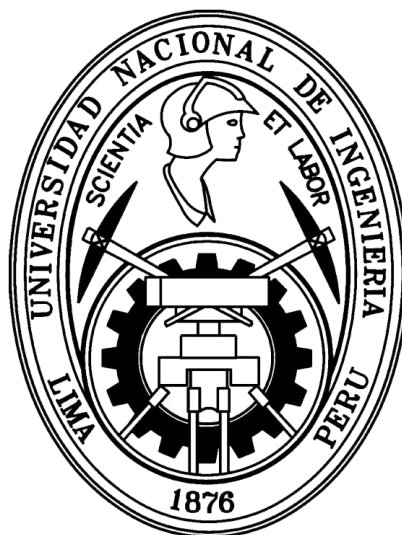


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

“Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad biológica de compuestos de coordinación de cobalto y pirazinamida”

Para obtener el Título Profesional de:

Licenciado en Química

Elaborado por:

Natalia Karolina Chávez Llallire

Asesor:

Ana Cecilia Valderrama Negrón

2021

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres con mucho amor, porque a ellos les debo el haber estudiado una carrera universitaria, porque con paciencia y amor incentivaron mi anhelo por convertirme en profesional y sobre todo en una persona con valores, consciente de la realidad de nuestro país y capaz de afrontarla aun cuando se presenten situaciones adversas.

A mi asesora de tesis, por su infinita paciencia y dedicación para poder alcanzar el título profesional, por ser una persona admirable por sus cualidades profesionales y humanas.

A mi hermano y a Thiago, porque deseo que mis logros puedan mostrarles que con esfuerzo y constancia se puede alcanzar hasta las metas que parecen ser inalcanzables.

A mis abuelitos y tíos, porque desde donde están siempre han procurado lo mejor para mi alentándome a seguir adelante sin darme por vencida demostrándome que están y estuvieron orgullosos de cada uno de mis aciertos.

A Luis, porque no dejó de alentarme en ningún momento y en los momentos difíciles de este proceso fue un gran apoyo para no desistir y culminar con este trabajo.

A Hachi, porque fue el mejor compañero durante mis largas noches de estudio y durante la redacción de esta tesis.

A todas las personas, amigos, profesores y familiares, que me acompañaron en este proceso y de alguna forma han contribuido con la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a los laboratorios LABICER (Laboratorio de Investigación y Certificaciones) y GIEA (Grupo de Investigación de Electroquímica Aplicada) de la Universidad Nacional de Ingeniería, LAQISE-BIMET (Laboratorio de Química Inorgánica Sintética y Estructural: Bioinorgánica y Metalofármacos) de la Universidad de Sao Paulo, Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad Sao Paulo, y al Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Cayetano Heredia pues gracias a su apoyo se realizaron la gran mayoría de análisis de caracterización y actividad biológica de este trabajo.

Contenido

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Lista de Tablas	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaciones	
Capítulo I Introducción	
I.1 Objetivos	
1. Objetivos Generales	
2. Objetivos Específicos	
I.2 Justificación	
Capítulo II Antecedentes	
II.1 Tuberculosis	
II.2 Pirazinamida	
1. Información biológica básica	
2. Mecanismo de resistencia al fármaco	
3. Potencial in vitro contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
4. Espectro de actividad	
5. Otras actividades in vitro	
6. Eficacia en humanos	
7. Reacciones adversas en humanos	
II.3 Pirazinamidasa	
II.4 Cobalto	
1. Generalidades	
2. Propiedades físicas	
3. Propiedades químicas	
4. Importancia biológica	
5. Compuestos de Cobalto (II)	
5.1 Aspectos generales	
5.2 Compuestos organometálicos	
6. Complejos de Cobalto (II)	
6.1 Complejos catiónicos de cobalto (II)	
6.2 Complejos neutros de cobalto (II)	
6.3 Complejos aniónicos de cobalto (II)	
7. Propiedades magnéticas de los complejos de cobalto (II)	
II.5 Antecedentes de los complejos sintetizados	
II.6 Otros complejos con probada actividad biológica antituberculosis	
Capítulo III Síntesis y caracterización de los complejos de pirazinamida y cobalto	
III.1 Desarrollo Experimental	
1. Síntesis de los complejos	
1.1 Síntesis del complejo Co-PZA (1)	
1.2 Síntesis del complejo Co-PZA (2)	
2. Técnicas de caracterización	
2.1 Análisis elemental (C, H y N)	
2.2 Análisis de Absorción atómica (Co)	
2.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	
2.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)	
2.5 Medidas de susceptibilidad magnética	

- 2.6 Espectroscopía Ultravioleta y Visible (UV-Vis)
- 2.7 Espectroscopía Infrarroja (FTIR)
- 2.8 Espectroscopía Raman
- 2.9 Análisis de conductividad

Capítulo IV Resultados y discusiones

IV.1 Complejo Co-PZA (1)

- 1. Síntesis
- 2. Propiedades fisicoquímicas
 - 2.1 Punto de fusión
 - 2.2 Solubilidad
- 3. Composición química
 - 3.1 Análisis elemental de C, H y N
 - 3.2 Espectroscopía de absorción atómica de cobalto (Co)
 - 3.3 Determinación de cloruros por argentometría
 - 3.4 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
 - 3.5 Análisis termogravimétrico (TGA)
- 4. Medidas de susceptibilidad magnética
- 5. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)
- 6. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)
- 7. Espectroscopía Raman
- 8. Medidas de conductividad

IV.2 Complejo Co-PZA (2)

- 1. Síntesis
- 2. Propiedades fisicoquímicas
 - 2.1 Punto de fusión
 - 2.2 Solubilidad
- 3. Composición química
 - 3.1 Análisis elemental de C, H y N
 - 3.2 Espectroscopía de absorción atómica de cobalto (Co)
 - 3.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
 - 3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)
- 4. Medidas de susceptibilidad magnética
- 5. Espectroscopía UV-Visible (UV-Vis)
- 6. Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)
- 7. Espectroscopía Raman
- 8. Medidas de conductividad

Capítulo V Actividad biológica

V.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

- 1. Preparación de inóculo
- 2. Preparación de la placa con las drogas e inoculación de la cepa

V.2 Ensayo de Wayne

- 1. Preparación de células competentes para la expresión
- 2. Transformación de células competentes para la expresión
- 3. Expresión en células BL21(DE3)*pLys* de *E. coli*
- 4. Purificación de pirazinamidas recombinante
 - 4.1 Obtención del extracto crudo
 - 4.2 Cromatografía de afinidad
 - 4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE
 - 4.4 Concentración de la pirazinamidas
 - 4.5 Prueba de Bradford

V.3 Resultados y Discusiones

1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

1.1 Complejo Co-PZA (1)

1.1.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 7

1.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 6

1.2 Complejo Co-PZA (2)

1.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 7

1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 6

2. Ensayo de Wayne

2.1 Ensayo de Wayne cualitativo

2.2 Ensayo de Wayne cuantitativo

2.2.1 Ensayo de Wayne – Condiciones I

2.2.2 Ensayo de Wayne – Condiciones II

2.2.3 Ensayo de Wayne – Condiciones III

Capítulo VI Resumen de resultados y Conclusiones

Referencias bibliográficas

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la pirazinamida

Tabla 2. Propiedades físicas del Cobalto

Tabla 3. Complejos con ligandos pirazinamida

Tabla 4. Resumen de complejos con actividad biológica antituberculosis probada

Tabla 5. Condiciones del método utilizado en la cromatografía de alto rendimiento

Tabla 6. Solubilidad del complejo Co-PZA (1) y pirazinamida

Tabla 7. Porcentajes en masa experimentales y calculados de C, H y N del complejo Co-PZA (1)

Tabla 8. Valores de concentración y absorbancia de los estándares

Tabla 9. Datos de preparación de la muestra de complejo Co-PZA (1)

Tabla 10. Concentración final de cobalto (%Co) en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 11. Tabla comparativa de resultados de concentración de cobalto en Co-PZA (1)

Tabla 12. Datos del análisis de cloruros en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 13. Tabla comparativa de resultados de concentración de cloruros en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 14. Valores de concentración y área de los estándares de la curva de calibración de pirazinamida

Tabla 15. Datos de la preparación del complejo Co-PZA (1)

Tabla 16. Concentración HPLC (ug/L) y final de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 17. Tabla comparativa del porcentaje experimental y calculado de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 18. Tabla comparativa de valores experimental y calculado del porcentaje en masa del óxido de cobalto formado (CoO) en el análisis termogravimétrico del complejo Co-PZA (1)

Tabla 19. Valores de contribución diamagnética de los átomos en el complejo Co-PZA (1)

Tabla 20. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el patrón

Tabla 21. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el complejo Co-PZA (1)

Tabla 22. Momento magnético para algunos iones de metales de transición

Tabla 23. Asignación de grupos funcionales en el espectro infrarrojo de pirazinamida

Tabla 24. Desplazamientos importantes en el infrarrojo de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (1)

Tabla 25. Asignación de grupos funcionales en el espectro Raman de pirazinamida

Tabla 26. Desplazamientos importantes en el Raman de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (1)

Tabla 27. Regiones donde ocurren vibraciones debido al enlace metal-halógeno

Tabla 28. Resumen de los rangos de Λ M esperados para complejos de diferentes tipos de electrolitos a 10^{-3} M en solventes orgánicos comunes ($\text{cm}^2 \cdot \text{ohm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Tabla 29. Datos de conductividad en metanol a 25°C

Tabla 30. Solubilidad del complejo Co-PZA (2) y pirazinamida

Tabla 31. Porcentajes en masa experimentales y calculados de C, H y N del complejo Co-PZA (2)

Tabla 32. Datos de preparación de la muestra de complejo Co-PZA (2)

Tabla 33. Concentración final de cobalto (%Co) en el complejo Co-PZA (2)

Tabla 34. Tabla comparativa de resultados de concentración de cobalto en Co-PZA (2)

Tabla 35. Datos de la preparación del complejo Co-PZA (2)

Tabla 36. Concentración HPLC (ug/L) y final de pirazinamida en el complejo Co-PZA (2)

Tabla 37. Tabla comparativa del porcentaje de pirazinamida experimental y calculado en el complejo Co-PZA (2)

Tabla 38. Tabla comparativa de valores experimental y calculado del porcentaje en masa del óxido de cobalto formado (CoO) en el análisis termogravimétrico del complejo Co-PZA (2)

Tabla 39. Valores de contribución diamagnética de los átomos en el complejo Co-PZA (2).

Tabla 40. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el complejo Co-PZA (2)

Tabla 41. Tabla comparativa entre los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (2)

Tabla 42. Frecuencias de absorción y sus asignaciones para el ion NO_3^- (D_{3h})

Tabla 43. Frecuencias de absorción y sus asignaciones para el enlace M-ONO_2^- (C_{2v})

Tabla 44. Frecuencias de absorción de los picos relacionados al nitrato en el complejo Co-PZA (2)

Tabla 45. Desplazamientos importantes de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (2)

Tabla 46. Datos de conductividad en metanol a 25°C

Tabla 47. Componentes para la preparación del “Resolving y Stacking” gel para electroforesis

Tabla 48. Concentración mínima inhibitoria a pH 7 del complejo Co-PZA (1)

Tabla 49. Concentración mínima inhibitoria a pH 6 del complejo Co-PZA (1)

Tabla 50. Concentración mínima inhibitoria a pH 7 del complejo Co-PZA (2)

Tabla 51. Concentración mínima inhibitoria a pH 6 del complejo Co-PZA (2)

Tabla 52. Preparación de muestras para el ensayo de Wayne en pirazinamidasas de *M. tuberculosis* Wild Type (WT)

Tabla 53. Preparación de muestras para el ensayo de Wayne en pirazinamidasas de *M. tuberculosis* K48T

Tabla 54. Actividad enzimática de pirazinamidasas ($\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de pirazinamidasas) –
Condiciones I

Tabla 55. Actividad enzimática de pirazinamidasas ($\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de pirazinamidasas) –
Condiciones II

Tabla 56. Actividad enzimática de pirazinamidasas ($\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de pirazinamidasas) –
Condiciones III

Lista de figuras

Figura 1. Molécula de Pirazinamida

Figura 2. Mecanismo de acción de pirazinamida en *M. tuberculosis*

Figura 3. Conversión de nicotinamida y pirazinamida a su forma ácida por nicotinamidasa / pirazinamidasa

Figura 4. Representación de la estructura de la enzima pirazinamidasa de *Mycobacterium tuberculosis*

Figura 5. Vitamina B12

Figura 6. Algunos complejos modelo de vitamina B12

Figura 7. Reacción de formación de ciclopentadieno

Figura 8. Diagrama de ORTEP mostrando la estructura molecular del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$

Figura 9. Fotografía del complejo Co-PZA (1)

Figura 10. Gráfica Concentración de Cobalto (ppm) VS. Absorbancia

Figura 11. Gráfica Concentración de Pirazinamida VS. Área

Figura 12. Curva termogravimétrica del complejo Co-PZA (1)

Figura 13. Espectro UV del complejo Co-PZA (1)

Figura 14. Espectro Infrarrojo de la molécula de pirazinamida

Figura 15. Espectro infrarrojo del complejo Co-PZA (1)

Figura 16. Espectro Raman de la molécula de pirazinamida

Figura 17. Espectro Raman del complejo Co-PZA (1)

Figura 18. Rangos generales de vibraciones por enlace metal-halógeno

Figura 19. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (1)

Figura 20. Fotografía del complejo Co-PZA (2)

Figura 21. Curva termogravimétrica del complejo Co-PZA (2)

Figura 22. Espectro UV del complejo Co-PZA (2)

Figura 23. Espectro infrarrojo del complejo Co-PZA (2)

Figura 24. Desdoblamiento de bandas del ion nitrato a nitrato covalente

Figura 25. Espectro infrarrojo de nitrato de cobalto hexahidratado

Figura 26. Espectro Raman del complejo Co-PZA (2)

Figura 27. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (2)

Figura 28. Distribución de muestras en placa de 96 pozos para la determinación de la MIC

Figura 29. Fotografía de las placas de 96 pozos donde se determinó la MIC de pirazinamida, las sales precursoras, los complejos y las mezclas de las sales y pirazinamida a pH 7 de *M. tuberculosis* (a) Wild Type H37Rv (b) Wild Type resistente DM97 (c) MDR D49N

Figura 30. Fotografía de las placas de 96 pozos donde se determinó la MIC de pirazinamida, las sales precursoras, los complejos y las mezclas de las sales y pirazinamida a pH 6 de *M. tuberculosis* (a) Wild Type H37Rv (b) Wild Type resistente DM97 (c) MDR D49N

Figura 31. Ensayo de Wayne cualitativo en pirazinamidasa de *M. Tuberculosis* Wild Type

Figura 32. Ensayo de Wayne en pirazinamidasa de *M. Tuberculosis* K48T cualitativo

Figura 33. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasas frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones I

Figura 34. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasas frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones II

Figura 35. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasas frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones III

Lista de abreviaciones

OMS	Organización mundial de la Salud
TB	Tuberculosis
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
TB-MDR	Tuberculosis multidrogorresistente
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
RAIT	Riesgo anual de infección por tuberculosis
TB XDR	Tuberculosis extensamente resistente
PZA	Pirazinamida
MIC	Concentración mínima inhibitoria
TEMA	Tetrazolium microplate assay
POA	Ácido pirazinoico
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>M. bovis</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>M. leprae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Cys	Cisteína
Asp	Asparagina
Lys	Lisina
Ser	Serina
His	HistidinA
metOH	Metanol
HPLC	High performance liquid chromatography
FTIR	Fourier tranform infrared spectroscopy
ATR	Attenuated total reflectance
UV-VIS	Ultravioleta visible
EECC	Energía de estabilización de campo cristalino
Medio LB	Medio Luria-Bertani
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Trometamina)
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	Tetrametiletilendiamina
BSA	Albúmina de suero bovino

Capítulo I.

Introducción

I.1 Objetivos

1. Objetivos generales

✓ Sintetizar dos complejos de Cobalto (II) con pirazinamida (PZA): Co-PZA (1) y Co-PZA (2), utilizando dos sales precursoras de cobalto: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ respectivamente.

✓ Caracterizar los complejos Co-PZA (1) y Co-PZA (2) utilizando técnicas fundamentales fisicoquímica y de espectrofotometría.

2. Objetivos específicos

✓ Elucidar y proponer tanto la fórmula molecular como la estructura química para cada complejo sintetizado en base a los resultados de la caracterización.

✓ Evaluar la actividad biológica de los complejos, enfocando la actividad antituberculosa, para ello se propone:

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los complejos frente a un cultivo microbiológico TEMA, utilizando cepas de *M. tuberculosis* nativas H37Rv y cepas altamente resistentes denominadas multidrogorresistentes (MDR).
2. Evaluar la concentración de producción de ácido pirazinoico mediante un ensayo de Wayne.

I.2 Justificación

La tuberculosis (TB) continúa siendo un importante problema de salud global. Según las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tuberculosis en el año 2019 afectó alrededor de 10 millones de personas y fue responsable de la muerte de 1.4 millones de personas a nivel mundial [1]. En nuestro país la tuberculosis es una importante causa de morbilidad en el grupo de jóvenes y adultos, se reportan casos en todos los departamentos del país, pero la enfermedad se concentra principalmente en los departamentos de la costa central y la selva [2].

La resistencia a los fármacos antituberculosos es un problema emergente que ha complicado de cierta manera el control de la enfermedad. En nuestro país se ha observado un incremento de casos de TB MDR y de tuberculosis extensamente resistente (TB XDR) [2].

Por ello, la necesidad de identificar nuevos agentes terapéuticos que permitan superar las limitaciones actuales de los esquemas de tratamiento frente a los casos de tuberculosis drogorresistente.

El hecho de que en el mecanismo de acción de la pirazinamida esté incluida una metaloproteína, como lo es la pirazinamidasa [3], es señal de que la presencia de centros metálicos probablemente intervengan en el mecanismo de actividad biológica de la pirazinamida, por lo que aprovechar la propiedad de transporte del metal o inclusive la potenciación del fármaco por la presencia del mismo, como se ha comprobado para otros metalofármacos anticancerígenos de platino (Pt), antirreumáticos de oro (Au), antiinflamatorios de cobre (Cu) o bactericidas de plata (Ag) [4, 5, 6, 7], etc., se hace necesaria para la síntesis de derivados metalados de pirazinamida como un nuevo tipo de agente terapéutico.

En este trabajo en particular se ha planteado la síntesis de dos derivados de pirazinamida que incluyen un centro metálico de Cobalto (II), con la finalidad de mejorar la actividad

antituberculosa de pirazinamida. Como ha sido antes probado en muchos casos, los complejos metálicos son más potentes que los fármacos puros [8].

Debido a que el mecanismo de acción de pirazinamida no es completamente comprendido [9], existen muchos factores que podrían afectar de manera positiva en la actividad antituberculosa. Siendo una de las principales hipótesis en cuanto a la actividad biológica, la posibilidad de que los complejos metálicos sean hidrolizados por una enzima pirazinamidasa de una cepa mutante, normalmente inactiva frente a pirazinamida estándar [3]. Esto basado en la premisa de que un metal unido a pirazinamida cumpliría el mismo rol que cumple dentro de una metaloenzima como la pirazinamidasa.

Capítulo II.

Antecedentes

II.1 Tuberculosis

De acuerdo con la Organización mundial de la Salud (OMS), enfermedades infecciosas y parasitarias son la mayor causa de enfermedades humanas en todo el mundo, en particular, tuberculosis (TB), una antigua y actualmente reemergente enfermedad infecciosa, sigue siendo un problema de salud pública al principio del siglo 21 [10].

La tuberculosis es una enfermedad transmisible y es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso (por encima de VIH/SIDA). En 2019, alrededor de 10 millones de personas desarrollaron tuberculosis y 1.4 millones murieron. La tuberculosis es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que se transmite cuando las personas enfermas de tuberculosis expulsan bacterias al aire; por ejemplo, al toser. Esta enfermedad generalmente afecta a los pulmones (TB pulmonar), pero también puedes afectar otros órganos (TB extrapulmonar) [1].

La tuberculosis puede afectar a cualquier ser humano en cualquier parte del mundo, pero la mayoría que ha desarrollado la enfermedad (aproximadamente el 90%) son adultos; existen más casos en hombres (56%) que en mujeres (32%); y de los que enfermaron de tuberculosis en 2019 el 87% estaban en 30 de los países con alta carga de tuberculosis. La tasa de casos a nivel nacional varía desde menos de 5 a más de 500 por 100000 habitantes por año. Las personas afectadas por la tuberculosis a menudo enfrentan dificultades económicas (pobreza), vulnerabilidad, marginación, estigmatización y discriminación. Aproximadamente la cuarta parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* [1].

La tuberculosis es curable y prevenible. La mayoría (cerca del 85%) que desarrolla tuberculosis puede ser exitosamente tratado con un régimen de fármacos de 6 meses; el tratamiento tiene el beneficio adicional de reducir la trasmisión de la infección. Desde el 2000, el tratamiento de la tuberculosis ha evitado más de 60 millones de muertes, aunque con el

acceso por debajo de la cobertura sanitaria universal todavía, muchos millones también se han perdido el diagnóstico y la atención. El tratamiento preventivo está disponible para personas con infección por tuberculosis. El número de personas que desarrollan infecciones y enfermedades (por lo tanto, el número de muertes) puede ser reducido mediante acciones multisectoriales para abordar los determinantes de la tuberculosis, como la pobreza, desnutrición y la infección por VIH, la diabetes y el tabaquismo [1].

La OMS estimó 282000 casos nuevos y recaídas de TB para la región de las américas para el 2017, un 3% de la carga mundial de TB (10 millones de casos) y una tasa de incidencia de 28 por 100000 habitantes. En las américas, la tasa de incidencia más alta se observó en el caribe (61.2 por 100000 habitantes), seguido de américa del sur (46.2), américa central y México (25.9) y Norte américa (3.3). Para el 2017 se estimó que el 87% de los casos de TB se encontraban en diez países. Un poco más de la mitad se concentran en Brasil Perú y México [11].

En el 2018, las muertes estimadas para la región de las américas fueron 22900 (21200 – 25600), de las que 26% (5900) correspondieron a personas con coinfección por la TB y el VIH (coinfección por TB/VIH). Se estima que entre 2017 y 2018 hubo 1000 muertes menos en la región. Esta diferencia se explica principalmente por el descenso en las muertes estimadas de Brasil (200), México (100) y Perú (100). Entre 2010 y 2018, la velocidad de descenso media de la tasa de mortalidad estimada por TB fue de 3.1% anual para las muertes sin asociación con VIH. El descenso de la mortalidad asociada con VIH fue menos en ese mismo periodo, con un promedio de 2.4% anual [12].

En la región de las américas se estimaron 289000 casos incidentes de TB en el 2018 (3% de los casos mundiales). De ellos, 185000 (64%) correspondieron a hombres de 15 años a más; 15000 (5.5%) eran personas menores de 15 años. La tasa de incidencia estimada para la

región fue de 28.7 por 100000 habitantes, con tendencia al aumento en los últimos 5 años. Entre el 2017 y el 2018, el número de casos de TB estimados en las américas aumentó 2.5% (8000 casos más estimados de TB), debido principalmente al incremento de las estimaciones para Brasil (4000), Perú (2000), México (1000) y Venezuela (1000). En el 2018, 69% de los casos estimados de TB correspondieron a cinco países (Brasil, Perú, México, Haití y Colombia) y 86% a doce países [12].

Los estudios nacionales para estimar el riesgo anual de infección por tuberculosis (RAIT), realizados en nuestro país durante los últimos 30 años, reportaron cambios importantes en los patrones de transmisión de *M. tuberculosis*. En los años 1994-1995, en Lima y Callao el RAIT estimado fue 1.5% y en otras ciudades del país fue 7 veces menor (0.2%); para los años 2004-2005 se estimó un RAIT muy similar tanto para Lima-Callao (0.83%) y el resto de las ciudades del país (0.76%), pero que, comparado con el periodo anterior, en Lima-Callao se observó una reducción de casi la mitad y para el resto de las provincias un incremento de 4 veces; la estimación para los años 2008 y 2009 el RAIT fue muy similar al periodo anterior. Desde el fortalecimiento del programa de control de la tuberculosis en la década de los 90 hasta el año 2003, en el país se observó una disminución sostenida en la incidencia de TB mayor al 8% anual. Posterior a esta época la tendencia se mantuvo casi estacionaria, observándose una disminución promedio anual de 2%. Para el año 2014 se reportaron en nuestro país alrededor de 27350 casos nuevos de TB y la incidencia de TB reportada fue de 88.8 casos nuevos por cada 100 mil habitantes. En los últimos 2 años (2013 al 2014) cinco departamentos (Madre de Dios, Ucayali, Loreto, Lima, e Ica) presentaron incidencia de TB por encima del nivel nacional, estos departamentos reportaron el 72% de los casos nuevos notificados en el país. Lima es el departamento que más casos de tuberculosis concentra en el país (60%) y, es el tercer departamento con la incidencia más alta; el mayor porcentaje de casos se concentran en la

provincia metropolitana de Lima, y en sus distritos de San Juan de Lurigancho, Rímac, La Victoria, El Agustino, Ate, Santa Anita y Barranco [2].

La información estimada de mortalidad por TB en nuestro país muestra que se alcanzó la meta de reducir a la mitad la mortalidad por TB respecto al año 1990, con una disminución estimada del 71%, de 34 muertes por TB por cada 100 mil habitantes en el año 1990 a una disminución de 9.8 para el año 2012. También para el año 2012, 8 departamentos tuvieron tasas superiores al nivel nacional: Ucayali, Loreto, Moquegua, Huánuco, Madre de Dios, Tacna, Lima y Callao. El 65% de las defunciones por TB ocurrieron en personas mayores de 50 años. La edad promedio de muerte por TB varió entre 50 y 55 años y se mantuvo con una tendencia casi estacionaria en el periodo de análisis [2].

Como resultado, TB es una de las principales causas actuales de muerte en el mundo. La OMS estima que alrededor de 30 millones de personas van a ser infectadas en los siguientes 20 años, no solo en países en desarrollo sino también en países desarrollados. Debido a estos factores, tuberculosis recibe un mayor nivel de atención de los sistemas de salud que otras enfermedades transmisibles [13].

II.2 Pirazinamida

Pirazinamida, con su fórmula general $C_5H_5N_3O$ (*Figura 1*) es un miembro de la familia pirazina y es conocida como un muy efectivo agente antimicobacteriano, con un rol bien establecido en el tratamiento de tuberculosis, siendo capaz de acortar la terapia de tuberculosis de 9-12 a 6 meses [14]. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la *Tabla 1*.

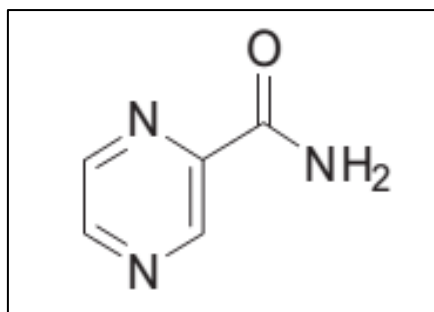


Figura 1. Molécula de Pirazinamida

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la pirazinamida [9, 15]

Apariencia	Cristales finos blancos
Peso molecular	123.11 g/mol
Punto de fusión	192 °C
Solubilidad a 25 °C	Agua : 15 mg/mL Metanol : 13.8 mg/mL Cloroformo : 7.4 mg/mL Etanol : 5.7 mg/mL Isopropanol : 3.8 mg/mL

1. Información biológica básica.

El mecanismo de acción de pirazinamida es escasamente comprendido: el ácido pirazinoico, la forma activa de pirazinamida ha demostrado inhibir varias funciones en *M. tuberculosis* a pH ácido [16,17].

La evidencia experimental sugiere que pirazinamida ingresa por difusión pasiva en *M. tuberculosis* y es convertida a ácido pirazinoico (POA) en el citoplasma por la enzima pirazinamidasa (también llamada nicotinamidasa). Una vez convertido, POA se acumula y una porción sale de la célula, y siempre que el medio tenga un pH ácido, POA se protona (HPOA) y vuelve a ingresar, lo que podría contribuir con la disrupción del potencial de membrana [17, 18]. Un sistema de flujo de salida ineficiente hace que el HPOA se difunda a una velocidad

mayor que su flujo de salida [17]. La acumulación de POA y HPOA disminuye el pH intracelular a un nivel subóptimo que puede inactivar muchas rutas incluyendo funciones de transporte de membrana y síntesis de ácidos grasos, causando daño celular [17, 18]. (Figura 2)

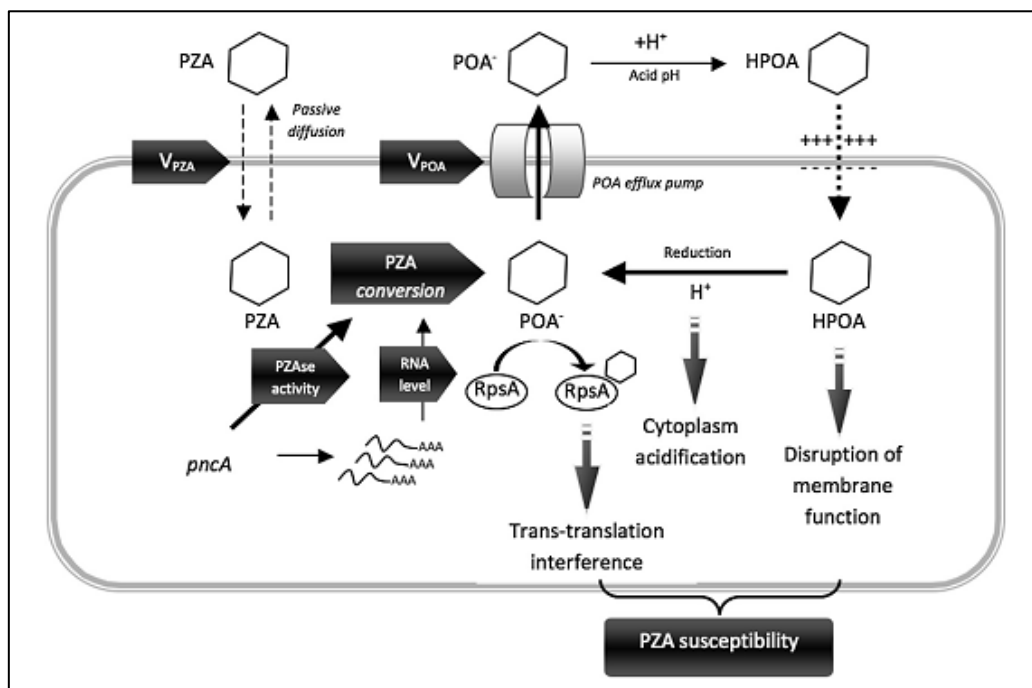


Figura 2. Mecanismo de acción de pirazinamida en *M. tuberculosis*

2. Mecanismo de resistencia al fármaco.

Las mutaciones resistentes a pirazinamida son usualmente encontradas en la enzima convertidora pirazinamidasa [19]. Aunque un estudio reciente identificó una proteína ribosomal S1 (RpsA), particularmente importante en el estado latente, como un localizador de ácido pirazinoico. POA se une a RpsA inhibiendo la trans-traducción, por lo que una mutación en RpsA podría producir resistencia a pirazinamida [20, 21].

Las mutaciones en pirazinamidasa son inusualmente localizadas, se extienden por todo el gen, pero hay tres áreas de mutaciones agrupadas alrededor de los aminoácidos 3-71, 61-85 y 132-142. [22] La pirazinamida se acumula, probablemente como ácido pirazinoico, dentro de *M. tuberculosis* sensible pero no dentro de una cepa resistente, posiblemente por la falta de

la enzima convertidora [23]. Un pequeño número de mutaciones resistentes a pirazinamida ocurren fuera del gen de *pncA* (codificado por pirazinamidasa) pero no han sido completamente caracterizadas [22].

3. Potencial *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) para *M. tuberculosis* es reportada como 6-50 ug/mL a pH 5.5 [18] pero >2000 ug/mL en *Escherichia coli* y *M. smegmatis* al mismo pH. Un monitoreo cauteloso es necesario durante la medición de la MIC, la densidad bacteriana y la albúmina de suero pueden afectar los resultados [18, 24].

Específicamente, la MIC90 a pH 5.5 es 50 ug/mL, a pH 5.8 es 100 ug/mL y a pH 5.95 es 200 ug/mL [24].

4. Espectro de actividad.

Hipotéticamente, la pirazinamida actúa específicamente para especies de micobacteria, ejerciendo sus propiedades antibacterianas bajo condiciones de pH ácido. *M. bovis* y *M. leprae* son innatamente resistentes a pirazinamida. Pirazinamidasa está ampliamente distribuida en la bacteria aun cuando la eficacia de pirazinamida es limitada a *M. tuberculosis* y otros pocos organismos. Todas las cepas micobacterianas de bovinos carecen de actividad de pirazinamidasa debido a la mutación puntual en el gen de *pncA*. *M. smegmatis* y es también resistente a pirazinamida probablemente debido al muy eficiente sistema de flujo de salida que no permite la acumulación de ácido pirazinoico dentro de la célula [18].

5. Otras actividades *in vitro*.

Las condiciones anaerobias mejoran la actividad de pirazinamida [23]. Cultivos más antiguos de *M. tuberculosis* parecen ser un poco más sensibles a pirazinamida [25] y tienen un potencial de membrana más débil en comparación con cultivos frescos [17]. Bajo algunas

condiciones la actividad bactericida es inversamente proporcional a la absorción de uridina, reflejando la actividad de pirazinamida contra bacilos persistentes *in vivo* [25]. Un experimento mostró actividad de pirazinamida contra persistores de *E. coli* después del tratamiento con ampicilina [26]. La actividad de pirazinamida contra *M. tuberculosis* en macrófagos es controversial [27] aunque muchos autores reportaron alguna actividad [23]. Pirazinamida ha demostrado ser eficaz en los ensayos de sangre pura [28] en los que se usó la sangre colectada de un donador tratado con medicamentos como medio para cultivar los bacilos.

6. Eficacia en humanos.

Pirazinamida es generalmente usado en combinación con otros fármacos como isoniazida, rifampicina en el tratamiento de micobacteria tuberculosis. El régimen de tratamiento más usado a menudo: inicialmente isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol diariamente por dos meses, seguido por isoniazida y rifampicina tres veces a la semana por cuatro meses. Las dosis específicas y los tiempos de tratamiento específicos varían y se pueden encontrar detalles en muchas fuentes, incluidos los Centros para el control de enfermedades y la OMS [9].

Pirazinamida acorta la terapia de 11 a 6 meses al matar organismos no afectados por otros medicamentos antituberculosos, especialmente en ambientes ácidos. Pirazinamida utilizada en los primeros dos meses de tratamiento reduce la duración del tiempo requerido, pirazinamida también redujo la tasa de recaídas de 22 a 8% cuando se agrega a una combinación con isoniazida y estreptomina. [18, 29] Esto atraviesa las meninges inflamadas y es una parte esencial del tratamiento de la meningitis tuberculosa [9].

7. Reacciones adversas en humanos.

Los efectos secundarios incluyen daño hepático, artralgias, anorexia, náuseas y vómitos, disuria, malestar y fiebre, anemia sideroblástica.

Pueden producirse efectos adversos sobre el mecanismo de coagulación de la sangre o la integridad vascular, y reacciones de hipersensibilidad como urticaria, prurito y erupciones en la piel. Pirazinamida está contraindicado en personas con daño hepático severo o con gota aguda. Pirazinamida debe suspenderse y no reanudarse si aparecen signos de daño hepatocelular o hiperuricemia acompañada de una artritis gotosa aguda [9].

II. 3 Pirazinamidasas

La nicotinamidasas/pirazinamidasas (pirazinamidasas) de *M. tuberculosis* está involucrada en la activación del importante fármaco antituberculoso de primera línea pirazinamida, por la conversión a su forma activa, ácido pirazinoico (Figura 3). Pirazinamidasas es codificado por el gen *pncA* para su actividad contra *M. tuberculosis* [18, 30 y 31].

