UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de triamtereno con $ZnCl_2$ y/o $MnCl_2$: Evaluación del carácter fotosensibilizador y efectos cito y genotóxico.

Jhon Darío Coral Coral

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Medellín, Colombia

2022

Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de triamtereno con $ZnCl_2$ y/o $MnCl_2$: Evaluación del carácter fotosensibilizador y efectos cito y genotóxico.

Jhon Darío Coral Coral

Tesis de maestría presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Química

Directora:

Gloria Cristina Valencia Uribe, PhD.

Codirector:

Juan Bautista López Ortiz, MSc.

Grupos de Investigación:

Aplicaciones en Fotoquímica - GIAFOT

Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Química

Medellín, Colombia

2022

Dedicación.

A mis padres por el amor brindado; a mi hermano Diego por el apoyo.

Agradecimientos

Gracias a la profesora Cristina Valencia por la confianza y permitirme el ingreso al grupo de investigación GIAFOT. Al profe Juan López por darnos siempre la mano y permitirnos utilizar su laboratorio.

A Glori, David, Dany Santiago, Helen, Caro Velásquez, Isa y Alejandra por su compañía y amistad.

A la Escuela de Quimica, al profe Carlos Paucar, a los laboratoristas Jaime, Aníbal y Fernando por estar siempre prestos a ayudarnos.

Resumen

Síntesis y caracterización de nuevos compuestos de triamtereno con $ZnCl_2$ y/o $MnCl_2$: Evaluación del carácter fotosensibilizador y efectos cito y genotóxico.

El triamtereno, un compuesto diurético de primera línea en algunos países incluido dentro del grupo de los ahorradores de potasio presenta poca solubilidad en agua. Con el propósito de mejorar este parámetro, y en consecuencia su disposición en el organismo, se sintetizaron dos nuevos compuestos en los que se modificó la estructura del TAT con manganeso y zinc, usando sus respectivos cloruros. La síntesis se llevó a cabo en solución agua:metanol. Estos compuestos fueron caracterizados a través de microscopía electrónica de barrido SEM y difracción de Rayos X en polvo. Adicionalmente, se observaron los perfiles de disolución en el tiempo en medio acuoso, evidenciando que este parámetro mejoró en los nuevos compuestos sintetizados. La caracterización de los nuevos compuestos se realizó a través de técnicas espectroscópicas como absorción UV-VIS, infrarrojo y raman. Los resultados obtenidos se contrastaron con termogramas y perfil de dilución. Se determinó el carácter fotosensibilizador del TAT y de los nuevos compuestos con Zn y Mn en medios alcohólicos. Se realizaron medidas de actinometría en estado estacionario que permitieron establecer el rendimiento cuántico de oxígeno molecular singulete generado por los nuevos compuestos. Adicionalmente, se realizaron medidas de rendimiento cuántico de fluorescencia, para aportar a la caracterización de los materiales, con miras al estudio posterior de sus aplicaciones como marcadores fluorescentes. La caracterización se completó con ensayos citotóxicos, genotóxicos y con prueba de hemolisis; con lo que fue posible demostrar el potencial antineoplásico de los nuevos compuestos sintetizados sobre la línea celular tumoral MCF-7.

Palabras clave: ***Triamtereno, Perfil de dilución, Caracterización espectroscópica, Estabilidad fotoquímica, Ensayos citotóxicos y genotóxicos, Hemólisis, Síntesis de compuestos***

Abstract

Synthesis and characterization of new triamterene compounds with $ZnCl_2$ and/or $MnCl_2$: Evaluation of photosensitizing character and cytotoxic and genotoxic effects.

Triamterene, a first line diuretic compound in some countries included in the group of potassium sparing compounds, presents poor solubility in water. In order to improve this parameter, and consequently its disposition in the organism, two new compounds were synthesized in which the TAT structure was modified with manganese and zinc, using their respective chlorides. The synthesis was carried out in water:methanol solution. These compounds were characterized by SEM scanning electron microscopy and powder X-ray diffraction. Additionally, the dissolution profiles over time in aqueous medium were observed, evidencing that this parameter improved in the new synthesized compounds. The characterization of the new compounds was carried out through spectroscopic techniques such as UV-VIS absorption, infrared and Raman. The results obtained were contrasted with thermograms and dilution profile. The photosensitizing character of TAT and the new compounds with Zn and Mn in alcoholic media was determined. Steady state actinometry measurements were performed to establish the singlet molecular oxygen quantum yield generated by the new compounds. Additionally, fluorescence quantum yield measurements were performed to contribute to the characterization of the materials, with a view to the subsequent study of their applications as fluorescent markers. The characterization was completed with cytotoxic, genotoxic and hemolysis assays; thus, it was possible to demonstrate the antineoplastic potential of the new compounds synthesized on the MCF-7 tumor cell line.

Keywords: ***Triamterene, Dilution profile, Spectroscopic characterization, Photochemical stability, Cytotoxic and genotoxic assays, Hemolysis, Compound synthesis.***

Tabla de contenido

Introducción general **13**

Objetivos **20**

Metodología general **21**

Reactivos y solventes **21**

1. CAPÍTULO 1 ..... **25**

1.1 Resumen 25
1.2 Abstract 26
1.3 Introducción 27
1.4 Metodología 32
1.5 Resultados y Análisis 35
1.6 Conclusiones 44
1.7 Referencias 45

2. CAPÍTULO 2 ..... **51**

2.1 Resumen 51
2.2 Abstract 52
2.3 Introducción 53
2.4 Metodología 56
2.5 Resultados y Análisis 62
2.6 Conclusiones 79
2.7 Referencias 80
2.8 Anexos 86

3. CAPÍTULO 3 ..... **91**

3.1 Resumen 91
3.2 Abstract 92
3.3 Introducción 93
3.4 Metodología 97
3.5 Resultados y Análisis 102
3.6 Conclusiones 111
3.7 Referencias 113

Conclusiones generales **117**

Recomendaciones y Proyecciones **119**

Lista de figuras

Pág.

Figura 0-1: Estructura del 2,4,7-triamino-6-fenilpteridina (Triamtereno) 13

Figura 0-2: Estructura de las moléculas de pteridina (a), pterina (b) y ácido fólico (c). 14

Figura 0-3: Algunas moléculas de importancia biológica que incluyen el heterociclo de pteridina y pterina en su estructura**.** 15

Figura 1-1: Coordinación de una sal de cobre con un derivado de pteridina. Los átomos involucrados en la coordinación son el nitrógeno N5 y el oxígeno O4. 28

Figura 1-2: Estructura modelo de la coordinación M (metal)-ligando, para los derivados de pteridina BZLMH (R1=fenil) y PZLMH (R1=4-piridin). 28

Figura 1-3: Estructura del tetrahalocuprato (II) de triamtereno con participación de los Nitrógenos N3 y N8 protonados, en la generación de la sal al ser ionizados por el quelante. 30

Figura 1-4: Color de los nuevos compuestos TAT-Zn (izquierda) y TAT-Mn (derecha) en suspensión en la solución hidroalcohólica. 33

Figura 1-5: Apariencia de los nuevos compuestos sintetizados 36

Figura 1-6: Micrografías tomadas por microscopía electrónica SEM. a) y b) TAT; c) TAT-Zn y d) TAT-Mn. ……37

Figura 1-7: Análisis elemental tomado en microscopía SEM. TAT-Zn a la izquierda y TAT-Mn a la derecha. ……38

Figura 1-8: Patrón de difracción de rayos X en polvo para el TAT puro. 39

Figura 1-9: Comparación de los patrones de difracción de rayos-x de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn. ……40

Figura 1-10: Determinación experimental del coeficiente de extinción molar del TAT en agua. ……...42

Figura 1-11: Variación de la absorbancia en el tiempo para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, medido a 362 nm. ……...43

Figura 2-1: Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar de TAT en MeOH. Concentración en celda de $2.47x10^{-3}$ g/L ($9.76x10^{-6}$ M) hasta $2.14x10^{-2}$ g/L ($8.45x10^{-5}$ M). 63

Figura 2-2: Coeficientes de extinción especifico y molar para el TAT en MeOH 63

Figura 2-3: Espectros de absorción y coeficiente de extinción específico TAT-Zn. Concentración en celda de $2.30x10^{-3}$ g/L hasta $3.63x10^{-2}$ g/L. 64

Figura 2-4: Espectro de absorción y coeficiente de extinción especifico de TAT-Mn. Concentración en celda, de $2.36x10^{-3}$ g/L hasta $2.68x10^{-2}$ g/L. 65

Figura 2-5: Comparación de espectros TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en MeOH. 65

Figura 2-6: Band gap para el TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en el rango entre 300 nm y 440 nm de la curva de absorción, a través del Método de Tauc. 66

Figura 2-7: Espectro FT-IR del TAT 67

Figura 2-8: Comparación de espectros FT-IR para el TAT puro y los nuevos compuestos con Mn y Zn en el rango 3500 cm^{-1} y 2500 cm^{-1} 68

Figura 2-9: Comparación de espectros FT-IR para el TAT puro y los nuevos compuestos con Mn y Zn en el rango 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} 69

Figura 2-10: Espectro Raman para el TAT 70

Figura 2-11: Raman para los compuestos TAT, TAT-Zn y TAT-Mn 70

Figura 2-12: TGA-DSC de TAT 71

Figura 2-13: TGA-DSC de TAT-Zn 72

Figura 2-14: TGA-DSC de TAT-Mn 73

Figura 2-15: Degradación en el tiempo del TAT, TAT-Zn y TAT-Mn después de exponer muestras a radiación con LED 370 nm. 74

Figura 2-16: Cinética de pseudo primer orden para la degradación de DPBF en metanol, en presencia de TAT. 75

Figura 2-17: Cinéticas de pseudo primer orden parala degradación de DPBF en metanol, en presencia de TAT-Zn (izquierda) y TAT-Mn (derecha), respectivamente 75

Figura 2-18: Cinética de pseudo primer orden en la degradación de DPBF en metanol, solo y en presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, respectivamente. Medidas de absorción a 411 nm. 76

Figura 3-1: Estructura de los anillos de pirimidina, pirazina y pteridina 93

Figura 3-2: Resultados prueba de exclusión de tripano en CHO-K1 103

Figura 3-3: Resultados prueba de exclusión de tripano en MCF-7 103

Figura 3-4: Resultados de rojo neutro en CHO - K1 (izquierda) y MCF-7 (derecha)..... 104

Figura 3-5: Resultados de MTT sobre CHO-K1 (izquierda) y MCF-7 (derecha)..... 105

Figura 3-6: Hemolisis y fotohemólisis causada por los tratamientos a 0.23 µg/mL al cabo de 90 minutos. Las muestras de fotohemólisis fueron sometidas a radiación UVA. 106

Figura 3-7: Imágenes tomadas por microscopio de fluorescencia de ensayo cometa para línea celular CHO-K1 y MCF-7. 108

Figura 3-8: Cuantificación del daño en el ADN para cada una de las muestras tratadas de las imágenes obtenidas en test cometa para CHO-K1 y MCF-7. 108

Figura 3-9: Aberraciones cromosómicas e ICH para línea celular CHO-K1. 109

Figura 3-10: Aberraciones cromosómicas e ICH para línea celular MCF-7 en presencia de TAT ……110

Figura 3-11: Resultados de índice mitótico en línea CHO-K1 y MCF-7 al ser tratadas con TAT, TAT-Zn y TAT-Mn. 110

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Concentración del TAT alcanzada en distintos solventes reportada por algunos autores ……30

Tabla 1-2: Análisis elemental SEM del compuesto TAT-Zn 38

Tabla 1-3: Análisis elemental SEM del compuesto TAT-Mn 38

Tabla 1-4: Determinación del tamaño de celda unitaria por Ley de Bragg. 41

Tabla 1-5: Absorbancia y concentración de TAT en las distintas soluciones en 75 minutos. Coeficiente molar de extinción experimental del TAT en H_2O: $\varepsilon_{\lambda 362nm}$ = 16182 $cm^{-1}M^{-1}$ 43

Tabla 2-1: Soluciones stock de TAT y sus derivados sintetizados, en MeOH. 57

Tabla 2-2: Análisis de regresión lineal para las cinéticas de pseudo primer orden en el consumo del DPBF, solo y en presencia de presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn. 77

Tabla 2-3: Rendimientos cuánticos obtenidos, para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn. 77

Tabla 2-4: Medidas de potencial Z para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn 78

Tabla 3-1: Resultados de fotohemólisis expresados en porcentaje. El solvente utilizado fué DMSO al 2%. …….107

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término	Unidad / Definición
ε	Coeficiente de extinción molar	$cm^{-1}M^{-1}$
ε_S	Coeficiente de extinción especifico	$cm^{-1}(g/L)^{-1}$
λ	Longitud de onda	nm
ϕ_Δ	Rendimiento cuántico de oxígeno molecular singulete	Ecuación (6)
ϕ_f	Rendimiento cuántico de fluorescencia	Ecuación (8) y (9)

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutico
BH_4	Tetrahidrobiopterina
BrdU	Bromodesoxiuridina
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato reductasa

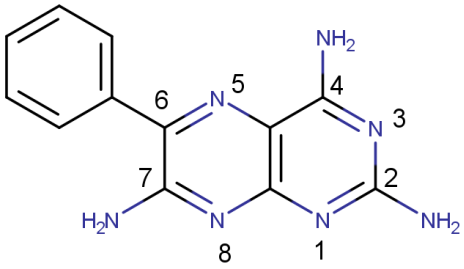
DIP	Dipiridamol
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPBF	Difenilbenzofurano
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GRF	Globulos rojos frescos
IC50	Concentración inhibitoria media máxima
ICH	Intercambio de Cromatides Hermanas
ISC	Cruce entre sistemas
MeOH	Metanol
MMR	Reparación mismatch
MTT	bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
MTX	Metotrexato
$O_2[^1\Delta_g]$	Oxigeno molecular singulete
PABA	Ácido para-aminobenzoico
PBS	Buffer fosfato salino
PTX	Pralatexato
ROS	Especies reactivas de oxigeno
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
TAT	Triamtereno
TAT-Mn	Triamtereno con Manganeso

TAT-Zn	Triamtereno con Zinc
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofolato
TS	Timidilato sintasa
UVA	Ultravioleta A (315 nm - 400 nm)
UVB	Ultravioleta B (280 nm - 315 nm)
UVC	Ultravioleta C (100 nm - 280 nm)
UV-VIS	Ultravioleta visible
XRPD	Difracción de rayos X en polvo

Introducción general

El triamtereno (TAT) 2,4,7-triamino-6-fenilpteridina (Figura 0-1), es un diurético heterocíclico derivado de las pteridinas, cuya acción farmacológica es utilizada para el tratamiento de pacientes con hipertensión arterial y retención de líquidos. Este principio activo actúa sobre las células de túbulos distales de nefronas, inhibiendo la liberación de iones potasio y la reabsorción de iones sodio, por lo que es utilizado en pacientes que presentan deficiencias de potasio (IARC, 2016). El TAT se puede usar de manera individual o en combinación con otros diuréticos de tipo asa y tiazídico, como furosemida, hidroclorotiazida o bendroflumetiazida, para el tratamiento del edema hipostático (Asghar Ensafi & Hajian, 2008; Haeger, 1969). También se utiliza para prevenir el edema asociado a insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis, síndrome nefrótico, edema inducido por esteroides, idiopático y edema debido a hiperaldosteronismo secundario (GSK, 2009; Netzer et al., 1995). El TAT es considerado como un diurético de primera línea y según datos de la empresa IMS Health (Estadísticas Médicas Intercontinentales de salud, por sus siglas en inglés) para el 2012, el TAT se utilizó en cerca de 2.8 millones de medicamentos recetados a 1.2 millones de pacientes en Estados Unidos. Aunque su uso ha venido decreciendo desde el 2004 hasta el 2012, el reposicionamiento de medicamentos lo ha puesto nuevamente en la mira y a la fecha, el TAT se sigue produciendo por su uso en países como Estados Unidos, Alemania y Chile, por mencionar algunos (Guillotin et al., 2017; IARC, 2016)

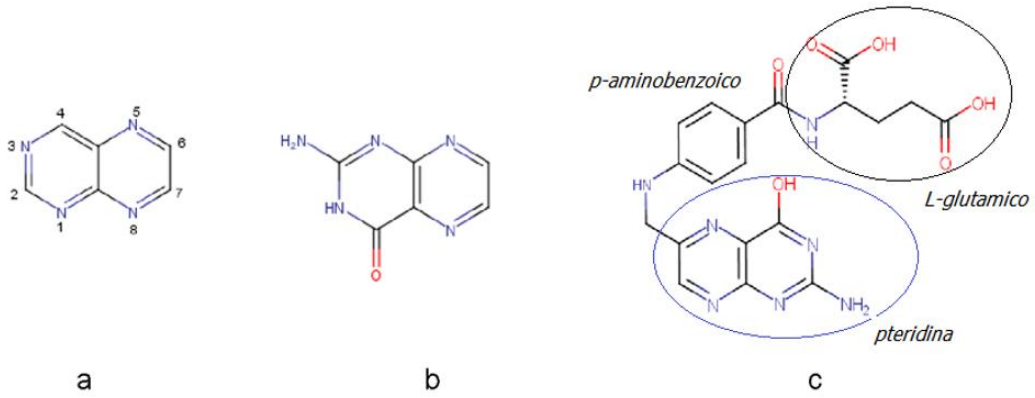
Figura 0-1: Estructura del 2,4,7-triamino-6-fenilpteridina (Triamtereno)



Este compuesto pertenece a la familia de las pteridinas, biciclos formados por un anillo de pirazina y otro de pirimidina, ampliamente distribuidos en la naturaleza, cuyos derivados

con sustituyentes 2-amino 4-oxo dan lugar a las pterinas (Figuras 0-2 a y b). Entre las pteridinas sustituidas se encuentran moléculas tan importantes como el ácido fólico (Figura 0-2 c), en cuya estructura se reconocen los fragmentos 5,6,7,8-tetrahidropterina, el ácido para-aminobenzoico (PABA, por sus siglas en inglés) y el ácido L-glutámico; estos dos últimos segmentos unidos a través de unión peptídica. De forma general, los derivados de pteridina tienen importancia biológica y llevan a cabo diversas funciones metabólicas, estando presentes en un gran número de sistemas que envuelven reacciones bioquímicas de importancia fisiológica, además de hacer parte de muchos productos farmacéuticos de origen natural y sintético (Castaño Espinal, 2016; Lorente, 2003). Algunos de estos derivados son responsables del pigmento en diversos insectos, están presentes en el folato, son importantes cofactores esenciales en síntesis de nucleótidos en el proceso de división celular y actúan como fotorreceptores de compuestos biológicos (Castaño Espinal, 2016). Por ejemplo, el 5,10-meteniltetrahidrofolato, es un derivado del ácido fólico que absorbe luz en la región UVA (315 - 400 nm), la cual conduce a daños en el proceso de reparación del ADN al ser sometido a radiación en esta región del espectro electromagnético (Lorente, 2003).

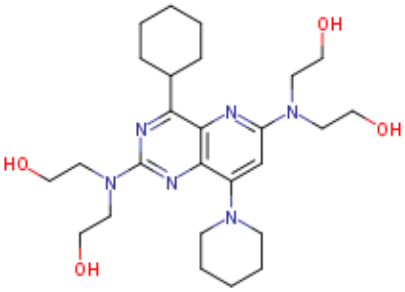
Figura 0-2: Estructura de las moléculas de pteridina (a), pterina (b) y ácido fólico (c).



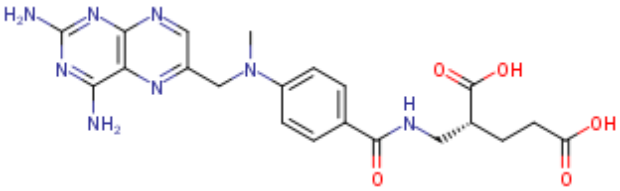
Diversos principios activos de medicamentos contienen el núcleo de pteridina y presentan diferentes efectos farmacológicos. Estos incluyen al diurético triamtereno; el antiagregante plaquetario dipiramidol (DIP); ácido fólico (AF) como antianémico y gran responsable en la síntesis de timinas y de las bases púricas (Carmona-Martínez et al., 2018); y tetrahidrobiopterina (BH4), empleado para tratar deficiencias de fenilalanina hidroxilasa

(enzima que degrada fenilalanina) y evitar enfermedades como la fenilcetonuria (Castaño Espinal, 2016; Cedano Díaz et al., 2012; Lorente, 2003). Del mismo modo, este anillo se presenta en otros compuestos como el metotrexato (MTX) y el pralatexato (PTX) que, por su analogía con el folato, actúan como antitumorales bloqueando la enzima dihidrofolato reductasa encargada de transformar el dihidrofolato (DHF) en tetrahidrofolato (THF). El MTX es mayormente utilizado para tratar la artritis reumatoidea y el PTX para tratar el cáncer de linfa (Carmona-Martínez et al., 2018). Algunas de estas estructuras se aprecian en la figura 0-3.

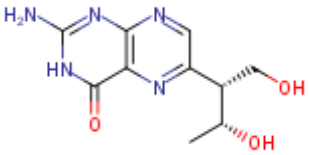
Figura 0-3: Algunas moléculas de importancia biológica que incluyen el heterociclo de pteridina y pterina en su estructura**.**



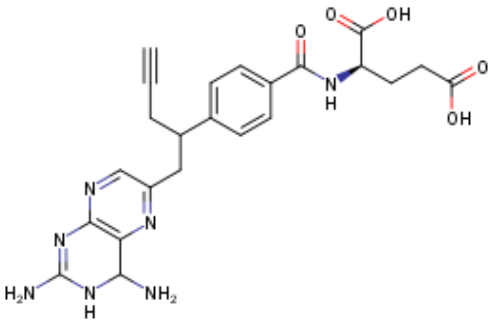
Dipiridamol



Metotrexato



Tetrahidrobiopterina



Pralatexato

Sin embargo, es posible observar el desarrollo de efectos secundarios adversos en tejidos expuestos a la luz, en pacientes tratados con una gran variedad de medicamentos, asociados a diferentes acciones farmacológicas. Estos incluyen antiinflamatorios,

diuréticos, antipiréticos, analgésicos y antibacterianos, por lo que se reconocen como medicamentos fototóxicos, lo cual en algunos casos involucra la participación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Zaheer et al., 2016). Para el caso específico del TAT, Vargas et al. (1988) realizó estudios sobre el fármaco y su capacidad de foto-inducir hemolisis en eritrocitos de sangre periférica humana a una concentración de 50 µg/mL tras ser irradiado durante 1 hora con una lampara OSRAM HQL 250w(320-400nm). De la misma forma abordó estudios sobre la capacidad fototóxica en linfocitos y neutrófilos a concentraciones entre los 80 y 160 µg/mL irradiando la solución de TAT durante 2 horas. En la misma investigación, se registró la aparición de un fotoproducto identificado como un dímero de triamtereno con pérdida del grupo fenilo, tras irradiar una solución de TAT en PBS con luz UVB (280-315 nm) siendo esto una prueba de la degradación del fármaco bien sea formando dímeros y perdiendo el grupo fenilo (Vargas, Fuentes, et al., 1998) o degradando la estructura del heterociclo (Fiori et al., 2003).

En otros estudios, Vargas et al. (2001), estableció que el DIP es apagador de oxígeno molecular singulete $O_2[^1\Delta_g]$, y de anión superóxido $(O_2^{\cdot-})$, por lo que podría actuar como un fotoprotector en caso de administrarse de forma paralela con otros principios activos que potencialmente puedan generar ROS; sin embargo, en este mismo estudio se reportó que como producto de su foto-autooxidación también genera $O_2[^1\Delta_g]$ y $(O_2^{\cdot-})$ modificando la estructura del anillo de piperidina y posteriormente dañando lípidos, proteínas y el ADN. Estos estudios se realizaron evaluando la inhibición de los procesos de foto descomposición en presencia de apagadores específicos de ROS.

Reportes previos de Juzeniene et al., (2016) señalan que el ácido fólico, no genera eficientemente ROS, pero si los fotoproductos que se obtienen luego de su irradiación UVA (315-400 nm), identificados como 6-formilpterina y ácidopterin-6-carboxilico. A través de estudios *in vitro* se observó que una concentración de 1µM de AF en células de carcinoma epidermoide duplica los niveles de ROS, mientras que la misma concentración de 6-formilpterina y ácidopterin-6-carboxilico aumenta hasta seis veces la generación de estas especies. De forma similar al estudio anterior, Chahidi et al., (1983), reportó que más que el metotrexato, son sus fotoproductos los encargados de sensibilizar la oxidación de histidina y triptófano al irradiar una solución acuosa en presencia del MTX y los aminoácidos a una longitud de onda de 366 nm. Otros estudios demuestran que el MTX y su fotoproducto, 2,4-diamino-6-(hidroximetil) pteridina, son capaces de inducir oxidación

en las bases nitrogenadas, especialmente en el nitrógeno 7 de la guanina, reacción causada por el efecto fotosensibilizador del oxígeno singlete (Hirakawa et al., 2002). Para el caso específico del TAT, en solventes como agua y PBS, nuestro grupo de investigación no ha observado la generación de oxígeno molecular singulete ni en experimentos en estado estacionario, ni resueltos en el tiempo, pero si en otros solventes como etanol y metanol (resultados por publicar). Sin embargo, es oportuno mencionar que este principio presenta advertencia, especialmente cuando es suministrado con otros diuréticos fotosensibilizadores como la hidroclorotiazida y la furosemida.

Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS por sus siglas en inglés), el TAT es un medicamento de clase II, es decir, pertenece al grupo de baja solubilidad en agua y alta permeabilidad en tejido intestinal que puede estar asociado a una baja biodisponibilidad oral. Los medicamentos de ingesta oral poco solubles en agua generalmente presentan poca biodisponibilidad y por ende deben ser suministrados en solución acuosa a elevadas dosis para alcanzar la concentración correcta en plasma; por ello se buscan técnicas que permitan solubilizar o aumentar la velocidad de dilución de estos medicamentos para facilitar la absorción en el organismo (Savjani et al., 2012). La biodisponibilidad del triamtereno administrado por vía intravenosa u oral se ha estimado en un 52 ± 22 % calculado a partir de concentraciones plasmáticas y urinarias, demostrando que existe una alta variabilidad entre la población evaluada.

Particularmente, frente a las dificultades asociadas a las deficiencias en solubilidad de los principios activos de medicamentos, hay técnicas que contribuyen a incrementar la disposición del medicamento en el organismo y pueden ser de tipo físicas o químicas. Entre las químicas, se encuentra la formación de complejos de coordinación y de sales (Savjani et al., 2012; Williams et al., 2013). Las sales son ampliamente utilizadas para mejorar la disolución y la biodisponibilidad de algunos principios activos, que son poco solubles en agua (Alvarado López, 2015), situación que es común al TAT. Las empresas farmacéuticas que trabajan en nuevos medicamentos se enfocan principalmente en que sean de administración oral, esto por ser los más económicos y de mayor elección por los mismos pacientes

Para el caso del TAT, debido a su analogía con el folato, se convierte en foco de interés su estudio como potencial anticancerígeno. Específicamente esta propiedad ha sido abordada evaluando la disminución de la viabilidad en líneas de células de cáncer de colon,

el cual afecta a cerca del 35% en personas que sufren de presión arterial alta. Hay evidencias de actividad anticancerígena en células de cáncer de colon tratadas con TAT, de gran incidencia en pacientes con este tipo de afecciones en el sistema circulatorio, por lo que es el TAT un principio activo de gran interés para tratamientos futuros contra el cáncer (Guillotin et al., 2017; Moghadam et al., 2018).

Es muy pertinente conocer, controlar y/o evitar los efectos secundarios que puedan derivarse, por ejemplo, de la interacción con agentes exógenos con la radiación electromagnética, por lo que corresponde sobre nuevos materiales determinar la estabilidad fotoquímica y evaluar su carácter fotosensibilizador. Adicionalmente, cualquier producto nuevo a nivel farmacéutico, cosmético o de alimentos, requiere estudios y pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad para su evaluación.

Por lo anterior, esta investigación plantea la síntesis y caracterización de sales y/o complejos de coordinación del Triamtereno, utilizando $ZnCl_2$ y $MnCl_2$, en los que se mejore la miscibilidad en sistemas acuosos, que sirvan de referencia para posteriormente avanzar a estudios de biodisponibilidad debido a sus aplicaciones farmacológicas como diurético. La síntesis de complejos del TAT es viable, dado que posee en su estructura varios grupos amino y nitrógenos heterocíclicos con electrones libres que pueden coordinarse con cationes metálicos. Sin embargo, en medio ácido, estos sitios ricos en electrones pueden protonarse y en presencia de los iones metálicos podrían generar las sales con el catión del Triamtereno, las cuales se espera que sean más solubles en medios polares en comparación con el ligando TAT, además la formación de complejos de coordinación y/o sales, permitirán conservar su estabilidad térmica y fotoquímica.

Referente a las medidas de los espectros de absorción UV-VIS y de emisión fluorescente, éstos pueden presentar cambios de modificarse la densidad electrónica en sectores de la molécula involucrados en las transiciones electrónicas. Estos cambios pueden originar modificaciones en el carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete y el rendimiento cuántico de fluorescencia del TAT, por lo que se realizarán medidas que permitan establecer su variación. De ser complejos de coordinación, se podrán observar nuevas transiciones metal-metal o metal ligando. Adicionalmente, debido al alto rendimiento cuántico de fluorescencia observado para el TAT, de formar compuestos muy estables con algunos de los metales, esto permitirá abrir un campo de estudio como marcadores fluorescentes.

De forma general, aumentar la tasa de dilución del principio activo favorece el aumento en la concentración del producto que llega a la célula y mejora sus aplicaciones como diurético y como potencial anticancerígeno. Debido a que se está proponiendo modificar la estructura de un medicamento con el propósito de favorecer su transporte y biodisponibilidad al interior del organismo, se realizarán estudios de cito y genotoxicidad para los derivados obtenidos, en los que se espera mejorar los parámetros observados para el TAT o al menos conservarlos. Se contribuirá al estudio del potencial anticancerígeno del TAT y los compuestos sintetizados, a través de ensayos genotóxicos en una línea celular de cáncer, la cual permitirá demostrar el alcance del triamtereno y los nuevos compuestos sintetizados.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto en la solubilidad, estabilidad, citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos materiales sintetizados a partir de triamtereno con sales de manganeso y zinc.

Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar nuevos compuestos de triamtereno con sales de manganeso y zinc.

- Determinar la estabilidad térmica y fotoquímica, solubilidad y características espectroscópicas de los derivados sintetizados.

- Evaluar el carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete por parte de los compuestos sintetizados como parámetro de fototoxicidad.

- Determinar el potencial cito y genotóxico en líneas celulares y sangre periférica humana, como parte de la caracterización de los nuevos compuestos.

