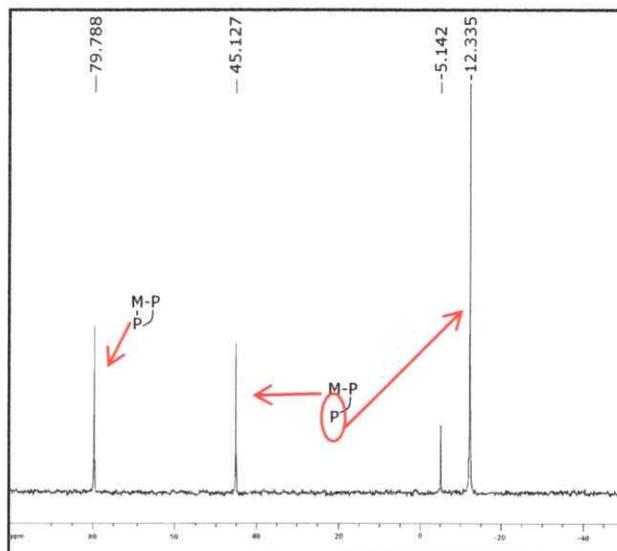
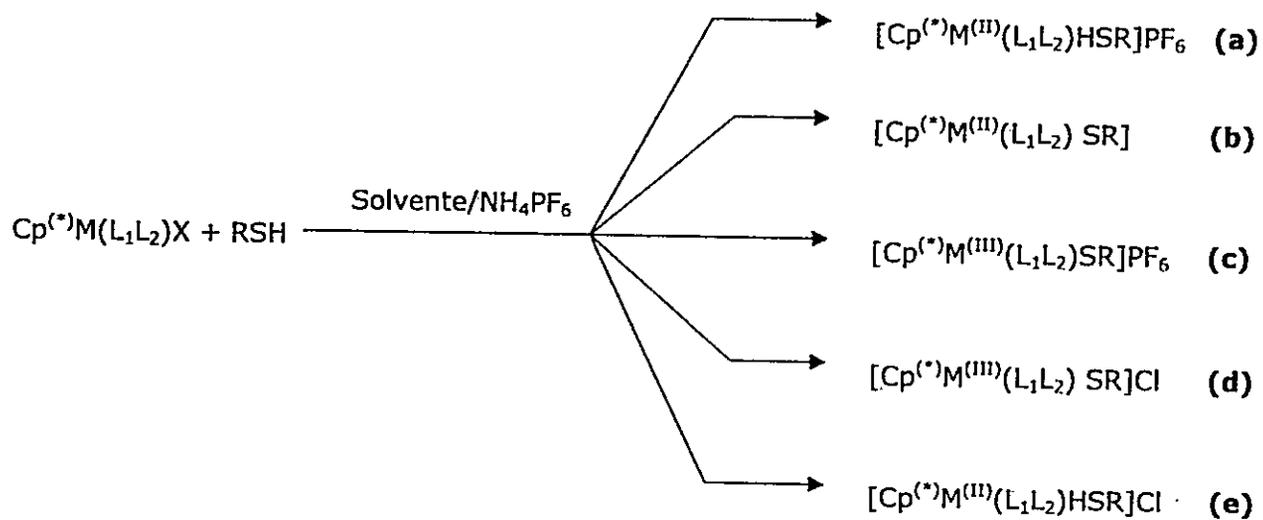


Figura N° 11: Espectro NMR ^{31}P del Compuesto $\text{Cp}(\text{dppe})\text{RuCl}$ en CDCl_3 .

3.2 Estudio del rompimiento del enlace S-H en tioles modelos con los derivados organometálicos.

En general la reacción de un compuesto organometálico $\text{Cp}^{(*)}\text{M}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{X}$ con tioles RSH puede originar los productos que se muestran en el esquema N° 9:

23. Moura, E.; Dickman, M.; Siebald, H.; Gama, G. *Polyhedron*. 1999, **18**, 2899-2906.



- + * = CH₃ ó H.
- + M = Fe Ru.
- + X = I (complejos de Fe) ó Cl (complejos de Ru).
- + L₁, L₂ = dppe ó PPh₃.
- + Solvente = MeOH (complejos de Fe) ó EtOH (complejos de Ru).

ESQUEMA N°9: Productos probables en la reacción de un complejo organometálico con tior.

Los tioles modelos reaccionan con el complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ en metanol como solvente y en presencia de NH_4PF_6 como abstractor de haluros, para originar complejos Fe(III)-SR .

Por otra parte, los compuestos de Ru no reaccionan con los tioles o se observan productos que indican que el enlace SH permanece inalterado (Reacción **(a)** o **(e)** del esquema N°8). En este último caso se obtienen productos del tipo $[\text{CpRu}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{HSR}]\text{X}$ ($\text{X} = \text{Cl}$ o PF_6).

3.2.1. Análisis IR para los complejos sintetizados.

Los espectros IR de los productos sintetizados dan información rápida de su naturaleza, corroborándose, posteriormente con otras técnicas. Estos se muestran en las figuras N° 12 y 13 y en la tabla N° 8.

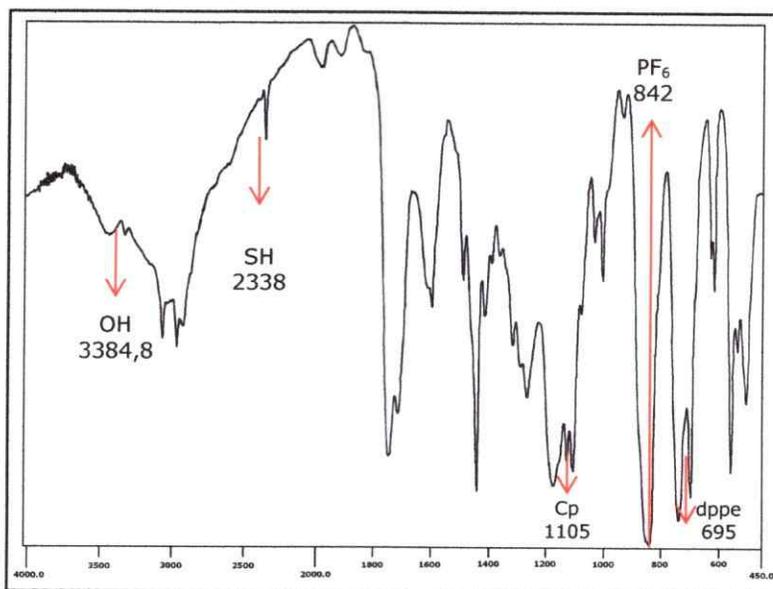


Figura N° 12: Espectro IR del Complejo $[\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}-\text{DTT}^+]$, en pastilla de KBr.

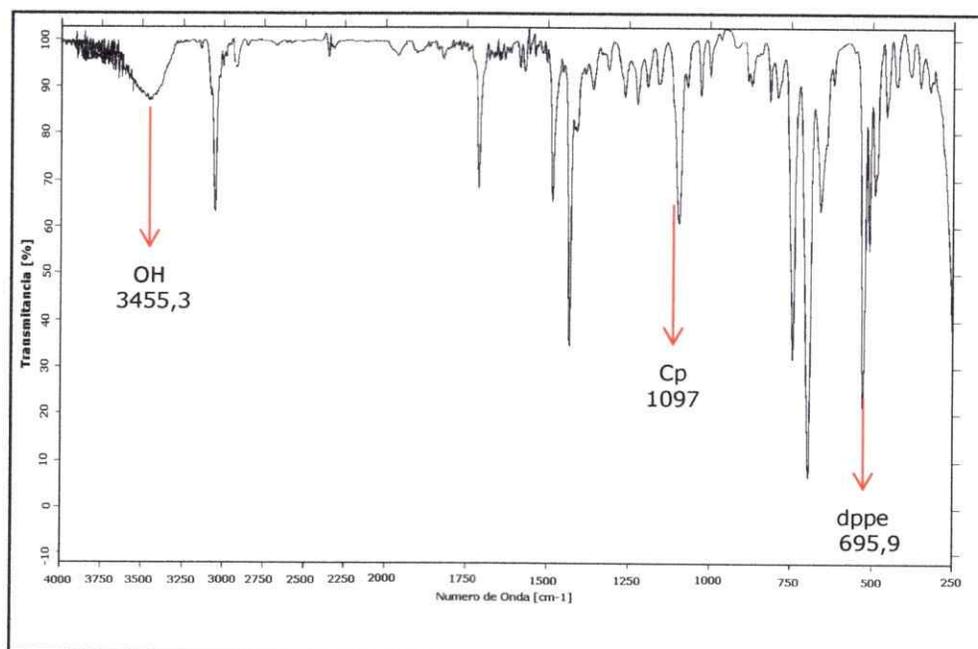


Figura N° 13: Espectro IR del Complejo $[\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{Ru}-\text{DTT}^+]$, en pastilla de KBr.

En el espectro IR, la banda típica del $\nu(\text{SH})$ no es observada para los complejos **(1)**, **(3)** y **(4)**, pero para el complejo **(2)** esta vibración es observada a 2338 cm^{-1} debido al grupo SH sin coordinar que queda libre, como es esperado.

También se observa la banda típica del anión PF_6^- , $\nu(\text{PF}_6) \approx 840 \text{ cm}^{-1}$ y para el fragmento $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$, $\delta(\text{C}_5\text{H}_5) \approx 1100 \text{ cm}^{-1}$; $\delta(\text{fuera del plano } \text{C}_5\text{H}_5) \approx 690 \text{ cm}^{-1}$.

Las bandas características de los ligantes también se observan: $\nu(\text{NH}_2)$ a 3425 y 3269 cm^{-1} , $\nu(\text{OH}) \approx 3400 \text{ cm}^{-1}$ y $\delta(\text{NH}_2)$ a 1592 cm^{-1} [5].

El complejo **(5)**, obtenido de la reacción del fragmento $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{Ru}^+$ con mercaptoetanol, presentó las bandas esperadas en el espectro IR para el anión PF_6^- , $\nu(\text{PF}_6) \approx 837,6 \text{ cm}^{-1}$, y para dicho fragmento: $\delta(\text{C}_5\text{CH}_3) \approx 109,6 \text{ cm}^{-1}$, así como se observan las bandas típicas del ligante: $\nu(\text{OH}) \approx 3420 \text{ cm}^{-1}$.

Para el resto de los complejos no se observan las bandas típicas de los ligantes, observándose solo las bandas del fragmento organometálico, por lo cual se deduce que no hay ruptura del enlace SH.

Tabla N° 8: IR de los complejos obtenidos.

