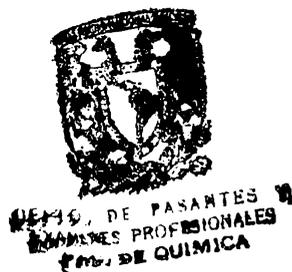


66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FARMACOLOGICO DE NUEVOS
QUIMIOTERAPICOS CON CENTROS METALICOS



T E S I S
para obtener el título de :
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
Q U E P R E S E N T A:
PATRICIA MORAN WHITE
MEXICO, D.F. 1981.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE	Lena Ruíz Azuara
VOCAL	Rafael Castillo Bocanegra
SECRETARIO	Salvador Martín Sosa
1er. SUPLENTE	Ezequiel Murillo García
2do. SUPLENTE	Martha Enedina Jiménez C.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Química Inorgánica

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química, UNAM

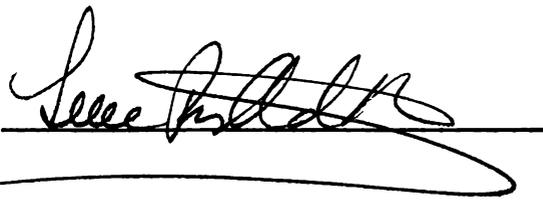
Nombre completo y firma del sustentante:

Patricia Morán White



Nombre completo y firma del asesor del Tema:

Dra. Lena Ruíz Azuara



La dedico:

Al hombre que amo, Héctor

A mis padres, por su esfuerzo, cariño
y desvelo para hacer posible quien soy

A Lena, por estimularme a realizar
este trabajo

Agradezco:

A Lena, por su valioso apoyo y solida-
ridad continua

A Ma. Amelia, por descubrir una parte
importante de mí y a Gisela por im-
pulsarme como lo ha hecho

A Noráh por sus amables consejos y
preocupación por mi salud

A los doctores Salvador Martín , Rafael
el Castillo y Andoni Garritz por --
sus sus enseñanzas y confianza depositadas
en mí

A Bertha, Elvira, Carmen, Rosi, Olga y
Martha, por su amistad y valiosa cooperación

A Angelina Quintero y Ofelia Espejo, por
permitirme el uso de su equipo

A mis compañeros del Laboratorio 210,
por la peculiar manera de estimarme
de cada uno

A mis amigos.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
Contenido	1
Nomenclatura y Abreviaturas	3
I. INTRODUCCION	I-1
Objetivo del Estudio	I-1
Microorganismos de Prueba Utilizados	I-2
Tipo de Compuestos Ensayados	I-4
II. ANTECEDENTES	II-1
Fenómeno de la Quelación en Medicina	II-1
Funciones de los Quelatos	II-2
A. Actividad Biológica y Mecanismo de Acción en Bacterias y Virus	II-3
B. Actividad Biológica y Modo de Acción en Virus	II-9
C. Actividad en Cultivos Celulares y Tumores	II-12
III. MATERIAL Y METODOS	III-1
A. Material	III-1
Material Biológico	III-1
Medios de Cultivo	III-1
Material de Laboratorio	III-1
Equipo	III-2
Reactivos	III-2
B. Métodos	III-4
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	IV-1
Efecto de las Sales Metálicas	IV-1
Influencia de los Disolventes	IV-1
Efecto de los Ligantes	IV-1
Efecto de los Compuestos de Coordinación	IV-2
V. RESULTADOS	V-1
Tabla I. Efecto de las Sales Metálicas	V-2
Tabla II. Influencia de los Disolventes	V-3
Tabla III. Efecto de los Ligantes	V-4
Tabla IV. Efecto de los Compuestos de Coordi- nación	V-5
Tabla A. Tabla Comparativa para $[\text{Ni accac fen}_2]$	V-6
Tabla B. Tabla Comparativa para $[\text{Ni gli fen}_2]$	V-7
Tabla C. Tabla Comparativa para $[\text{Ni acac}_2 \text{ bipi}]$	V-8
Tabla D. Tabla Comparativa para $[\text{Ni acac}_2 \text{ fen}]$	V-9
Tabla E. Tabla Comparativa para $[\text{Co ox báto}_2]$	V-10
Tabla F. Tabla Comparativa para $[\text{Co gli}_2 \text{ fen}]$	V-11
Tabla G. Tabla Comparativa para $[\text{Co acac}_2 \text{ fen}]$	V-12

2.

	<u>Página</u>
VI. DISCUSION DE RESULTADOS	VI-1
VII. CONCLUSIONES	VII-1
VIII. BIBLIOGRAFIA	VIII-1

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

acac	- -	Acetil acetato (O-O)
ox	- -	Oxalato (O' - O')
bipi	- -	2,2' - biperidina (N-N)
fen	- -	Fenantrolina (N' - N')
5 cloro fen	- -	5-Cloro fenantrolina
5 nitro fen	- -	5-Nitrofenantrolina
5 Me fen	- -	5-Metilfenantrolina
5 fenil fen	- -	5-fenilfenantrolina
4,7 dicloro fen	- -	4,7- diclorofenantrolina
5,5' diMe fen	- -	5,5'-dimetilfenantrolina
5,6 diMe fen	- -	5,6- dimetilfenantrolina
3,4,7,8 tm fen	- -	3,4,7,8, - tetrametilfenantrolina
bato	- -	bato fenantrolina (4,7-difenil 1,10-fenantrolina) (N' - N')
gli	- -	glicinato (O - N)
DMSO	- -	dimetilsulfóxido
COD	- -	ciclooctadieno
DDP	- -	cis - diclorodiamínplato (II)
°C	- -	grados centígrados
gr	- -	gramos
MeOH	- -	metanol
EtOH	- -	etanol
moos.	- -	microorganismos
G.A.	- -	grado analítico
λ	- -	longitud de onda
T	- -	transmitancia
aas.	- -	aminoácidos
baar.	- -	microorganismo ácido-alcohol resistentes.

I. INTRODUCCION

Desde sus inicios, gran parte de la investigación se ha enfocado a tratar de resolver problemas de salud. En nuestro país, las enfermedades infecciosas son la causa más frecuente de mortalidad y morbilidad. El uso de los quimioterápicos es relativamente reciente, por lo cual es un campo abierto a la investigación. La síntesis de quimioterápicos ha sido de naturaleza empírica, ésto es, que no existe una relación estructura/actividad lo suficientemente clara, como para diseñar la síntesis de un quimioterápico que desarrolle una actividad específica sobre un determinado moo. Cuando ésto se llegue a tener, se podrá diseñar un quimioterápico para aquellos moos patógenos que se presentan en formas resistentes a otros quimioterápicos y antibióticos conocidos.

Se han sintetizado muchos compuestos orgánicos como posibles quimioterápicos, y ¿por qué no intentar compuestos inorgánicos con esta función? En el terreno de la Bioinorgánica ésto se comenzó a tratar desde 1959. En México, el Departamento de Química Inorgánica de DEPG de la Facultad de Química de la UNAM, está trabajando sobre este tópico desde 1975 (20, 21, 22, 23, 24, 25). Se sintetizaron recientemente, compuestos de coordinación con ligantes del tipo O - O, N - N y O - N, entre ellos aminoácidos esenciales (20, 21, 22, 23, 24, 25); sin embargo, se desconoce la actividad biológica de estos probables agentes quimioterápicos.

Un estudio farmacológico en principio nos lleva a comprobar primeramente la actividad biológica de los nuevos compuestos, estudio que tiene interés solo cuando se aplica a moos patógenos.

Los moos de prueba seleccionados para este trabajo fueron:

- Streptococcus sanguis
- Bacillus subtilis
- Staphylococcus aureus coagulasa positivo
- Escherichia coli
- Shigella dysenteriae
- Salmonella typhi
- Cándida albicans
- Trichophyton tonsurans

por ser de los patógenos más representativos (con excepción de Bacillus subtilis).