Metodología general

Para la obtención de los nuevos compuestos formados a partir del TAT (253.26 g/mol) y de las sales de $ZnCl_2$ (136.286 g/mol) y $MnCl_2$ (197.91 g/mol) se utilizó una relación molar 1:1 teniendo en cuenta los trabajos de Acuña Cueva et al., (2003); el Azzouzi et al., (2017); Llopis et al., (1993). Dada la baja solubilidad del TAT en agua, este se disuelve en metanol (99.8% p/p) mientras que las sales son fácilmente disueltas en agua destilada. Se ajustan los volúmenes para que en mezcla quede una proporción 1:4 de solución hidroalcohólica (Agua:Metanol) al momento de adicionar la sal del metal disuelta en la solución con el TAT. El proceso se lleva a cabo con agitación y una temperatura de 55°C. Al cabo de 3 horas aproximadamente, la solución con Zn se torna de color blanco mientras que la de Mn de color marrón. Luego de un tiempo de no evidenciar cambios en la solución, se da por finalizado el proceso. Tras evaporación del solvente restante y procesos de lavado y secado, se extraen los sólidos de cada muestra los cuales son analizados para determinar sus propiedades espectroscópicas, morfológicas, de velocidad de dilución, estabilidad térmica y fotoquímica (UVA), e incluso propiedades biológicas al ser testeados sobre líneas celulares normal y tumoral.

Para determinar el efecto de la modificación del TAT con las sales $ZnCl_2$ y $MnCl_2$, sobre la velocidad de dilución de los compuestos, se utilizó la metodología planteada por Li et al., (2015) adicionando iguales cantidades de sólido en el mismo volumen de agua y realizando un seguimiento de la absorbancia, como parámetro proporcional a la concentración de TAT disuelta en la disolución, para lo cual las muestras se filtran previamente con microfiltros de nylon 0.22 µM. A continuación, se listan las técnicas a las cuales las muestras fueron sometidas, incluyendo algunos reactivos de mayor relevancia.

Reactivos y solventes

El TAT, $ZnCl_2$ y $MnCl_2$, son obtenidos de SIGMA-ALDRICH y fueron utilizados sin tratamientos previos. metanol, etanol, ácido acético glacial, HCl al 37%, DMSO, benceno, rojo neutro, sarcosinato de sodio , bromodesoxiuridina (BrdU) , Colcemid, Bromuro de etidio, NaCl, DPBF grado analítico, isopropanol, peróxido de hidrogeno, Giemsa obtenidos

de MERCK Millipore. Medio de cultivo RMPI 1640 de BIOWEST, Suero fetal bovino de LABG&M, PBS, tripsina-EDTA Sln 10X al 0,5% de Santacruz Biotechnology, MTT de AMRESCO, azul de tripano de MP BIOMEDICALS, mitomicina C de Fisher Scientific, Hoeschst 33258, agarosa SIGMA, tris, triton X-100 de AMRESCO.

Instrumentación

Espectroscopia UV-VIS

Se utilizó en el análisis el Espectrofotometro *AGILENT 8453 UV-Visible ChemStation y PerkinElmer Lambda 35, con software UVWinlab y Lambda35*, respectivamente.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las muestras se fijaron en cinta de grafito, se les realizó un recubrimiento delgado en oro (Au) y se analizaron en el microscopio electrónico de barrido en alto vacío *DENTON VACUUM Desk IV*, con el fin de obtener imágenes en alta resolución. Se empleó el detector de electrones secundarios para evaluar la morfología y topografía de las muestras. El análisis elemental se realizó mediante una Microsonda de rayos X-EDX (referencia INCA PentaFETx3 Oxford Instruments). Tiempo de análisis: 1.5 horas.

Espectroscopia FT-IR

Los espectros IR fueron tomados con el *equipo FT-IR Spectrum Two (ATR) - Perkin Elmer*. Tipo de detector DTGS y recolección de datos en el rango espectral de 8300 a 350 cm^{-1} con resolución hasta de 0.5 cm^{-1}.

Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis termogravimétricos se realizaron en equipo *TA Instrument TGA550*, bajo atmósfera de Nitrógeno, calentando a una rampa de 10°C/min hasta llegar a 650 °C y posteriormente hasta 900°C. Los análisis calorimetría diferencial de barrido DSC 250, en atmósfera de Nitrógeno, calentando con una rampa de 10°C/min hasta 550 °C.

Raman

Se utilizó espectrómetro *LabRam HR Evolution, de Horiba Scientific* con láser de excitación HeNe 632 nm y 784 nm. Tiempo de exposición de 50 segundos. Todo el espectro fue recolectado en el rango entre 100 y 2500 cm-1.

Espectroscopia de fluorescencia

Espectrofotómetro de fluorescencia en estado estacionario *Cary Eclipse. Voltaje de 450 V*. con slit de excitación 5 nm y slit de emisión 5 nm con velocidad de barrido medio.

Fuentes de irradiación

La fuente de irradiación utilizada para la medida de fotoestabilidad y en las medidas cinéticas en experimentos en estado estacionario, para comparar el carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete, son de tipo LED370E de Thorlabs 2,5 mW, 370 ± 20 nm y

Software

Procesamiento de espectros

Los espectros de absorción y emisión fueron procesados utilizando el software para espectroscopia óptica *Spectragryph versión 1.2.9 copyright © 2016-2018*, desarrollado por Dr. Friedrich Menges y *OriginPro 2018 SR1 copyright © 1991-2017 OriginLab Corporation*. Para las estructuras químicas y reacciones, se utilizó el software *MarvinSketch 20.17.0 copyright © 1998-2020 ChemAxon Ltd.*

Modelos biológicos

Línea celular CHO – K1

La línea celular CHO–K1 (ATCC CCL- 61) proviene de un subclonaje de la línea parental CHO derivada de ovario de hámster chino, que crece adherida al sustrato (Ahn & Antoniewicz, 2013).

Línea celular MCF-7

La línea celular tumoral que se empleó para los ensayos fue MCF-7 (ATCC: HTB-22) derivada de adenocarcinoma de mama (Koutsilieris et al., 1999).

Equipos menores

Microscopio óptico, microscopio de fluorescencia *ZEISS*, cámara de electroforesis, cámara de Neubauer, medidor de pH, baño ultrasonido, planchas de calentamiento con agitación, termómetros digitales, baños termostatizados, vortex, centrífugas y micropipetas.

1. CAPÍTULO 1

Síntesis y caracterización morfológica de compuestos de triamtereno con $ZnCl_2$ y $MnCl_2$. Perfil de dilución.

1.1 Resumen

El triamtereno (TAT), considerado un compuesto diurético de primera línea en algunos países e incluido dentro del grupo de los ahorradores de potasio, se ha usado de manera individual o en combinación con hidroclorotiazida para el tratamiento de hipertensión y edema hipostático. Este principio activo presenta poca solubilidad en agua (45 μg/mL), un limitante en la adsorción a través de administración oral. Con el propósito de mejorar este parámetro y en consecuencia su disposición en el organismo, se sintetizaron dos nuevos compuestos, en los que se modificó la estructura del TAT con metales del bloque d (manganeso y zinc), con el uso de los respectivos cloruros. La síntesis se llevó a cabo en solución agua:metanol. Estos compuestos fueron caracterizados a través de microscopía electrónica de barrido SEM y difracción de Rayos X en polvo. Adicionalmente, se observaron los perfiles de disolución en el tiempo en medio acuosa, evidenciando que este parámetro mejora en los compuestos sintetizados, con relación al TAT. En esta última medida, requirió de la realización de las curvas de calibración para el cálculo de los coeficientes de extinción del TAT y sus derivados, debido a que el seguimiento de la evolución de la dilución en el tiempo se realizó con el cálculo de la concentración, proporcional a la absorbancia. Todos los cambios observados, son evidencia de la formación de los nuevos compuestos.

Palabras clave

Síntesis de derivados de triamtereno, caracterización morfológica, perfil de dilución

1.2 Abstract

The Triamterene (TAT), is considered a diuretic compound and included within the group of drugs called potassium-sparing drugs, has been used alone or in combination with hydrochlorothiazide for the treatment of hypertension and hypostatic edema. However, due to its low solubility in aqueous medium (45 µg / mL), but it´s presents a limiting adsorption through oral administration. In order to improve this parameter, and consequently its disposition in the body, two new compounds coordinated with metals from block d (manganese and zinc) were synthesized from TAT and the salts of these metals as precursors.

For the characterization of the synthesized compounds, morphological analysis was carried out through SEM scanning electron microscopy and X-ray powder diffraction, the results shown the formation of the new compounds obtained. Additionally, the dissolution profiles were observed over time in aqueous medium as well as the determination of extinction coefficients using the UV-VIS spectrophotometric technique, showing improvements in the synthesized compounds.

Keywords

Synthesis of triamterene derivatives, morphological characterization, dilution profile

1.3 Introducción

La química de coordinación es una excelente alternativa para realizar modificaciones y generar nuevos compuestos en los que se espera se conserve la acción farmacológica, incluso la coordinación con el metal genera la posibilidad de transiciones metal ligando y ligando metal, que pueden conducir al desplazamiento de señales que incluso se pueden observar tras la formación de complejos de asociación, sales o cocristales (Savjani et al., 2012; Williams et al., 2013). Para el caso específico del triamtereno, con tres grupos amino primarios, puede dar lugar a la formación de sales con ácidos orgánicos, así como complejos de coordinación con el centro metálico como se ha realizado con otros principios activos de medicamentos que son poco solubles en agua (Alvarado López, 2015). De forma general, la industria farmacéutica y las recomendaciones desde la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), se dirigen a promover el desarrollo de nuevos medicamentos que sean de administración oral, por ser los más económicos y de mayor elección por los mismos pacientes. Un reto con la mayoría de los medicamentos de ingesta oral es mejorar su escasa su solubilidad o aumentar su tasa de disolución, ya que en el lugar en donde se lleve a cabo la absorción, el principio activo debe estar totalmente disuelto (Savjani et al., 2012).

Existen ejemplos muy interesantes de formación de complejos de coordinación de compuestos derivados de pteridinas como la lumazina, por ejemplo, (lumazina, 1-metillumazina y 1,6,7-trimetillumazina), con Cu (II) y Cd (II), los cuales presentan coordinación con el N5 y O4 (Figura 1-1). En las estructuras cristalinas encontradas para estos complejos, se evidencia la participación del hidrógeno en la posición N3 interactuando con uno de los cloros de la sal de cobre para la formación de la estructura cristalina del complejo (Acuña Cueva et al., 2003). Estos trabajos se motivaron con el fin de entender la reactividad de compuestos como la molibdopterina (cofactor del molibdeno) o la tetrahidropterina (precursor de la BH_4), cuyos complejos metálicos son útiles como vehículos biológicos. Estos resultados son útiles como referencias de las posiciones en las que podrían generarse las coordinaciones metal-ligado

Figura 1-1: Coordinación de una sal de cobre con un derivado de pteridina. Los átomos involucrados en la coordinación son el nitrógeno N5 y el oxígeno O4.

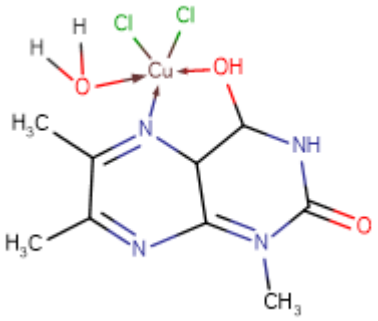


Figura adaptada de: Acuña Cueva et al., (2003)

Estudios de espectroscopia infrarroja del derivado 2,4-dihidroxipteridina, benzoilhidrazona de 6-acetil-1,3,7-trimetillumazina (BZLMH), señalan que los nitrógenos N5 y el N6' de la molécula están relacionados en la coordinación del ion metálico como se aprecia en la figura 1-2 (Jiménez Pulido et al., 2008). Estos mismos nitrógenos son los principales responsables de la coordinación en piridinilhidrazona de 6-acetil-1,3,7-trimetillumazina (PZLMH) con Cu(II), Ag(I), Cd(II), Hg(II) y Gd(III) (el Azzouzi et al., 2017). La coordinación puede ser bidentada o incluso tridentata, involucrando los átomos señalados en la figura. En gran parte de los casos la reacción molar se da en proporción 1:1.

Figura 1-2: Estructura modelo de la coordinación M (metal)-ligando, para los derivados de pteridina BZLMH (R1=fenil) y PZLMH (R1=4-piridin).

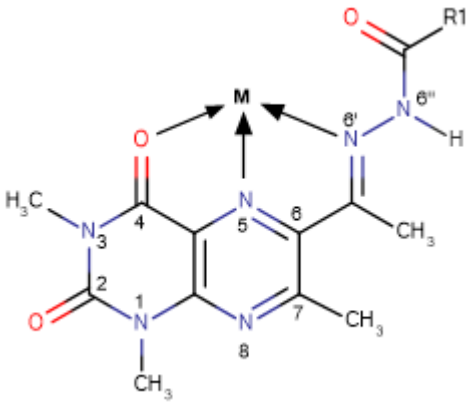


Figura adaptada de: Jiménez Pulido et al., 2008.

La naturaleza exacta de como los derivados de pteridina se involucran en el sistema de ciclo celular y la forma en que esto se puede aprovechar requiere de estudios más elaborados; mientras tanto, las investigaciones se enfocan en la síntesis de nuevos compuestos de coordinación que involucran ligandos derivados de pteridina como modelos para imitar la reactividad del sitio metálico de algunas metaloenzimas (el Azzouzi et al., 2017; Jiménez Pulido et al., 2008).

Observando la estructura química del TAT (Figura 0-1), es importante tener presente que todos los grupos amino pueden en principio, actuar como donantes de electrones y en consecuencia, ser potenciales posiciones de enlace con iones metálicos; más aún, aquellos nitrógenos del heterociclo debido a que sus electrones libres son ortogonales al sistema π y no pueden deslocalizarse efectivamente, por lo que no afectarían de forma importante la transición a mayor longitud de onda que presenta el TAT en la región UVA de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, a menos de que la coordinación involucre los electrones libres tipo *n* de los grupos amino sobre el anillo, los cuales pueden deslocalizarse parcialmente en el sistema aromático. Los nitrógenos de los grupos amino primario ($-NH_2$), complementan perfectamente la posibilidad de generar complejos bidentados generando anillos de 5 miembros con el metal, y se puede contar incluso con la participación de los átomos de H que tienen enlazados. Estudios de resolución de la estructura cristalina y propiedades espectroscópicas de una sal de triamtereno diprotonada, señalan como sitios de enlace los nitrógenos N3 y N8 del TAT al someterse a un medio ácido en presencia de tetrahalocuprato (II), (Llopis et al., 1993) como se aprecia en la figura 1-3. El medio excesivamente ácido favorece la protonación de los nitrógenos mencionados.

Si bien la formación de estos compuestos puede mejorar la solubilidad y transporte de este principio activo a través del organismo, también pueden afectar la actividad del medicamento. Al respecto, puede plantearse que la formación de compuestos de coordinación con ligandos como las pteridinas, puede contribuir al proceso de transferencia de electrones, los cuales se llevan de forma natural en los procesos biológicos. El efecto farmacológico puede verse mejorado debido al efecto quelante. El solapamiento de los orbitales del ligando con el metal con grupos donantes ya incorporados, aumentaría la deslocalización de los electrones π del TAT, lo que en consecuencia trae un aumento en la liposolubilidad, y esto en definitiva, favorece la permeación a través de la membrana celular (Priya et al., 2009; Villa Pérez et al., 2018). En los complejos se incrementan las

posibilidades de las transiciones electrónicas, metal ligando y ligando metal, así como se disminuyen otras donde específicamente se centraron las coordinaciones entre las partes. En el caso particular de la formación de sales, éstas serán más hidrosolubles en comparación con el TAT. En estos casos, estos compuestos pueden ser transportados al interior de la membrana celular, por mecanismos de transporte a través de procesos de difusión facilitada o con la ayuda de proteínas transportadoras.

Figura 1-3: Estructura del tetrahalocuprato (II) de triamtereno con participación de los Nitrógenos N3 y N8 protonados, en la generación de la sal al ser ionizados por el quelante.

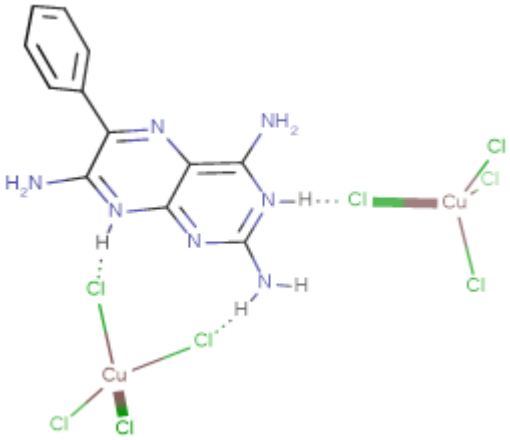


Figura adaptada de: Llopis et al., (1993)

Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, el TAT es un medicamento de clase II, es decir; pertenece al grupo de baja solubilidad (45 μg/mL en H_2O; 8 μg/mL en PBS, pH 7.4), y alta permeabilidad en tejido intestinal (Li et al., 2015; Savjani et al., 2012).

Tabla 1-1: Concentración del TAT alcanzada en distintos solventes reportada por algunos autores

Solvente	Parámetro calculado
Agua	45 µg/mL (Li et al., 2015)
DMSO:PBS (1:4)	200 µg /mL (Bawa, 2007)
Ácido fórmico	$1x10^5$ µg /mL (Sigma, n.d.)

Entre los metales de interés para formar los nuevos compuestos con TAT en el presente trabajo, se encuentra el zinc, el cual efectúa su coordinación con la participación de orbitales tipo *s*, teniendo claro que su estado de oxidación es +2 y para el cual sus orbitales *d* están llenos [Zn (II) ($3d^{10}$)]. Esta condición de los orbitales *d* llenos, aumentan su estabilidad con relación a otros metales del bloque *d*, debido a que son menos apantallados y en consecuencia poseen una mayor carga nuclear efectiva que otros metales del mismo período. Esto puede conducir al aumento de las interacciones ión-dipolo, donde los orbitales *d* llenos son más fácilmente polarizables que los *s* y *p* del ligando. El manganeso por su parte, del mismo período de la tabla periódica, al ser más grande y tener su subcapa *d* semillena, admite más opciones en cuanto a números de oxidación y debido a su tamaño puede tener mayor coordinación con el ligando. Sin embargo, este metal, por la misma condición de su distribución electrónica, es más fácilmente oxidable y posiblemente sus complejos también menos estables.

Específicamente los metales seleccionados, hacen parte de los cofactores enzimáticos en diversas funciones metabólicas en el organismo humano. El manganeso es necesario para producir energía y proteger las células: también es necesario para fortalecer los huesos, reproducción, coagulación sanguínea y mantener un sistema inmunitario sano. Las cantidades de manganeso en el cuerpo oscilan entre 0.003 mg en un recién nacido, hasta 2.3 mg en hombres adultos. Por otro lado, el zinc ayuda al sistema inmunitario a combatir virus y bacterias, es necesario para sintetizar proteínas y ADN, para el crecimiento y desarrollo, cicatrización de heridas y el funcionamiento normal del sentido del gusto y el olfato. La cantidad de zinc en el cuerpo oscila entre los 2 mg en un recién nacido hasta más de 12 mg en una persona adulta (NIH, 2019). Por lo anterior, en esta investigación se obtienen nuevos compuestos con el ligando TAT y metales Mn y Zn, se evalúa su efecto sobre la velocidad de dilución en agua, se procede a su caracterización morfológica y espectroscópica, y en los próximos capítulos, se presentan los resultados frente a la estabilidad térmica y fotoquímica, el efecto sobre el carácter fotosensibilizador (generación del oxígeno molecular singulete), y sus efectos cito y genotóxicos.

1.4 Metodología

1.4.1 Síntesis del nuevo compuesto de TAT con $ZnCl_2$.

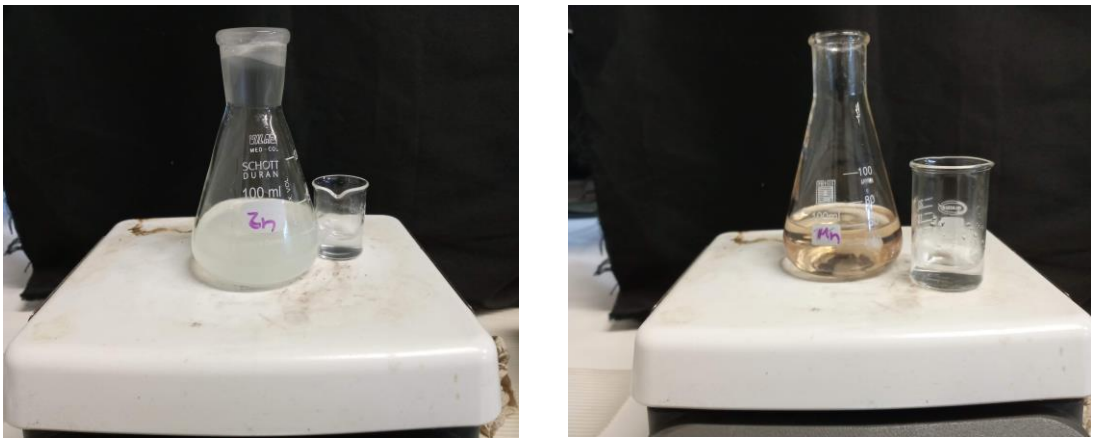
En la obtención del TAT-Zn se utilizó una relación molar 1:1. El TAT (253.26 g/mol) sólido al 99% de pureza, se disolvió en metanol al 99.8% de pureza. Este proceso se aceleró introduciendo la solución en baño de ultrasonido por 5 minutos y posteriormente se llevó el recipiente a una plancha de calentamiento con agitación a una temperatura de 55°C para no exceder el punto de ebullición del metanol reportado como 64°C según Ott et al., (2012).

Por separado y en la cuarta parte del volumen anterior, se disuelve el $ZnCl_2$ anhidro (136.286 g/mol) en agua destilada. El TAT disuelto se adiciona lentamente a la solución salina a un ritmo de 0.5 mL por cada 10 min manteniendo la agitación y el calentamiento constante. Aproximadamente 2.5 horas después, se observa un cambio en la coloración de la solución pasando de incoloro a blanco el cual es un indicativo de que se han formado nuevas partículas (Figura 1-4). Al cabo de 20 días en reposo y permitiendo la evaporación del solvente de manera a presión atmosférica, al abrigo de luz y polvo, el sólido blanco se recolectó por centrifugación a 6500 rpm / 10 min. El sólido fue lavado con una mezcla metanol y agua fría (1:1) para arrastrar el exceso de sal y de TAT en el medio, estos lavados se hicieron por triplicado para garantizar remoción de excipientes y posteriormente se somete a secado en estufa hasta conservar un peso homogéneo en la muestra.

1.4.2 Síntesis del nuevo compuesto de TAT con $MnCl_2$.

El proceso de la síntesis del TAT-Mn es similar al descrito anteriormente. Se disolvió el TAT en metanol y el $MnCl_2.4H_2O$ (197.91 g/mol) en una cantidad similar de agua destilada. Se agrega la solución de TAT sobre la solución de la sal en las mismas condiciones descritas anteriormente (0.5 mL/10 min) manteniendo agitación y calentamiento constante. El proceso tarda entre 2 y 3 horas, al cabo de las cuales la solución se torna de color marrón, indicando así la transformación química (Figura 1-4). El nuevo sólido es recolectado por centrifugación y es lavado posteriormente. Se somete a secado en estufa hasta una masa homogénea en la muestra.

Figura 1-4: Color de los nuevos compuestos TAT-Zn (izquierda) y TAT-Mn (derecha) en suspensión en la solución hidroalcohólica.



1.4.3 Análisis de Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Al análisis de SEM (por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscope), permite determinar la morfología de las muestras. En el equipo se genera un haz de electrones acelerado y polarizado. Los electrones estabilizados mediante un campo magnético son dirigidos con el uso de bobinas hacia un punto especifico de la muestra, permitiendo hacer un barrido en determinada zona. En medio de la interacción haz de electrones-muestra, se generan pérdidas de energía, rayos-x y electrones secundarios (con alto rendimiento) los cuales son principalmente utilizados para construir la imagen o micrografía. Las imágenes obtenidas presentan una amplia profundidad de campo, lo que posibilita el estudio de muestras rugosas o microcristalinas. Los rayos-x generados son utilizados para analizar la composición de la muestra "*in situ*". Este análisis se lleva a cabo aprovechando la energía dispersada característica de cada elemento químico, energía que es traducida en una señal que proporciona información analítica cualitativa y cuantitativa (Quiroz, 2014).

1.4.4 Difracción de Rayos X en polvo (XRPD).

No todas las sustancias cristalinas pueden formar cristales macroscópicos, por lo tanto, se utiliza el modelo propuesto por Debye & Scherrer (1916) para determinar el difractograma de solidos cristalinos en polvo. Esta técnica consiste en hacer pasar un haz de rayos x a

través del material, no es destructiva y se destina a estudiar la estructura de diversos materiales en estado sólido. Estos cristales se orientan de manera aleatoria y los rayos que inciden en la muestra se difractan de tal manera que se forma una imagen circular en una placa fotográfica.

En teoría, toda estructura cristalina puede considerarse como conjuntos de redes desplazadas entre sí, por ende, todo arreglo de red difracta rayos X reflejándolos desde un plano; esto siempre y cuando, se ajuste a una solución discreta de la ley de Bragg. El haz de rayos X se divide en varias direcciones por acción de la difracción causada por la agrupación de átomos en forma simétrica. Esto genera un patrón de intensidades o difractograma que se interpreta según la ubicación de los átomos en el cristal. En la ecuación (1) λ es la longitud de onda, *n* es un número entero y *d* es la distancia entre planos (Coral, 2010; Quiroz, 2014).

$$n\lambda = 2d \quad sen\ \theta \qquad (1)$$

Reorganizando términos, tenemos:

$$d \quad = {}^{n\lambda}/_{sen\theta} \qquad (2)$$

El lugar en donde se detecta una reflexión de rayos X depende exclusivamente de θ, para un λ específico. Esto quiere decir que, la posición de las reflexiones del haz incidente depende únicamente de la dimensión de la red y no de la posición entre sus átomos. La difracción de rayos X es una característica exclusiva de cada material (huella digital) lo que permite identificar y caracterizar el material de estudio (Quiroz, 2014).

1.4.5 Determinación de coeficiente de extinción molar del TAT en agua y el perfil de dilución en presencia de $ZnCl_2$ y $MnCl_2$.

Debido a que el seguimiento de la evolución en el proceso de dilución de las muestras en el tiempo, se realiza por espectroscopía UV-VIS, se realizaron las curvas de calibración de concentración vs absorbancia. De forma inicial, se determinó el coeficiente de extinción molar del TAT en agua. Se preparo una solución madre de TAT 1.6 x 10^{-4} M en agua

destilada, de la cual se tomaron alícuotas y se hicieron adiciones sucesivas en celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a temperatura ambiente. El rango de concentraciones en celda fue entre de 7.5 x 10^{-6} M y 4.9 x 10^{-5} M. En el rango analizado, se verificó el cumplimiento de la ley de Beer, en donde la respuesta de la absorbancia se mantuvo lineal, frente a la concentración (Parnis & Oldham, 2013). La lectura se realizó en máximo de longitud onda de absorción en UVA (λ_{max} = 362.4 nm). Al graficar la absorbancia vs concentración molar, se obtuvo la curva de calibración.

En la evaluación del perfil de disolución en el tiempo, se utilizó la metodología expresada por Li et al., (2015). Se prepararon 3 soluciones, cada una con 5 mg de TAT puro en 250 mL de agua destilada (0.02mg/mL, 8 x 10^{-5} M) con el fin de alcanzar una absorbancia cercana a 1.00 en celda. Para monitorear el cambio en la absorbancia que surge a raíz de la interacción del TAT con Zn y Mn, a un recipiente se adicionó $ZnCl_2$ y al otro $MnCl_2$ en una relación molar 1:1. De cada muestra se tomaron alícuotas de 2 mL las cuales se filtraron (diámetro de poro 0.22 µm) antes de leer la absorbancia en celda. Se determinó el cambio de la absorbancia en el tiempo de cada uno de los tratamientos desde el minuto cero (0) hasta completar 2 horas o hasta alcanzar absorbancia igual a 1.00.

1.5 Resultados y Análisis

1.5.1 Apariencia Física de los nuevos compuestos

Luego de ser secados en estufa a 70°C, se recogieron los nuevos compuestos en tubos de vidrio. Los sólidos formados mantienen su color al igual que en la suspensión; esto es, color amarillo pálido para el compuesto TAT-Zn y color marrón para el compuesto denominado TAT-Mn. Ambos se recogen en forma de material particulado percibiendo al TAT-Zn como el de partículas más pequeñas, estilo polvo; mientras que el TAT-Mn forma hojuelas bastante delgadas (Figura 1-5).

Los materiales se siguen conservando al abrigo de la luz en un desecador y se procede a determinar el resto de las características.

Figura 1-5: Apariencia de los nuevos compuestos sintetizados

TAT-Zn TAT TAT-Mn

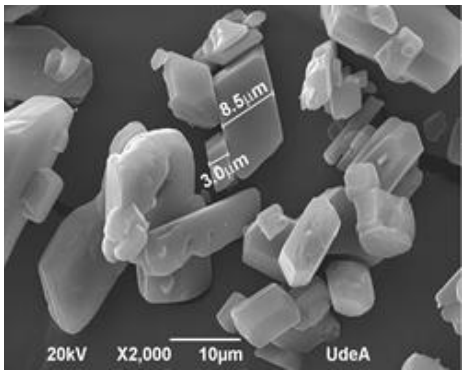
1.5.2 Resultados y análisis de micrografías SEM

Se tomaron varias micrografías utilizando microscopia de barrido electrónico en donde se puede apreciar claramente que los cristales tanto del precursor TAT como de los nuevos compuestos generados, tienen tamaños distintos, debido a un proceso de cristalización no homogéneo; esto es, todos los cristales tienen diferente longitud y espesor. La figura 1-6 muestra la morfología del TAT a 2000 y 4000 veces el aumento de tamaño. El TAT puro es capaz de formar cristales de gran tamaño de formas no homogéneas siendo la mayoría en formas de rombos y otras hexagonales, se puede apreciar la superficie lisa y de pared gruesa. En algunos sitios se observan conglomerados de estas formas las cuales aparecen de tonalidad más oscura debido a la densidad de la muestra (entre más densa sea la muestra, menor es el contraste que se genera). El ancho de los cristales es cercano a los 3µm mientras que el largo y alto son variables. Es claro en las imágenes, como la interacción con $ZnCl_2$ y $MnCl_2$ cambia la forma de cristalización. En ambos casos los cristales son de menor dimensión, pero con geometría alargada. Justamente, este parámetro de largor se hace difícil de medir debido a su múltiple fragmentación y en algunos sitios, estas formas se agrupan en conglomerados permitiendo visualizar estructuras más largas que el campo visible. El TAT-Zn forma estas estructuras alargadas conocidas como acículas con extremo semicircular y de apariencia lisa en las cuales el ancho es inferior a los 2µm. El compuesto TAT-Mn prefiere formar estructuras algo más rugosas, pero también alargadas en forma de rectángulos planos. De igual manera se

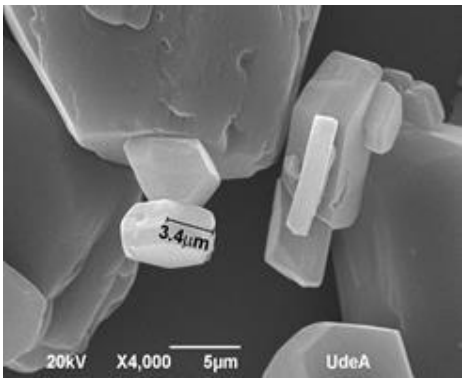
disminuye el tamaño en la formación de cristales que ahora tienen una forma alargada y medianamente uniforme, como largos bastones. Debido al largo de estas estructuras ocurre lo mismo que con el TAT-Zn y tienden a la fragmentación. El ancho de estas estructuras ronda los 1.5 μm.

