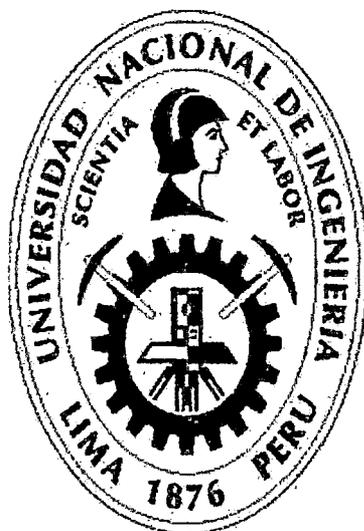


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



Tesis para optar el título de Licenciado en Química
Titulada:

“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL
Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA
METALOCOLORQUINA AgCQNO_3 ”

Presentada por
LARRY DANILO AGUIRRE MENDEZ

Asesora:
Dra. Ana C. Valderrama Negrón

LIMA – PERÚ

2014

Digitalizado por:

Consortio Digital del
Conocimiento MebLatam,
Hemisferio y Dalse

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación ha sido posible a una gran cantidad de personas que de alguna u otra forma han ayudado a completarla del mejor modo posible, por lo que es necesario agradecer su desinteresada colaboración.

El trabajo se origina junto al novel Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) fundado y dirigido por la Dra. Ana Valderrama Negrón, asesora de esta tesis de licenciatura, a quien agradezco enormemente haberme acogido y brindado su confianza y apoyo en este largo camino en que se convirtió la realización de la tesis. Así mismo he de agradecer a los profesores de la escuela profesional de Química por sus enseñanzas, que aunque pocas se plasman en este documento; a la gente que laboró y labora en los Laboratorios de Química No 12 y 33 de la Facultad de Ciencias por brindarme el acceso a los materiales, reactivos y equipos necesarios para el trabajo; y a los amigos que me acompañaron durante los 5 años que duró los estudios de pregrado en la UNI.

He de agradecer también, al Dr. Juan Z. Dávalos, director del Laboratorio de Resonancia Ciclotrónica de Iones del CSIC – España y a sus colaboradores del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia por su valiosa colaboración en la caracterización del compuesto AgCQNO_3 usando las más modernas técnicas de análisis químico, sin las cuales no hubiera sido posible la determinación estructural.

Finalmente, expreso mi agradecimiento a la Dra. Denise de Oliveira Silva por su colaboración con los análisis elemental e infrarrojo en la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo – Brasil, y la verificación de la conductividad iónica del compuesto AgCQNO_3 en su Laboratorio de Química Inorgánica Sintética e Estructural - Bioinorgánica e Metalofármacos del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo; asimismo agradezco al Dr. Julio Santiago Contreras por su cooperación para la realización de los ensayos de actividad biológica de los compuestos trabajados en los laboratorios de biología del IPEN.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| CAPITULO I: INTRODUCCIÓN | 2 |
| OBJETIVOS | 4 |
| 1.1 Objetivo general | 4 |
| 1.2 Objetivos específicos | 4 |
| JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO | 5 |
| CAPÍTULO II: ANTECEDENTES | 6 |
| 2.1 LOS METALES EN MEDICINA | 6 |
| 2.2 FÁRMACOS Y “METALOFÁRMACOS” | 9 |
| 2.3 FÁRMACOS QUINOLÍNICOS COMO ANTIMALÁRICOS..... | 11 |
| 2.4. LA CLOROQUINA..... | 12 |
| 2.5 LAS METALOCOROQUINAS | 13 |
| 2.6 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE LA CLOROQUINA Y SUS COMPLEJOS METÁLICOS | 15 |
| 2.6.1 Malaria y antimaláricos de cloroquina..... | 15 |
| 2.6.2 Artritis reumatoide y antiartríticos tipo cloroquina..... | 21 |
| 2.6.3 Cáncer y anticancerígenos de cloroquina..... | 22 |
| 2.6.4 VIH-1/SIDA y antivirales de cloroquina..... | 24 |
| 2.6.5 Enfermedades dermatológicas y su tratamiento con compuestos tipo cloroquina | 24 |
| 2.5 LA PLATA(I) | 26 |
| 2.5.1 La plata (Ag) como elemento del grupo 11 | 26 |
| 2.5.2 Propiedades atómicas y físicas | 28 |
| 2.5.3 Propiedades químicas..... | 28 |
| 2.5.4 Los iones acuosos | 29 |
| 2.6 QUÍMICA DE COORDINACIÓN DE LA Ag(I)..... | 31 |
| 2.6.1 Compuestos de coordinación con ligandos N-donadores | 34 |
| 2.6.2 Compuestos de coordinación con aminoácidos, proteínas y péptidos..... | 36 |
| 2.7 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE LA PLATA Y SUS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN..... | 37 |
| 2.7.1 Tratamiento de enfermedades de origen microbiano | 38 |
| 2.7.2 Tratamiento de cáncer y VIH-1 con compuestos de plata..... | 41 |

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL | 44 |
| 3.1 OBTENCIÓN DE CLOROQUINA BASE (CQ) A PARTIR DE SU SAL DIFOSFATO DE CLOROQUINA | 45 |
| 3.2 SÍNTESIS DE LA METALOCOROQUINA AgCQNO_3 | 47 |
| 3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN | 48 |
| 3.3.1 Análisis elemental | 48 |
| 3.3.2 Espectroscopía ultravioleta..... | 49 |
| 3.3.3 Espectroscopía FTIR | 49 |
| 3.3.4 Espectroscopía CP/MAS RMN | 49 |
| 3.3.5 Ensayos de conductividad en solución..... | 51 |
| 3.3.6 Espectrometría de masas ESI/FT-ICR | 51 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES | 53 |
| 4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CLOROQUINA BASE OBTENIDA..... | 53 |
| 4.1.1 Análisis del espectro ultravioleta..... | 53 |
| 4.1.2 Análisis elemental (C, H y N)..... | 55 |
| 4.1.3 Análisis de los espectros FTIR | 56 |
| 4.1.4 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{13}C | 59 |
| 4.1.5 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{15}N | 61 |
| 4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LA METALOCOROQUINA AgCQNO_3 | 62 |
| 4.2.1 Análisis elemental (C, H, N y Ag)..... | 62 |
| 4.2.2 Análisis de los espectros FTIR | 64 |
| 4.2.3 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{13}C | 77 |
| 4.2.4 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{15}N | 79 |
| 4.2.5 Análisis de la conductividad en DMSO | 81 |
| 4.2.6 Análisis de los espectros ESI/FT-ICR..... | 81 |
| Fragmentación por IRMPD (Disociación Multifotónica Infrarroja) de la especie compleja CQAgCQ^+ ($m/z = 747.3$)..... | 85 |
| CAPÍTULO V: ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 90 |
| 5.1 REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS (ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN EN AGAR) | 90 |
| 5.2 MATERIAL BIOLÓGICO | 91 |
| 5.3 EQUIPOS..... | 91 |
| 5.4 MEDIOS DE CULTIVO | 91 |
| 5.5 PROCEDIMIENTO..... | 92 |
| 5.5.1 Preparación del medio de cultivo..... | 92 |
| 5.5.2 Preparación de las muestras | 92 |