Dado que las mutaciones en *pncA* fueron asociadas con la resistencia a pirazinamida [32], muchos grupos de investigadores han identificado varias mutaciones en *pncA* que pueden llevar a la pérdida de actividad de pirazinamidasas, y estas mutaciones son consideradas en ser la principal razón para la resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis* [22, 33-41].

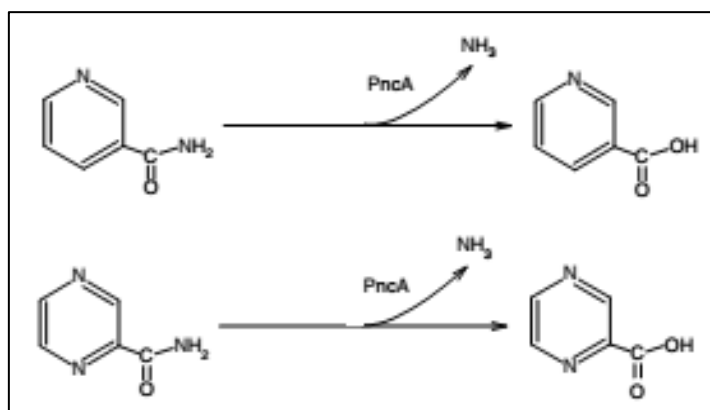


Figura 3. Conversión de nicotinamida y pirazinamida a su forma ácida por nicotinamidasas/pirazinamidasas

Pirazinamidasas ha sido encontrada en muchos microorganismos como *Escherichia coli*, *Flavobacterium peregrinum*, *Torula cremoris* y *Saccharomyces cerevisiae* [42-45]. La enzima

está involucrada en la conversión de nicotinamida a ácido nicotínico. Las características bioquímicas de ciertas pirazinamidasa de bacterias han sido estudiadas pero la pirazinamidasa de *M. tuberculosis* no había sido bien caracterizada. En 1988, Boshoff and Mizrahi [46] intentaron caracterizar pirazinamidasa de *M. tuberculosis* usando la proteína parcialmente purificada. En 2001, Lemaitre et al. [47] determinó la actividad de pirazinamidasa de nueve mutantes de origen natural que llevan una única sustitución de aminoácidos, y especuló que una disminución en la actividad de pirazinamidasa estaba relacionada con sus modificaciones estructurales causadas por las mutaciones en el sitio activo putativo Cys138. Residuos como Asp8, Lys96 y Ser104 han sido propuestos para jugar un rol en el funcionamiento del centro catalítico de pirazinamidasa, como estos tres residuos son localizados cerca de la Cys138 y drásticamente perjudican la actividad enzimática de las pirazinamidasa mutadas. Du [48] condujo una investigación correlativa y resolvió la estructura cristalina tridimensional de pirazinamidasa de *Pyrococcus horikoshii* (37% secuencia de aminoácidos idénticos con pirazinamidasa de *M. tuberculosis*). En sus estudios, ellos sugieren que Asp10, Lys94 y Cys133 (Asp8, Lys96 y Cys138, respectivamente en *M. tuberculosis*) fueron centros catalíticos y que Asp52, His54 y His71 (Asp49, His51 y His71, respectivamente en *M. tuberculosis*) fueron sitios de unión al centro metálico Zn^{2+} . Ellos también propusieron que el residuo Cys133 de pirazinamidasa probablemente ataca al carbono del grupo carbonilo de pirazinamida para formar una enzima acilada a través del tiolato después de ser activado por Asp10, y liberar amoníaco; el agua activada con zinc luego ataca el carbono del grupo carbonilo del enlace tioéster. A través del enlace de otra molécula de agua, los reactantes liberan ácido pirazinoico. El residuo Lys94 está luego en una posición para formar un par iónico ya sea con Asp10 o Cys133 [48].

En el 2007 un estudio reveló que pirazinamidasa es una proteína monomérica de 20.89 kDa. El pH y temperatura óptimos para su actividad enzimática fue de 7.0 y 40 °C,

respectivamente. La espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo reveló que la enzima es una proteína que contiene Mn^{2+}/Fe^{2+} con una proporción molar de $[Mn^{2+}]$ a $[Fe^{2+}]$ de 1:1; además, la adición externa de cualquiera de los iones metálicos no tuvo un efecto aparente sobre la actividad enzimática de pirazinamidasas proveniente de una cepa nativa (*wild type*). Para ello se removieron completamente los iones metálicos de manganeso y hierro por diálisis de una enzima *wild type*. Luego fueron añadidos Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} a la enzima y apoenzima en una concentración final de 2 mM, siendo incubados por 24 horas a 4 °C. La actividad enzimática no fue afectada por los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} y Fe^{2+} , pero si fue inhibido por los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+} en la enzima. Sin embargo, la actividad enzimática en la apoenzima fue restaurada por Mn^{2+} y Fe^{2+} en un 80-90% pero no por Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{3+} . Este resultado sugiere que Mn^{2+} y Fe^{2+} pueden ser grupos prostéticos de pirazinamidasas de *M. tuberculosis* [31].

En el 2011 otro estudio confirmó que la pirazinamidasas es una metaloenzima que contiene Fe^{2+} coordinado por un aspartato y tres histidinas en una disposición bipiramidal tetragonal distorsionada por las cadenas laterales de los residuos His51, His71 y dos moléculas de agua H_2O 220 y 221 en posición ecuatorial, y cadenas laterales de Asp49 y His57 en posición axial (*Figura 4*) [49].

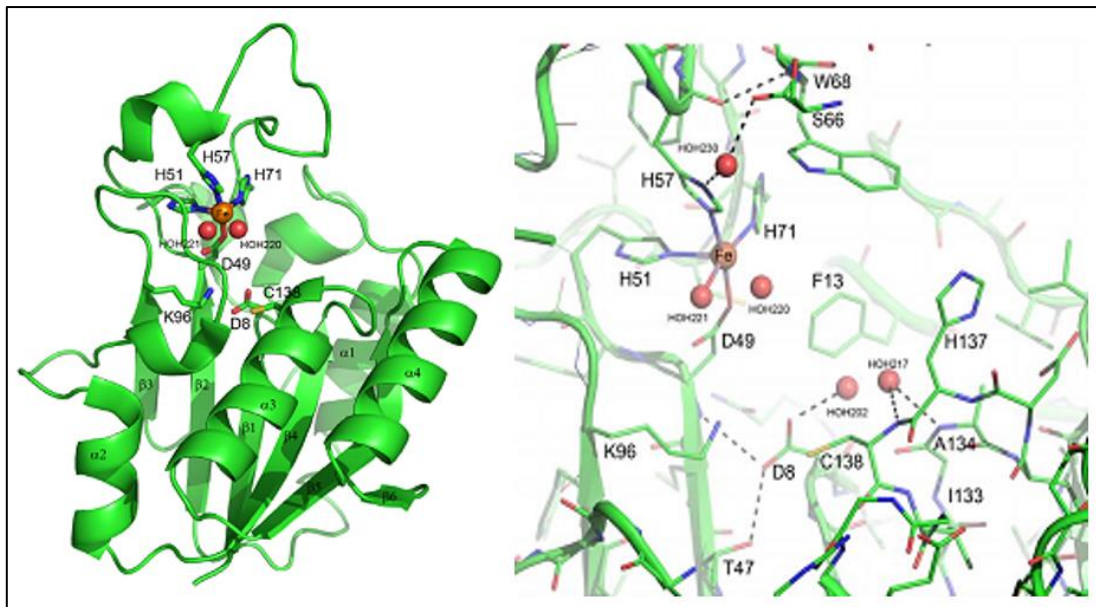


Figura 4. Representación de la estructura de la enzima pirazinamidasa de *Mycobacterium tuberculosis*

En el 2012 Sheen et. al [3] evaluaron el rol de diversos iones metálicos divalentes en la actividad de pirazinamidasa de *M. tuberculosis*. Para determinar el efecto de los metales divalentes sobre la pirazinamidasa, la pirazinamidasa natural recombinante correspondiente a la cepa de referencia susceptible a la pirazinamida H37Rv se expresó en *Escherichia coli* con y sin un carboxi terminal. La pirazinamidasa marcada con His se inactivó por agotamiento del metal y se reactivó mediante titulación con metales divalentes. Aunque Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} restauraron la actividad pirazinamidasa, solo el Co^{2+} mejoró la actividad enzimática a niveles más altos que la pirazinamidasa *wild type*. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Mg^{2+} no restauraron la actividad en las condiciones evaluadas.

II.4 Cobalto

1. Generalidades.

El metal fue aislado y reconocido por primera vez como un elemento por el químico sueco Brandt en 1735 [50]. El cobalto constituye cerca del 0.001% de la corteza terrestre. Esta

ampliamente distribuido pero los minerales principales que pueden ser comercialmente explotados son los arseniuros, sulfuros y los óxidos [51]. En cuanto a sus propiedades nucleares, el isótopo natural ^{59}Co es convertido a su núcleo isomérico ^{60}Co térmicamente en un reactor por bombardeo con neutrones. Ambos isómeros decaen al isótopo no radiactivo de níquel, ^{60}Ni , por emisión de rayos β y γ . ^{60}Co es ampliamente usado como fuente de radiactividad, es decir, como una fuente concentrada de rayos γ en investigaciones de química de radiación y biológicos [52].

2. Propiedades físicas.

Cobalto es un metal blanco plateado parecido al hierro o níquel puro en apariencia. Cobalto es más duro que el hierro. Las propiedades físicas del cobalto (*Tabla. 2*) son muy dependientes no solo de su pureza sino también de su forma alotrópica presente. Así como el hierro y níquel, el cobalto es ferromagnético [53, 54].

Tabla 2. Propiedades físicas del Cobalto

Número atómico	27
Configuración electrónica	$1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^7 4s^2$
Punto de fusión (°C)	1493
Punto de ebullición (°C)	3100
Densidad (g/cm³)	8.90

3. Propiedades químicas.

Cobalto absorbe muy poco hidrógeno incluso a altas temperaturas y en nitrógeno es prácticamente insoluble hasta 1200 °C. El cobalto finamente dividido es pirofórico en el aire, pero el metal compacto es apenas atacado por debajo de 300 °C. La escala del óxido en el cobalto calentado en aire u oxígeno hasta 900 °C consiste en una capa exterior de Co_3O_4 y una capa de CoO próxima al metal; por encima de 900 °C, el Co_3O_4 se descompone y consiste

únicamente de CoO. El cobalto reacciona con muchos elementos no metálicos cuando se calienta, por ejemplo, los halógenos, el boro, azufre, fósforo, arsénico y antimonio; las reacciones a menudo proceden con incandescencia [50].

4. Importancia biológica.

Cobalto es un elemento traza vital en la nutrición animal. Los rumiantes que se alimentan de pastos deficientes de cobalto exhiben crecimiento retardado, pérdida de apetito y anemia; una rápida recuperación ocurre al alimentar a estos animales con una dieta suplementada con cobalto. Por lo tanto, las sales de cobalto no son consideradas específicamente tóxicas para los animales, pero para los humanos, estas pueden irritar el tracto intestinal en altas dosis y causar náuseas, vómitos y diarrea [55]. Pequeñas cantidades de cobalto, sin embargo, son invaluableles en el tratamiento de la anemia perniciosa. El descubrimiento en 1926 del factor antipernicioso de la anemia en el hígado llevó al descubrimiento en 1948 de la vitamina B₁₂, que poco después se demostró que contenía cobalto. La vitamina B₁₂, cianocobalamina (*Figura 5*), contiene cobalto en estado de oxidación +3. Esta vitamina se asemeja a la porfirina, pero difiere en que tiene cuatro anillos pirrolina en lugar de cuatro anillos pirroles. El átomo de cobalto está rodeado octaédricamente por cinco átomos de nitrógeno (cuatro provenientes de los anillos pirrolina y uno proveniente del anillo benzimidazol) y un átomo de carbón del ligando ciano. El ligando ciano puede ser reemplazado por otros aniones; por ejemplo, en la vitamina B_{12a}, es hidroxocobalamina y en la vitamina B_{12c}, es nitritocobalamina [50].

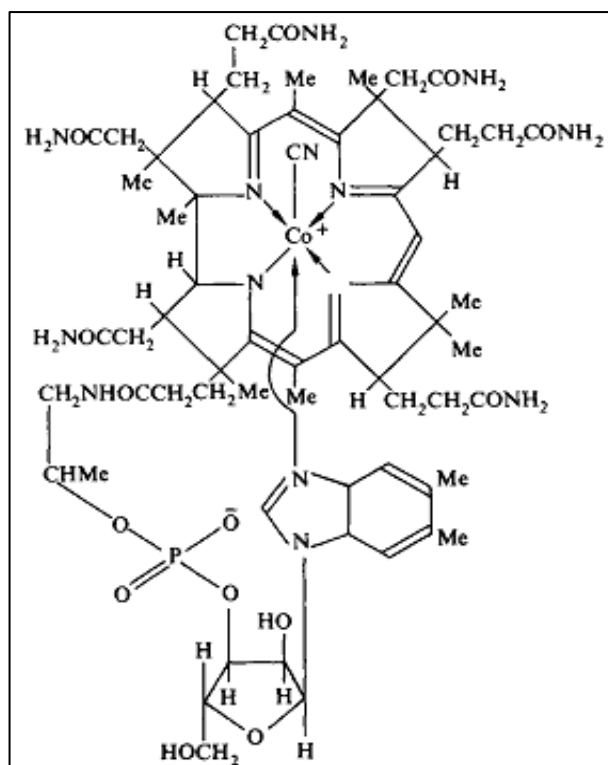


Figura 5. Vitamina B12

5. Compuestos de Cobalto (II).

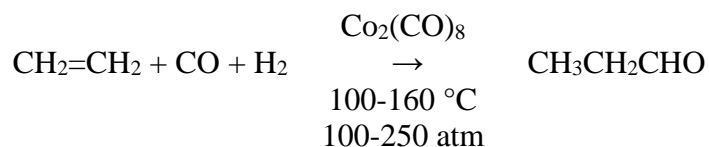
5.1 Aspectos generales.

Los principales estados de oxidación de cobalto son +2 y +3. En ausencia de ligandos que no sean agua, las soluciones de cobalto (II) contienen el ion hexaacuoso rosado $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ y este es el estado termodinámicamente más estable. El ion $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ de cobalto (III) es un agente oxidante muy poderoso, de hecho oxidará el agua a oxígeno. Por lo tanto, en ausencia de agentes acomplejantes, las sales simples de cobalto (III) no son estables en solución acuosa. En presencia de ligandos, como el ligando amino, que estabilizan el cobalto (III), la oxidación de cobalto (II) a cobalto (III) se vuelve mucho más favorable e incluso puede ser provocada por el oxígeno atmosférico. Con algunos ligandos, como ciano, la estabilización es tan pronunciada que el complejo de cobalto (II) reduce agua a hidrógeno. Cobalto (II) forma un largo número de sales simples que son estables en soluciones acuosas neutras o ácidas, mientras que las sales simples de cobalto (III) son menos comunes y estables en solución acuosa. Los

complejos de cobalto (III) son, sin embargo, numerosos y estables y han jugado un rol importante en el desarrollo de la química de coordinación [50].

5.2 Compuestos organometálicos.

El uso de octacarbonilo de dicobalto como un catalizador en una variedad de síntesis orgánicas ha permitido estudiar una extensa e importante química organometálica del cobalto. Como ejemplos del uso del catalizador de carbonilo de cobalto, podemos citar la reacción de hidroformilación (OXO) que permite la preparación de aldehídos a partir de alquenos, monóxido de carbono e hidrógeno [50]:



Por otro lado, la vitamina B₁₂ puede ser considerada un alquilo natural de cobalto, en esta vitamina, cobalto esta enlazado a un grupo adenosil vía un σ -enlace Co-C. Las alquilcobalaminas pueden ser preparadas por la acción de haluros de alquilo, olefinas o acetilenos en la forma reducida de cianocobalamina (vitamina B₁₂). Un número de complejos de cobalto con sistemas muy parecidos al de la vitamina B₁₂ han sido investigados. Estos incluyen los complejos aetioporfirina (*Figura 6a*), dimetilglioxima (*Figura 6b*) y las bases de Schiff (*Figura 6c*) [50].

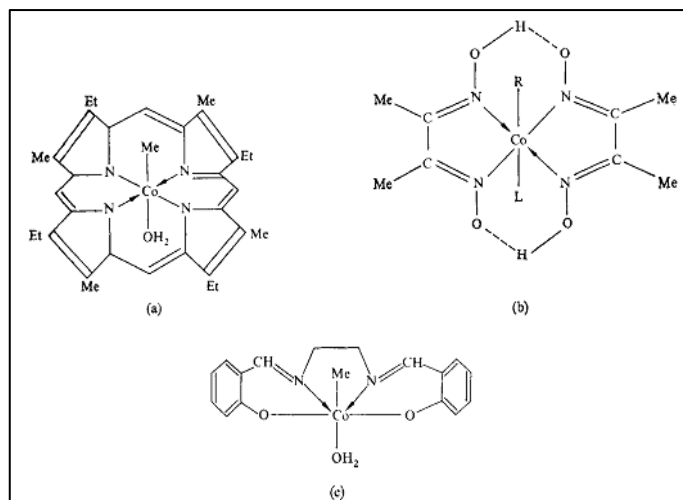


Figura 6. Algunos complejos modelo de vitamina B₁₂

El cobalto no forma fácilmente complejos con mono-olefinas pero se han descrito varios compuestos con di-olefinas. La adición de un hidruro al ion cobaltoceno resulta en la formación de un complejo ciclopentadieno (*Figura 7*) [50]:

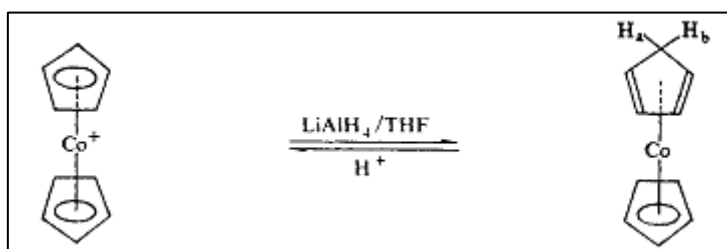


Figura 7. Reacción de formación de ciclopentadieno

6. Complejos de Cobalto (II).

Los complejos de cobalto (II) son muy numerosos. La mayoría de estos complejos tienen básicamente una estructura octaédrica o tetraédrica teniendo usualmente colores anaranjado-rosado o azul-violeta respectivamente. Cobalto (II) forma más complejos tetraédricos que otros iones de metales de transición; la diferencia relativamente baja en las energías de estabilización del campo cristalino entre los complejos octaédrico y tetraédrico de cobalto (II) (d^7) es parcialmente responsable de esto [56].

6.1 Complejos catiónicos de Cobalto (II).

El ion hexaacuado $[Co(H_2O)_6]^{2+}$. Este ion rosado está presente en la estructura cristalina de $Co(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $CoSO_3 \cdot 6H_2O$ y $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, esto está también presente en soluciones acuosas de sales de cobalto (II) de aniones no acomplejantes, junto con pequeñas cantidades de iones tetraédricos $[Co(H_2O)_4]^{2+}$ [57].

Otros cationes $[CoL_X]^{2+}$. Muchas sales de cobalto (II) reaccionan con amoniacó para formar amoniatos, seis moléculas de amoniacó que generalmente se combinan con la sal. Mientras que estas aminas pueden ser preparadas en solución acuosa en presencia de exceso de amoniacó, ellas son rápidamente oxidadas en este medio. El ion $[Co(NH_3)_6]^{2+}$ es descompuesto por agua pura. La estructura cristalina de $CoX_2 \cdot 6NH_3$ ($X = Cl, Br, I, ClO_4, BF_4, PF_6$ y SO_3F) posee átomos de cobalto octaédricamente rodeado por moléculas de amoniacó [50].

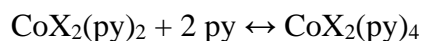
En algunos solventes y con algunas sales de cobalto, también ocurre la autoformación de complejos [58]: $2CoCl_2 + 6DMSO \rightarrow [Co(DMSO)_6]^{2+} + [CoCl_4]^{2-}$

Los ligandos bidentados frecuentemente forman cationes octaédricos, por ejemplo, $[Co(dipy)_3]^{2+}$, $[Co(phen)_3]^{2+}$, $[Co(en)_3]^{2+}$ en solución acuosa y por reacciones de desproporción con carbonilos de cobalto. Alguno de estos ligandos, sin embargo, resultan en complejos con estructura cuadrado-plana, por ejemplo, $[Co(en)_2](AgI_2)_2$ [59].

Los cationes tetraédricos son también formados por ligandos unidentados. Cobalto es tetraédricamente coordinado por oxígeno en $[Co(Ph_3AsO)_4]I_2$. Unos pocos cationes con número de coordinación 5 son formados con ligandos cuadridentados $N(CH_2CH_2NMe_2)_3$ (trenMe); estos son del tipo $[Co(trenMe)X]X$ ($X = Cl, Br, I$), estos compuestos son de spin alto ($\mu_{eff} \sim 4.5$ B.M.) y son electrolitos univalentes en nitrobenzeno. Ellos tienen una estructura bipiramidal trigonal [50].

6.2 Complejos neutros de cobalto (II).

Los nitrógeno-donadores forman una larga lista de complejos de este grupo. Debido a la pequeña diferencia de estabilidad entre los complejos octaédricos y tetraédricos, es común encontrar ambas estructuras con una determinada sal de cobalto y ligando dados, de hecho, a veces se encuentran los dos complejos en equilibrio. Una de las series más estudiadas de complejos es la de los compuestos $\text{CoX}_2(\text{py})_2$. El complejo $\text{CoCl}_2(\text{py})_2$ puede existir a temperatura ambiente como una forma violeta (estable) y como una forma azul (inestable). La forma violeta es octaédrica con puentes cloro (esto tiene un cobalto rodeado por cuatro cloros a 2.49 Å y dos nitrógenos a 2.14 Å) y la forma azul es tetraédrica y monomérica. Los bromuros, yoduros y cianatos forman solo complejos azules tetraédricos $\text{CoX}_2(\text{py})_2$ mientras que el tiocianato y selenocianato forman solo complejos octaédricos rojo-púrpura $\text{Co}(\text{NCS})_2(\text{py})_2$ y $\text{Co}(\text{NCSe})_2(\text{py})_2$. Todos estos complejos, sin embargo, dan una especie tetraédrica cuando se disuelven en solventes orgánicos como el nitrobenzono. La adición de más piridina a las soluciones permite un equilibrio tetraédrico-octaédrico [50]:



y tales sistemas permiten el estudio de la importancia de los efectos electrónicos y estéricos. En general cuanto más fácilmente el par σ de electrones en el ligando es polarizable, menos se requieren las moléculas del ligando para efectuar la electroneutralidad. De modo que para los complejos con un ligando de nitrógeno dado y varios iones haluro, a veces ocurre un cambio de estereoquímica octaédrica a tetraédrica al pasar del cloruro al yoduro. Esto ocurre con las piridinas, y con ligandos como pirazina y pirazinas sustituidas. El efecto estérico es observado cuando los ligandos tienen grupos alquilo que interfieren con otros grupos en una estructura octaédrica. Para muchos ligandos nitrogenados, los complejos tetraédricos CoX_2L_2 y octaédricos CoX_2L_4 pueden ser preparados usando la relación correcta metal:ligando [50].

6.3 Complejos aniónicos de cobalto (II).

El ion CoCl_4^{2-} es tetraédrico, sin embargo, el tetraedro de iones cloruro no es perfectamente regular, porque, aunque las distancias de enlace cobalto-cloro son todas iguales, existe una distorsión angular. Las sales rojo pálido de metales alcalinos $\text{K}_2\text{Co}(\text{NO}_3)_4$ y $\text{Na}_2\text{Co}(\text{NO}_3)_4$ son preparadas en las reacciones de hexanitrocobaltatos(III) con pentóxido de dinitrógeno. Estas sales del ion $[\text{Co}(\text{NO}_3)_4]^{2-}$ son higroscópicas, sus propiedades magnéticas y espectroscópicas se parecen a la de los complejos tetraédricos de cobalto (II). Aniones unidentados como OH^- , N_3^- , acetato y trifluoroacetato forman complejos tetraédricos con cobalto (II). Aparecen también los complejos de formiato para ser del tipo $[\text{Co}(\text{OCOH})_6]^{4+}$ y los complejos de oxalato $[\text{Co}(\text{OX})_2]^{2-}$; como las sales de carbonato, $\text{K}_2[\text{Co}(\text{CO}_3)_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ellos son descompuestos en agua [50].

7. Propiedades magnéticas de los complejos de cobalto (II).

El ion Co^{2+} tiene configuración electrónica que en campos octaédricos puede dar lugar a complejos de alto spin $t_{2g}^5 e_g^2$ o de bajo spin $t_{2g}^6 e_g^1$. Altos valores en la energía de separación del campo del ligando ($Dq > 1500 \text{ cm}^{-1}$) son requeridos para causar un emparejamiento de spines con cobalto (II), por lo que solo se encuentran pocos complejos con ligandos de campo fuerte. Los complejos tetraédricos son de alto spin con la configuración $e^4 t_2^3$ [50, 60]

Las propiedades magnéticas proporcionan un medio complementario para distinguir la estereoquímica. Se espera que el término basal "T" del ion octaédrico genere una contribución orbital dependiente de la temperatura al momento magnético, mientras que no se espera lo mismo del término basal "A" del ion tetraédrico. De hecho, en un campo tetraédrico, el término ${}^4T_2(F)$ excitado se "mezcla" con el término basal 4A_2 debido al acoplamiento spin-órbita y se espera que los complejos tetraédricos de cobalto (II) tengan momentos magnéticos dados por $\mu_e = \mu_{\text{spin-solo}}(1 - 4\lambda/10Dq)$, donde λ es la constante de acoplamiento spin-órbita y su valor es igual

a -170 cm^{-1} y $\mu_{\text{spin-solo}}=3.87\text{ BM}$. Por lo tanto, los momentos magnéticos de los complejos tetraédricos se encuentran en el rango 4.4-4.8 MB, mientras que los de los complejos octaédricos están alrededor de 4.8-5.2 MB a temperatura ambiente, disminuyendo apreciablemente a medida que se reduce la temperatura [61].

II.5 Antecedentes de los complejos sintetizados

Complejos de pirazinamida con cloruro y bromuro de cobalto fueron sintetizados en 1988. La estereoquímica de los complejos fue investigada por mediciones magnéticas y espectroscopía infrarroja y electrónica. Finalmente, se postularon las siguientes fórmulas moleculares $\text{Co(PZA)}_2\text{Cl}_2$ y $\text{Co(PZA)}_2\text{Br}_2$. No se probó ningún tipo de actividad biológica en estos complejos [62].

La síntesis de otro complejo de pirazinamida y cobalto (II) fue publicada en el 2012. Esta síntesis se llevó a cabo mediante la adición de una solución etanólica de pirazinamida a una solución acuosa de nitrato de cobalto (II) hexahidratado a temperatura ambiente. La estructura elucidada por difracción de rayos X (*Figura 8*) fue $[\text{Co(PZA)}_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$. El estudio de este complejo solo fue de carácter estructural ya que no fue probada ninguna actividad biológica antituberculosa [63].

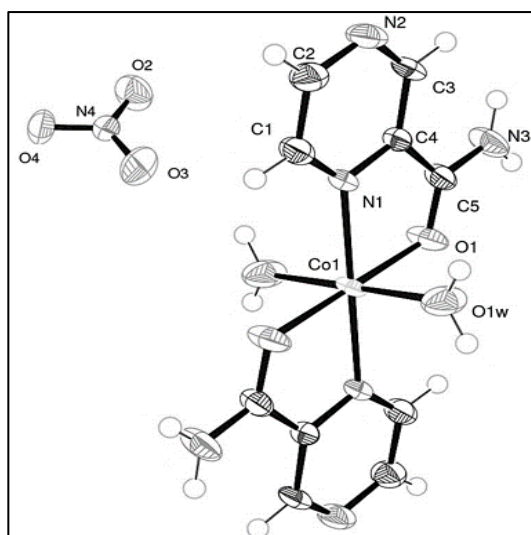


Figura 8. Diagrama de ORTEP mostrando la estructura molecular del complejo $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$

El uso de pirazinamida en la síntesis de nuevos complejos no ha sido exclusivo para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosis. Por ello se podrá encontrar en distintas fuentes bibliográficas la publicación de nuevos complejos de pirazinamida con distintos centros metálicos en las que el estudio ha sido enfocado en la estequiometría de los nuevos compuestos. Entre estos complejos se encuentran:

Tabla 3. Complejos con ligandos pirazinamida

Complejo Metálico	Referencia
$[\text{Co}(\text{PZAH})(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$ $[\text{Zn}(\text{PZAH})(\text{bipy})_2]\text{ClO}_4$ $[\text{Zn}(\text{PZAH})(\text{phen})_2]\text{ClO}_4$ donde PZAH ₂ =pirazinamida, bipy=2,20-bipiridina, phen=1,10-fenantrolina	[14]
$[\text{Cu}(\text{INA})(\text{PZA-H})(\text{OH})]\text{H}_2\text{O}$ donde PZA=pirazinamida, INA=isoniazida	[64]
$[\text{Cu}(\text{PZA})_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})_2]$ $[\text{Cu}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$	[65]
$\{\text{Ag}_6(\text{pza})(\text{pca})_3(\text{H}_2\text{O})\}_n$ donde pca=ácido 1,2-benzenedicarboxílico	[66]

La revisión bibliográfica de todas estas referencias ha sido de gran utilidad para la elucidación de los complejos sintetizados en este trabajo.

II.6 Otros complejos con probada actividad biológica antituberculosis

En busca de nuevos fármacos que demuestren actividad antituberculosis, se han modificado fármacos ya usados en el tratamiento de tuberculosis e incluso se han desarrollado nuevos ligandos que potencien esta actividad. Diversos metales han sido usados para la síntesis de estos complejos. (Tabla 4)

Tabla 4. Resumen de complejos con actividad biológica antituberculosis probada

Complejo metálico	Método usado para la determinación de actividad biológica	Referencia
[Fe(L-H) ₃] L: derivados de (3-aminoquinoxalina-2-carbonitrilo N ¹ , N ⁴ -dioxido)	MIC	[13]
[M{ML _n (n ⁵ -C ₅ H ₄)C(H)=NN=C(S)NHR}-(Cl)(PPh ₃)] M: Pd, Pt; ML _n : Re(CO) ₃ , FeCp; R: H, CH ₃	MIC	[67]
[Co(LH) ₂]Cl ₂ , [Ni(LH) ₂]Cl ₂ .3H ₂ O, [Zn(LH) ₂]Cl ₂ LH: 2-(2-benzo[d]tiazol-2-ilo)hidrazono) propan-1-ol	MIC	[68]
[Ru(NH ₃) ₅ (INH)] ²⁺ INH: isoniazida	MIC	[69]
[VO(pic)(8HQ)] Pic: ácido 2-picolínico	MIC	[70]
[Mn(atc) ₂]; [Mn(atc-Et) ₂]; [Mn(atc-Ph) ₂] Atc: acetilpiridinatiosemicarbazona	MIC	[71]

Capítulo III.
Síntesis y caracterización de los
complejos de pirazinamida y cobalto

III.1 Desarrollo experimental

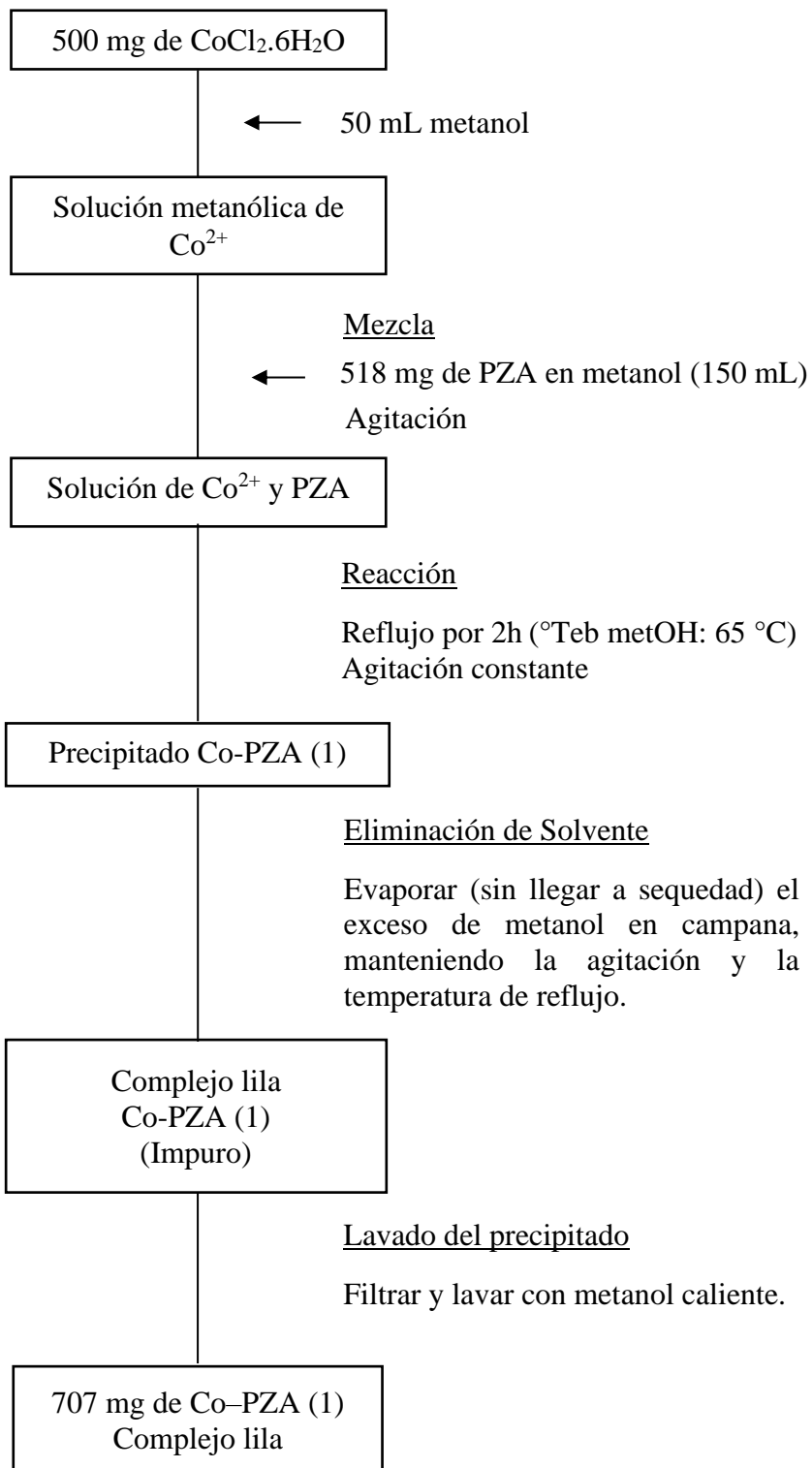
1. Síntesis de los complejos

1.1 Síntesis del complejo Co-PZA (1).

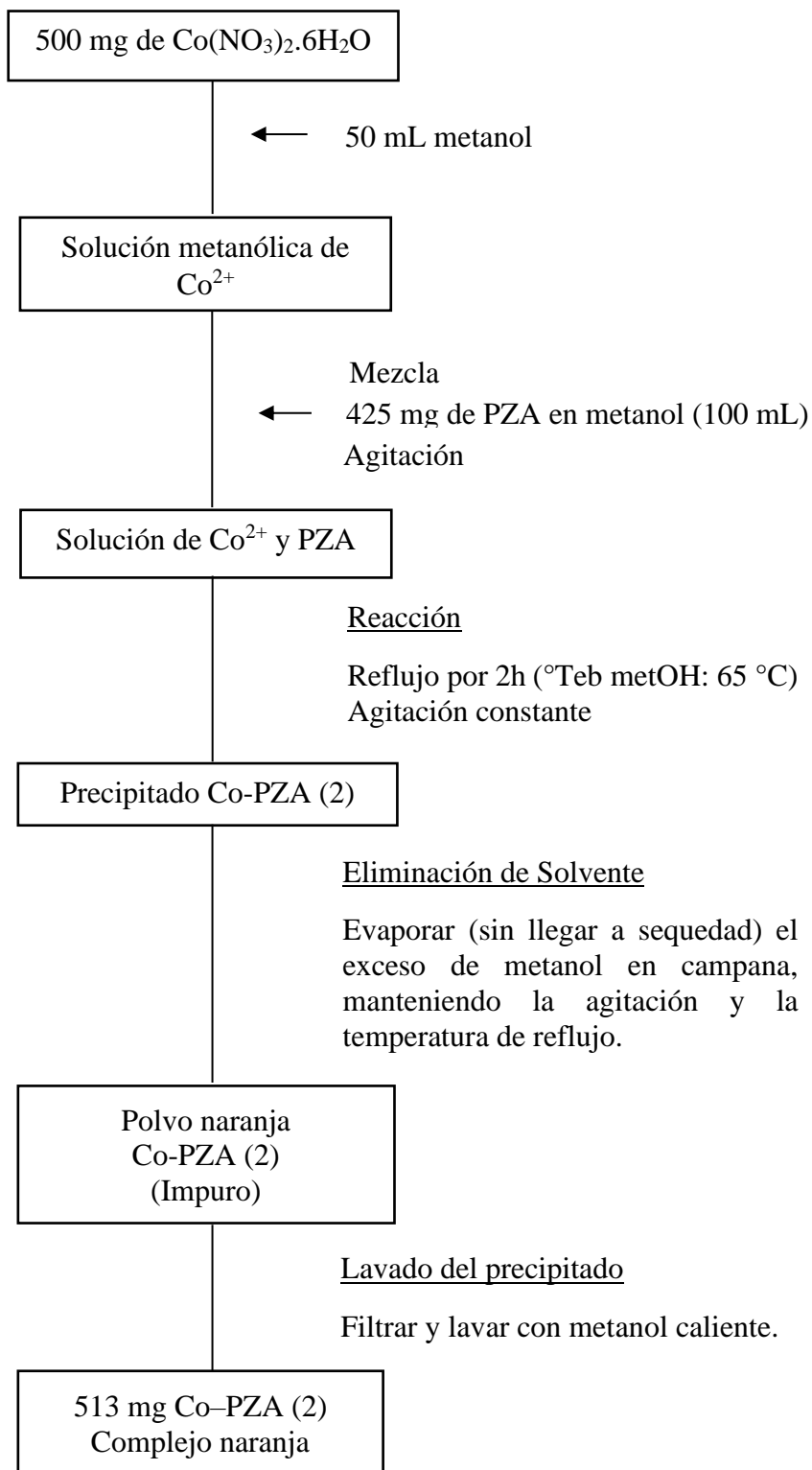
Se realizó la síntesis del complejo Co-PZA (1) disolviendo en metanol la sal precursora de cloruro de cobalto (II) hexahidratado en un balón de reacción de dos bocas. Posteriormente se añadió el ligando pirazinamida (disuelto en metanol) en relación de 1:2 (metal:ligando). La reacción se llevó a cabo en reflujo por aproximadamente dos horas en constante agitación. Al transcurrir las dos horas, se destapó una de las bocas con la finalidad de evaporar el metanol sin llegar a sequedad. Finalmente se filtró y se enjuagó con metanol caliente para eliminar la pirazinamida y la sal que no reaccionaron. (*Esquema 1*)

1.2 Síntesis del complejo Co-PZA (2).

Se realizó la síntesis del complejo Co-PZA (2) disolviendo en metanol la sal precursora de nitrato de cobalto (II) hexahidratado en un balón de reacción de dos bocas. Posteriormente se añadió el ligando pirazinamida (disuelto en metanol) en relación de 1:2 (metal:ligando). La reacción se llevó a cabo en reflujo por aproximadamente dos horas en constante agitación. Al transcurrir las dos horas, se destapó una de las bocas con la finalidad de evaporar el metanol (evitando llegar a sequedad). Finalmente se filtró y se enjuagó con metanol caliente para eliminar la pirazinamida y la sal que no reaccionaron. (*Esquema 2*)



Esquema 1. Diagrama de síntesis del complejo Co-PZA (1)



Esquema 2. Diagrama de síntesis del complejo Co-PZA (2)

2. Técnicas de caracterización

El análisis químico de una muestra comprende la determinación cualitativa y cuantitativa de uno, varios o todos los elementos que la constituyen, tanto si se encuentran a nivel mayoritario como minoritario o en trazas. La caracterización cualitativa de los elementos que componen un material o una disolución se puede abordar por varias técnicas instrumentales, pero su cuantificación queda limitada a aquellas cuya señal específica es proporcional a la concentración atómica [72].