Streptococcus sanguis, se reportó en reciente estudio como el moo. patógeno más frecuente en las gargantas de los capitalinos mexicanos⁽¹⁾. Además es un género que se caracteriza por ser ubicuo y causar infecciones generales en todos los órganos y en especial la endocarditis.

Streptococcus aureus, sigue siendo el agente etiológico más importante de infecciones e inflamaciones purulentas y seropurulentas y abscesos localizados, pasando por impétigo hasta piemias fatales.

Escherichia coli, continúa reportándose como el causante de

disenterías en niños, así como Shigella dysenteriae en adultos como agente etiológico de la conocida disentería bacilar.

No hay duda de la importancia de Salmonella typhi, tal vez el moo. más importante como causa de enfermedades gastrointestinales produciendo la tifoidea.

Cándida albicans, es un moo. frecuente en hospitales y aunque es oportunista, como segundo invasor hasta producir la muerte por invasión masiva, es causante de moniliasis en piel, uñas, bronquios, pulmones, siendo frecuentes en personas con bajas defensas, constituyendo casi siempre el tipo de infecciones secundarias en diabéticos. Son también conocidas la vaginitis e infecciones sistémicas generalizadas que causa.

Se seleccionó Trichophyton tonsurans como representante de los dermatofitos que invaden tejidos cutáneos y subcutáneos, causando el familiar "pie de atleta" y aunque no llegan a causar la muerte, sí constituyen un grave problema de salud pública; simplemente se escogió una especie de este género que se caracteriza por atacar tanto a piel como uñas y pelo.

Por último, Bacillus subtilis, se seleccionó como moo. prueba sin ser patógeno, por ser gram positivo y tener formas de resistencia (esporulación), es decir, muy parecido al género Clostridium, sólo que aerobio. Se hizo con el fin de trabajar con un moo. no peligroso

y aerobio que simplificaría en gran parte la técnica de ensayo experimental, pero en el que se pudiese observar la capacidad de esporulación en presencia de los nuevos probables quimioterápicos, recordando que se ha demostrado por inmunomicroscopía electrónica la relación entre la formación de spora y producción de toxina en el género Clostridium.

Como existe la posibilidad de que sólo el metal central o sólo los ligantes sean los responsables de la actividad biológica de los nuevos compuestos, también se ensayan las sales metálicas y los ligantes solos. Para conocer el efecto de los disolventes utilizados para realizar las soluciones de las sales metálicas, ligantes y compuestos de coordinación también se prueban todos los disolventes necesarios.

Los compuestos de coordinación que se prueban son sólo los correspondientes a las series de Co y Ni, debido a que son los disponibles en el laboratorio por el momento.

Por último, advierto que éste no es un estudio farmacológico completo, además es solamente semicuantitativo e "in vitro", para seleccionar los compuestos que podrían fungir como quimioterápicos por su actividad a bajas dosis. Esto es sólo una parte de las pruebas farmacológicas que han de continuarse, con el resto de los compuestos sintetizados (20, 21, 22, 23, 24, 25).

II. ANTECEDENTES

El desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades es aún muy empírico. Muchos fármacos se descubrieron por accidente o por ensayo y error, conociéndose en muy pocos casos una clara relación entre la acción del compuesto en el cuerpo y sus propiedades físicas y químicas. Uno de estos pocos casos lo constituye un grupo denominado agentes quelantes, que se caracterizan por su habilidad para secuestrar átomos metálicos. La quelación es un fenómeno frecuente que se presenta en muchos compuestos biológicos importantes como: Hemoglobina, Mioglobina, Clorofila, Vitamina B₁₂, Citocromo oxidasa, Nitrogenasa, etc., donde en todos los casos se tiene un átomo central metálico que funge como ácido de Lewis, rodeado de bases de Lewis llamadas ligantes, formando lo que se llama un compuesto de coordinación o compuesto complejo, debido a que los enlaces principales son enlaces covalentes coordinados. Un tipo especial de ligantes son los agentes quelantes, que pueden unirse al átomo central por más de un punto, es decir, por medio de más de dos pares de electrones (ligantes polidentados), formando compuestos de coordinación llamados quelatos.

La importancia médica de los agentes quelantes reside en el hecho de que los metales son vitales para los organismos vivos. El metabolismo del ser humano depende de los llamados elementos traza

que consisten en los micronutrientes siguientes: Mn, Fe, Co, Cu, Zn y Mo (elementos de transición), y por otra parte, pequeñas cantidades de otros ciertos metales tales como: Al, V, Cr, Ni, As, Cd, Sb, Au, Hg, Pb, Bi, etc., son altamente tóxicos para el cuerpo⁽²⁾.

Así los quelatos pueden tener las siguientes funciones (6, 7, 8, 9, 10, 11):

1. Extraer metales tóxicos del organismo por formación de compuestos excretables.
2. Liberar metales traza a tejidos o sustancias que los requieran.
3. Inactivar bacterias y virus por supresión de los metales que requieren para su metabolismo, o por liberación de metales dañinos a ellos⁽⁶⁾. Este punto es el que será abordado aquí.

Además las enfermedades por células malignas sugieren la importancia biológica de la quelación desde otro punto de vista. Muchos fármacos como cis-dicloro diamínplatino (II) (DDP), $[\text{Rh acac COD}]$, cis- $[\text{Ru (II) (DMSO)}_4\text{Cl}_2]$, complejos de Pd con 6- mercapto purina, etc., (2, 18, 19) que muestran alguna actividad contra el cáncer poseen la propiedad de ser quelatos. Varias estructuras celulares incluyendo el núcleo, se sabe contienen metales traza. También se ha notado que algunos quelatos actúan contra virus. Todo esto sugiere que la quelación del metal también debe ser un factor importante en el cáncer. Se ha supuesto que los virus están asociados con varios tipos de cáncer y contienen unidades protéicas y de ácidos nucleicos capaces de quelación

de manera que se ha propuesto que los metales deben destruir o disminuir la actividad viral. Para este propósito se probaron complejos metálicos con anticarcinogénicos como agentes coordinantes, encontrándose actividad antiviral de los mismos. ⁽²⁾

Es conveniente revisar algunos trabajos donde se estudian diferentes tipos de actividad biológica que manifiestan compuestos de coordinación análogos a los utilizados en el presente trabajo (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Véase tabla I, para los compuestos con actividad antibacteriana.

A. Actividad Biológica y Mecanismo de Acción en Bacterias y Hongos

Desde 1949, Mc - Naught y Owen (26) realizaron los primeros estudios sobre bacterias del rumen, en 1951 Turian sobre moos. ácido-alcohol resistentes (baar) y por primera vez Feeney en 1957 (26) sobre moos. gram positivos, demostrando el efecto bacteriostático de los quelatos formados con fenantrolina más iones metálicos. Se probaron los ligantes fenantrolina y 2,2' bipyridina como bases, sales cuaternarias y quelatos con ligantes idénticos y mixtos. ⁽²⁾

Autores como White, Harris, Cheyne, Rwyer, Reid, Schulman (2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16), y otros más han realizado estudios importantes con ligantes como: fen(ver abreviaturas), 5- fen, bato, 5,6- di fen, tmfen, 5- fenilfen, 5- clorofen, 4,7- diclorofen,

5- nitrofen, 5, 5- di fen, y análogos con bipi, investigando su efecto sobre bacterias (9, 13, 14).

Se han probado compuestos de coordinación y los ligantes anteriores sobre moos. como: Streptococcus pyogenes var. Oxford, Streptococcus viridans, Streptococcus pneumoniae, C. Welchi, C. Perfringens, C. Tetani, E. coli, B. subtilis, P. vulgaris, S. dysenteriae, Staphylococcus pyogenes, M. tuberculosis, etc. (9, 14).

Se ha notado una diferencia en el mecanismo de acción de los compuestos inertes y lábiles. Entre los compuestos inertes se encuentran los de Fe, Ru y Ni, y entre los lábiles tenemos: Mn, Cu, Cd y Zn, siendo estos últimos de actividad más intensa y rápida. Los quelatos son en ambos casos catiónicos y disociados en solución acuosa.