| | |
|---|-----|
| 5.5.3 Preparación de los inóculos | 92 |
| 5.5.4 Realización de la prueba de actividad antimicrobiana..... | 92 |
| 5.5.5 Lectura de placas..... | 93 |
| 5.6 RESULTADOS Y DISCUSIONES | 93 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES..... | 99 |
| ANEXOS | 101 |
| A1. NOTACIÓN Y ENUMERADO DE ÁTOMOS USADOS PARA LA CQ | 101 |
| A2. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES | 101 |
| Análisis elemental de C, H, N | 101 |
| Espectroscopía molecular (Ultravioleta-Visible e Infrarrojo)..... | 102 |
| Espectroscopía RMN en estado sólido' | 104 |
| Espectrometría de masas FT-ICR | 109 |
| Ensayos de conductividad en solución | 111 |
| A3. REACTIVOS QUÍMICOS..... | 112 |
| A4. SOLUBILIDADES DE CLOROQUINA (CQ) Y DIFOSFATO DE CLOROQUINA (CQDP)..... | 113 |
| A5. ESPECTROS UV..... | 113 |
| A6. RESULTADOS DE RMN EN SOLUCIÓN | 115 |
| A7. OTROS ESPECTROS FT-ICR..... | 116 |
| A8 ANTIBIOGRAMAS..... | 117 |

LISTA DE FIGURAS, DIAGRAMAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Complejos anticancerígenos de platino..... | 8 |
| Figura 2. Áreas de la Química inorgánica medicinal..... | 9 |
| Figura 3. Moléculas quinolónicas con mayor actividad biológica aisladas del extracto de la quina..... | 11 |
| Figura 4. Compuestos aminoquinolíticos derivados de la quinina con excelente actividad antimalárica..... | 12 |
| Figura 5. Enantiómeros de la cloroquina: (<i>R</i>)-(-) cloroquina y (<i>S</i>)-(+ cloroquina..... | 13 |
| Figura 6. Estructura de la cloroquina y las metalocloroquinas reportadas..... | 14 |
| Figura 7. Estructura propuesta para los complejos: a) PdCl ₂ (CQ) ₂ , b) IrCl(COD)(CQ) y c) Ir ₂ Cl ₆ (CQ)·3H ₂ O..... | 15 |
| Figura 8. Proceso digestivo en eritrocitos infectados con parásitos de malaria y el mecanismo de acción de la CQ..... | 18 |
| Figura 9. Compuestos 4-aminoquinolinas usados en el tratamiento de la artritis reumatoide: la cloroquina y la hidroxicloroquina..... | 21 |
| Figura 10. Diagrama logC̄-pH para Ag (I) 10 ⁻² M..... | 30 |
| Figura 11. Estructuras poliméricas de (a) AgCN y (b) AgSCN..... | 30 |
| Figura 12. Estructuras cubano y de silla adoptado por complejos (R ₃ P)AgX..... | 32 |
| Figura 13. Orbitales híbridos, ψ ₁ y ψ ₂ , formados de un orbital d _{z²} y un s, y los híbridos formados de los orbitales ψ ₂ y p _z | 33 |
| Figura 14. Representación esquemática de los números de coordinación y geometrías que adopta la plata(I) en sus complejos..... | 34 |
| Figura 15. Estructura polimérica del complejo [Ag(en)]ClO ₄ | 35 |
| Figura 16. Estructura de los complejos nitrato de tris(1-fenil-3,5-dimetilpirazol) plata(I) y perclorato de bis(imidazol) plata(I) tipo cluster..... | 35 |
| Figura 17. Acción antimicrobiana de la plata (Ag ⁺) ilustrando tres vías principales..... | 40 |
| Figura 18. Complejos de plata(I) con actividad antitumoral..... | 42 |
| Diagrama 1. Método de obtención de cloroquina base (CQ)..... | 46 |
| Diagrama 2. Método de síntesis del compuesto AgCQNO ₃ en acetonitrilo..... | 48 |
| Figura 19. Espectros UV de CQDP̄ y CQ̄ 10 ⁻⁴ M en HCl 0.01 N..... | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Formas resonantes causantes del efecto batocrómico en el espectro electrónico de la CQ. | 54 |
| Figura 21. Estructuras de la CQ base (neutra) y el CQDP (protonado). | 56 |
| Figura 22. Espectro Infrarrojo de la cloroquina base obtenida (CQ) en pastillas de KBr. | 57 |
| Figura 23. Espectro Infrarrojo de la sal difosfato de cloroquina (CQDP) en pastillas de KBr. | 58 |
| Figura 24. Espectros CP/MAS RMN de ^{13}C de la CQ base. | 59 |
| Figura 25. Espectro CP/MAS RMN de ^{15}N de CQ base. | 61 |
| Figura 26. Estructuras probables para la metalocloroquina AgCQNO_3 | 63 |
| Figura 27. Espectro Infrarrojo del complejo AgCQNO_3 en pastillas de KBr. | 65 |
| Figura 28. Fragmento ampliado en la región $3400 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 66 |
| Figura 29. Enlaces puentes de hidrógeno en la molécula de CQ. | 67 |
| Figura 30. Posición de las bandas de nitratos en el espectro infrarrojo. | 69 |
| Figura 31. Fragmento ampliado en la región $2430 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ del espectro Infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 70 |
| Figura 32. Bandas de combinación típicas de complejos con nitratos. | 71 |
| Figura 33. Fragmento ampliado en la región $1800 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro Infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 72 |
| Figura 34. Fragmento ampliado en la región $1650 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 73 |
| Figura 35. Fragmento ampliado en la región $1400 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 74 |
| Figura 36. Fragmento ampliado en la región $1200 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 75 |
| Figura 37. Fragmento ampliado en la región $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 76 |
| Figura 38. Fragmento ampliado en la región $500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 76 |
| Figura 39. Espectros CP/MAS RMN de ^{13}C del complejo AgCQNO_3 | 78 |
| Figura 40. Resumen de los $\delta(^{13}\text{C})$ del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 78 |
| Figura 41. Espectro CP/MAS RMN de ^{15}N del complejo AgCQNO_3 | 80 |
| Figura 42. Resumen de los $\delta(^{15}\text{N})$ del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 | 80 |