LIGANTE COMPLEJO	dppe	PPh ₃	PF ₆	Cp/Cp ⁺	CO	SH	OH	NH ₂
(1) Cp(dppe)Fe ⁺⁺ Mercaptoetanol	695	-	840	1105	-	-	3420,4	-
(2) Cp(dppe)Fe ⁺⁺ Ditiotreitól	695	-	842	1105	-	2338	3384,8	-
(3) Cp(dppe)Fe ⁺⁺ L-Cys	695,3	-	841	1103	1612	-	3430	3269
(4) Cp(dppe)Fe ⁺⁺ GSH	680	-	800	1100	1500	-	3590	3636
(5) Cp*(dppe)Ru ⁺⁺ Mercaptoetanol	694,4	-	837,6	1096,6	-	-	3420	-
(6) Cp*(dppe)Ru ⁺⁺ Ditiotreitól	695,9	-	-	1094,7	-	-	3455,3	-
(7) Cp*(dppe)Ru ⁺⁺ GSH	696,4	-	840,9	-	-	-	-	3050,0
(8) Cp(PPh ₃) ₂ Ru ⁺⁺ Mercaptoetanol	-	695,9	840,5	1089,5	-	-	3449,0	-
(9) Cp(PPh ₃) ₂ Ru ⁺⁺ Ditiotreitól	-	694,7	840,9	1089,0	-	-	-	-
(10) Cp(PPh ₃) ₂ Ru ⁺⁺ L-Cys	-	694,6	840,8	1086,4	-	-	-	3051,2
(11) Cp(PPh ₃) ₂ Ru ⁺⁺ GSH	-	694,4	842,7	1086	-	-	-	3050,9

3.2.2 Análisis RMN de los complejos sintetizados.

Los espectros NMR ^1H de los compuestos **(6)** al **(10)** (ver tabla N° 8), muestran señales muy débiles y que no concuerdan con las señales esperadas para los ligantes. Se observa en los espectros NMR ^{31}P de los compuestos **(6)** al **(7)**, una única e intensa señal a 45 ppm, aproximadamente, la cual corresponde a la señal del dppe ó PPh_3 , dejando en evidencia que los complejos de Ru no reaccionan con los tioles ya descritos.

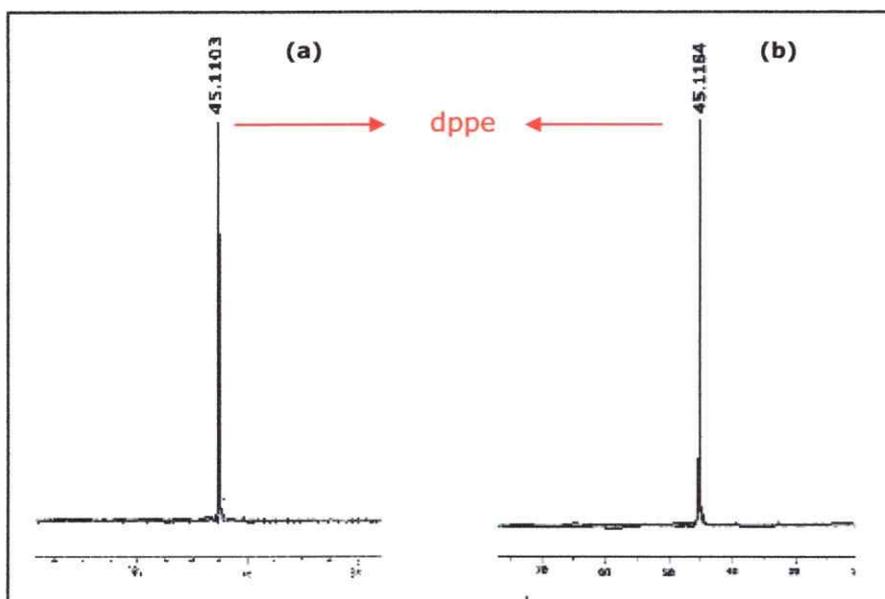


Figura N° 14: Espectro RMN de ^{31}P para productos de las reacciones de $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{Ru}^+$ + DTT **(a)** y $\text{Cp}^*(\text{dppe})\text{RuCl}$ **(b)**.

3.2.3 Caracterización de los complejos [Cp(dppe)Fe-SR]PF₆.

El análisis elemental para cada compuesto está de acuerdo a lo esperado y lo propuesto. Los datos obtenidos se pueden observar en la tabla N° 9.

Tabla N° 9: Análisis Elemental de Los Complejos [Cp(dppe)Fe-SR]PF₆.

Complejo	Análisis Elemental			Calculado			Fórmula Molecular
	%C	%H	%S	%C	%H	%S	
(1)	51,66	4,75	5,91	51,25	4,75	5,91	C ₃₃ H ₃₅ F ₆ OSP ₃ Fe
(2)	50,59	4,49	5,43	51,34	4,64	5,50	C ₃₅ H ₃₉ F ₆ O ₂ S ₂ P ₃ Fe
(3)	51,85	4,35	1,60	50,88	4,48	1,70	C ₃₄ H ₃₆ F ₆ O ₂ NSP ₃ Fe
(4)	52,39	4,74	-	52,39	5,09	3,30	C ₄₁ H ₆₅ F ₆ O ₅ N ₃ SP ₃ Fe

Como es esperado para los complejos de Fe (III) d⁵ bajo spin, los compuestos son paramagnéticos. En los espectros EPR se puede observar una única señal simétrica. Los valores de g son un poco mas altos que los valores de g para el electrón libre (g = 2,0032), lo cual es usualmente observado para los complejos de 17 electrones de Fe (III) que poseen un SOMO ocupado con una predominante carácter metálico [13 y 20].

El espectro EPR para el compuesto (3), se puede observar en la figura N°15 y los valores de g se pueden ver en la tabla N° 10.

Tabla N°10: EPR^a y UV-visible^b de los complejos [Cp(dppe)Fe-SR]PF₆.

COMPLEJO	g(iso)	$\lambda_{\text{máx.}} (\epsilon)$	
		λ_1	λ_2
(1) Cp(dppe)Fe ⁺ + Mercaptoetanol	2,066	441 (205)	583 (700)
(2) Cp (dppe)Fe ⁺ + Ditiotretol	2,069	446 (196)	535 (790)
(3) Cp(dppe)Fe ⁺ + L-Cys	2,079	441 (205)	553 (820)

^a En CH₂Cl₂.

^b En CH₂Cl₂, en λ nm, ϵ en (mol L⁻¹)⁻¹.

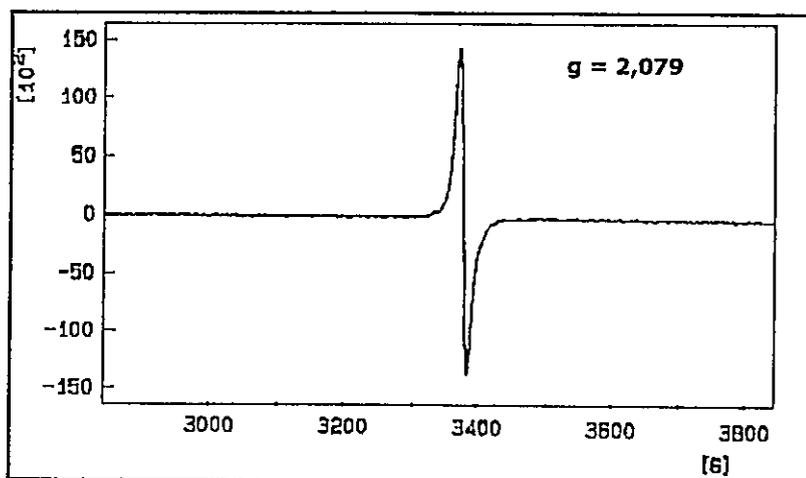


Figura N° 15: Espectro EPR del Complejo (3), a temperatura ambiente y en solución de CH₂Cl₂.

El espectro UV-visible para los complejos de $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe-SR}$ presentan una banda de absorción cercana a los 580nm, característica de los complejos que contienen el cromóforo Fe(III)-SR ^[11-13] (Figura N°16).

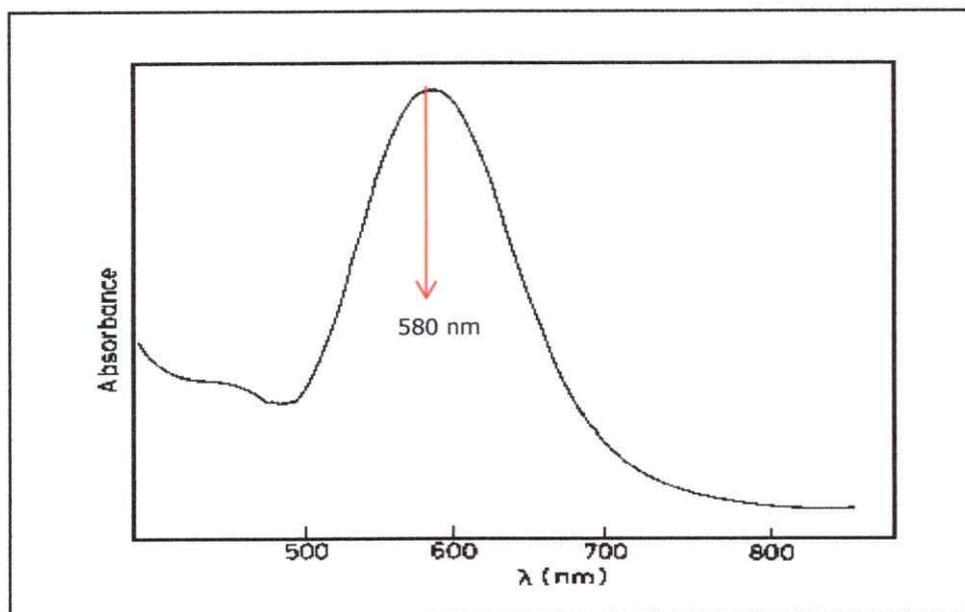


Figura N° 16: Espectro UV-visible del Complejo **(1)**, a temperatura ambiente y en solución de CH_2Cl_2 .

La formación de la serie de compuestos $[\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe-SR}]\text{PF}_6$, muestra que el fragmento $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$ reacciona efectivamente tanto los tioles modelos como los tioles de interés biológico.

Los complejos obtenidos de la reacción de los compuestos de rutenio con los tioles modelos son de color anaranjado-amarrillo, y poseen una banda de absorción intensa cercana a los 237 nm.

3.3 Estudio del efecto de los derivados organometálicos sobre la actividad de la papaína.

3.3.1 Estudio de la actividad enzimática.

Se define la actividad de la enzima como:

$$1U = 0,1\Delta A$$

Donde U corresponde a unidad.

Como se tiene una solución de enzima de concentración 1 mg/mL y se toman 30 μ L de dicha solución, en total se tienen 30 μ g de enzima en todas las reacciones enzimáticas, la absorbancia se divide por 0,003 mg. Así, la velocidad estará expresada en [U/(mg \times min)].

La cinética mostrada comprueba que esta es una enzima que se puede utilizar en ensayos biológicos, pues en tiempos relativamente cortos se obtienen resultados reproducibles.

La figura muestra la gráfica de velocidad de reacción de la enzima papaína en condiciones estándar (Figura N° 17). Se observó que a partir de los 10 minutos la velocidad disminuyó, por lo que se utilizó como tiempo de reacción para todas las evaluaciones los 5 min.