2.1 *Análisis elemental (C, H y N).*

Los compuestos orgánicos están constituidos mayoritariamente por carbono e hidrógeno; por lo tanto, es importante la determinación precisa de estos elementos [72].

En este trabajo se ha utilizado el método de análisis elemental para determinar el porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno correspondiente al contenido de pirazinamida de cada complejo.

Se ha utilizado el analizador elemental PERKIN-ELMER 2400 SERIES II de la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo (IQ-USP).

2.2 *Espectroscopía de absorción atómica de cobalto (Co).*

La espectroscopía de absorción atómica se basa en la absorción de radiación por átomos libres en estado fundamental. La longitud de onda de la radiación emitida o absorbida es específica para cada elemento, lo que permite su identificación. Mientras que la intensidad de la radiación a esa longitud de onda específica es proporcional a la cantidad del elemento presente en la muestra. Las determinaciones cuantitativas solo serán posibles si los elementos a medir se encuentran en disolución o en la forma adecuada para ser transportados a la llama donde se romperán los enlaces quedando como ~~como~~ átomos libres [72].

En este trabajo se ha utilizado la espectroscopía de absorción atómica para determinar el contenido de cobalto de los complejos utilizando como tratamiento de muestra la disolución en medio ácido.

El equipo utilizado fue el espectrofotómetro de Absorción atómica SHIMADZU AA-7000 del Laboratorio de Investigación y Certificaciones (LABICER) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), utilizando una lámpara de cátodo hueco de Cobalto a 240.7 nm HAMAMATSU PHOTONICS K.K. L233-27NU.

Se preparó una curva de 0.4, 1.0 y 2.0 ppm de cobalto en ácido nítrico 0.5 M. De la misma manera se preparó una solución en ácido nítrico 0.5 M de cada complejo a una concentración aproximada de 1 ppm de cobalto.

El valor del parámetro R obtenido fue igual a 0.9999.

2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica analítica de separación más utilizada debido principalmente a su versatilidad, alta sensibilidad, fácil adaptabilidad, precisión, la posibilidad de utilizar especies no volátiles o inestables térmicamente, y su gran aplicabilidad a sustancias de interés para la industria, la investigación. Ejemplos significativos de aplicaciones de la cromatografía HPLC los constituyen el análisis de aminoácidos, proteínas, fármacos, biocombustibles, drogas, hidratos de carbono, grasas, pesticidas, contaminantes alimenticios, antibióticos, vitaminas o efluentes [72].

En este trabajo se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento para la determinación del contenido de pirazinamida en los complejos. Este análisis se realizó con el Cromatógrafo Líquido de Alto rendimiento (HPLC) SHIMADZU del Laboratorio LABICER de la UNI, utilizando un Detector de Arreglo de Diodos SPD-M30A, una Bomba LC-30AD

con un Inyector Automático SIL-30AC, Horno de Columna CTO-20AC y Controlador CBM-20A. El método tuvo las siguientes condiciones:

Tabla 5. Condiciones del método utilizado en la cromatografía de alto rendimiento

Columna	RP C18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5 µm Partícula (Restek)
Horno de Columna	40 °C
Detector	Arreglo de Diodos
Longitud de onda	269 nm
Bomba	Cuaternaria
Flujo	0.8 mL/min
Fase móvil	A: Buffer Fosfato 10 mM pH 2 B: Metanol
Elución isocrática	A:B, 85:15
Volumen de Inyección	20 µL
Tiempo de corrida	10 min
Integración	Área vs Concentración

A estas condiciones fueron analizados los estándares de 10, 25 y 50 ppm para la curva de calibración de pirazinamida y las muestras de los complejos. Los estándares y los complejos fueron preparados en medio acuoso.

2.4 Análisis Termogravimétrico (TGA).

El Análisis termogravimétrico es una técnica en la que se monitorea la masa de una sustancia en función de la temperatura o el tiempo, ya que la muestra se somete a un programa de temperatura controlada en una atmósfera controlada [73].

El Análisis termogravimétrico consta de un portamuestra que es sostenido por una balanza de precisión (termobalanza). Este portamuestra reside en un horno, el cual se calienta o enfría durante el experimento. La masa de la muestra se controla durante el experimento. Un gas de purga controla el entorno de la muestra. Este gas puede ser un gas reactivo, oxidante o inerte que fluye sobre la muestra y sale por un escape [73].

En este trabajo el análisis termogravimétrico fue realizado en la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo (IQ-USP) con el analizador TA INSTRUMENTS TGA Q500, la temperatura máxima de alcance fue de 1000 °C.

2.5 Determinación del momento magnético.

La determinación del momento magnético se realizó mediante la medición de las masas de los complejos en una balanza SHIMADZU AW120 del Laboratorio LAQISE-BIMET del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo con la aplicación de un campo magnético mediante un dispositivo elaborado en el mismo laboratorio.

Este análisis se realizó midiendo por cuadruplicado la masa de los complejos antes de y después de la aplicación de un campo magnético. Para la verificación de las mediciones se utilizó un patrón de tetra(tiocianato)cobaltato (II) de mercurio, $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ que presenta un valor de $\chi = 16.44 \times 10^{-6}$ unidades CGS/Gauss a 20 °C midiendo su masa de la misma manera que los complejos.

2.6 Espectroscopía Ultravioleta y Visible (UV-Vis).

La espectroscopia UV-VIS es una herramienta muy útil para el análisis cualitativo y la determinación estructural de especies, así como una técnica clásica para el análisis cuantitativo. La absorción UV-VIS proporciona datos para la identificación de sustancias disueltas, lo que se logra por la forma del espectro, longitudes de onda a las que se presentan los máximos y mínimos de absorción, por los valores de absorptividad molar, o por los cambios que experimenta el espectro al variar el pH, el disolvente, o la concentración. Para este tipo de aplicación es necesario que la amplitud de banda sea lo más pequeña posible para que los picos de absorción queden perfectamente definidos. Sin embargo, dado que el número de máximos y mínimos no es muy elevado, la identificación inequívoca resulta bastante difícil. El espectro de absorción ultravioleta-visible de un compuesto se debe por lo general a tres tipos de

transiciones: 1) Transiciones producidas por electrones π , σ y n. 2) Transiciones producidas por electrones d y f. 3) Transiciones producidas por transferencia de carga [72].

En este trabajo la espectroscopía Ultravioleta-Visible se realizó con el espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 del Laboratorio LABICER de la UNI, en el rango de 200 a 900 nm para la detección de las bandas correspondientes a pirazinamida y cobalto.

Se prepararon soluciones 0.002 M (aproximadamente) de Co-PZA (1) y Co-PZA (2) en metanol absoluto (Grado HPLC) para la identificación de la banda correspondiente a cobalto en el rango del visible. Para la identificación de la banda pirazinamida se preparó una dilución (1:1) de las soluciones anteriormente preparadas de Co-PZA (1) y Co-PZA (2).

2.7 Espectroscopía infrarroja (FTIR).

La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas más importantes en análisis químico. Esto es debido a que las bandas de absorción observadas en un espectro infrarrojo de un compuesto corresponden a las frecuencias de vibración de los enlaces entre los átomos de la molécula. Como cada molécula es una combinación única de átomos y enlaces, el espectro infrarrojo es una identificación de cada compuesto. Por tanto, es una herramienta muy poderosa en análisis cualitativo [72].

El análisis de espectroscopía FTIR de este trabajo se realizó con el espectrofotómetro PERKIN-ELMER del Laboratorio LABICER de la UNI, bajo la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) desde 400 a 4000 cm^{-1} para la identificación de los picos característicos de los grupos funcionales de la molécula de pirazinamida y sus desplazamientos por la formación de cada complejo.

2.8 Espectroscopía Raman

Las transiciones vibracionales se pueden observar por espectroscopía infrarroja o Raman. Sin embargo, estas transiciones se registran de manera distinta. En la espectroscopía infrarroja se mide la absorción de la luz infrarroja (IR) en función de la frecuencia. Por el contrario, el origen del espectro Raman es claramente distinto. La muestra se irradia con un haz de láser cuya longitud puede ser cualquiera entre ultravioleta, visibles, infrarrojo cercano y se estudia la luz dispersada que presenta una frecuencia que cambia con respecto a la línea excitante. La facilidad de manejo de los modernos espectrómetros Raman les permite ser una técnica de rutina y una herramienta muy útil en la investigación [72].

En este trabajo la espectroscopía Raman se realizó con el espectrofotómetro del Laboratorio de Electroquímica Aplicada (GIEA) de la UNI, utilizando un láser de 785 nm con una potencia de 50 mW desde 200 a 1800 cm^{-1} para la identificación de desplazamientos de los picos característicos de los grupos funcionales de la molécula de pirazinamida y sus desplazamientos por la formación de cada complejo.

2.9 Análisis de conductividad.

La determinación de la conductancia para compuestos de coordinación y la interpretación de los datos en términos de estructuras posibles proviene del estudio formal del campo de la química de coordinación. Sin embargo, excepto por los complejos más simples de ligandos inorgánicos (usualmente), el uso de agua como un solvente para propósitos de conductancia es a menudo indeseable debido a los problemas de hidrólisis, o los problemas de solubilidad. Por ello el uso de agua en estas pruebas ha disminuido y el uso de solventes orgánicos se ha incrementado, particularmente en los últimos 20 años. Desafortunadamente, el número de solventes que han sido usados para estudios de compuestos de coordinación, la amplia variación en los tipos de complejos estudiados y las diferencias en las condiciones

experimentales usadas han dejado la situación en confusión con relación a los rangos de conductancia esperados para un tipo particular de electrolito. Aun para solventes comúnmente usados como acetona, una examinación rápida de la literatura revela conflictos en los rangos de los datos de conductancia, la incorrecta asignación del tipo de electrolito y las correlaciones injustificadas con estructuras posibles [74].

Se analizó la conductividad de los complejos en metanol utilizando el conductímetro ECO SENSE EC300A del laboratorio LABICER de la UNI. Cada complejo fue preparado a 10^{-3} M. Se utilizó la relación $\Lambda_m = \kappa / C_m$ para obtener los valores de la conductividad molar e identificar el tipo de sal de cada complejo.

Capítulo IV.

Resultados y discusiones

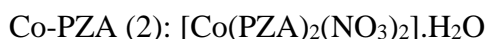
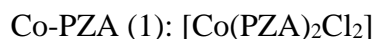
Con base en el procedimiento para la síntesis de los complejos Co-PZA (1) y Co-PZA (2), se espera que el átomo metálico de cobalto en ambos complejos sea coordinado por dos moléculas de pirazinamida debido a que la relación molar M:L (metal:ligando) en la síntesis de los complejos fue 1:2.

Se espera también que el átomo de cobalto en cada complejo conserve el número de oxidación +2 que posee en sus sales precursoras de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Además, tomando en cuenta al Cobalto (II), se sabe que este es capaz de coordinar con los números de coordinación 4, 6 incluso con 5 en algunos casos [61].

En el caso de los complejos, considerando tanto al átomo de cobalto y al ligando, es factible tener dos pirazinamidas coordinadas al cobalto de forma bidentada, donde los aniones cloruro y nitrato ocupen los orbitales “d” disponibles para completar la esfera de coordinación.

Finalmente, se proponen las siguientes fórmulas moleculares para los complejos, utilizando diversas técnicas de caracterización para llegar a ellas:



En esta sección se presentan los resultados de las técnicas de caracterización utilizadas obtenidos de cada complejo sintetizado y caracterizado:

IV.1 Complejo Co-PZA (1)

1. Síntesis

En la síntesis del complejo Co-PZA (1) se obtuvo un sólido no cristalino de color lila (Figura 9). El rendimiento obtenido en la síntesis del complejo Co-PZA (1) fue de 89%.

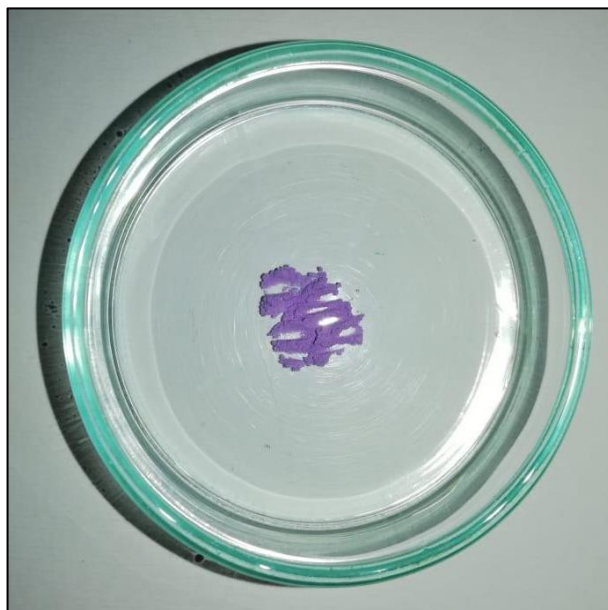


Figura 9. Fotografía del complejo Co-PZA (1)

2. Propiedades fisicoquímicas

2.1 Punto de fusión

El complejo no presenta punto de fusión, sin embargo, a partir de los 240°C empieza a descomponerse cambiando su color hasta oscurecerse.

2.2 Solubilidad

La solubilidad del complejo Co-PZA (1) comparado con la solubilidad del ligando pirazinamida, muestra que es una sustancia soluble en solventes polares a excepción de la acetona en la cual es insoluble.

Tabla 6. Solubilidad del complejo Co-PZA (1) y pirazinamida

Solvente	Co-PZA (1)	Pirazinamida
Agua	S	MS
Etanol	PS	PS
Metanol	S	S
Acetona	I	S
DMF	S	S
DMSO	S	S
Cloroformo	I	PS

*S: soluble, PS: poco soluble, MS: muy soluble, I: insoluble

3. Composición Química

Se han utilizado las técnicas de análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno; análisis de absorción atómica de cobalto y determinación argentométrica de cloruros para verificar la composición del complejo Co-PZA (1). Además, también se utilizó el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento para cuantificar el contenido de pirazinamida en el complejo. Finalmente, se utilizó la termogravimetría para conocer el porcentaje de óxido de cobalto formado al final del proceso y compararlo con el valor calculado de acuerdo con la fórmula propuesta.

3.1 Análisis elemental (C, H y N)

A continuación, se presentan los porcentajes experimentales y calculados de C, H y N obtenidos en el análisis elemental y con base en la fórmula propuesta.

Tabla 7. Porcentajes en masa experimentales y calculados de C, H y N del complejo Co-PZA (1)

Elemento	% Experimental	% Calculado	% Δ (variación)
C	32.39	31.94	0.45
H	2.97	2.68	0.29
N	22.82	22.35	0.47

Comparando estos valores, se observa que el error es menor a 1%, por lo que en este trabajo se considerará que los porcentajes de C, H y N obtenidos coinciden con los valores calculados basados en la fórmula propuesta para el complejo Co-PZA (1).

3.2 Espectroscopía de Absorción atómica de cobalto (Co)

En este trabajo se empleó el análisis de absorción atómica para la determinación de cobalto en el complejo Co-PZA (1). Para ello se preparó una curva de calibración de 0.4, 1 y 2 ppm [75], obteniendo los resultados que se muestran en la *Tabla 8* y la *Figura 10*:

Tabla 8. Valores de concentración y absorbancia de los estándares

Estándar	Concentración, ppm	Absorbancia
1	0.4	0.0261
2	1.0	0.0629
3	2.0	0.1218

Para la preparación de la muestra se pesó 0.0320 g del complejo y se disolvió en ácido nítrico 0.5N, el volumen final de la solución fue de 25 mL y se realizó una dilución de 1:200.

Tabla 9. Datos de preparación de la muestra de complejo Co-PZA (1)

Complejo	Masa, g	Vol. Final, mL	Factor de dilución
Co-PZA (1)	0.0320	25	200

Finalmente, el resultado de concentración de cobalto en el complejo Co-PZA (1) fue:

Tabla 10. Concentración final de cobalto (%Co) en el complejo Co-PZA (1)

Complejo	Concentración de la solución preparada, ppm	Concentración Final, %Co
Co-PZA (1)	0.9999	15.62

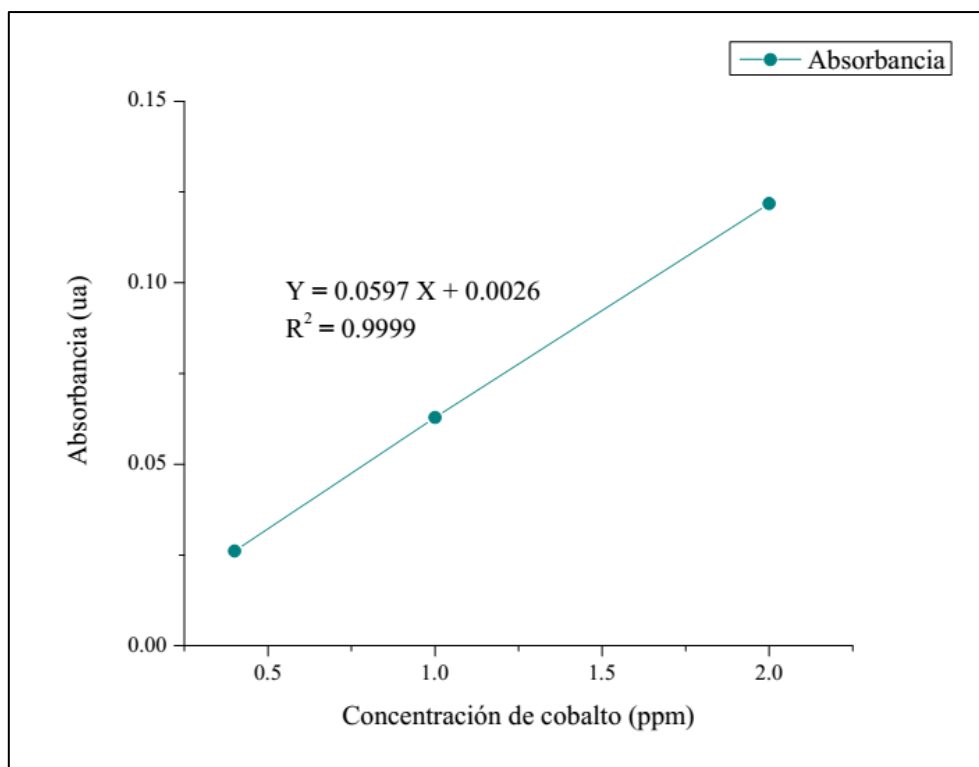


Figura 10. Gráfica Concentración de Cobalto (ppm) VS. Absorbancia

A continuación, se muestra una tabla comparativa del porcentaje de cobalto experimental y calculado del complejo Co-PZA (1).

Tabla 11. Tabla comparativa de resultados de concentración de cobalto en Co-PZA (1)

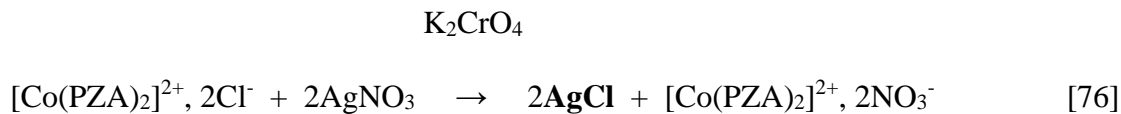
Complejo	% Co Experimental	% Co Calculado	%Δ
Co-PZA (1)	15.62	15.67	0.05

De esta manera, confirmamos la presencia de un átomo de cobalto en una molécula de complejo Co-PZA (1).

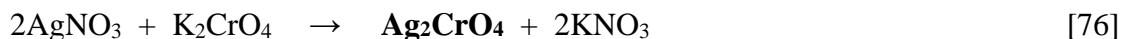
3.3 Determinación del contenido de cloruros.

Se determinó el contenido de cloruros en el complejo Co-PZA (1): $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$, para ello se utilizó el *Método Argentométrico de Mohr* preparando una solución acuosa del complejo, la cual fue titulada con una solución de AgNO_3 estandarizada.

Las reacciones que ocurren en la titulación entre el cloruro y el nitrato son las siguientes:



(precipitado blanco)



(precipitado rojo ladrillo)

De acuerdo con el análisis realizado se obtuvo lo siguiente:

Tabla 12. Datos del análisis de cloruros en el complejo Co-PZA (1)

Masa, g	Volumen del complejo para la titulación, mL	Volumen de AgNO ₃ consumido, mL
0.0455	20	2.0
		2.0

Para la obtención del resultado se debe considerar el siguiente cálculo, el cual se extrajo de los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales adaptándola para una muestra sólida [77]:

$$\text{Cl, ppm} = \frac{N_{\text{AgNO}_3} \times V_{\text{AgNO}_3} \times 35453}{V_{\text{Cl}}} \times \frac{V}{m} \quad \text{Expresión 1}$$

Donde:

N_{AgNO_3} es la normalidad de la solución de AgNO₃ (N = 0.0481 N).

V_{AgNO_3} es el volumen de AgNO₃ consumido en la titulación.

35453 es el factor de conversión basado en la masa atómica de Cl.

V_{Cl} es el volumen de la alícuota utilizada de la solución del complejo Co-PZA (1).

V es el volumen de la solución preparada del complejo Co-PZA (1) ($V = 50$ mL).

m es la masa del complejo Co-PZA (1) para la solución preparada

Al comparar el valor experimental y calculado del contenido de cloruros, se encuentra:

Tabla 13. Tabla comparativa de resultados de concentración de cloruros en el complejo Co-PZA (1)

Complejo	% Cl Experimental	% Cl Calculado	% Δ
Co-PZA (1)	18.74	18.85	0.11

Este resultado indica que el complejo Co-PZA (1) contiene cloruros en un 18.74% lo que equivale a dos átomos de cloro en una molécula del complejo. Estos cloruros podrían encontrarse inicialmente en forma de aniones o ligandos. Al disolver el complejo en agua, los cloruros como aniones se disociarían fácilmente en el medio. Por otro lado, los cloruros como ligandos serían desplazados por moléculas de agua (para entrar a la esfera de coordinación del complejo como ligandos acuo), debido al orden de fuerza de ligandos: $I^- < Br^- < S^{2-} < SCN^- < Cl^- < N_3^-$, $F^- < urea$, $OH^- < ox$, $O^{2-} < H_2O < NCS^- < pi$, $NH_3 < en < bpi$, $fen < NO_2^- < CH_3^-$, $C_6H_5^- < CN^- < CO$ [60, 78] quedando libres en el medio de disolución del complejo, de esta manera es como los cloruros se encuentran en el medio disponibles para ser titulados con el nitrato de plata.

3.4 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

En este estudio se determinó el contenido de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1) usando la cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se preparó una curva con estándares de 10, 25 y 50 mg/L. La pirazinamida presentó un tiempo de retención en el rango de 5.76 – 5.87 minutos utilizando una columna C18 y una fase

móvil de flujo isocrático compuesta por buffer fosfato 10 mM a pH 2 y metanol [79]. La detección y cuantificación de la pirazinamida se realizó utilizando un detector de arreglo de diodos donde su banda característica fue encontrada a 268 nm aproximadamente.

A continuación, se presentan los datos obtenidos de la curva de calibración de pirazinamida:

Tabla 14. Valores de concentración y área de los estándares de la curva de calibración de pirazinamida

Estándar	Concentración, mg/L o ppm	Área
1	10	456279
2	25	1133982
3	50	2275383

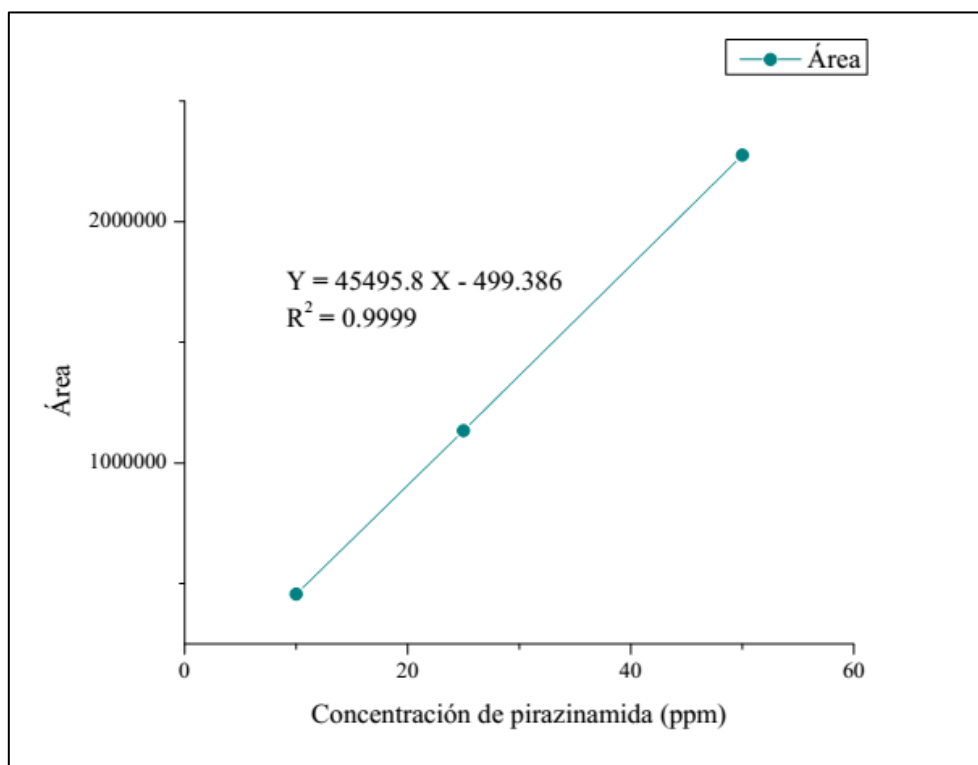


Figura 11. Gráfica Concentración de Pirazinamida VS. Área

En cuanto a la preparación de la muestra, se pesó 10 mg del complejo para llevarlo a un volumen final de 50 mL de agua, esta solución fue diluida a la cuarta parte de su concentración antes de ser inyectadas en el cromatógrafo (HPLC)

Tabla 15. Datos de la preparación del complejo Co-PZA (1)

Complejo	Masa, mg	Volumen Final, mL	Factor dilución
Co-PZA (1)	10.00	50	4

La concentración obtenida en el análisis fue:

Tabla 16. Concentración HPLC ($\mu\text{g/L}$) y final de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1)

Complejo	Concentración HPLC de pirazinamida, $\mu\text{g/L}$	Concentración Final de pirazinamida, $\mu\text{g/mL}$	Masa total de pirazinamida, μg
Co-PZA (1)	32.462	129.848	6492.400

Dados los resultados, se presenta una comparación entre los valores experimental y calculado:

Tabla 17. Tabla comparativa del porcentaje experimental y calculado de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1)

Complejo	% Pirazinamida experimental	% Pirazinamida calculado	%Δ
Co-PZA (1)	64.92	65.47	0.55

La *Tabla 17* muestra que los porcentajes experimental y calculados coinciden. Por lo tanto, se demuestra que existen dos moléculas de pirazinamida en el complejo Co-PZA (1).

3.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico realizado en este estudio se basó en el monitoreo de la masa del complejo en función del incremento de la temperatura hasta alcanzar los 950°C.

En la *Figura 12* se muestra que el complejo Co-PZA (1) se descompone en 3 etapas, la suma de estas 3 pérdidas deja un residuo con un porcentaje en masa igual a 20.42%. Tomando en cuenta que al final del proceso de descomposición se llega a la formación del óxido metálico [73, 80] que en este caso es el óxido de cobalto, se ha calculado que el CoO representa el 19.93% de la masa del complejo. La diferencia de porcentaje del residuo experimental y calculado puede deberse a muchas razones y una de ellas puede ser la pureza de la muestra. [73] Sin embargo, la diferencia es menor al 1%, por ello se toma este resultado como prueba de que la fórmula propuesta es correcta.

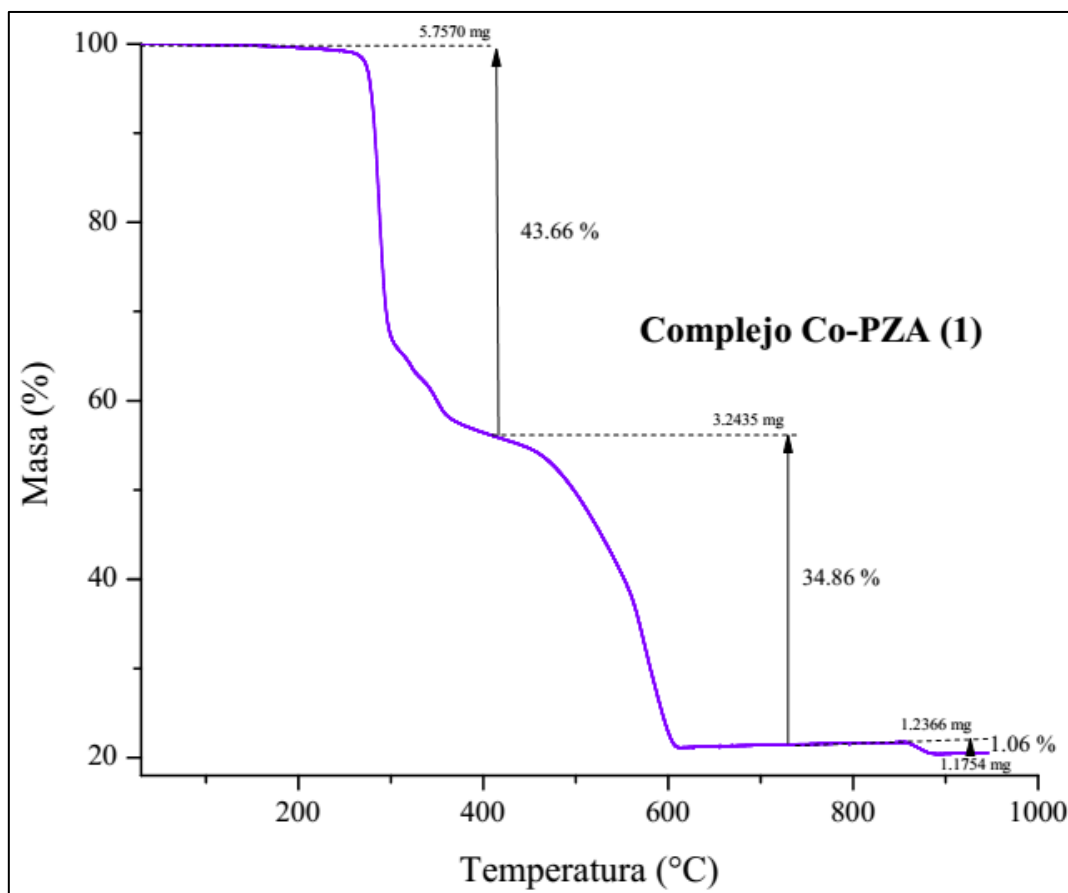


Figura 12. Curva termogravimétrica del complejo Co-PZA (1)

Tabla 18. Tabla comparativa de valores experimental y calculado del porcentaje en masa del óxido de cobalto formado (CoO) en el análisis termogravimétrico del complejo Co-PZA (1)

Complejo	% CoO experimental	% CoO calculado	%Δ
Co-PZA (1)	20.42	19.93	0.49

4. Determinación del momento magnético

Para verificar el comportamiento magnético del complejo Co-PZA (1) sintetizado en este trabajo, se realizaron medidas de susceptibilidad magnética a temperatura ambiente. A partir de los valores de susceptibilidad magnética molar (χ_M) se obtuvo los valores del momento magnético efectivo (μ_{eff}), y a partir de estos valores el número de electrones desapareados pudo ser determinado, así como la relación con su geometría molecular.