| | |
|---|-----|
| Figura 43. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ en DMSO (100 µg/mL)..... | 82 |
| Figura 44. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ en DMSO (100 µg/mL) para m/z > 700 Da..... | 83 |
| Figura 45. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ en DMSO:agua (4:96, 100µg/mL). | 83 |
| Figura 46. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ , en DMSO:ACN (4:96, 100 µg/mL). | 84 |
| Figura 47. Espectro de masas de la especie CQAgCQ ⁺ fragmentada por IRMPD. | 85 |
| Figura 48. Compuestos usados por Dávalos y col. como modelos teóricos para el cálculo de las afinidades protónicas (M = H) y Ag ⁺ -catiónicas (M = Ag) de los nitrógenos en la CQ. ... | 86 |
| Figura 49. Secuencia de descomposición del dímero Ag ₂ CQ ₂ ²⁺ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag ⁺ -N en la CQ. | 87 |
| Figura 50. Secuencia de descomposición del polímero cat-ht [AgCQ] _{2n} ²ⁿ⁺ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag ⁺ -N en la CQ. | 88 |
| Figura 51. Secuencia de descomposición del polímero cat-hh [AgCQ] _{2n} ²ⁿ⁺ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag ⁺ -N en la CQ. | 88 |
| Figura 52. Estructura propuesta para el complejo AgCQNO ₃ | 89 |
| Figura 53. Antibiograma de <i>Escherichiacoli</i> efectuado por método de Kirby-Bauer | 91 |
| Figura 54. Gráficas comparativas de la capacidad inhibitoria de los compuestos AgCQNO ₃ , CQ, CQDP y AgNO ₃ sobre cepas gram negativas (<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>) y gram positivas (<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>). | 94 |
| Figura 55. Comparación de la pared celular de las bacterias (A) gram positivas y (B) gram negativas. | 97 |
| Figura A1. Estructura de la cloroquina (CQ) = 7-Cloro-4-(4'-dietilamino-1'-metilbutilamino) quinolina..... | 101 |
| Figura A2. Principio de operación de un analizador elemental | 102 |
| Figura A3. Estados electrónicos (E), vibracionales (V) y rotacionales (R) de una molécula poliatómica..... | 103 |
| Figura A4. Esquema de un instrumento de FT-RMN. | 104 |
| Figura A5. Representación esquemática de la disposición experimental para el giro de la muestra en el análisis por RMN en estado sólido | 106 |
| Figura A6. Espectro MAS RMN de ¹³ C (125MHz) de glicina en polvo uniformemente marcada con ¹³ C (10%) a diferentes velocidades de rotación..... | 107 |
| Figura A7. Explicación del fenómeno de Polarización cruzada (CP) en RMN. | 108 |

| | |
|---|-----|
| Figura A8. Transportador óptico de iones y estadios de bombeo diferencial para adaptar una fuente ESI a un instrumento FT-ICR..... | 109 |
| Figura A9. Representación esquemática del proceso de excitación y detección en una celda ICR..... | 110 |
| Figura A10. Espectro UV de un patrón de fosfato de cloroquina (CQDP) a 10^{-4} M en medio HCl 0.01N..... | 113 |
| Figura A11. Espectro UV de la cloroquina base obtenida (CQ) a 10^{-4} M en medio HCl 0.01N..... | 114 |
| Figura A12. Espectros UV superpuestos de la CQ base obtenida y del patrón CQDP a 10^{-4} M en medio HCl 0.01N..... | 114 |
| Figura A13. Resumen de asignaciones de los $\delta(^1\text{H})$, $\delta(^{13}\text{C})$ y $\delta(^{15}\text{N})$ para la CQ en DMSO- d_6 | 115 |
| Figura A14. Resumen de asignaciones de los $\delta(^1\text{H})$, $\delta(^{13}\text{C})$ y $\delta(^{15}\text{N})$ para el complejo AgCQNO ₃ en DMSO- d_6 | 115 |
| Figura A15. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ en DMSO (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)..... | 116 |
| Figura A16. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO ₃ en DMSO (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)..... | 116 |
| Figura A17. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO ₃ , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO ₃ a 20mg/mL sobre <i>Staphylococcus aureus</i> | 117 |
| Figura A18. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO ₃ , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO ₃ a 20mg/mL sobre <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| Figura A19. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO ₃ , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO ₃ a 20mg/mL sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 118 |
| Figura A20. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO ₃ , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO ₃ a 20mg/mL sobre <i>Bacillus subtilis</i> | 118 |
| | |
| Tabla 1. Casos de Malaria por especies y por años reportados en el Perú desde el 2008. . | 16 |
| Tabla 2. Energías de ionización (kJmol^{-1}) de los metales del grupo 11..... | 28 |
| Tabla 3. Energía de separación (eV) entre los estados de transición para los elementos del grupo 11..... | 32 |
| Tabla 4. Máximas absorbancias de CQDP y CQ 10^{-4} M en HCl 0.01N, y el porcentaje de pureza aprox. de CQ obtenida..... | 55 |
| Tabla 5. Contenido de C, H, N calculado y experimental en dos muestras de CQ obtenidas..... | 55 |
| Tabla 6. Identificación de grupos funcionales de CQ y CQDP..... | 56 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 7. Asignaciones de $\delta(^{13}\text{C})$ en solución y en estado sólido de la CQ..... | 60 |
| Tabla 8. Asignaciones de $\delta(^{15}\text{N})$ en solución y en estado sólido de la CQ. | 62 |
| Tabla 9. Contenido de C, H, N y Ag calculado y experimental de dos muestras del complejo AgCQNO_3 | 62 |
| Tabla 10. Identificación de grupos funcionales en el compuesto AgCQNO_3 y su comparación con el ligando libre CQ..... | 64 |
| Tabla 11. Tipos de coordinación del ion nitrato en sus complejos. | 68 |
| Tabla 12. Frecuencias de absorción y asignaciones para el ion nitrato (D_{3h}). | 68 |
| Tabla 13. Frecuencias de absorción y asignaciones para el ion nitrato (C_{2v}). | 69 |
| Tabla 14. Asignaciones de los $\delta(^{13}\text{C})$ en estado sólido del complejo AgCQNO_3 , y su variación respecto al ligando CQ: $\Delta\delta = \delta(\text{CQ}) - \delta(\text{AgCQNO}_3)$ | 79 |
| Tabla 15. Asignaciones de los $\delta(^{15}\text{N})$ en estado sólido del complejo AgCQNO_3 , y su variación respecto al ligando CQ: $\Delta\delta = \delta(\text{CQ}) - \delta(\text{AgCQNO}_3)$ | 81 |
| Tabla 16. Afinidades protónica y Ag-catiónica de la CQ en fase gaseosa. | 87 |
| Tabla 17. Medida (en mm) del diámetro de los halos de inhibición del complejo AgCQNO_3 y los compuestos implicados en su síntesis. | 93 |
| Tabla A1. Resumen de las principales interacciones en RMN en estado sólido | 105 |
| Tabla A2. Intervalos de conductancias molares (Λ_M) esperados para electrolitos de 2, 3, 4 y 5 iones ($\sim 10^{-3}$ M) en solventes comunes a 25°C | 111 |
| Tabla A3. Solubilidades de CQ y CQDP a 20°C | 113 |