Figura 1-6: Micrografías tomadas por microscopía electrónica SEM. a) y b) TAT; c) TAT-Zn y d) TAT-Mn.

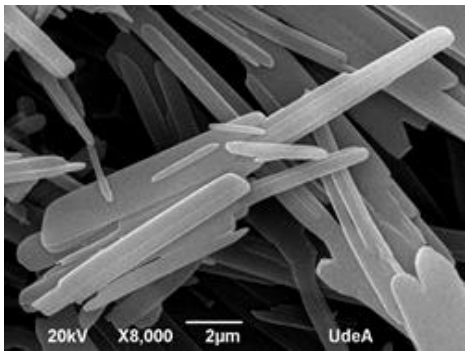
a.



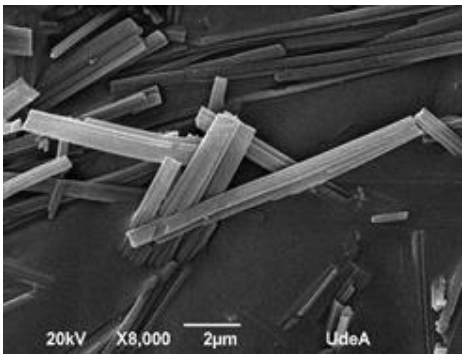
b.



c.



d.



El análisis elemental se realizó mediante una Microsonda de rayos X-EDX. Los resultados aparecen en la figura 1-7 y en ambos casos se encuentra la presencia de los metales Zn y Mn junto con su halógeno Cl proveniente de la sal precursora. Para el Zn se tiene un porcentaje atómico de 15.76%, en peso de la muestra mientras que para el Mn se encuentra que el porcentaje atómico tiene un valor de 2.59% que corresponde a en peso de la muestra como aparece en las tablas 1-2 y 1-3.

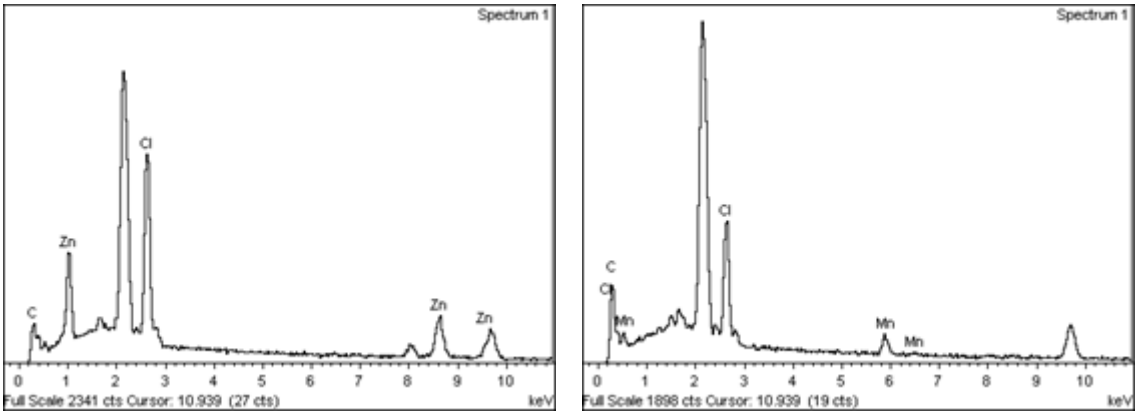
Tabla 1-2: Análisis elemental SEM del compuesto TAT-Zn

Elemento	Intensidad de señal	% Peso	% Atómico
C	0.1698	29.4 ± 5.12	62.53
Cl	0.8047	30.17 ± 2.25	21.71
Zn	0.8659	40.39 ± 3.04	15.76

Tabla 1-3: Análisis elemental SEM del compuesto TAT-Mn

Elemento	Intensidad de señal	% Peso	% Atómico
C	0.2964	70.91 ± 2.10	89.05
Cl	0.8722	19.66 ± 1.43	8.36
Mn	0.7883	9.43 ± 0.87	2.59

Figura 1-7: Análisis elemental tomado en microscopía SEM. TAT-Zn a la izquierda y TAT-Mn a la derecha.



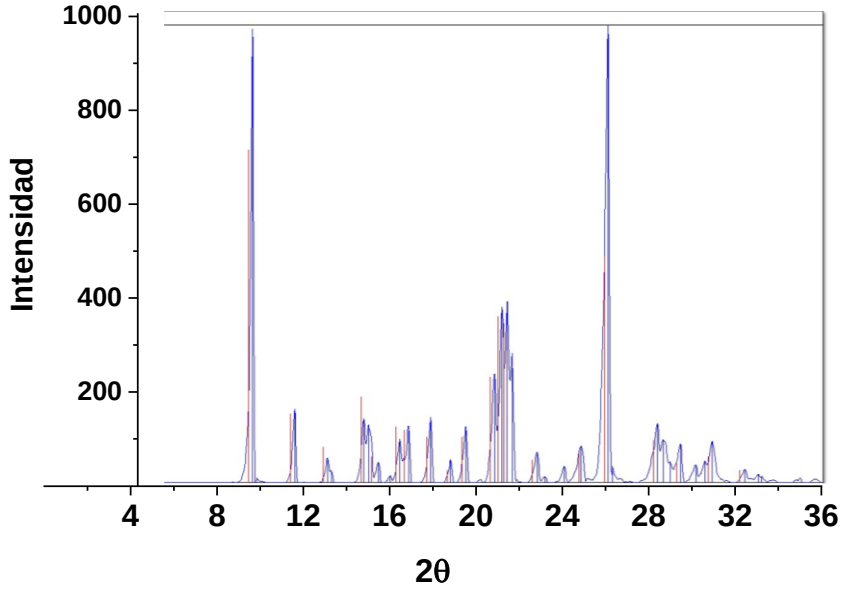
1.5.3 Análisis de patrón de difracción: Rayos-X en Polvo

El patrón de rayos-x en polvo (XRPD) otorga una huella digital de la forma específica de un cristal, por lo que esta técnica se utiliza como método confiable para identificar y

caracterizar las formas diferentes que puedan tener el TAT con los dos nuevos compuestos generados con Zn y Mn (Bawa, 2007).

La figura 1-8 muestra una comparación entre el patrón de difracción experimental y el teórico. Los valores de los ángulos de difracción (2θ) coinciden exactamente con el TAT teórico de referencia [00-039-1824]. Al observar las señales en los mismos ángulos de difracción, se demuestra que el ligando TAT conserva las propiedades y características de sólido cristalino (Peng et al., 2018); por lo tanto, es una referencia de la calidad de la muestra. La señal que se toma de referencia es la cercana a 2θ = 10°, ocasionada por una separación interplanar entre las capas que conforman el cristal (Cullity, 1978). La similitud entre las señales proporciona la seguridad de que el TAT utilizado es puro y se pueden realizar reacciones de síntesis.

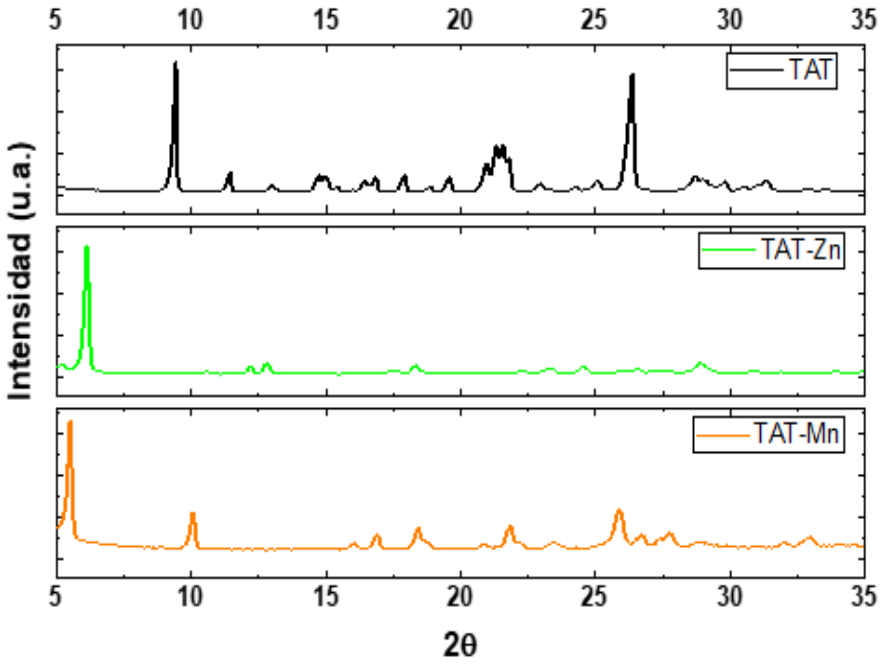
Figura 1-8: Patrón de difracción de rayos X en polvo para el TAT puro.



A continuación, se obtuvieron los difractogramas para cada uno de los nuevos compuestos sintetizados. Al comparar los patrones de difracción de rayos X de TAT-Zn, TAT-Mn y TAT se observan señales bastante diferentes en posición, forma e intensidad. Esto confirma que los sólidos obtenidos (inherentemente diferentes) forman cristales no amorfos y no homogéneos al igual que el TAT precursor. La señal que aparece cercana al ángulo 2θ = 10° está asociada con la separación de los planos que están presentes en el cristal

(separación interplanar) y las señales inferiores a este ángulo se originan al aumentar el tamaño de la celda como se ve en el TAT-Zn y TAT-Mn, esto quiere decir que se ha formado un buen complejo cristalino y que, además, cada compuesto presenta diferente fase cristalina (Cullity, 1978). Esta información se puede detallar en la figura 1-9, en donde el patrón del TAT aparece de color negro en la parte superior de la gráfica, el patrón del TAT-Zn aparece en la mitad de color verde y el patrón del TAT-Mn esta al final de color rojo.

Figura 1-9: Comparación de los patrones de difracción de rayos-x de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn.



Con la ley de Bragg, se puede dar un indicio del tamaño de la celda unitaria (d) utilizando el pico o banda que aparece más a la izquierda de cada difractograma. Acorde a la ley, entre menor el ángulo de difracción, más grande es el tamaño de celda ocasionado por una mayor distancia interplanar de los nuevos compuestos. El resumen de esta información se encuentra condensada en la tabla 1-4.

Tabla 1-4: Determinación del tamaño de celda unitaria por Ley de Bragg.

Compuesto	Posición de banda 2θ	Angulo (radianes) θ	Tamaño de celda (Å) d
TAT	9.4	4.7	9.43
TAT-Zn	6.1	3.1	14.4
TAT-Mn	5.5	2.7	16.1

1.5.4 Determinación del perfil de dilución en agua y coeficiente de extinción específico para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn.

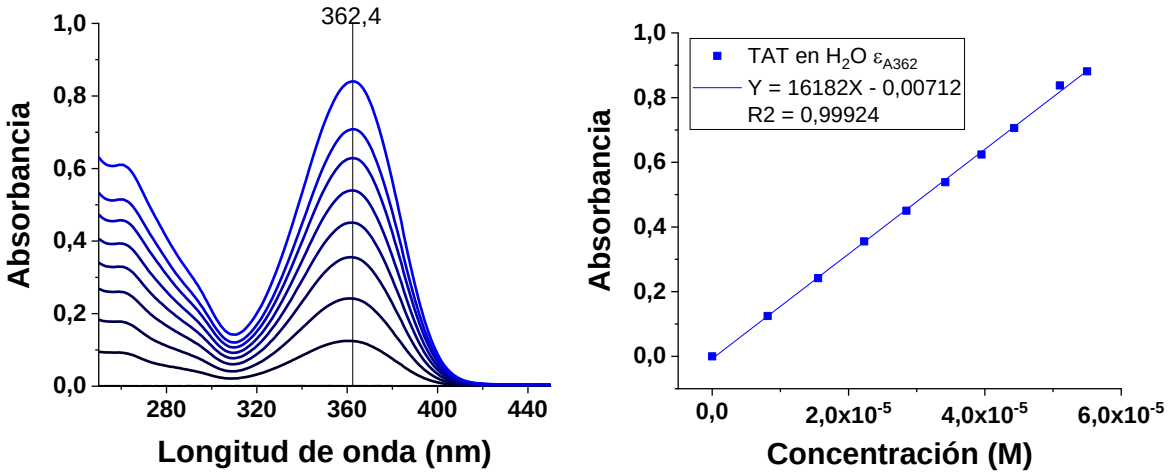
Si bien lo referente a la caracterización espectroscópica, se describe en el capítulo siguiente, es pertinente mencionar, que debido a que se realizará el seguimiento del cambio en la concentración, a través de medidas de absorbancia, como parámetro proporcional a la concentración, se hace necesario realizar la curva de calibración y adicionalmente, se determina el coeficiente de extinción, por lo que este parámetro en particular para el TAT como referencia, se presenta en este capítulo. Para el TAT en agua, estas medidas se realizan en concentraciones del orden de 10^{-5} M. En la figura 1-10, se observan los espectros del TAT a diferentes concentraciones y la curva de calibración en la que los resultados de absorbancia y de concentración, se ajustan a un modelo lineal, medidos a λ_{max} = 362,5 nm. La pendiente de este gráfico corresponde al coeficiente de extinción molar. El valor del intercepto en el modelo de regresión, nos señala donde está la incertidumbre en la medida y que en este caso corresponde a la tercera cifra decimal. Para este caso, el valor del coeficiente de extinción molar, medido a temperatura ambiente, es $\boldsymbol{\mathcal{E}_{362\,nm} = 16\,182\ cm^{-1}M^{-1}}$.

Es importante tener presente que el cloruro de Zn (II) tiene un máximo de absorción reportado a 197,6 nm y de ahí, un decrecimiento pronunciado, de forma similar al observado para el $MnCl_2$, la longitud de onda de corte es a 240 nm (Ramesh et al., 2014), por lo que no presenta una absorbancia en la región en UVA, donde se sigue la absorbancia del TAT o de sus derivados (Trivedi et al., 2017). como parámetro proporcional

a la concentración y en consecuencia, no presentan interferencia en las medidas. En la figura 1-11 se observan los resultados del cambio de las absorbancias de los tres compuestos en el tiempo manteniendo una agitación regular. El análisis ANOVA de las pendientes tras regresión lineal arroja valor P por debajo de un nivel de confianza 0.05 para las tres pendientes, por lo tanto, se puede afirmar que existe un efecto estadísticamente importante en cuanto a la velocidad de dilución del TAT en agua en presencia de los cloruros de Zn y Mn. El mismo análisis arroja que las pendientes son diferentes entre sí, corroborando que el tratamiento con adición de Zn aumenta la velocidad de dilución del TAT con mayor significancia. Las soluciones con TAT-Zn y TAT-Mn en el medio alcanzan un mayor valor de absorbancia en un menor tiempo de agitación que el TAT a la longitud de onda evaluada de 362 nm. Considerando como referencia los 75 minutos, tiempo al cual el compuesto TAT-Zn alcanzo absorbancia cercana a 1.00, las soluciones acuosas de TAT-Zn y TAT-Mn presentaron porcentaje de disoluciones de 97.5% y 80.0% respectivamente; mientras que el TAT solo un 57.5%. Un tiempo de dilución más corto, puede contribuye a una mejor absorción del principio activo.

Los datos se tomaron por un tiempo superior a los 100 minutos hasta alcanzar una absorbancia cercana a 1.00, que corresponde al valor máximo estimado según se prepararon las muestras con base al coeficiente de extinción encontrado para el TAT.

Figura 1-10: Determinación experimental del coeficiente de extinción molar del TAT en agua.



En la tabla 1-5 se encuentra la concentración alcanzada en cada una de las soluciones al cabo de 75 minutos de agitación, tiempo en el que la solución TAT-Zn alcanzo la absorbancia de 1.00. Los ensayos se llevaron a cabo a 23.7 °C y los porcentajes de concentración fueron calculados teniendo en cuenta 5 mg pesados en un volumen de 250 mL de H_2O ($7.9x10^{-5}$ M). Los resultados arrojan que la inclusión del Zn y Mn en la estructura del TAT incrementan la velocidad de dilución del principio activo hasta en un 40% para las condiciones evaluadas.

Figura 1-11: Variación de la absorbancia en el tiempo para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, medido a 362 nm.

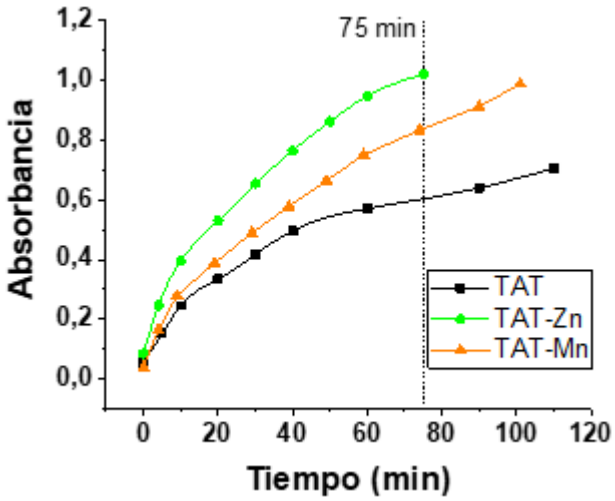


Tabla 1-5: Absorbancia y concentración de TAT en las distintas soluciones en 75 minutos. Coeficiente molar de extinción experimental del TAT en H_2O: $\varepsilon_{\lambda 362nm}$ = 16182 $cm^{-1}M^{-1}$

Solución	Absorbancia	Concentración TAT en solución (µg/mL)	% TAT en solución
TAT	0.604	11.5	57.5%
TAT-Zn	1.025	19.5	97.5%
TAT-Mn	0.839	16.0	80.0%

1.6 Conclusiones

Los compuestos sintetizados de TAT con $ZnCl_2$ y $MnCl_2$, respectivamente, exhiben propiedades morfológicas que los diferencian de su precursor TAT, evidenciado a través de los estudios de micrografías SEM, en referencia al tamaño y forma de los cristales obtenidos. Los compuestos formados con TAT-Zn y TAT-Mn muestran cristales más largos y aplanados en comparación con el precursor TAT. Estos cambios morfológicos observados en las micrografías SEM son indicio de un cambio en la cristalinidad de las muestras que se obtienen tras evaporación del solvente (Onoda et al., 2020).

El cambio observado en los difractogramas XRPD permite corroborar lo evidenciado en las micrografías SEM, en donde la forma alargada de las bandas nos dice que los compuestos presentan formas de cristalización diferentes, no homogénea y no amorfas, dando por echo que los 3 compuestos son inherentemente distintos. Con la ley de Bragg, se obtuvo un indicio del tamaño de la celda unitaria (d), encontrando que los compuestos TAT-Zn (d=14.4 Å) y TAT-Mn (d=16.1 Å) aparentemente tienen mayor tamaño de celda que el TAT (d=9.43 Å). Acorde a esta ley, a menor el ángulo de difracción, más grande es el tamaño de celda, derivado de una mayor distancia interplanar de los nuevos compuestos (Debye & Scherrer, 1916).

El análisis elemental, obtenido mediante Microsonda de rayos X-EDX, permite evidenciar que el Zn y Mn están presentes en la estructura del TAT provocando mayores distancias entre los planos de los microcristales formados. Estos metales ligados al TAT hacen que el principio activo aumente la tasa de disolución alcanzando mayores concentraciones en menores intervalos de tiempo en las condiciones en que se llevó a cabo el experimento. A los 75 minutos de agitación a temperatura ambiente (23.7°C) , la solución con Zn aumento la tasa de dilución del TAT en un 40% mientras que la solución con Mn logró un incremento del 22.5% respecto al mismo compuesto. El incremento en la velocidad de disolución del fármaco contribuye a una mejor absorción en el organismo.

1.7 Referencias

Acuña Cueva, E. R., Faure, R., Illán Cabeza, N. A., Jiménez Pulido, S. B., Moreno Carretero, M. N., & Quirós Olozábal, M. (2003). Synthesis and characterization of several lumazine derivative complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Pd(II) and Pt(II). X-ray structures of a mononuclear copper complex and a dinuclear cadmium complex. *Inorganica Chimica Acta*, *351*(1), 356–362. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00172-5

Ahn, W. S., & Antoniewicz, M. R. (2013). Parallel labeling experiments with [1,2-13C]glucose and [U-13C]glutamine provide new insights into CHO cell metabolism. *Metabolic Engineering*, *15*, 34–47. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.10.001

Alvarado López, K. (2015). Uso de cocristales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. *Pensamiento Actual*, *15*(25), 207–215.

Asghar Ensafi, A., & Hajian, R. (2008). Determination of losartan and triamterene in pharmaceutical compounds and urine using cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Analytical Sciences*, *24*(11), 1449–1454. https://doi.org/10.2116/analsci.24.1449

Bawa, Y. (2007). Solvent inclusion properties of Triamterene crystal forms and solubility differences between Roxithromycin polymorphic forms. In *Thesis* (Issue April). http://repository.nwu.ac.za/handle/10394/1469

Carmona-Martínez, V., Ruiz-Alcaraz, A. J., Vera, M., Guirado, A., Martínez-Esparza, M., & García-Peñarrubia, P. (2018). Therapeutic potential of pteridine derivatives: A comprehensive review. *Medicinal Research Reviews*, 1–56. https://doi.org/10.1002/med.21529

Castaño Espinal, D. C. (2016). Reacciones de fotodegradación de tirosina, histidina, metionina y hormona estimulante de los melanocitos inducidas por pterina.

Cedano Díaz, A., Martínez González, S., Escalera Valente, F., Salgado Moreno, S., Carrillo Díaz, F., Macías Coronel, H., & Peña Parra, B. (2012). La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico Veterinario*, *2*(4), 43–54.

Chahidi, C., Morliere, P., Aubailly, M., Dubertrei, L., & Santus, R. (1983). Photosensitization by methotrexate photoproducts. *Photochemistry and Photobiology*, *38*(3), 317–322. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb02678.x

Coral, D. F. (2010). Influencia del hidróxido de calcio en las propiedades físico químicas del almidón de maíz.

Cullity, B. D. (1978). Elements of X-RAY DIFFRACTION. In *Plant Management & Physiology* (Second Edition). Addison-Wesley Publishing Company INC.

Debye, P., & Scherrer, P. (1916). Interferenzen an regellos orientierten Teilchen im Röntgenlicht. I. *Nachrichten von Der Gesellschaft Der Wissenschaften Zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse*, *1916*, 277. http://eudml.org/doc/58947

El Azzouzi, N., El Fadli, Z., & Metni, M. R. (2017). Synthesis and chemical characterization of some transition metal complexes with a 6-acetyl-1,3,7-trimetyllumazine ligand. *Journal of Materials and Environmental Science*, *8*(12), 4323–4328. https://doi.org/10.26872/jmes.2017.8.12.455

GSK. (2009). *Dyazide (hydrochlorothiazide/triamterene)* (p. 12). https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/016042s077lbl.pdf

Guillotin, D., Austin, P., Begum, R., Freitas, M. O., Merve, A., Brend, T., Short, S., Marino, S., & Martin, S. A. (2017). Drug-repositioning screens identify triamterene as a selective drug for the treatment of DNA mismatch repair deficient cells. *Clinical Cancer Research*, *23*(11), 2880–2890. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1216

Haeger, K. (1969). Combination of bendroflumethiazide and triamterene in the treatment of hypostatic edema. *Angiology*, *20*(6), 334–340. https://doi.org/https://doi.org/10.1177/000331976902000603

Hirakawa, K., Aoshima, M., Hiraku, Y., & Kawanishi, S. (2002). Photohydrolysis of methotrexate produces pteridine, which induces poly-G–specific DNA damage through photoinduced electron transfer. *Photochemistry and Photobiology*, *76*(5), 467. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)076<0467:pomppw>2.0.co;2

IARC. (2016). Triamterene. In *Some Drugs and Herbal Products* (Vol. 108, pp. 263–283). International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Drugs-And-Herbal-Products-2015

Jiménez Pulido, S. B., Linares Ordóñez, F. M., Martínez Martos, J. M., Moreno Carretero, M. N., Quirós Olozábal, M., & Ramírez Expósito, M. J. (2008). Metal complexes with the ligand derived from 6-acetyl-1,3,7-trimethyllumazine and benzohydrazide. Molecular structures of two new Co(II) and Rh(III) complexes and analysis of in vitro antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *102*(8), 1677–1683. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.04.004

Juzeniene, A., Grigalavicius, M., Ma, L. W., & Juraleviciute, M. (2016). Folic acid and its photoproducts, 6-formylpterin and pterin-6-carboxylic acid, as generators of reactive oxygen species in skin cells during UVA exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *155*, 116–121. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.01.001

Koutsilieris, M., Reyes-Moreno, C., Choki, I., Sourla, A., Doillon, C., & Pavlidis, N. (1999). Chemotherapy cytotoxicity of human MCF-7 and MDA-MB 231 breast cancer cells is altered by osteoblast-derived growth factors. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *5*(2), 86–97.

Li, A. Y., Xu, L. L., Chen, J. M., & Lu, T. B. (2015). Solubility and dissolution rate enhancement of triamterene by a cocrystallization method. *Crystal Growth and Design*, *15*(8), 3785–3791. https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00439

Llopis, M. J., Alzuet, G., Martin, A., Borrás, J., García-Granda, S., & Díaz, R. (1993). Halocuprates(II) of triamterinium, a diprotonated pteridine derivative. Crystal structure of (triamterinium)CuCl4. Electronic and EPR characterization of (triamterinium)CuX4 (X = Cl, Br). *Polyhedron*, *12*(20), 2499–2506. https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)83075-2

Lorente, C. (2003). Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2216

Moghadam, N. H., Salehzadeh, S., Tanzadehpanah, H., Saidijam, M., Karimi, J., & Khazalpour, S. (2018). In vitro cytotoxicity and DNA/HSA interaction study of triamterene using molecular modelling and multi-spectroscopic methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *37*(9), 2242–2253. https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1489305

Netzer, T., Ullrich, F., Knauf, H., & Mutschler, E. (1995). Potassium-Retaining Diuretics: Triamterene. In R. F. Greger, H. Knauf, & E. Mutschler (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (1st ed., pp. 396–421). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79565-7

NIH. (2019). National Institutes of Health. Office of Dietary Supplements. https://ods.od.nih.gov/

Onoda, H., Inoue, Y., Ezawa, T., Murata, I., Chantadee, T., Limmatvapirat, S., Oguchi, T., & Kanamoto, I. (2020). Preparation and characterization of triamterene complex with ascorbic acid derivatives. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *46*(12), 2032–2040. https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1842439

Ott, J., Gronemann, V., Pontzen, F., Fiedler, E., Grossman, G., Burkhard Kersebohm, K., Weiss, G., & Witte, C. (2012). Methanol - An Industrial Review. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

Parnis, J. M., & Oldham, K. B. (2013). Beyond the beer-lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *267*, 6–10. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.006

Peng, B., Wang, J.-R., & Mei, X. (2018). Triamterene–furosemide salt: structural aspects and physicochemical evaluation. *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, *74*(6), 738–741. https://doi.org/10.1107/S2052520618013185

Priya, N. P., Arunachalam, S. V., Sathya, N., Chinnusamy, V., & Jayabalakrishnan, C. (2009). Catalytic and antimicrobial studies of binuclear ruthenium(III) complexes containing

bis-β-diketones. *Transition Metal Chemistry*, *34*(4), 437–445. https://doi.org/10.1007/s11243-009-9214-z

Quiroz, H. (2014). Preparación y estudio de las propiedades estructurales, opticas y morfológicas de nanotubos de TiO2 para su aplicación en sensores ópticos.

Ramesh, V., Umarani, P., Jayaraman, D., & Manivannan, V. (2014). Synthesis and characterization of magnesium chloride doped l -threonine dihydrogen phosphate crystal. 5, 59–65.

Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharmaceutics*, *2012*, 1–10. https://doi.org/10.5402/2012/195727

Sigma. (n.d.). *Triamterene Sigma ALdrich*. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t4143?lang=en&region=CO

Trivedi, M. K., Sethi, K. K., Panda, P., & Jana, S. (2017). A comprehensive physicochemical, thermal, and spectroscopic characterization of zinc (II) chloride using X-ray diffraction, particle size distribution, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis/differential thermogravimetric analysis, . *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, *7*(1), 33–40. https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_2_17

Vargas, F., Cheng, A. T., Velutini, G., Marcano, E., Sánchez, Y., Fraile, G., & Velásquez, M. (2001). In vitro antioxidant and photo-oxidant properties of dipyridamole. *International Journal of Toxicology*, *20*(6), 363–368. https://doi.org/10.1080/109158101753333640

Vargas, F., Volkmar, I. M., Sequera, J., Mendez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velasquez, M., & Medina, R. (1998). Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *42*(3), 219–225. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00074-8

Villa Pérez, C., Ortega, I. C., Vélez Macías, A., Payán, A. M., Echeverría, G. A., Soria, D. B., & Valencia-Uribe, G. C. (2018). Crystal structure, physicochemical properties, Hirshfeld surface analysis and antibacterial activity assays of transition metal complexes of 6-

methoxyquinoline. *New Journal of Chemistry*, *42*(9), 7166–7176. https://doi.org/10.1039/c8nj00661j

Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2013). Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews*, *65*(1), 315–499. https://doi.org/10.1124/pr.112.005660

Zaheer, M. R., Gupta, A., Iqbal, J., Zia, Q., Ahmad, A., Roohi, Owais, M., Hashlamon, A., Mohd Setapar, S. H., Aliev, G., & Md Ashraf, G. (2016). Molecular mechanisms of drug photodegradation and photosensitization. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(7), 768–782. https://doi.org/10.2174/1381612822666151209151408

2. CAPÍTULO 2

Determinación de estabilidad térmica y propiedades espectroscópicas de los compuestos formados con TAT, $ZnCl_2$ y $MnCl_2$.