El valor de la susceptibilidad magnética y el número de electrones desapareados del complejo se podrán obtener a partir del valor de la masa del complejo y del compuesto patrón siguiendo las expresiones [81, 82]:

$$\chi_{gm} = \frac{\chi_{gp} (\Delta_m - \delta_m) x m_p}{(\Delta_p - \delta_p) x m_m} \quad \text{Expresión 2}$$

$$\Rightarrow \chi_M = \chi_{gm} x \bar{M} \quad \text{Expresión 3}$$

$$\Rightarrow \chi'_M = \chi_M - \chi_{corregido} \quad \text{Expresión 4}$$

$$\Rightarrow \mu_{eff} = 2.84 x \sqrt{\chi'_M x T} = \sqrt{[n(n + 1)]} \quad \text{Expresión 5}$$

Donde:

χ_{gm} es susceptibilidad/gramo de muestra

χ_{gp} es susceptibilidad/gramo de patrón

m_m y m_p son masa de muestra y masa del patrón respectivamente

Δ_m y Δ_p son variación de masa de muestra al aplicar el campo magnético y variación de masa de patrón al aplicar el campo magnético respectivamente

δ_m y δ_p son variación de masa del eppendorf de la muestra al aplicar el campo magnético y variación de masa del eppendorf del patrón al aplicar el campo magnético.

Después de obtener el valor de la susceptibilidad magnética molar (χ_M), este valor debe ser corregido debido a la contribución diamagnética de los iones y ligandos presentes en el complejo. En este estudio se usaron las constantes de Pascal (*Tabla 19*) para estimar la contribución diamagnética [60, 83]. Finalmente, con la susceptibilidad magnética corregida se obtiene el momento magnético efectivo y por consiguiente el número de electrones desapareados.

Tabla 19. Valores de contribución diamagnética de los átomos en el complejo Co-PZA (1)

Catión, anión, elemento o molécula	Contribución diamagnética (x10⁻⁶ unidades CGS)
Co ²⁺	-12
C	-6
H	-2.93
O (aldehído o cetona)	-1.73
N (anillo)	-4.61
Cl	-23 (anión) y -20.1 (neutro)

De acuerdo con la fórmula propuesta para el complejo y los valores indicados en la *Tabla 19*, se obtiene que la contribución diamagnética total (susceptibilidad magnética corregida $\chi_{corregido}$) para el complejo Co-PZA (1) es -178.4×10^{-6} .

A continuación, se muestran los datos obtenidos en la medición de la susceptibilidad magnética a 20°C:

- Datos del patrón de medida: $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ $\chi = 16.44 \times 10^{-6}$ (χ_{gp})

Tabla 20. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el patrón

Repetición	1	2	3	4	Promedio
δ_p	-0.001200	-0.001100	-0.001100	-0.001100	-0.001125
Δ_p	0.001200	0.001200	0.001000	0.001100	0.001125
m_p	0.020200	0.020000	0.020000	0.019800	0.020000

- Datos del Complejo Co-PZA (1): $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ $\bar{M} = 376.069$ $\chi_{\text{corregido}} = -178.4 \times 10^{-6}$

Tabla 21. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el complejo Co-PZA (1)

Repetición	1	2	3	4	Promedio
δ_1	-0.000900	-0.001000	-0.001200	-0.001000	-0.001025
Δ_1	0.002300	0.002200	0.002300	0.002100	0.002225
m_1	0.019800	0.019700	0.019700	0.019800	0.019750

De donde se obtiene que para el complejo Co-PZA (1), reemplazando en las expresiones 2, 3, 4 y 5:

$$\chi_{ga} = 24,0473 \times 10^{-6}$$

$$\chi_M = 9043,428 \times 10^{-6}$$

$$\chi'_M = 9221,848 \times 10^{-6}$$

$$\mu_{eff} = 4.668 = \sqrt{[n(n+1)]}$$

$$n = 3$$

Tabla 22. Momento magnético para algunos iones de metales de transición [83]

Iones	μ_{eff} Teórico o calculado	μ_{eff} Experimental
V ⁴⁺	1.73	1.7 – 1.8
Cu ²⁺	1.73	1.7 – 2.2
V ³⁺	2.83	2.6 – 2.8
Ni ²⁺	2.83	2.8 – 4.0
Cr ³⁺	3.87	~ 3.8
Co ²⁺	3.87	4.1 – 5.2
Fe ²⁺	4.90	5.1 – 5.5
Co ³⁺	4.90	~ 5.4
Mn ²⁺	5.92	~ 5.9
Fe ³⁺	5.92	~ 5.9

El valor del momento magnético obtenido experimentalmente para el complejo Co-PZA (1) fue de 4.668, de acuerdo con la *Tabla 22* este valor corresponde al ion metálico de Co²⁺ con 3 electrones desapareados en un entorno octaédrico [60, 62, 68, 84], es decir, un campo octaédrico débil o de espín alto con configuración $t^5_{2g}e^2_g$ y EECC (energía de estabilización de campo cristalino) igual a $0.8\Delta_o$ [60].

5. Espectroscopía de UV-Visible

Cobalto (II), un sistema d^7 , tiene los siguientes estados de ion libre: 4F , 4P , 2P , 2D , 2G , 2H y 2F . En un campo cristalino octaédrico, el estado de ion libre más bajo, 4F , se divide en dos orbitales triplete, $^4T_{1g}$ y $^4T_{2g}$, y un orbital singulete, $^4A_{2g}$; mientras que el siguiente estado más bajo de ion libre, 4P , permanece como $^4T_{1g}$ [85].

El diagrama de Orgel para el ion Co²⁺ en campos octaédricos débiles revela que se debe observar un espectro con tres absorciones [60]. Transiciones desde el estado basal: $^4T_{1g}(F)$, a $^4T_{2g}(F)$, $^4A_{2g}(F)$ y $^4T_{1g}(P)$ provocan absorciones de banda ancha en la región del visible y el infrarrojo cercano. Generalmente, el espectro de cobalto (II) en un medio octaédrico consiste

en una banda ancha en el infrarrojo cercano (${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{2g}(F)$), una banda ancha y menos intensa en el visible (${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4A_{2g}(F)$) y otra banda ancha en el visible (${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{1g}(P)$) [84]. La primera banda, asignada a la transición ${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{2g}(F)$, es usualmente encontrada en la región de $5500 - 11000 \text{ cm}^{-1}$. La segunda banda es débil (pero permitida por el spin), asignada a la transición ${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4A_{2g}(F)$ es encontrada en la región de $12000 - 17000 \text{ cm}^{-1}$; la tercera banda es asignada a la transición ${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{1g}(P)$, 2P , 2G y usualmente es encontrada en la región de $16000 - 22000 \text{ cm}^{-1}$ [86].

El espectro UV del complejo Co-PZA (1) se muestra en la *Figura 13*. En él se observa una banda a 320 nm, el cual se atribuye a la presencia del ligando. Además, en el rango del visible se observa una banda de baja absorbancia (opacada por la intensidad de la banda de la región ultravioleta) a 522 nm, el cual se atribuye a la presencia del metal de transición.

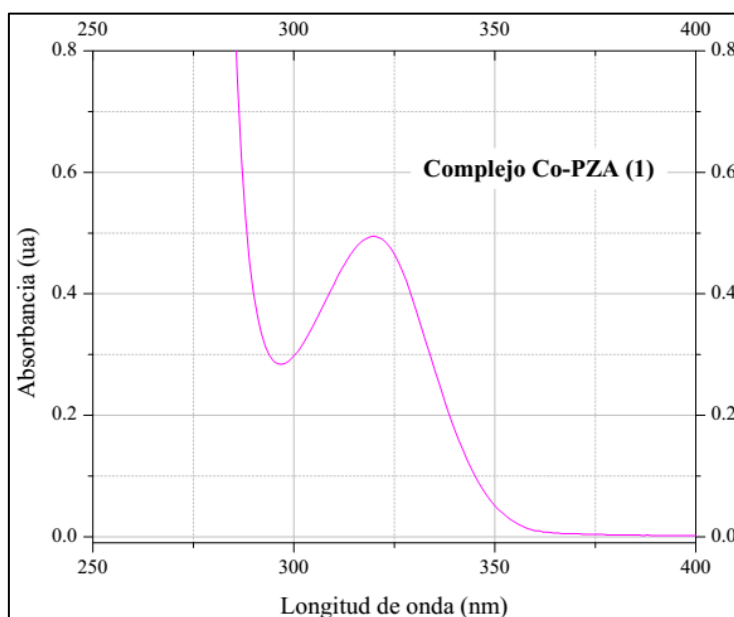


Figura 13. Espectro UV del complejo Co-PZA (1)

Al convertir las longitudes de onda a números de onda se obtiene que la banda a 320 nm es equivalente a 31250 cm^{-1} y la de 522 nm a 19157 cm^{-1} . Donde la última banda es asignada a la transición ${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{1g}(P)$; debido a que las transiciones ${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4T_{2g}(F)$ y

${}^4T_{1g}(F) \leftrightarrow {}^4A_{2g}(F)$ ocurren a menor número de onda (o mayor longitud de onda), bandas que no se observan en el espectro.

Finalmente, la banda que se asignó a la presencia del ligando pertenecería a una transición electrónica de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ [14, 87].

6. Espectroscopía de infrarrojo FTIR

En este estudio se ha empleado la espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR por su nominación en inglés Attenuated total reflectance) para la obtención de los espectros del ligando y el complejo Co-PZA (1) en la región media del infrarrojo.

A continuación, se muestra el espectro infrarrojo de la molécula de pirazinamida, utilizado como ligando en los complejos sintetizados.

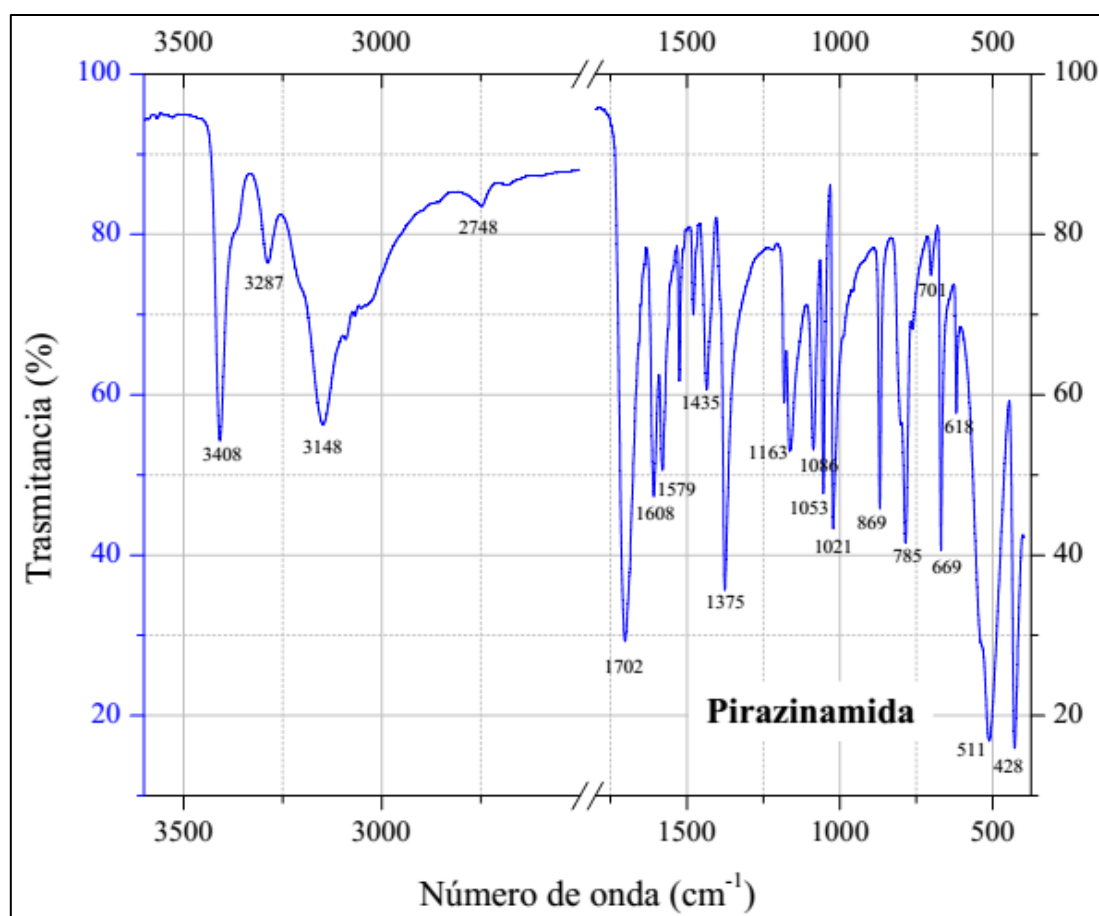


Figura 14. Espectro Infrarrojo de la molécula de pirazinamida

Pirazinamida tiene cuatro átomos donadores: los nitrógenos del anillo pirazina, el oxígeno del grupo carbonil y el nitrógeno del grupo amino, por lo tanto, tiene diferentes modos de enlace al ion metálico [80, 88, 89], es decir diferentes sitios de coordinación.

En algunos complejos, la coordinación de la pirazinamida al metal ocurre a través de los nitrógenos del anillo [14, 80, 90, 91, 92] y otras veces a través del oxígeno de grupo carbonil [80, 90, 93].

En el análisis de espectroscopía infrarroja de pirazinamida se identificaron los picos más importantes correspondientes a los grupos funcionales que posee esta molécula (C=O, NH₂ y el anillo pirazina) y de acuerdo con un estudio de Teoría funcional de densidad [94] se logró asignar la mayoría de los picos obtenidos en el espectro infrarrojo de la pirazinamida.

(Tabla 23)

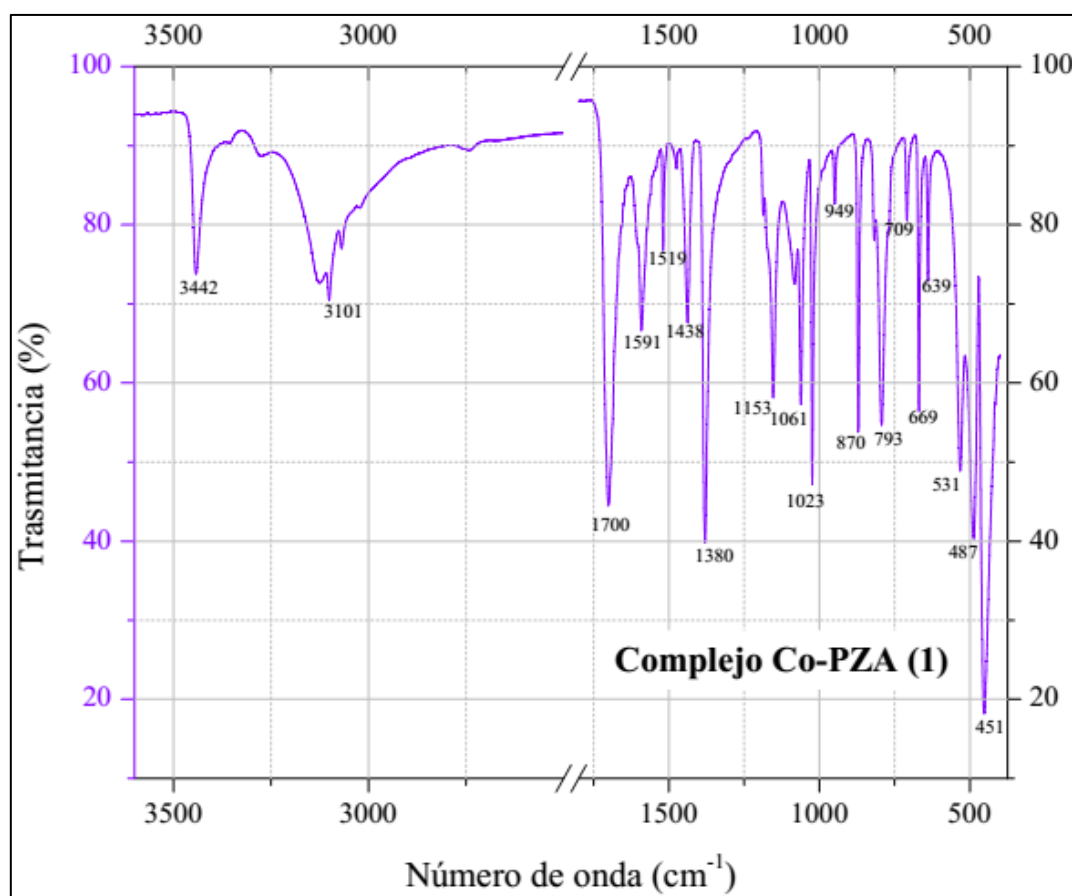


Figura 15. Espectro infrarrojo del complejo Co-PZA (1)

Para identificar los puntos de coordinación de pirazinamida al enlazarse con el núcleo metálico de cobalto en el complejo Co-PZA (1), se analizaron las variaciones en los números de onda de los picos más importantes del espectro de pirazinamida y del complejo.

Tabla 23. Asignación de grupos funcionales en el espectro infrarrojo de pirazinamida

N°	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Modo de Vibración
1	3408	NH ₂	Tensión asimétrica
2	3287	NH ₂	Tensión simétrica
3	3148	NH ₂	Tensión simétrica
4	2748	--	Sobretono
5	1702	C=O	Tensión
		NH ₂	Flexión en el plano
6	1608	NH ₂	Flexión en el plano
7	1579	NH ₂	Flexión en el plano
		C-C anillo	Tensión
8	1524	C-N anillo	Tensión
9	1478	C-N anillo	Tensión
		C-H anillo	Flexión en el plano
10	1435	C _{anillo} -C _{amida}	Tensión
		C-H anillo	Flexión en el plano
11	1375	C-C anillo	Tensión
		C-H anillo	Flexión en el plano
12	1181	C-N anillo	Tensión
		C-C anillo	Tensión
13	1163	C-H anillo	Flexión en el plano
14	1086	NH ₂	Balaceo
15	1053	.N-C-C anillo	Flexión en el plano
		C-H anillo	Flexión en el plano
16	1021	C-N-C anillo	Flexión en el plano
17	869	NH ₂	Torsión
18	785	N-C	Flexión fuera del plano
		C _{anillo} -C _{amida}	Flexión fuera del plano
		C-C anillo	Flexión fuera del plano
		C-H anillo	Flexión fuera del plano
19	701	C=O	Flexión fuera del plano
		C-N	Flexión fuera del plano

20	669	N-C-C	Flexión en el plano
21	618	NH ₂	Torsión
22	511	NH ₂	Balaceo
		C-C-N	Flexión en el plano
		--	Balaceo del anillo
23	428	C-N anillo	Flexión fuera del plano
		N-H amida	Flexión fuera del plano

En la siguiente tabla se presenta las variaciones que se observan en el espectro del complejo Co-PZA (1) (*Figura 15*) respecto del espectro de pirazinamida.

Tabla 24. Desplazamientos importantes en el infrarrojo de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (1)

Número de onda de pirazinamida (cm ⁻¹)	Número de onda del complejo (cm ⁻¹)	Δ cm ⁻¹	Grupo Funcional
3408	3442	34	NH ₂
3148	3101	47	NH ₂
1608	1591	17	NH ₂
1579	1591	12	NH ₂
			C-C anillo
			C-H anillo
1163	1153	10	C-H anillo
ND	949	--	C-H anillo
618	639	21	NH ₂
511	531	20	NH ₂
	487	24	C-C-N
			anillo
428	451	23	C-N anillo
			N-H amida

Tomando en cuenta los puntos de coordinación posibles de pirazinamida, se observa que hay cambios en los números de onda de los picos relacionados con el grupo funcional amida NH₂ y el anillo aromático.

Los cambios más resaltantes se observan en los dos primeros picos de pirazinamida que corresponden al NH_2 debido a la tensión o estiramiento asimétrico y simétrico de los enlaces N-H [95, 96, 97], además también se observa que el pico de 1608 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los enlaces N-H sufre un desplazamiento a 1591 cm^{-1} .

Finalmente, se observan desplazamientos y cambios morfológicos en los picos a 618, 511 y 428 cm^{-1} de pirazinamida hacia 639, 531 y 451 cm^{-1} en el complejo Co-PZA (1) que corresponden a vibración de torsión, balanceo y flexión fuera del plano del grupo amida [94, 95].

Todos estos cambios observados en el rango de 3500 a 3100 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} y de 600 a 400 cm^{-1} aproximadamente evidencian la formación de un enlace a través del nitrógeno del grupo amida con el centro metálico de cobalto.

Así como han sido observados cambios en los números de onda de los picos que corresponden al grupo amida, también se observan desplazamientos mayores a 10 cm^{-1} en los picos que han sido asignados al anillo aromático [94, 95] y se observa además la aparición o intensificación en el espectro del complejo Co-PZA (1) de una vibración a 949 cm^{-1} que no está activa en el espectro de pirazinamida, de acuerdo a la bibliografía revisada este pico puede corresponder a una vibración del anillo aromático [95, 98] que tiene sustituciones en las posiciones 1,2 y 4, es decir, un anillo bencénico 1,2 y 4-trisustituido [97] que también tiene vibración en a 780 cm^{-1} aproximadamente y que se expresa a 785 y 793 cm^{-1} en pirazinamida y en el complejo Co-PZA (1) respectivamente. De esta información podríamos arriesgarnos a decir que un enlace a través del nitrógeno en la posición 4 (tomando como posición 2 la sustitución debido al grupo amida) y el centro metálico de cobalto podría tomar lugar.

7. Espectroscopía Raman

En este estudio, se utilizó la espectroscopía Raman para analizar los posibles enlaces formados entre el centro metálico de cobalto en el complejo Co-PZA (1) y sus ligandos. Especialmente aquellos enlaces de los que sus vibraciones no pudieron ser observada a través de la espectroscopía infrarroja realizada en este estudio, ya que como es conocido las espectroscopias infrarroja y Raman son mutuamente complementarias [99].

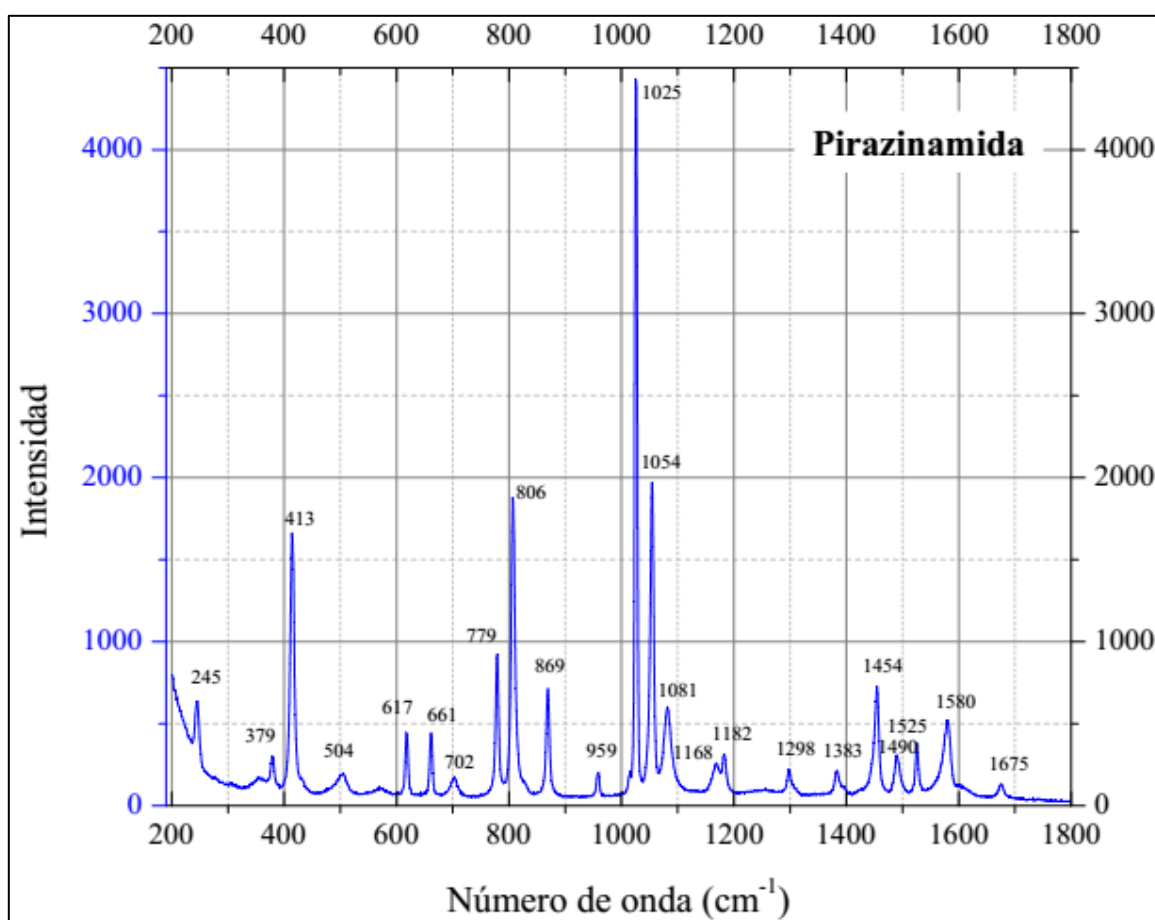


Figura 16. Espectro Raman de la molécula de pirazinamida

La Figura 16 muestra el espectro Raman de la molécula de pirazinamida y a continuación se presenta una tabla con la asignación de sus picos [94].

Tabla 25. Asignación de grupos funcionales en el espectro Raman de pirazinamida

Nº	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Modo de Vibración
1	245	Anillo aromático	Balanceo
2	379	NH ₂	Balanceo
		C-C anillo	Flexión fuera del plano
		C-N anillo	
3	413	C=O	Flexión fuera del plano
		C-N anillo	Tensión
		N-H amida	
4	504	NH ₂	Balanceo
		C _{anillo} -C _{amida} -N	Flexión en el plano
		Anillo aromático	Balanceo
5	617	NH ₂	Torsión
6	661	C-C-N anillo	Flexión en el plano
		NH ₂	Balanceo
7	702	C=O	Flexión fuera del plano
		C-N anillo	
8	779	C-N anillo	Flexión fuera del plano
		C-C anillo	
		C _{anillo} -C _{amida}	
		C-H anillo	
9	806	C _{anillo} -C _{amida} -N	Flexión en el plano
		NH ₂	Balanceo
10	869	NH ₂	Torsión
11	959	C-H anillo	Flexión fuera del plano
12	1025	C-N-C anillo	Flexión en el plano
13	1054	C-C-N anillo	Flexión en el plano
		C-H anillo	
14	1081	NH ₂	Balanceo
15	1168	C-H anillo	Flexión en el plano
16	1182	C-N anillo	Tensión
		C-C anillo	Tensión
		NH ₂	Balanceo
17	1298	C-H anillo	Flexión en el plano
18	1383	C-C anillo	Tensión
		C-H anillo	Flexión en el plano
		NH ₂	
19	1454	C _{anillo} -C _{amida}	Tensión

		C-N amida	Tensión
		N-H amida	Flexión en el plano
		C-H anillo	Flexión en el plano
20	1490	C-N anillo	Tensión
		C-H anillo	Flexión en el plano
21	1525	C-N anillo	Tensión
22	1580	C-C anillo	Tensión
		NH ₂	Flexión en el plano
23	1675	C=O	Tensión

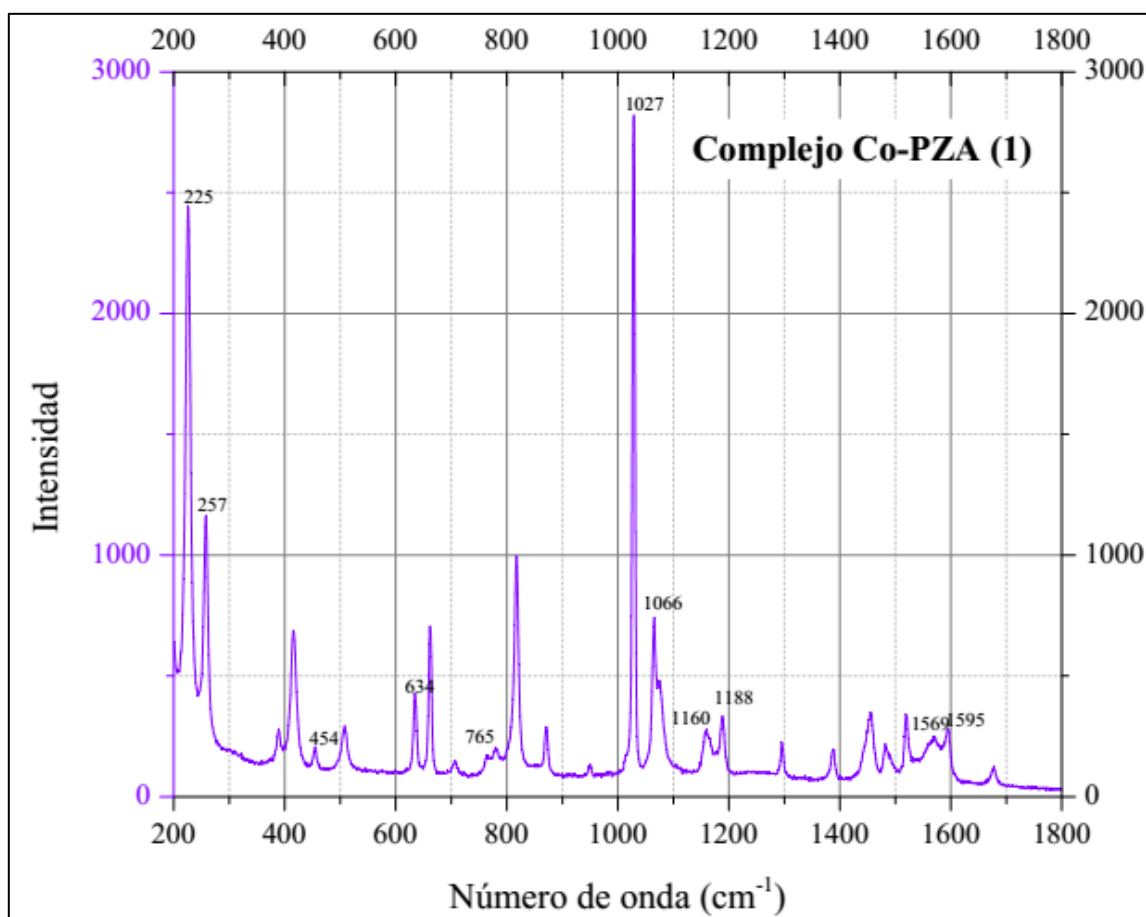


Figura 17. Espectro Raman del complejo Co-PZA (1)

Tabla 26. Desplazamientos importantes en el Raman de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (1)

Número de onda de pirazinamida (cm ⁻¹)	Número de onda del complejo (cm ⁻¹)	Δ cm ⁻¹	Grupo Funcional
--	225	--	Co-Cl
245	257	12	Anillo aromático
--	454	--	Co-Cl
617	634	17	NH ₂
779	--	--	C-N anillo
1081	--	--	NH ₂
1168	1160	8	C-H anillo
1185	1188	3	
1580	1569	11	C-C anillo
	1595	15	NH ₂

El espectro Raman del complejo Co-PZA (1) presenta diferencias frente al espectro de pirazinamida.

Se observa dos picos en el espectro del complejo que no aparecen en el espectro de pirazinamida, el primero a 225 cm⁻¹ y el segundo a 454 cm⁻¹, de acuerdo con la bibliografía revisada para este estudio se ha encontrado que alrededor de 200 y 400 cm⁻¹ son frecuentes las vibraciones del enlace M-Cl [98, 100] tanto en la espectroscopía Raman como infrarroja (Tabla 27 y Figura 18) [93]. Por ejemplo, a 430 cm⁻¹ se observa una banda para el compuesto de CoCl₂, además a 320 y 230 cm⁻¹ se observan bandas para los compuestos de CoCl₂.2py y CoCl₂.4py respectivamente (donde py representa a piridina) [97]. Por otro lado, J. E. Rüede y D. A. Thornton afirman que para un compuesto octaédrico de cobalto del tipo ML₂X₂ donde L es piridina y X es cloro, existen dos vibraciones en el infrarrojo correspondientes al enlace Co-Cl los cuales aparecen a 222 y 230 cm⁻¹. Mientras que para un compuesto de tipo tetraédrico las vibraciones para el mismo enlace aparecen a 307 y 346 cm⁻¹ [101]. Para un compuesto MgCl₂ aparecen vibraciones a 249, 327 y 842 cm⁻¹ [102]. Por lo tanto, con la evidencia de los rangos a los que aparecen las vibraciones de un enlace tipo M-X (donde M es el metal y X es

el halógeno) tanto en el espectro infrarrojo como en el Raman, en este estudio se ha asignado al enlace Co-Cl los picos de 225 y 454 cm^{-1} , donde el cloruro proviene de la sal precursora con la que se realizó la síntesis del complejo.

Otros cambios observados en el espectro Raman del complejo provienen del grupo funcional NH_2 del que ya se había confirmado como punto de coordinación en el ítem anterior con el estudio del espectro infrarrojo. Estos cambios se reflejan en: el desplazamiento del pico a 617 cm^{-1} en pirazinamida a 634 cm^{-1} en el complejo, así como también la superposición de los picos a 1054 y 1081 cm^{-1} en pirazinamida que se presentan como una sola señal a 1065 cm^{-1} en el complejo y finalmente el desdoblamiento del pico a 1580 cm^{-1} en dos señales a 1569 y 1595 cm^{-1} . También se observan diferencias importantes en los números de onda que corresponden a los enlaces C-C, C-H, C-N del anillo aromático. Por ejemplo, el pico a 779 cm^{-1} en pirazinamida se presenta como una señal de baja intensidad a 765 cm^{-1} en el complejo, esta vibración es asignada al enlace C-N del anillo [94]. También el pico a 959 cm^{-1} en pirazinamida que luego aparece como una leve señal a 950 cm^{-1} en el complejo, es asignado al enlace C-H del anillo aromático [94]. A 1054 cm^{-1} se observa un pico que es asignado a una vibración generada por el enlace entre los carbonos y nitrógeno del anillo aromático C-C-N [94], este pico se desliza y se superpone con el pico a 1081 cm^{-1} de pirazinamida en el pico 1065 cm^{-1} en el complejo. Finalmente, otro cambio que se observa en cuanto a las vibraciones generadas por el anillo aromático es el alejamiento entre los picos a 1168 y 1182 cm^{-1} de pirazinamida que en el complejo aparecen a 1160 y 1188 cm^{-1} duplicando su separación.

Tomando en cuenta las diferencias observadas entre los espectros que corresponden a pirazinamida y el complejo, en este estudio se concluye que existen enlaces entre el centro metálico de cobalto y el cloro (Co-Cl) y además con un nitrógeno del grupo amida y del anillo aromático (Co-N). En este último supuesto se tomará como nitrógeno coordinante al de la

posición número 4, debido a lo que ya se había propuesto en la última parte del ítem anterior de espectroscopía infrarroja.