Tabla N° 11: Valores de $V (\Delta A_{440nm})$ en relación al tiempo de reacción t_{Rx} (min).

t_{Rx} (min)	$V (\Delta A_{440nm}) \pm SD$
0	0
5	$0,2238 \pm 0,007$
10	$0,3479 \pm 0,004$
20	$0,4061 \pm 0,008$
30	$0,4517 \pm 0,003$

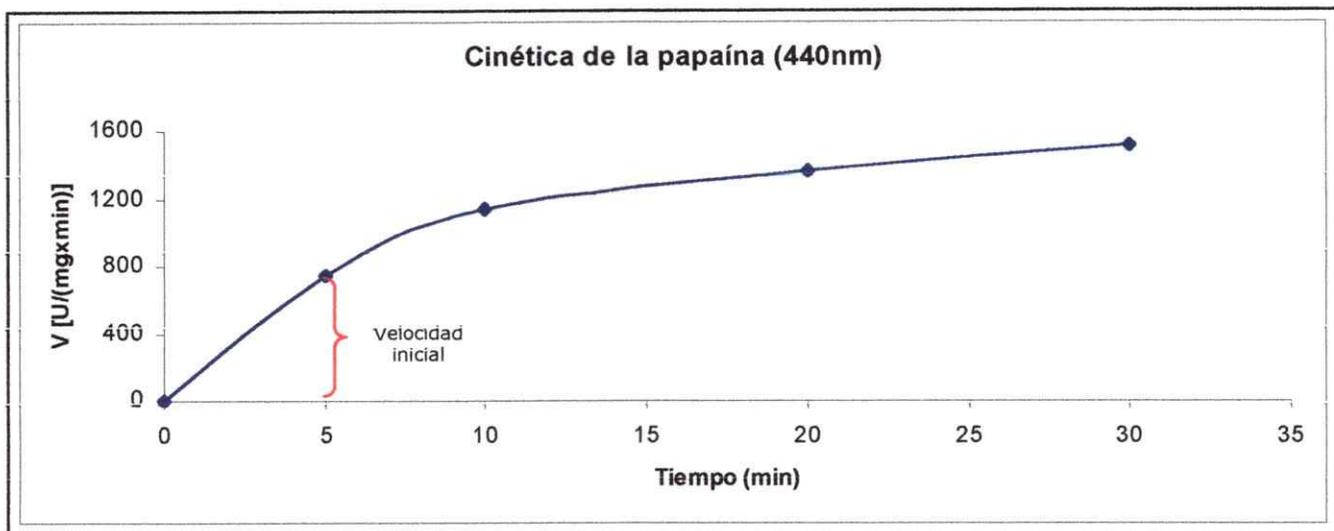


Figura N° 17: Cinética enzimática.

3.3.2 Efecto del complejo organometálico $Cp(dppe)FeI$ sobre la actividad de la papaína.

Al analizar el efecto del complejo $Cp(dppe)FeI$, 1mg/mL (1,55 mM) en la actividad de la enzima previamente activada e incubada durante 5 minutos, se observó que se indujo un aumento de un 95% de la actividad enzimática (Figura N° 18).

Tabla N° 12: Valores de $V (\Delta A_{440nm})$ en relación al tipo de reacción.

	$V (\Delta A_{440nm}) \pm SD$
Control	0,2511±0,004
$Cp(dppe)Fe^+$	0,4916±0,006

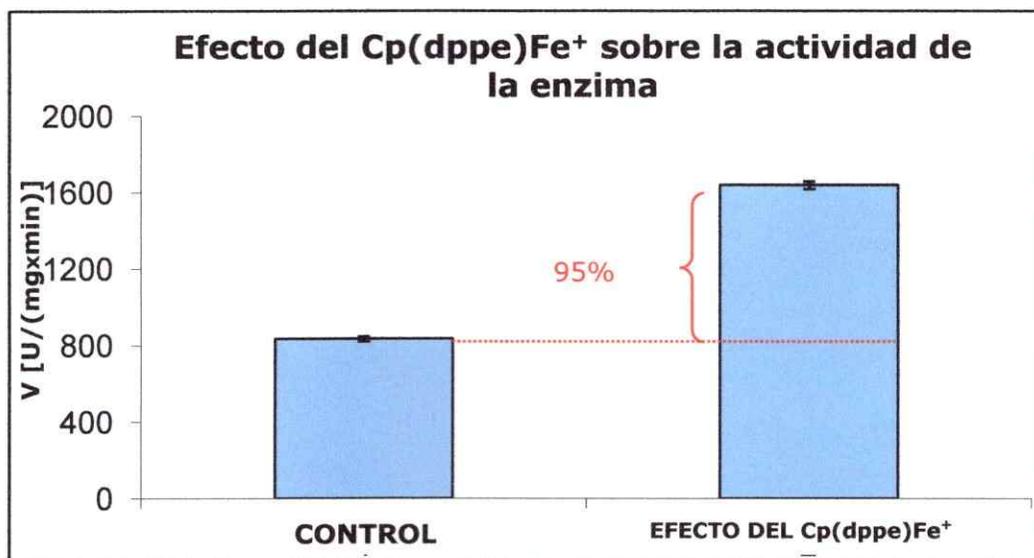


Figura N° 18: Efecto del $Cp(dppe)Fe^+$ sobre la actividad de la papaína. La enzima fue activada, e incubada con el complejo durante 5 min. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones $\pm 0,006$ error.

Este comportamiento se puede explicar por el hecho que el complejo organometálico Cp(dppe)FeI es capaz de romper los enlaces S-S en compuestos del tipo RS-SR (Fig. N° 1), lo que podría ayudar a activar la enzima aumentando así su actividad catalítica.

3.3.3 Variación de la concentración del complejo organometálico.

Para determinar el efecto de la concentración del fragmento organometálico en la actividad enzimática (Tabla N° 13), se probaron diferentes concentraciones en las mismas condiciones del ensayo descrito antes. Se observa que la actividad aumenta con la concentración del fragmento organometálico utilizada (Figura N° 19).

Tabla N° 13: Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.

	V (ΔA_{440nm}) \pm SD
(1) Control	0,2511 \pm 0,004
(2) 1,5X10 ⁻² mM	0,3549 \pm 0,006
(3) 3,0X10 ⁻² mM	0,4498 \pm 0,007
(4) 4,5X10 ⁻² mM	0,4508 \pm 0,007
(5) 6,0X10 ⁻² mM	0,4331 \pm 0,009
(6) 7,5X10 ⁻² mM	0,5175 \pm 0,008

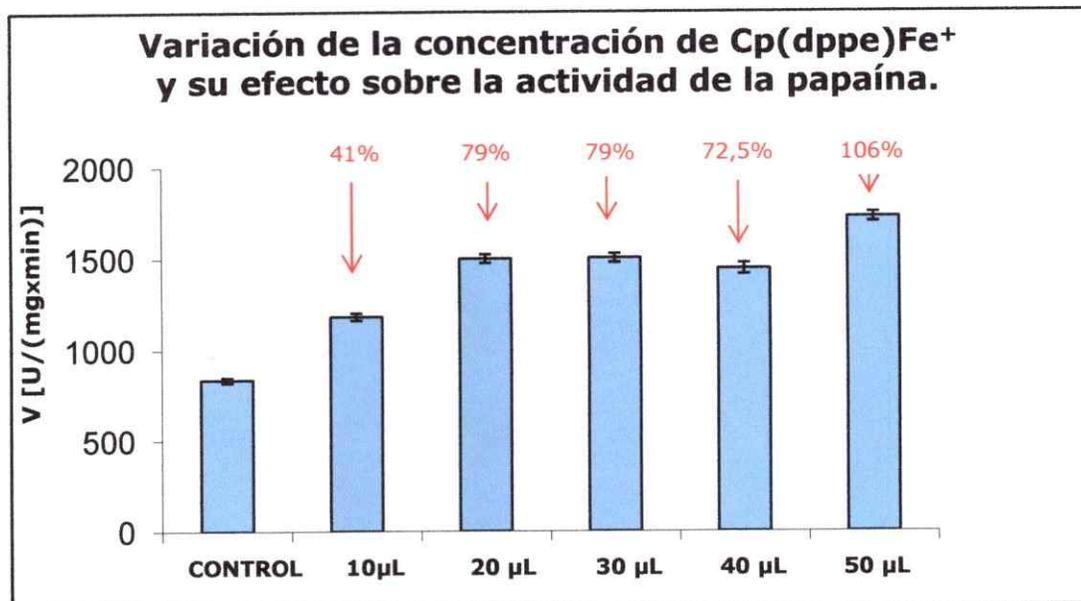


Figura N° 19: Efecto de la variación de la concentración del Cp(dppe)Fe^+ sobre la actividad de la enzima.

Se puede observar que la actividad de la enzima aumenta al aumentar la concentración del compuesto organometálico. Esto sugiere que la hipótesis planteada en el sentido que el fragmento contribuye en la activación de la enzima, podría ser el mecanismo mediante el cual se produce el efecto observado.

3.3.4. Efecto del complejo organometálico $Cp(dppe)FeI$ sobre la actividad de la enzima. Reacción por 24 hrs.

Como se observó en los experimentos anteriores, la actividad de la enzima aumenta al agregar al medio de reacción una solución que contiene al fragmento organometálico en estudio, aún variando la concentración de este.

Es por ello que se decidió dejar reaccionar por 24 hrs la enzima, tanto activada como sin activador, con el fragmento (Tabla N° 14). Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en las figuras siguientes. Se puede observar en la figura N° 20 que la reacción de la enzima con el fragmento durante 24 hrs produce una disminución en la actividad de la enzima, de entre un 91,2% a un 50,8%, dependiendo de las condiciones de reacción. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas, si la medición de actividad se realiza previa incubación con el activador durante 24 hrs.

Tabla N° 14: Valores de $V (\Delta A_{440nm})$ en relación al tipo de reacción.

	$V (\Delta A_{440nm}) \pm SD$
Reacción	0,2386±0,004
(1) $E_{activada} + Cp(dppe)Fe^+$	0,0211±0,0001
(2) $E + Cp(dppe)Fe^+$	0,0675±0,001
(3) $E + A + Cp(dppe)Fe^+$	0,1173±0,002

Legenda tabla

SD : Desviación estándar

E : Enzima.

A : Activador

$E_{activada}$: Enzima previamente activada.