El modelo de acción propuesto es que el quelato se introduce al interior de la célula bacteriana adhiriéndose a la membrana por lipofilicidad (que le confieren los sustituyentes metílicos y fenílicos a los ligantes mencionados). Luego el quelato interfiere con reacciones de óxido-reducción del metabolismo interno, en especial con las de la mitocondria, lo que provoca en la bacteria muerte, o pérdida de su capacidad para reproducirse. Los quelatos inertes ejercen su actividad por medio del catión como un todo, implicando interacciones del tipo fuerzas de Van der Waals y fuerzas de corto alcance⁽⁹⁾, mientras

TABLA I

<u>Metales</u>	<u>Ligantes</u>	<u>Microorganismos de Prueba</u>	<u>Referencia</u>
Cu (II)	fan	<u>Staphylococcus aureus</u> (Var.Oxford)	9
Cd (II)	3,4-(CH ₃) ₂ -fen	<u>Escherichia coli</u>	
Zn (II)	3,8-(CH ₃) ₂ -fen		
Mn (II)	4,7-(CH ₃) ₂ -fen		
Co (II)	3,4,5,6, -(CH ₃) ₄ -fen		
Te (II)	3,4,7,8-(CH ₃) ₄ -fen		
Ni (II)	3,4,5,6,7,8-(CH ₃) ₆ -fen		
Cu (II)	fen		
Fe (II)	5-CH ₃ -fen	<u>Staphylococcus aureus</u>	
Ni (II)	4,7-(CH ₃) ₂ -fen	<u>Streptococcus pyogenes</u>	
Cu (II)	5,6-(CH ₃) ₂ -fen	<u>Clostridium perfringens</u>	
	3,5,6,8-(CH ₃) ₄ -fen		
	5-C ₆ H ₅ -fen		
	4,7-(C ₆ H ₅) ₂ -fen		
	5-Cl-fen		
	4,7-Cl ₂ -fen		
	5-NO ₂ -fen		
Fe (II)	bipi		
Cu (II)	4,4' - ó 5,5' (CH ₃) ₂ -bipi		
	4,4'-(C ₂ H ₅) ₂ -bipi		
	4,4'-(CH ₃) ₂ -5,5'-(C ₂ H ₅) ₂ -bipi		

<u>Metales</u>	<u>Ligantes</u>	<u>Microorganismos de Prueba</u>	<u>Referencia</u>
Fe (II)	fen	<u>Corynebacterium diphtheriae</u>	14
	5-CH ₃ -fen	<u>Streptococcus viridans</u>	
	5, 6-(CH ₃) ₂ -fen	<u>Streptococcus pneumoniae</u>	
	3, 5, 6, 8-(CH ₃) ₄ -fen	<u>Brucella abortus</u>	
		<u>Clostridium tetani</u>	
		<u>Bacillus subtilis</u>	
		<u>Shigella dysenteriae</u>	
		<u>Salmonella typhimurium</u>	
		<u>Pasteurella pestis</u>	
		<u>Pseudomona aeruginosa</u>	
Ru (II)	fen	<u>Micobacterium tuberculosis</u>	14
	5-NO ₂ -fen	<u>Staphylococcus aureus</u>	
	5-Cl-fen	<u>Streptococcus pyogenes</u>	
	3, 5, 6, 8-(CH ₃) ₄ -fen	<u>Clostridium perfringens</u>	
	mixtos:	<u>Escherichia coli</u>	
	fen y (NH ₃) ₂	<u>Proteus vulgaris</u>	
	5-NO ₂ -fen y (NH ₃) ₂		
	5-Cl-fen y (NH ₃) ₂		
	3, 5, 6, 8-(CH ₃) ₄ -fen		
	y (NH ₃) ₂ .		
	fen y acac		
	5-NO ₂ -fen y acac		
	5-Cl-fen y acac		
	3, 5, 6, 8-(CH ₃) ₄ -fen		
	y acac.		

que los quelatos lábiles la ejercen mediante sus productos de disociación en el medio. (9, 14)

La actividad sobre la levadura Saccharomyces cerevisiae, es la de provocar formación de colonias miniaturas respiratorio - deficientes por falta de enzimas. En general, con excepción de algunos quelatos metálicos derivados de la tmfen, las concentraciones inhibitorias de las bases fueron considerablemente bajas a comparación de sus correspondientes sales cuaternarias y quelatos. Provocan baja toxicidad y alta concentración de colonias respiratorias - deficientes, como la euflavina, pero mostrando 15 veces menos mutagenicidad que éste producto.

La acción de los quelatos y sales cuaternarias puede ser en la superficie, además de intracelularmente, ya que la levadura cuenta con receptores superficiales para transporte específico para cationes monovalentes y divalentes que posiblemente son interferidos. Se tiene evidencia de la acción intracelular por la pérdida de las bandas de absorción debidas a los citocromos a y b, pero aumento de la intensidad de la banda del citocromo c, cuando se hace crecer esta cepa en $\left[\text{Fe}^{\text{III}} (\text{tmfen})_3 \right] \text{SO}_4$, lo cual también fue demostrado para Staphylococcus pyogenes.

Respecto a hongos patógenos, la relativa baja actividad de los antifúngicos contra antibacteriales, se debe a la resistencia de la

membrana a la penetración de los fármacos y a la gran reserva de rutas bioquímicas alternativas que le permiten la sobrevivencia de los hongos. Por tanto, debemos pensar en compuestos que penetren fácilmente la membrana (alta lipofilicidad) y que actúen inespecíficamente sobre varias enzimas.

Para C. albicans, se ha encontrado que la actividad de quelatos con fenantrolinas sustituidas es siempre mayor que cuando no lo está⁽¹⁵⁾. Los complejos de Fe y Ru, tienen actividades similares, y debido a su marcada estabilidad, se propone que actúan como pseudo-esferas muy cargadas por medio de interacciones del tipo fuerzas de Van der Waals y de corto alcance⁽⁹⁾. Blank ha demostrado la alta actividad fungistática de la 2,9 di - fen que forma quelatos poco estables. El hongo más resistente probado fue C. albicans, el cual acumula marcadamente el color del compuesto en la colonia.

Los resultados generales son:

1. La actividad "in vitro" contra moos. fue mayor sobre moos. baar., luego sobre gram positivos y por último para los gram negativos.
2. La fenantrolina y derivados, tienen actividad moderada contra gram positivos, con excepción de los compuestos de Ru que presentan la mayor actividad.
3. La metilsustitución proporciona mayor actividad contra gram positivos y moos. baar.
4. La nitrosustitución solo benefició la actividad contra M . tuberculosis.

5. La actividad es en orden decreciente: quelatos > bases > sales cuaternarias.
6. La tan alta actividad de las bases es probablemente debido a su gran habilidad de penetrar al sitio de acción, comparado con el quelato y la sal cuaternaria que son especies cargadas.
7. Actividad de los complejos lábiles es mayor que la presentada por los complejos inertes.
8. El modo de acción propuesto es que al tener los quelatos un alto potencial redox, lipofilicidad incrementada, alta localización de carga, poseen una capacidad incrementada de enlace sobre sitios biológicos susceptibles. La acción puede llevarse a cabo superficialmente por medio de receptores catiónicos o bien, intracelularmente a nivel de mitocondria o del factor citoplasmático que controla la síntesis de enzimas respiratorias.