Tabla 27. Regiones donde ocurren vibraciones debido al enlace metal-halógeno

	Cl
M-X (tensión), cm-1	610 – 220
M-X (deformación), cm-1	200 – 100

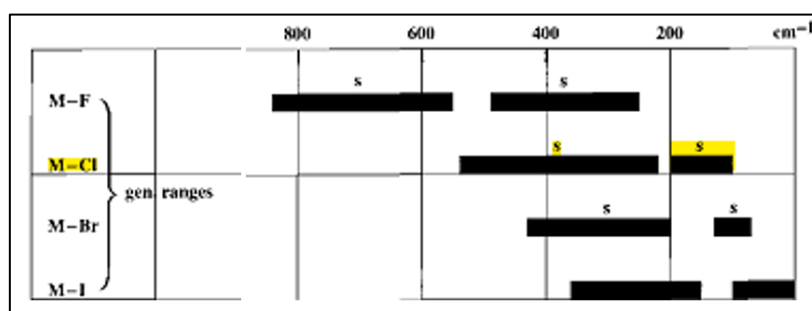


Figura 18. Rangos generales de vibraciones por enlace metal-halógeno

8. Análisis de conductividad

El procedimiento comúnmente adoptado es el de determinar la conductividad específica, κ , de una solución a partir de la medida de la resistencia, R , en una celda experimental de constante de celda conocida, la celda formando un brazo de circuito de puente de Wheatstone. Finalmente, κ es calculada por la expresión 6 [74]:

$$\kappa = \text{Constante de celda} / R \quad \text{Expresión 6}$$

Las expresiones más usadas para la comparación de electrolitos son la conductividad equivalente, Λ_e , o la conductividad molar, Λ_M , que están relacionadas a κ por las expresiones 7 y 8 [74]:

$$\Lambda_e = \kappa V_e \quad \text{y} \quad \Lambda_M = \kappa V_M \quad \text{Expresión 7}$$

$$\Lambda_e = \kappa / C_e \quad \text{y} \quad \Lambda_M = \kappa / C_M \quad \text{Expresión 8}$$

Donde V_e y V_M son los volúmenes (en mililitros) conteniendo 1 equivalente o 1 mol de soluto respectivamente, y C_e y C_M son las concentraciones del soluto expresado en equivalentes/mL o mol/mL respectivamente [74].

Los rangos aceptables de Λ_M para varios tipos de electrolitos se muestran en la *Tabla 28* [74].

Tabla 28. Resumen de los rangos de Λ_M esperados para complejos de diferentes tipos de electrolitos a 10^{-3} M en solventes orgánicos comunes ($\text{cm}^2 \cdot \text{ohm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Solventes	Tipos de electrolitos			
	1:1	2:1	3:1	4:1
Nitrometano	75 - 95	150 - 180	220 - 260	290 - 330
Nitrobenceno	20 - 30	50 - 60	70 - 82	90 - 100
Acetona	100 - 140	160 - 200	270	360
Acetonitrilo	120 - 160	220 - 300	340 - 420	500
Dimetilformamida	65 - 90	130 - 170	200 - 240	300
Metanol	80 - 115	160 - 220	290 - 350	450
Etanol	35 - 45	70 - 90	120	160

De acuerdo con la literatura, la determinación del tipo de electrolito se realizó preparando una solución de 10^{-3} M del complejo Co-PZA (1) en metanol. A esta solución se le midió su conductividad específica a 25°C con un conductímetro de constante de celda conocida. Los datos obtenidos de la medición en metanol fueron los siguientes:

Tabla 29. Datos de conductividad en metanol a 25°C

SOLVENTE / COMPLEJO	Conductividad específica, κ , $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$	Conductividad específica promedio, κ , $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$
BLANCO (Metanol)	2.8	2.8
	2.8	
	2.8	
Co-PZA (1)	135.4	134.7
	133.9	
	134.9	

Dados los resultados obtenidos, el valor de conductividad promedio para el complejo Co-PZA (1) es $134.7 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. De acuerdo con la *Tabla 28*, este valor no pertenece a ningún tipo de electrolito, y lo que se puede observar es que el valor 134.7 se encuentra en la mitad del rango entre 115 y $160 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ que son los valores límite de los rangos de tipo de electrolito 1:1 y 2:1.

Como ya se ha visto en los ítems anteriores, se ha propuesto que la fórmula molecular para el complejo Co-PZA (1) es $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ donde el centro metálico de cobalto tendría dos tipos de ligandos: pirazinamida y cloro. En base al resultado de espectroscopía infrarroja, pirazinamida tendría dos átomos coordinantes a cobalto, los cuales serían el nitrógeno de la amida y el nitrógeno del anillo aromático, de esa manera, teniendo en cuenta que se proponen dos pirazinamidas en la estructura, se tendrían cuatro lugares de coordinación ocupados, quedando dos lugares para completar la geometría octaédrica los cuales serían ocupados por los átomos de cloro basándonos en los resultados de la espectroscopía Raman. Por lo tanto, con esta información, el complejo Co-PZA (1) en medio metanólico se disociaría como un electrolito de tipo 2:1, sin embargo, la conductividad obtenida no coincide con el resultado esperado. Esto puede deberse a que el complejo en el medio metanólico no se disocia por completo como un electrolito 2:1, es decir, que en un porcentaje de moléculas de complejo se disocian los dos cloruros y en otro porcentaje solo un cloruro, y eso podría provocar que la conductancia tenga un valor intermedio entre los tipos de electrolitos 1:1 y 2:1.

Finalmente, la estructura molecular del complejo Co-PZA (1) sería representada por la *Figura 19*:

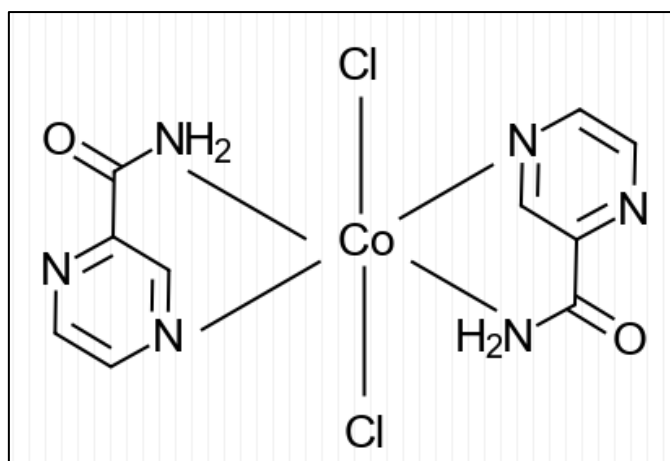


Figura 19. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (1)

IV.2 Complejo Co-PZA (2)

1. Síntesis

En la síntesis del complejo Co-PZA (2) se obtuvo un sólido no cristalino de color anaranjado (*Figura 20*). El rendimiento obtenido en la síntesis del complejo Co-PZA (2) fue de 55%.



Figura 20. Fotografía del complejo Co-PZA (2)

2. Propiedades fisicoquímicas

2.1 Punto de fusión

El complejo no presenta punto de fusión, sin embargo, a partir de los 260°C empieza a descomponerse cambiando de color hasta oscurecerse.

2.2 Solubilidad

La solubilidad del complejo Co-PZA (2) comparado con la solubilidad del ligando pirazinamida, muestra que es una sustancia medianamente soluble en solventes polares a excepción de la acetona en la cual es insoluble.

Tabla 30. Solubilidad del complejo Co-PZA (2) y pirazinamida

Solvente	Co-PZA (2)	Pirazinamida
Agua	S	MS
Etanol	PS	PS
Metanol	S	S
Acetona	I	S
DMF	PS	S
DMSO	PS	S
Cloroformo	I	PS

*S: soluble, PS: poco soluble, MS: muy soluble, I: insoluble

3. Composición química

Se ha utilizado las técnicas de análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno; análisis de absorción atómica de cobalto para verificar la composición del complejo Co-PZA (2). Además, también se utilizó el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento para cuantificar el contenido de pirazinamida en el complejo. Finalmente, se utilizó la termogravimetría para conocer el porcentaje de óxido de cobalto formado al final del proceso y compararlo con el valor calculado de acuerdo con la fórmula propuesta.

3.1 Análisis elemental de C, H y N

A continuación, se presentan los porcentajes experimentales y calculados de C, H y N obtenidos en el análisis elemental y con base en la fórmula propuesta.

Tabla 31. Porcentajes en masa experimentales y calculados de C, H y N del complejo Co-PZA (2)

Elemento	% Experimental	% Calculado	% Δ (variación)
C	26.01	26.86	0.85
H	2.87	2.70	0.17
N	24.65	25.06	0.41

Comparando estos valores, se observa que el error es menor a 1%, por lo que en este trabajo se considerará que los porcentajes de C, H y N obtenidos coinciden con los valores calculados basados en la fórmula propuesta para el complejo Co-PZA (2).

3.2 Espectroscopía de absorción atómica de cobalto (Co)

En este trabajo se empleó el análisis de absorción atómica para la determinación de cobalto en el complejo Co-PZA (2). Para ello se preparó una curva de calibración de 0.4, 1 y 2 ppm [75], obteniendo los resultados mostrados en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)** en la *Tabla 8* y *Figura 10*.

Para la preparación de la muestra se pesó 0.0377 g del complejo y se disolvió en ácido nítrico 0.5N, el volumen final de la solución fue de 25 mL y se realizó una dilución de 1:200.

Tabla 32. Datos de preparación de la muestra de complejo Co-PZA (2)

Complejo	Masa, g	Vol. Final, mL	Factor de dilución
Co-PZA (2)	0.0377	25	200

Finalmente, el resultado de concentración de cobalto en el complejo Co-PZA (2) fue:

Tabla 33. Concentración final de cobalto (%Co) en el complejo Co-PZA (2)

Complejo	Concentración de la solución preparada, ppm	Concentración Final, %Co
Co-PZA (2)	0.9899	13.13

A continuación, se muestra una tabla comparativa del porcentaje de cobalto experimental y calculado (con base a la fórmula molecular propuesta) del complejo Co-PZA (2).

Tabla 34. Tabla comparativa de resultados de concentración de cobalto en Co-PZA (2)

Complejo	% Co Experimental	% Co Calculado	%Δ
Co-PZA (2)	13.13	13.18	0.05

De esta manera, confirmamos la presencia de un átomo de cobalto en una molécula de complejo Co-PZA (2).

3.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

En este estudio se determinó el contenido de pirazinamida en el complejo Co-PZA (2) usando la cromatografía líquida de alto rendimiento bajo las mismas condiciones de trabajo especificadas en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1) ítem 3.3 Cromatografía líquida de alto rendimiento**. Los resultados de la curva de calibración obtenidos se presentaron en la sección antes mencionada en la *Tabla 14* y *Figura 11*.

En cuanto a la preparación de la muestra, se pesó 10 mg del complejo para llevarlo a un volumen final de 50 mL de agua, esta solución fue diluida a la cuarta parte de su concentración antes de ser inyectadas en el cromatógrafo (HPLC)

Tabla 35. Datos de la preparación del complejo Co-PZA (2)

Complejo	Masa, mg	Volumen Final, mL	Factor dilución
Co-PZA (2)	10.00	50	4

La concentración obtenida en el análisis fue:

Tabla 36. Concentración HPLC ($\mu\text{g/L}$) y final de pirazinamida en el complejo Co-PZA (2)

Complejo	Concentración HPLC de pirazinamida, $\mu\text{g/L}$	Concentración Final de pirazinamida, $\mu\text{g/mL}$	Masa total de pirazinamida, μg
Co-PZA (2)	27.939	111.754	5587.700

Dados los resultados, se presenta una comparación entre los valores experimental y calculado:

Tabla 37. Tabla comparativa del porcentaje de pirazinamida experimental y calculado en el complejo Co-PZA (2)

Complejo	% Pirazinamida experimental	% Pirazinamida calculado	%Δ
Co-PZA (2)	55.88	55.06	0.81

El resultado de porcentaje de pirazinamida muestra que existen dos moléculas de pirazinamida por una molécula de complejo.

3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico realizado en este estudio se basó en el monitoreo de la masa del complejo en función del incremento de la temperatura hasta alcanzar los 950°C.

En la *Figura 21* se muestra que el complejo Co-PZA (2) se descompone en 4 etapas, la suma de estas 4 pérdidas deja un residuo con un porcentaje en masa igual a 17.46%. Tomando en cuenta que al final del proceso de descomposición se llega a la formación del óxido metálico [73, 80] que en este caso es el óxido de cobalto, se ha calculado que el CoO representa el 16.76% de la masa del complejo. La diferencia de porcentaje del residuo experimental y calculado puede deberse a muchas razones y una de ellas puede ser la pureza de la muestra. [73] Sin embargo, la diferencia es menor al 1%, por ello se toma este resultado como prueba de que la fórmula propuesta es correcta.

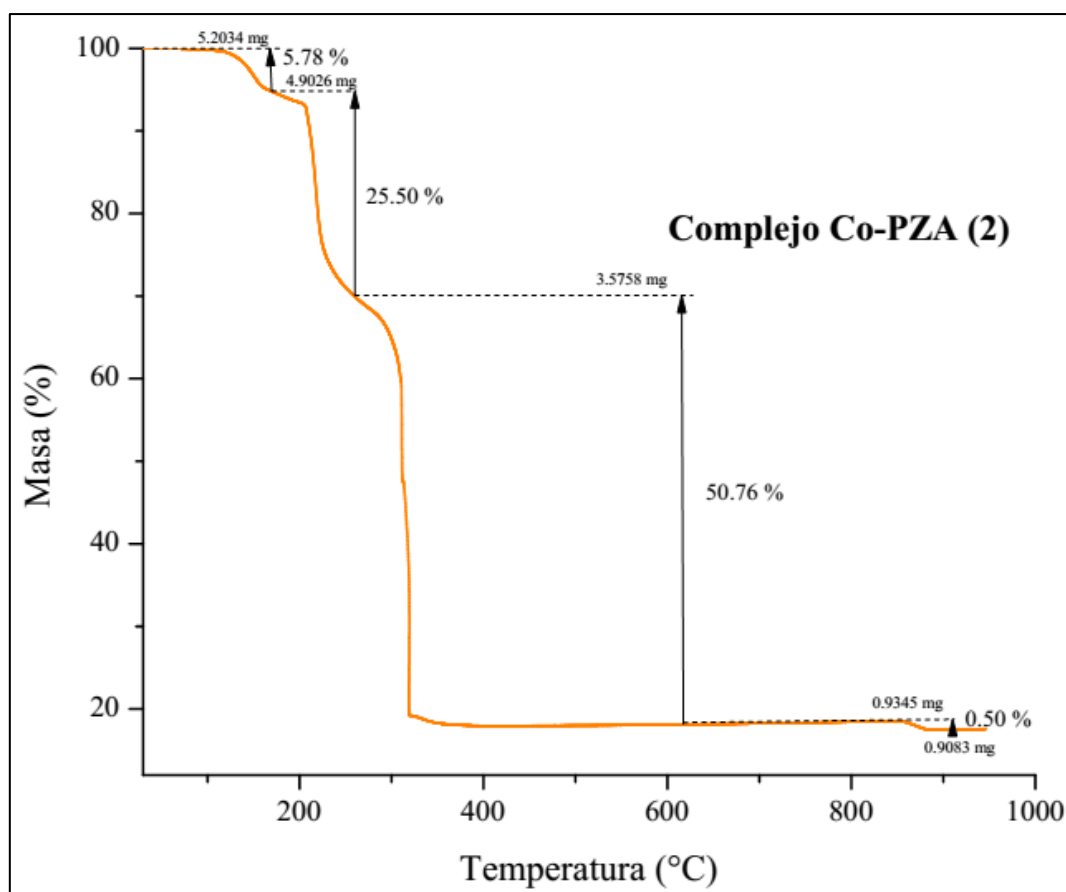


Figura 21. Curva termogravimétrica del complejo Co-PZA (2)

Tabla 38. Tabla comparativa de valores experimental y calculado del porcentaje en masa del óxido de cobalto formado (CoO) en el análisis termogravimétrico del complejo Co-PZA (2)

Complejo	% CoO experimental	% CoO calculado	%Δ
Co-PZA (2)	17.46	16.76	0.70

4. Determinación del momento magnético.

Para verificar el comportamiento magnético del complejo Co-PZA (2) sintetizado en este trabajo, se realizaron las mismas medidas de susceptibilidad magnética a temperatura ambiente que fueron realizadas para el complejo Co-PZA (1). Como ya se ha visto en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)**, después de obtener el valor de la susceptibilidad magnética molar (χ_M), este valor debe ser corregido debido a la contribución diamagnética de los iones y

ligandos presentes en el complejo. En la *Tabla 39*, se muestran los valores de contribución diamagnética de los átomos y moléculas presentes en el complejo Co-PZA (2) [60, 83].

Tabla 39. Valores de contribución diamagnética de los átomos en el complejo Co-PZA (2)

Catión, anión, elemento o molécula	Contribución diamagnética (x10 ⁻⁶ unidades CGS)
Co ²⁺	-12
C	-6
H	-2.93
O (aldehído o cetona)	-1.73
N (anillo)	-4.61
NO ₃ ⁻	-19
H ₂ O	-14

De acuerdo con la fórmula propuesta para el complejo y los valores indicados en la *Tabla 39*, se obtiene que la contribución diamagnética total (susceptibilidad magnética corregida $\chi_{\text{corregido}}$) para el complejo Co-PZA (2) es -198.4×10^{-6} .

Los datos obtenidos en la medición de la susceptibilidad magnética a 20°C del patrón se presentaron en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)** en la *Tabla 20*. A continuación, se muestran los datos obtenidos del complejo Co-PZA (2):

- Datos del Complejo Co-PZA (2):

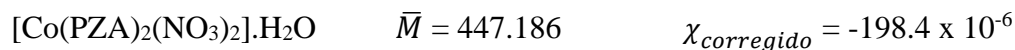


Tabla 40. Datos de la medición de susceptibilidad magnética para el complejo Co-PZA (2)

Repetición	1	2	3	4	Promedio
δ_2	-0.000800	-0.000800	-0.000900	-0.001200	-0.000925
Δ_2	0.001700	0.001800	0.001700	0.001700	0.001725
m_2	0.021000	0.021000	0.020900	0.020900	0.020950

De donde se obtiene que para el Complejo Co-PZA (2), reemplazando en las expresiones 2, 3, 4 y 5 de la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)**:

$$\chi_{ga} = 18,4846 \times 10^{-6}$$

$$\chi_M = 8266,075 \times 10^{-6}$$

$$\chi'_M = 8464,495 \times 10^{-6}$$

$$\mu_{eff} = 4.473 = \sqrt{[n(n + 1)]}$$

$$n = 3$$

El valor del momento magnético obtenido experimentalmente para el complejo Co-PZA (2) fue de 4.473, de acuerdo con la *Tabla 22* este valor corresponde al ion metálico de Co^{2+} con 3 electrones desapareados en un entorno octaédrico [60, 62, 78, 84], es decir, un campo octaédrico débil o de espín alto con configuración $t^5_{2g}e^2_g$ y EECC (energía de estabilización de campo cristalino) igual a $0.8\Delta_o$ [60].

5. Espectroscopía UV-Visible

Cobalto (II), un sistema d^7 , tiene los siguientes estados de ion libre: 4F , 4P , 2P , 2D , 2G , 2H y 2F . En un campo cristalino octaédrico, el estado de ion libre más bajo, 4F , se divide en dos orbitales triplete, $^4T_{1g}$ y $^4T_{2g}$, y un orbital singulete, $^4A_{2g}$; mientras que el siguiente estado más bajo de ion libre, 4P , permanece como $^4T_{1g}$ [85].

Como ya se mencionó en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)** el diagrama de Orgel para el ion Co^{2+} en campos octaédricos débiles revela que se debe observar un espectro con tres absorciones [60]. La primera banda, asignada a la transición $^4T_{1g}(F) \leftrightarrow ^4T_{2g}(F)$, es usualmente encontrada en la región de $5500 - 11000 \text{ cm}^{-1}$. La segunda banda es débil (pero permitida por el spin), asignada a la transición $^4T_{1g}(F) \leftrightarrow ^4A_{2g}(F)$ es encontrada en la región de

12000 – 17000 cm^{-1} ; la tercera banda es asignada a la transición ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4\text{T}_{1g}(\text{P})$, 2P, 2G y usualmente es encontrada en la región de 16000 – 22000 cm^{-1} [86].

El espectro UV del complejo Co-PZA (2) se muestra en la *Figura 22*. En él se observa una banda a 319 nm, el cual se atribuye a la presencia del ligando. Además, en el rango del visible se observa una banda de baja absorbancia (opacada por la intensidad de la banda de la región ultravioleta) a 513 nm, el cual se atribuye a la presencia del metal de transición.

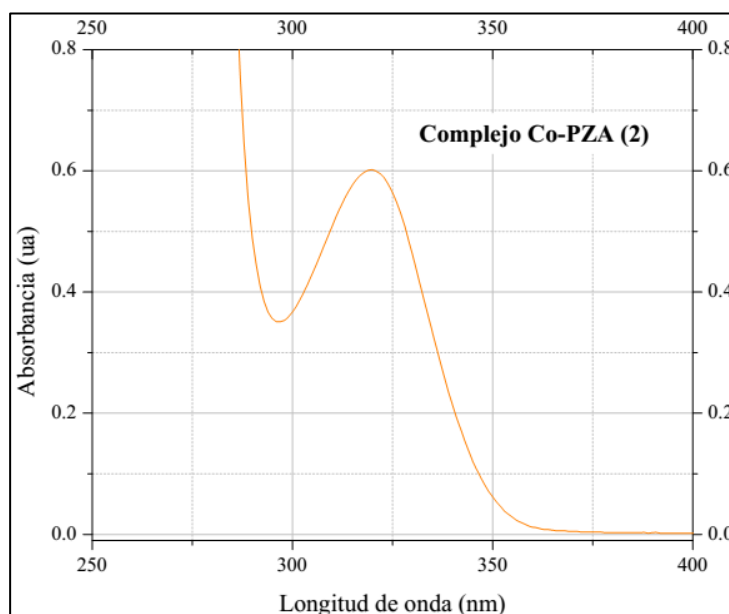


Figura 22. Espectro UV del complejo Co-PZA (2)

Al convertir las longitudes de onda a números de onda se obtiene que la banda a 319 nm es equivalente a 31347 cm^{-1} y la de 513 nm a 19493 cm^{-1} . Donde la última banda es asignada a la transición ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4\text{T}_{1g}(\text{P})$; debido a que las transiciones ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4\text{T}_{2g}(\text{F})$ y ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \leftrightarrow {}^4\text{A}_{2g}(\text{F})$ ocurren a menor número de onda (o mayor longitud de onda), bandas que no se observan en el espectro.

Por otro lado, la banda que se asignó a la presencia del ligando pertenecería a una transición electrónica de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. [14, 87]

Finalmente, se debe mencionar que existe una banda relacionada al ion nitrato pero que no es observada en el espectro del complejo, sin embargo, si es observada al realizar un barrido espectrométrico de la sal de nitrato de cobalto, esta banda se presenta a 300 nm. Por tanto, al observar el espectro del complejo, notamos que esta banda podría estar superpuesta con la banda relacionada a pirazinamida.

6. Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

En este estudio se ha empleado la espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR por su nominación en inglés Attenuated total reflectance) para la obtención de los espectros del ligando y el complejo Co-PZA (2) en la región media del infrarrojo.

Tanto el espectro infrarrojo como la tabla con la asignación de grupos funcionales de pirazinamida se muestran en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)** en la *Tabla 23* y *Figura 14*. Como ya se ha mencionado también en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)**, pirazinamida tiene cuatro átomos donadores: los nitrógenos del anillo pirazina, el oxígeno del grupo carbonil y el nitrógeno del grupo amino, por lo tanto, tiene diferentes modos de enlace al ion metálico [80, 88, 89], es decir diferentes sitios de coordinación ya que en algunos complejos, la coordinación de la pirazinamida al metal ocurre a través de los nitrógenos del anillo [14, 80, 90, 91, 92] y otras veces a través del oxígeno de grupo carbonil [80, 90, 93].

A continuación, se muestra el espectro infrarrojo del complejo Co-PZA (2):

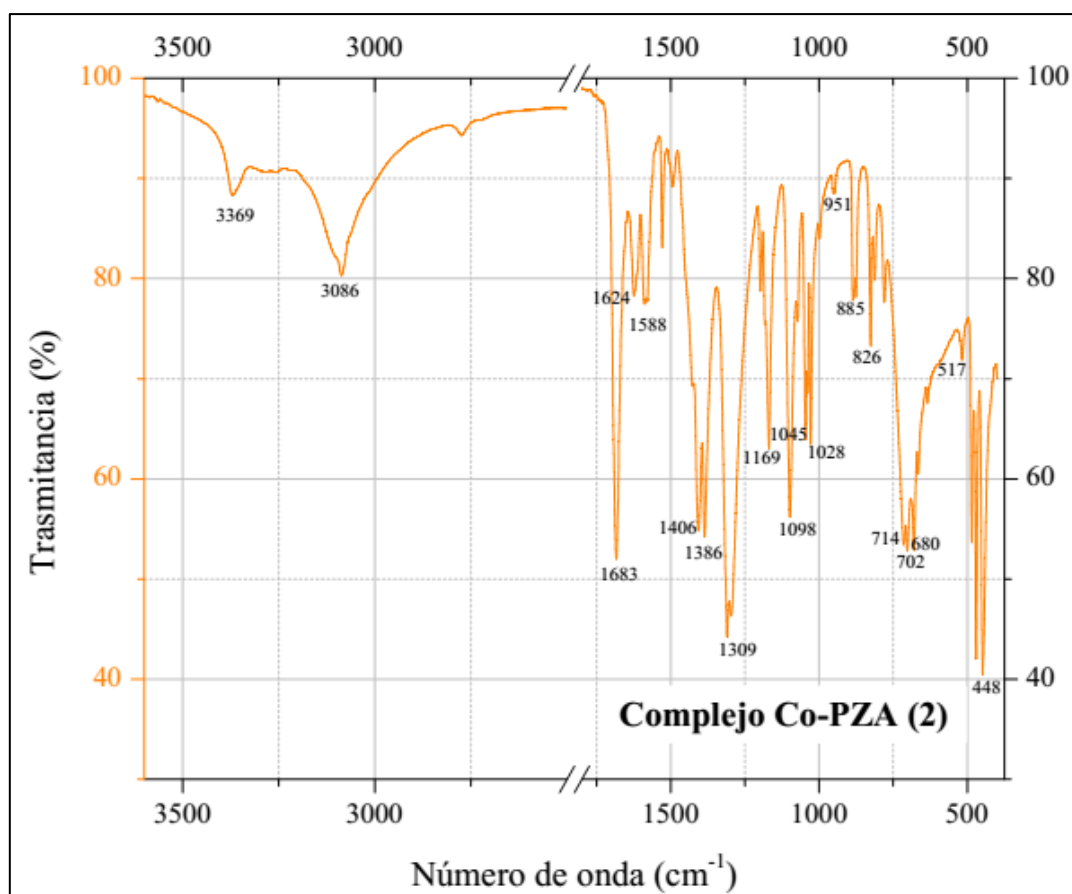


Figura 23. Espectro infrarrojo del complejo Co-PZA (2)

Tomando en cuenta los picos identificados en el espectro de pirazinamida en la *Tabla 23*, se compara los espectros para observar las variaciones de los picos correspondientes a los grupos funcionales del ligando.

En la siguiente tabla se presenta las variaciones que se observan en el espectro del complejo Co-PZA (2) (*Figura23*) respecto del espectro de pirazinamida.

Tabla 41. Desplazamientos importantes en el infrarrojo de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (2)

Número de onda de pirazinamida (cm ⁻¹)	Número de onda del complejo (cm ⁻¹)	Δ cm ⁻¹	Grupo Funcional
3408	3369	39	NH ₂
3287	--	--	NH ₂
3148	3086	62	NH ₂
1702	1683	19	C=O
1608	1624	16	NH ₂
1435	--	--	C _{anillo} -C _{amida}
1375	1386	11	C-C anillo
			C-H anillo
1086	1098	12	NH ₂
1053	1045	8	.N-C-C anillo
			C-H anillo
1021	1028	7	C-N-C anillo
785	826	41	N-C
			C _{anillo} -C _{amida}
			C-C anillo
			C-H anillo
669	--	--	NH ₂
618	--	--	NH ₂
511	--	--	NH ₂
428	448	28	N-H amida

Tomando en cuenta los puntos de coordinación posibles de pirazinamida, se observa que hay cambios en los números de onda y morfología de los picos relacionados con el grupo funcional amida NH₂ y carbonilo C=O.

Si empezamos el análisis por las bandas a mayor número de onda encontramos que los picos a 3369 y 3086 cm⁻¹ del complejo, corresponden a los desplazamientos de los picos a 3408 y 3148 cm⁻¹ de pirazinamida, vibraciones que se deben a la tensión simétrica y asimétrica del enlace N-H [95, 96, 97]. También se observa que el pico a 3287 cm⁻¹ de pirazinamida debido a la tensión simétrica del enlace N-H [94], no aparece en el espectro del complejo Co-PZA (2)

(Figura 23). Además, el pico a 1608 cm^{-1} que corresponde a la flexión de los enlaces N-H [94] sufre un desplazamiento a 1624 cm^{-1} , así como la vibración a 1086 cm^{-1} por balanceo del grupo amida NH_2 se desplaza a 1098 cm^{-1} .

Por otro lado, a menores números de onda también se observan variaciones en las vibraciones que corresponden especialmente al grupo amida. Los picos a 669 , 618 y 511 cm^{-1} no aparecen en el espectro del complejo Co-PZA (2), esto probablemente sucede porque los tipos de vibraciones implicadas a estos números de onda no tienen lugar en el complejo por la formación de enlaces, también se debe tener en cuenta que cerca de esta zona del espectro aparecen vibraciones correspondientes a otro grupo funcional que forma parte del complejo. Todo ello puede ocasionar este tipo de cambios en el espectro. Finalmente, hay un desplazamiento del pico a 428 cm^{-1} de pirazinamida hacia 448 cm^{-1} debido a la flexión del enlace N-H.

Todos estos cambios mencionados anteriormente reflejan la formación de un enlace a través del nitrógeno del grupo amida y el centro metálico de cobalto del complejo Co-PZA (2).

Otra variación importante entre los espectros es la banda a 1683 cm^{-1} del complejo Co-PZA (2) proveniente del desplazamiento del pico a 1702 cm^{-1} de pirazinamida. El rango general para verificar la presencia de vibraciones debido al grupo funcional $\text{C}=\text{O}$ es de $1900 - 1650\text{ cm}^{-1}$ debido a la tensión entre el carbono y el oxígeno de la molécula [103], siendo ésta su banda característica. Por lo tanto, se asigna al pico de 1702 cm^{-1} la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ [94]. Al verificar un desplazamiento en el espectro del complejo para la vibración más representativa de este grupo, se puede afirmar que a través del átomo coordinante de este grupo se estaría dando lugar a un enlace con el centro metálico del complejo.

Se evidencian otras zonas importantes en el espectro del complejo Co-PZA (2) que no provienen de las vibraciones causadas por los grupos funcionales del ligando pirazinamida. La

primera de ellas es la región de $1500 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ donde se observan bandas a 1406 , 1386 , 1309 y 1296 cm^{-1} . En esta zona ya existen vibraciones provenientes de pirazinamida, sin embargo de acuerdo con la literatura, también en esta zona se expresan vibraciones debido al enlace M-ONO_2^- [99, 104, 105], la bibliografía indica que cuando se forma un enlace covalente M-O-NO_2^- se origina un desdoblamiento de dos bandas presentes en el espectro del ion nitrato, el primer desdoblamiento ocurre con una banda aproximadamente a 1390 cm^{-1} (Tabla 42) la cual genera bandas a 1300 y 1500 cm^{-1} aproximadamente [99, 104, 105] (Tabla 43 y Figura 24). Los valores experimentales de las bandas del ion nitrato se observan en la Figura 24, y la banda que debería encontrarse a 1390 cm^{-1} aproximadamente, se encuentra a 1317 cm^{-1} (Figura 25), esta banda se desdoblará al formarse el enlace M-O-NO_2^- y sus bandas de desdoblamiento han sido asignados a los picos a 1406 y $1309-1296 \text{ cm}^{-1}$ (Tabla 44) del espectro del complejo Co-PZA (2). Además, a 1406 cm^{-1} se considera la superposición con el pico a 1435 cm^{-1} que surge de la tensión y/o flexión por enlaces entre átomos del anillo de pirazinamida [94], esto se puede evidenciar con la forma de la banda en el complejo. Es decir, que para la banda a 1435 cm^{-1} de pirazinamida no habría una variación en el número de onda sino un solapamiento con bandas provenientes del enlace M-O-NO_2^- . Por otro lado, en la misma banda a 1406 cm^{-1} se puede visualizar un pico que sobresale a 1386 cm^{-1} , se ha considerado que esta banda se debe al ligero desplazamiento de la banda a 1375 cm^{-1} proveniente de la tensión y/o flexión de enlaces relacionados con átomos del anillo aromático de pirazinamida, este desplazamiento no ha sido considerado como una evidencia de formación de enlace entre los átomos involucrados.

Tabla 42. Frecuencias de absorción y sus asignaciones para el ion NO_3^- (D_{3h}) [99]

Número de onda (cm^{-1})	Asignación
1390	Tensión NO_2 (asimétrica)
1050	Tensión N – O (simétrica)
831	Deformación NO_2
720	Oscilación en el plano

Tabla 43. Frecuencias de absorción y sus asignaciones para el enlace M-ONO_2^- (C_{2v}) [94]

Número de onda (cm^{-1})	Asignación
1531 – 1481	Tensión (asimétrica)
1290 – 1253	Tensión NO_2 (simétrica)
1034 – 970	Tensión N – O
800 – 781	Oscilación fuera del plano
740	Deformación NO_2
713	Oscilación en el plano

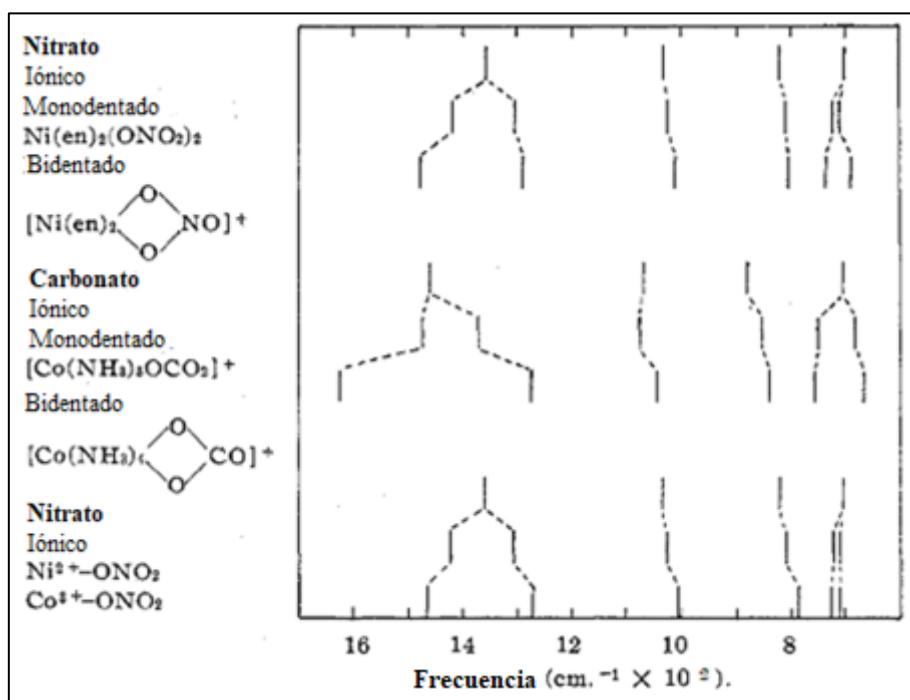


Figura 24. Desdoblamiento de bandas del ion nitrato a nitrato covalente [104]

El segundo desdoblamiento ocurre con la banda a 720 cm^{-1} (*Tabla 42*) la cual genera bandas débiles que muchas veces pasan desapercibidas en el espectro infrarrojo [99]. En la *Figura 25* no se observa ninguna banda a este número de onda, sin embargo, en el espectro del complejo Co-PZA (2) existen bandas a 714 y 702 cm^{-1} (*Tabla 44*) que no provienen de vibraciones originadas por el ligando pirazinamida, ya que sus bandas presentes en esta zona tienen una morfología muy diferente. En este contexto, estas absorciones son consideradas señales producto del desdoblamiento de la banda teórica a 720 cm^{-1} [99, 104, 105]. Además, la señal que se observa a 680 cm^{-1} es considerada como una señal proveniente del desplazamiento del pico a 669 cm^{-1} de pirazinamida que esta superpuesta con la banda más ancha del desdoblamiento.