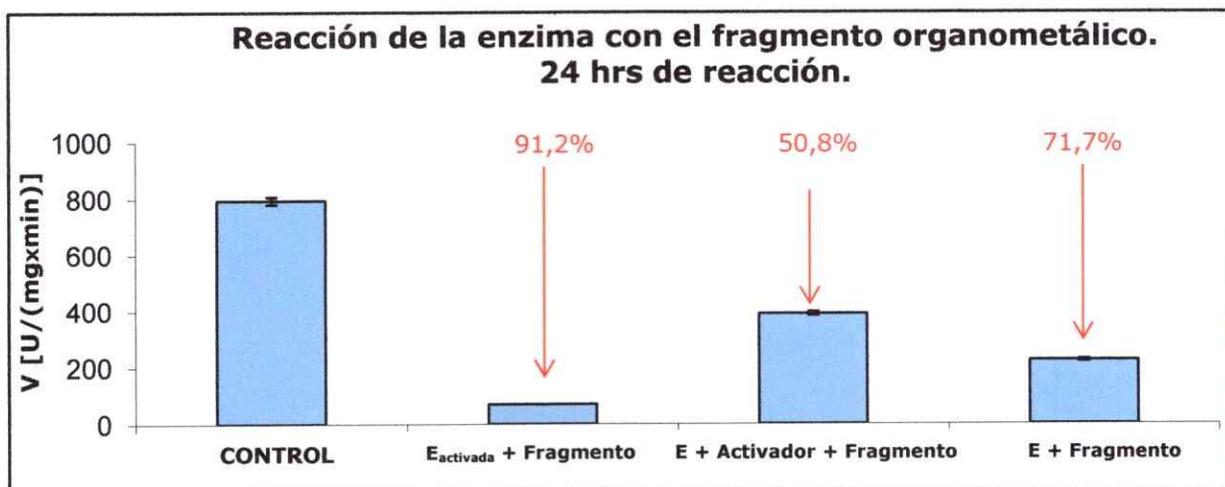


Figura N° 20: Efecto del $Cp(dppe)Fe^+$ sobre la actividad de la enzima.

Este comportamiento del complejo $Cp(dppe)FeI$ con la papaína se puede explicar debido a la capacidad que este compuesto posee para romper los enlaces S-H presentes tanto en tioles modelos como en la enzima, por lo cual se vería afectada la actividad catalítica de la enzima.

3.3.5. Efecto de complejos organometálicos de rutenio sobre la actividad de la papaína.

Se determinó el efecto de complejos organometálicos de rutenio en la actividad de la enzima. En este caso se siguió el mismo protocolo que para el complejo $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$, se activó la enzima, se agregaron $50\mu\text{L}$ del respectivo complejo ($7,5 \times 10^{-2}\text{mM}$) y se dejó reaccionar por 24 hrs (Tabla N° 15).

Los resultados mostrados en la figura N° 21 señalan que la actividad de la enzima fue fuertemente inhibida, obteniéndose valores de absorbancia incluso negativos. Es importante destacar que este es un resultado absolutamente distinto al obtenido con los tioles, en donde no se produce interacción.

Tabla N° 15: Valores de $V (\Delta A_{440\text{nm}})$ en relación al tipo de reacción.

	$V (\Delta A_{440\text{nm}}) \pm \text{SD}$
Control	$0,2386 \pm 0,004$
$\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$	$-0,0244 \pm 0,0007$
$\text{Cp}(\text{dppe})\text{Ru}^+$	$-0,0564 \pm 0,0008$
$\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$	$0,1312 \pm 0,002$

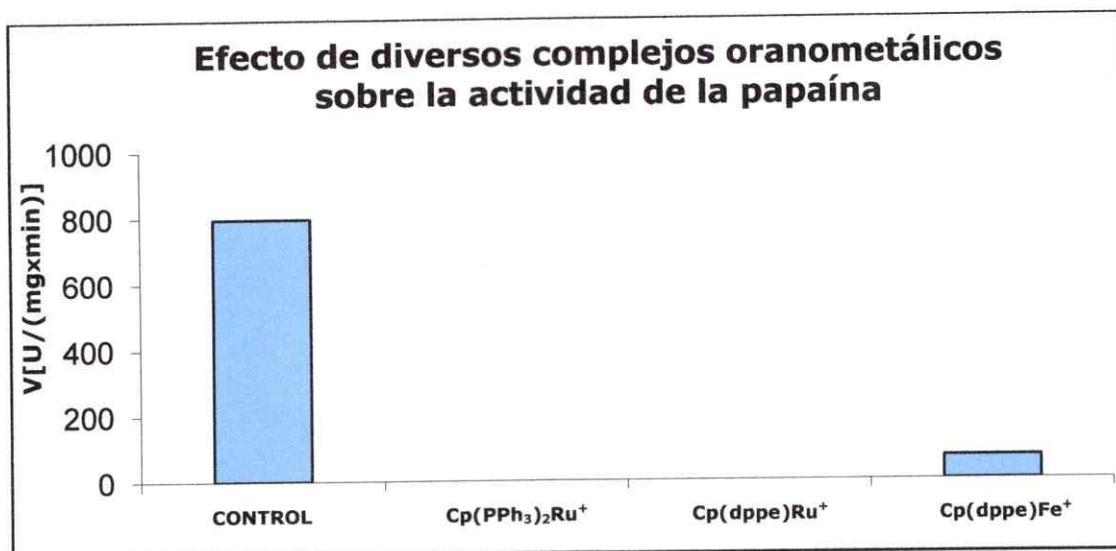


Figura N° 21: Efecto de diversos Complejos Organometálicos sobre la Actividad de la Enzima.

3.3.6 Determinación del IC_{50} .

3.3.6.1 Cálculo del IC_{50} para el complejo organometálico Cp(dppe)FeI.

Como se observó que la actividad de la enzima disminuyó en un 91,2% cuando la enzima activada se hizo reaccionar por 24 hrs con el fragmento organometálico a una concentración de $7,5 \times 10^{-2}$ mM, se utilizaron concentraciones menores del fragmento con el propósito de determinar la concentración del fragmento organometálico a la cual se reduce la actividad en un 50% (IC_{50}) (Tabla N° 16). La figura N° 22, muestra que el disminuir la concentración el efecto se hace menos drástico y la inhibición se reduce en una menor proporción.

Tabla N°16: Valores de V (ΔA_{440nm}) en relación al tipo de reacción.

	V (ΔA_{440nm}) \pm SD
Reacción	0,2386 \pm 0,004
(1) 3.1X10⁻³mM	0,1928 \pm 0,004
(2) 6.2X10⁻³mM	0,2066 \pm 0,005
(3) 9.3X10⁻³mM	0,1375 \pm 0,003
(4) 1.2X10⁻²mM	0,1235 \pm 0,003
(5) 1.5X10⁻²mM	0,1312 \pm 0,002

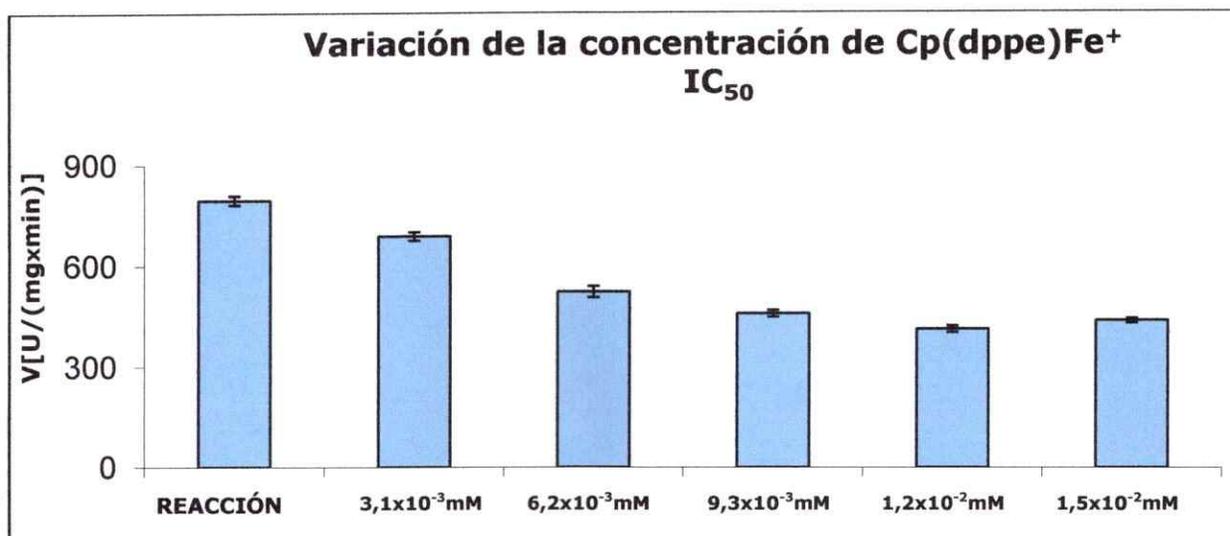


Figura N° 22: Efecto de la variación de la concentración del Cp(dppe)Fe⁺ sobre la actividad de la papaína (IC₅₀).

Para determinar el IC_{50} , es necesario hacer una aproximación potencial del gráfico, la cual se muestra en la figura N° 23. Una vez obtenida la ecuación que representa esta tendencia se puede interpolar el valor en el cual se obtiene la disminución en un 50%.

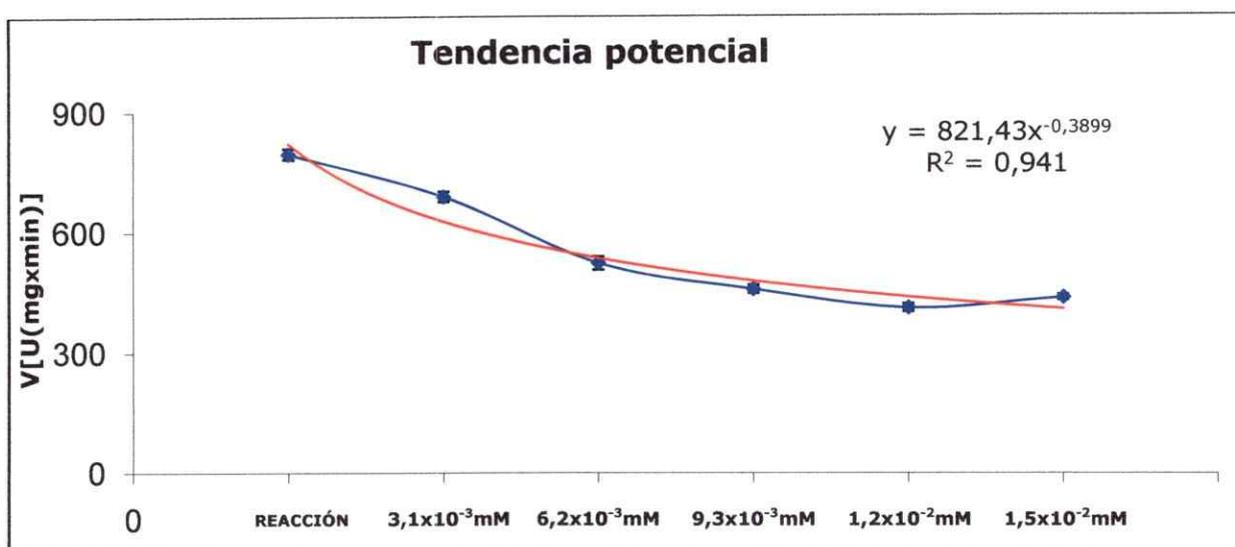


Figura N° 23: Aproximación potencial del gráfico del efecto de la variación de la concentración del $Cp(dppe)Fe^+$ sobre la actividad de la papaína.