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis de un nuevo complejo de plata(I) por la reacción directa de su ión metálico con el fármaco cloroquina, esto es una "metalocloroquina", su caracterización mediante análisis elemental, espectroscopía infrarroja (FT-IR), resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^{15}N en estado sólido (CP/MAS RMN), espectrometría de masas de alta resolución (FT-ICR), y conductividad iónica en DMSO.

La estequiometría encontrada por análisis elemental corresponde a la forma AgCQNO_3 , que supone la posibilidad de un dímero o un polímero. Los estudios por las técnicas espectroscópicas y la conductividad en DMSO favorecen la formación de un polímero con iones nitrato fuera de la esfera de coordinación. Los resultados obtenidos por FT-IR y CP/MAS RMN muestran la coordinación de los iones Ag(I) a través de los nitrógenos quinolínico N_1 y trialquilamínico N_4 , mientras que los estudios por FT-ICR muestran la formación de especies CQAgCQ^+ durante la fragmentación, lo que favorece una estructura polimérica de tipo cabeza-cabeza.

Los ensayos de actividad biológica contra bacterias gram positivas y gram negativas muestran que la bioactividad de las sales de plata(I) se conserva en el complejo AgCQNO_3 bajo las condiciones de estudio, y que su mecanismo de acción antimicrobial sería semejante al de muchos compuestos antimicrobiales de plata, donde el complejo actúa como liberador de iones bioactivos de Ag(I) .

CAPITULO I:

INTRODUCCIÓN

La Química inorgánica medicinal es una rama relativamente joven de la Química bioinorgánica, pero con un crecimiento exponencial debido a éxitos espectaculares como el cisplatín para el tratamiento de cáncer testicular, complejos de gadolinio en imágenes de resonancia magnética (MRI), y el aumento de la medicina nuclear para terapia y diagnóstico. Se encuentra en la interface de la medicina y la química inorgánica, e incluye medicamentos metalados, agentes quelantes, agentes de diagnóstico conteniendo metales, y suplementos minerales de elementos esenciales.¹ En este contexto el desarrollo de metalofármacos está direccionado a potenciar la actividad de un fármaco de actividad conocida con la finalidad de mejorar su capacidad para el tratamiento de enfermedades. Así los metalofármacos de cloroquina (CQ) resultan más eficaces que el fármaco libre en el tratamiento de malaria y varios tumores cancerosos.

La propuesta del presente trabajo gira en torno a la síntesis de metalocloroquinas con centros metálicos de plata(I) todavía desconocidas en la literatura científica. El trabajo experimental se llevó a cabo entre los años 2010 – 2012, financiado con los fondos del Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), y se realizó en tres etapas: i) obtención de cloroquina base a partir de su sal difostato y su caracterización con técnicas espectroscópicas (UV, FTIR, RMN), ii) síntesis del complejo AgCQNO_3 y elucidación de su estructura usando técnicas espectroscópicas convencionales y no convencionales (CP/MAS RMN y FT-ICR), y iii) estudios de actividad biológica del complejo AgCQNO_3 frente a bacterias gram positivas y gram negativas.

Este documento, además de los capítulos relacionados al trabajo experimental y la discusión de los resultados encontrados, incluye un capítulo de antecedentes con una excelente revisión bibliográfica sobre el fármaco cloroquina, los compuestos de plata y sus potenciales aplicaciones medicinales frente a distintas enfermedades modernas.

Si bien el resultado más importante ha sido el descubrimiento de la estructura polimérica del complejo AgCQNO_3 y su mecanismo de descomposición en solución, acelerado por la presencia de agua, los estudios de actividad biológica revelan que dicho compuesto actúa como un complejo liberador de especies bioactivas de plata(I)-cloroquina que serían las responsables de su actividad biológica.

Cabe resaltar, además, que los estudios de la estructura molecular del complejo AgCQNO_3 , inédito hasta la realización de este trabajo, conllevaron a la publicación del artículo titulado "A silver complex of chloroquine: Synthesis, characterization and structural properties" en la revista *New Journal of Chemistry* editado por *The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique* 2013.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Síntesis y caracterización de la metalocloroquina AgCQNO_3 , y estudios de su actividad biológica.