Otras bandas correspondientes a la formación del enlace M-O-NO_2^- se presentan en el espectro del complejo Co-PZA (2) a 780 cm^{-1} (*Tabla 42*) por la oscilación fuera del plano del enlace [99] y a 1045 cm^{-1} donde es activa la vibración de tensión del enlace N-O del nitrato unido covalentemente al metal [99], esta banda es producto de la señal a 1045 cm^{-1} del espectro del nitrato de cobalto [104] también producto de la tensión del enlace N-O cuando el nitrato es iónico [99] (*Tala 42 y Figura 25*)

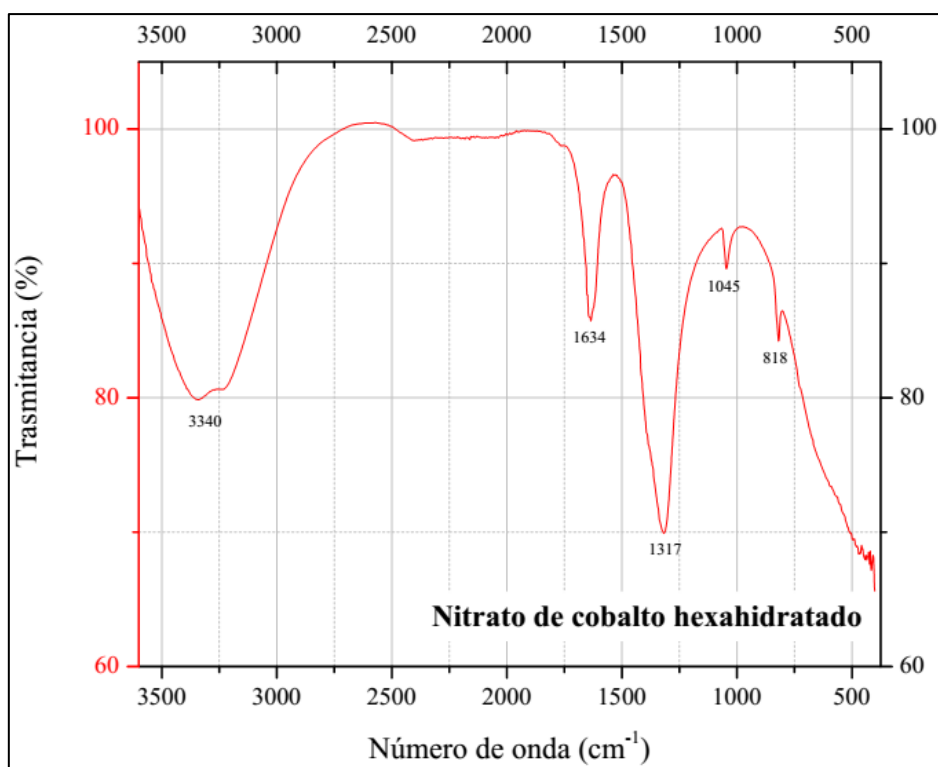


Figura 25. Espectro infrarrojo de nitrato de cobalto hexahidratado

Tabla 44. Frecuencias de absorción de los picos relacionados al nitrato en el complejo Co-PZA (2)

Número de onda del complejo (cm^{-1})	Asignación
714	Deformación NO_2
702	Oscilación en el plano
780	Oscilación fuera del plano
1045	Tensión N – O
1406	Tensión (asimétrica)
1309-1296	Tensión NO_2 (simétrica)

Los picos que aparecen a 826 y 1028 cm^{-1} en el espectro del complejo Co-PZA (2) son producto de ligeros desplazamientos de las bandas a 785 y 1021 cm^{-1} de pirazinamida respectivamente producto de las vibraciones de los átomos del anillo aromático, los cuales no representan ninguna posibilidad de enlace de los átomos que involucran esta vibración.

Por lo tanto, de acuerdo con las variaciones observadas, se deduce que la coordinación del ligando pirazinamida hacia el átomo metálico de cobalto sucede a través del nitrógeno y oxígeno del grupo amida, ocupando cuatro sitios de coordinación en total por las dos moléculas de pirazinamida presentes en el complejo. Además, también se evidencia la formación de un enlace covalente a través del oxígeno del grupo nitrato de forma monodentada.

7. Espectroscopía Raman

En esta parte de este estudio, se utilizó la espectroscopía Raman para confirmar los resultados obtenidos en la espectroscopía infrarroja de los posibles enlaces formados entre el centro metálico de cobalto en el complejo Co-PZA (2) y sus ligandos, ya que como es conocido las espectroscopias infrarroja y Raman son mutuamente complementarias. [99]

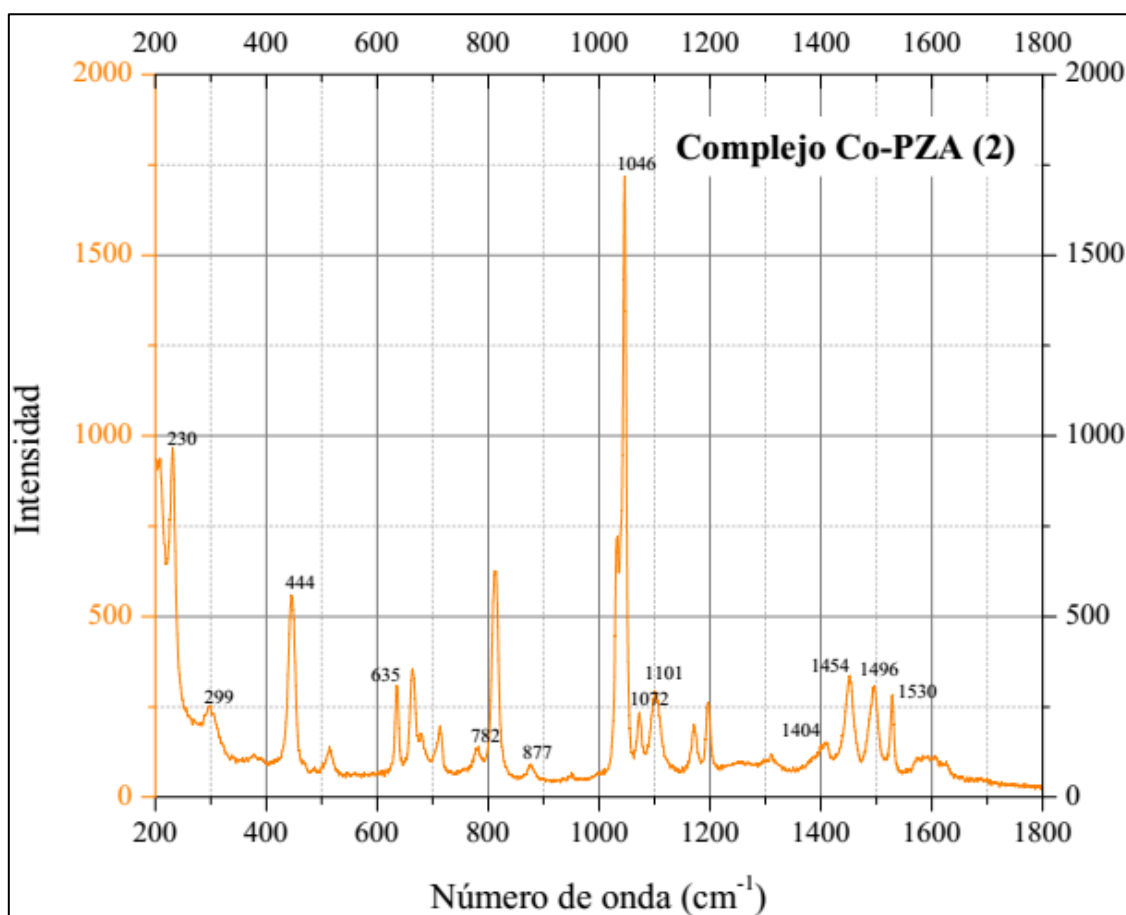


Figura 26. Espectro Raman del complejo Co-PZA (2)

Tabla 45. Desplazamientos importantes en el Raman de los picos de pirazinamida y el complejo Co-PZA (2)

Número de onda de pirazinamida (cm ⁻¹)	Número de onda del complejo (cm ⁻¹)	Δ cm ⁻¹	Grupo Funcional
--	230	--	Anillo aromático
245	--	--	Anillo aromático
379	--	--	NH ₂
413	444	--	NH ₂
617	635	17	NH ₂
779	782	3	C-N anillo
869	877	8	NH ₂
959	--	--	Anillo aromático
1025	1046	21	Anillo aromático
1054	1072	18	C-C-N anillo
1081	1101	20	NH ₂
1580	--	--	NH ₂
1675	--	--	C=O

Al comparar los espectros de pirazinamida y el complejo Co-PZA (2), se observa que los cambios más significativos ocurren con las absorciones relacionadas al grupo amida como los desplazamientos de las señales de pirazinamida a 413, 617 y 1081 cm⁻¹ [99] hacia 444, 635 y 1101 cm⁻¹ en el complejo. También ocurren variaciones con respecto a la intensidad de las señales relacionadas al mismo grupo, por ejemplo, los picos a 379, 869 y 1580 cm⁻¹ disminuyeron su intensidad en el espectro del complejo Co-PZA (2), todas estas variaciones son asignadas al grupo amida [99, 106] reflejando la formación de enlace entre el cobalto y el nitrógeno de este grupo funcional.

Otro cambio importante se observa en el pico a 1675 cm⁻¹ de pirazinamida, este pico es característico del grupo C=O [94, 106] y se observa el cambio de su señal en el espectro del complejo Co-PZA (2). De esta manera, se evidencia la formación de un enlace entre el cobalto y el oxígeno del grupo C=O.

Por lo tanto, luego de analizar los cambios importantes entre los espectros de pirazinamida y el complejo, se concluye que los enlaces entre el centro metálico de cobalto y la molécula de pirazinamida suceden a través del nitrógeno del grupo amida y del oxígeno del mismo grupo.

8. Análisis de conductividad.

Ya en la sección **IV.1 Complejo Co-PZA (1)** se ha explicado el procedimiento adoptado para la determinación de la conductividad. Además, se ha proporcionado una tabla (*Tabla 28*) con los rangos de conductividad molar de acuerdo con el tipo de electrolito en solventes orgánicos comunes.

De acuerdo con la literatura, la determinación del tipo de electrolito se realizó preparando una solución de 10^{-3} M del complejo Co-PZA (2) en metanol. A esta solución se le midió su conductividad específica a 25°C con un conductímetro de constante de celda conocida.

Los datos obtenidos de la medición en metanol fueron los siguientes:

Tabla 46. Datos de conductividad en metanol a 25°C

SOLVENTE / COMPLEJO	Conductividad específica, κ , $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	Conductividad específica promedio, κ , $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
BLANCO (Metanol)	2.8	2.8
	2.8	
	2.8	
Co-PZA (2)	162.0	161.6
	161.4	
	161.3	

Dados los resultados obtenidos, el valor de conductividad promedio para el complejo Co-PZA (2) es $161.6 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Con base a la información proporcionada en la *Tabla 28*, este

valor corresponde a un electrolito de tipo 2:1, resultado que concuerda con la disociación que tendría la molécula propuesta para el complejo Co-PZA (2): $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ donde los nitratos pasarían al medio quedando un núcleo de cobalto y pirazinamida.

Finalmente, la estructura molecular del complejo Co-PZA (2) sería representada por la

Figura 27:

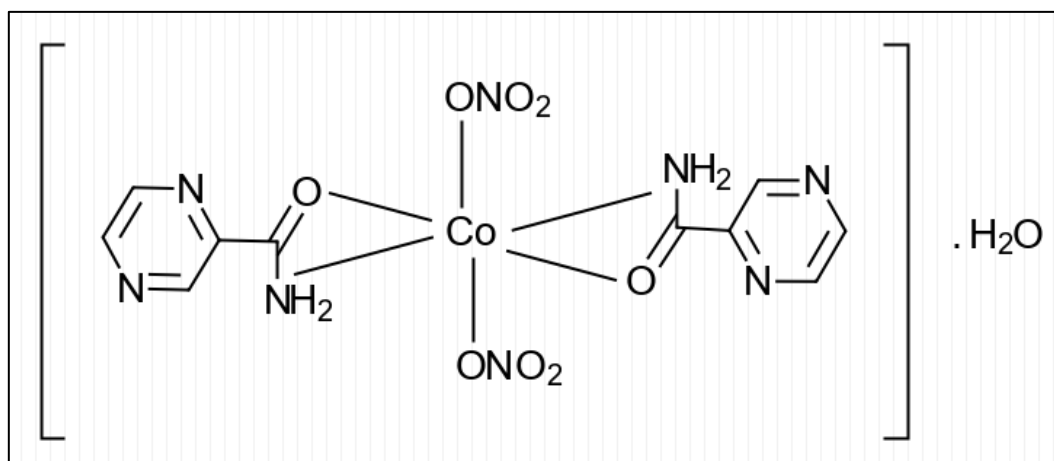


Figura 27. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (2)

Capítulo V.

Actividad biológica

En la evaluación de la actividad biológica se realizaron dos tipos de pruebas. En la primera prueba se midió la capacidad antimicrobiana de los complejos sintetizados en cultivos microbiológicos de cepas seleccionadas de *M. Tuberculosis*, con ello se estimó de manera cuantitativa la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada complejo. Entre las cepas seleccionadas se incluyó cepas sensibles y resistentes a pirazinamida. En la segunda prueba se midió la capacidad de cada complejo de ser hidrolizado por enzimas pirazinamidasa empleando el ensayo o test de Wayne. Las enzimas utilizadas fueron la pirazinamidasa nativa o *Wild Type* y pirazinamidases mutantes que perdieron la capacidad funcional debido a mutaciones cerca o que comprometen el sitio de coordinación.

V.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Los complejos junto a pirazinamida fueron evaluados en un cultivo de Tetrazolium en microplaca (TEMA) de 96 pozos. El TEMA es un método que permite la determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) de una droga para un determinado microorganismo. Este método se basa en los cambios colorimétricos causados por la capacidad de oxidación-reducción del colorante Tetrazolium [107]. A continuación, se explica cada parte del proceso de la evaluación de la concentración mínima inhibitoria:

1. Preparación del inóculo

Se inocularon 2 asadas de una cepa de cultivo de *M. tuberculosis* (cultivadas en medio 7H10 agar de 3 a 4 semanas) en un tubo de vidrio con 4 a 5 beads y 100 μ L de una solución al 10% de Tween. Se agitó con vortex por 30 segundos para luego dejar reposar por 5 minutos. Se agregaron 3 mL de solución salina tween (SST). Se agitó con vortex nuevamente por 30 segundos para dejar reposar de 15 a 20 minutos. Se transfirió el sobrenadante gota a gota a un tubo de vidrio sin beads y conteniendo 4 mL de SST. Se ajustó la turbidez a McFarland #1 utilizando SST como diluyente. Finalmente se hizo una dilución de 1 en 25 de la cepa

McFarland #1 con medio 7H9, se homogenizó y se agitó con vortex durante 30 segundos [108, 109].

2. Preparación de la placa con las drogas e inoculación de la cepa

Se agregaron 100 μL de medio 7H9-OADC al 10% a las columnas de la 3 hasta la 10 y las filas desde la A hasta la G (*Figura 28*) y 200 μL de medio 7H9-OADC al 10% a la columna 11. Posteriormente se agregó 100 μL de las drogas diluidas respectivas (en medio 7H9) a las columnas 2 y 3. Donde cada fila corresponde a una droga diferente, es decir, pirazinamida, complejos metálicos o sales precursoras [108, 109].

Con una pipeta multicanal se hicieron diluciones 1:2, se mezclaron 5 veces y se llevó 100 μL desde la columna 3 hasta la columna 10. Se descartó el volumen sobrante que quedó en la multipipeta de tal manera que todos los pozos tengan un volumen final de 100 μL excepto aquellos de la columna 11. Se llenó con 200 μL de agua destilada los pozos de las columnas 1 y 12 y la fila H para simular una cámara de humedad durante el tiempo de incubación. Finalmente se agregó 100 μL de la cepa diluída 1/25 a todos los pozos (columnas 2-11). Donde la columna 11-Fila A-F es el control de crecimiento de la cepa y la columna 11-Fila G que solo contiene medio 7H9, es el control negativo de la reacción. Se colocó la placa dentro de una bolsa zip-lock y se incubó a 37°C [108, 109].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	PZA 800 µg/mL 6.5 mM	PZA 400 µg/mL 3.25 mM	PZA 200 µg/mL 1.63 mM	PZA 100 µg/mL 0.81 mM	PZA 50 µg/mL 0.41 mM	PZA 25 µg/mL 0.20 mM	PZA 12.5 µg/mL 0.10 mM	PZA 6.25 µg/mL 0.05 mM	PZA 3.13 µg/mL 0.03 mM	Control (+)	H ₂ O
B	H ₂ O	CoCl ₂ 1550 µg/mL 6.5 mM	CoCl ₂ 775 µg/mL 3.25 mM	CoCl ₂ 388 µg/mL 1.63 mM	CoCl ₂ 194 µg/mL 0.81 mM	CoCl ₂ 97 µg/mL 0.41 mM	CoCl ₂ 48 µg/mL 0.20 mM	CoCl ₂ 24 µg/mL 0.10 mM	CoCl ₂ 12 µg/mL 0.05 mM	CoCl ₂ 6 µg/mL 0.03 mM	Control (+)	H ₂ O
C	H ₂ O	Co(NO ₃) ₂ 1827 µg/mL 6.3 mM	Co(NO ₃) ₂ 914 µg/mL 3.15 mM	Co(NO ₃) ₂ 457 µg/mL 1.58 mM	Co(NO ₃) ₂ 228 µg/mL 0.79 mM	Co(NO ₃) ₂ 114 µg/mL 0.39 mM	Co(NO ₃) ₂ 57 µg/mL 0.20 mM	Co(NO ₃) ₂ 29 µg/mL 0.10 mM	Co(NO ₃) ₂ 14 µg/mL 0.05 mM	Co(NO ₃) ₂ 7 µg/mL 0.02 mM	Control (+)	H ₂ O
D	H ₂ O	Co-PZA (1) 1977 µg/mL 5.3 mM	Co-PZA (1) 989 µg/mL 2.65 mM	Co-PZA (1) 494 µg/mL 1.33 mM	Co-PZA (1) 247 µg/mL 0.66 mM	Co-PZA (1) 124 µg/mL 0.33 mM	Co-PZA (1) 62 µg/mL 0.17 mM	Co-PZA (1) 31 µg/mL 0.08 mM	Co-PZA (1) 15 µg/mL 0.04 mM	Co-PZA (1) 8 µg/mL 0.02 mM	Control (+)	H ₂ O
E	H ₂ O	Co-PZA (2) 1977 µg/mL 4.4 mM	Co-PZA (2) 989 µg/mL 2.2 mM	Co-PZA (2) 494 µg/mL 1.1 mM	Co-PZA (2) 247 µg/mL 0.55 mM	Co-PZA (2) 124 µg/mL 0.28 mM	Co-PZA (2) 62 µg/mL 0.14 mM	Co-PZA (2) 31 µg/mL 0.07 mM	Co-PZA (2) 15 µg/mL 0.03 mM	Co-PZA (2) 8 µg/mL 0.02 mM	Control (+)	H ₂ O
F	H ₂ O	PZA + CoCl ₂ 800-1550 µg/mL 6.5+6.5 mM	PZA + CoCl ₂ 400-775 µg/mL 3.25+3.25 mM	PZA + CoCl ₂ 200-388 µg/mL 1.63+1.63 mM	PZA + CoCl ₂ 100-194 µg/mL 0.81+0.81 mM	PZA + CoCl ₂ 50-97 µg/mL 0.41+0.41 mM	PZA + CoCl ₂ 25-48 µg/mL 0.20+0.20 mM	PZA + CoCl ₂ 12.5-24 µg/mL 0.10+0.10 mM	PZA + CoCl ₂ 6.25-12 µg/mL 0.05+0.05 mM	PZA + CoCl ₂ 3.125-6 µg/mL 0.03+0.03 mM	Control (+)	H ₂ O
G	H ₂ O	PZA + Co(NO ₃) ₂ 800-1827 µg/mL 6.5+6.3 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 400-914 µg/mL 3.25+3.15 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 200-457 µg/mL 1.63+1.58 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 100-228 µg/mL 0.81+0.79 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 50-114 µg/mL 0.41+0.39 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 25-57 µg/mL 0.20+0.20 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 12.5-29 µg/mL 0.10+0.10 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 6.25-14 µg/mL 0.05+0.05 mM	PZA + Co(NO ₃) ₂ 3.125-7 µg/mL 0.03+0.02 mM	Control (-)	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Figura 28. Distribución de muestras en placa de 96 pozos para la determinación de la MIC

Al sexto día se agregó 50 µL de la mezcla tetrazolium-Twenn al pozo G10 y se incubó por 24 horas. Al día siguiente, se observó un viraje de color amarillo a púrpura y debido al cambio de color se agregó el colorante a todos los pozos, se incubó por 24 horas más. El MIC de cada droga será en el pozo donde no se observó cambio de color [108, 109].

Se realizó este ensayo en 3 cepas de *Mycobacterium Tuberculosis* diferentes: H37Rv (cepa nativa o Wild Type susceptible), DM97 (wild type resistente) y D49N (cepa mutante) [109, 110].

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria de los complejos con cada cepa a dos diferentes valores de pH: 6.6 y 6.

V.2 Ensayo de Wayne.

El ensayo de Wayne evalúa la hidrólisis de la pirazinamida (también pirazinamida contenida en los complejos), la cual es transformada a ácido pirazinoico por la enzima pirazinamidasa. Este ácido pirazinoico reacciona con el sulfato ferroso que se añade en el ensayo de Wayne, produciendo una coloración roja de variable intensidad según la cantidad de ácido pirazinoico producido [110, 111].

Para realizar este ensayo es necesario obtener la enzima purificada y conocer su concentración. Al conocer la concentración de la enzima obtenida se debe calcular el volumen de cada reactivo que forma parte de la reacción de tal forma que el volumen final sea de 100 μ L.

El ensayo consiste en la preparación de 4 tubos eppendorff en donde uno corresponde al blanco y los tres tubos restantes corresponden a pirazinamida, complejo Co-PZA (1) y complejo Co-PZA (2). Primero se agrega el volumen adecuado de agua y buffer fosfato de concentración apropiada a pH 6.4 de tal manera que la concentración final de buffer en los 100 μ L sea de 50 mM. Posteriormente se agrega el volumen adecuado de enzima y se incuba a 37 °C por 10 o 30 minutos dependiendo de si el ensayo es cualitativo o cuantitativo respectivamente. Al pasar el tiempo correspondiente, se añade la droga (pirazinamida o los complejos), y al cabo de 3 minutos se añade 10 μ L de sulfato ferroso al 20% para el desarrollo del color y se detiene la reacción usando 445 μ L de glicina 0.4 M a pH 3.4 (acidificado con HCl) [112].

Para obtener la proteína purificada se realizaron los siguientes procedimientos microbiológicos obtenidos del Manual de Protocolos de proteínas del Laboratorio de biología molecular y bioinformática de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

1. Preparación de células competentes para la expresión

Para la expresión las células más comúnmente utilizadas son las BL21 (DE3) pLysS de *E.coli*. Una colonia de estas células fue sembrada por agotamiento en una placa con LB-agar sin antibiótico y paralelamente en una placa con kanamicina (40 µg/mL) para asegurar la ausencia de un algún plásmido que confiera resistencia. Una colonia fue transferida a 2 mL de medio Luria-Bertani (LB) e incubada a 37 °C con agitación durante toda la noche. Un mililitro del cultivo fue inoculado en 50 mL de medio LB sin antibiótico, y mantenido en incubación a 37 °C con agitación hasta que su densidad óptica a 600nm sea entre 0.35 y 0.45 OD. El contenido fue transferido a un tubo nuevo, incubado en hielo durante 10 minutos y centrifugado a 4000 RPM y a 4 °C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y sobre el pellet recuperado fue adicionado inmediatamente 20 mL de 0.1 M de CaCl₂, la mezcla homogenizada será incubada en hielo por 15 minutos y nuevamente centrifugada a 3000 RPM y 4 °C durante 10 minutos. Sobre el pellet se añadió 1 mL de 0.1 M de CaCl₂-glicerol frío 15% homogenizando el contenido. Finalmente, las células competentes se alicuotaron en fracciones de 50 µL y se almacenaron a -70 °C [112, 113].

2. Transformación de las células competentes para la expresión

Tres tubos con células competentes BL21(DE3) pLysS, fueron descongeladas durante 10 minutos en hielo y recibieron 5 µL de plásmido (entre 40 a 100 ng de plásmido de *Wild Type* o recombinante). Para tener un control de calidad del proceso realizado, fue necesario contar con un control negativo y positivo de transformación. Al control negativo se le añadió 2 µL de agua MiliQ y al positivo 2 µL (50 ng/mL) de pET28a sin inserto [112].

Las células fueron incubadas en un baño maría a 42 °C durante 45 segundos y en hielo por 10 minutos (transformación por Shock térmico). Se añadió 1 mL de medio LB y se mantuvo en incubación durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. Por último, alícuotas de 20 µL

fueron sembradas en placas LB-agar con kanamicina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron incubadas toda la noche a 37 °C [112, 113].

3. Expresión en las células BL21(DE3) pLysS de E. coli

Una colonia de la placa incubada en la transformación de las células competentes para la expresión fue cultivada en 10 mL de caldo LB conteniendo kanamicina (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por cuadruplicado dejándola crecer a 37 °C en agitación durante una noche. Los 10 mL de cada cultivo fueron transferidos a 4 fracciones de 250 mL de caldo LB conteniendo kanamicina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), diluyendo así el cultivo a 1/25 y manteniéndolo en incubación a 37 °C con agitación hasta que la absorbancia sea 0.7 OD a 600 nm. Para inducir la expresión, ya que el plásmido pET28a contiene el gen *lac I*, se agregó 250 μL de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y el cultivo fue incubado en agitación durante 6 horas a 37 °C. Las células se centrifugaron a 13000 RPM y 4 °C por 15 minutos y el pellet fue resuspendido en 20 ml de Binding Buffer a pH 7.4 (fosfato sódico 20mM, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM) [110, 112].

Finalmente, las células resuspendidas fueron almacenadas a -70 °C. Para ver la diferencia en la expresión proteica antes y después de agregar el IPTG, alícuotas fueron tomadas de los caldos en ambos momentos y sometidas a una corrida electroforética [108, 112].

4. Purificación de la pirazinamidasa *Wild Type* y recombinante

4.1 Obtención del extracto crudo.

Las células congeladas a -70 °C fueron descongeladas en baño maría a 37 °C y congeladas a -70 °C nuevamente. Este ciclo se repitió tres veces. Se sonicó la suspensión en un baño de hielo usando el Sonicador S3000, con un nivel de poder de 3 por 3 ciclos (cada ciclo consistió en 1 segundo activo y 1 segundo inactivo durante un minuto con descansos de 3 minutos entre cada ciclo). El lisado celular fue centrifugado a 12500 RPM y 4 °C durante 20

minutos. El sobrenadante que contuvo la fracción soluble de interés fue recuperado. Se centrifugó a las mismas condiciones 3 veces más [110, 112].

4.2 Cromatografía de afinidad.

Se utilizó una columna “His-trap chelating” de capacidad de 5ml y el purificador de proteínas BIO-RAD Biologic LD con un autocolector de fracciones donde se colocaron tubos de vidrio de 6 ml, un detector “single path UV monitor UV-1” y una registradora donde se realizó el cromatograma. Los búferes utilizados fueron fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M y diferentes concentraciones de imidazol: 20mM (Binding buffer), 40mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM, 500mM, a pH 7.4 [110, 112].

Después de equilibrar la columna con 10 volúmenes de columna del Binding buffer; 10 volúmenes de buffer fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, pH 7.4 y nuevamente 10 volúmenes de Binding buffer, la fracción soluble (obtenida en el procedimiento de obtención del extracto crudo) fue cargada en dos partes para evitar sobrepasar la capacidad de la columna que es de 12 mg/mL de proteína. Una vez que la muestra fue cargada, la proteína fue lavada con los diferentes búferes fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M y las variables concentraciones de imidazol (40mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM, 500mM a pH 7.4). Los búferes fueron adicionados en orden creciente a la concentración de imidazol y cambiados cada vez que el pico del cromatograma bajó y la señal del espectrofotómetro fue constante [110, 112].

4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Después de haber escogido las fracciones adecuadas en base al cromatograma, éstas se analizaron por medio de una electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones denaturantes. Los geles fueron preparados con el equipo “MiniProtean II” de Bio-Rad de la siguiente manera [112]:

Tabla 47. Componentes para la preparación del “Resolving y Stacking”
gel para electroforesis

Componentes de la Solución (Resolving Gel)	Volumen (mL)	Componentes de la Solución (Stacking Gel)	Volumen (mL)
Agua destilada	4.6	Agua destilada	3.4
Acrilamida mix al 30%	10.0	Acrilamida mix al 30%	0.83
Tris 1.5 M pH 8.8	5.0	Tris 1.0 M pH 6.8	0.63
SDS al 10%	0.2	SDS al 10%	0.05
Persulfato de amonio al 10%	0.2	Persulfato de amonio al 10%	0.05
TEMED	0.008	TEMED	0.005
Volumen Total	20	Volumen Total	5

4.4 Concentración de la Pirazinamidasasa.

Las fracciones que reportaron la presencia de pirazinamidasasa en los geles fueron concentradas empleando una membrana de ultrafiltración de celulosa serie YM- Millipore NMWL 10 KDa en un sistema de ultrafiltración con agitador Amicon 8010 a 4 °C. Las muestras de las fracciones se agregaron cada vez que fue necesario hasta llegar a un volumen de 50 mL en el concentrador. Un balón de gas nitrógeno fue conectado al concentrador a presión constante, facilitando el paso de la disolución través del filtro. El flujo empleado fue de una gota cada 2 segundos. Una vez juntadas las fracciones y cuando el volumen final en el concentrador fue de 2 ml aproximadamente, la proteína fue lavada 5 veces con 50 mL de búfer fosfato sódico 50 mM, pH 6.4, con el objetivo de remover los restos del imidazol que pudieron permanecer. El contenido proteico fue recuperado del concentrador, alicuotado en fracciones de 500 µL en tubos de microcentrífuga-silicona de baja retención y almacenados a -20 °C. Para tener la seguridad que se concentró la proteína de interés fue necesario realizar una nueva corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 15% (tal como se describió previamente) de las fracciones alicuotadas provenientes de la concentración y determinar la concentración

de proteína según el método de Bradford. Finalmente, una prueba de actividad cualitativa fue realizada [110, 112].

4.5 Prueba de Bradford.

Este método colorimétrico que es comúnmente usado para determinar la concentración de proteína total de una muestra se basa en la unión proporcional del colorante Coomassie a las proteínas; conforme haya más concentración proteica, más oscura se tornará la muestra.

Un stock de BSA (albúmina de suero bovino) fue preparada a 10 mg/mL y diluida 1/10 para la preparación de los estándares de la curva de calibración. Se preparó una curva de 5 a 100 µg/mL de BSA y de acuerdo con el contenido proteico de las proteínas concentradas (pirazinamidas de las cepas trabajadas). En algunos casos fue necesario hacer una dilución de estas proteínas con el fin de estar dentro del rango de trabajo de la curva [112].

V.3 Resultados y discusiones

1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

1.1 Complejo Co-PZA (1)

1.1.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 7

A continuación, se muestra la *Tabla 48* con los resultados de la concentración mínima inhibitoria en mM de pirazinamida, el complejo, la sal y la mezcla física (sin reacción) de sal y pirazinamida en cultivos de *M. Tuberculosis* de cepas con pirazinamidas *Wild Type* susceptible o H37Rv, *Wild Type* resistente o DM97 y pirazinamidas multidrogo resistente con mutación en el sitio de coordinación D49N a pH 7:

Tabla 48. Concentración mínima inhibitoria a pH 7 del complejo Co-PZA (1)

	H37Rv	DM97	D49N
Pirazinamida (PZA)	> 6.5 mM	> 6.5 mM	> 6.5 mM
CoCl₂.6H₂O	0.41 mM	0.20 mM	0.03 mM
Complejo Co-PZA (1)	0.33 mM	0.33 mM	0.02 mM
PZA + CoCl₂.6H₂O	0.41 + 0.41 mM	0.20 + 0.20 mM	0.03 + 0.03 mM

A pH 7 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas H37Rv se observa que la actividad inhibitoria del complejo es mayor que la de pirazinamida pues inhibe el crecimiento a una concentración equivalente a 0.33 mM mientras que pirazinamida inhibe a más de 6.5 mM. Además, se observa que la sal precursora inhibe a mayor concentración, 0.41 mM, es decir, que el complejo tiene una ligera mayor acción inhibitoria. La mezcla física de la sal con pirazinamida presenta la misma actividad inhibitoria que la sal sola, por lo tanto, es mayor a la actividad de pirazinamida sola, lo que puede significar que la actividad en la mezcla se deba a la presencia de la sal.

Por otro lado, a pH 7 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas DM97 el comportamiento de pirazinamida es similar que en H37Rv, sin embargo, la actividad inhibitoria de la sal respecto del complejo es mayor siendo sus valores 0.20 y 0.33 mM respectivamente. También se observa un comportamiento similar en la mezcla de la sal y pirazinamida, pues vuelve a tener la misma actividad que la sal sola.

Finalmente, a pH 7 también se evaluó la actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas D49N. Pirazinamida presenta una actividad inhibitoria con concentración mayor a 6.5 mM, el complejo presenta su actividad a 0.02 mM siendo mayor que la actividad de la sal y la mezcla de la sal y pirazinamida que presentan un valor de 0.03 mM.

En conclusión, pirazinamida presenta el mismo comportamiento en *M. Tuberculosis* con todas las variantes de pirazinamidasa. El complejo presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida, lo cual indica que, hablando a nivel de bacteria, el complejo puede inhibir mejor el crecimiento del *M. Tuberculosis* H37Rv, DM97 y D49N que la misma pirazinamida. Además, el complejo presenta mayor actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasa D49N que con las cepas de *Wild Type* susceptible y resistente a pirazinamida.

1.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 6

En la *Tabla 49* se muestra los resultados de la concentración mínima inhibitoria en mM de pirazinamida, el complejo, la sal y la mezcla física (sin reacción) de sal y pirazinamida en cultivos de *M. Tuberculosis* de cepas con pirazinamidasa *Wild Type* susceptible o H37Rv, *Wild Type* resistente o DM97 y pirazinamidasa multidrogo resistente con mutación en el sitio de coordinación D49N a pH 6:

Tabla 49. Concentración mínima inhibitoria a pH 6 del complejo Co-PZA (1)

	H37Rv	DM97	D49N
Pirazinamida (PZA)	0.81 mM	> 6.5 mM	> 6.5 mM
CoCl₂.6H₂O	0.41 mM	0.41 mM	0.03 mM
Complejo Co-PZA (1)	0.04 mM	0.33 mM	0.02 mM
PZA + CoCl₂.6H₂O	0.05 + 0.05 mM	0.41 + 0.41 mM	0.03 + 0.03 mM

A pH 6 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasa H37Rv se observa que la actividad inhibitoria del complejo es mayor que la de pirazinamida pues inhibe el crecimiento a una concentración equivalente a 0.04 mM mientras que pirazinamida inhibe a más de 0.81 mM. Además, se observa que la sal precursora inhibe a mayor concentración, 0.41 mM, es decir, que el complejo tiene mayor acción inhibitoria. La mezcla de la sal con pirazinamida presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida y la sal solas.