B. Actividad Biológica y Modo de Acción en Virus

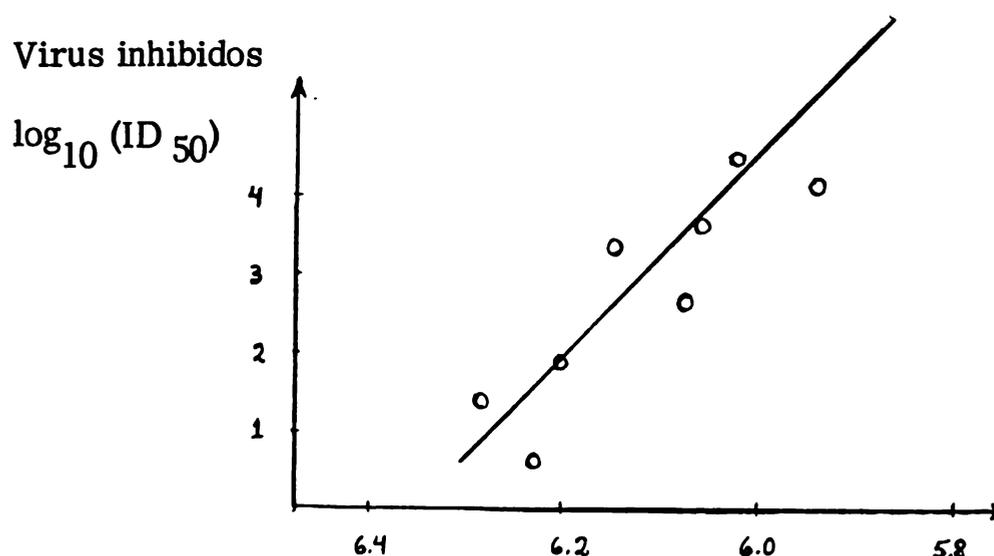
Nuevamente las pruebas realizadas sobre virus con quelatos de Ru (II) y ortofenantrolinas sustituidas, muestran que la actividad virostática aumentaba con la sustitución metílica o fenílica de la fenantrolina, con la observación de que la actividad de los quelatos es debida a su naturaleza catiónica.

Todos los quelatos y sales cuaternarias inhiben la multiplicación de virus en grados variados. El efecto de los quelatos con ligantes mixtos, es mayor que con ligantes iguales, observación asociada a un potencial redox menor y aumento de penetrabilidad del quelato monovalente mixto, permitiendo mayor acumulación intracelular.

Los trisquelatos de Co (II) y Fe (II) son más lábiles que los correspondientes de Ni (II) y Ru (II) y por tanto más efectivos, siendo los más activos los de Cu (II), Cd, Mn (II), y Zn (II) ⁽¹³⁾.

El inhibidor más potente fue $[\text{Ru}(\text{tm}_4\text{fen})_2\text{acac}] \text{Cl}$ a concentración $6 \times 10^{-7} \text{ M}$, con efecto antiviral y progresivo sin regresión al enjuagarse.

Curva dosis vs. efecto:



Se puede definir al virus como ácido nucléico envuelto en proteína y ocasionalmente también por lípido y polisacárido. Extracelularmente es metabólicamente inerte e incapaz de propagarse por sí mismo, así, la reproducción viral es solo intracelular y dependiente del material y energía de la célula huésped. Al entrar pierde su identidad y se convierte en un componente más, pero que dirige el metabolismo para sintetizar más virus. El proceso de infección viral sigue la siguiente secuencia:

1. Adsorción por atracción electrostática y posiblemente una unión específica de proteína viral con receptores celulares complementarios.
2. Penetración por fagocitosis dejando la proteína y solo inyectándose el ácido nucléico a la célula huésped.
3. Fase de eclipse donde el ácido nucléico dirige la replicación de todos los constituyentes virales. No hay evidencia física ni química de este paso.
4. Aparición de nuevos precursores virales en forma de antígeno fijador de complemento y una hora después, aparición de material hematoaglutinante en el citoplasma.
5. Ensamble de partículas virales.
6. Expulsión con ruptura celular y casi siempre daño irrevocable y muerte celular.

Así el fármaco antiviral, puede tener acción directa contra el virus extracelular o por inhibición del proceso reproductivo en cualquier paso. El mecanismo en el primer caso es probablemente la formación de enlaces al adsorberse los quelatos catiónicos en la superficie del virus. Este mecanismo se fundamenta en el hecho de encontrarse que la interacción virus - quelato, es parcialmente reversible por la restauración de la capacidad hemaglutinante del virus al ser lavado⁽¹⁰⁾. En el segundo caso los quelatos parecen producir inhibición de la respiración y de la producción de energía en la célula huésped con la consecuente inhibición de la multiplicación viral, dependiendo del tiempo de exposición el modo de acción. Por ejemplo, si $[\text{Ru}(\text{tm fen})_2 \text{acac}]^+$ se agrega simultáneamente con virus de influenza a suspensiones de tejido alantoideo en capa, el quelato falla en inhibir las etapas de adsor-

ción, penetración y ruptura del virus, pero inhibe la producción de hemaglutinina y virus completos. En cambio cuando se agrega luego de 3 horas de infección, se inhibe completamente la formación de virus nuevos, tal vez actuando durante la fase eclipsada. Los virus probados han sido: MEL Melbourne. cepa de influenza A, Herpes simple, Vaccinia, Poliomieltis, en células normales y malignas de epitelio de riñón de mono y alantoideas de embrión de pollo. Por último, se ha reportado una más fácil inactivación de los virus de la influenza y herpes que de poliomieltis y vaccinia.

C. Actividad en Cultivos Celulares y Tumores

Se ha reportado inhibición del crecimiento de algunos tumores por la aplicación de ciertos quelatos catiónicos y neutros de metales de transición, por ejemplo: $[\text{Cu}(\text{tmfen})\text{fen}]^{++}$ y $[\text{Tu}(\text{tmfen})\text{acac}_2]^{++}$, que inhiben el crecimiento de tumores de ascitis de Landschutz en ratones⁽⁸⁾, el cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP), es corriente hoy en día en muchos hospitales del mundo para el tratamiento de cáncer en ovarios, testicular y de otros tipos⁽¹⁸⁾, sistemas del tipo $[\text{Rh acac COD}]$, cis- $[\text{Ru(II)(DMSO)}_4\text{Cl}_2]$, etc., se ha probado que tienen eficacia terapéutica contra el carcinoma ascitis de Ehrlich⁽¹⁹⁾. La manera en que actúan es por inhibición de la síntesis de DNA por el DPP sospechándose sea por intercalación del compuesto entre pares de bases adyacentes, como de hecho actúan

antibióticos como la actinomicina⁽¹⁸⁾, o bien, en el caso de los complejos de Rh, y Ru se ha observado una depresión en la incorporación de uridina en macromoléculas de células tumorales, con inhibición similar en la incorporación de timidina, uridina y leucina cuando se prueban dosis mayores. Vale la pena mencionar que en éstos últimos compuestos se ha obtenido una muy baja toxicidad en los tejidos, contándose ya con dos bajas dosis con uso terapéutico⁽¹⁹⁾.

Aún cuando se ha notado que la actividad biológica de los quelatos es amplia, debe aclararse que ha sido el comportamiento "in vitro", más "in vivo" no se han obtenido tan buenos resultados. Por ejemplo, en virus las dosis requeridas para inhibir la multiplicación viral no alcanza niveles tóxicos en mamíferos, pero las dosis necesarias para inactivarlos totalmente son 100 veces mayores, cayendo dentro de los niveles tóxicos para las células huésped. La mayoría de los quelatos son letales para células a concentraciones de 10^{-5} a 10^{-7} M (13), sin diferencia aparente por ser cultivos de células normales o malignas, adultas o embrionarias, epiteliales o fibroblásticas.

Los quelatos han sido incapaces de proteger contra infecciones virales, estafilocócicas y estreptocócicas en mamíferos sobre todo debido al poderoso efecto de bloqueo neuromuscular que manifiestan estos compuestos (propiedad curariforme y anticolinesterasa que a su vez depende de la forma enantiomérica de la que se trate en compuestos asimétricos⁽¹²⁾).