2.1 Resumen

Los compuestos sintetizados fueron caracterizados a través de técnicas espectroscópicas como absorción UV-VIS, infrarrojo y raman. Estos análisis proveen información acerca de los posibles sitios de unión de los metales Zn y Mn en la molécula del TAT. Según los resultados, se deduce que es el nitrógeno 5 del anillo de pterina el mayor candidato para unirse a los metales, así como los nitrógenos de los grupos amino. Estos resultados se contrastaron con los obtenidos en los termogramas y en el perfil de dilución al relacionar la disminución de temperatura de fusión con la perdida de enlaces de hidrogeno intramoleculares, así como el aumento en la velocidad de dilución del TAT.

Se determinó el carácter fotosensibilizador del TAT y los complejos con Zn y Mn sintetizados, en medios alcohólicos, pero esto no pudo ser observado en solución acuosa, debido posiblemente al reducido tiempo de vida del oxígeno molecular singulete en agua. Esto se realizó a través de medidas de actinometría en estado estacionario, que permitieron establecer el rendimiento cuántico de oxígeno molecular singulete que generan los nuevos compuestos. Adicionalmente, se realizaron medidas de rendimiento cuántico de fluorescencia, para aportar a la caracterización de los materiales, con miras al estudio posterior de sus aplicaciones como marcadores fluorescentes. La caracterización se completó con la determinación de las medidas de band gap óptico y potencial Z. Este último, con el propósito de estimar la estabilidad de las dispersiones de los compuestos sintetizados.

Se evidencia que los metales Zn y Mn se incorporan satisfactoriamente y seguramente presentan interacción con el N5 del heterociclo, observando este efecto en diferentes tamaños y desplazamientos de las bandas de los espectros UV y técnicas de

espectroscopia infrarroja. Esta interacción con los metales provoca cambios en los enlaces de hidrogeno intramoleculares alterando la estabilidad térmica y cambiando la forma de cristalización de los compuestos.

Palabras clave

Caracterización espectroscópica, estabilidad térmica, estabilidad fotoquímica

2.2 Abstract

One of the most significant evidence to verify the generation of new coordination compounds is the determination of the structural, thermal and spectroscopic properties of the new synthesized compounds. With the analysis of spectroscopic techniques such as UV-VIS, infrared and RAMAN technical, it could be deduced that the nitrogen 5 of the pterin ring of the TAT is the main candidate to bind the metals Manganese and Zinc. In addition, the thermograms were contrasted with the dilution profile, it was evidenced that the decrease in melting temperature with the loss of intramolecular hydrogen bonds, as well as the increase in the dilution rate of the TAT.

Additionally, the photosensitizing character was determined through steady- state actinometry measurements of the TAT and the complexes with Zn and Mn synthesized in alcoholic media, it was possible to ensure the generation of singlet molecular oxygen and the calculation of the quantum yield for the new compounds. Additionally, fluorescence quantum yield measurements were carried out to contribute to the characterization of the materials, with a view to the subsequent study of their applications as fluorescent markers. The characterization was completed with the determination of the optical band gap and Z potential measurements. The latter, with the purpose of estimating the stability of the dispersions of the synthesized compounds.

It is evident that Zn and Mn are incorporated satisfactorily and surely interact with the N5 of the heterocycle, observing this effect in different in sizes and shifts in the bands of the UV spectra and infrared spectroscopy techniques. This interaction with metals causes ruptures in intramolecular hydrogen bonds, lowering the melting point and changing the crystallization form of the compounds.

Keywords

Spectroscopic characterization, thermal stability, photochemical stability

2.3 Introducción

El interés por la química de coordinación y formación de sales de los derivados de pterinas viene en aumento año tras año. Ya han sido sintetizados algunos complejos de coordinación y algunas sales utilizando como precursor orgánico a los derivados de pteridina. Por ejemplo, complejos de compuestos alquilados de lumazina con Cu(II) y Cd(II) realizados por Acuña Cueva et al., (2003) demostraron que el N5 de la pteridina está involucrado en el enlace de coordinación (Figura 1-1). Así mismo, Jiménez Pulido et al., (2009) en su trabajo con la pteridina-benzoylhidrazona, un hibrido entre 6-acetil-1,3,7-trimetilumazina y benzohidrazida (Jiménez Pulido et al., 2008), encontró que también es el N5 del anillo heterocíclico el responsable de coordinarse esta vez con los metales rodio (Rh) y cobalto (Co) (Figura 1-2). Finalmente, investigaciones como la de el Azzouzi et al., (2017) corroboran que, en el caso de la piridinilhidrazona, un derivado de trimetillumazina, vuelve a ser el N5 uno de los grandes responsables de la formación del enlace, esta vez con Ag, Cu, Hg, y Gd.

Particularmente en la estructura del TAT (Figura 0-1), tanto los electrones libres de los nitrógenos en el heterociclo del anillo de la pteridina, como los nitrógenos de los grupos amino, unidos a este, son potenciales donores de electrones, en su proceso de generar coordinaciones con los metales. Sin embargo, los nitrógenos del anillo tienen un especial ambiente químico, debido a que sus electrones libres no pueden deslocalizarse en el sistema aromático, debido a que son ortogonales a este. Con relación a las sales, aquí cabe mencionar a Llopis et al., (1993) quien sintetizo una sal de TAT con un compuesto tetrahalogenado en un medio excesivamente ácido, protonando así los nitrógenos N3 y N8 de la pteridina, responsables de formar puentes de hidrogeno con el tetrahalocuprato (Figura 1-3).

Muchos de estos trabajos expuestos, entre otros, tienen motivaciones relacionadas a entender la síntesis, reactividad y transporte de los metales en el organismo, como lo es el caso del molibdeno y la molibdopterina o la tetrahidropterina (precursor de la BH_4), cuyos

complejos metálicos son útiles como cofactores biológicos. La naturaleza exacta de como los derivados de pteridina se involucran en el sistema de ciclo celular y la forma en que esto se puede aprovechar requiere de estudios más elaborados; mientras tanto, las investigaciones se enfocan en la síntesis de nuevos compuestos de coordinación que involucran ligandos derivados de pteridina como modelos para imitar la reactividad de, por ejemplo, el sitio metálico de algunas metaloenzimas (el Azzouzi et al., 2017; Jiménez Pulido et al., 2008).

Existen varios grupos de medicamentos que después de su administración por cualquiera de las vías comúnmente utilizadas (oral, tópica, intravenosa), pueden generar reacciones adversas de tipo fototóxicas, que son activadas por la exposición del paciente a radiación UV-VIS. A diferencia de las reacciones fotoalérgicas, la fotosensibilización depende de la dosis del medicamento y de la radiación, y puede involucrar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), con capacidad de incrementar el estrés oxidativo sobre proteínas y lípidos (Zaheer et al., 2016). Existen estudios cualitativos que sugieren que el TAT puede formar por radiación en la región UVA, específicamente oxígeno molecular singulete ($O_2[^1\Delta_g]$) (Vargas, Fuentes, et al., 1998; Vargas, Volkmar, et al., 1998) y que esto es asociado a su fototoxicidad. Al respecto, es propio mencionar que esta especie, $O_2[^1\Delta_g]$, es el estado excitado de más baja energía del oxígeno molecular y hace parte de las especies reactivas de oxígeno; es deficiente de electrones, diamagnética (multiplicidad singulete) y su exceso de energía con relación al estado basal triplete, le permiten participar en reacciones que están prohibidas para el estado basal triplete. Tiene un tiempo de vida que oscila entre los 4 y 60 ms en fase líquida (Jensen, 1999), lo que implica que las reacciones en la que participa son muy rápidas. Las especies que lo producen se les llama fotosensibilizadores tipo II. Estas especies, son capaces de absorber energía y desde sus estados excitados (principalmente el triplete por ser un proceso permitido por que se conserva la multiplicidad de espín), a través de procesos como transferencia de energía al oxígeno molecular o de intercambio electrónico, generan el $O_2[^1\Delta_g]$. Los pasos involucrados en el proceso de fotosensibilización son: excitación por absorción de radiación (ecuación 3), cruce entre sistemas (*ISC* por su sigla en inglés: *intersystem crossing*) (ecuación 4), y transferencia de energía (ecuación 5) (Zoltan et al., 2007). De ser un fotosensibilizador de tipo físico, se regenerará el fotosensibilizador en estado basal, luego de su interacción con otras especies apagadoras. Presenta un

decaimiento radiativo (fosforescencia) en la región del infrarrojo a 1270 nm. De ser de tipo químico, se presentaría la transformación química del fotosensibilizador S, y en consecuencia, la formación de fotoproductos. Es importante mencionar, que un fotosensibilizador de $O_2[^1\Delta_g]$, puede tener ambos componentes en su mecanismo de fotosensibilización (físico y químico), y su eficiencia estaría marcada, por reacciones cuyas velocidades sean más rápidas que su decaimiento radiativo, o al menos que presenten tiempos de vida media comparables.

$$S \xrightarrow{hv} {}^1S^* \tag{3}$$

$$^1S^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3S^* \tag{4}$$

$$^3S^* + O_2\,(^3\textstyle\sum_g) \longrightarrow S + O_2\,(^1\Delta_g) \tag{5}$$

Esta especie altamente oxidante, puede participar en procesos fototóxicos en los organismos (Jensen, 1999; Quintero & Miranda, 2000), por ejemplo, induciendo peroxidación lipídica y entrecruzamiento de proteínas. Sin embargo, las propiedades de esta especie excitada del oxígeno molecular singulete, también pueden ser aprovechadas entre otras, en terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer (León et al., 2016).

Regularmente, la evaluación del carácter fotosensibilizador en la generación del $O_2[^1\Delta_g]$, puede determinarse de forma indirecta, con estudios cinéticos del decaimiento de especies químicas que son apagadores de esta especie excitada del oxígeno molecular, llamados actinómetros. La relación entre las constantes de decaimiento de seudo primer orden (k) y los rendimientos cuánticos ($\Phi\Delta$), en la generación del $O_2[^1\Delta_g]$, entre un fotosensibilizador de referencia (s) y el compuesto objeto de estudio (m), respectivamente, permite determinar este parámetro, (ecuación 6). Este último parámetro se describe como las moles de $O_2[^1\Delta_g]$ generadas, por las moles de fotones absorbidas por el fotosensibilizador (Wilkinson et al., 1993).

$$\frac{\Phi_\Delta^m}{\Phi_\Delta^s} = \frac{k_{exp}^m}{k_{exp}^s} \tag{6}$$

El TAT es un compuesto con un alto rendimiento cuántico de fluorescencia (Netzer et al., 1995), cuyos valores están previamente reportados (0.9 y 0.8 en metanol y PBS respectivamente), utilizando sulfato de quinina como actinómetro (Fiori et al., 2003). Sin embargo, presentan variaciones considerables con los presentados por Vargas, Fuentes, et al., (1998) de 0,54 en metanol. En nuestro grupo de Investigación ya se han medido en etanol, metanol y PBS, utilizando como actinómetros de referencia sulfato de quinina y antraceno (resultados pendientes de publicar), pero en todos estos solventes, con valores superiores al 80 %. Estos serán comparados con los resultados obtenidos para los complejos del ligando TAT, con los cloruros de Zn y Mn.

Así, en el presente capítulo se estudia el efecto que presentan los compuestos obtenidos, de la reacción del TAT con los cloruros de Zn y Mn, en comparación con el TAT, frente a la estabilidad térmica (TGA-DSC), fotoestabilidad (UVA) y fototoxicidad. Esta última, referente a la generación del oxígeno molecular singulete. Se realizan las curvas de calibración a través de espectroscopía de absorción UV-VIS y se determinan los coeficientes de extinción específicos de TAT y sus derivados. Esta caracterización se complementa con la determinación del Potencial Z (ζ) a pH 7. Por lo referente a los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia reportados para el TAT, se vislumbra al TAT como posible marcador químico para realizar seguimiento de metales pesados. Esta última aplicación, si bien no es objeto de nuestro presente estudio, el caracterizar los compuestos formados, puede ser un punto de referencia al respecto.

2.4 Metodología

2.4.1 Coeficiente de extinción molar

Con base en los espectros de absorción UV-VIS de los compuestos, se procedió a determinar el coeficiente de extinción. Se prepararon soluciones de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en MeOH, con las especificaciones que aparecen en la tabla 2-1.

Tabla 2-1: Soluciones stock de TAT y sus derivados sintetizados, en MeOH.

Compuesto	TAT	TAT-Zn	TAT-Mn
Cantidad (mg)	5.00	4.63	4.74
Volumen total (mL)	10	10	10

Para la disolución completa de las muestras, los matraces con las soluciones se sometieron al ultrasonido en baño maría durante 15 minutos a 40°C. Una vez homogenizada las muestras, se depositó 1.9 mL de metanol y 0.1 mL de DMSO (99%) en celdas de cuarzo; este último para favorecer la solubilidad de las muestras. Para cada uno de los compuestos se realizaron adiciones de alícuotas de la solución madre en el rango donde la absorbancia es lineal a la concentración según la ley de Lambert-Beer (Parnis & Oldham, 2013). Con los valores arrojados se realiza el análisis por regresión lineal de absorbancia vs concentración en donde la pendiente es equivalente al coeficiente de extinción molar (ε). Para el caso del TAT-Zn y TAT-Mn, al no conocer su composición específica, en lugar de determinar el coeficiente de extinción molar (ε [=] $cm^{-1}M^{-1}$) se determinó el coeficiente de extinción especifico (ε_s [=] $cm^{-1}(g/L)^{-1}$) tanto para los nuevos compuestos como para el precursor TAT.

2.4.2 Cálculo de energía *band gap* para los compuestos

La banda prohibida o *band gap* es la diferencia de energía que existe entre el electrón en la *banda de valencia* (electrones que participan en uniones atómicas) y el electrón libre o en la *banda de conducción* (contiene electrones que participan en corrientes eléctricas); por lo tanto, se puede definir al band gap como la energía necesaria (E_g) para excitar al electrón de modo que este pueda participar en la conducción. Cuando el electrón se excita y pasa a la banda de conducción, es libre de moverse por el semiconductor creando un espacio vacío o hueco en donde antes estaba ligado el electrón. Tanto el agujero en la banda de valencia como el electrón excitado participan en la conducción (Makuła et al., 2018).

Según la energía del band gap, los compuestos pueden ser clasificados como aislantes ($E_g \geq 5$ eV), semiconductores (E_g entre 1 y 5 eV), o conductores (Travizano et al., 2002).

La determinación del band gap aporta a la caracterización del compuesto. Con frecuencia se hace referencia a este parámetro cuando se discuten las propiedades fotocatalíticas de los semiconductores (Makuła et al., 2018), y en el presente trabajo, puede ser un punto de referencia para el estudio de estos compuestos como fotosensibilizadores vs fotocatalizadores.

Para calcular el band gap de los compuestos se utilizó el método grafico de Tauc el cual asume que la energía es dependiente del coeficiente de absorción. La ecuación (7) relaciona el método de Tauc y Davis-Mott, y se utiliza para probar el band gap óptico de las partículas desde el espectro de absorción UV-VIS. En la ecuación, α representa el coeficiente de absorción, h la constante de Planck, ν es la frecuencia, k una constante de proporcionalidad, n representa la naturaleza de la transición (en una transición indirecta permitida como ocurre con los óxidos metálicos, n = 1/2) y E_g es la banda prohibida (Amin et al., 2021; Makuła et al., 2018).

$$(\alpha h\nu)^n = k\left(h\nu - E_g\right) \tag{7}$$

El grafico resultante muestra la reflexión del espectro de los compuestos sintetizados transformado según la ecuación (7) (eje y) vs la energía del fotón (eje x). La región que muestra un aumento lineal y pronunciado de la absorción de luz con el aumento de energía es característica de los materiales semiconductores (Makuła et al., 2018). La recta tangente marca el punto de intersección con el eje x de la gráfica de Tauc. Este valor es un estimado de la energía de banda prohibida.

2.4.3 Espectroscopia FT-IR por método de ATR

Los análisis de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, permiten identificar los grupos funcionales que se presentan en TAT por medio de señales que representan los modos vibracionales de los enlaces; además permiten identificar algunos cambios estructurales que se presenten al incorporar Zn y Mn en la molécula orgánica, afectando la intensidad, forma o desplazando las señales originales.

La masa de la muestra analizada fue aproximadamente de 2 mg, la cual se llevó al equipo FT-IR Spectrum Two (ATR) - Perkin Elmer. La lectura de datos se realizó en un rango espectral de 8300 a 350 cm^{-1} con resolución hasta de 0.5 cm^{-1}.

2.4.4 Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman se basa en el fenómeno de dispersión inelástica de luz monocromática. Estudia los modos de frecuencias bajas como rotatorios y vibratorios entre otros; para realizar huellas dactilares sin el uso de etiquetas o marcadores por lo que se considera una técnica no invasiva ni destructiva (Sperati et al., 2018). En los productos farmacéuticos de estado sólido, las bandas y desplazamientos Raman están asociados con el empaquetamiento molecular y los posibles cambios que pueda sufrir la estructura después de una reacción física o química (Peng et al., 2018, 2019).

Los espectros Raman fueron tomados en espectrómetro LabRam con láser de excitación HeNe 632 nm y 784 nm. Las muestras se exponen durante un tiempo de 50 segundos mientras se realiza la recolección de datos en el rango entre 100 y 2500 cm^{-1}.

2.4.5 Análisis termogravimétrico TGA y DSC

Los análisis termogravimétricos se realizaron en un equipo TA Instrument TGA550, en atmósfera de Nitrógeno, calentando a una rampa de 10°/min. Los análisis calorimetría diferencial de barrido DSC 250, en atmósfera de Nitrógeno, calentando con una rampa de 10°/min.

2.4.6 Fotoestabilidad

Se prepararon soluciones de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en metanol de 0.5 mg/mL. Se realizó la adición de una cantidad suficiente de solución de cada uno de los 3 compuestos de forma independiente, en celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico con agitación magnética, con 2 mL de MeOH para alcanzar una absorbancia cercana a 1.0 en 370 nm, que corresponde al máximo de irradiación de la lampara led utilizada. El seguimiento se realiza reportando los cambios en la absorbancia de las soluciones irradiadas en intervalos de 10 minutos hasta completar una hora. Para determinar si hay efeto térmico, soluciones iguales se dejan durante el mismo período de tiempo al abrigo de la luz.

2.4.7 Carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete

La evaluación de la modificación del carácter fotosensibilizador en la generación de oxígeno molecular singulete, se realiza por estudios de actinometría en estado estacionario, utilizando LED centrado en 370 nm. Se prepararon soluciones de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en metanol de 0.5 mg/mL, así como del difenilisobenzofurano (DPBF); este último, compuesto que reacciona eficientemente con el oxígeno excitado, es el apagador o quencher (Q) del $O_2[^1\Delta_g]$ y se prepara en benceno a una concentración 1.78 x 10^{-3}M.

A 2 mL de MeOH, en una celda de cuarzo, se adiciono solución de DPBF, hasta absorbancia cercana a 0.5 (411 nm). A esta solución se le hace seguimiento del cambio en la absorbancia, por irradiación directa, para evidenciar el autoconsumo y tener esta medida como punto de referencia.

En celdas de cuarzo con 2 mL de MeOH, se hacen adiciones de forma independiente de alícuotas de las soluciones de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, hasta absorbancia cercana a 0.5 en 370nm. A continuación, en cada celda se adiciona solución de DPBF hasta alcanzar una absorbancia cercana a 0.5 en 411nm, máximo de absorbancia del DPBF. La irradiación en celda se lleva a cabo utilizando un filtro U340, con el propósito de permitir que la radiación sea absorbida por el fotosensibilizador (TAT, TAT-Zn o TAT-Mn), manteniendo agitación constante.

El seguimiento se realiza reportando los cambios en la absorbancia del quencher a 411 nm en un intervalo de tiempo de 10 minutos. La pendiente del análisis cinético de pseudo primer orden, es proporcional a la formación de $O_2[^1\Delta_g]$ (Entradas et al., 2020). La comparación de las velocidades de degradación del DPBF en presencia de los fotosensibilizadores TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, permite conocer la eficiencia en la generación de $O_2[^1\Delta_g]$ (ecuación 6), tomando como referencia, al TAT como fotosensibilizador, a temperatura ambiente.

2.4.8 Determinación de rendimiento cuántico de fluorescencia

Se prepararon concentraciones alrededor de 0.1 M de cada compuesto y 0.1 M de sulfato de quinina en solución 0.5 M H_2SO_4 (actinómetro de referencia). De estas soluciones se

toman alícuotas para obtener en celda absorbancias alrededor de 0.1 a la longitud de onda de excitación (soluciones matcheadas). Es posible escoger esta longitud de onda en la intersección de los espectros. En la determinación del rendimiento cuántico de los diferentes compuestos y en diferentes solventes se empleó el actinómetro, con un rendimiento cuántico de 0.546. Se realiza corrección, con los valores de índice de refracción, según se indica en la ecuación (8), donde ϕ_f corresponde al rendimiento cuántico de fluorescencia, η a los índices de refracción, ***F*** el área bajo la señal de fluorescencia y **A** la absorbancia. **S** y **M**, corresponden a los valores para el sulfato de quinina y la muestra, respectivamente.

$$\phi_f^M = \frac{F^M \times A^S \times n_M^2}{F^S \times A^M \times n_S^2} \times \phi_F^S \qquad (8)$$

De forma regular, el valor de rendimiento cuántico de fluorescencia se obtiene de la relación de las pendientes (*m*) de los gráficos de la integral de fluorescencia vs la absorbancia, para lo cual se hace uso de la ecuación (9).

$$\phi_f^M = \frac{m^M \times n_M^2}{m^S \times n_S^2} \times \phi_F^S \qquad (9)$$

2.4.9 Potencial Z (ζ)

El potencial Z (ζ) nos permite evidenciar la atracción o repulsión electrostática entre las partículas, aspecto que afecta la estabilidad de las dispersiones que pueda formar un compuesto. El potencial Z es medido entre la superficie de las partículas y el líquido en las que se encuentran dispersas. En la tabla 2.3, se presentan los resultados del análisis para el TAT y los compuestos formados entre el TAT y los cloruros de Zn y Mn. Las muestras se prepararon suspendiendo cada compuesto al 1% en agua milli-Q y fueron leídas bajo el modelo de Smoluchowski, en Zetasizer Nano Series – Nano Z, Malvern, a 25°C, en celda de plástico. Los datos reportados son el valor promedio de tres mediciones.

2.5 Resultados y Análisis

2.5.1 Espectros de Absorción UV-VIS y coeficientes de extinción molar y especifico

Se realizó la medición del coeficiente de extinción molar del TAT (Figura 2-1). En el espectro se observa un máximo de absorción en 367.51 nm correspondiente a transiciones tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Transiciones permitidas que han sido corridas al rojo, debido a la deslocalización electrónica de los electrones π, sobre el sistema aromático. El coeficiente de extinción fue obtenido del análisis de regresión lineal del grafico de absorbancia vs concentración. En la figura 2-1 se observa un coeficiente de correlación R^2 cercano a 1, valor que informa de la buena relación entre las variables en el rango que se realizó la prueba (Parnis & Oldham, 2013). La pendiente corresponde al coeficiente de extinción molar. Se realiza la medición de los coeficientes de las tres muestras en MeOH y para el TAT, se compara con valor reportado previamente de $\varepsilon_{365\ nm}$ = 18 400 $M^{-1}*cm^{-1}$ (Fiori et al., 2003). El valor obtenido en el presente trabajo, para el TAT en MeOH, es de 18437 $M^{-1}*cm^{-1}$, muy cercano al publicado anteriormente, indica que las pruebas son reproducibles y garantizan la integridad del compuesto utilizado como ligando (Grisales, 2020; Payan, 2015).

Es este caso, se reportan en paralelo los cálculos para el coeficiente de absorción molar y específico para el TAT en la Figura 2-2; esto para poder establecer comparaciones con los coeficientes de absorción específicos obtenidos para los compuestos sintetizados.

Al no tener certeza del peso molecular del soluto en los nuevos compuestos, la concentración se debe expresar en g/L. El coeficiente de extinción se calculó con la longitud de onda a la máxima absorción del compuesto, siendo 366.81 para el compuesto con Zn y 363.71 para el compuesto con Mn como se muestra en las figuras 2-3 y 2-4. Al igual que en el caso del TAT, el coeficiente de correlación R^2 muestra en ambos casos un valor cercano a 1.0 el cual es indicador de la buena relación entre las variables en el rango de concentraciones en los que se realizó la prueba. La pendiente corresponde al coeficiente de extinción específico ($\boldsymbol{\varepsilon_s}$) y sus unidades son $L * g^{-1} cm^{-1}$ (Díaz et al., 2010).

Figura 2-1: Espectro de absorción y coeficiente de extinción molar de TAT en MeOH. Concentración en celda de $2.47x10^{-3}$ g/L ($9.76x10^{-6}$ M) hasta $2.14x10^{-2}$ g/L ($8.45x10^{-5}$ M).

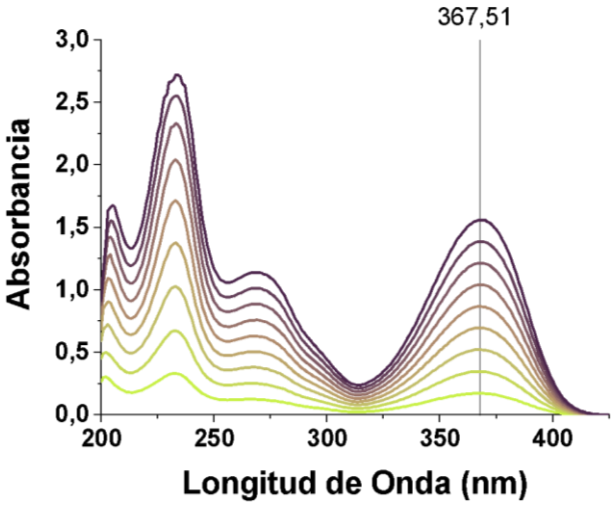
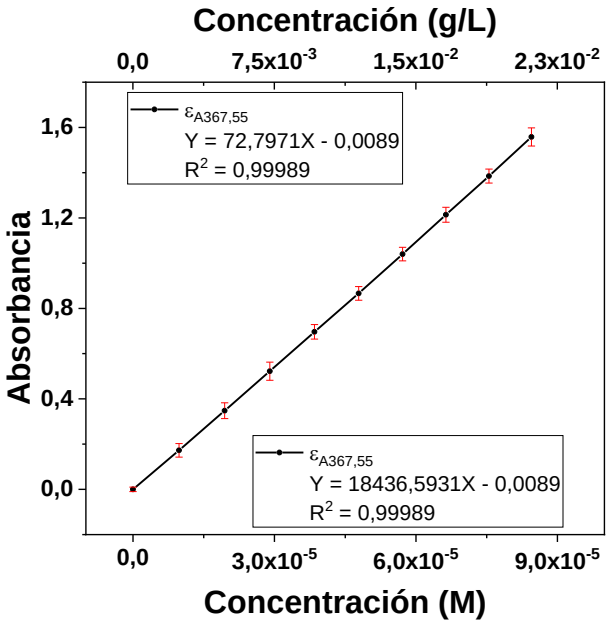


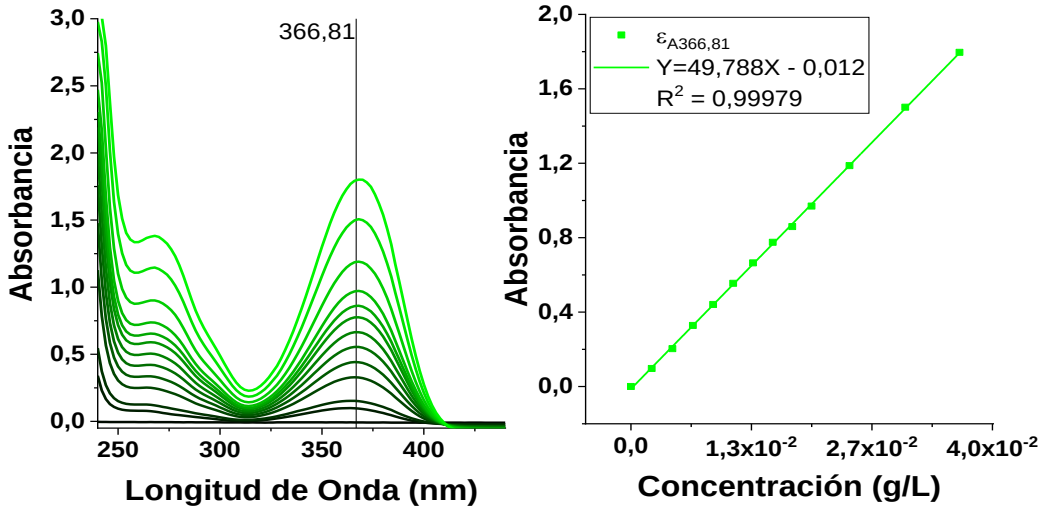
Figura 2-2: Coeficientes de extinción especifico y molar para el TAT en MeOH



La figura 2-5, muestra los espectros normalizados en MeOH. Aunque la formación de los precipitados amarillo tenue (TAT-Zn) y marrón (TAT-Mn) son indicadores de la formación de compuestos diferentes a los originales, los perfiles de los espectros de absorción son

similares en la región UVA, con diferencias más evidentes, en las regiones UVB y UVC. Se observa la reducción de los coeficientes de absortividad molar, para los compuestos sintetizados, con relación al TAT, en la región UVA, señalando que ha disminuido un poco la probabilidad de transición (Grisales, 2020; Payan, 2015). En la banda correspondiente al TAT-Mn se observa efecto hipsocrómico (hacia menores longitudes de onda). Es claro, según la figura 2-5 que la incorporación del Zn y Mn induce cambios en el espectro, que evidencian la transformación química. Para la comparación de las pendientes se utilizó el software *originpro 2018* © el cual utiliza el valor P, siendo este muy inferior a un intervalo de confianza de 0.05; por lo tanto, las pendientes son estadísticamente diferentes, y en consecuencia cada compuesto presenta una absortividad molar distinta.

Figura 2-3: Espectros de absorción y coeficiente de extinción específico TAT-Zn. Concentración en celda de $2.30x10^{-3}$ g/L hasta $3.63x10^{-2}$ g/L.



Se calculó adicionalmente el coeficiente de extinción molar para el TAT en agua y medio de cultivo RMPI 1640, datos necesarios para las pruebas de dilución en agua y para las pruebas cito y genotóxicas. Estos resultados se reportan al final, ANEXO, de este capítulo.

Figura 2-4: Espectro de absorción y coeficiente de extinción especifico de TAT-Mn. Concentración en celda, de 2.36x10^{-3} g/L hasta 2.68x10^{-2} g/L.