1.2 Objetivos específicos

- Obtención de cloroquina base (CQ) a partir de difosfato de cloroquina (CQDP).
- Síntesis del compuesto AgCQNO_3 por reacción directa de AgNO_3 con el ligando base CQ.
- Caracterización y determinación de la estructura del producto de síntesis por análisis elemental, espectroscopía infrarroja FTIR, RMN ^{13}C y ^{15}N en estado sólido (CP/MAS-RMN), espectrometría de masas FT-ICR y conductividad en DMSO.
- Determinación y comparación de la actividad biológica de las sustancias de partida (cloroquina y nitrato de plata) versus el nuevo compuesto AgCQNO_3 frente a bacterias gram positivas y gram negativas.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Un fármaco ideal debe de ser: hidrosoluble, estable en el torrente sanguíneo y fácilmente integrado por las células; no debe ser: tóxico, carcinogénico, alergénico, mutagénico o teratogénico.^a Y aunque los fármacos puramente orgánicos (o sus sales) pueden llegar a tener las primeras características muchas veces presentan también las últimas, conocidos comúnmente como "efectos secundarios" haciendo que el fármaco a veces pueda llegar a ser más tóxico que la misma enfermedad que combate si no se aplica en bajas dosis. La cloroquina ha sido uno de los fármacos más potentes contra la malaria y su uso se ha extendido al tratamiento de otras enfermedades de origen bacteriano, viral y autoinmune; sin embargo, resulta tóxica en dosis relativamente elevadas ocasionando daño ocular, por lo que se requiere del desarrollo de sus compuestos derivados con menores efectos secundarios, y/o mayor actividad biológica para disminuir su dosificación.

Desde años atrás, se ha ideado una estrategia para terapias alternativas más efectivas (o menos tóxicas) contra muchas enfermedades basada en la modificación de fármacos por la incorporación de un ion metálico en su estructura molecular. Para el caso específico de la cloroquina se ha propuesto la formación de complejos metálicos de cloroquina o "metalocloroquinas", con actividad antimalárica superior a la cloroquina incluyendo cepas cloroquina-resistentes. Otras metalocloroquinas, además, han presentado actividad contra enfermedades como el cáncer.

Como parte de la búsqueda por nuevos metalofármacos con actividad biológica potencializada, en este trabajo se presenta resultados alentadores de una nueva metalocloroquina con centros metálicos de Ag(I), de actividad biológica comprobada, posible por la presencia de grupos ligantes en la molécula de cloroquina y su afinidad por iones metálicos.

^a La exposición a sustancias tóxicas, carcinogénicas, alergénicas, mutagénicas o teratogénicas puede producir lesiones graves, cáncer, reacciones alérgicas, mutaciones genéticas o alteraciones estructurales, funcionales o metabólicas en el preonato, respectivamente.

CAPÍTULO II:

ANTECEDENTES

2.1 LOS METALES EN MEDICINA

En las últimas décadas los químicos inorgánicos han puesto su mirada en la medicina. Así su trabajo se ha centrado en el diseño de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico, al conocimiento de la influencia de los iones metálicos en el tratamiento con fármacos orgánicos y a la comprensión de los mecanismos por los que se producen ciertas enfermedades. Se configuró así una nueva área de la química denominada "Química Inorgánica Medicinal".^{2,3} Siendo aún más específico que la "Química Medicinal",⁴ se le puede definir como una disciplina donde se descubre, diseña, sintetiza e identifica compuestos inorgánicos con actividad biológica; se llevan a cabo estudios sobre su metabolismo, y la interpretación de su mecanismo de acción a nivel molecular para construir su relación de "estructura-actividad".

Como disciplina, la Química Inorgánica Medicinal sólo ha existido en los últimos 50 años, desde el descubrimiento de la actividad antitumoral del cisplatín, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]; sin embargo, el uso medicinal de los compuestos inorgánicos proviene de miles de años atrás.⁵ Así, el sulfato de cobre y los alumbres estaban entre las sustancias usadas por los egipcios antiguos para preparar pociones con efecto desinfectante. En Arabia y China, preparados de oro fueron usados en los años 2500 antes de nuestra era y, más recientemente, el mercurio se usó para tratar sífilis durante la epidemia europea del final del siglo XV y comienzos del siglo XVI. Las suspensiones acuosas de hojuelas de oro (*Goldschlager* o

Geldwasser) también fueron usadas en preparados medicinales, aunque no haya valor medicinal probado en la ingestión de oro metálico. La observación de Koch de la acción bactericida de cianuro de oro en 1890 ofreció una base más científica al uso de oro en farmacia. Una aplicación más exitosa se logró en los años 1930s cuando los compuestos de oro se usaron para tratar la artritis reumática.⁶ En 1909, se introdujo el compuesto de arsénico *Salvarsan* para tratar sífilis, seguido por el *Mapharsen*, y luego por compuestos de bismuto que se usaron en combinación con *Mapharsen*. Estos fármacos, en particular aquellos de arsénico, tenían efectos secundarios severos y sin duda esto contribuyó a la creencia que los metales son generalmente tóxicos y no adecuados para usarse en fármacos.⁶

En la segunda mitad del siglo XX, el platino y el tecnecio jugaron un papel importante despertando mucho mayor interés en el uso medicinal de los compuestos metálicos. En 1964, mientras Barnett Rosenberg investigaba el efecto de los campos eléctricos en el crecimiento de bacterias hizo el importante descubrimiento que algunos compuestos de platino podían inhibir la división celular de los *serendipitous*. Esta observación sirvió para que en 1978 el compuesto de platino "cisplatín" (conocido por más de 100 años) fuera aprobado por la Dirección de Alimentos y Medicinas Estadounidense (la FDA) para el tratamiento de cáncer ovárico y testicular. El descubrimiento del cisplatín estimuló la investigación en una variedad de compuestos metálicos con propiedades antitumorales y potencial para convertirse en anticancerígenos (figura 1).⁶

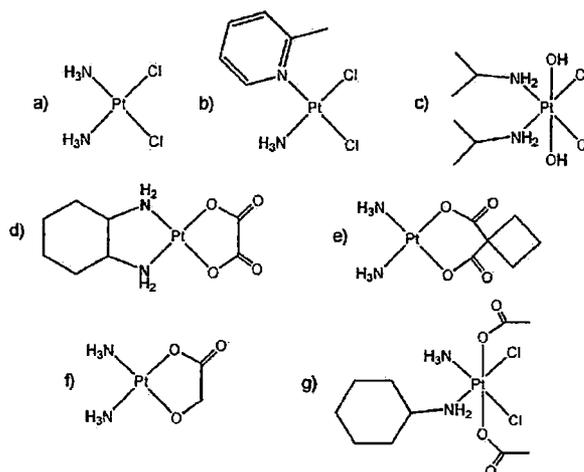


Figura 1. Complejos anticancerígenos de platino: a) cisplatín, b) ZD0437, c) iproplatín, d) oxaliplatín, e) carboplatín, f) nedaplatín y g) satraplatín.⁷