Solo en aplicaciones tópicas se ha tenido éxito, al controlar infecciones en piel y mucosas con fines terapéuticos o profilácticos sin manifestación tóxica. Los estudios sobre toxicidad y vías de administración de quelatos se continúan porque a pesar de todo tienen grandes propiedades terapéuticas. Se considera como prometedor un compuesto que tenga actividad biológica a una concentración no mayor de $100 \mu\text{cg/ml}$, fijándose esta dosis como la máxima tolerable en el cuerpo humano sin consecuencias tóxicas (28, 29, 30, 31). La mayor ventaja que ofrecen estos nuevos quimioterápicos, es que provocan formas resistentes solo después de aplicarse un número de 15 veces más que las necesarias para producirse por la aplicación de otros fármacos actualmente utilizados.

Por último, de lo anterior se visualiza la necesidad de ensayar nuevos compuestos que guarden la similitud requerida para mantener la actividad biológica ya apreciada pero que carezcan de los efectos adversos como la toxicidad.

Para ellos en el presente trabajo se prueban compuestos de coordinación con ligantes mixtos y además de los ya utilizados del tipo O-O y N-N, sean del tipo O-N.

III. MATERIAL Y METODOS

A. Material

1. Material Biológico.

Se realizaron las pruebas de actividad biológica de los compuestos sobre las siguientes capas de moos. de prueba obtenidas del cepario de la Universidad.

- | | |
|------------------------------|----------------------------------|
| 1. Cocos Gram ⁺ | a) <u>Staphylococcus aureus</u> |
| | b) <u>Streptococcus sanguis</u> |
| 2. Bacilos Gram ⁺ | c) <u>Bacillus subtilis</u> |
| 3. Bacilos Gram ⁻ | d) <u>Escherichia coli</u> |
| | e) <u>Salmonella thyphi</u> |
| | f) <u>Shigella disenteriae</u> |
| 4. Hongos | g) <u>Cándida albicans</u> |
| | h) <u>Trichophyton tonsurans</u> |

2. Medios de Cultivo.

Agar Hinton - Mueller para bacterias

Agar Dextrosa - Sabouraud para hongos

3. Material de Laboratorio:

Cajas de Petri desechables

Tubos de ensayo de 22 x 150 mm

Pipetas desechables de 0.5 ml

Pipeta volumétrica de 25 ml

Vasos de precipitado de 600 ml
 Vasos de precipitado de 1000 ml
 Vasos de precipitado de 50 ml
 Matracer volumétricos de 1000 y de 2000 ml
 Matraces aforados de 25, 50 y 100 ml
 Vidrios de Reloj
 Gradillas
 Propipeta
 Jeringas desechables de 20 ml
 Espátula cromada
 Mecheros de Bunsen con manguera de hule
 Telas de asbesto
 Tripies
 Algodón
 Gasa
 Cinta gomada.

4. Equipo.

Autoclave
 Filtros Milipore de 25 mm de diámetro (Swinnex-25), con malla de 0.22μ
 Espectrofotómetro digital Varian Series 634
 Balanza analítica (precisión de 0.01 mg).

5. Reactivos.

<u>Sales de iones metálicos</u>	<u>Origen</u>	<u>Concentración Soln. Acuosas</u>
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck	0.1606 g/100 ml

<u>Salas de iones metálicos</u>	<u>Origen</u>	<u>Concentración Soln. Acuosas</u>
$\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Backer	0.1604 g/100 ml
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	0.1148 g/100 ml
ZnCl_2 anhidro	Backer	0.0919 g/100 ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Carlo-Erba	0.1335 g/100 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	0.1824 g/100 ml
$\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$	Ventron Alfa Prd.	0.1764 g/100 ml
$\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	in situ	0.1845 g/100 ml

Disolventes

CCl_4	G.A.
CHCl_3	G.A.
CH_2Cl_2	G.A.
EtOH	G.A.
MeOH	G.A.
DMSO	G.A.
Acetona	G.A.
H_2O	destilada

<u>Compuestos de coordinación</u>	<u>Origen</u>	<u>Concentración</u>	<u>Disolvente</u>
$\text{Co}_2(\text{ox}) \text{bato}_4$ I_2	A^+	100 $\mu\text{cg/ml}$	MeOH/ CHCl_3
Co fen (gli)_2	A^+	100 $\mu\text{cg/ml}$	MeOH
Co fen (acac)_2	A^+	100 $\mu\text{cg/ml}$	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$
$\text{Ni (fen)}_2 \text{ acac}$ Cl	B^{++}	100 $\mu\text{cg/ml}$	EtOH/ H_2O
Ni gli (fen)_2 Cl	B^{++}	100 $\mu\text{cg/ml}$	H_2O
Ni bipi (acac)_2	B^{++}	100 $\mu\text{cg/ml}$	CHCl_3
Ni fen (acac)_2	B^{++}	100 $\mu\text{cg/ml}$	CHCl_3

A^+ Preparados por David Díaz (21)
 B^{++} Preparados por Rafael Moreno (22)

<u>Ligantes</u>	<u>Origen</u>	<u>Concentraciones</u>	<u>Disolvente</u>
Glicina	Merck	23.19 y 99.03 mg/100 ml	H ₂ O
Fenantrolina	Merck	35.26 y 112.82 mg/100 ml	MeOH
Bipiridina	Merck	30.56, 48.89 y 97.78 "	MeOH
Acetilacetona	Eastman	31.07 y 62.05 mg/100 ml	H ₂ O
Oxalato de Potasio	Backer	27.58 mg/100 ml	H ₂ O

B. Métodos

El estudio experimental semicuantitativo de la actividad biológica de quimioterápicos, puede realizarse de diversas maneras (3, 5). El método que a continuación se describe fue escogido en base a su confiabilidad, bajo costo, material fácilmente asequible y poco complicado en su manejo. La reproducibilidad del método ya ha sido analizada habiendo proporcionado buenos resultados⁽⁴⁾.

El método consiste en la observación de la existencia de desarrollo microbiano luego de la inoculación de los microorganismos de prueba en cajas de Petri con el medio de cultivo apropiado, al que previamente se le ha incorporado la sustancia cuyo efecto se quiere estudiar, observando el tiempo y la temperatura de incubación deseados. El por qué de ciertas consideraciones se justificarán al final de éste subtema.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Efecto de las sales de iones metálicos.

1. Se preparan las soluciones acuosas de las sales de iones metálicos en las concentraciones indicadas y se esterilizan.
2. Se preparan los medios de cultivo (para ensayar compuestos de Manganese antes deberá ajustarse al pH a 5.0) y se vierten 14 ml del medio en cada caja de Petri.
3. Inmediatamente después, antes de su gelificación, se agrega 1 ml de la solución acuosa estéril de cada una de las sales.
4. Se permite la solidificación del medio luego de agitación suave para la dispersión homogénea de la solución salina en el medio.
5. Se preparan las suspensiones microbianas en agua estéril y se ajusta su concentración por turbidez a un $40 \pm 1\%$ T contra un blanco de agua.
6. Se inocula 1 ml de suspensión microbiana en condiciones de esterilidad y se distribuye homogéneamente en la superficie de la gelosa por movimientos suaves de la caja de Petri.
7. Se sellan con cinta gomada y se incuban a temperatura ambiente por un tiempo de 48 horas las bacterias y de 5 días la levadura y el hongo filamentoso, al final del cual se observa si hubo desarrollo microbiano.

Influencia de los disolventes.

Se siguen los mismos pasos excepto que el punto 3, se agrega 1 ml del disolvente puro.

Efecto de los ligantes.

Los mismos pasos excepto que para el punto 3 se agrega

1 ml del ligante en solución (pág.III-4)estéril en las concentraciones señaladas anteriormente.

Efecto de los Compuestos de Coordinación.