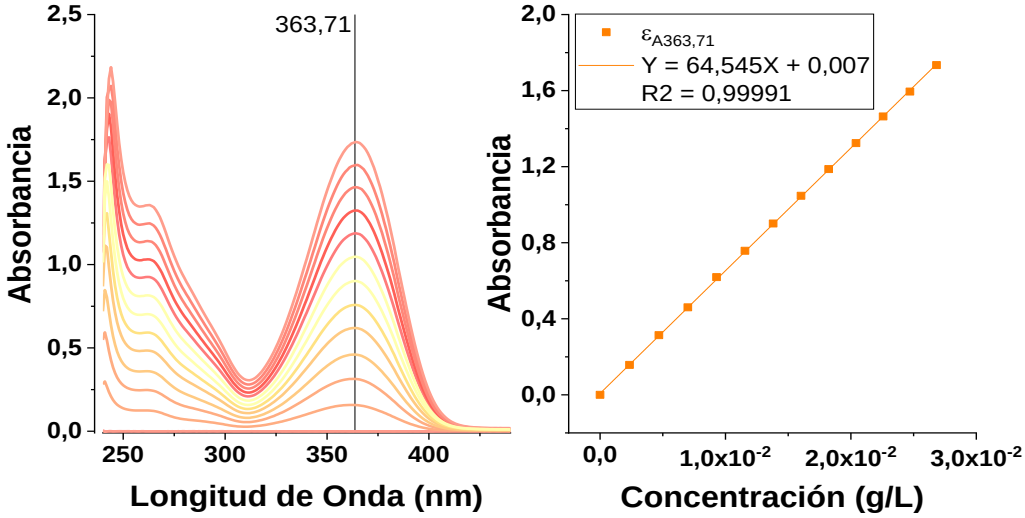
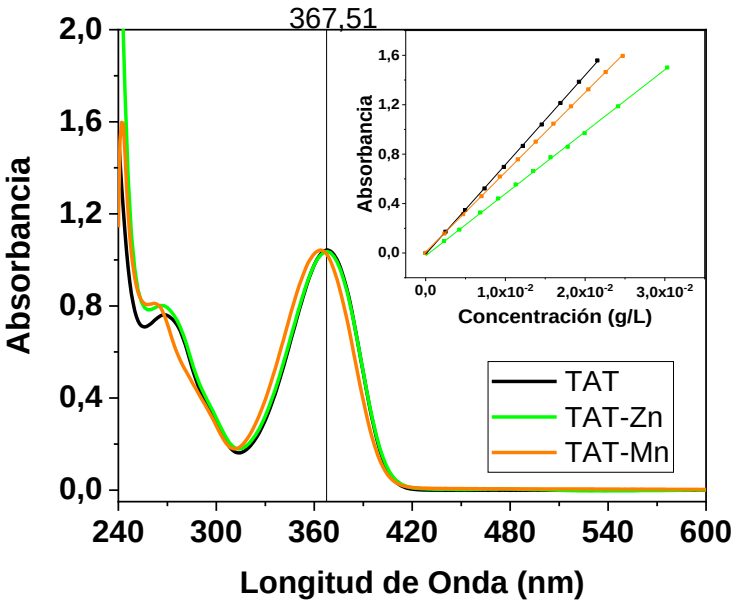


Figura 2-5: Comparación de espectros TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en MeOH.

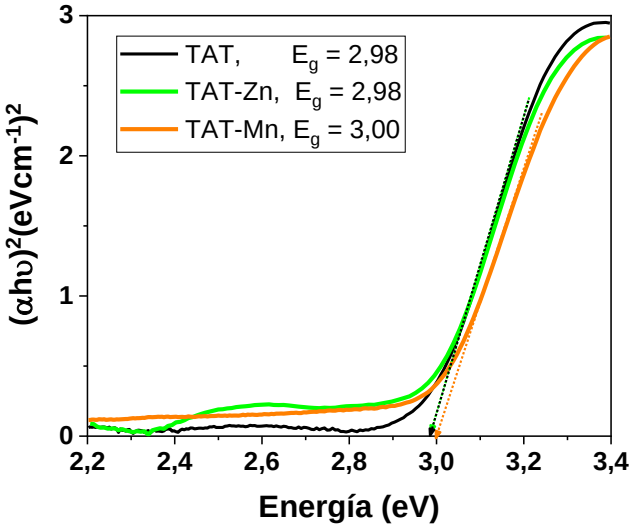


2.5.2 Energía Band gap

La posición de la energía *band gap* se calculó gráficamente con el método de Tauc para todas las soluciones. Tanto para el triamtereno como para las mezclas de triamtereno con los cloruros de Zn y Mn, los valores obtenidos para el band no presentan diferencias estadísticamente significativas, como se puede observar en la figura 2-6. La incorporación de los metales al ligando no altera el gap energético; el Zn y el Mn no proporcionan grandes cambios con respecto a la energía que se necesita para que los electrones salten de la zona de valencia a la zona de conducción. Para las gráficas se tomó el valor de n=1/2 el cual define el tipo de transición (Amin et al., 2021), siendo estas permitidas debido al alto valor en el coeficiente de extinción como se evidencio en los resultados inmediatamente anteriores.

Los valores de band gap encontrados, 2.98 eV para el TAT y TAT-Zn y 3.0 eV para el TAT-Mn, ubican a los tres compuestos como semiconductores de banda ancha (WBG por sus siglas en inglés). Las propiedades electrónicas de estos materiales se encuentran justo en la mitad de los aislantes y de los conductores puesto que el band gap es más grande que el de los semiconductores convencionales (E_g aprox. 1 eV). El band gap de un material WBG se establece en el rango de 2 a 4 eV (Yoshikawa et al., 2007).

Figura 2-6: Band gap para el TAT, TAT-Zn y TAT-Mn en el rango entre 300 nm y 440 nm de la curva de absorción, a través del Método de Tauc.



2.5.3 Espectroscopia infrarroja por método ATR.

Se presentan los espectros FT-IR del TAT, así como el de los respectivos compuestos generados con los cloruros de Zn y Mn. En la figura 2-7 se observa el espectro IR del TAT en el cual se aprecian sus bandas características. Las señales entre 3465 y 3282 cm^{-1} corresponden a estiramientos simétricos y asimétricos de los grupos amino primarios ($R\text{-}NH_2$) de la molécula (Dahl et al., 1989; Llopis et al., 1993; Mukne & Nagarsenker, 2004; Onoda et al., 2020); en la zona de los 3117 y 3003 cm^{-1} se encuentran los estiramientos del enlace C-H de los carbonos sp^2 de los ciclos del grupo fenilo; las señales entre 1675 cm^{-1} corresponde a estiramientos de los dobles enlaces de los núcleos bencénicos, señales que también aparecen entre 1612 y 1354 cm^{-1}, junto con las señales correspondientes a ν(C-C) y las ν(C-N) y todas los estiramientos y contracciones entre enlaces de los anillos. La señal de 1100 cm^{-1} y por debajo de ella corresponden a estiramientos del grupo aromático fenilo actuando como un sustituyente de la pteridina (Mukne & Nagarsenker, 2004; Onoda et al., 2020; Silverstein et al., 2005).

Figura 2-7: Espectro FT-IR del TAT

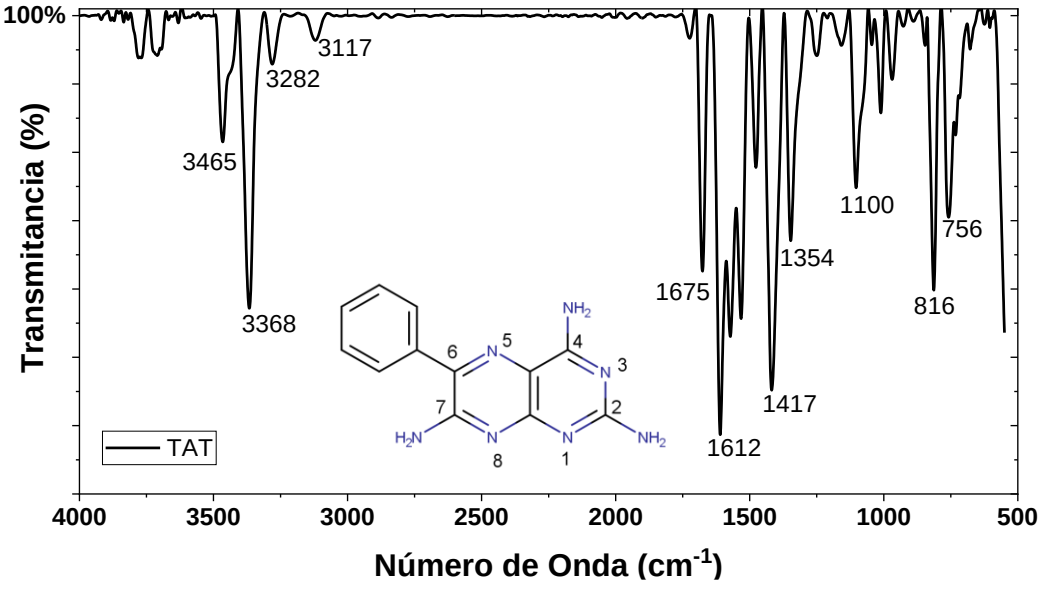
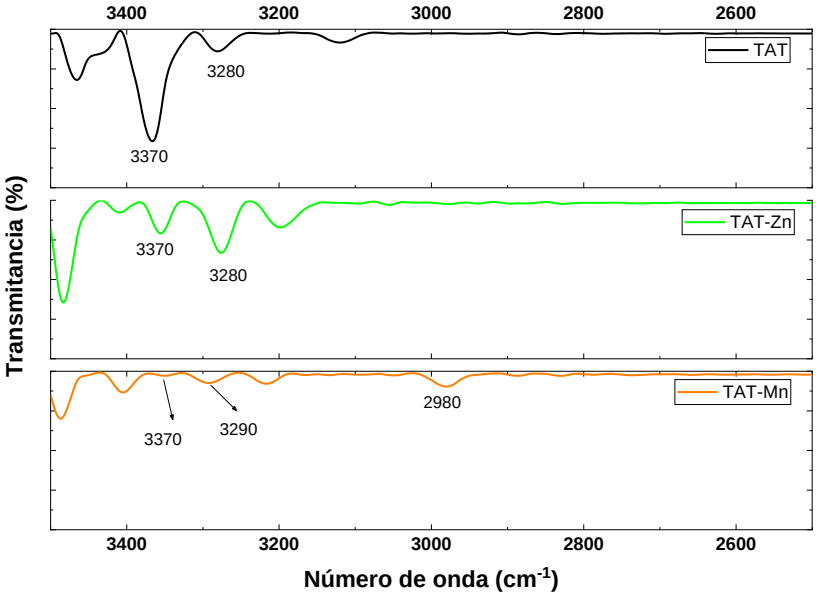


Figura 2-8: Comparación de espectros FT-IR para el TAT puro y los nuevos compuestos con Mn y Zn en el rango 3500 cm^{-1} y 2500 cm^{-1}

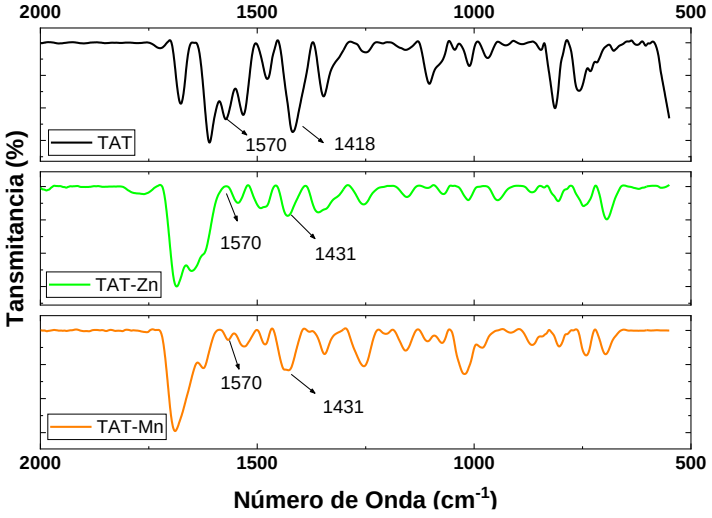


En la siguiente imagen (Figura 2-8) se comparan los 3 espectros FT-IR correspondientes al precursor orgánico TAT y los nuevos compuestos formados TAT-Zn y TAT-Mn. La región comprendida entre los 3500 cm^{-1} y 3100 cm^{-1} corresponde a vibraciones internas de la molécula de triamtereno (Dahl et al., 1989). Se observa la perdida de la intensidad de la señal de 3370 cm^{-1} a la vez que en el TAT-Zn se intensifica la señal de 3280 cm^{-1}. Esto es un indicio de que los grupos amino están interactuando con los metales estableciendo un enlace coordinado.

En la figura 2-9, se señalan dos de las bandas más representativas para este estudio, puesto que indican interacción del metal con los nitrógenos de los anillos heterocíclicos de la pteridina. La banda en 1570 cm^{-1} corresponde concretamente a ν(C=N) de los anillos de la pteridina la cual se pierde en los compuestos con Zn y Mn seguramente por una interacción entre los N5 y N8 con los iones metálicos (El-Tabl et al., 2002; Jiménez Pulido et al., 2009). Además, los desplazamientos de las ν(C=C) y ν(C-N) que aparecían en los valores alrededor de 1418 cm^{-1}, aparecen ahora desplazadas hacia la derecha lo cual se puede originar por la interacción de N5 con el metal (Acuña Cueva et al., 2003; el Azzouzi et al., 2017). Los enlaces con halógenos aparecen en rangos inferiores a los 400 cm^{-1} por

lo que no se pueden visibilizar en este estudio (Acuña Cueva et al., 2003; El-Tabl et al., 2002; Payan, 2015).

Figura 2-9: Comparación de espectros FT-IR para el TAT puro y los nuevos compuestos con Mn y Zn en el rango 2000 cm^{-1} a 500 cm^{-1}



2.5.4 Raman

En la figura 2-10, se muestra el espectro Raman para el TAT y se señalan las bandas más prominentes. Este patrón de bandas coincide con otros espectros previamente reportados en la literatura y en bases de datos como (Peng et al., 2019; Sperati et al., 2018; Wiley, 2021). Dentro de las señales más características para el TAT se tiene que las vibraciones alrededor de 1607 cm^{-1} pueden ser asignados a los estiramientos C=N dentro del anillo de pteridina. La banda más intensa alrededor de 1360 cm^{-1} está asociada con estiramientos C-N en el anillo de pteridina. A estas bandas se les suman los movimientos de balanceo (rocking) de los enlaces N-H y C-H, que aparecen entre 1400 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} e incluso el balanceo (wagging) de los grupos amino ($-NH_2$). Adicional a esto las señales cercanas a 1200, 1000 y 700 cm^{-1} podrían corresponder a balanceo tipo rocking de C-H y $-NH_2$, deformación de los anillos y flexiones fuera del plano del grupo $-NH_2$ respectivamente. Estos datos se obtuvieron según otros investigadores como (Peng et al., 2018) que analizaron las señales Raman para el triamtereno en presencia de ácido nicotínico y (Castillo et al., 2016) quienes obtuvieron las señales Raman para el ácido pterin-6-carboxilico, un análogo estructural del triamtereno.

Figura 2-10: Espectro Raman para el TAT

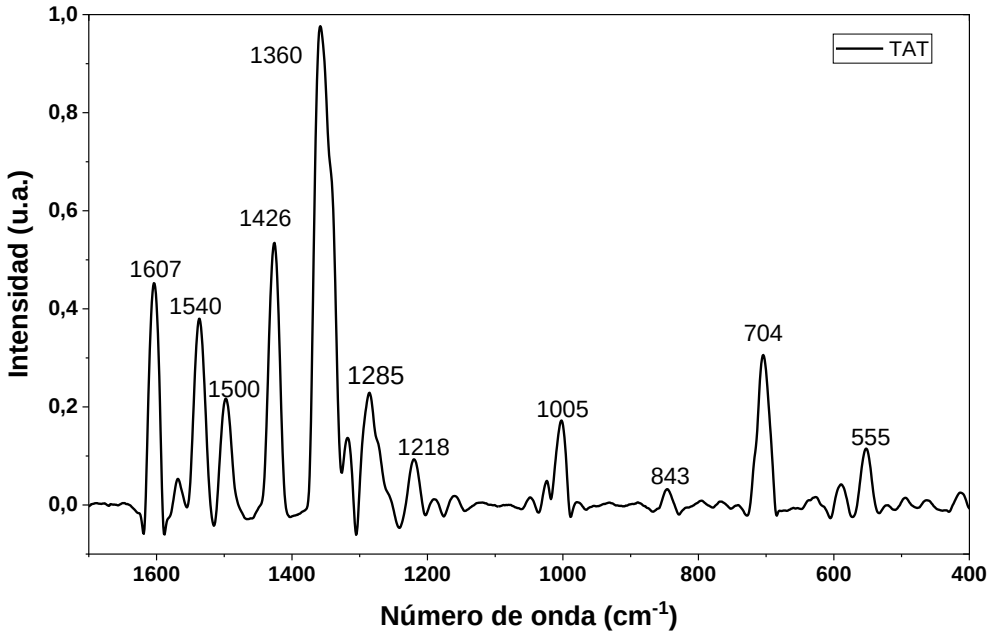
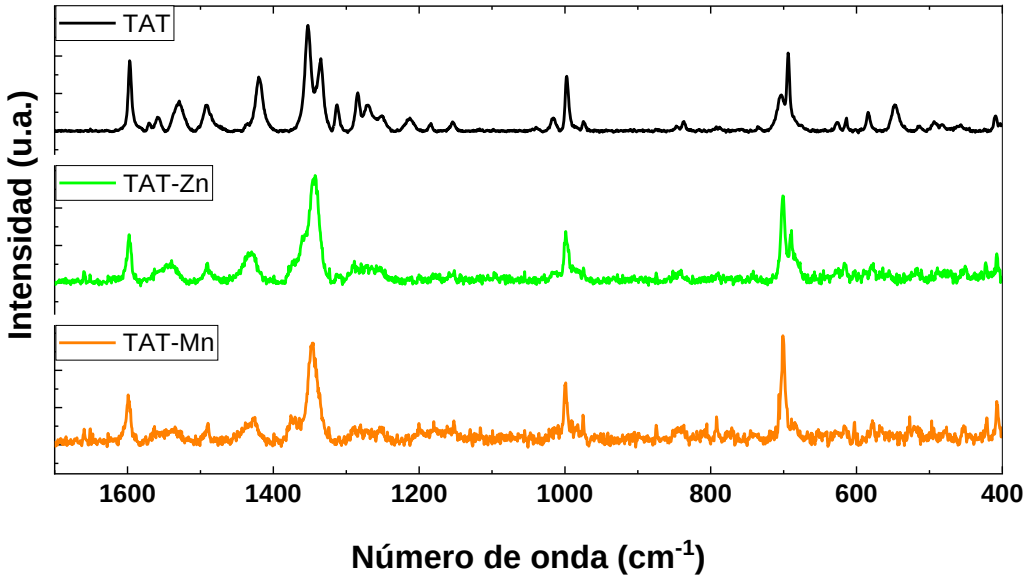


Figura 2-11: Raman para los compuestos TAT, TAT-Zn y TAT-Mn



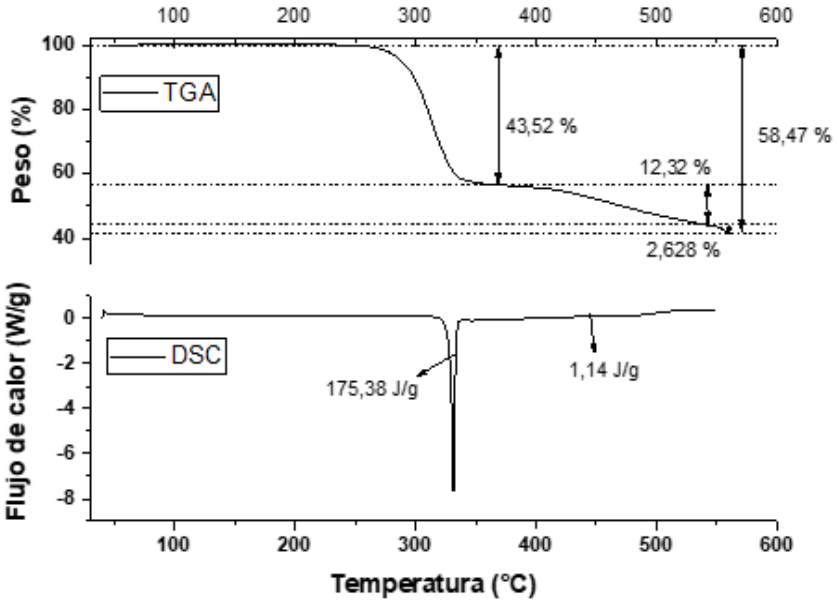
Para los compuestos TAT-Zn y TAT-Mn las señales entre 1650 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} pierden bastante intensidad como se ve en la figura 2-11. Estas señales están relacionadas con los modos vibracionales C=N (Peng et al., 2019), y al ser los focos de posibles lugares de unión del TAT con el metal, es de esperar que se pierda la intensidad debido a una pérdida de fuerza de los enlaces sumado a cambios vibracionales de los estiramientos C=N y C-

N. Estos son el eje principal del anillo de pteridina (Peng et al., 2018). Estos resultados van de la mano con lo anteriormente expresado en el análisis de espectros FT-IR.

2.5.5 Análisis de TGA y DSC

La figura 2-12 muestra en la parte superior el termograma o curva de descomposición térmica del TAT y en la parte de abajo aparece el DSC de la misma muestra. Para temperaturas inferiores a 300°C corresponden pérdidas de componentes de bajo peso molecular como aditivos, aguas de cristalización y solventes, en donde vemos que el TAT se mantiene estable, es un compuesto puro (forma aguda del DSC) con un solo evento endotérmico importante correspondiente al punto de fusión del TAT entre los 300°C y 360°C. Esto acorde con el punto de fusión reportado en los antecedentes (Bawa, 2007; Kapoor, 1994) de 316°C aproximadamente. En este punto se presenta la mayor velocidad de degradación térmica, puesto que el análisis se corrió en una atmosfera inerte. El porcentaje total de materia perdido fue del 43.52%. Se observa que antes del punto de fusión no existen perdidas significantes y además, el termograma muestra que el compuesto no está hidratado o solvatado.

Figura 2-12: TGA-DSC de TAT



En la figura 2-13, el termograma del TAT-Zn muestra marcadas diferencias con el TAT. En los primeros 200°C hay evaporación de agua y de material volátil como solvente. A partir

de este punto comienza la perdida de aguas de cristalización y demás componentes de bajo peso molecular, así como la liberación de $HCl_{(g)}$ a los 250°C por la presencia de cloro e hidrogeno en el compuesto. A la par ocurre la degradación de la muestra en un proceso lento hasta llegar a 630°C aproximadamente. Sin embargo, el termograma mostrado, no llega hasta el punto en el que se observe una masa constante y en consecuencia, debe complementarse para evidenciar el material que queda como cenizas y metal. El porcentaje de pérdida de la masa total ingresada fue de 30.70%, hasta la temperatura observada.

Por último, la figura 2-14 muestra el termograma y DSC del TAT-Mn. Este compuesto presenta buena cristalización según la forma de los picos del DSC y al igual que el caso anterior, se presentan perdidas de agua y de solvente en los primeros 200°C. A los 260°C se presenta usualmente la volatilización de $HCl_{(g)}$ por la presencia de cloro e hidrogeno en el compuesto; a partir de aquí, se degrada el compuesto paulatinamente hasta quedar únicamente metal y cenizas. En el proceso se pierde el 57.11 % de la muestra.

Figura 2-13: TGA-DSC de TAT-Zn

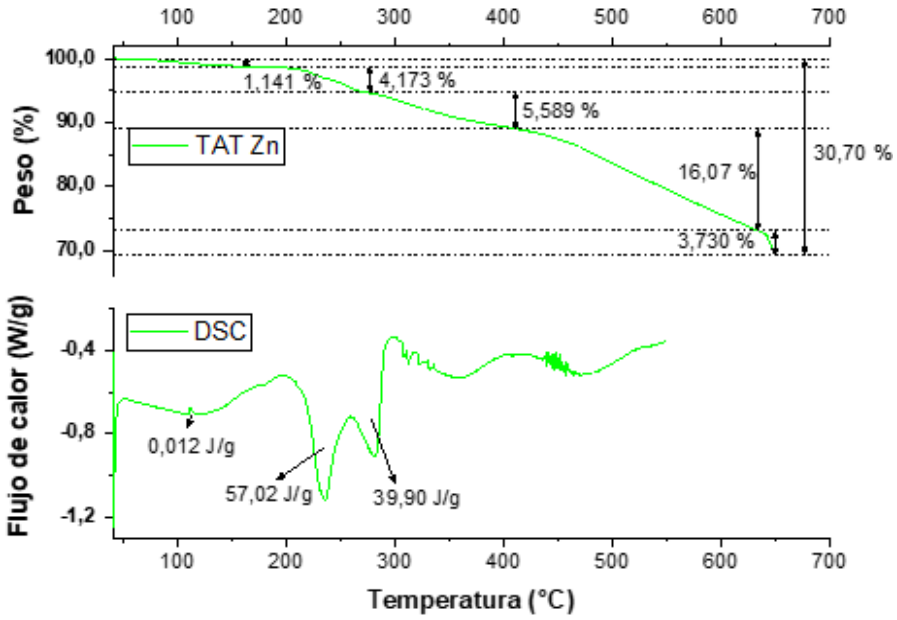
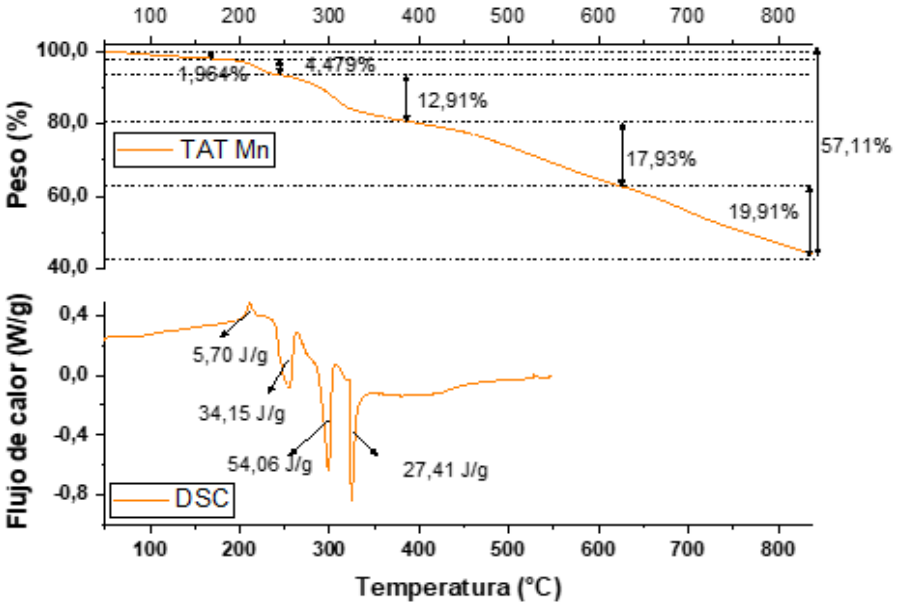


Figura 2-14: TGA-DSC de TAT-Mn



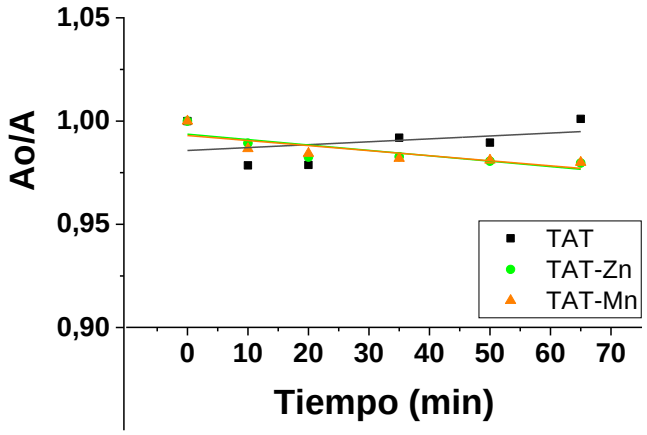
Acorde a resultados anteriores de dilución en agua, la inclusión del metal, en teoría, podría romper o debilitar los enlaces de hidrogeno intramoleculares del TAT responsables del alto punto de fusión (Netzer et al., 1995), hace que este pierda algunos de sus enlaces de hidrogeno disminuyendo esta temperatura. Hay una evidente perdida de estabilidad de los nuevos materiales generada por la inclusión del Zn y Mn en la estructura y según los resultados obtenidos, al no evidenciar aparición de isoterma, se prevé la formación de carbonitruros, compuestos insolubles de elevado punto de fusión. A los 650°C tanto de TAT-Zn como de TAT-Mn se ha perdido menos del 40% de la masa, mientras que el TAT puro ha perdido el 58.5% de su masa. El análisis TGA de los compuestos hasta 900°C demostró que los compuestos siguen perdiendo masa dando un indicio de la formación de carbonitruros o nitratos de carbono grafitico. Se pretende realizar nuevos análisis de cenizas sobrantes del material calcinado como una proyección de la investigación.

2.5.6 Análisis de fotoestabilidad

El análisis de fotoestabilidad indica que los 3 compuestos son estables tras la irradiación directa durante más de 1 hora con LED370E (Figura 2-15). En el ANEXO 2, se incluye la información referente a la irradiación absorbida por las muestras, lo cual fue realizado en

el Instituto de Física de la Universidad Nacional de Rosario, Rosario-Argentina. La fuente utilizada, centrada en 370 nm, se tomó en considerando la región que corresponde a la máxima longitud de onda en donde absorben los compuestos en la región UVA. Durante el tiempo del análisis, se observó degradación de los dos nuevos compuestos del 2,16%. Se podría decir entonces que los compuestos son estables fotoquímicamente bajo las condiciones de trabajo evaluadas.

Figura 2-15: Degradación en el tiempo del TAT, TAT-Zn y TAT-Mn después de exponer muestras a radiación con LED 370 nm.



Según análisis estadístico del software Originpro 2018©, se calculó el valor P con un intervalo de confianza de 0.05, obteniendo un valor superior a 0.08 por lo que se concluye que las pendientes no son estadísticamente diferentes; por lo tanto, no se evidencia que la adición de Zn y Mn este afectando la fotoestabilidad del TAT.

2.5.7 Generación de oxígeno molecular singulete $O_2[\,^1\Delta_g]$

Se evaluó la estabilidad en el tiempo de las soluciones con TAT, los nuevos compuestos y DPBF, de forma individual, en condiciones sin irradiación (efecto térmico) y luego de ser irradiadas, en las mismas condiciones en las que se realiza el seguimiento al consumo de DPBF, como apagador de oxígeno molecular singulete, en presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, respectivamente.

Figura 2-16: Cinética de pseudo primer orden para la degradación de DPBF en metanol, en presencia de TAT.