En este caso el efecto del fragmento en la actividad de la enzima fue concentración-dependiente, obteniéndose un $r = 0,941$ (Figura N° 23). A partir de esta gráfica se determinó que la IC_{50} equivale a una concentración de $9,97 \times 10^{-3} \text{ mM}$ de $Cp(dppe)Fe^+$ ($6,43 \mu\text{L}$).

3.3.6.2 Cálculo del IC_{50} para el complejo organometálico $Cp(dppe)RuCl$.

Dado que a la concentración utilizada en el ensayo anterior, se produjo una total inhibición de la actividad enzimática, se determinó el efecto de concentraciones menores en la actividad. En la figura N° 24 se observa que al reducir la concentración, el efecto del complejo se reduce significativamente.

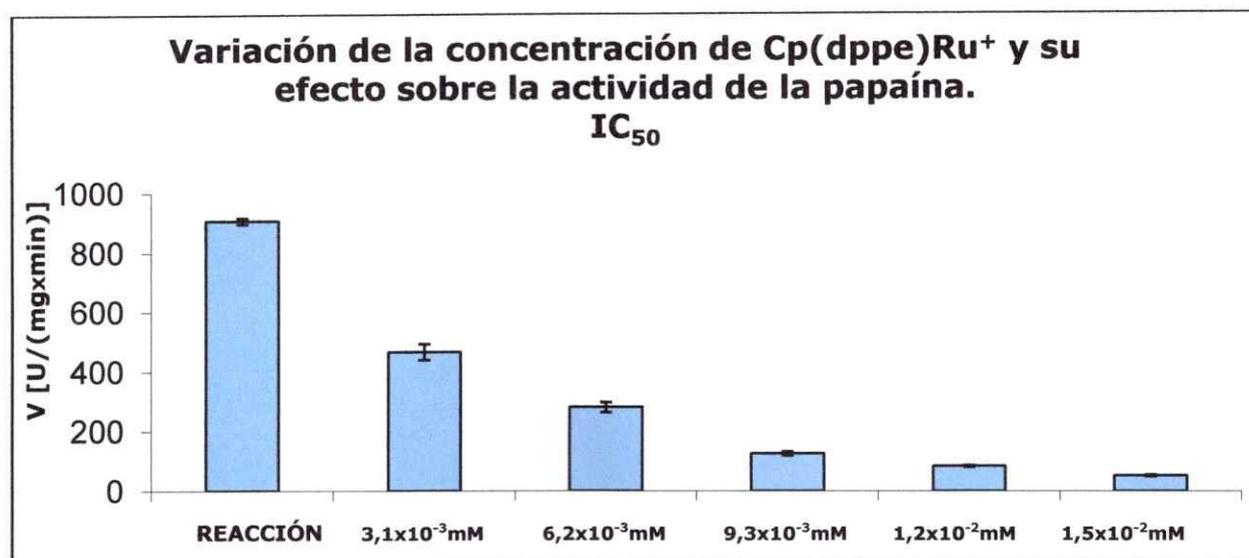


Figura N° 24: Efecto de la variación de la concentración del $Cp(dppe)Ru^+$ sobre la Actividad de la Enzima.

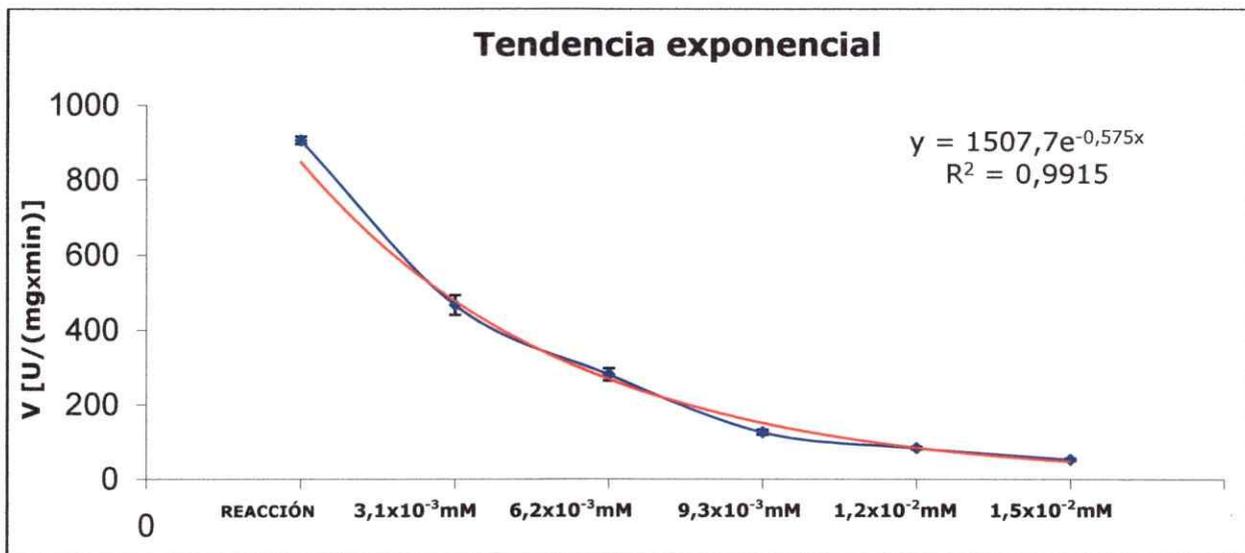


Figura N° 25: Aproximación exponencial del gráfico del efecto de la variación de la concentración del Cp(dppe)Ru^+ sobre la Actividad de la Enzima.

La IC_{50} , obtenida en este caso fue $3,24 \times 10^{-3}$ mM de Cp(dppe)Ru^+ (Figura N° 25). Se observó que el valor obtenido en este caso es inferior al obtenido para el fragmento Cp(dppe)Fe^+ , lo que indicaría que este complejo es mucho más reactivo, pues se necesita menor cantidad del fragmento de Ru para disminuir la actividad de la enzima.

3.3.6.3 Cálculo del IC_{50} para el complejo organometálico $Cp(PPh_3)_2RuCl$.

Como se mostró antes, al utilizar una concentración del fragmento organometálico igual a $7,5 \times 10^{-2} \text{mM}$, la actividad de la enzima disminuyó en un 100% (Figura N° 21). Se observa en la figura N° 26 que hay un efecto bimodal; a bajas concentraciones no hay un efecto significativo respecto del control, mientras que en el rango $9,3 \times 10^{-3} \text{mM}$ a $1,5 \times 10^{-2} \text{mM}$, si hay un efecto inhibitorio claro. En este caso, para determinar la IC_{50} , se ajustaron los valores de la curva a una ecuación polinomial de 4° orden (Figura N° 27). El valor de IC_{50} obtenido es $9,94 \times 10^{-3} \text{mM}$, siendo este similar al obtenido para el fragmento $Cp(dppe)Fe^+$.

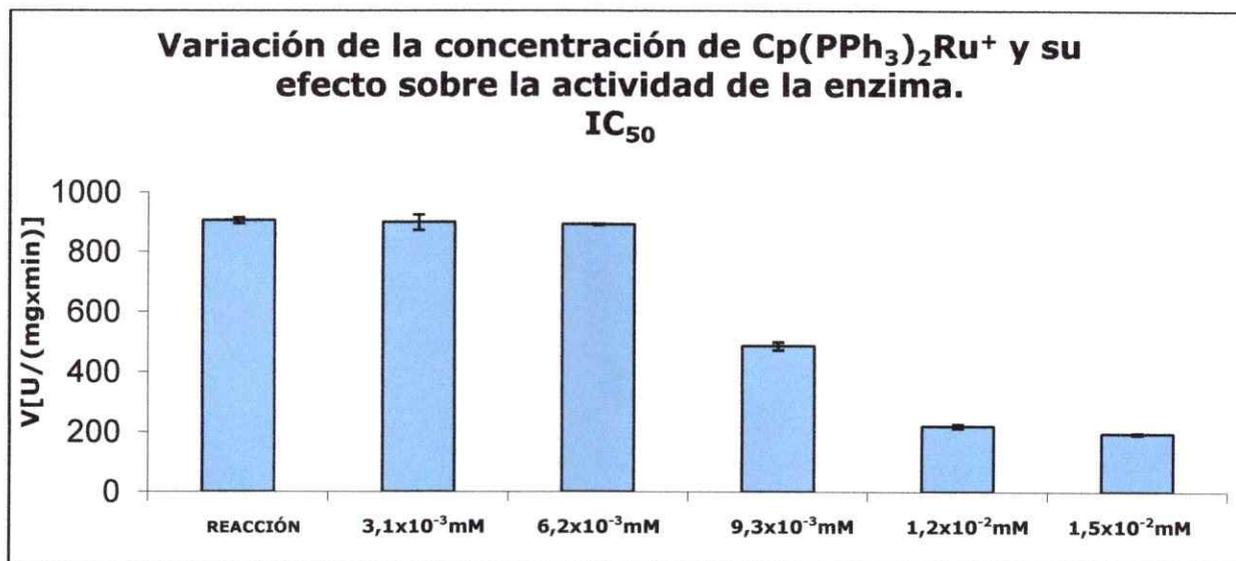


Figura N° 26: Efecto de la variación de la concentración del $Cp(PPh_3)_2Ru^+$ sobre la actividad de la enzima.

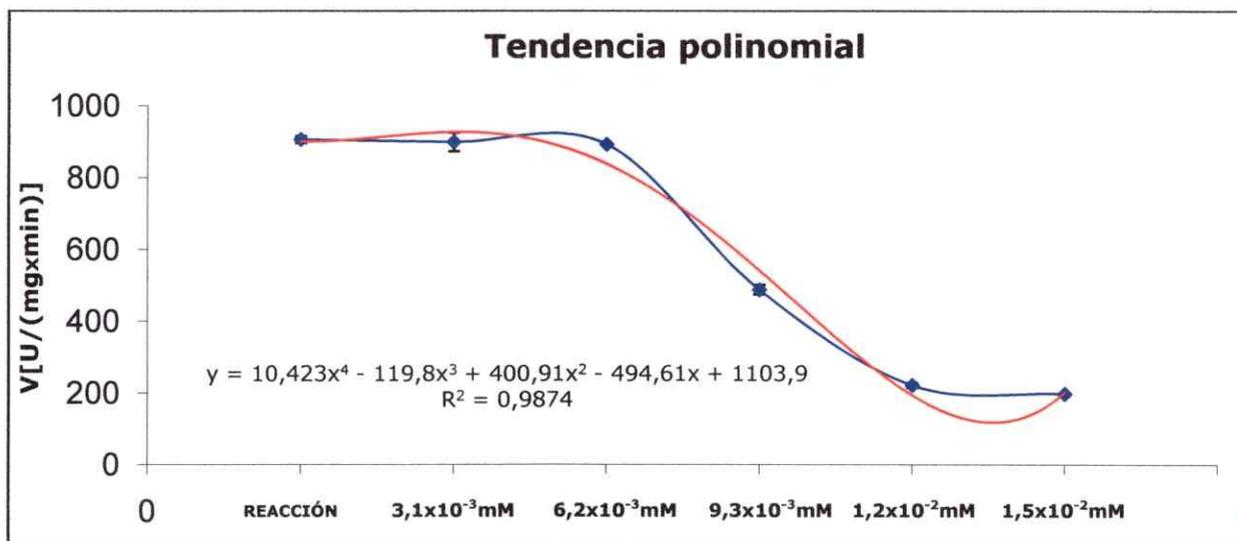


Figura N° 27: Aproximación polinomial de 4º orden del gráfico del efecto de la variación de la concentración del $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$ sobre la actividad de la enzima.