Por otro lado, a pH 6 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas DM97 el comportamiento de pirazinamida cambia pues su concentración es mayor a 6.5 mM. El complejo presenta mayor acción inhibitoria que pirazinamida, la sal y la mezcla de sal y pirazinamida.

Finalmente, a pH 6 también se evaluó la actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas D49N. Pirazinamida presenta una actividad inhibitoria con concentración mayor a 6.5 mM, el complejo presenta su actividad a 0.02 mM siendo mayor que la actividad de la sal y la mezcla de la sal y pirazinamida que presentan un valor de 0.03 mM.

En conclusión, el complejo presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida sola en *M. tuberculosis* con pirazinamidasas de las tres variantes evaluadas.

1.2 Complejo Co-PZA (2)

1.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 7

La *Tabla 50* muestra los resultados de la concentración mínima inhibitoria en mM de pirazinamida, el complejo, la sal y la mezcla física (sin reacción) de sal y pirazinamida en cultivos de *M. Tuberculosis* de cepas con pirazinamidasas *Wild Type* susceptible o H37Rv, *Wild Type* resistente o DM97 y pirazinamidasas multidrogo resistente con mutación en el sitio de coordinación D49N a pH 7:

Tabla 50. Concentración mínima inhibitoria a pH 7 del complejo Co-PZA (2)

	H37Rv	DM97	D49N
Pirazinamida (PZA)	> 6.5 mM	> 6.5 mM	> 6.5 mM
Co(NO₃)₂.6H₂O	0.39 mM	0.20 mM	0.02 mM
Complejo Co-PZA (2)	0.28 mM	0.28 mM	0.02 mM
PZA + Co(NO₃)₂.6H₂O	0.41 + 0.39 mM	0.20 + 0.20 mM	0.03 + 0.02 mM

A pH 7 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas H37Rv se observa que la actividad inhibitoria del complejo es mayor que la de pirazinamida pues inhibe el crecimiento a una

concentración de 0.28 mM mientras que pirazinamida inhibe a más de 6.5 mM. Además, se observa que la sal precursora inhibe a mayor concentración, 0.39 mM, es decir, que el complejo tiene una ligera mayor acción inhibitoria. La mezcla de la sal con pirazinamida presenta similar actividad inhibitoria que la sal sola, por lo tanto, es mayor a la actividad de pirazinamida sola.

Por otro lado, a pH 7 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasa DM97 el comportamiento de pirazinamida y el complejo es similar que en H37Rv, sin embargo, la actividad inhibitoria de la sal respecto del complejo es mayor siendo sus valores 0.20 y 0.28 mM respectivamente. También se observa un comportamiento similar en la mezcla de la sal y pirazinamida, pues vuelve a tener la misma actividad que la sal sola.

Finalmente, a pH 7 también se evaluó la actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasa D49N. Pirazinamida presenta una actividad inhibitoria con concentración mayor a 6.5 mM, el complejo presenta actividad a 0.02 mM al igual que la sal.

En conclusión, pirazinamida presenta el mismo comportamiento en *M. Tuberculosis* con todas las variantes de pirazinamidasa. El complejo Co-PZA (2) presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida, lo cual indica que, hablando a nivel de bacteria, el complejo puede inhibir mejor el crecimiento del *M. Tuberculosis* H37Rv, DM97 y D49N que la misma pirazinamida. Además, el complejo presenta mayor actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasa D49N que con las cepas de *Wild Type* susceptible y resistente a pirazinamida.

1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a pH 6

En la *Tabla 51* se muestra los resultados de la concentración mínima inhibitoria en mM de pirazinamida, el complejo, la sal y la mezcla física (sin reacción) de sal y pirazinamida en cultivos de *M. Tuberculosis* de cepas con pirazinamidasa *Wild Type* susceptible o H37Rv, *Wild*

Type resistente o DM97 y pirazinamidasas multidrogo resistente con mutación en el sitio de coordinación D49N a pH 6:

Tabla 51. Concentración mínima inhibitoria a pH 6 del complejo Co-PZA (2)

	H37Rv	DM97	D49N
Pirazinamida (PZA)	0.81 mM	> 6.5 mM	> 6.5 mM
Co(NO₃)₂·6H₂O	0.39 mM	0.39 mM	0.02 mM
Complejo Co-PZA (2)	0.03 mM	0.28 mM	0.02 mM
PZA + Co(NO₃)₂·6H₂O	0.05 + 0.05 mM	0.41 + 0.39 mM	0.03 + 0.02 mM

A pH 6 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas H37Rv se observa que la actividad inhibitoria del complejo es mayor que la de pirazinamida pues inhibe el crecimiento a una concentración equivalente a 0.03 mM mientras que pirazinamida inhibe a más de 0.81 mM. Además, se observa que la sal precursora inhibe a mayor concentración, 0.39 mM, es decir, que el complejo tiene mayor acción inhibitoria. La mezcla de la sal con pirazinamida presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida y la sal solas.

Por otro lado, a pH 6 en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas DM97 el comportamiento de pirazinamida cambia pues su concentración es mayor a 6.5 mM. El complejo presenta mayor acción inhibitoria que pirazinamida, la sal y la mezcla de sal y pirazinamida.

Finalmente, a pH 6 también se evaluó la actividad inhibitoria en *M. Tuberculosis* con pirazinamidasas D49N. Pirazinamida presenta una actividad inhibitoria con concentración mayor a 6.5 mM, el complejo y la sal presentan la misma actividad inhibitoria, siendo su valor igual a 0.02 mM. El complejo, la sal y la mezcla de pirazinamida y sal presentan mayor actividad inhibitoria que pirazinamida sola.

En conclusión, el complejo presenta mayor actividad inhibitoria que pirazinamida sola en *M. tuberculosis* con pirazinamidasas de las tres variantes evaluadas.

A continuación, en las *Figuras 29 y 30* se muestra las placas de 96 pozos donde se realizó determinación de la MIC, para pirazinamida, las sales precursoras, los complejos Co-PZA (1) y Co-PZA (2) y las mezclas de las sales y pirazinamida siguiendo la distribución indicada en el cuadro de la *Figura 28*:

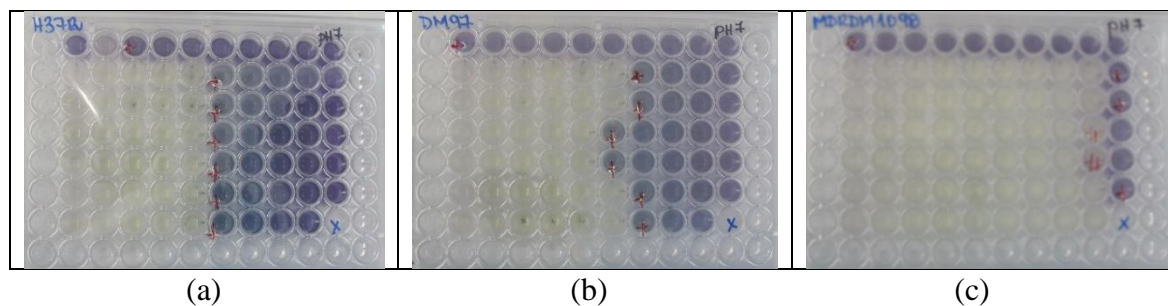


Figura 29. Fotografía de las placas de 96 pozos donde se determinó la MIC de pirazinamida, las sales precursoras, los complejos y las mezclas de las sales y pirazinamida a pH 7 de *M. tuberculosis* (a) Wild Type H37Rv (b) Wild Type resistente DM97 (c) MDR D49N

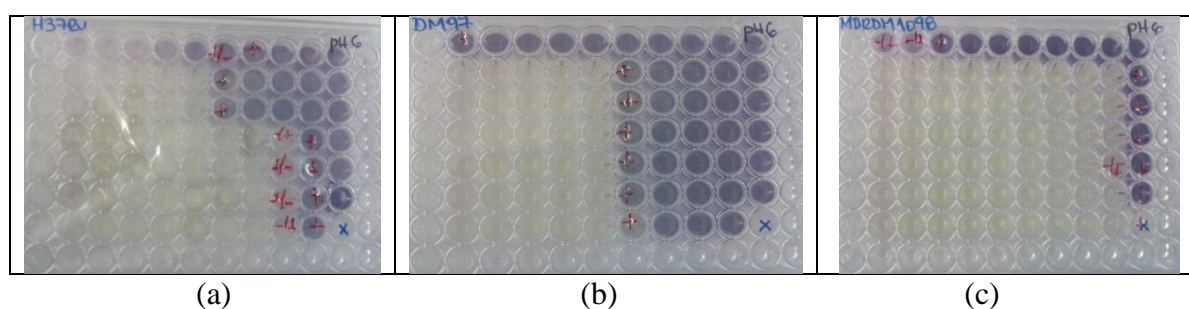


Figura 30. Fotografía de las placas de 96 pozos donde se determinó la MIC de pirazinamida, las sales precursoras, los complejos y las mezclas de las sales y pirazinamida a pH 6 de *M. tuberculosis* (a) Wild Type H37Rv (b) Wild Type resistente DM97 (c) MDR D49N

2. Ensayo de Wayne

2.1. Ensayo de Wayne cualitativo

Se realizó el ensayo de Wayne cualitativo en la cepa Wild Type de pirazinamidasa y en una cepa con mutación cerca del sitio de enlace al metal de pirazinamidasa denominado K48T.

El ensayo en pirazinamidasas Wild Type se realizó en concentraciones iguales a 20 mM de pirazinamida, complejo Co-PZA (1) y complejo Co-PZA (2). La preparación de muestras para el ensayo se muestra en la *Tabla 52*:

Tabla 52. Preparación de muestras para el ensayo de Wayne en pirazinamidasas de *M. tuberculosis* Wild Type (WT)

Reactivo	Concent. inicial	Concent. final	Blanco (μL)	Pirazinamida (μL)	Co-PZA (1) (μL)	Co-PZA (2) (μL)
PZAsa WT	533.35 mM	3 μM	0.56	0.56	0.56	0.56
Buffer Fosfato	100 mM	50 mM	50	50	50	50
PZA	121 mM	20 mM	-	16.5	-	-
Co-PZA (1)	60.5 mM	20 mM	-	-	33.1	-
Co-PZA (2)	101.93 mM	20 mM	-	-	-	19.6
H ₂ O MQ	-	-	44.4	27.9	11.3	24.8
TOTAL (uL)			100	100	100	100

En el ensayo cualitativo el tiempo de incubación antes de agregar la droga (pirazinamida o los complejos) es de 10 minutos, luego de agregar la droga correspondiente en cada tubo, se dejó transcurrir 3 minutos y se agregó 10 μL de sulfato ferroso al 20% y 445 μL de 0.4M de Glicina-HCl. El resultado obtenido se observa en la siguiente imagen:

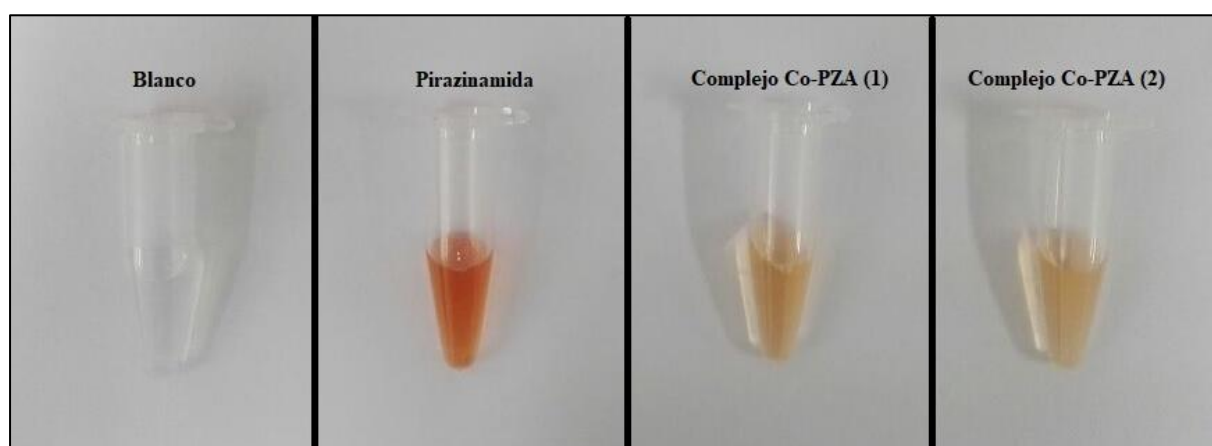


Figura 31. Ensayo de Wayne cualitativo en pirazinamidasas de *M. tuberculosis* Wild Type

La *Figura 31* muestra el resultado de la reacción del ensayo de Wayne cualitativo. Se observa que en el tubo correspondiente al blanco no hay desarrollo de color. Además, se observa que el tubo de pirazinamida presenta mayor intensidad en la coloración con respecto a los complejos, lo que revela que pirazinamida presenta mayor capacidad de hidrolizarse que los complejos cuando pirazinamidasa Wild Type está presente. Entre los complejos no se observa una clara diferencia.

El ensayo en pirazinamidasa K48T se realizó en concentraciones iguales a 20 mM de pirazinamida, complejo Co-PZA (1) y complejo Co-PZA (2). La preparación de muestras para el ensayo se muestra en la *Tabla 53*:

Tabla 53. Preparación de muestras para el ensayo de Wayne en pirazinamidasa de *M. tuberculosis* K48T

Reactivo	Concent. inicial	Concent. final	Blanco (μL)	Pirazinamida (μL)	Co-PZA (1) (μL)	Co-PZA (2) (μL)
PZAsa WT K48T	156.8 mM	3 μM	1.9	1.9	1.9	1.9
Buffer Fosfato	100 mM	50 mM	50	50	50	50
PZA	121 mM	20 mM	-	16.5	-	-
Co-PZA (1)	60.5 mM	20 mM	-	-	33.1	-
Co-PZA (2)	60.5 mM	20 mM	-	-	-	33.1
H₂O MQ	-	-	48.1	31.6	15	15
TOTAL (uL)			100	100	100	100

El resultado obtenido se observa en la siguiente imagen:

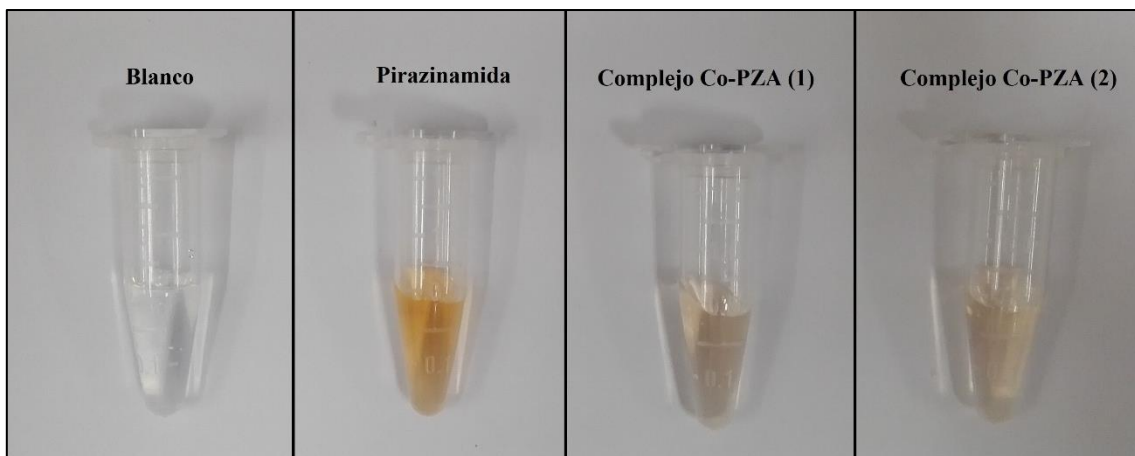


Figura 32. Ensayo de Wayne en pirazinamidasa de *M. tuberculosis* K48T cualitativo

La Figura 32 muestra el resultado de la reacción del ensayo de Wayne cualitativo. Se observa que en el tubo correspondiente al blanco no hay desarrollo de color. Además, se observa que el tubo de pirazinamida presenta mayor intensidad en la coloración con respecto a los complejos, lo que revela que pirazinamida presenta mayor capacidad de hidrolizarse que los complejos cuando pirazinamidasa K48T está presente. Entre los complejos no se observa una clara diferencia. Finalmente, se puede notar que en los dos ensayos realizados el desarrollo de color es menor cuando se trabajó con la pirazinamidasa mutante K48T, lo que confirma que al trabajar con una cepa que contiene pirazinamidasa Wild Type sin mutaciones hay mayor sensibilidad que al trabajar con una mutante.

2.2. Ensayo de Wayne cuantitativo

Se realizó el ensayo de Wayne cuantitativo en *Mycobacterium tuberculosis* Wild type susceptible y en cepas con las siguientes mutaciones en pirazinamidasa: K48T, G78C y V131G. Se trabajó con tres condiciones diferentes, variando la concentración de enzima, de droga y de tiempo. Finalmente se calculó la actividad enzimática en $\mu\text{mol}/\text{min}$ de reacción por miligramo de pirazinamidasa.

2.2.1 Ensayo de Wayne – Condiciones I

La concentración de pirazinamidasas fue de 3 μ M, la de pirazinamida 20 mM y el tiempo de reacción fue 3 minutos, los resultados de actividad enzimática se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 54. Actividad enzimática de pirazinamidasas (μ mol/min por mg de pirazinamidasas) – Condiciones I

Droga	Mutación			
	Wild Type	K48T	G78C	V131G
Blanco	0	0	0	0
Pirazinamida	119.9	32.3	41.9	43.2
Complejo Co-PZA (1)	39.4	10.6	12.4	16.8
Complejo Co-PZA (2)	35.8	9.8	12.0	15.6

La interpretación de los datos obtenidos en la *Tabla 54* se muestran en la *Figura 33*, los números 1, 2, 3 y 4 del eje axial corresponden a pirazinamidasas Wild type, K48T, G78C y V131G correspondientemente:

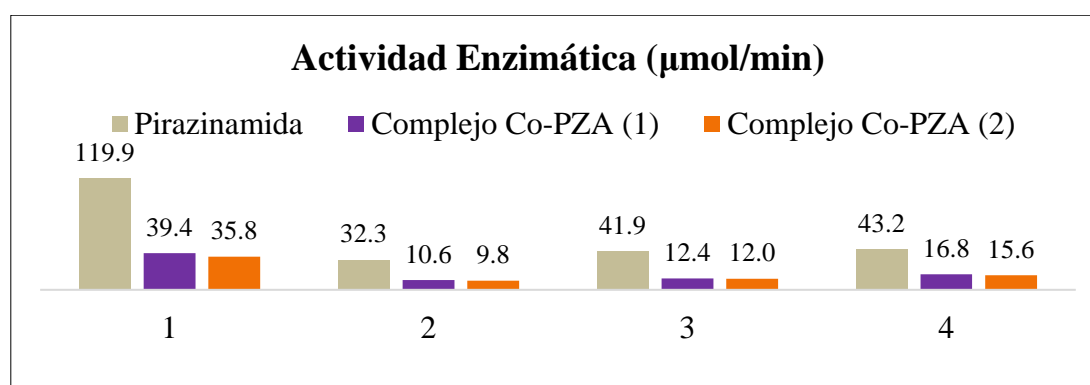


Figura 33. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasas frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones I

Se observa un mismo comportamiento de las drogas evaluadas en todas las variantes de pirazinamidasas. Es decir, la actividad enzimática de pirazinamidasas Wild type, K48T, G78C y

V131G frente a pirazinamida es mayor que frente a los complejos, esto indica que pirazinamidasa puede hidrolizar mejor a pirazinamida sola que cuando se encuentra enlazada a un centro metálico. También se observa que pirazinamidasa en todas sus variantes frente al complejo Co-PZA (1) tiene ligeramente mayor actividad enzimática que con el complejo Co-PZA (2). Finalmente, también se puede observar la susceptibilidad de cada variante de pirazinamidasa frente a las drogas, especialmente con pirazinamida, notando que las variantes con mutaciones presentan baja actividad enzimática comparada con Wild type.

2.2.2 Ensayo de Wayne – Condiciones II

La concentración de pirazinamidasa fue de 1 μ M, la de pirazinamida 4 mM y el tiempo de reacción fue 3 minutos, los resultados de actividad enzimática se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 55. Actividad enzimática de pirazinamidasa (μ mol/min por mg de pirazinamidasa) –
Condiciones II

Droga	Mutación	
	Wild Type	V131G
Blanco	0	0
Pirazinamida	55.7	36.3
Complejo Co-PZA (1)	82.8	19.7
Complejo Co-PZA (2)	63.3	19.4

La interpretación de los datos obtenidos en la *Tabla 55* se muestran en la *Figura 34*, los números 1 y 2 del eje axial corresponden a pirazinamidasa Wild type y V131G correspondientemente:

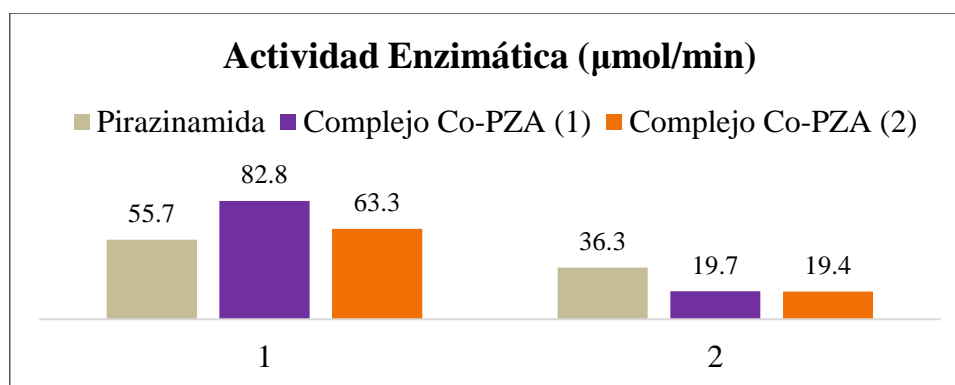


Figura 34. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasa frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones II

Se observa un comportamiento diferente con respecto a las condiciones evaluadas en el ítem anterior, puesto que la actividad enzimática de pirazinamidasa Wild type frente a pirazinamida es menor comparada con la actividad de los complejos. Sin embargo, pirazinamidasa V131G presenta mayor actividad frente a pirazinamida. En ambas variantes se observa que el complejo Co-PZA (1) presenta mayor capacidad de ser hidrolizado por la enzima que el complejo Co-PZA (2).

2.2.3 Ensayo de Wayne – Condiciones III

La concentración de pirazinamidasa fue de 0.5 µM, la de pirazinamida 4 mM y el tiempo de reacción fue 1 minuto, los resultados de actividad enzimática se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 56. Actividad enzimática de pirazinamidasa (µmol/min por mg de pirazinamidasa) – Condiciones III

Droga	Mutación	
	Wild Type	V131G
Blanco	0	0
Pirazinamida	33.7	12.7
Complejo Co-PZA (1)	29.0	11.6
Complejo Co-PZA (2)	27.9	11.1

La interpretación de los datos obtenidos en la *Tabla 56* se muestran en la *Figura 35*, los números 1 y 2 del eje axial corresponden a pirazinamidasas Wild type y V131G correspondientemente:

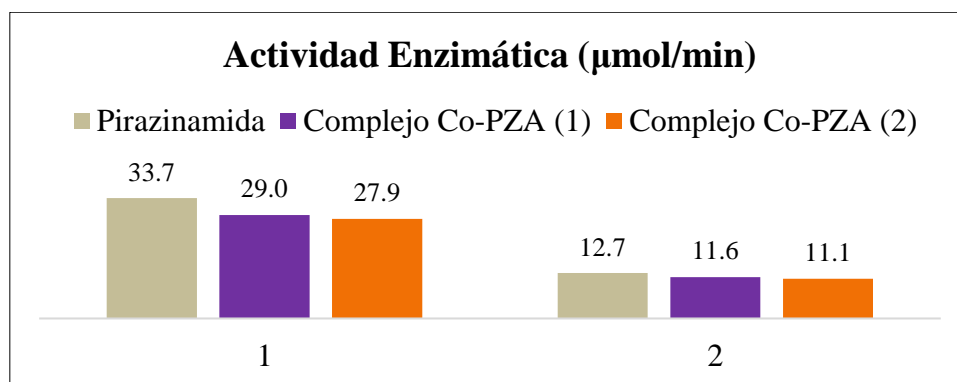


Figura 35. Diagrama de barras comparativo de actividad enzimática de pirazinamidasas frente a pirazinamida y los complejos – Condiciones III

Se observa un mismo comportamiento de las drogas evaluadas en las dos variantes de pirazinamidasas. Es decir, la actividad enzimática de pirazinamidasas Wild type y V131G frente a pirazinamida es mayor que frente a los complejos, esto indica que pirazinamidasas pueden hidrolizar mejor a pirazinamida sola que cuando se encuentra enlazada a un centro metálico. También se observa que pirazinamidasas en ambas variantes frente al complejo Co-PZA (1) tienen ligeramente mayor actividad enzimática que con el complejo Co-PZA (2). Finalmente, se vuelve a observar que la susceptibilidad de pirazinamidasas con mutación es menor que pirazinamidasas Wild type, frente a las tres drogas evaluadas, especialmente con pirazinamida.

Capítulo VI.

Resumen de resultados y Conclusiones

VI.1 Resumen de resultados

1. Se logró sintetizar dos complejos de cobalto (II) con pirazinamida: Co-PZA (1) y Co-PZA (2).

2. La caracterización a través de las técnicas espectroscópicas y fisicoquímicas permitió postular la fórmula y estructura química molecular de cada complejo, siendo: $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (Figura 19) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Figura 27) respectivamente.

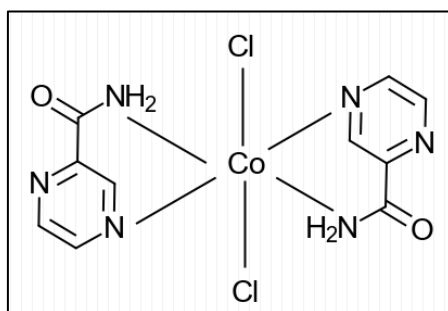


Figura 19. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (1)

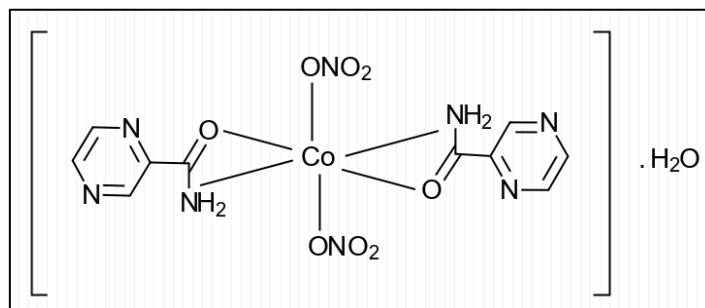


Figura 27. Estructura molecular propuesta para el complejo Co-PZA (2)

3. En la determinación de la concentración mínima inhibitoria se comprobó que la capacidad antimicrobiana de los complejos fue mayor a la de pirazinamida. En el ensayo de Wayne se comprobó que pirazinamidasa tiene mayor actividad enzimática sobre pirazinamida en comparación con los complejos.

4. En el 2017, este trabajo fue presentado como un póster con el nombre de ***“Synthesis, characterization and determination of the antituberculous activity of cobalt (II) coordination***

compounds with pyrazinamide” en el 6to Simposio Latinoamericano de Química de coordinación (SILQCOM6) y organometálica. Se logró obtener un premio al mejor póster por nuestra presentación.



5. En el 2020, este trabajo fue publicado como un artículo científico con el nombre de *“Síntesis, Caracterización y Evaluación de la Actividad Biológica de Compuestos de Coordinación de Cobalto con Pirazinamida”* en la Revista de la Sociedad Química Peruana.

Recibido el 27-10-20

Aprobado el 28-10-20

315

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBALTO CON PIRAZINAMIDA

Natalia Karolina Chávez Llalire^a, Rocio Isabel Ramírez Pantir, Patricia Sheen Cortovarria^b, Mirko Juan Zimic Peralta^b, Ana Cecilia Valderrama Negrón^{a*}

RESUMEN

En este estudio se han sintetizado dos nuevos compuestos de coordinación de cobalto con pirazinamida: Co-PZA (1) y Co-PZA (2), a partir de dos sales precursoras de cobalto y el fármaco pirazinamida. El objetivo de este estudio ha sido elucidar la estructura química de cada complejo sintetizado mediante el uso de las técnicas de caracterización conocidas, así como evaluar y comparar su actividad biológica respecto al fármaco libre pirazinamida. Con respecto a la caracterización, se usaron las técnicas de análisis elemental de C, H y N, espectroscopía de absorción atómica de cobalto, análisis termogravimétrico, susceptibilidad magnética, espectroscopía de UV-Visible, infrarrojo y Raman. La actividad biológica fue evaluada determinando la concentración mínima inhibitoria en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. La fórmulas moleculares propuestas a partir de los resultados de la caracterización fueron: $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ para el complejo Co-PZA (1) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ para el complejo Co-PZA (2). Los dos complejos presentaron mayor capacidad antimicrobiana que pirazinamida.

Palabras clave: cobalto, pirazinamida, tuberculosis.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF COBALT WITH PYRAZINAMIDE COORDINATION COMPOUNDS

ABSTRACT

In this study, two new cobalt with pyrazinamide (PZA) coordination compounds: Co-PZA (1) and Co-PZA (2) were synthesized from two cobalt precursor salts. The aim of this study is to elucidate the chemical structure of each synthesized complex by using characterization

^a Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metafármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rimac, Lima, Perú, mitacevn29@yahoo.com.mx.

^b Unidad de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú.

VI.2 Conclusiones

✓ Se sintetizaron dos complejos de cobalto (II) y pirazinamida: Co-PZA (1) y Co-PZA (2); y la caracterización a través de las técnicas espectroscópicas y fisicoquímicas permitió postular la fórmula y estructura química molecular de cada complejo, siendo: $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (*Figura 19*) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (*Figura 27*) respectivamente.

✓ Se determinó la concentración mínima inhibitoria donde se comprobó que la capacidad antimicrobiana de los complejos fue mayor a la de pirazinamida. Además, al realizar el ensayo de Wayne se obtuvo que pirazinamidasas desarrolló mejor su actividad enzimática sobre pirazinamida en comparación con los complejos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] World Health Organization. (2020). Global Tuberculosis Report 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- [2] Ministerio de Salud del Perú. (2016, febrero). Análisis de la Situación Epidemiológica de la Tuberculosis en el Peru, 2015. https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=599&Itemid=204
- [3] Sheen, P., Fuentes, P., Pesaresi, A., Gilman, R. H., Gutiérrez, A. H., Olivera, P., Evangelista, W., Moreno-Román, P., Zimic, M., Ferrer, P., Sotelo, J., Flores, M., Solis, J., Lamba, D., Christiansen, G., & Rueda, D. (2012). Role of Metal Ions on the Activity of Mycobacterium tuberculosis Pyrazinamidase. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 153-161. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.10-0565>
- [4] Loehrer, P. J. (1984). Cisplatin. *Annals of Internal Medicine*, 100(5), 704. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-5-704>
- [5] Champion, G. D., Graham, G. G., & Ziegler, J. B. (1990). The gold complexes. *Baillière's Clinical Rheumatology*, 4(3), 491-534. [https://doi.org/10.1016/s0950-3579\(05\)80005-6](https://doi.org/10.1016/s0950-3579(05)80005-6)
- [6] Weder, J. E., Dillon, C. T., Hambley, T. W., Kennedy, B. J., Lay, P. A., Biffin, J. R., Regtop, H. L., & Davies, N. M. (2002). Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coordination Chemistry Reviews*, 232(1-2), 95-126. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00086-3](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00086-3)
- [7] Leitão, J., Sousa, S., Leite, S., & Carvalho, M. (2018). Silver Camphor Imine Complexes: Novel Antibacterial Compounds from Old Medicines. *Antibiotics*, 7(3), 65. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030065>
- [8] Tiwari, C.R.. (2012). Antibacterial study of mixed ligand chelate and its application to tuberculosis. *Der Pharma Chemica*. 4. 39-42.
- [9] Pyrazinamide. (2008). *Tuberculosis*, 88(2), 141-144. [https://doi.org/10.1016/s1472-9792\(08\)70021-0](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(08)70021-0)
- [10] <http://www.who.int/>
- [11] Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. (2018). Tuberculosis en las Américas 2018. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49510?locale-attribute=es>
- [12] Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. (2020). Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2019. <https://www.paho.org/es/documentos/tuberculosis-americas-informe-regional-2019>
- [13] Tarallo, M. B., Urquiola, C., Monge, A., Costa, B. P., Ribeiro, R. R., Costa-Filho, A. J., Mercader, R. C., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., Torre, M. H., & Gambino, D. (2010). Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(11), 1164-1170. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.07.005>
- [14] Chiniforoshan, H., Radani, Z. S., Tabrizi, L., Tavakol, H., Sabzalian, M. R., Mohammadnezhad, G., Görls, H., & Plass, W. (2015). Pyrazinamide drug interacting with Co(III) and Zn(II) metal ions based on 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline ligands:

Synthesis, studies and crystal structure, DFT calculations and antibacterial assays. *Journal of Molecular Structure*, 1081, 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.10.027>

[15] P. (2005, 25 marzo). Pyrazinamide. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyrazinamide>

[16] Boshoff, H. I., Mizrahi, V., & Barry, C. E. (2002). Effects of Pyrazinamide on Fatty Acid Synthesis by Whole Mycobacterial Cells and Purified Fatty Acid Synthase I. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2167-2172. <https://doi.org/10.1128/jb.184.8.2167-2172.2002>

[17] Zhang, Y. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 790-795. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg446>

[18] Zhang, Y., & Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 7(1), 6–21.

[19] Davies, A. P., Billington, O. J., McHugh, T. D., Mitchison, D. A., & Gillespie, S. H. (2000). Comparison of Phenotypic and Genotypic Methods for Pyrazinamide Susceptibility Testing with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3686-3688. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3686-3688.2000>

[20] Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., Wang, H., Zhang, W., & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 333(6049), 1630-1632. <https://doi.org/10.1126/science.1208813>

[21] Sheen, P., Lozano, K., Gilman, R. H., Valencia, H. J., Loli, S., Fuentes, P., Grandjean, L., & Zimic, M. (2013). pncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 93(5), 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.005>

[22] Scorpio, A. (1997, 1 marzo). Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. PubMed Central (PMC). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163747/>

[23] Wade, M. M., & Zhang, Y. (2004). Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*, 53(8), 769-773. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45639-0>

[24] Salfinger, M., & Heifets, L. B. (1988). Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(7), 1002-1004. <https://doi.org/10.1128/aac.32.7.1002>

[25] Hu, Y., Coates, A. R., & Mitchison, D. A. (2006). Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 10(3), 317–322.

[26] Wade, M. M., & Zhang, Y. (2006). Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(5), 936-941. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl358>

[27] Teyssier L. (2001). Higher activity of morphazinamide over pyrazinamide against intracellular. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 5(4), 386.