Los mismos pasos, excepto que para el punto 3 se agrega 1 ml del compuesto de coordinación en solución estéril en la concentración señalada antes (pág. III-3).

a) En vista de que sólo interesan los compuestos biológicamente activos a concentraciones por debajo de $100 \mu\text{cg/ml}$, las concentraciones probadas para los compuestos de coordinación, fueron justamente las necesarias para obtener una concentración final de $100 \mu\text{cg/ml}$, (recuérdese que se agrega 1 ml de solución del compuesto por 14 ml de medio de cultivo). Los cálculos estequiométricos llegan a tener soluciones de 0.15 gr/100 ml (ó 0.075 gr/50 ml ó 0.0385 gr/25 ml dependiendo de la cantidad de muestra disponible). De igual manera las concentraciones probadas de ligante y de ión metálico, fueron las necesarias para obtener las concentraciones finales proporcionales debidas a una concentración final de $100 \mu\text{cg/ml}$, del compuesto de coordinación. Para realizar los cálculos estequiométricos, se tomó un peso molecular promedio de los compuestos de coordinación, encontrándose que una concentración de $100 \mu\text{cg/ml}$ correspondía a aproximadamente $0.45 \mu\text{ moles/ml}$, por lo que se desprendía que debería de probarse la concentración de ión metálico necesaria pa-

ra dar la concentración final de $0.45\mu\text{moles/ml}$, en vista de que en todos los casos se trata de complejos mono-nucleares. Para el caso de los ligantes, éstos cálculos son un poco más complicados ya que se presentan de 1 a 3 moles de ligante por mol de compuesto de coordinación, debiendo hacerse el cálculo para cada caso; tomando en cuenta que la concentración final de $100\mu\text{cg/ml}$ del compuesto de coordinación corresponde a aproximadamente $0.45\mu\text{moles/ml}$, la concentración de la solución de los ligantes debe ser tal que dé una concentración final de $0.45\mu\text{moles/ml} \times \frac{\text{No. moles de ligante}}{\text{mol de compuesto}}$. Las concentraciones obtenidas por estos cálculos están indicadas en el listado del material (pags. III-2 y III-4).

b) Se prueba 1 ml de disolvente puro en 14 ml de medio de cultivo como testigo de prueba que simula las condiciones del experimento y permite observar sólo el efecto del disolvente, justo en la concentración final que se obtiene en cada experimento.

c) Se seleccionaron los medios de cultivo Hinton-Mueller, para bacterias, y Dextrosa-Sabaurand para hongos, por ser medios de cultivo ricos y no selectivos, ya que su única función en este trabajo fue la de permitir el desarrollo microbiano.

d) Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15 libras de presión. Las soluciones de sales metálicas, ligantes y compuestos de coordinación, y los disolventes utilizados

fueron esterilizados por filtración en filtros Milipore, para evitar la descomposición térmica de las muestras.

e) La concentración de las suspensiones microbianas en agua estéril, se ajusta en base a la turbidez obtenida por la lectura de unidades Klett (U.K.), en un Nefelómetro con filtro verde (el cual se calibra con una curva patrón de BaCl_2 y H_2SO_4 0.1N), que a su vez corresponde a una lectura de transmitancia en un espectrofotómetro a una $\lambda = 580 \text{ nm}$ (3).

Se escogió como buena una concentración de la suspensión microbiana correspondiente a un $40 \pm 1 \%$ T, leyendo contra un blanco de agua en todos los casos, en vista de que este fue el vehículo de suspensión.

f) Si bien es cierto que la Temperatura óptima de crecimiento para microorganismos patógenos es de 37°C , ésto a su vez no significa que no puedan tener un buen desarrollo a temperatura ambiente, que fue como hubo que fijarse esta variable en el experimento debido a la falta de equipo necesario. Los tiempos de incubación usados corresponden a los estrictamente necesarios para asegurar la existencia de desarrollo microbiano en caso dado.

g) Todas las pruebas se realizaron por triplicado para reducir así el error aleatorio en los resultados obtenidos.

h) En todos los casos se corrieron testigos de crecimiento como control del experimento.

i) La resiembra de los moos. se realizó aproximadamente cada dos semanas y cuando se tuvo sospecha de contaminación o mutación, se reconocieron las características microscópicas y de tinción de los mismos.

V. RESULTADOS

Se presentan en las siguientes tablas utilizando la siguiente simbología:

- +++ Buen crecimiento
- ++ Crecimiento moderado
- + Crecimiento escaso
- (-) Crecimiento ausente

Tabla I Efecto de las sales metálicas

Tabla II Influencia de los disolventes

Tabla III Efecto de los ligantes

Tabla IV Efecto de los compuestos de coordinación.

Las tablas A, B, C, D, E, F, G, corresponden a las tablas comparativas de los efectos de cada una de las partes que componen los complejos.

Efecto de las Sales Metálicas

Co Cl ₂ · H ₂ O	Ni Cl ₂ · H ₂ O	Cu Cl ₂ · 2 H ₂ O	Bn Cl ₂ anh .	Nn Cl ₂ · 4 H ₂ O	Fe Cl ₃ · 6 H ₂ O	Ru Cl ₃ · X H ₂ O	Co Cl ₃ · 6 H ₂ O	
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>S. Sanguis</u>
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>S. Aureus</u>
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>B. subtilis</u>
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>E. coli</u>
+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>S. typhi</u>
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>S. dysenteriae</u>
+++	+++*	+++	+++	++	+++	+	+++	<u>C. albicans</u>
+++	+	+++	+	++	+++	+	+++	<u>T. tonsurans</u>

* No toman el color de la sal las colonias.

Influencia de los Disolventes

C Cl ₄	CH Cl ₃	CH ₂ Cl ₂	Acetona	Et OH	Me OH	DMSO	H ₂ O	
+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	<u>S. sanguis</u>
+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	<u>S. aureus</u>
+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++	<u>B. subtilis</u>
+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	<u>E. coli</u>
+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	<u>S. typhi</u>
+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	<u>S. dysenteriae</u>
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<u>C. albicans</u>
+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	<u>T. tonsurans</u>

fen ₃	fen ₂	fen ₁	gli ₃	gli ₂	gli ₁	bipi ₃	bipi ₂	bipi ₁	acac ₂	acac ₁	ox ₁	
(-)	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	++	<u>S. sanguis</u>
(-)	+	+	+++	+++	+++	+	++	++	++	++	++	<u>S. aureus</u>
(-)	+	+++	+++	+++	+++	(-)	+	++	++	+	++	<u>B. subtilis</u>
(-)	+	+++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	++	<u>E. coli</u>
(-)	+	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	<u>S. typhi</u>
(-)	+	++	++	++	++	+	++	++	+	+	+	<u>S. dysenteriae</u>
(-)	(-)	(-)	+++	+++	++	+	++	++	+++	++	++	<u>C. albicans</u>
(-)	+	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	++	<u>T. tonsurans</u>

Efecto de los Compuestos de Coordinación

	[Niacacfen ₂]Cl O-O, N-N EtOH/H ₂ O	[Niglifen ₂] Cl O-N, N-N H ₂ O	[Niacac ₂ bipi] O-O, N-N CHCl ₃	[Niacac ₂ fen] O-O, N-N CHCl ₃	[Cox ₂ bato ₂]I ₂ O-O, N-N MeOH/CHCl ₃	[Cogli ₂ fen] O-N, N-N MeOH	[Coacac ₂ fen] O-O, N-N MeOH/CHCl ₃
<u>S. sanguis</u>	+	+	+	++	+	(-)	(-)
<u>S. aureus</u>	+	++	++	++	++	(-)	+
<u>B. subtilis</u>	+	++	++	++	+	(-)	+
<u>E. coli</u>	++	+	+	+	++	+	+
<u>S. Typhi</u>	++	++	++	++	++	(-)	++
<u>S. dysenteriae</u>	++	++	++	++	++	(-)	+
<u>C. albicans</u>	++	++	++	++	++	+	++
<u>T. tonsurans</u>	++	++	++	+	+	(-)	+++