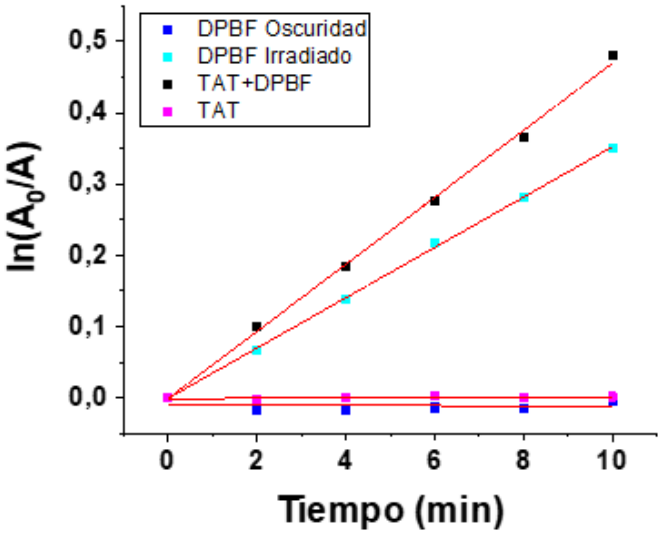
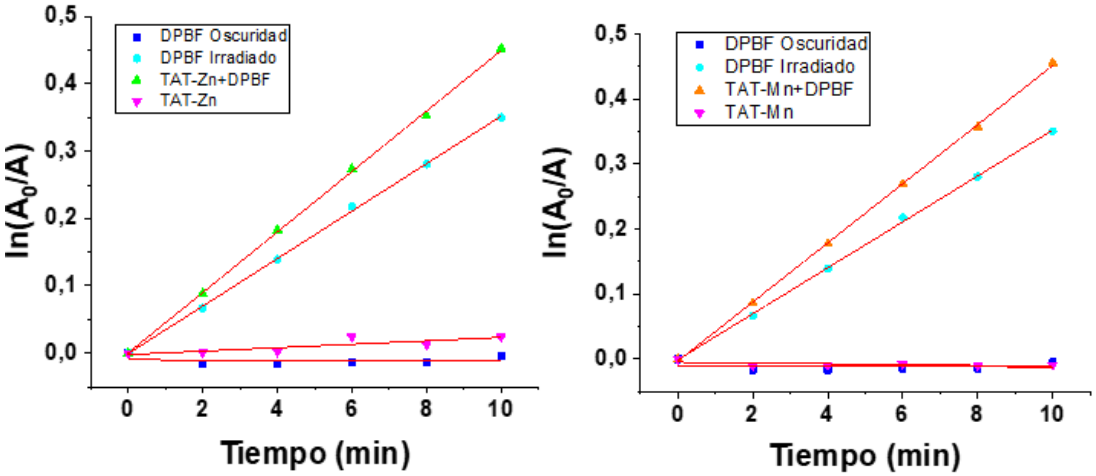


Figura 2-17: Cinéticas de pseudo primer orden parala degradación de DPBF en metanol, en presencia de TAT-Zn (izquierda) y TAT-Mn (derecha), respectivamente



Para evaluar la variación en la generación del $O_2[^1\Delta_g]$, de los compuestos nuevos, con relación al TAT, en metanol, se procede al cálculo de las pendientes en los análisis de regresión lineal, que corresponde a la constante de pseudo primer orden para el consumo de DPBF como apagador del oxígeno excitado, tomando como medida de cambio, la absorbancia a 411 nm, por ser proporcional a la concentración del DPBF. Se observa que el DPBF, presenta autoconsumo. Debido a esto, debe restarse de las pendientes de los

gráficos en los que se evalúa la cinética de pseudo primer orden del consumo del DPBF, al graficar ln(Ao/A) vs tiempo(min), al considerar que las constantes son aditivas y de esta forma se puede estimar cual es la fracción del aporte en comparación con el TAT. Los resultados obtenidos utilizando filtro U340, se encuentran resumidos en las figuras 2-16 y 2-17. Se aprecia en cada una de las tres figuras anteriores, que bajo las mismas condiciones y en presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, aumenta la degradación del DPBF, respecto al DPBF solo, siendo esto un indicador de se están generando oxigeno molecular singulete, al incrementarse el consumo del quencher.

A continuación, se incluye en la figura 2-18, el análisis cinético para la constante de consumo del DPBF, en presencia de los tres compuestos y del DPBF solo, donde se observa que, si tomamos como referencia el rendimiento cuántico del TAT en etanol (Grisales, 2020), los rendimientos cuánticos calculados con base en la ecuación 6, serían para el TAT-Zn y TAT-Mn, de 0,12 y 0,11. En la tabla 2-2, se presentan los resultados obtenidos para el análisis de regresión lineal.

Figura 2-18: Cinética de pseudo primer orden en la degradación de DPBF en metanol, solo y en presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, respectivamente. Medidas de absorción a 411 nm.

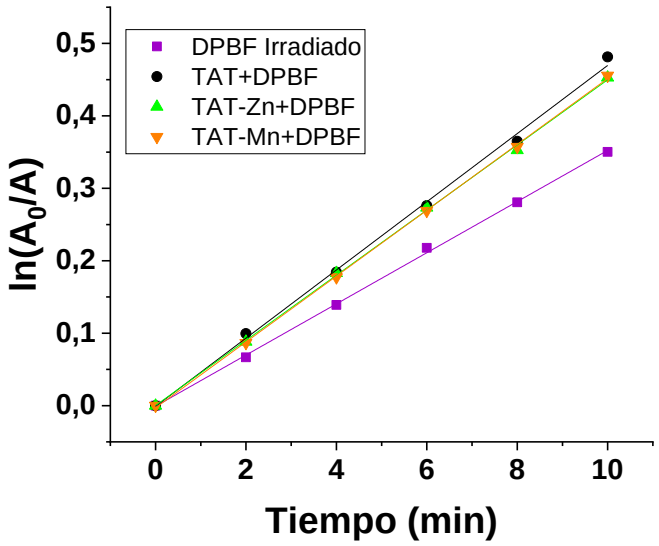


Tabla 2-2: Análisis de regresión lineal para las cinéticas de pseudo primer orden en el consumo del DPBF, solo y en presencia de presencia de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn.

Compuesto	Pendiente	R^2
TAT-DPBF	0.04707 ± 0.0011 x 10^{-4}	0.99788
TAT-Zn-DPBF	0,04497 ± 5.54 x 10^{-4}	0.99939
TAT-Mn-DPBF	0,04545 ± 3.86 x 10^{-4}	0.99971
DPBF	0.03531 ± 4,78 x 10^{-4}	0.99927

Derivado de la comparación de las pendientes de las cinéticas de TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, todas ellas en presencia de DPBF, no se observan bajo criterio del valor P (0,15), diferencias estadísticamente significativas. Por lo anterior, si bien, visualmente presentan diferencias, estas estarían dentro del error de método.

2.5.8 Rendimiento cuántico de fluorescencia

En la tabla 2-3 se reportan los rendimientos cuánticos obtenidos. Las diferencias observadas son consecuencia de los cambios en las propiedades microscópicas y macroscópicas del solvente que incluyen su polaridad, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares, capacidad electrón dadora (acidez α y basicidad β). Solo en solventes como acetona, acetato de etilo y cloroformo, se observa una disminución importante en el rendimiento cuántico de fluorescencia para los compuestos que han incorporado los metales Zn y Mn. Con parámetros como dipolaridad π*, no es posible observar una tendencia en esta variación y en consecuencia, debe realizarse una análisis multiparamétrico, que permita estimar las tendencias combinadas de varios aspectos asociados a la polaridad del solvente. En el resto de los solventes analizados, se observan cambios menores.

Tabla 2-3: Rendimientos cuánticos obtenidos, para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn.

Solvente	ϕ_f^{TAT}	ϕ_f^{TAT-Zn}	ϕ_f^{TAT-Mn}
Agua	0,61	0,62	0,57
HEPES	0,74	0,70	0,57

Etanol	0,51	0,58	0,53
Metanol	0,52	0,55	0,53
Tolueno	0,02	0,01	0,00
Éter Etílico	0,05	0,01	0,00
Acetona	0,60	0,29	0,15
Acetato de etilo	0,51	0,16	0,02
Aceto nitrilo	0,59	0,49	0,41
DMF	0,65	0,40	0,60
Cloroformo	0,77	0,04	0,02
DMSO	0,56	0,66	0,64

Estos análisis fueron obtenidos con el apoyo del profesor Olimpo García Beltrán, de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Ibagué.

Análisis previos realizados por el grupo de investigación *GIAFOT* de la Universidad Nacional de Colombia – Medellín (datos pendientes por publicar) muestran rendimientos cuánticos de fluorescencia para el TAT cercanos al 90% en medios polares, por lo que es preciso realizar análisis complementarios de las medidas comparando las pendientes de las gráficas resultantes y disminuir errores del método.

2.5.9 Medidas de potencial Z

Tabla 2-4: Medidas de potencial Z para TAT, TAT-Zn y TAT-Mn

Muestra	Potencial Z (mV)	Desviación estándar	Conductividad (mS/cm)	Desviación estándar
TAT	-22.7	1.95	0.0124	0.0021
TAT-Zn	47.0	1.85	0.0944	0.0026
TAT-Mn	24.8	0.503	0.0309	0.0001

En todos los casos, se observó la superficie de las partículas cargadas. Sin embargo, llama la atención que la carga del TAT negativa, es opuesta a la carga observada para los compuestos sintetizados con Zn y Mn. La magnitud de los valores obtenidos para los

compuestos con Zn y Mn, señalan que ambos pueden formar dispersiones estables y ligeramente estables, respectivamente, así como el TAT también puede formar dispersiones levemente estables. En todos los casos observados, estas partículas cargadas, se repelen y en consecuencia no tienen una tendencia natural a estados agregados. El valor negativo observado para el TAT, podría deberse a los electrones libres de los nitrógenos asociados al heterociclo. El cambio de carga, en los compuestos formados, señala la incorporación de los metales en la estructura.

2.6 Conclusiones

Los espectros de absorción mostrados por TAT-Zn y TAT-Mn son levemente distintos al de su precursor TAT, el efecto hipsocrómico se debe al efecto de unión de los metales con la molécula orgánica sin alterar su conjugación. Tanto el cambio en el perfil de los espectros, como las diferencias observadas de coloración y en los valores obtenidos de coeficientes de extinción, indican que se integraron efectivamente los metales a la estructura del TAT.

El TAT es una molécula que presenta enlaces intramoleculares de hidrogeno entre los nitrógenos de los grupos amino y los nitrógenos del anillo de pteridina. Esto le confiere poca solubilidad en agua y un alto punto de fusión. Al incluir al Zn y Mn, se alteran estos enlaces de hidrogeno, dejando electrones disponibles del nitrógeno para interactuar con las moléculas del medio circundante alterando también su estabilidad térmica.

Los cambios observados en las señales de los análisis FT-IR y Raman, dependen de las modificaciones de los grupos funcionales, porque al involucrarse los átomos en nuevos enlaces, cambian las frecuencias de las vibraciones. Al incorporar un nuevo elemento en el TAT, algunas de estas señales disminuyen notoriamente, sobre todo las involucradas con los nitrógenos N5 y las señales de los grupos $-NH_2$. Esto quiere decir, que son estos los átomos posiblemente enlazados al Zn y al Mn, en la molécula del TAT, demostrando así que los metales se han incorporado con éxito en la molécula y se ha formado un nuevo compuesto. En el caso específico del Raman, se aprecia una clara disminución en la zona de 1600 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} del TAT, la cual corresponde a estiramientos de los enlaces doble y sencillo entre carbono y nitrógeno del heterociclo; así como también se observa la aparición de nuevas señales (nuevos enlaces) en los 1370 cm^{-1} y 700 cm^{-1}

correspondientes a C-N del heterociclo y deformación del anillo de pteridina respectivamente.

Tanto el TAT, como los compuestos formados con los cloruros de Zn y Mn, son estables bajo radiación UVA y no se observan diferencias estadísticamente significativas en la evolución de sus espectros de absorción UV-VIS, durante el tiempo del análisis. En referencia a los análisis de TGA, señalan que el TAT tiene una mayor estabilidad térmica (300°C) en comparación con TAT-Zn y TAT-Mn (200°C).

El carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete, es del mismo orden para los tres compuestos. No se observan diferencias estadísticamente significativas en las cinéticas de pseudo primer orden para el consumo del DPBF como apagador del oxígeno excitado, en presencia de TAT y sus derivados.

Tanto el TAT como sus derivados, presentan cargas negativa y positiva, respectivamente, pero su magnitud da cuenta de que pueden formar dispersiones estables y no tienden a formar agregados.

De forma general, se observan pequeños cambios en la fluorescencia entre el TAT y los compuestos sintetizados con Zn y Mn con lo cual se proyectan futuras aplicaciones de los compuestos como marcadores fluorescentes en los solventes utilizados.

2.7 Referencias

Acuña Cueva, E. R., Faure, R., Illán Cabeza, N. A., Jiménez Pulido, S. B., Moreno Carretero, M. N., & Quirós Olozábal, M. (2003). Synthesis and characterization of several lumazine derivative complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Pd(II) and Pt(II). X-ray structures of a mononuclear copper complex and a dinuclear cadmium complex. *Inorganica Chimica Acta*, *351*(1), 356–362. https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00172-5

Amin, P. O., Muhammadsharif, F. F., Raza Saeed, S., Ketuly, K., & Sulaiman, K. (2021). The Effect of Donor- pi -Acceptor Unit on the Optoelectronic Parameters of Poly (Triamterene-co-Terephthalate): Betalain Dye Composite System. March. https://www.researchgate.net/publication/350342735_The_Effect_of_Donor-pi-

Acceptor_Unit_on_the_Optoelectronic_Parameters_of_PolyTriamterene-co-TerephthalateBetalain_Dye_Composite_System

Bawa, Y. (2007). Solvent inclusion properties of Triamterene crystal forms and solubility differences between Roxithromycin polymorphic forms. In *Thesis* (Issue April). http://repository.nwu.ac.za/handle/10394/1469

Castillo, J., Rozo, C., Bertel, L., Rindzevicius, T., Mendez, S., Martinez, F., & Boisen, A. (2016). Orientation of Pterin-6-Carboxylic Acid on Gold Capped Silicon Nanopillars Platforms: Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Studies. *J. Braz. Chem. Soc.*, *27*(5), 971–977. https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150352

Dahl, O., Ziedrich, K. H., Marek, G. J., & Paradies, H. H. (1989). Physicochemical and structural studies of triamterene. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *78*(7), 598–606. https://doi.org/10.1002/jps.2600780719

Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Meléndez-Valdés, F. T., & Fiñana, I. T. (2010). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas* (pp. 1–8). https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm

el Azzouzi, N., el Fadli, Z., & Metni, M. R. (2017). Synthesis and chemical characterization of some transition metal complexes with a 6-acetyl-1,3,7-trimetyllumazine ligand. *Journal of Materials and Environmental Science*, *8*(12), 4323–4328. https://doi.org/10.26872/jmes.2017.8.12.455

El-Tabl, H. M., El-Saied, F. A., & Ayad, M. I. (2002). Manganese(II), iron(III), cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II), and uranyl(VI) complexes of n-(4-formylantipyrine)benzothiazol-2-ylacetohydrazide. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, *32*(7), 1245–1262. https://doi.org/10.1081/SIM-120014301

Entradas, T., Waldron, S., & Volk, M. (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and*

Photobiology B: Biology, *204*, 111787. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787

Fiori, J., Ballardini, R., Andrisano, V., & Cavrini, V. (2003). Photostability studies on the furosemide-triamterene drug association. *Farmaco*, *58*(9), 867–873. https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00098-3

Grisales, D. (2020). Determinación del carácter fotosensibilizador del oxígeno molecular singulete en el desarrollo de fototoxicidad asociada al uso de Triamtereno y de su combinación con la Hidroclorotiazida.

Jensen, A. W. (1999). Drugs: Photochemistry and Photostability Edited by A. Albini and E. Fasani (Dell' Universita Di Pavia). *Journal of the American Chemical Society*, *121*(37), 8678–8678. https://doi.org/10.1021/ja9857559

Jiménez Pulido, S. B., Linares Ordóñez, F. M., Martínez Martos, J. M., Moreno Carretero, M. N., Quirós Olozábal, M., & Ramírez Expósito, M. J. (2008). Metal complexes with the ligand derived from 6-acetyl-1,3,7-trimethyllumazine and benzohydrazide. Molecular structures of two new Co(II) and Rh(III) complexes and analysis of in vitro antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *102*(8), 1677–1683. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.04.004

Jiménez Pulido, S. B., Linares Ordóñez, F. M., & Moreno Carretero, M. N. (2009). Novel coordination behavior of a pteridine-benzoylhydrazone ligand (BZLMH): Theoretical calculations, XRD structures and luminescence studies. *Polyhedron*, *28*(13), 2641–2648. https://doi.org/10.1016/j.poly.2009.05.061

Kapoor, V. K. (1994). Triamterene. In H. G. B. T.-A. P. of D. S. and E. Brittain (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* (Vol. 23, pp. 571–605). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60613-9

León, I. E., Cadavid-Vargas, J. F., di Virgilio, A. L., & Etcheverry, S. (2016). Vanadium, ruthenium and copper compounds: A new class of non-platinum Metallodrugs with anticancer activity. *Current Medicinal Chemistry*, *23*(30). https://doi.org/10.2174/0929867323666160824162546

Llopis, M. J., Alzuet, G., Martin, A., Borrás, J., García-Granda, S., & Díaz, R. (1993). Halocuprates(II) of triamterinium, a diprotonated pteridine derivative. Crystal structure of (triamterinium)CuCl4. Electronic and EPR characterization of (triamterinium)CuX4 (X = Cl, Br). *Polyhedron*, *12*(20), 2499–2506. https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)83075-2

Makuła, P., Pacia, M., & Macyk, W. (2018). How To Correctly Determine the Band Gap Energy of Modified Semiconductor Photocatalysts Based on UV-VIS Spectra. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *9*(23), 6814–6817. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b02892

Mukne, A. P., & Nagarsenker, M. (2004). Triamterene-β-cyclodextrin systems: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*, *5*(1), 142–150. https://doi.org/10.1208/pt050119

Netzer, T., Ullrich, F., Knauf, H., & Mutschler, E. (1995). Potassium-Retaining Diuretics: Triamterene. In R. F. Greger, H. Knauf, & E. Mutschler (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology* (1st ed., pp. 396–421). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79565-7

Onoda, H., Inoue, Y., Ezawa, T., Murata, I., Chantadee, T., Limmatvapirat, S., Oguchi, T., & Kanamoto, I. (2020). Preparation and characterization of triamterene complex with ascorbic acid derivatives. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *46*(12), 2032–2040. https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1842439

Parnis, J. M., & Oldham, K. B. (2013). Beyond the beer-lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *267*, 6–10. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.006

Payan, A. (2015). Síntesis y caracterización estructural de un compuesto de coordinación con el ligando 6-metoxiquinolina y evaluación del carácter fotosensibilizador de oxígeno molecular singulete.

Peng, B., Wang, J.-R., & Mei, X. (2018). Triamterene–furosemide salt: structural aspects and physicochemical evaluation. *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, *74*(6), 738–741. https://doi.org/10.1107/S2052520618013185

Peng, B., Zhang, Z., Wang, J. R., Li, M., Zhang, Q., & Mei, X. (2019). Confocal Raman micro-spectral evidence and physicochemical evaluation of triamterene salts. *Analyst*, *144*(2), 530–535. https://doi.org/10.1039/c8an01579a

Quintero, B., & Miranda, M. A. (2000). Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey. *Ars Pharmaceutica*, *41*(1), 27–46.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (Seventh ed). John Wiley & sons, INC.

Sperati, C. J., Zhang, C., Delsante, M., Gupta, R., Bagnasco, S., & Barman, I. (2018). Raman Spectroscopy for the Diagnosis of Intratubular Triamterene Crystallization. *Kidney International Reports*, *3*(4), 997–1003. https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.03.010

Travizano, M., Romano, S., & Kamienkowski, J. (2002). Determinación de la banda prohibida (band gap) en Si. *Mathematica*, *2*. http://users.df.uba.ar/sgil/labo5_uba/inform/info/pautadas/band_gap_siI_2k2a.pdf

Vargas, F., Fuentes, A., Sequera, J., Méndez, H., Fraile, G., Velásquez, M., & Medina, R. (1998). In vitro approach to investigating the phototoxicity of the diuretic drug triamterene. *Toxicology in Vitro*, *12*(6), 661–667. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(98)00057-5

Vargas, F., Volkmar, I. M., Sequera, J., Mendez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velasquez, M., & Medina, R. (1998). Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *42*(3), 219–225. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00074-8

Wiley, J. & S. (2021). *Triamterene - Raman - Spectrum - SpectraBase*. John Wiley & Sons, Inc. https://spectrabase.com/spectrum/682dsezWsXm

Wilkinson, F., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1993). Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *22*(1), 113–262. https://doi.org/10.1063/1.555934

Yoshikawa, A., Matsunami, H., & Nanishi, Y. (2007). Development and applications of wide bandgap semiconductors. *Wide Bandgap Semiconductors: Fundamental Properties and Modern Photonic and Electronic Devices*, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-540-47235-3_1

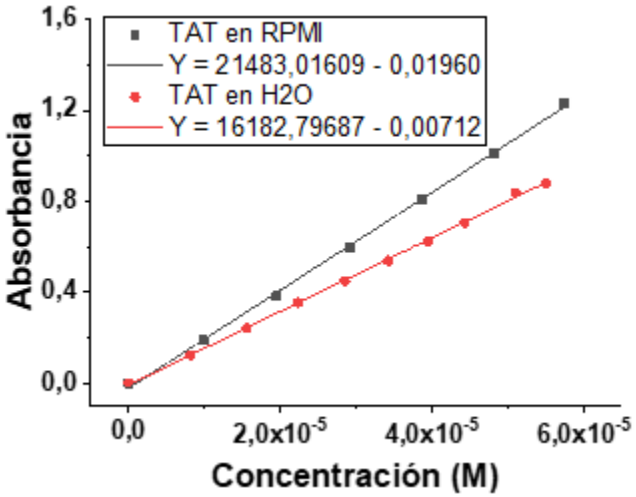
Zaheer, M. R., Gupta, A., Iqbal, J., Zia, Q., Ahmad, A., Roohi, Owais, M., Hashlamon, A., Mohd Setapar, S. H., Aliev, G., & Md Ashraf, G. (2016). Molecular mechanisms of drug photodegradation and photosensitization. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(7), 768–782. https://doi.org/10.2174/1381612822666151209151408

Zoltan, T., Vargas, F., & Izzo, C. (2007). UV-VIS Spectrophotometrical and Analytical Methodology for the Determination of Singlet Oxygen in New Antibacterials Drugs. *Analytical Chemistry Insights*, *2*, 117739010700200020. https://doi.org/10.4137/117739010700200015

2.8 Anexos

2.7.1 Anexo 1:

Figura 1.A1: Coeficiente de extinción molar del TAT en medio RPMI 1640 y en H_2O destilada. Las pendientes se calcularon con absorbancias a de la longitud de onda 367 nm para el RPMI y 360 nm para H_2O destilada.



2.7.2 Anexo 2: Estimación de la radiación UV absorbida por Zn, Mn y TAT

La fuente LED370E utilizada para las irradiaciones fue medida por el radiómetro Thorlabs S120VC, SN P0011836, modelo PM100D. Este radiómetro multicanal fue previamente calibrado con un espectroradiómetro de fibra óptica Avantes (modelo AvaSpec-ULS3648) en el año 2018. Las mediciones realizadas con el instrumento Thorlabs a 3 cm de la fuente en el rango espectral 355-385 nm, fueron transformadas a valores de irradiancia espectral como se muestra en la figura 2-A2.

Estos valores se tomaron a diferentes λ, en torno al pico de emisión máximo centrado en 370 nm. La irradiancia UV total a una distancia de 3 cm de la fuente fue de 11.17 $mW.cm^{-2}$ (o bien, de $3.45x10^{-4}$ $einstein.m^{-2}.s^{-1}.nm^{-1}$). Las absorbancias de las soluciones irradiadas de Triamtereno y los complejos con Zn y Mn en un tiempo de 65 segundos son representadas en la figura 2, incluyendo el espectro del LED.

Figura 2-A2. Espectro del LED370E en unidades de $mW.cm^{-2}.nm^{-1}$ y $einstein.m^{-2}.s^{-1}.nm^{-1}$

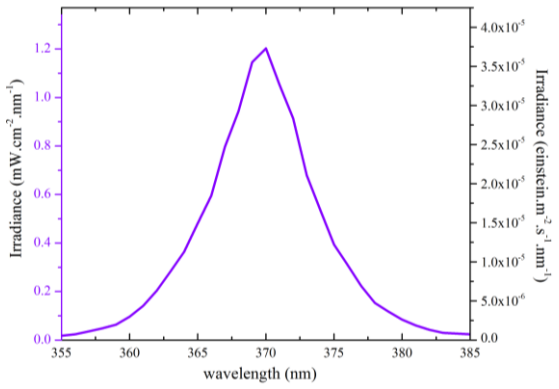
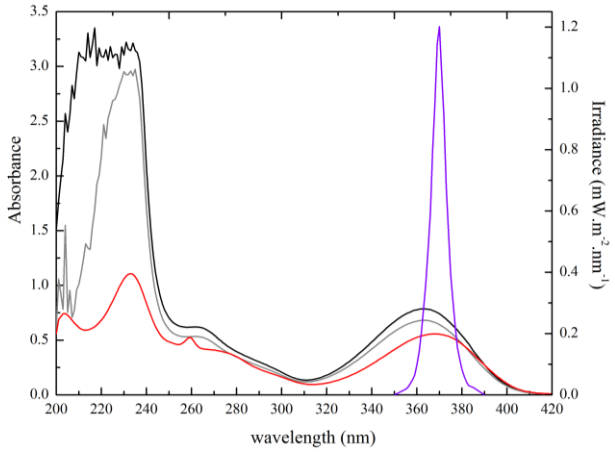


Figura 3. A2 Absorbancias de Zn (negro), Mn (gris), TAT (rojo) irradiadas 65s con el LED370E a 3cm (violeta).



El factor de absorción es una función de λ que representa la fracción de la radiación que puede ser absorbida por la muestra (Braslavsky, 2007) y se define de la siguiente manera:

(1) $$f_\lambda = 1 - T_\lambda = 1 - 10^{-A_\lambda}$$

donde A_λ es la absorbancia de la solución y T_λ es la transmitancia correspondiente. Para calcular la radiación absorbida por la muestra, basada en la irradiancia del LED370E, se define la I_p (o también llamada $q^{a,v}_{n,p}$; ver Ipiña et al. 2014) se utiliza la siguiente relación:

(2) $$I_p = \frac{1}{\ell}\int_{\lambda_2}^{\lambda_1} E_{n,p,\lambda}\left(1-10^{-A_\lambda}\right)d\lambda$$

donde $E_{n,p,\lambda}$ es la radiación emitida por el LED370E calculada en unidades de einstein.m^{-2}.nm^{-1} y se multiplica por f_λ de la ec. (1) para cada una de las muestras (Figura 4.A2). Para obtener la irradiancia absorbida por cada solución, los resultados son integrados en función de la longitud de onda y multiplicados por el inverso del camino óptico de la celda, L (Figura 5.A2).

Figura 4.A2. Factor de absorción de Zn (negro), Mn (gris), TAT (rojo) irradiadas 65s con el LED370E a 3cm (violeta).

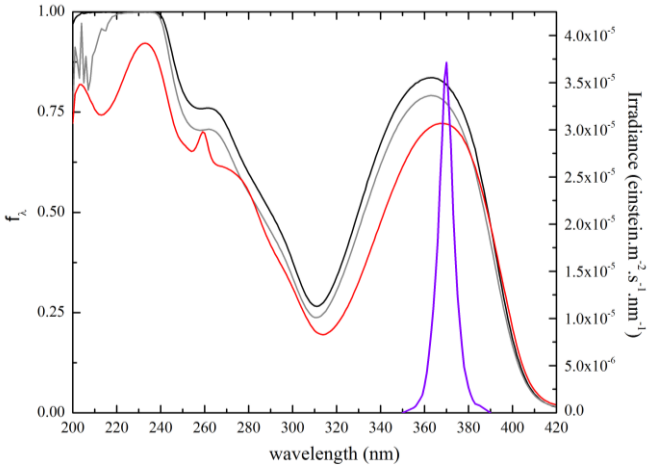
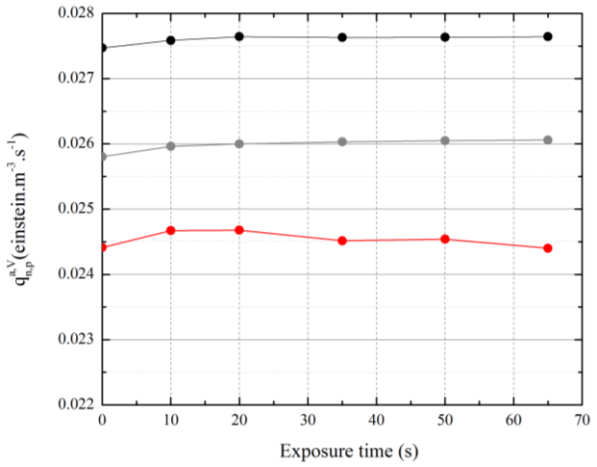


Figura 5.A2. La irradiancia absorbida I_p (=$q^{a,v}_{n,p}$) para las diferentes muestras y tiempos de exposición.



Si se quiere calcular el rendimiento cuántico se utiliza la velocidad de consumo y se divide por cada una de la $q^{a,v}_{n,p}$ obtenidas:

$$\Phi_R = -\frac{(d[R]/dt)_0}{q^{a,V}_{n,p}}$$

Tabla1.A2. Radiación absorbida por cada una de las muestras en función del tiempo de exposición.

Tiempo de exposición (s)	Zn $q^{a,v}_{n,p}$ (einstein.m^{-3}.s^{-1})	Mn $q^{a,v}_{n,p}$ einstein.m^{-3}.s^{-1}	TAT$q^{a,v}_{n,p}$ (einstein.m^{-3}.s^{-1})
0	0.02747	0.0258	0.02441
600	0.02759	0.02596	0.02467
1200	0.02764	0.026	0.02468
2100	0.02763	0.02603	0.02452
3000	0.02763	0.02605	0.02454
3900	0.02764	0.02606	0.0244
promedio±sigma	0.027±0.00007	0.026±0.00009	0.024±0.0001

Conclusión

La intensidad del LED fue medida a 3 cm, distancia a la cual se colocó la celda de cuarzo. La radiación absorbida por la muestra se calculó con la ecuación (2) considerando f_λ para cada una de las muestras. Las $q^{a,v}_{n,p}$ resultaron ser prácticamente constantes para cada tiempo de irradiación.

El presenta trabajo ha sido realizado en colaboración con la doctora Adriana Ipiña, investigadora del instituto de Física Rosario, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de Rosario (IFIR-CONICET-UNR), Argentina. Sistema Nacional de Investigadores, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SNI-CONACYT), México.