[28] Wallis, R. S., Palaci, M., Vinhas, S., Hise, A. G., Ribeiro, F. C., Landen, K., Cheon, S., Song, H., Phillips, M., Dietze, R., & Ellner, J. J. (2001). A Whole Blood Bactericidal Assay for Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(8), 1300-1303. <https://doi.org/10.1086/319679>

[29] Grosset, J., Truffot-Pernot, C., Lacroix, C., & Ji, B. (1992). Antagonism between isoniazid and the combination pyrazinamide-rifampin against tuberculosis infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(3), 548-551. <https://doi.org/10.1128/aac.36.3.548>

[30] Konno, K., Feldmann, F. M., & McDermott, W. (1967). Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *The American review of respiratory disease*, 95(3), 461–469. <https://doi.org/10.1164/arrd.1967.95.3.461>

[31] Zhang, H., Deng, J.-Y., Bi, L.-J., Zhou, Y.-F., Zhang, Z.-P., Zhang, C.-G., Zhang, Y., & Zhang, X.-E. (2008). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *FEBS Journal*, 275(4), 753-762. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06241.x>

[32] Scorpio, A., & Zhang, Y. (1996). Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, 2(6), 662-667. <https://doi.org/10.1038/nm0696-662>

[33] Cheng, S.-J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L., & Zhang, Y. (2000). *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 528-532. <https://doi.org/10.1128/aac.44.3.528-532.2000>

[34] Mestdagh, M., Fonteyne, P. A., Realini, L., Rossau, R., Jannes, G., Mijs, W., De Smet, K. A., Portaels, F., & Van den Eeckhout, E. (1999). Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(9), 2317–2319. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10471589/>

[35] Hou, L., Osei-Hyiaman, D., Zhang, Z., Wang, B., Yang, A., & Kano, K. (2000). Molecular characterization of *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Epidemiology and Infection*, 124(2), 227-232. <https://doi.org/10.1017/s0950268899003635>

[36] Hannan, M. M., Desmond, E. P., Morlock, G. P., Mazurek, G. H., & Crawford, J. T. (2001). Pyrazinamide-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 647-650. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.2.647-650.2001>

[37] Park, S. K., Lee, J. Y., Chang, C. L., Lee, M. K., Son, H. C., Kim, C. M., Jang, H. J., Park, H. K., & Jeong, S. H. (2001). *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infectious Diseases*, 1(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-1-4>

[38] Lee, K. W., Lee, J. M., & Jung, K. S. (2001). Characterization of *pncA* Mutations of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 16(5), 537. <https://doi.org/10.3346/jkms.2001.16.5.537>

[39] Rodrigues, V. de F. S., Telles, M. A., Ribeiro, M. O., Cafrune, P. I., Rossetti, M. L. R., & Zaha, A. (2005). Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 444-446. <https://doi.org/10.1128/aac.49.1.444-446.2005>

[40] Portugal, I., Barreiro, L., Moniz-Pereira, J., & Brum, L. (2004). *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2736-2738. <https://doi.org/10.1128/aac.48.7.2736-2738.2004>

[41] Barco, P., Cardoso, R. F., Hirata, R. D. C., Leite, C. Q. F., Pandolfi, J. R., Sato, D. N., Shikama, M. L., de Melo, F. F., Mamizuka, E. M., Campanerut, P. A. Z., & Hirata, M. H. (2006). *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(5), 930-935. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl363>

[42] Ghislain, M., Talla, E., & François, J. M. (2001). Identification and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamidase gene, *PNC1*. *Yeast*, 19(3), 215-224. <https://doi.org/10.1002/yea.810>

[43] Pardee, A. B., Benz, E. J., Jr, St Peter, D. A., Krieger, J. N., Meuth, M., & Triesmann, H. W., Jr (1971). Hyperproduction and purification of nicotinamide deamidase, a microconstitutive enzyme of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 246(22), 6792-6796. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4399474/>

[44] Tanigawa, Y., Shimoyama, M., Dohi, K., & Ueda, I. (1972). Purification and properties of nicotinamide deamidase from *Flavobacterium peregrinum*. *The Journal of biological chemistry*, 247(24), 8036-8042. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4264486/>

[45] Joshi, J. G., & Handler, P. (1962). Purification and properties of nicotinamidase from *Torula cremoris*. *The Journal of biological chemistry*, 237, 929-935. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14452547/>

[46] Boshoff, H. I., & Mizrahi, V. (1998). Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 180(22), 5809-5814. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9811635/>

[47] Lemaitre, N., Callebaut, I., Frenois, F., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (2001). Study of the structure-activity relationships for the pyrazinamidase (*PncA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 353(3), 453. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530453>

[48] Du, X., Wang, W., Kim, R., Yakota, H., Nguyen, H., & Kim, S.-H. (2001). Crystal Structure and Mechanism of Catalysis of a Pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*†. *Biochemistry*, 40(47), 14166-14172. <https://doi.org/10.1021/bi0115479>

[49] Petrella, S., Gelus-Ziental, N., Maudry, A., Laurans, C., Boudjelloul, R., & Sougakoff, W. (2011). Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLoS ONE*, 6(1), e15785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015785>

[50] Nicholls, D. (1975). *The Chemistry of Iron, Cobalt and Nickel*. Google Books. <https://books.google.com.pe/books?id=pD79BAAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

[51] Young, R. S. (1948). *Cobalt*, A. C. S. Monograph (N.o 108). Reinhold, New York.

[52] Bate, L. C., & Leddicotte, G. W. (1961). *The Radiochemistry of Cobalt*. Subcommittee on Radiochemistry, National Academy of Sciences--National Research Council; available from the Office of Technical Services, Department of Commerce.

[53] Cobalt, C. D., Centre d'Information du Cobalt (Bruxelles), & Battelle Memorial Institute. (1960). *Cobalt Monograph*. C.I.C.

[54] Hampel, C. A. (1968). *The Encyclopedia of the Chemical Elements*. Reinhold Book Corporation.

[55] Weissbecker, C. (1950). *Kobalt als Spurenelement und Pharmakon*. Wissenschaftliche Verlagsges.

[56] Blake, A. B., & Cotton, F. A. (1964b). Relative Enthalpies of Formation of Some Tetrachlorometallate Ions. *Inorganic Chemistry*, 3(1), 5-10. <https://doi.org/10.1021/ic50011a002>

[57] Swift, T. J. (1964). The Kinetics of Structural Transformation of Hydrated Cobalt(II) and Zinc(II) Ions in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry*, 3(4), 526-529. <https://doi.org/10.1021/ic50014a016>

[58] Gutmann, V. (1967). Coordination chemistry of certain transition-metal ions. The role of the solvent. *Coordination Chemistry Reviews*, 2(2), 239-256. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(00\)80206-4](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(00)80206-4)

[59] Lever, A. B. P., Lewis, J., & Nyholm, R. S. (1963). Notes: Square-planar Bisethylenediamine-Metal Complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2552-2555. <https://doi.org/10.1039/jr9630002541>

[60] Huheey, J. E., Keiter, E. A., & Keiter, R. L. (1997). *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity* (4th Edition) (4.a ed.). Prentice Hall.

[61] Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements* (2.a ed.). Butterworth-Heinemann.

[62] Allan, J. R., Paton, A. D., Turvey, K., Bowley, H. J., & Gerrard, D. L. (1988). Structural and electrical studies of some first row complexes of pyrazinamide. *Journal of Coordination Chemistry*, 17(3), 255-266. <https://doi.org/10.1080/00958978808070776>

[63] Pannu, A. P. S., Lee, S., & Lee, Y. (2012). Diaquabis(pyrazine-2-carboxamide- κ 2N1,O)cobalt(II) dinitrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 68(4), m512-m513. <https://doi.org/10.1107/s1600536812012573>

[64] Tyagi, Dr. D. K., & kumar, S. (2014). Mixed Ligand Copper (II) Complex with Isoniazid and Pyrazinamide. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7(4), 13-16. <https://doi.org/10.9790/5736-07421316>

[65] Tünde, Jurca & Marian, Eleonora. (2009). Scanning electronic microscopy study of new pyrazinamide compounds with metallic ions. *Farmacia*. 57.

[66] Huang, H.-Q., Wang, D.-F., Zhang, T., & Huang, R.-B. (2015). Effects of different carboxylates on Ag(I) coordination compounds with pyrazinamide and pyrazinecarbonitrile with in situ reaction ligands. *Journal of Molecular Structure*, 1086, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.12.083>

[67] Arancibia, R., Quintana, C., Biot, C., Medina, M. E., Carrère-Kremer, S., Kremer, L., & Klahn, A. H. (2015). Palladium (II) and platinum (II) complexes containing organometallic thiosemicarbazone ligands: Synthesis, characterization, X-ray structures and antitubercular evaluation. *Inorganic Chemistry Communications*, 55, 139-142. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2015.03.036>

[68] Netalkar, P. P., Netalkar, S. P., Budagumpi, S., & Revankar, V. K. (2014). Synthesis, crystal structures and characterization of late first row transition metal complexes derived from benzothiazole core: Anti-tuberculosis activity and special emphasis on DNA binding and cleavage property. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.083>

[69] Aguiar, I. de, Tavares, A., Roveda, A. C., da Silva, A. C. H., Marino, L. B., Lopes, É. O., Pavan, F. R., Lopes, L. G. F., & Franco, D. W. (2015). Antitubercular activity of Ru (II) isoniazid complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.008>

[70] Correia, I., Adão, P., Roy, S., Wahba, M., Matos, C., Maurya, M. R., Marques, F., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., Avecilla, F., & Costa Pessoa, J. (2014). Hydroxyquinoline derived vanadium(IV and V) and copper(II) complexes as potential anti-tuberculosis and anti-tumor agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 141, 83-93. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.019>

[71] Oliveira, C. G., Maia, P. I. da S., Souza, P. C., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F., Viana, R. B., Batista, A. A., Nascimento, O. R., & Deflon, V. M. (2014). Manganese(II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 132, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.011>

[72] (Ed.), G. C. S., & (Ed.), F. M. I. S. (2012). Técnicas de análisis y caracterización de materiales (2a edición revisada y aumentada) (Biblioteca de Ciencias) (Spanish Edition) (2.a ed.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

[73] Gabbott, P. (2007). *Principles and Applications of Thermal Analysis* (1.a ed.). Wiley-Blackwell.

[74] Geary, W. J. (1971). The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 7(1), 81-122. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(00)80009-0)

[75] Analytical Applications Department. *Atomic Absorption Cook Book* (N.o 3). SHIMADZU Cooperation.

[76] Jeffery, G. H., Bassett, J., Mendham, J., & Denney, R. C. (1989). *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis* (5th ed.). John Wiley & Sons Inc.

[77] Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., Greenberg, A. E., & Franson, A. M. H. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, Centennial Edition (21.a ed.). Amer Public Health Assn (APHA) / American Water Works Association (AWWA).

[78] Lever, A. B. P. (1986). *Inorganic Electronic Spectroscopy* (2da ed.). Elsevier.

[79] Momin, M. A. M., Thien, S. J., Krittaphol, W., & Das, S. C. (2017). Simultaneous HPLC assay for pretomanid (PA-824), moxifloxacin and pyrazinamide in an inhaler formulation for drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 135, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.046>

[80] Ali, A. E., Elasala, G. S., Mohamed, E. A., & Kolkaila, S. A. (2019). Spectral, thermal studies and biological activity of pyrazinamide complexes. *Heliyon*, 5(11), e02912. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02912>

[81] Roteiro de Prática de Laboratório da Disciplina: Química de Coordenação. (1998) Propriedades Magnéticas de Compostos de Coordenação

[82] Valderrama, N. A. C. (2005). Síntese, caracterização e investigação da potencialidade biológica de carboxilatos dinucleares de Ru, Rh e Cu com nitroimidazóis (Disertación de doctorado)

[83] Bain, G. A., & Berry, J. F. (2008). Diamagnetic Corrections and Pascal's Constants. *Journal of Chemical Education*, 85(4), 532. <https://doi.org/10.1021/ed085p532>

[84] de Berg, K. C., & Chapman, K. J. (2001). Determination of the Magnetic Moments of Transition Metal Complexes Using Rare Earth Magnets. *Journal of Chemical Education*, 78(5), 670. <https://doi.org/10.1021/ed078p670>

[85] Reimann, C. W. (1966). Electron Absorption Spectrum of Cobalt (II) - Dopes Trisphenanthrolinezinc Nitrate Dihydrate. *Journal of research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry*, 70A, 417.

[86] Reedijk, J., Driessen, W. L., & Groeneveld, W. L. (2010). A semi-empirical energy-level diagram for octahedral cobalt(II) complexes. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 88(9), 1095-1109. <https://doi.org/10.1002/recl.19690880912>

[87] Rohatgi-Mukherjee, K. K. (1978). *Fundamentals of photochemistry* (1st ed.). Wiley.

[88] Akyuz, S., Andreeva, L., Minceva-Sukarova, B., & Basar, G. (2007). Vibrational spectroscopic study of two dimensional polymer compounds of pyrazinamide. *Journal of Molecular Structure*, 834-836, 399-402. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.11.057>

[89] Akyuz, S. (2003). The FT-IR spectra of pyrazinamide complexes of transition metal(II) tetracyanonickelate. *Journal of Molecular Structure*, 651-653, 541-545. [https://doi.org/10.1016/s0022-2860\(02\)00675-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2860(02)00675-0)

[90] Shirvan, S. A., & Haydari Dezfuli, S. (2012). catena-Poly[[[aqua(pyrazine-2-carboxamide- κ 2N1,O)zinc]- μ -pyrazine-2-carboxamide- κ 3N1,O:N4] dinitrate]. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 68(5), m627-m628. <https://doi.org/10.1107/s1600536812016017>

[91] Shirvan, S. A., & Haydari Dezfuli, S. (2012b). Dichloridobis(pyrazine-2-carboxamide- κ N4)zinc(II). *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 68(5), m546. <https://doi.org/10.1107/s1600536812013888>

[92] Goher, M. A. S., & Mautner, F. A. (2000). Spectral and structural characterization of copper(I) halide, nitrate and perchlorate complexes of pyrazine carboxamide (pyza) and X-ray crystal structure of polymeric [Cu(pyza)2I]_n complex. *Polyhedron*, 19(6), 601-606. [https://doi.org/10.1016/s0277-5387\(99\)00374-5](https://doi.org/10.1016/s0277-5387(99)00374-5)

[93] Miotti, R. D., de Souza Maia, A., Paulino, Í. S., Schuchardt, U., & de Oliveira, W. (2002). Synthesis and ethylene polymerization catalysis of mono(cyclopentadienyl)lanthanide compounds with the pyrazinamide ligand. *Journal of Alloys and Compounds*, 344(1-2), 92-95. [https://doi.org/10.1016/s0925-8388\(02\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0925-8388(02)00315-8)

[94] Chiş, V., Pîrnaşu, A., Jurcaş, T., Vasilescu, M., Simon, S., Cozar, O., & David, L. (2005). Experimental and DFT study of pyrazinamide. *Chemical Physics*, 316(1-3), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.05.004>

[95] Facultad de Química. (2012). *Manual de Experimentos (Química Orgánica II 1407)*. Universidad Nacional Autónoma de México.

[96] Pretsch, E., Bühlmann, P., & Affolter, C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data* (3rd completely rev. and enlarged ed. 2000. Corr. 2nd printing ed.). Springer.

[97] Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. Wiley.

[98] Alves, O. L., & Hase, Y. (1982). The Infrared Spectra of Cobalt(II) Halide Complexes with Trimethylphosphine Oxide (TMPO). *Spectroscopy Letters*, 15(6), 423-433. <https://doi.org/10.1080/00387018208062667>

[99] Therald Moeller - Editor. (2020). *Inorganic Syntheses. Volume V* (First ed.). McGraw-Hill Inc.

[100] Watt, G. W., & Klett, D. S. (1964). The Infrared Spectra of Ammines of Cobalt(III) Chloride. *Inorganic Chemistry*, 3(5), 782-783. <https://doi.org/10.1021/ic50015a046>

[101] Rüede, J. E., & Thorton, D. A. (1976). The far infrared spectra of metal chloride complexes of pyridine in relation to their structures. *Journal of Molecular Structure*, 34(1), 75-81. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(76\)80081-6](https://doi.org/10.1016/0022-2860(76)80081-6)

[102] Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* (1.a ed.). Wiley.

[103] Creswell, C. J., Runquist, O. A., & Campbell, M. M. (1972). *Spectral Analysis of Organic Compounds*. Longman.

[104] Curtis, N. F., & Curtis, Y. M. (1965). Some Nitrate-Amine Nickel(II) Compounds with Monodentate and Bidentate Nitrate Ions. *Inorganic Chemistry*, 4(6), 804-809. <https://doi.org/10.1021/ic50028a007>

[105] Addison, C. C., & Gatehouse, B. M. (1960). 125. The infrared spectra of anhydrous transition-metal nitrates. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 613. <https://doi.org/10.1039/jr9600000613>

[106] Sharma, P., Nandi, R., Gangopadhyay, D., Singh, A., & Singh, R. K. (2018). Temperature dependent polymorphism of pyrazinamide: An in situ Raman and DFT study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 190, 177-180. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.016>

[107] Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785-796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

[108] Caviedes, L., Delgado, J., & Gilman, R. H. (2002). Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1873-1874. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1873-1874.2002>

[109] Barrera Tomas, M., Tomas Chota, G. E., Sheen Cortavarría, P., Fuentes Bonilla, P., Inocente Camones, M. A., & Santiago Contreras, J. C. (2017). Synthesis of acyl-hydrazone from usnic acid and isoniazid and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Revista*

Colombiana de Química, 46(3), 17-21.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n3.61980>

[110] Sheen, P., Ferrer, P., Gilman, R. H., López-Llano, J., Fuentes, P., Valencia, E., & Zimic, M. J. (2009). Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 89(2), 109-113. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.01.004>

[111] Méndez, M. M. (2008). Aplicación de la prueba polimorfismo conformacional de la hebra simple de ADN (SSCP) en la determinación de la susceptibilidad a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* (Disertación de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

[112] Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática. Manual de protocolos de proteínas. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

[113] Ausubel, Edited by: Frederick M., Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology* (2.a ed.). Current Protocols.

ANEXO

A. Cromatogramas de los estándares de calibración del análisis de HPLC

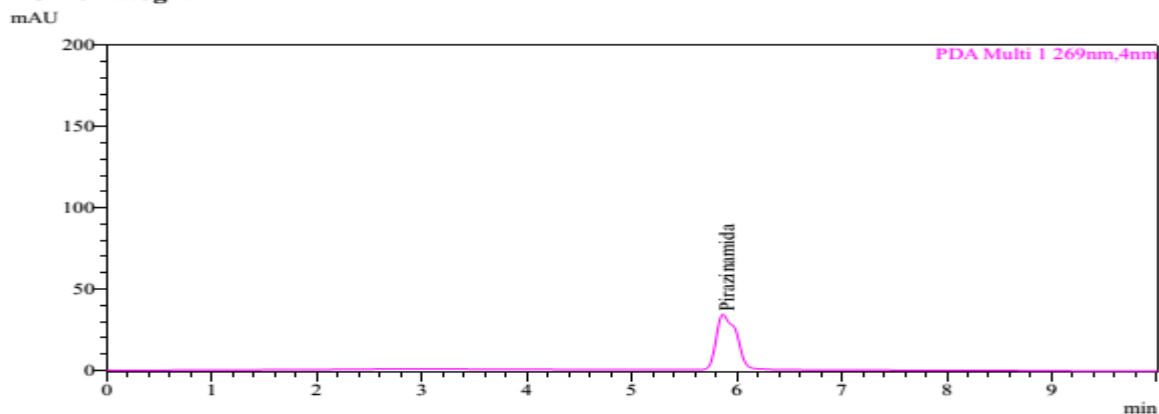
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : STD 10 ppm INY1
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 1

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.865	457299	10.062	mg/L	Pirazinamida
Total		457299			

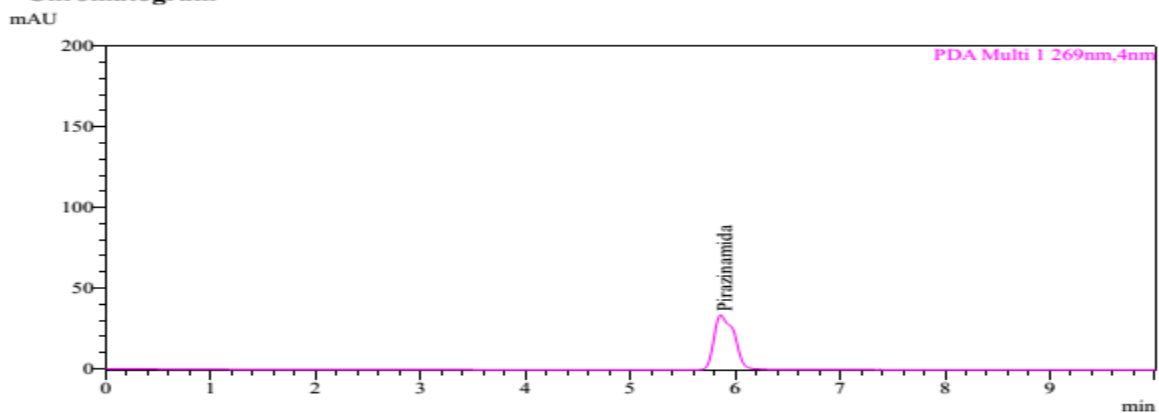

Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : STD 10 ppm INY 2
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 1

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.859	455260	10.018	mg/L	Pirazinamida
Total		455260			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

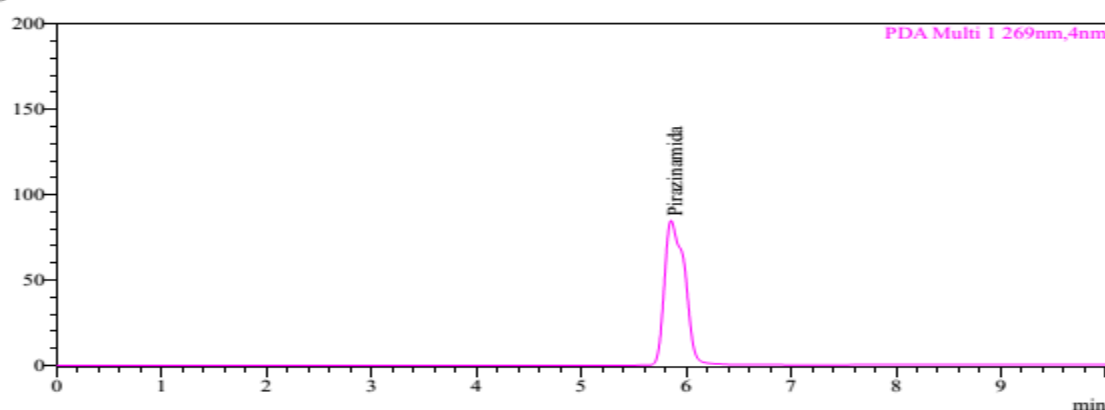
<Sample Information>

Sample Name : STD 25 ppm INY1
 Vial # : 1-2
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 2

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.853	1133906	24.934	mg/L	Pirazinamida
Total		1133906			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

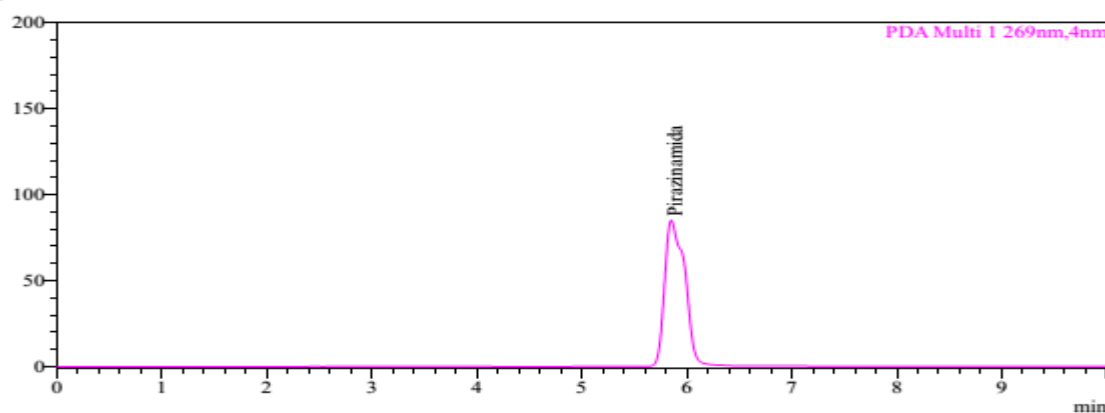
<Sample Information>

Sample Name : STD 25 ppm INY2
 Vial # : 1-2
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 2

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.849	1134058	24.938	mg/L	Pirazinamida
Total		1134058			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

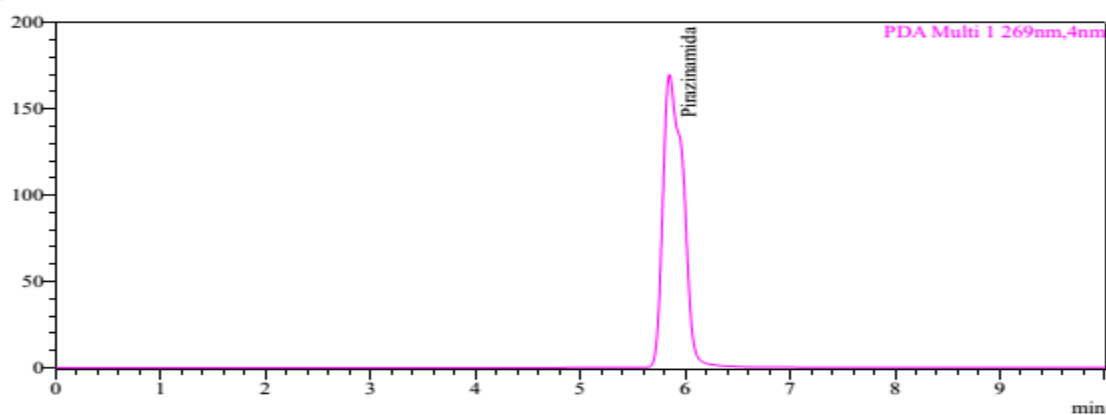
<Sample Information>

Sample Name : STD 50 ppm INY1
 Vial # : 1-3
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 3

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.847	2276037	50.038	mg/L	Pirazinamida
Total		2276037			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

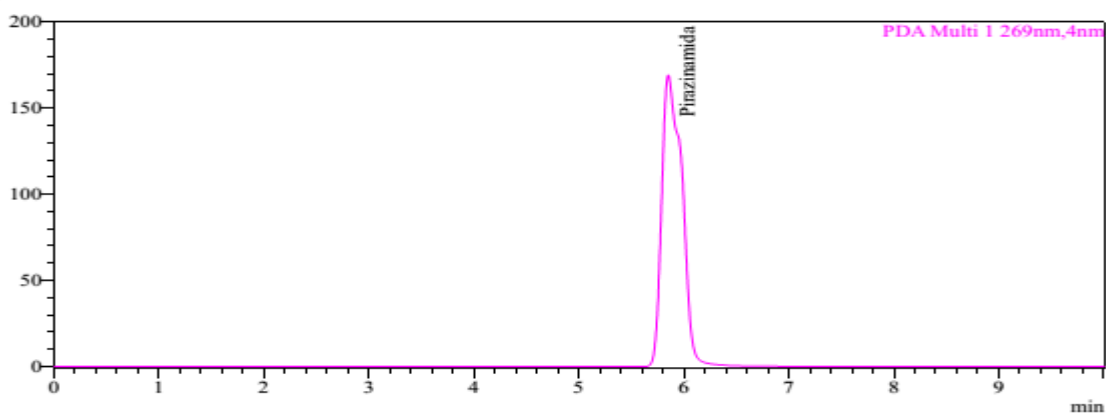
<Sample Information>

Sample Name : STD 50 ppm INY2
 Vial # : 1-3
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Standard
 Level : 3

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

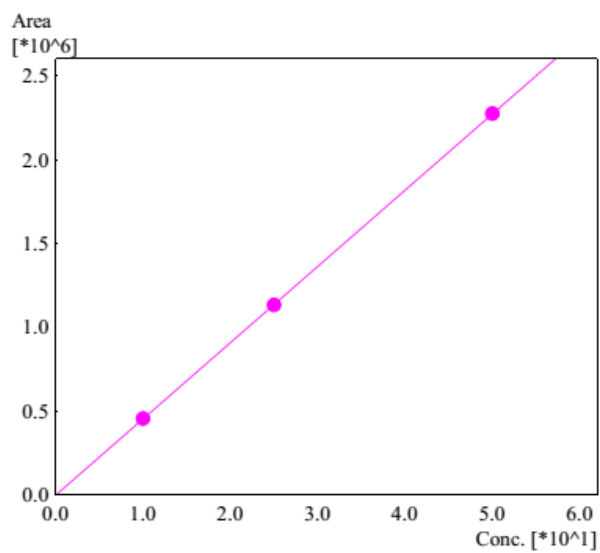
PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.849	2274729	50.010	mg/L	Pirazinamida
Total		2274729			

B. Curva de calibración del análisis de HPLC

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Pirazinamida
 Function : $f(x)=45495.8*x-499.386$
 $Rr1=0.9999962$ $Rr2=0.9999923$
 FitType : Linear
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	456279	457299
2	25	1133982	455260
3	50	2275383	1134058
			2276037
			2274729

C. Cromatogramas de los complejos $[\text{Co}(\text{PZA})_2\text{Cl}_2]$ (C1) y $[\text{Co}(\text{PZA})_2(\text{NO}_3)_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (C2)

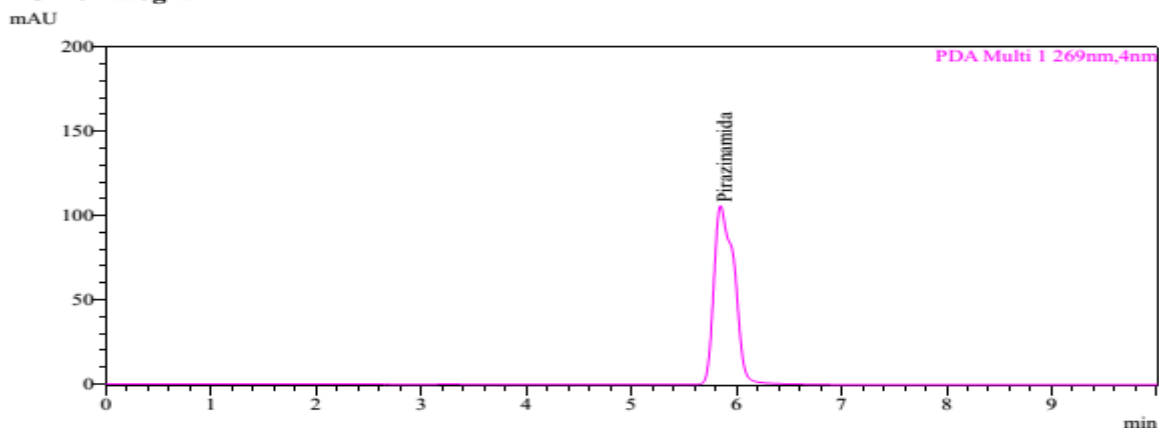
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : C1 INY1
 Vial # : 1-4
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.846	1478637	32.511	mg/L	Pirazinamida
Total		1478637			

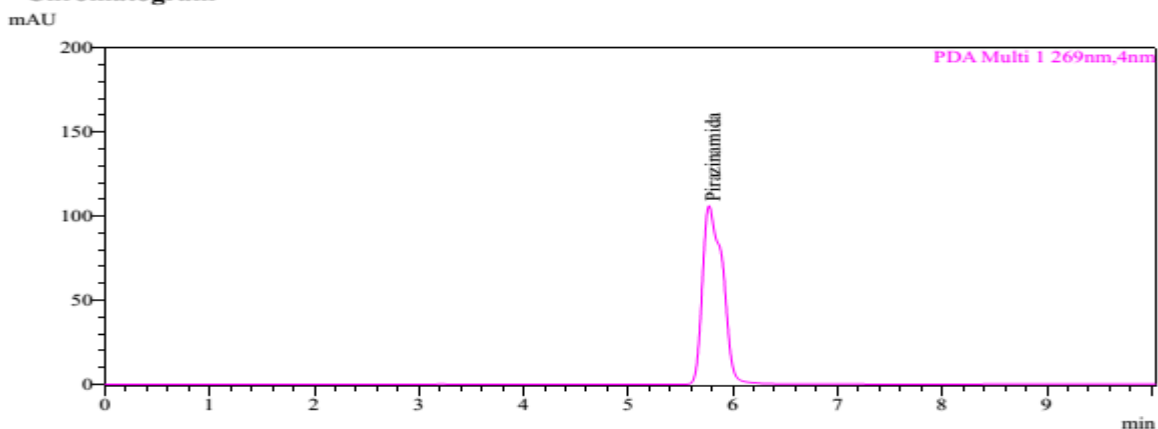
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : C1 INY2
 Vial # : 1-4
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.770	1474168	32.413	mg/L	Pirazinamida
Total		1474168			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

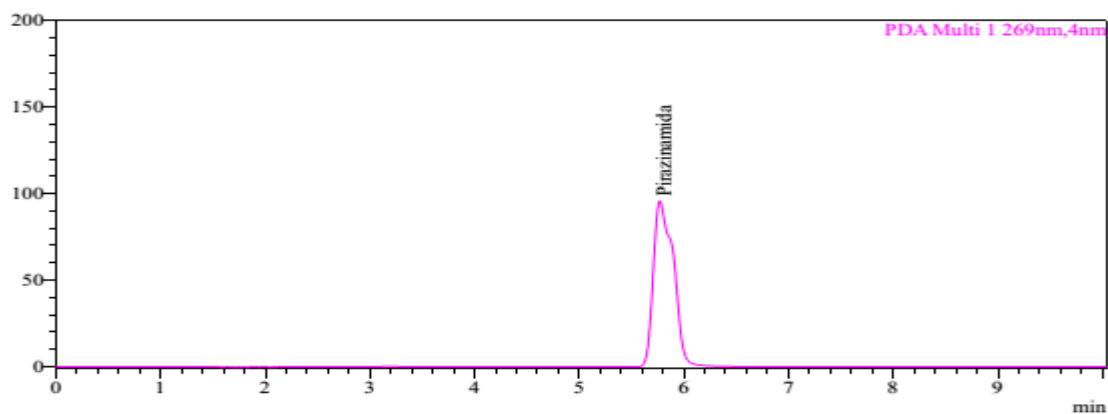
<Sample Information>

Sample Name : C2 INY1
 Vial # : 1-5
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.768	1269398	27.912	mg/L	Pirazinamida
Total		1269398			

SHIMADZU
LabSolutions

Analysis Report

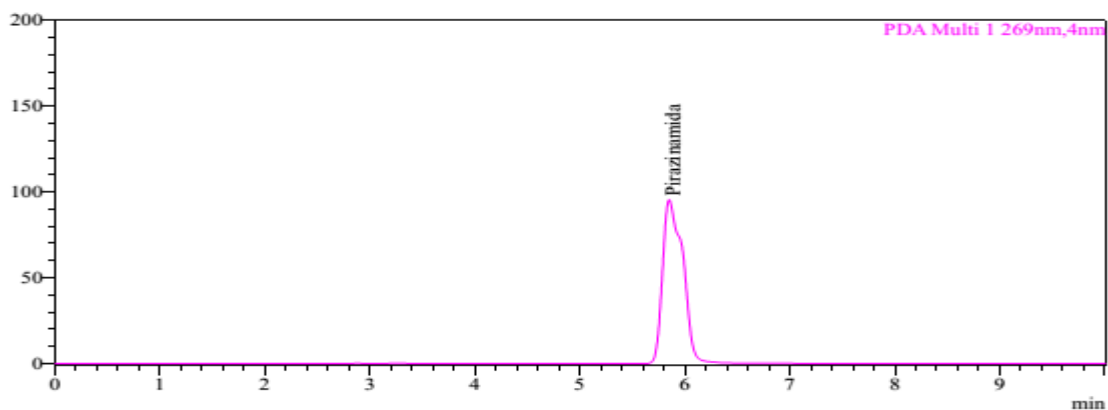
<Sample Information>

Sample Name : C2 INY2
 Vial # : 1-5
 Injection Volume : 10 uL

Sample Type : Unknown

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 269nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Name
1	5.849	1271806	27.965	mg/L	Pirazinamida
Total		1271806			