Por otro lado, el elemento radiactivo tecnecio, creado por el hombre en 1937, hizo una contribución importante a la medicina diagnóstica del siglo XX. Una clase en particular de tecnecio tiene propiedades nucleares que lo adecuan para su uso en medicina diagnóstica; emite rayos γ que, al originarse en una fuente dentro del cuerpo, atraviesan los tejidos y pueden ser detectados externamente. Esto permite crear una imagen de la distribución en la fuente de rayos γ dentro del cuerpo. Debido a su versatilidad química, el tecnecio se puede incorporar en compuestos químicos afines a órganos o tejidos específicos en el cuerpo haciéndolo todavía más útil en el diagnóstico de las enfermedades.⁶

El uso de elementos radiactivos como componentes farmacéuticos para medicina terapéutica ofrece un reto mayor que las aplicaciones en diagnóstico por imagen. Los compuestos de radio han sido usados para tratar tumores de diversas dolencias. En este contexto, Korngold y Pressman demostraron que anticuerpos impregnados con yodo radiactivo podían ser localizados en los tumores de ratas, mientras que Kohler y Milstein obtuvieron células híbridas que producen anticuerpos específicos para objetivos cancerosos fijos. Así, en 2002 el Zevalin (*Ibritumomab*) recibió la aprobación de la FDA para tratar tipos de linfoma no Hodgkin de células B. Este compuesto contiene un anticuerpo monoclonal marcado con Itrio radiactivo, cuyo uso marcó el inicio de la "radioinmunoterapia usando un

elemento metálico radiactivo".⁶ Parece que, para un tipo de enfermedad cuando menos, la "magic bullet" de Erlich hubiese llegado.^b

Además, de los avances en las áreas de investigación de la química inorgánica antes mencionadas se han obtenido logros valiosos en otras áreas como en el diseño de suplementos minerales más efectivos, la eliminación del cuerpo de elementos tóxicos y la inhibición de metaloenzimas con el uso de ligandos (figura 2).



Figura 2. Áreas de la Química inorgánica medicinal.⁵

2.2 FÁRMACOS Y "METALOFÁRMACOS"

Los fármacos pueden interactuar con una variedad de biomoléculas, lo que puede dar lugar a la inhibición de los procesos bioquímicos o biofísicos asociados con estas. Aunque la mayoría de fármacos no necesita iones metálicos para su actividad biológica, hay varias familias que requieren iones metálicos para funcionar correctamente. En algunos casos, los iones metálicos están perfectamente enlazados y son parte integral de su estructura y función. La eliminación de los iones metálicos, por tanto, da lugar a la desactivación y/o cambio en la estructura de estos fármacos. En otros casos, la unión de iones metálicos a las

^b Hace más de 100 años, Paul Ehrlich (1854-1915), planteó la idea de la "magic bullet", un pigmento cargado con un metal pesado, capaz destruir selectivamente a los agentes causantes de una enfermedad sin dañar los tejidos sanos del enfermo.

moléculas de los fármacos puede producir sustancias químicas con características bioquímicas diferentes pero con poca modificación estructural. Al igual que en el caso de las "metaloproteínas", estas nuevas familias son denominados "metaloantibióticos" ⁸ y "metalofármacos".⁹

La estructura y la actividad antimicrobial, antiviral, y/o anticancerígena de estos metalofármacos proporcionan una mayor comprensión de su relación estructura-actividad. Los iones metálicos juegan un papel importante en su acción y están implicados en interacciones específicas con proteínas, membranas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Por ejemplo, la unión de los metalofármacos Fe/Co-bleomicina, Fe/Cu-estreptoningrina, Mg-quinolona, Mg-quinobenzoxacina, Mg-ácido aurólico, y cisplatín con ADN atrofian la función del ADN o provocan su ruptura; la unión de las metalobacitracinas al undecaisopropenil pirofosfato evita el reciclado del pirofosfato a fosfato lo cual resulta en inhibición de la síntesis de pared celular; y el enlace de los iones metálicos a los ionóforos o sideróforos permite su transporte a través de la membrana celular ocasionando la alteración en el potencial de membrana.⁸

La síntesis de metalofármacos, es decir, la obtención de complejos metálicos donde fármacos de actividad biológica conocida actúan como ligandos, constituye un método fundamental para potencializar la actividad de un fármaco, ya sea mejorando el rendimiento de su transporte, estabilizándolo hasta alcanzar su blanco específico (foco bioquímico de la enfermedad) o alterando su mecanismo de acción debido la presencia del ión metálico con afinidad por biomoléculas originadas o modificadas por la enfermedad; lo que puede generar nuevas aplicaciones del metalofármaco sobre otras enfermedades no tratadas con el fármaco de partida. La presencia del ión metálico, por tanto, puede disminuir la dosis mínima requerida para el tratamiento de la enfermedad e incluso disminuir los efectos secundarios inherentes al tratamiento químico con el fármaco.

2.3 FÁRMACOS QUINOLÍNICOS COMO ANTIMALÁRICOS

Los alcaloides son una de las clases más importantes de productos naturales que han proporcionado medicamentos desde la antigüedad. El diseño y síntesis de nuevos fármacos usando alcaloides como prototipo ha sido muy importante en el desarrollo de la química medicinal. Muchos derivados de alcaloides quinolínicos actúan como agentes analgésicos potentes, hipertensores, amebicidas, virucidas, etc.¹⁰ Un caso muy importante involucra al famoso alcaloide quinina (figura 3-1), aislado de la corteza del árbol de la quina en 1820, que jugó un papel trascendental en el desarrollo de la química orgánica sintética y medicinal por más de 150 años. El extracto de la quina (o cinchona) era usado por los nativos americanos para combatir los escalofríos y la fiebre, y fue introducido en Europa como agente medicinal cuando la condesa de Cinchon fue tratada y curada de malaria en el año 1638.¹¹