Referencia

Ipiña, A., Castaño, C., Dántola, M. L., & Thomas, A. H. (2014). Solar radiation exposure of dihydrobiopterin and biopterin in aqueous solution. Solar Energy, 109, 45–53. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.solener.2014.08.025

3. CAPÍTULO 3

Evaluación del potencial citotóxico y genotóxico de los nuevos compuestos derivados del TAT

3.1 Resumen

En la determinación de citotoxicidad se realizaron ensayos de exclusión de azul de tripano, captación de rojo neutro, reducción de MTT y hemolisis; y para la determinación de genotoxicidad se realizaron ensayos de aberraciones cromosómicas, test cometa e intercambio de cromátides hermanas, utilizando como referencia las líneas celulares normal CHO-K1, línea tumoral MCF-7 y sangre periférica humana. Se pudo corroborar que el IC50 para el TAT es de 8 µg/mL, y que además de eso hay un efecto dosis-respuesta de los tratamientos evaluados sobre la funcionalidad de las líneas celulares. Las pruebas genotóxicas realizadas demuestran que el TAT tiene selectividad sobre líneas tumorales disminuyendo su viabilidad, efecto que se potencia con la incorporación de Zn y Mn en la molécula. El índice mitótico de las células expuestas a los nuevos compuestos disminuye rotundamente incluso superando al control positivo

Con lo anterior fue posible demostrar el potencial citotóxico y genotóxico de los nuevos compuestos de TAT sobre la línea celular tumoral MCF-7, lo que resulta prometedor para el desarrollo de nuevos tratamientos antitumorales, sin que se presenten efectos adversos sobre las células no tumorales, teniendo un margen de concentraciones sobre las cuales asegurar el efecto deseado.

Palabras clave

Ensayos citotóxicos y genotóxicos, test cometa, azul de tripano, rojo neutro, aberraciones cromosómicas, ICH, hemolisis.

3.2 Abstract

Since these synthesized coordinate compounds will potentially be used in humans and as part of the characterization, the evaluation of the cyto and genotoxic potential of the new TAT-derived compounds was carried out. However, in the cytotoxicity analyzes, tritan blue exclusion tests, neutral red uptake, MTT reduction and hemolysis were performed. In the case of the determination of genotoxicity, chromosomal aberration tests, comet test and sister chromatid exchange were performed, using as reference the normal cell lines CHO-K1, tumor line MCF-7 and human peripheral blood. It was possible to corroborate that the IC50 for TAT is 8 µg/mL, with an dose-response effect of the evaluated treatments on the functionality of the cell lines. The genotoxic tests carried out showed that TAT has selectivity over tumor lines, decreasing its viability, an effect that is enhanced with the incorporation of Zn and Mn in the molecule. The mitotic index of the cells exposed to the new compounds decreased sharply, even surpassing the positive control.

With the above, it was possible to demonstrate the cytotoxic and genotoxic potential of the new TAT compounds on the tumor cell line, which is promising for the development of new antitumor treatments, without adverse effects on non-tumor cells, having a range of concentrations over which to ensure the desired effect.

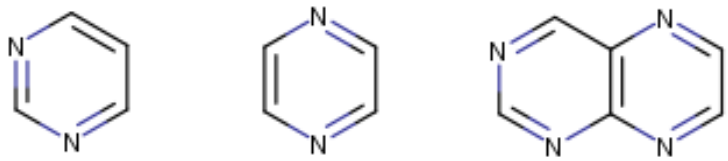
Keywords

Cytotoxic and genotoxic assays, comet assay, trypan blue, neutral red, chromosomal aberrations, ICH, hemolysis.

3.3 Introducción

Las pteridinas, compuestos heterocíclicos, están conformados por un anillo de pirazina y otro de pirimidina; un doble anillo de diez átomos entre los cuales se incorporan algunos nitrógenos. Estas moléculas se encuentran distribuidas en los seres vivos, a lo largo de la naturaleza participando en varias reacciones bioquímicas. Algunas se encuentran en la pigmentación blanca-amarilla de alas de mariposas (Lorente, 2003; Thomas, 2001) mientras que otras pteridinas como el tetrahidrofolato y la tetrahidrobiopterina participan en diversas reacciones metabólicas indispensables en mamíferos y las deficiencias de estos compuestos conllevan al desarrollo de afecciones relacionadas con la reducción de niveles de neurotransmisores, como la dopamina y serotonina, provocando patologías en recién nacidos como retraso mental, convulsiones, alteraciones de postura, entre otros (Lorente, 2003; Martínez-Pardo, 2012). La estructura química de este compuesto se muestra en la figura 3-1.

Figura 3-1: Estructura de los anillos de pirimidina, pirazina y pteridina



Pirimidina Pirazina Pteridina

El derivado activo del ácido fólico, el ácido 5,6,7,8-tetrahidrofolico o simplemente tetrahidrofolato (THF), está involucrado de manera directa en la síntesis de bases nitrogenadas del ADN (Lehninger et al., 2006; Stryer, 1995). Es el encargado de donar el grupo metilo para convertir el dUMP a dTMP; acción llevada a cabo por la enzima timidilato sintasa (TS). De todas las funciones que tiene el ácido fólico en el organismo (Figura 0-2), la síntesis de nucleótidos es una de las más importantes. Por su estructura química, el folato puede considerarse una pteridina con un sustituyente muy grande en el carbono 6 del heterociclo y que debe ser sintetizado *in vivo* (Thomas, 2001). Cuando se interrumpe

la producción de nucleótidos en el organismo, las células dejan de replicarse y las principales afectadas son las provenientes de la medula ósea, como los glóbulos rojos, y las células madre de la mucosa intestinal puesto que requieren de divisiones celulares constantes lo que puede provocar afecciones en la morfología de los glóbulos rojos, enfermedad conocida como anemia megaloblástica (Lorente, 2003; Stryer, 1995; Wu et al., 2021).

Otras pterinas actúan como cofactores enzimáticos que catalizan reacciones de oxido-reducción gracias a la incorporación del molibdeno en su estructura (Pfleiderer et al., 1984). El molibdeno es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza gracias a su solubilidad en agua y es utilizado por diversos sistemas biológicos por su capacidad oxido-reductora. El déficit en el molibdeno, un cofactor enzimático, está asociado a daño neurológico progresivo, gota y xantinuria o concentración elevada de xantina en la orina (Pérez-González et al., 2012). Dentro de las enzimas que utilizan el molibdeno como cofactor en su estructura están las nitrogenasas y enzimas mononucleares como la xantina oxidasa, DMSO reductasa, formato deshidrogenasa y sulfito oxidasa involucradas en la transferencia de electrones entre un sustrato y la molécula de agua (João Romão et al., 1997; Pérez-González et al., 2012).

El anillo de pteridina se presenta en otros compuestos que, por su analogía con el folato, actúan como antitumorales bloqueando la enzima dihidrofolato reductasa encargada de transformar el dihidrofolato en tetrahidrofolato, por ejemplo, el metotrexato y el pralatexato que son utilizados para tratar la artritis reumatoidea y el cáncer de origen linfoproliferativo (Carmona-Martínez et al., 2018). El MTX actúa bloqueando dos puntos directamente, siendo el primero de ellos la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), encargada de reducir el DHF a THF. Posteriormente y de manera indirecta, se interrumpe la acción de la TS bloqueando la producción del THF (cofactor de la TS) impidiendo la reducción del dUMP. Esto trae como consecuencia el bloqueo de la síntesis *de novo* de la timina provocando muerte celular (Carmona-Martínez et al., 2018; Hsiao et al., 2014). El MTX es probablemente el derivado de pteridina más usado en tratamiento antitumoral y se emplea para el tratamiento de cáncer de seno, de pulmón, leucemia y artritis reumatoidea entre otros; del mismo modo, el PTX, aprobado desde el 2009 por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) es otra pteridina utilizada para el tratamiento de linfoma (Carmona-Martínez et al., 2018).

Diversas investigaciones muestran al TAT como potencial medicamento anticancerígeno por su analogía estructural y afinidad por la timidilato sintasa. Dado que el transporte del MTX está mediado por el mismo transportador que el de los compuestos fisiológicos de folato 5-metil-tetrahidrofólico y ácido 5-formil-tetrahidrofólico; se presume que el TAT podría aprovechar este vehiculo para ingresar a la célula y causar toxicidad por una deficiencia de folato inducida por competitividad (Schalhorn et al., 1981). Por ejemplo, Moghadam et al., (2018) estudió la forma como se intercala el TAT en la molécula del ADN al adicionando distintas concentraciones del medicamento directamente sobre ADN de timo de ternero y también sobre albumina sérica humana (transportadora de proteínas y medicamentos en la sangre). La unión de las moléculas se siguió a través de cambios en los espectros de absorción, pero sobre todo en los espectros de emisión al observar disminución en la fluorescencia del sistema ADN-RN (rojo neutro) cuando en el sistema se incorporó el TAT para formar ADN-TAT y liberar RN al medio. Esto, gracias a la capacidad del TAT de intercalarse en el ADN, específicamente en regiones ricas en guanina y citosina según estudios computacionales del mismo autor, lo que conlleva a la adhesión y posterior bloqueo de la replicación y transcripción de genes. Esta investigación se complementó con ensayo MTT sobre líneas celulares de cáncer de colon de *Homo sapiens* HCT116 y *Mus musculus* CT26 encontrando el IC50 para cada línea de 31.30 µM y 24.45 µM respectivamente.

En un ensayo con leucocitos de sangre periférica y de una línea celular de linfoma humano BJAB-B95-8 se encontró que a concentraciones del orden de 10^{-5} M, entre el TAT y el metabolito TAT-OH inhiben entre el 50% y 80% la actividad de la DHFR en las células sanguíneas; mientras que en el estudio con línea celular, los ensayos *in vitro* demostraron que existe una relación dosis-respuesta encontrando que a concentraciones superiores a 80 µM de TAT se presentó inhibición total de DHFR intracelular lo cual deterioró el metabolismo del ADN y desencadenó citólisis. Esto se cuantificó mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano (IARC, 2016; Schalhorn et al., 1981).

Por otro lado, Guillotin et al., (2017) estudió la capacidad del TAT de atacar células con deficiente sistema de reparación mismatch (MMR) mediado por la generación de ROS concluyendo que el TAT es un medicamento selectivo para células tumorales *in vivo* e *in vitro* con lo cual este compuesto se candidatiza como potencial fármaco para futuras investigaciones y tratamientos contra el cáncer.

La citotoxicidad se asocia a la capacidad de ciertas sustancias o eventos con la cualidad general de ser tóxicos para las células vivas y que puede ser causada por estímulos químicos, físicos/ambientales e incluso biológicos. Particularmente, la toxicidad química puede afectar vías metabólicas o causar daño en compuestos indispensables para el funcionamiento celular adecuado. Afecciones causadas por un agente químico en el ADN, membrana celular, organelas (mitocondrias, retículo endoplasmático), microtúbulos, entre otros, pueden desencadenar procesos de apoptosis (muerte programada) o necrosis (muerte accidental) en la célula (Aşkin Çelik, 2018). La evaluación de la citotoxicidad constituye un paso inicial para determinar el potencial de toxicidad de una sustancia. Todo fármaco, cosmético aditivo alimenticio, o producto en general que se pretenda liberar al público, debe ser evaluado rigurosamente con la finalidad de disminuir al máximo los riesgos para la salud de los humanos. Solo aquellos productos con toxicidad mínima o nula son candidatos para su disposición como fármacos o cosméticos. Los productos con actividad anticancerígena deben tener un importante factor citotóxico selectivo. Entender y conocer los factores de citotoxicidad de las sustancias, es esencial para futuras formulaciones de dosis mínima (Aşkin Çelik, 2018; Freshney, 2005).

La genotoxicidad se define como un efecto destructivo que afecta la integridad del material genético de las células (ADN, ARN) resultando en afecciones en la funcionalidad del cromosoma y en proteínas asociadas (Erkan, Aydin, Orta Yilmaz, & Yildizbayrak, 2021; López et al., 2012; Seukep, Noumedem, Djeussi, & Kuete, 2014). Al respecto, la acción de agentes exógenos como los medicamentos, puede afectar el material genético, por la formación de enlaces e interacciones directamente con el ADN o indirectamente afectando proteínas de reparación, de condensación de cromatina, entre otras. Esto podría conllevar a mutaciones que afecten genes (protooncogenes), que participan en el control del ciclo celular y posteriormente causar neoplasia o cáncer (López Ortiz & Márquez Fernández, 2002). De forma general, estas transformaciones pueden ser inducidas por agentes físicos (radiación UV y/o temperatura,) químicos (ROS, alquilantes, halogenados, radicales libres), biológicos (virus de hepatitis B) o por combinación de ellos. Es necesario entonces que todo producto nuevo en el campo de farmacia, cosmética, alimentación, y otros, sea testeado desde la parte citotóxica y genotóxica para su aplicación y comercialización.

Los ensayos *in vitro* permiten obtener información respectivamente sobre la genotoxicidad primaria o la causada por el agente en cuestión (Turkez et al., 2017). Entre algunas de las

pruebas estas se encuentran el análisis de aberraciones cromosómicas (AC), el intercambio de cromátides hermanas (ICH) y el ensayo cometa. Esta batería de pruebas aportan la información suficiente para evaluar si una sustancia es capaz de generar daño en el ADN y por lo tanto ser genotóxica.

3.4 Metodología

Las líneas celulares estudiadas fueron un modelo que representa una fisiología normal CHO-K1 y otro modelo neoplásico de cáncer de mama MCF-7. La última línea se escogió con vista a elucidar el efecto anticancerígeno reportado para el TAT. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 5% y 1% de penicilina-estreptomicina 50 U.I/mL, a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%. Para el mantenimiento de las líneas, se cambió el medio cada dos días realizando lavado con solución buffer fosfato (PBS) hasta obtener una confluencia celular aproximada del 70%. El desprendimiento de las células se realizó con tripsina al 0.05% v/v EDTA 0.03% v/v (ácido etilendiamino tetracético) y se dejó actuar durante 2 minutos en incubadora a 37°C. La viabilidad celular se determinó mediante tinción de azul de tripano al 0.4% antes de cada ensayo. En cada uno de los experimentos, se utilizaron cultivos con una viabilidad mayor al 90% y fueron incubadas durante 24 horas antes de aplicar los tratamientos.

Se determinó la citotoxicidad de los compuestos mediante las pruebas de azul de tripano, rojo neutro, reducción de MTT. Los cultivos celulares fueron sometidos a la acción de TAT y sus derivados TAT-Zn y TAT-Mn; estos fueron preparados en DMSO puro y llevados a las diluciones correspondientes con medio RPMI 1640. El tiempo de exposición a los tratamientos para los ensayos citotóxicos fue de 24 horas con el fin de no alcanzar la pérdida total de viabilidad. La concentración máxima evaluada para los tratamientos fue de 8 µg/mL, dato correspondiente al IC50 reportado por Moghadam et al., (2018) sobre dos líneas celulares de cáncer de colon en humano (HCT116) y en ratón (CT26).

3.4.1 Prueba de Azul de Tripano

En este ensayo se sembraron $8x10^4$ células/pozo en platos de 24 (CHO-K1) se incubaron durante 24 horas, luego las células fueron tratadas por un tiempo igual. La suspensión

celular fue incubada con azul de tripano (0.04%) y contadas en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó a partir de la ecuación (10):

$$\%\,Viabilidad = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células totales}} * 100 \quad (10)$$

3.4.2 Ensayo de captación de rojo neutro

El protocolo que se sigue es el propuesto por (Arencibia Arrebola et al., 2003) con algunas modificaciones. Este ensayo se llevó a cabo en platos de 96, en cada pozo, se sembraron $8x10^3$ células de la línea CHO-K1 y se incubaron por 24 horas, posteriormente se trataron con 10 µL de los tratamientos y se incubaron por otras 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo, se lavó cada pozo con PBS y se adicionó 50 µl de rojo neutro (0,1 mg/mL) y se incubó por 1,5 horas. Luego, se retiró el rojo neutro, se lavó con PBS y se agregó 100 µl de etanol (50%)-ácido acético (0,1%) por 10 minutos. El plato se llevó a lector de ELISA a 540 nm y el porcentaje de viabilidad se determinó a partir de la ecuación (11).

$$\%Viabilidad = \frac{Absorbancia\ del\ tratamiento}{Absorbancia\ del\ control\ solvente} * 100 \quad (11)$$

3.4.3 Reducción de MTT

Esta prueba se realizó usando el protocolo de Ulukaya et al., (2008) con algunas modificaciones. La prueba MTT se evaluó en platos de 96, en cada pozo se adicionaron $8x10^3$ células en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF a 37°C y CO_2 al 5%. 24 horas después se trataron las células con los compuestos de TAT y se incubaron en las mismas condiciones descritas durante 24 horas. Posteriormente se adicionaron 10 µL de la solución de MTT (5mg/mL) a cada pozo, se incubaron por 3,5 horas en oscuridad y se les adicionó 100 µL de isopropanol-ácido a cada pozo para diluir los cristales de formazán formados, se agitó vigorosamente y la placa se lleva a un lector de ELISA a para recopilar la información a 570 nm. El control solvente contiene DMSO al 20%, quedando en el pozo

a una concentración de 2% y la viabilidad celular se determinó utilizando la ecuación (11) descrita en el apartado anterior.

3.4.4 Hemólisis y Fotohemolisis

Se obtuvo sangre de un individuo aparentemente sano, sexo masculino, 31 años de edad y Rh O+. Libre de consumo de drogas, tabaco y bebidas alcohólicas. Se extrajeron 10 mL de sangre con jeringa que se depositaron inmediatamente en dos tubos tipo Falcon de 15 mL. A cada tubo se adiciono 5 mL de medio RPMI 1640 para completar un volumen total de 10 mL. Se centrifugaron a 2700 rpm durante 5 minutos y se realizaron 3 lavados (Feldman & Sink, 2008) extrayendo el líquido sobrenadante con pipetas Pasteur. Para la obtención de glóbulos rojos frescos (GRF) los precipitados finales se mezclaron por simple vaciado a un tubo Falcon en donde se adicionó medio RPMI 1640 en una proporción equivalente al doble del volumen de glóbulos rojos que resultó de los lavados.

En tubos eppendorf de 1.5 mL se adicionaron 215 µL de GRF, 870 µL de medio RPMI 1640 y 115 µL de cada tratamiento previamente preparados a 2.4 µg/mL. El volumen final de la solución fue de 1200 µL y la concentración de cada tratamiento alcanzó 0.23 µg/mL que corresponde a la concentración máxima reportada en pacientes (Mutschler, Gilfrich, Knauf, Mörke, & Völger, 1983). Se uso el medio de cultivo como control negativo, DMSO al 2% como control solvente y alcohol al 70% como control positivo. El tiempo de contacto de los GRF y los tratamientos fue de 30 minutos a 37°C; pasado ese tiempo se centrifugaron los eppendorf y se adicionaron 50 µL de muestra por triplicado al plato de 96 pozos. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta alcanzar 90 minutos y finalmente se leyó la absorbancia de las muestras a 550 nm. El porcentaje de hemólisis se determinó a partir de la ecuación (12) donde **A** es la absorbancia del sobrenadante de cada tratamiento, **B** es la absorbancia del control negativo y **C** es la absorbancia del control positivo.

$$\%\ hemólisis = \frac{(A-B)}{C} * 100 \qquad (12)$$

La prueba de fotohemólisis se realizó para confirmar si la radiación de los compuestos en conjunto con eritrocitos aumenta el efecto hemolítico por la aparición de ROS. Para este

ensayo se realizó el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior para los primeros 3 pozos de cada muestra salvo que se usó hipoclorito de sodio como control positivo. A continuación, las muestras fueron sometidas a radiación UVA con una lampara *UVGL-58 Handheld UV Lamp* con longitud de onda larga de 365 nm durante 30 minutos . El procedimiento se repitió hasta completar los 90 minutos y finalmente la absorbancia se leyó a 550 nm. El porcentaje de hemolisis mediado por ROS se calculó con la ecuación (12).

3.4.5 Aberraciones cromosómicas e Intercambio de Cromatides Hermanas (ICH)

Para las pruebas de genotoxicidad se sembraron $4x10^5$ células en cada pozo en plato de seis pozos, teniendo en cuenta que el volumen inicial que se siembra en cada pozo es de 2250 µL, el cual contiene las células más el medio RPMI1640 suplementado con 5% de SFB y 1% de antibiótico. Pasadas 24 horas se adicionó 250 µL de cada tratamiento a una concentración de 4 µg/mL para garantizar la viabilidad de las células en el tiempo de exposición. Los controles fueron: negativo (células sin tratamiento), solvente (células tratadas con DMSO al 2%) y positivo (células tratadas con mitomicina C). Pasado el tiempo de tratamiento, dos horas antes de la cosecha se adicionaron 25 µL de colcemid a una concentración de 10 µg/mL y se procedió a cosechar las muestras como se indica a continuación. Se retiró de cada pozo la suspensión celular y se lavaron con PBS; luego se adicionó tripsina para promover el desprendimiento celular. Posteriormente se inactivó la tripsina con la suspensión recogida en el primer paso y toda la suspensión se depositó en tubos cónicos de 15 mL. Las muestras fueron centrifugadas a 2100 g durante 10 minutos, pasado este tiempo se descartó el sobrenadante y se homogenizó el pellet celular. Luego se adicionó citrato de sodio 0.7% p/v hasta completar un volumen de 4 mL. Las muestras se almacenaron durante 10 minutos a 37°C y pasado este tiempo fueron centrifugadas nuevamente a 2100 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se homogenizó el pellet, luego de esto se procedió a fijar la muestra con metanol – ácido acético en una proporción 3:1. Finalmente se gotearon las muestras sobre placas obteniendo de esta forma los extendidos cromosómicos.

Para los extendidos cromosómicos en aberraciones cromosómicas se añadió BrdU a una concentración de 2 mg/mL, seis horas antes de la cosecha. Los extendidos cromosómicos obtenidos, se sometieron a tinción homogénea con Giemsa (5%) por 2 minutos, luego se realizó el análisis de aberraciones al microscopio en aumento de 100X analizando 50 células metafásicas de buena calidad, dotación cromosómica completa y buena separación entre los cromosomas Se calculó el índice mitótico en la población de células con la ecuación (13).

$$IM = \frac{\#\ mitosis}{(\#\ núcleos\ interfásicos + \#\ mitosis)} * 100 \qquad (13)$$

Para los extendidos cromosómicos de ICH se añadió BrdU 1 mg/mL, desde el montaje del ensayo. Los extendidos cromosómicos obtenidos después de exposición a 54 horas de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) fueron teñidos con tinción diferencial de la siguiente manera: las placas goteadas se sumergieron en solución bis-BENZIDIMIDE (0.05 mg/mL) (Hoechst 33258) durante 10 minutos. Luego las placas se lavaron con agua destilada en dos pasos sucesivos y se secadas suavemente hasta remover el agua. A cada lámina en posición horizontal, se le agregaron 0.3 mL de solución 2xSSC y fueron cubiertas con lamina cubreobjetos. Posteriormente fueron expuestas a una lámpara *Sylvania capsylite 75w, 120w PAR 3*0, a una distancia de 30 cm más o menos a 60°C por 20 minutos. Finalmente fueron teñidas con Giemsa (5%) durante 2 minutos. Se analizaron 50 metafases en microscopio a 100X y se determinó la existencia de ICH en cada célula por cada tratamiento.

3.4.6 Electroforesis alcalina en gel de células individuales (Ensayo Cometa)

En este ensayo se siguió el protocolo reportado por Singh et al., (1988). Se tomaron $4x10^5$ células CHO_K1 en 2250 µL de medio y se trataron 24 horas con los compuestos TAT, TAT-Zn y TAT-Mn, DMSO al 0.03 % como control solvente, H_2O_2 25 µM como control positivo y células sin tratar como control negativo. Pasado el tiempo, las suspensiones se centrifugaron a 2400 rpm durante 5 minutos y se conserva el pellet en donde están las células. Estas se mezclaron con 90 µL de agarosa de punto de fusión bajo 0.05% y se

depositaron en portaobjetos previamente tratados con agarosa de punto de fusión normal 0.5%.

Las placas portaobjetos fueron llevadas a nevera para solidificar la agarosa a 4°C y en aproximadamente 8 minutos se retiraron fueron sumergidas en buffer de lisis (sarcosinato de Na 1%, NaCl 2.5M; Na_2-EDTA 100 mM, tris 10 mM; pH 10 y tritón X-100, 1%). A continuación, se realizó lavado con PBS y se incubaron en cámara de electroforesis con buffer de corrido (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM) durante 20 minutos. Las muestras se corrieron a 25V y 300 mA durante 30 minutos a pH de 13. Al finalizar la electroforesis, las placas se lavaron con buffer neutralizante (tris 0,4 M pH 7,5) durante 15 minutos, luego de esto se deshidrataron con MeOH y se guardaron durante 24 horas para ser teñidas con bromuro de etidio (2 µg/mL).

Finalmente, con ayuda de microscopio de fluorescencia (ZEISS) con objetivo de 20X se tomaron fotografías de 50 nucleoides al azar por placa en donde se cuantificó, con la aplicación de uso libre *ImageJ* y el complemento *OpenComet*, la fluorescencia de las colas de los cometas causada por daño puntual en el ADN. Todos los pasos fueron realizados en completa oscuridad una vez que la suspensión entró en contacto con el buffer de lisis para evitar daños adicionales del material genético.

3.5 Resultados y Análisis

3.5.1 Exclusión de azul de tripano

De acuerdo con los resultados obtenidos para las dos líneas celulares y como se observa en la figura 3-2 y 3-3, no se percibe un efecto marcado de los tratamientos sobre la membrana celular tanto de las líneas CHO-K1 y MCF-7 respectivamente.

Figura 3-2: Resultados prueba de exclusión de tripano en CHO-K1

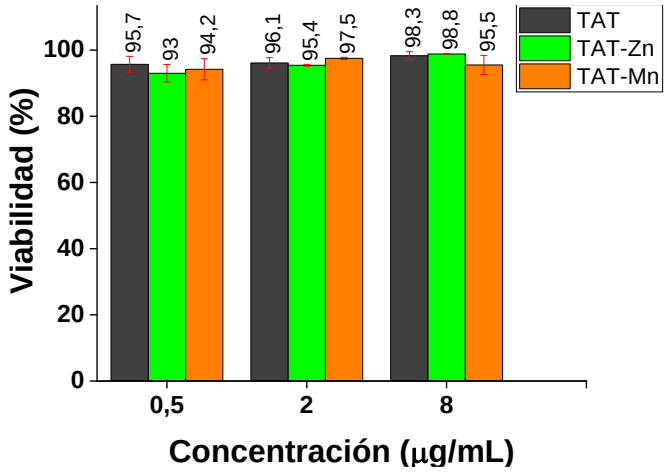
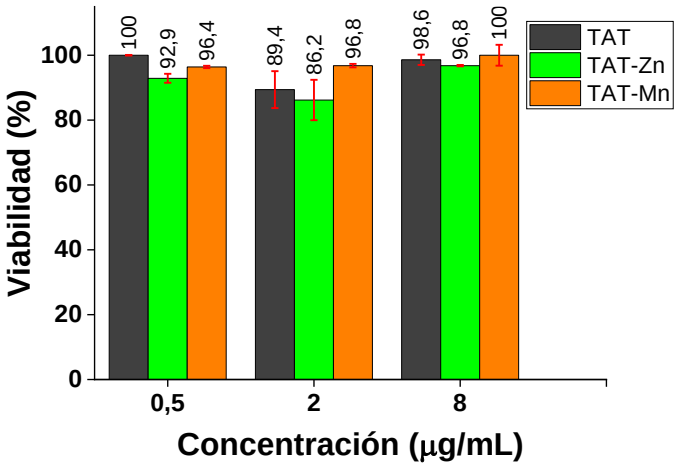


Figura 3-3: Resultados prueba de exclusión de tripano en MCF-7

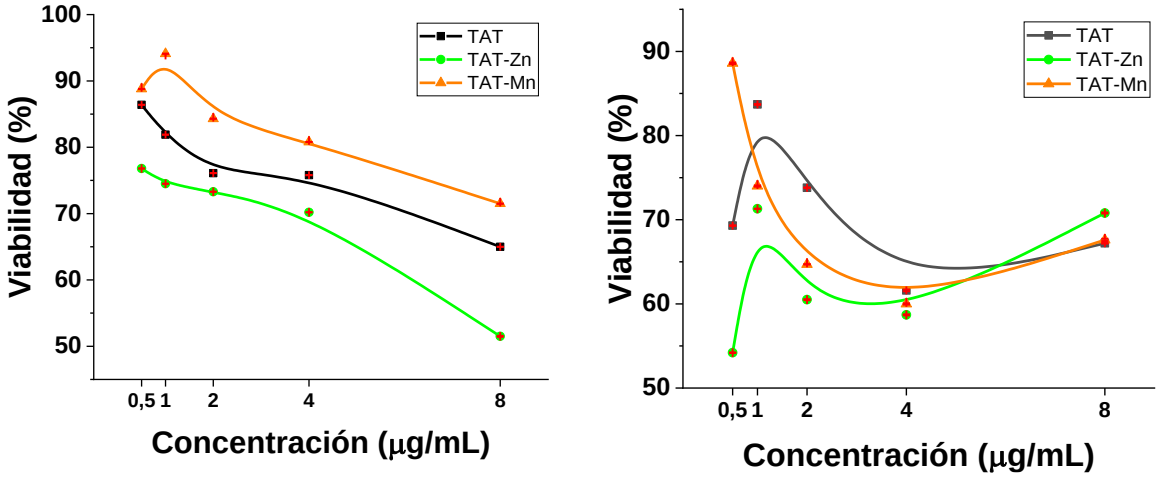


3.5.2 Captación de Rojo Neutro

La figura 3-4 muestra los resultados de la incorporación del colorante rojo neutro en las líneas celulares en donde se puede evidenciar que hay un efecto dosis respuesta para la línea celular CHO-K1 en donde a mayor concentración de los tratamientos, se ve comprometida la integridad de las organelas (lisosomas). El TAT-Zn fue el único compuesto que alcanza un valor cercano al 50% de perdida de viabilidad, mientras que el

TAT y TAT-Mn reducen la viabilidad entre el 65 y 70% respectivamente. Tras una regresión lineal, el análisis de varianza de las pendientes demostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y según el valor P, todos los tratamientos generan un efecto estadísticamente significativo en cuanto a la concentración evaluada y la respuesta en la viabilidad. Este resultado confirma lo propuesto por Park et al., (2021), en cuyo estudio demostró que el triamtereno en altas concentraciones (50 µg/mL) causa la ruptura lisosomal sin afectar a otros orgánulos celulares y aumenta el flujo de autofagia en la línea celular HepG2; esto se articula con el hecho de que los lisosomas son organelas que se originan a partir de la membrana celular.