Tabla A	C [Ni acac fen] ₂ ⁺	L ¹ fen ₂	L ² acac ₁	M NiCl ₂ ·H ₂ O	S ¹ EtOH	S ² H ₂ O	
Streptococcus sanguis	+	+	+	+++	+	+++	$C = L^1 = L^2 = S^1 >> \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	+	+	++	+++	++	+++	$C = L^1 > S^1 = L^2 > \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	+	+	+	+++	+	+++	$C = L^1 = L^2 = S^1 >> \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	++	+	++	+++	++	+++	$L^1 > C = L^2 = S^1 > \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	+	+++	+++	+	+++	$L^1 = S^1 > C > \frac{L^2 = M = S^2}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	++	+	+	+++	+	+++	$L^1 = L^2 = S^1 > C > \frac{M = S^1}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	-	++	+++	+++	+++	$L^1 >> C = L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	++	+	++	+	++	+++	$L^1 = M > C = L^2 = S^1 > \frac{S^2}{\text{no activos}}$

Tabla B	C [Ni gli fen ₂] ⁺	L ¹ fen ₂	L ² gli ₁	M NiCl ₂ · H ₂ O	S H ₂ O	
Streptococcus sanguis	+	+	+	+++	+++	$C = L^1 = L^2 >> \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	++	+	+++	+	+++	$L^1 > C > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	++	+	+++	+++	+++	$L^1 > C > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	+	+	++	+++	+++	$C = L^1 > L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	+	+++	+++	+++	$L^1 > C > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	++	+	+++	+++	+++	$L^1 > C = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	(-)	++	+++	+++	$L^1 >> C = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	++	+	++	+	+++	$L^2 = M > C = L^1 > \frac{S}{\text{no activo}}$

Tabla C	C [Ni acac ₂ bipi]	L ¹ bipi ₂	L ² acac ₂	M Ni Cl ₂ · H ₂ O	S CHCl ₃	
Streptococcus sanguis	+	++	+	+++	+++	$C = L^2 > L^1 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	++	++	++	+++	+++	$C = L^1 = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	++	++	++	+++	+++	$C = L^1 = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	+	++	++	+++	+++	$C > L^1 = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	+++	+++	+++	+++	$C > \frac{L^1 = L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	++	++	+	+++	+++	$L^2 > C = L^1 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	++	+++	+++	+++	$C = L^1 > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	++	++	++	+	+++	$M > C = L^1 = L^2 > \frac{S}{\text{no activo}}$

Tabla D	C [Ni acac ₂ fen]	L ¹ fen ₁	L ² acac ₂	M NiCl ₂ ·H ₂ O	S ¹ MeOH	S ² CHCl ₃	
Streptococcus sanguis	++	+	+	+++	+++	+++	$L^1 = L^2 > C > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	++	+	++	+++	+++	+++	$L^1 > C = L^2 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	++	+++	++	+++	++	+++	$C = L^2 > \frac{L^1 = M = S}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	+	+++	++	+++	+++	+++	$C > L^2 > \frac{L^1 = M = S}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	++	+++	+++	++	+++	$C = L^1 > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	++	++	+	+++	++	+++	$L^2 > C = L^1 > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	-	+++	+++	+++	+++	$L^2 \gg C > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	+	++	++	+	++	+++	$C = M > L^1 = L^2 > \frac{S}{\text{no activo}}$

Tabla E	C [Co ₂ ox bato ₂] 4	L ¹ bato ₂ ≈ fen ₂	L ² ox	M CoCl ₃ ·CH ₂ O	S ¹ MeOH	S ² CHCl ₃	
Streptococcus sanguis	+	+	++	+++	+++	+++	$C = L^1 > L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	++	+	++	+++	+++	+++	$L^1 > C = L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	+	+	++	+++	++	+++	$C = L^1 > L^2 = S^1 > \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	++	+	++	+++	+++	+++	$L^1 > C = L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	+	+++	+++	++	+++	$L^1 > C = S^1 > \frac{L^2 = M = S^2}{\text{no activos}}$
Sigella dysenteriae	++	+	+	+++	++	+++	$L^1 = L^2 > C = S^1 > \frac{M = S^2}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	-	++	+++	+++	+++	$L^1 \gg C = L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	+	+	++	+++	+++	+++	$C = L^1 > L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$

Tabla F	C [Cogli ₂ fen]	L ¹ fen ₁	L ² gli ₂	M CoCl ₂ · H ₂ O	S MeOH	
Streptococcus sanguis	-	+	+	+++	+++	$C > L^1 = L^2 > > \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	-	+	+++	+++	+++	$C > L^1 >> L^2 = \frac{M = S}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	-	+++	+++	+++	+++	$C >>> \frac{L^1 = L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Escherichia coli	+	+++	+++	+++	+++	$C >> \frac{L^1 = L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	-	++	+++	+++	++	$C >> L^1 = S \frac{L^2 = M}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	-	++	++	+++	++	$C >> L^1 = L^2 = S > \frac{M}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	+	-	+++	+++	+++	$L^1 > C >> \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	-	++	+++	+++	+++	$C >> L^1 > \frac{L^2 = M = S}{\text{no activos}}$

Tabla G	C [Co acac fen]	L ¹ fen ₁	L ² acac ₂	M CoCl ₂ ·H ₂ O	S ¹ CHCl ₃	S ² Me OH	
Streptococcus sanguis	(-)	+	+	+++	+++	+++	$C > L^1 = L^2 \gg \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Staphylococcus aureus	+	+	++	+++	+++	+++	$C = L^1 > L^2 > \frac{M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Bacillus subtilis	+	+++	++	+++	+++	++	$C > L^2 = S^2 > \frac{M = S^1 = L^1}{\text{no activos}}$
Echerichia coli	+	+++	++	+++	+++	+++	$C > L^2 > \frac{L^1 = M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Salmonella typhi	++	++	+++	+++	+++	++	$C = L^1 = S^2 > \frac{L^2 = M = S^1}{\text{no activos}}$
Shigella dysenteriae	+	++	+	+++	+++	++	$C = L^2 > L^1 = S^2 > \frac{M = S^1}{\text{no activos}}$
Cándida albicans	++	(-)	+++	+++	+++	+++	$L^1 \gg C > \frac{L^2 = M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$
Trichophyton tonsurans	+++	++	++	+++	+++	+++	$L^1 = L^2 > \frac{C = M = S^1 = S^2}{\text{no activos}}$

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

Se considera que los resultados en orden creciente de actividad están reportados como: +++, ++, +, (-) sobre los moos. de prueba .

Compuestos de Coordinación

Todos los compuestos son más activos que la sal metálica a excepción del NiCl_2 con el T. tonsurans; curiosamente para éste hongo tienen la misma actividad que el NiCl_2 los compuestos $[\text{Ni fen acac}_2]$, $[\text{Co ox bat}_2] \text{I}_2$, inhibiendo por completo su desarrollo el $[\text{Co fen gli}_2]$.

Ligantes

Los moos. Gram⁺ son en general más sensibles que los Gram⁻ ; siendo el moo. más resistente C. albicans, coincidiendo éstos resultados con lo anteriormente reportado.

La mayor concentración de fenantrolina probada, correspondiente a 3 moles de fenantrolina por mol de compuesto: fen_3 , inhibe por completo el crecimiento de los moos. de prueba, mientras que bipi_3 solo permite un desarrollo escaso, inhibiendo completamente el crecimiento de B. subtilis. fen_2 , permite el desarrollo escaso, mientras que bipi_2 lo permite moderado a excepción de B. subtilis nueva-

mente, al cual le permite solo un crecimiento escaso, al igual que fen_2 . Y en tendencias generales, fen es más activo contra los moos. que bipi.

En general gli no es activa, excepto para S. sanguis y S. dysenteriae, lo cual es consistente con su característica de nutriente, ya que ninguno de los moos. distingue el cambio de concentraciones, lo que sugiere que la mayor actividad encontrada para esos moos. es debido a razones particulares de su metabolismo.

Los moos. prueba, tampoco distinguen entre diferentes concentraciones de acac, obteniéndose una ligera inhibición (crecimiento escaso) para S. sanguis y S. dysenteriae y crecimiento abundante para S. typhi y T. tonsurans.

Para oxalato se probó solo la proporción para una mol por mol de compuesto, porque fue la concentración presente en cada uno de los compuestos probados, encontrándose una pequeña disminución de crecimiento (crecimiento moderado), excepto para S. dysenteriae (crecimiento escaso) y no inhibición del crecimiento para S. typhi.