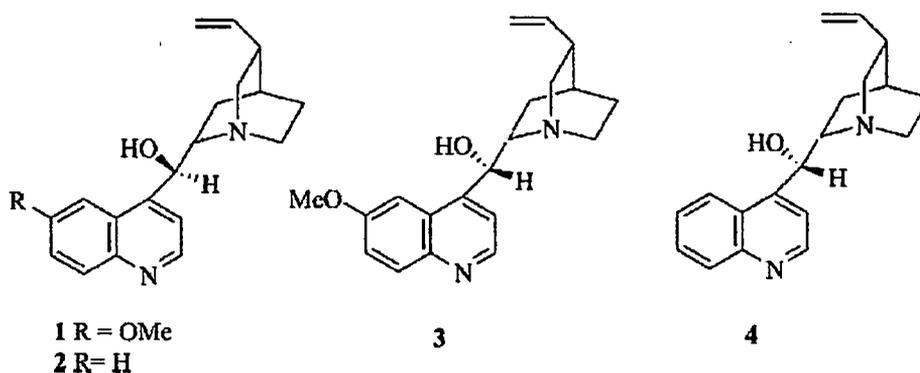


Figura 3. Moléculas quinolínicas con mayor actividad biológica aisladas del extracto de la quina: (1) quinina, (2) cinchonidina, (3) quinidina y (4) cinconina.¹⁰

Aunque la quinina presenta una potente actividad antimalárica, también ha mostrado severa toxicidad, razón por la cual se inició la búsqueda de nuevos fármacos, más efectivos y menos tóxicos, teniendo como base estructural el sistema quinolínicos original. Así se introdujeron los fármacos sintéticos 8-aminoquinolínicos como la primaquina y 4-aminoquinolínicos como la cloroquina (figura 4).

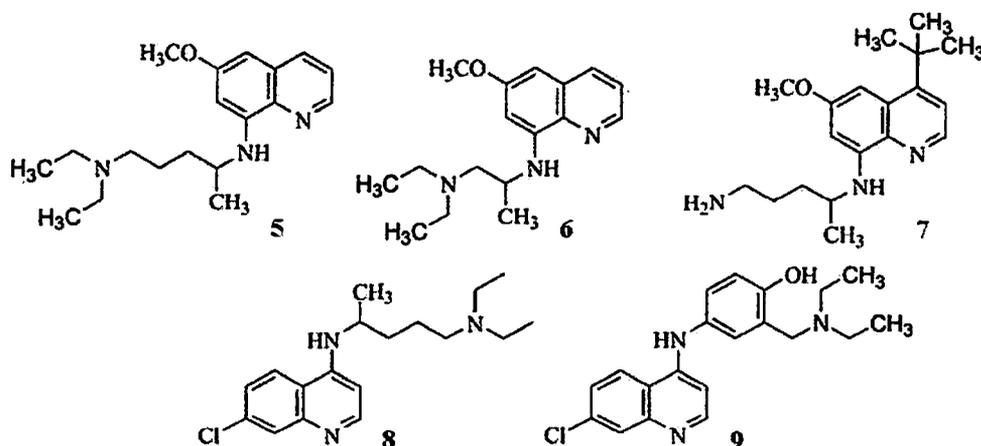


Figura 4. Compuestos aminoquinolíticos derivados de la quinina con excelente actividad antimalárica: (5) primaquina, (6) plasmoquina, (7) *t*-butilprimaquina, (8) cloroquina y (9) amodiaquina.¹⁰

2.4. LA CLOROQUINA

La Cloroquina (CQ = 4-aminoquinolina (*N'*-(7-cloroquinolina-4-il)-*N,N*-dietil-pentano-1,4-diamina) es una base diprótica débil ($pK_{a1}=8.1$; $pK_{a2}=10.2$) que puede existir en forma cargada (es decir protonada) o neutra (desprotonada). Debido a que la forma neutra es muy poco soluble en agua ($pH\sim 7$), en su uso clínico se administra en forma de sales (difosfato, sulfato o diclorhidrato) de la forma diprotonada. La forma desprotonada puede atravesar fácilmente la membrana celular y la de sus organelos; por el contrario la forma protonada es retenida en el interior de los organelos (por ejemplo, los lisosomas) donde el pH es menor.¹²

La cloroquina se sintetizó en 1934 en los laboratorios de Bayer en Alemania bajo el nombre de resoquina, y su uso farmacológico sólo se inició hasta 1946 por ser considerada, inicialmente, muy tóxica.¹³ Desde entonces, ha sido el antimalárico más importante y efectivo, de forma que en un esfuerzo por erradicar la malaria del planeta se utilizó desmesuradamente, llegando incluso a suministrarse a la población en la sal de cocina. Como resultado de ello a fines de 1950 se presentaron los primeros casos de cepas maláricas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina en las regiones de África, América del Sur y el Sureste Asiático donde se distribuyó la sal de cocina con cloroquina.¹⁴

Si bien, la cloroquina presenta 2 enantiómeros (figura 5), la relevancia clínica de cada forma aún es objeto de debate: resultados *in vitro* muestran una mayor actividad de la (*R*)-cloroquina sobre *P. falciparum*, pero las pruebas *in vivo* no muestran diferencia apreciable entre cada forma y tampoco en la mezcla racémica.¹⁵

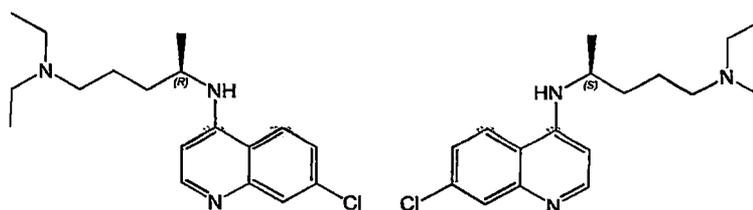


Figura 5. Enantiómeros de la cloroquina: (*R*)-(-) cloroquina (Izquierda) y (*S*)-(+) cloroquina (derecha).

Debido a su elevada actividad biológica, el uso de la cloroquina se ha extendido al tratamiento de otras enfermedades de origen bacteriano, viral y autoinmune, por lo que la búsqueda constante de nuevos fármacos análogos de la cloroquina se ha convertido en una tarea importante para los químicos medicinales.

2.5 LAS METALOCOROQUINAS.

La cloroquina presenta una riquísima química de coordinación marcada por la diferencia entre los grupos σ dadores (nitrógenos quinolínico N_1 , tipo anilina N_4 y trialkilamino N_4) y π dadores (aromaticidad quinolínica) presentes en su estructura química (figura 6). Dicha diferencia entre sus grupos ligantes ha hecho posible obtener complejos metálicos con iones de diferente naturaleza y en más de un estado de oxidación. Evidencia de esto es la amplia variedad de metalocloroquinas reportados en la literatura (figuras 6 y 7).