3.3.7 EPR de la reacción de la enzima con los compuestos organometálicos.

Para la reacción de los complejos organometálicos con la enzima, no se observó ninguna señal en el espectro EPR. Como se muestra en la figura N° 28 a N° 30, no existen señales que indiquen presencia de complejos paramagnéticos del tipo $\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{III})}\text{-SR}$. La ausencia de señales podría corresponder además, a la formación de un complejo diamagnético del tipo $\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{II})}\text{-SR}$.

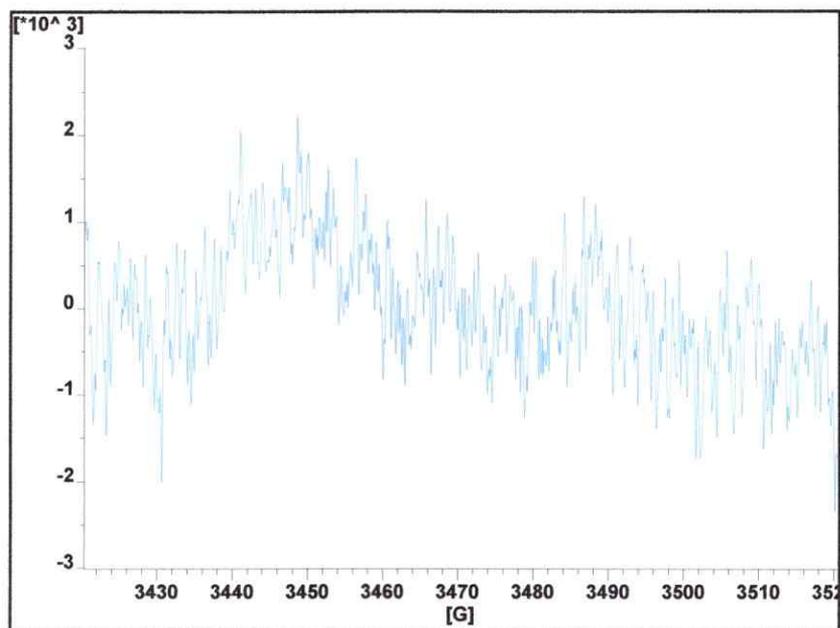


FIGURA N° 28: Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $Cp(dppe)Fe^+$.

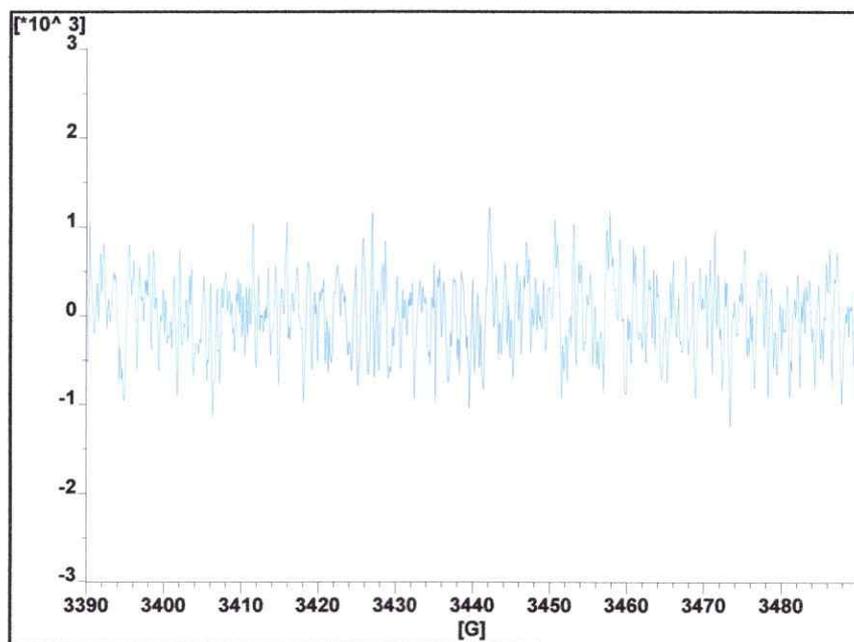


FIGURA N° 29: Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $Cp(dppe)Ru^+$.

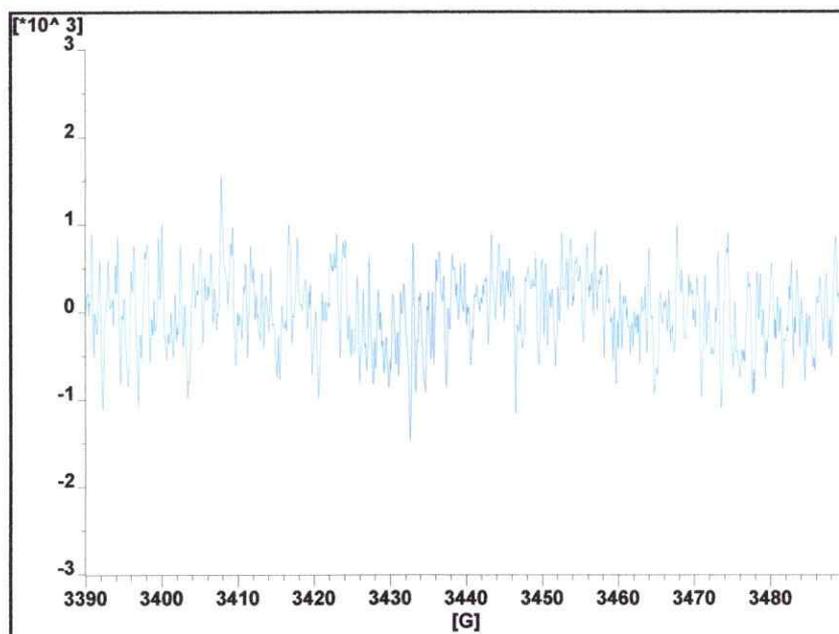


FIGURA N° 30: Espectro EPR la reacción de la enzima con el fragmento $\text{Cp}(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}^+$.

3.4 Discusión General.

La búsqueda de moléculas capaces de inhibir selectivamente enzimas importantes en sistemas biológicos, ha aumentado en los últimos años. Si bien tradicionalmente, se utilizan moléculas de naturaleza orgánica, los complejos organometálicos representan una buena alternativa como potenciales agentes terapéuticos.

En esta tesis doctoral se evaluó la interacción de complejos organometálicos de Fe y Ru con tioles modelos y con la enzima papaína que presenta en su sitio activo enlaces SH.

El rompimiento del enlace SH presente en tioles modelos, por el complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, aparentemente ocurre a través de la formación de un intermediario que involucra la molécula de azufre coordinada al fragmento organometálico^[10], como se sugiere en la figura N° 31:

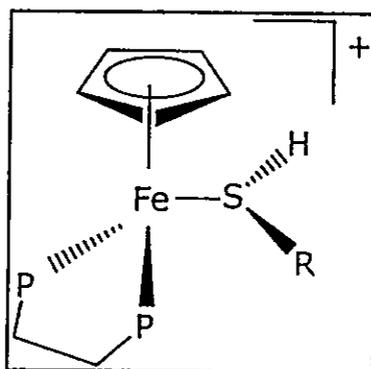


Figura N° 31: Intermediario del rompimiento de el enlace SH^[10].

Esta propuesta está apoyada por cálculos de orbitales moleculares, los cuales indican una interacción favorable de retrodonación HOMO [Cp(dppe)Fe⁺]-LUMO [RSH], como lo muestra la figura N° 32.

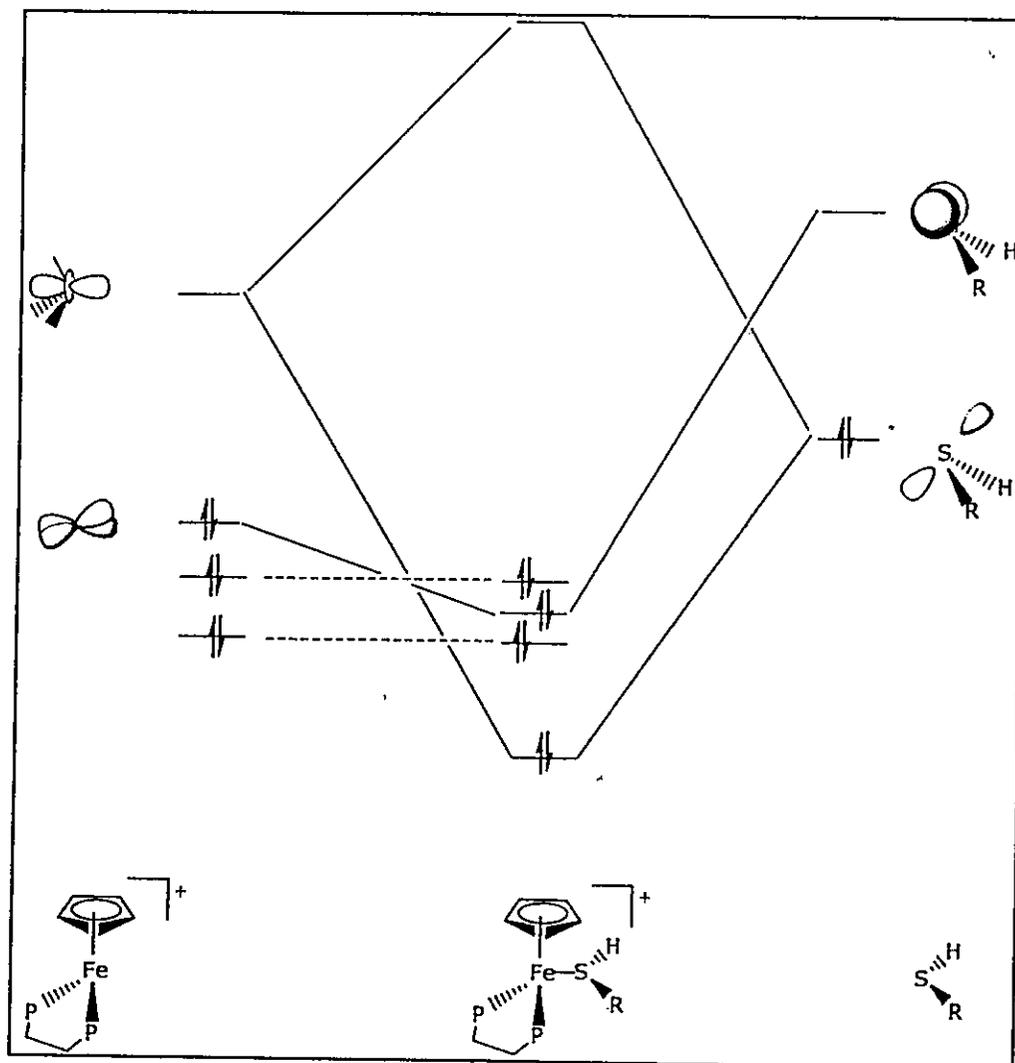


Figura N° 32: Diagrama de orbitales moleculares (OM) de la reacción del complejo Cp(dppe)Fe⁺ con un tiol RSH^[10].