Disolventes

Finalmente, se encontró que la influencia de los disolventes fue nula y relativamente pequeña para EtOH, MeOH, acetona en algunas ocasiones, y que por sí mismos no causan la inhibición total de desarrollo microbiano, empañando muy poco los efectos de los compuestos probados.

VII. CONCLUSIONES

La combinación (fen - gli) parece ser la más apropiada para la fórmula de un posible agente quimioterápico, por los resultados obtenidos de inhibición total, a excepción de E. coli y C. albicans, donde se encontró un crecimiento, aunque escaso.

Las ventajas de estos sistemas $M(O-N)_2(N-N)$, es que disminuyen la cantidad de fenantrolina, lo cual, además de ser un avance económico, constituye una disminución en el efecto citocida de este tipo de compuestos. Asimismo, la presencia de aas. enlazados al metal, producen un cambio radical en su actividad de nutriente (gli) a bacteriostático poderoso. Lo interesante de esta nueva fórmula es el hecho de que los compuestos de iones metálicos divalentes resultantes son neutros, reduciendo así las posibilidades de una actividad curariforme y anticolinesterasa, que se atribuye en parte a una distribución de carga catiónica en el complejo (12), y que ha sido la limitante para su administración sistémica.

Para este trabajo no se sintetizaron los compuestos análogos con fenantrolinas sustituidas por problemas económicos y porque ya es conocido el efecto de éstos grupos sustituidos. Además, muy probablemente éste efecto podría haber enmascarado la actividad de los otros ligantes presentes.

Este es el inicio de un estudio a nivel farmacológico de la serie de compuestos sintetizados previamente (20, 21, 22, 23, 24, 25), por lo que estas conclusiones están limitadas al tipo de compuestos probados hasta la fecha.

Por último, estos resultados apoyan una de las hipótesis principales de este proyecto de obtención de nuevos quimioterápicos con centro metálico, que consiste en la introducción de aas., en los compuestos activos, y aunque no se han realizado todavía estudios pertinentes para proponer un mecanismo de acción, es posible plantear a este nivel que la presencia del aa. confunde al moo. el cual asimila al compuesto nocivo más fácilmente.

VII. BIBLIOGRAFIA

Referencias Bibliográficas

1. García del Valle A, Hernández CL, : Formación de una Colección Regional de moos. de Vías respiratorias superiores. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1980).
2. Dwyer FP, Mellor DP, : Quelating Agents and Metal Quelates. Academic Press Ed, New York (1964), Chap 9.
3. The Pharmacopeia of the United States of America, 18th revision, Easton, Mack Publishing Co (1978), pg 867-82.
4. Aburto FL, Roldan TI, : Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Diversos Productos Naturales. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1980).
5. Goldstein A, Aronow L, Kalman S, : Principles of Drug Action. John Wiley and Sons Ed, New York (1974), Chapter 1, 8, 13.
6. Shubert J, : Quelation in Medicine. J Sci Amer, 1966, 24, [5] , 40-50.
7. Ochiai EI, : Environmental Bioinorganic Chemistry. J Chem Ed, 1974, 51,[4], 235-8
8. Dwyer FP, Mayhew E, Roe EM F, Shulman A, : Inhibition of Landschutz Ascites Tumour Growth by Metal Chelates Derived from 3,4,7,8 - tetramethyl - 1,10 - phenanthroline. A Br J Cancer, 1965, 19, 195-9.
9. Dwyer FP, Reid IK, Shulman A, Laycock G M, Dixson S, : The Biological Actions of 1,10-phenanthroline and 2,2' - bipyridine Hydrochlorides, Quaternary Salts and Metal Chelates and Related Compounds. Aust J of exptl biol med sci, 1969, 47, 203-18.
10. White DO, Harris A W, : Actions of Metals Chelates of Substituted 1,10 - phenantrolines on Viruses and Cells I. Aust J of exptl biol med sci, 1963, 41,[5], 517-26.
11. White DO, Harris A W, Shulman A, : Actions of Metal Chelates of Substituted 1,10 - phenantrolines on Viruses and Cells II. Aust J of exptl biol med sci, 1963, 41,[5], 527-37.

12. Koch J H, Rogers W P, Dwyer F P, Gyarfas E C, : The Metabolic Fate of Tris - 1,10 - phenanthroline ¹⁰⁶ Ruthenium (II) Perchlorate, A Compound with Anticholinesterase and Curare - like Activity. Aust of exptl med sci, 1957, 10, 342-50.
13. White D O, Harris A W, Cheyne I M, Shew M, : Actions of Metal Chelates of Substituted 1,10 - phenantrolines on Viruses and Cells III. 1969, 47, 81-9.
14. Butler H M, Horse A, Thrusky E, Shulman A, : Bactericidal Action of Selected Phenantroline Chelates and Related Compounds. Aust J of exptl biol med sci, 1969, 47, 541-52.
15. Roos J T H, Williams D R, : Synthesis and Evaluation of Several Compounds with Potencial Antiviral Activity. J inorg nucl chem, 1977, 39, 1294-7.
16. Shulman A, White D O, : Virostatic Activity of 1,10 - phenantroline Transition Metal Chelates: A Structure - Activity Analysis. Chem biol interactions, 1973, 6, 407-13.
17. Williams D R, : The Metals of Life. Ed Van Nostrand Reinhold Co. London, England (1971), Chap. 3.
18. Lippard S J, : Interaction of Pt-Drugs with DNA and RNA and Polymetallic Centers in Living Systems. Amer Chem Soc, 1978, 11, 211-6.
19. Giraldi T, Sava G, Bertoli G, Mestroni G, Zassinowich B, : Antitumor Action of Two Rhodium and Ruthenium Complexes in Comparison with cis - Diamminedichloroplatinum (II) Cancer Research, 1977, 37, 2662 - 6.
20. Escalante T S, : Síntesis y Caracterización de Nuevos Compuestos de Mn (II). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (1979).
21. Díaz D, : Nuevos Complejos de Co (II) y Co (III) con Ligantes Quelatos Mixtos del Tipo (O-N), (O-O) y (N-N)". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1980).
22. Moreno E R, : Síntesis y Caracterización de Nuevos Compuestos de Níquel. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (1978).

23. Martín P J J, : Síntesis y Caracterización de Compuestos de Coordinación de Cobre (II), Conteniendo Ligantes Donadores de Nitrógeno y Oxígeno. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (1977).
24. Marmolejo R G, : Nuevos Compuestos de Hierro. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (1979).
25. Izquierdo M G, : Síntesis y Caracterización de Nuevos Compuestos de Coordinación de Hierro (III) Conteniendo Quelatos Donadores de Nitrógeno. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, (1976).
26. Feeney R E, Petersen I M, Sahinkaya H, : Actions of Metal Chelates on Bacterias of the Rumen. J Bacterial 1957, 73, 284-6.
27. Davis B D, Dulbecco R, Eisin H, Ginsberg H, Barry-Wood W, Maclyn M, : Tratado de Microbiología. Ed Salvat, Segunda Edición, España, (1979).
28. Glasby J S, : Enciclopedia of Antibiotics. John Wiley and Sons Ed, London (1976).
29. Gale E F, Cundliffe E, Reynolds P E, Richamond M H, Waring M J, : The Molecular Basis of Antibiotics Action. John Wiley and Sons Ed, London (1972).
30. Garrod L P, Lambert H P, O'Gradi F, Waterworth P M, : Antibiotics and Chemotherapy. Churchill Livingstone Ed, 4th Edition, London (1973).
31. Goodman L S, Gilman A, : The Pharmacological Basis of Therapeutics. McMillan Publishing Co Inc, 5th Edition, New York, (1975), Sections IV, XIV.
32. Dwyer F P, Wright R D, Gyarfas E C, Shulman A, : Effect of Inorganic Complex Ions on Transmission at a Neuromuscular Junction. Nature, 1957, 179, 425-6.