Figura 3-4: Resultados de rojo neutro en CHO - K1 (izquierda) y MCF-7 (derecha)



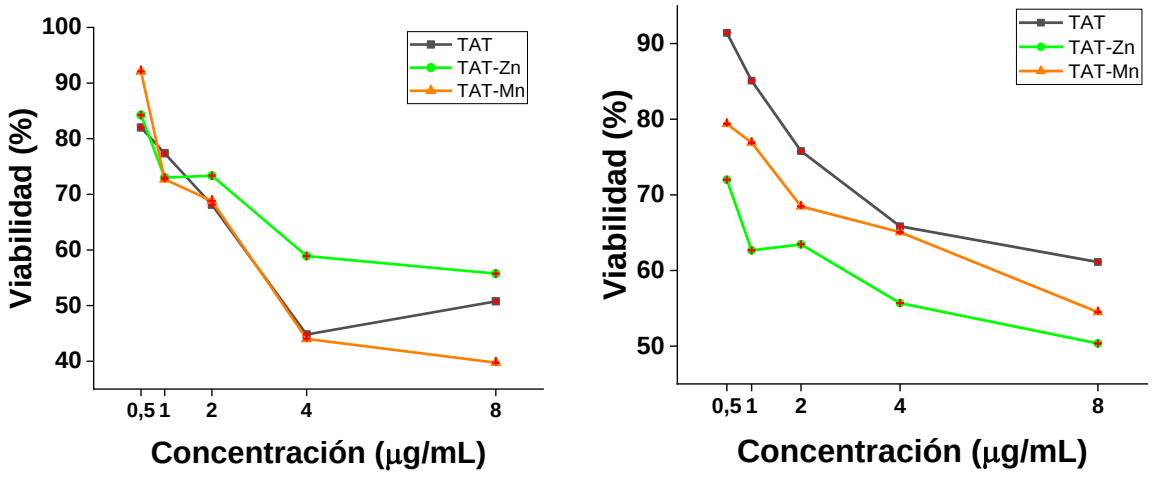
En la línea celular tumoral, no se percibe efecto importante de los tratamientos sobre la funcionalidad de la membrana, salvo el TAT-Mn que reduce la viabilidad de las células en un 22% como se aprecia en la misma figura. Tras una regresión lineal, el análisis de varianza mostró que no hay diferencias significativas entre las pendientes y que además los tratamientos no están ejerciendo una acción estadísticamente significativa sobre la viabilidad de las células; por lo tanto, no podemos afirmar que un tratamiento ejerza más toxicidad que otro ni que existe un efecto dosis-respuesta. Este comportamiento seguramente se da porque la línea cancerígena soporta mejor las condiciones adversas, y allí reside su capacidad proliferativa y resistente.

3.5.3 Reducción de MTT

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la prueba del MTT y como se aprecia en la figura 3-5; se comprobó que el aumento en la concentración de los tratamientos esta interfiriendo en el metabolismo de la línea celular CHO-K1 logrando incluso perdida del 50% de la viabilidad celular en los tratamientos con Zn y Mn. El análisis de varianza ANOVA tras una regresión lineal arrojó que tanto los tratamientos de TAT-Zn y TAT-Mn (valores P 0.047 y 0.015 respectivamente) presentan un cambio significativo en la variable de respuesta, lo cual quiere decir que la pérdida de viabilidad está asociada directamente al aumento de concentración de los tratamientos en el medio. No se puede afirmar lo mismo para el tratamiento con TAT (valor P 0.067), por lo tanto, el principio activo por si solo no genera un cambio estadísticamente significativo en la perdida de viabilidad en las concentraciones evaluadas.

Se realizo el mismo análisis para la línea MCF-7 y los resultados del ANOVA arrojaron que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados a la línea celular y que además todos generan pérdida de viabilidad celular estadísticamente significativa cuando se aumentan las concentraciones. Para esta línea, el TAT-Zn es el único compuesto que alcanza el IC50 a la concentración máxima evaluada, y se espera que el TAT y TAT-Mn lo alcancen a mayores concentraciones. Esto se concluye según la tendencia que se observa en la figura 3-5 .

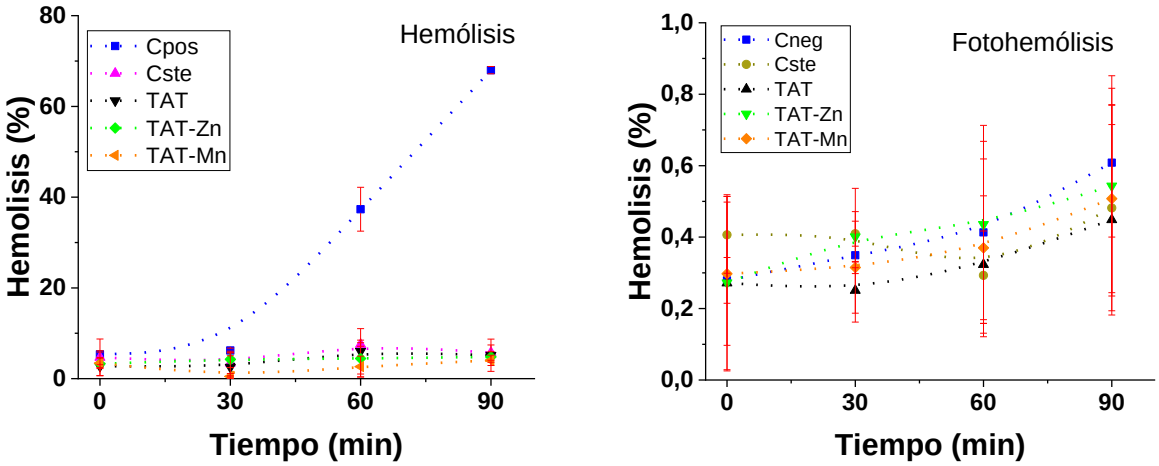
Figura 3-5: Resultados de MTT sobre CHO-K1 (izquierda) y MCF-7 (derecha)



3.5.4 Hemólisis y Fotohemólisis

La concentración de los tratamientos que se alcanzó en las muestras de los ensayos de hemólisis fue la máxima reportada en sangre 0.23 µg/mL según Mutschler et al, (1983). Los resultados se pueden observar en la figura 3-6 y tras un análisis estadístico, el valor P de los tratamientos (0.08) es superior al nivel de confianza de 0.05; por lo tanto, se concluye que nuestros compuestos no son hemolíticos y no están causando pérdida de la función fisiológica a la concentración evaluada ya que no existe diferencia significativa entre los tratamientos que contienen el medicamento y los controles negativo y solvente.

Figura 3-6: Hemolisis y fotohemólisis causada por los tratamientos a 0.23 µg/mL al cabo de 90 minutos. Las muestras de fotohemólisis fueron sometidas a radiación UVA.



En la prueba de fotohemólisis no se observaron grandes cambios en las absorbancias de las diferentes muestras como se puede observar en la tabla 3-1. Esto se comprobó con un análisis de varianza, el cual arrojó que para un nivel de confianza de 0.05, no existe diferencia significativa entre los tratamientos que contienen el TAT, TAT-Zn, TAT-Mn y solvente. Por lo tanto , se concluye que, a las concentraciones y tiempos evaluados, no existe generación de ROS significativa por parte de nuestros compuestos capaz de causar ruptura en membrana de eritrocitos. Esta información se contrastó con estudios previos (Vargas, F; Fuentes, 1997) en donde ele TAT genera fotohemólisis a una concentración de 50 µg/mL por tratamiento e irradiación con lampara *OSRAM HQL 250w (320-400nm*); además, el TAT se obtuvo a partir de tabletas de Diazyde de donde no se conoce el

proceso de extracción del principio activo, generando perdida de pureza del compuesto y por ende resultados no comparativos con nuestro análisis.

Tabla 3-1: Resultados de fotohemólisis expresados en porcentaje. El solvente utilizado fué DMSO al 2%.

Tiempo (min)	Control positivo	TAT	TAT-Zn	TAT-Mn	Control solvente
0	97,1	0,3	0,3	0,3	0,4
30	97,3	0,3	0,4	0,3	0,4
60	97,6	0,3	0,4	0,4	0,3
90	97,7	0,4	0,5	0,5	0,5

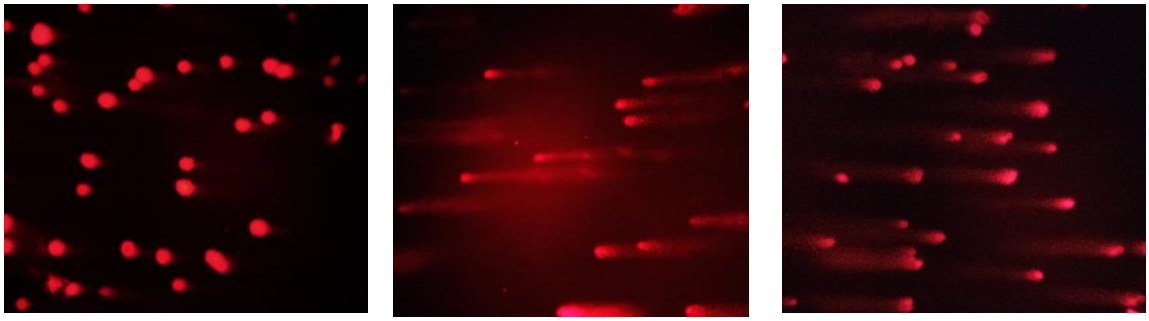
3.5.5 Resultados de Ensayo Cometa

La figura 3-7 permite observar el daño puntual que los tratamientos causan sobre el ADN de las líneas celulares, reflejado en las estelas o colas del cometa. Los tres tratamientos fueron evaluados a una concentración de 4 µg/mL, concentración por debajo del IC50 para garantizar la funcionalidad de la célula. El daño causado en el ADN se cuantificó con la aplicación de uso libre ***ImageJ*** con el complemento *OpenComet* y los resultados se observan en la figura 3-8.

En ambas líneas celulares, se aprecia un daño elevado con el compuesto TAT-Zn alcanzando el 43.2% para la línea CHO-K1 y 44.6% para MCF-7 . El compuesto con Mn de igual forma causa un daño apenas menor para ambas líneas y el principio activo precursor presenta valores que difieren en un 20% entre las líneas. Es importante aclarar que el control solvente presenta porcentaje daño de alrededor del 12% para la línea celular normal y del 9% para el modelo neoplásico lo cual, sin duda, está aumentando el daño real que pueden causar nuestros compuestos al ADN. Los resultados obtenidos van de la mano con antecedentes como el de Guillotin, D. et al. (2017) en donde se afirma que el TAT, por competición con el folato, favorece la aparición de ROS aumentando el estrés oxidativo de la célula, generando quiebres en el ADN y con gran afinidad por células tumorales.

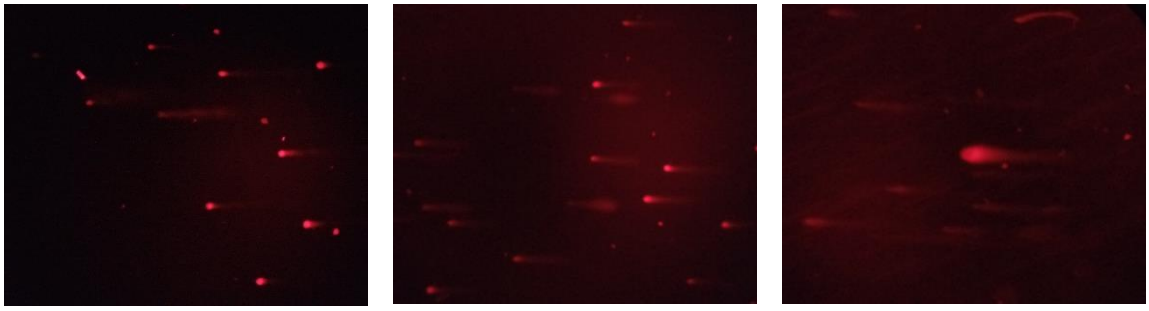
Figura 3-7: Imágenes tomadas por microscopio de fluorescencia de ensayo cometa para línea celular CHO-K1 y MCF-7.

Linea celular CHO-K1



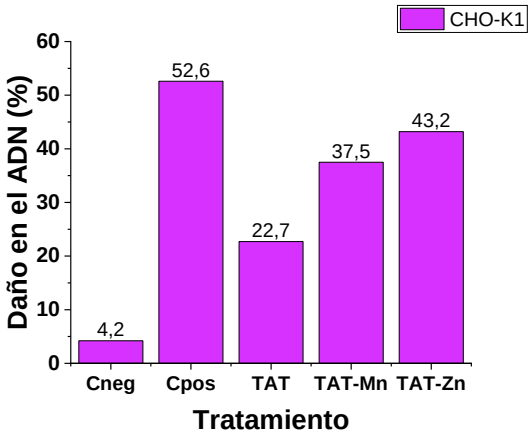
TAT TAT-Zn TAT-Mn

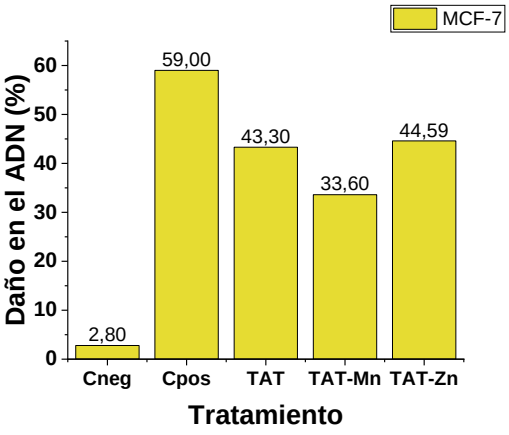
Linea celular MCF-7



TAT TAT-Zn TAT - Mn

Figura 3-8: Cuantificación del daño en el ADN para cada una de las muestras tratadas de las imágenes obtenidas en test cometa para CHO-K1 y MCF-7.

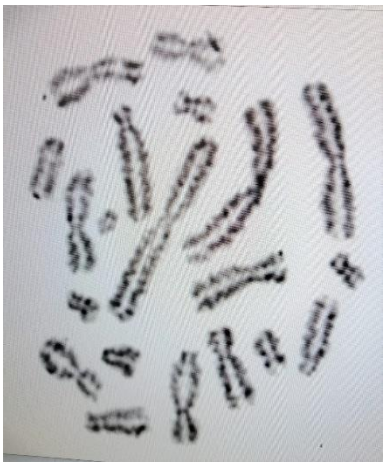




3.5.6 Resultados de Aberraciones cromosómicas e ICH

Figura 3-9: Aberraciones cromosómicas e ICH para línea celular CHO-K1.

Control negativo



TAT

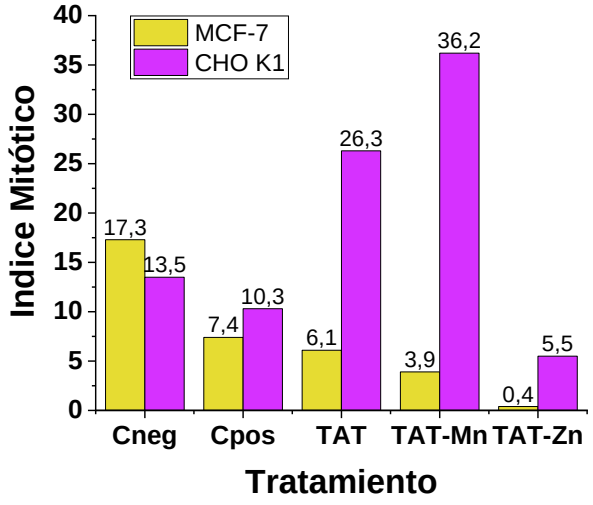
En la figura 3-9 se presentan algunas imágenes de los extendidos cromosómicos correspondientes al control negativo y al tratamiento con TAT. No se observaron efectos sobre el material genético total, puesto que no se presentaron aberraciones cromosómicas al tratar la línea celular CHO-K1 con los compuestos; del mismo modo, tampoco se aprecia un aumento en la cantidad de ICH para ninguno de los tratamientos revisados hasta el momento. Es importante mencionar, que el control negativo de la línea CHO-K1 es el único que ha completado los 2 ciclos necesarios para el análisis de ICH; mientras que en los demás tratamientos el ciclo se ha visto interrumpido seguramente por acción del TAT tal como lo menciona Guillotin et al. (2017) por una posible detención en la fase G2-M.

En la figura 3-10, se observó un efecto similar, sin aberraciones cromosómicas y ningún aumento en los ICH para la línea celular MCF-7 en las imágenes analizadas hasta el momento. Estos hallazgos son positivos ya que se pretende que el TAT y sus derivados con Zn y Mn no generen genotoxicidad en la línea normal y que tampoco aumenten la proliferación de anomalías en la línea cancerígena; esto con el fin de que el principio activo siga siendo atractivo para usos y futuras investigaciones.

Figura 3-10: Aberraciones cromosómicas e ICH para línea celular MCF-7 en presencia de TAT

3.5.7 Resultados del Índice mitótico

Figura 3-11: Resultados de índice mitótico en línea CHO-K1 y MCF-7 al ser tratadas con TAT, TAT-Zn y TAT-Mn.



Adicional a las anteriores pruebas, se observó que la línea celular MCF-7 disminuye su velocidad de replicación al estar expuesta a los tratamientos con TAT. Esto quiere decir que el ciclo celular se está alterando tal como aparece en investigaciones previas de

Guillotin et al. (2017) en donde se comprobó que el TAT (5 µg/mL) detiene el ciclo de células tumorales en la fase G2-M derivando en una reducción de la viabilidad. En la figura 3-11 se muestra el índice mitótico de ambas líneas celulares y se corrobora la afinidad del TAT con la línea tumoral inhibiendo su proliferación; efecto que no se aprecia en la línea celular normal y que además se ve aumentado con la presencia de Mn y Zn en el medio.

3.6 Conclusiones

El ensayo de hemolisis y fotohemólisis demostró que a las concentraciones y tiempos evaluados, los compuestos permanecen estables y no generan ruptura de la membrana celular de los eritrocitos. Respecto a la viabilidad, no se percibió efecto nocivo sobre la membrana celular como se muestra en el ensayo de azul de tripano, sin embargo, se observó efecto dosis respuesta en cuanto a la funcionalidad de lisosomas en CHO-K1, de acuerdo con los resultados que reveló el ensayo de captación de rojo neutro. Hay un efecto dosis respuesta de los compuestos evaluados en las concentraciones de 0.5, 1, 2, 4 y 8 µg/mL, que se corroboró mediante el ensayo de MTT lo cual quiere decir que los nuevos compuestos y el TAT tienen un efecto importante sobre el metabolismo mitocondrial siendo el TAT-Zn un tratamiento más incisivo sobre la línea tumoral. Estos datos reafirman la selectividad del triamtereno en su actividad antifolato sobre las células neoplásicas.

Existe una posible detención del ciclo celular en la fase G2-M lo que corresponde a la perdida de viabilidad observada por los compuestos. Tal como lo afirma Guillotin et al. (2017), el TAT puede generar un aumento de ROS (como se aprecia en los resultados de generación de $O_2[^1\Delta_g]$) provocando daños en el ADN incluyendo rupturas de cadena sencilla y doble, y daño oxidativo lo que ocasiona detención del ciclo celular. El impacto en estas rupturas se reflejó en el ensayo cometa en donde se apreciaron daños significativos sobre todo en los tratamientos con Zn y Mn. Al respecto, los altos porcentajes de daño en el genoma causados por el TAT-Zn se pueden atribuir a que el aumento en las concentraciones de Zn limita la proliferación de células neoplásicas, esto según estudios en donde se trabajó con una línea celular leucemoide en medio suplementado con Zn observando un efecto citotóxico; mientras que en otros modelos celulares saludables, como fibroblastos de pulmón humano, células epiteliales de próstata y leucocitos, el Zn demostró tener un efecto de protección anti-apoptótico. Esta protección no se presentó en las células cancerígenas y el Zn resultó ser más citotóxico a diferencia de las líneas

normales (Costa et al., 2022). La toxicidad de los tratamientos con manganeso, pueden explicarse por la liberación el ion Mn^{+2} al medio, el cual puede oxidarse a Mn^{+3} e inducir genotoxicidad a concentraciones de superiores a 0.05 M (Lima, P. D. L., Vasconcellos, M. C., Montenegro, R. C., Bahia, M. O., Costa, E. T., Antunes, L. M. G., & Burbano, R. R. 2011).

Estos estudios sustentan los resultados obtenidos en esta tesis ya que demuestran que tanto el TAT como el TAT-Zn afectan principalmente las líneas celulares tumorales y este efecto se aprecia con mayor relevancia en el índice mitótico observado. Este hallazgo fue clave para concluir que el ciclo celular se está deteniendo (G2-M según reportes) inhibiendo el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas que es justamente lo que se busca en los medicamentos antineoplásicos.

3.7 Referencias

Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernández, L. A., & Curveco Sánchez, D. L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología En Línea*, 40–52. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf

Aşkin Çelik, T. (2018). Introductory Chapter: Cytotoxicity. In *Cytotoxicity*. https://doi.org/10.5772/intechopen.77244

Carmona-Martínez, V., Ruiz-Alcaraz, A. J., Vera, M., Guirado, A., Martínez-Esparza, M., & García-Peñarrubia, P. (2018). Therapeutic potential of pteridine derivatives: A comprehensive review. *Medicinal Research Reviews*, 1–56. https://doi.org/10.1002/med.21529

Costa, M., Santos, B., Jorge, J., Alves, R., Marques, I., Sarmento, A., & Goncalves, A. (2022). Zinc Prevents DNA Damage in Normal Cells but Shows Genotoxic and Cytotoxic Effects in Acute Myeloid Leukemia Cells. International Journal of Molecular Sciences, 23(2567), 11. https://doi.org/https://doi.org/ 10.3390/ijms23052567

Erkan, M., Aydin, Y., Orta Yilmaz, B., & Yildizbayrak, N. (2021). Chapter 42 - Protective effects of vitamin C against fluoride toxicity. In V. B. Patel & V. R. B. T.-T. Preedy (Eds.) (pp. 435–445). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819092-0.00043-1

Feldman, B. F., & Sink, C. A. (2008). *"Methods", Practical Transfusion Medicine*. https://www.ivis.org/library/practical-transfusion-medicine/methods

Freshney, R. I. (2005). *Culture of animal cells: A manual of basic technique* (5th ed.). WILEY. https://doi.org/10.1002/9780471747598

Gascón Jiménez, S. (2007). Mecanismos de regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral. http://hdl.handle.net/10486/2621

Guillotin, D., Austin, P., Begum, R., Freitas, M. O., Merve, A., Brend, T., Short, S., Marino, S., & Martin, S. A. (2017). Drug-repositioning screens identify triamterene as a selective drug for the treatment of DNA mismatch repair deficient cells. *Clinical Cancer Research*, *23*(11), 2880–2890. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1216

Horváthová, E., Slameňová, D., Hlinčíková, L., Mandal, T. K., Gábelová, A., & Collins, A. R. (1998). The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research - DNA Repair*, *409*(3), 163–171. https://doi.org/10.1016/S0921-8777(98)00053-6

Hsiao, Y. L., Chang, P. C., Huang, H. J., Kuo, C. C., & Chen, C. Y. C. (2014). Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia From Traditional Chinese Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2014*, 1–21. https://doi.org/10.1155/2014/601064

IARC. (2016). Triamterene. In *SOME DRUGS AND HERBAL PRODUCTS* (Vol. 108, pp. 263–283). International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Drugs-And-Herbal-Products-2015

João Romão, M., Knäblein, J., Huber, R., & Moura, J. J. G. (1997). Structure and function of molybdopterin containing enzymes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *68*(2), 121–144. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6107(97)00022-9

Lima, P. D. L., Vasconcellos, M. C., Montenegro, R. C., Bahia, M. O., Costa, E. T., Antunes, L. M. G., & Burbano, R. R. (2011). Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: A review of the literature. Human and Experimental Toxicology, 30(10), 1435–1444. https://doi.org/10.1177/0960327110396531

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2006). *Lehninger PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA* (Cuarta edi).

López Ortiz, J. B. (Universidad N. de C., & Márquez Fernández, M. E. (Universidad N. de C. (2002). *Modelo experimental para el estudio cromosómico en células de mamíferos*. Laboratorio de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

López, S. L., Aiassa, D., Benítez Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Śnchez, N., Simoniello, M. F., & Carrasco, A. E. (2012). Pesticides used in South American GMO-based agriculture. A review of their effects on humans and animal models. In *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 6). https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59389-4.00002-1

Lorente, C. (2003). Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2216

Martínez-Pardo, M. (2012). Deficiencias de tetrahidrobiopterina (BH4): diagnóstico y tratamiento. *Acta Pediátrica de México*, *33*(6), 319–323. http://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2012/apm126l.pdf

Moghadam, N. H., Salehzadeh, S., Tanzadehpanah, H., Saidijam, M., Karimi, J., & Khazalpour, S. (2018). In vitro cytotoxicity and DNA/HSA interaction study of triamterene using molecular modelling and multi-spectroscopic methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *37*(9), 2242–2253. https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1489305

Mutschler, E., Gilfrich, H. J., Knauf, H., Mörke, W., & Völger, K. D. (1983). Pharmacokinetics of triamterene. Clinical and Experimental Hypertension, A5(2), 249–269. https://doi.org/10.3109/10641968309048825

Park, N. Y., Jo, D. S., Kim, Y. H., Bae, J.-E., Kim, J. B., Park, H. J., Choi, J. Y., Lee, H. J., Chang, J. H., Bunch, H., Jeon, H. B., Jung, Y.-K., & Cho, D.-H. (2021). Triamterene induces autophagic degradation of lysosome by exacerbating lysosomal integrity. *Archives of Pharmacal Research*, *44*(6), 621–631. https://doi.org/10.1007/s12272-021-01335-5

Pérez-González, A., Gómez-Peralta, J. I., Garza-Ortiz, A., & Barba-Behrens, N. (2012). Importancia del molibdeno en los sistemas biológicos y su papel en enzimas

mononucleares como parte del cofactor Moco. *Educacion Quimica*, *23*(1), 23–32. https://doi.org/10.1016/s0187-893x(17)30094-0

Pfleiderer, W., Kappel, M., & Baur, R. (1984). *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. *369*(2). https://doi.org/doi:10.1515/bchm3.1988.369.2.527

Schalhorn, A., Siegert, W., & Sauer, H. (1981). Antifolate Effect of Triamterene on Human Leucocytes and on a Human Lymphoma Cell Line. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *20*, 219–224.

Seukep, A. J., Noumedem, J. A. K., Djeussi, D. E., & Kuete, V. (2014). 9 - Genotoxicity and Teratogenicity of African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 235–275. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00009-1

Stryer, L. (1995). *Biochemistry* (4th editio). W. H. Freeman and Company.

Thomas, A. H. (2001). Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2215

Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *13*(10), 1089–1098. https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A. Y., & Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, *22*(1), 232–239. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.006

Wu, Q., Liu, J., Xu, X., Huang, B., Zheng, D., & Li, J. (2021). Mechanism of megaloblastic anemia combined with hemolysis. Bioengineered, 12(1), 6703–6712. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1952366

Conclusiones generales

Se logró la síntesis de complejos entre el ligando TAT y las sales $ZnCl_2$ y $MnCl_2$, respectivamente, lo cual se evidencia de forma inicial a través del cambio de coloración de las soluciones en el proceso de síntesis. Los resultados obtenidos desde SEM, permitieron determinar cambios en la morfología de los materiales sintetizados, obteniendo para los nuevos compuestos cristales en forma acicular a diferencia de los observados para el TAT; así como la evidencia desde el análisis elemental complementario a esta técnica, que muestra la presencia de metales en la superficie. Los cambios observados en los espectros FTIR y de Raman, señalan como sitio de coordinación al N5, ocasionando aumento en las distancias interplanares, como indicativo de la incorporación de otros elementos en las estructuras cristalinas vistos desde el análisis de XRPD.

Los complejos de coordinación obtenidos presentan una pérdida de masa inicial y gradual, de moléculas volátiles. Para estos nuevos compuestos se observa menor estabilidad térmica en comparación con el ligando TAT que se evidencia incluso en eventos térmicos previos a temperaturas cercanas al punto de fusión, que señalan la pérdida de moléculas posiblemente de H_2O y HCl incorporadas a la estructura cristalina. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas frente a la estabilidad fotoquímica bajo radiación UVA durante el tiempo del análisis. También se observó que las tasas de dilución del TAT, mejoran en presencia de las sales de Zn y Mn hasta en un 40%. Los complejos sintetizados muestran a través de sus espectros de absorción UV-VIS, FTIR y Raman, cambios asociados debidos a las diferencias estructurales en comparación con el ligando TAT.

Los rendimientos cuánticos en la generación de oxígeno molecular singulete $O_2[\,^1\Delta_g]$, son en magnitud comparables entre los compuestos sintetizados y el TAT, por lo que se puede asegurar que, en las concentraciones utilizadas, no se modifica el carácter fotosensibilizador como parámetro de fototoxicidad. No se observan diferencias estadísticamente significativas en las cinéticas de pseudo primer orden para el consumo del DPBF como apagador del oxígeno excitado.

Las pruebas citotóxicas demuestran que la máxima concentración evaluada de 8 µg/mL afectan la viabilidad celular por encima del 20% para ambas líneas celulares; llegando a perdida de viabilidad del 50% en algunos casos y solo en algunos tratamientos como el caso de TAT-Mn en MTT y TAT-Zn en rojo neutro. Estos valores son importantes a considerar para tener en cuenta la dosis a evaluar en los ensayos genotóxicos. EN cuanto a estas pruebas, se observó que la concentración evaluada de 4 µg/mL es suficiente para causar daño en el material genético, efecto que se refleja con mayor intensidad el ensayo cometa y en el índice mitótico mostrado en la línea celular MCF-7.

Todos los resultados en conjunto sugieren que el TAT-Zn y TAT-Mn potencian la acción cito y genotóxica del TAT, abriendo la puerta a nuevas investigaciones sobre el desarrollo de nuevos fármacos y el reposicionamiento de los mismos en el campo de complejos organometálicos y posibles tratamientos antineoplásicos.

Recomendaciones y Proyecciones

Complementario a las medidas del perfil de disolución, es adecuado llevar medidas en las mismas condiciones hasta observar una absorbancia constante y así poder obtener un valor de absorbancia en equilibrio, como parámetro termodinámico. Asi mismo, con los resultados obtenidos para el rendimiento cuántico de fluorescencia, se recomienda ampliar el estudio a un análisis multiparamétrico con datos de propiedades asociadas a la polaridad del solvente.

Como un estudio a proyectar, se propone analizar los restos calcinados que resultan del análisis de TGA para evaluar la posible presencia de nitruros de carbono que se puedan formar a temperaturas superiores a 600°C en una atmosfera empobrecida de oxígeno.

Relativo a los experimentos citotóxicos es recomendable ampliar el espectro de las concentraciones por encima y por debajo de las evaluadas en esta tesis. Se propone trabajar la batería de ensayos citotóxicos con la concentración máxima alcanzada por pacientes en sangre, y a la vez, establecer los limites a los cuales todos los tratamientos disminuyen la viabilidad celular al menos en un 50%. Para el análisis de ICH específicamente, se propone duplicar el tiempo de exposición al BrdU pretendiendo alcanzar el 2 ciclo celular en ambas líneas.