Esta interacción, produce un aumento de la densidad electrónica del LUMO del tior, el cual por poseer un carácter antienlazante, produce un debilitamiento del enlace S-H.

La diferencia de reactividad de los complejos de Ru (II) hacia tioles, con respecto al complejo de Fe (II) se debería, principalmente a la diferencia en las densidades electrónicas presentes sobre el metal en cada complejo, como se muestra en la figura N° 33:

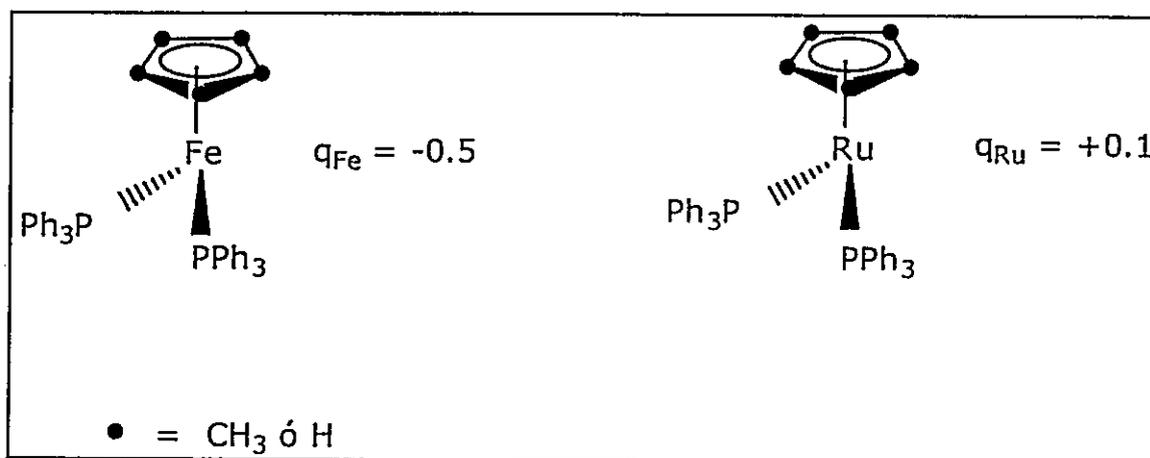


Figura N° 33: Diferencia en las densidades electrónicas presentes sobre el metal en cada complejo del tipo $Cp(L_1L_2)M^+$ ($M = Fe$ y Ru).

El fragmento de Fe (II) es más rico en electrones, por lo que induce una mayor retrodonación $\pi (M) \rightarrow \pi^* (RSH)$, lo que desestabiliza el enlace S-H, produciendo su ruptura. En cambio, el fragmento con Ru (II) es menos rico en electrones, por lo cual la interacción $\pi (M) \rightarrow \pi^* (RSH)$ no produciría una retrodonación tan importante, como para provocar la ruptura del enlace S-H (Figura N° 34).

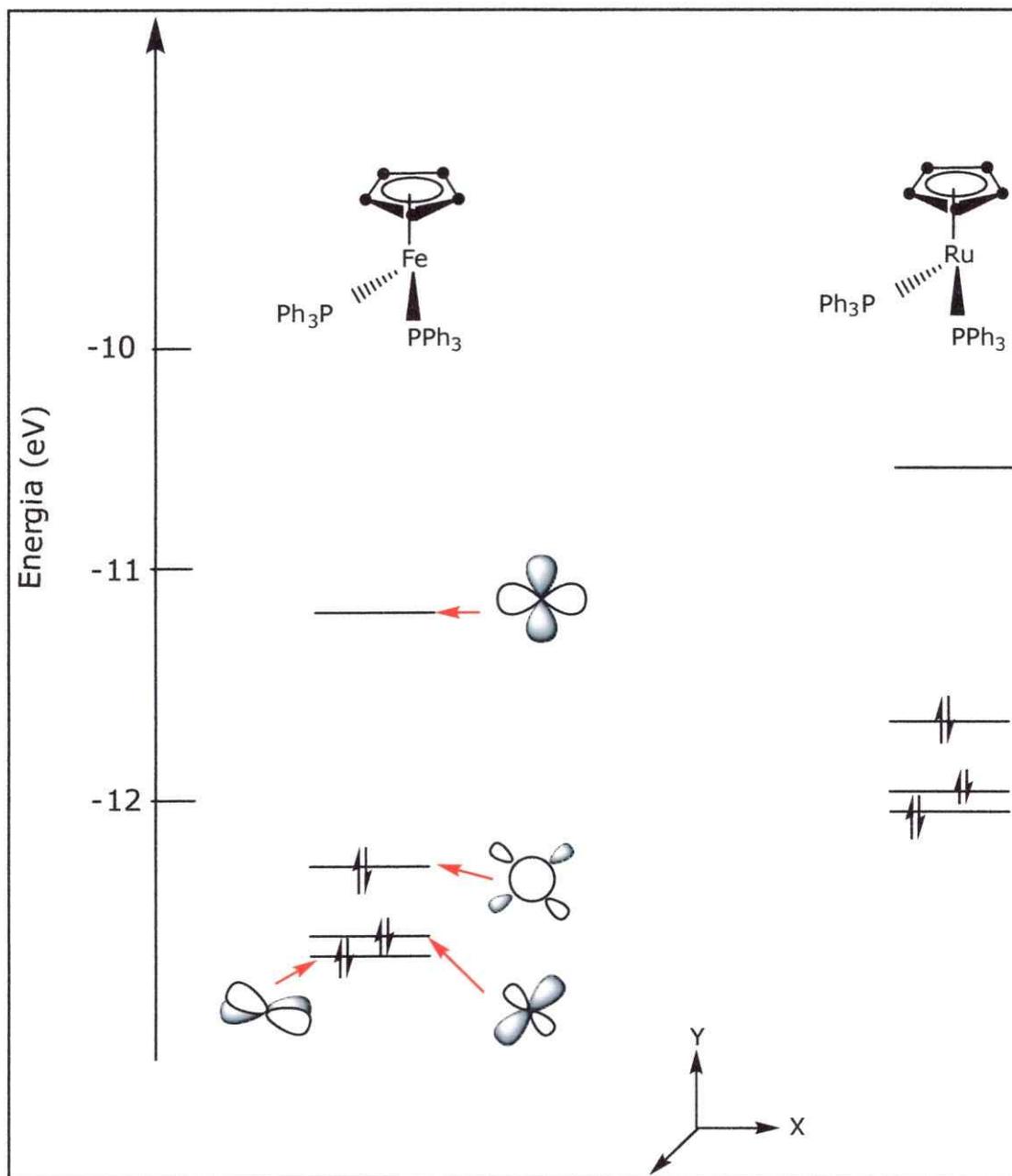
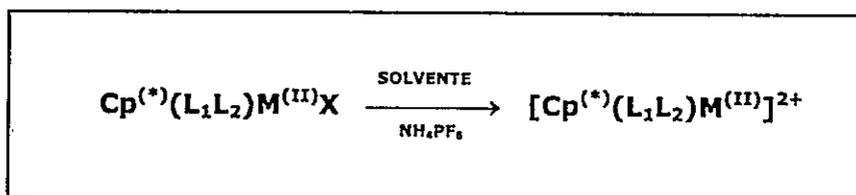


Figura N° 34: Diagrama de OM simplificado para los fragmentos $\text{CpFe(PPh}_3\text{)}_2^{2+}$ y $\text{CpRu(PPh}_3\text{)}_2^{2+}$.

La utilización de solventes con constante dieléctricas altas ^[11, 25], puede afectar la reactividad de los complejos con los tioles modelos, puesto que existe una vasta disociación del complejo organometálico ($[\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{II})}\text{X}]$) en este tipo de solventes. Estas condiciones serian favorables para una reacción directa del fragmento organometálico ($[\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{II})}]^{2+}$) con el enlace SH a través de una adición oxidativa. Por otra parte, la presencia de un abstractor de haluros como lo es el NH_4PF_6 , también induce la salida de haluro generando el fragmento organometálico, como se muestra a continuación:



Donde:

- M: Fe, Ru
- L_1L_2 : dppe, PPh_3
- X: I, Cl

En este contexto, la obtención del fragmento organometálico es el paso determinante en la de adición oxidativa del complejo al enlace H-SR, como se muestra a continuación en la figura N° 35. En esta se exhibe un diagrama esquemático de coordenada de reacción para la reacción de adición oxidativa del complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ con un tiol:

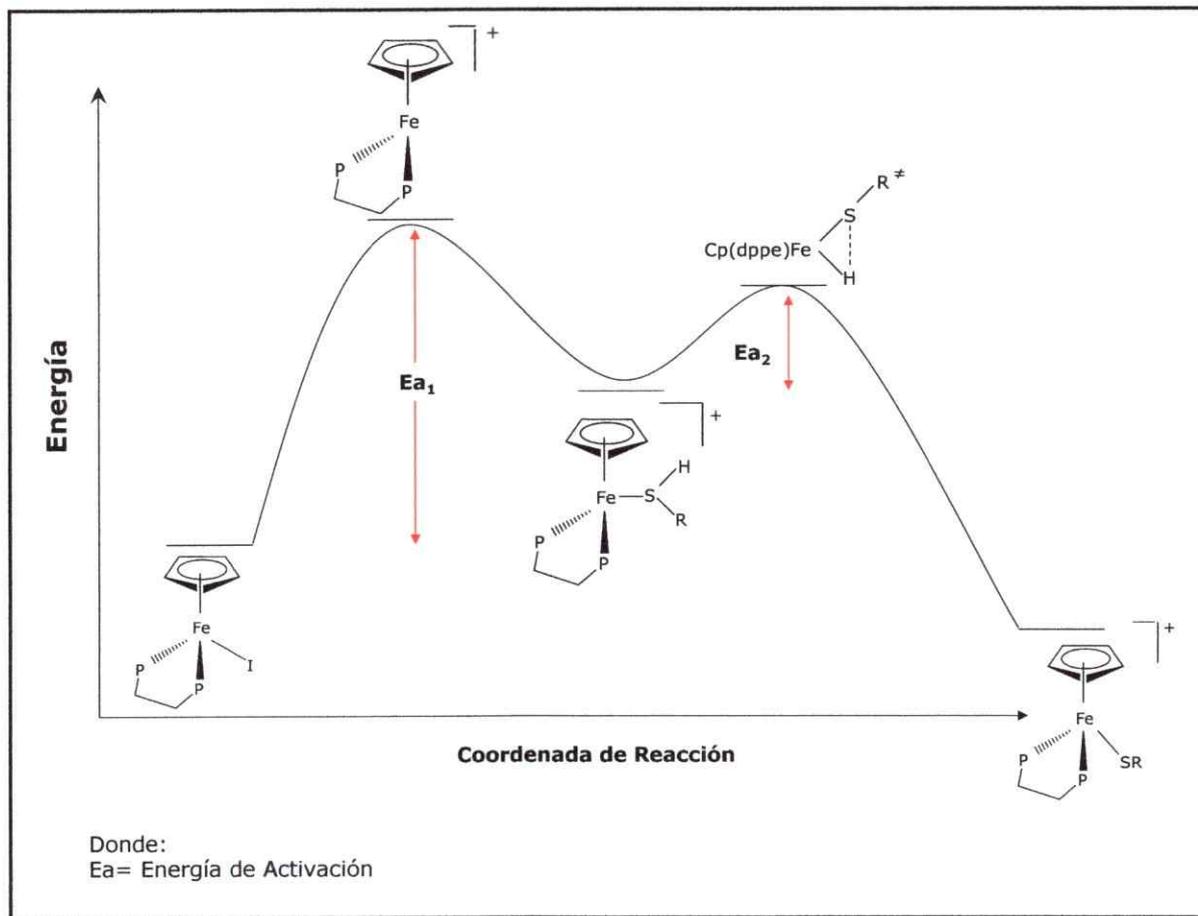


Figura N° 35: Diagrama esquemático de coordenada de reacción para la reacción de adición oxidativa del complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$ con un tiol ^[25].

En esta figura se puede observar la generación del fragmento organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$, el cuál es el paso determinante en una reacción de adición oxidativa (Ea_1). Una vez formado este fragmento de 16 electrones que contiene un sitio de coordinación libre, puede reaccionar rápidamente con el tiol (Ea_2), tal como se muestra en la mencionada figura.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que ambos complejos, son capaces de inhibir la actividad de la papaína cuando se incuban durante 24 horas, mientras que a tiempos cortos (menos de una hora), se produce una activación de la enzima.

Al intentar caracterizar a este efecto, mediante espectroscopia EPR, no se observo ningún tipo de interacción, lo que indica la no formación de complejos el tipo $\text{Cp}^{(*)}(\text{L}_1\text{L}_2)\text{M}^{(\text{III})}\text{-SR}$, los cuales son paramagnéticos. Esto sugiere que el mecanismo de reacción de los complejos organometálicos con la enzima es distinto al observado con los tioles modelos.

- En el caso del complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, pueden postularse dos explicaciones para su comportamiento con la papaína, ambas sin involucrar una reacción con la enzima a través de una adición oxidativa directa al enlace S-H de la enzima del sitio activo (en virtud de los resultados experimentales):
 - a) Modificación de la conformación de la papaína a través de la interacción con un sitio distinto al sitio activo de la enzima.

b) Reacción del fragmento organometálico de Fe con el enlace S-S en la enzima no activa, que produciría una adición oxidativa originando uniones Fe-S y provocando entonces una "pseudoactivación" de la enzima. Esto explicaría la activación inicial de la papaína a tiempos cortos. Esta interacción inicial produciría un nuevo cambio conformacional de la enzima, disminuyendo su actividad a tiempos largos.

- Los complejos de Ru, sin embargo, son más efectivos que el complejo de Fe estudiado en cuanto a disminuir la actividad de la enzima, puesto que poseen un IC_{50} bastante inferior al que posee el complejo de Fe (IC_{50} $[Cp(dppe)Ru^+] = 3,24 \times 10^{-3}$ mM; IC_{50} $[Cp(dppe)Fe^+] = 9,97 \times 10^{-3}$ mM; IC_{50} $[Cp(dppe)Ru^+] = 9,94 \times 10^{-3}$ mM).

Si bien el mecanismo por el cual interacciona el complejo organometálico de Ru con la enzima, no se tiene claro, se ha encontrado en la literatura que complejos de coordinación de Ru(III) ($[Ru^{(III)}(edta)(H_2O)]^-$) interaccionan con cys proteasas (papaína y bromelina), disminuyendo su actividad enzimática considerablemente debido a la interacción del grupo SH del residuo de cys proveniente de la enzima ^[25], tal como se muestra en la figura N° 36:

25. Chatterjee, D.; Hamza, M.; Shoukry, M.; Mitra, A.; Deshmukh, S; van Eldik, R. *Dalton Trans.*, 2003, 203.

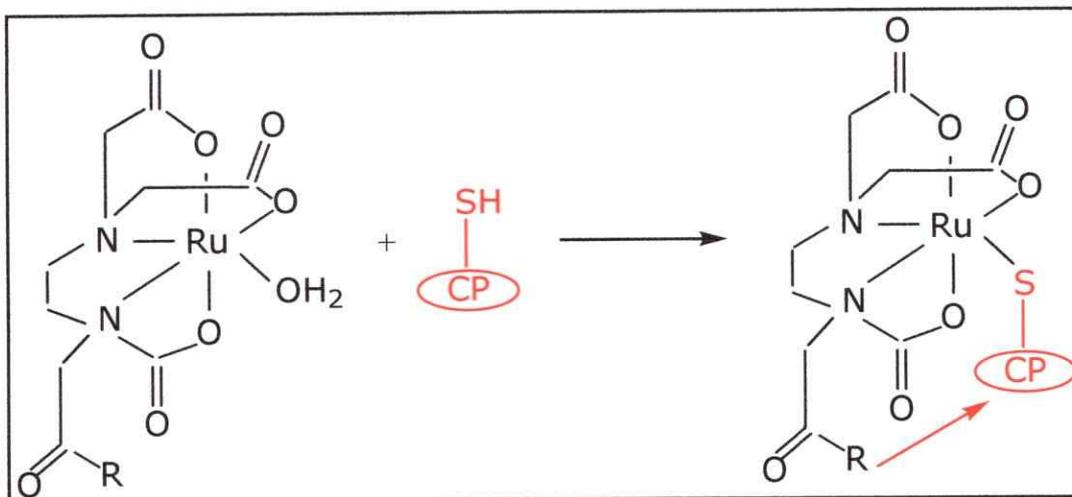


Figura N° 36: Inhibición de una cys proteasa por acción de la formación del complejo estable $\text{Ru}^{(\text{III})}(\text{edta})\text{-CP}$ [R=Sustituyente; CP= Cys proteasa] ^[25].

Esta interacción produciría la formación de un complejo estable enzima-inhibidor (E-I), en el cual se enlazaría el grupo SH del residuo de cys proveniente de la enzima al centro metálico del complejo, en este caso Ru(III).

4.

CONCLUSIONES

- El fragmento organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$, reacciona efectivamente con los tioles modelos en MeOH como solvente y NH_4PF_6 , originando complejos paramagnéticos de color azul de fórmula $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe-SR}$, lo cual indica que el enlace SH es roto efectivamente por el fragmento organometálico.
- Los compuestos de Ru ensayados, no presentan reactividad efectiva con el enlace SH de los tioles modelos estudiados.
- La enzima aumenta su actividad catalizadora producto de la reacción inmediata con el fragmento organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$, lo cual podría deberse principalmente a:
 - a) La reacción de este complejo con el enlace S-S de la enzima, originando un compuesto del tipo $[\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}]_n\text{-S}^{\wedge}\text{S}$, activando así a la enzima.
 - b) Cambia la conformación de la enzima por un mecanismo estructural no conocido, y la hace mas activa.

- El complejo organometálico $\text{Cp}(\text{dppe})\text{FeI}$, produce una disminución considerable en la actividad de la enzima estudiada, cuando reacciona con esta por 24 hrs. Esto puede deberse a:

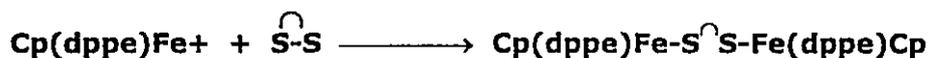
a) Una reacción en la cual el complejo organometálico forma un compuesto del tipo $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe-SR}$, en donde el Fe tiene estado de oxidación +2, lo cual explicaría la ausencia de señal en el espectro EPR.

b) En presencia del activador, disminuye la "proporción de desactivación" debido a la competencia:



Lo cual consume $\text{Cp}(\text{dppe})\text{Fe}^+$.

c) El efecto de disminución de la actividad que se observa cuando el fragmento es incubado con la enzima sin activar, por 24 hrs, puede ser explicada por la siguiente serie de reacciones:



Donde $\overset{\curvearrowright}{\text{S-S}}$ corresponde a la enzima sin activar.

- Se puede observar que si hay reacción de los complejos de Ru con la enzima, ya que esta última no presenta actividad en presencia de estos compuestos. Esto puede explicarse por la formación de un complejo del tipo $Cp^{(*)}(L_1L_2)Ru-SR$, en donde el Ru tendría estado de oxidación 2+, de forma similar a lo que podría ocurrir con el compuesto organometálico de Fe. Esto implica que el mecanismo de reacción del complejo organometálico, ya sea de Ru (II) o de Fe (II), con la enzima es vía un mecanismo completamente distinto al propuesto para los tioles modelos.

La aplicación que podrían tener los resultados obtenidos en esta tesis, en la inactivación de proteasas, enzimas asociadas a diferentes patologías, requiere de estudios adicionales que demuestren su grado de toxicidad y el mecanismo de inactivación. Estos estudios permitirían postular el uso de estos complejos en terapias que involucren la inactivación de proteasas.

La industria farmacéutica se encuentra siempre en una permanente búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser incluidas en terapias, por lo que nuestros resultados podrían tener una gran proyección si se logra avanzar en aquellos aspectos que determinan su uso farmacológico.

ANEXO 1

Presentaciones a congresos generadas por esta tesis:

- ***"Estudio Magnético de Complejos Organometálicos de Fe (III) con Ligantes de Interés Biológico"***

Carlos Díaz V. y Alejandra Pesce G.

IX Encuentro de Química Inorgánica, 31 de Julio-2 de Agosto 2002, Universidad Católica de Chile, Santiago. Póster.

- ***"Activación de Enlaces S-H por Compuestos Organometálicos"***

Alejandra Pesce G., Carlos Díaz V. y Gustavo Zúñiga N.

XXV Jornadas Chilenas de Química Inorgánica, 6 al 9 de Enero del 2004, Universidad Católica del Norte, Antofagasta. Conferencia.

- ***"Reactividad de compuestos Organometálicos de Fe (II) y Ru (II) frente a Tioles Simples y de Interés Biológico"***

Alejandra Pesce G., Carlos Díaz V. y Gustavo Zúñiga N.

X Encuentro de Química Inorgánica, 5 al 7 de Enero del 2005, Hotel "Los Nogales", Santiago de Chile. Póster.