Los complejos metálicos de cloroquina reportados en la literatura, han comprobado las posibilidades de formación de enlaces Metal-cloroquina a través de los grupos antes mencionados. En los complejos $[\text{RhCl}(\text{COD})(\text{CQ})]$ (complejo 1, fig. 6),¹⁶ $[\text{Au}(\text{PR}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$ (complejos 7-10, fig. 6),¹⁷ $[\text{PdCl}_2(\text{CQ})_2]$ (complejo 18, fig. 7),¹⁸ $[\text{IrCl}(\text{COD})(\text{CQ})]$ (complejo 19,

fig. 7),¹⁹ $[\text{Cu}(\text{CQ})_2]\text{Cl}$, $[\text{Cu}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{NO}_3$, $[\text{Cu}(\text{OAc})_2(\text{CQ})]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Zn}(\text{CQ})(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]_2$ y $[\text{Zn}(\text{CQ})(\text{Cl}_2)(\text{H}_2\text{O})]_2$ ²⁰ se encontró que la coordinación al centro metálico ocurre únicamente a través del nitrógeno quinolínico N_1 ; mientras que en los complejos $[(\text{CQ})_2\text{Au}(\text{Cl})_2]\text{Cl}$ (complejo 11, fig. 6) y $[(\text{CQ})(\text{Et}_2\text{O})\text{Au}(\text{Cl})(\text{SR})]\text{Cl}$ (complejo 12, fig. 6)²¹ sólo ocurre a través del nitrógeno trialquilamínico N_4 . En el complejo $\text{Ir}_2\text{Cl}_6(\text{CQ}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (complejo 20, fig. 7)¹⁹ la CQ se une a los centros metálicos a través de los nitrógenos N_4 y N_4' ; mientras que en el complejo $[\text{RuCl}_2(\text{CQ})]_2$ (complejo 2, fig. 6)¹⁶ la coordinación ocurre a través de N_1 y N_4' formando un dímero. Para los complejos anteriores, las posibilidades de enlace CQ-centro metálico se determinaron haciendo uso de la espectroscopía de resonancia nuclear de Hidrógeno (^1H RMN) observando cambios en los desplazamientos químicos de los hidrógenos vecinos al átomo dador.

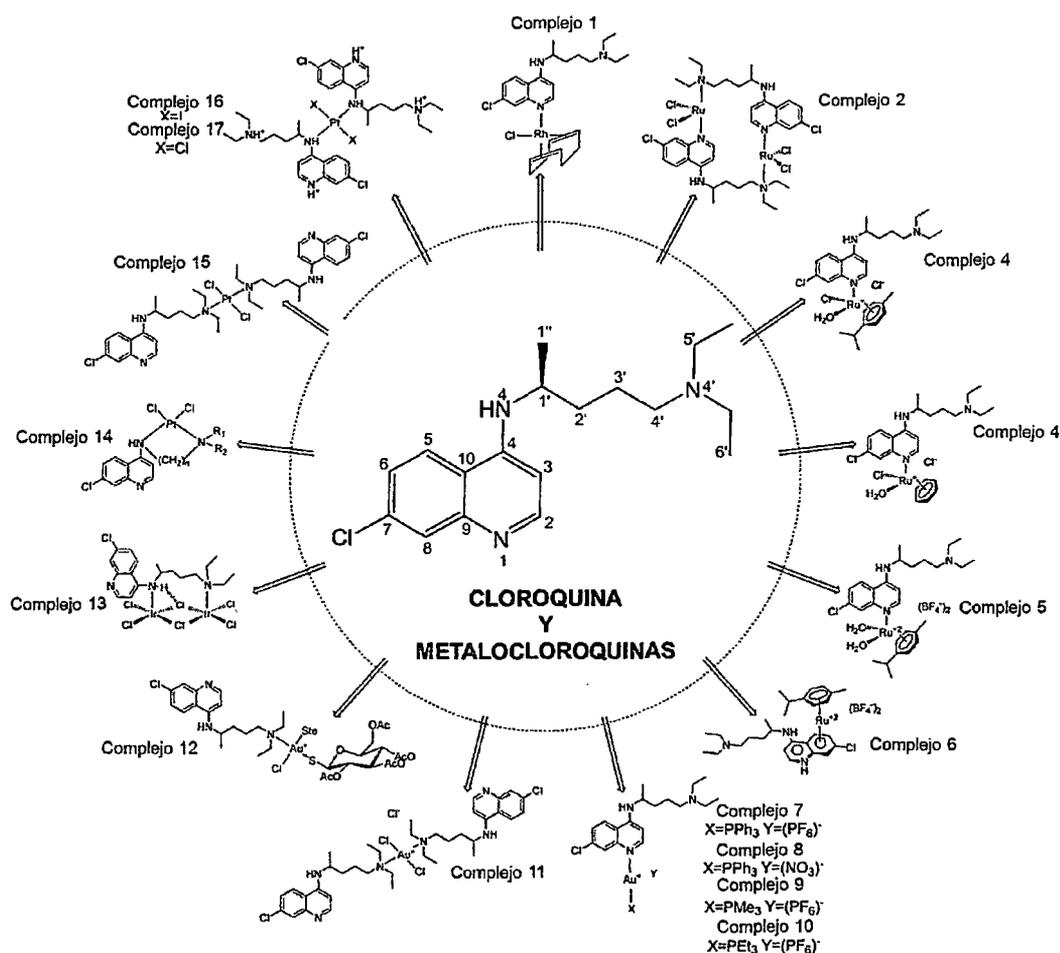


Figura 6. Estructura de la cloroquina y las metalocloroquinas reportadas.²²

En una publicación más reciente, Rajapakse y col.²³ reportaron el complejo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cymene})(\eta^6\text{-CQDP})][\text{BF}_4]_2$ (CQDP = difosfato de cloroquina) (complejo 6, fig. 6) donde se encontró que el enlace metal-ligando ocurre a través de los electrones deslocalizados π del anillo quinolinico, ya que en el CQDP los átomos N_1 y N_4 se encuentran protonados. Esta posibilidad fue resuelta por modelamiento computacional a través de cálculos DFT.

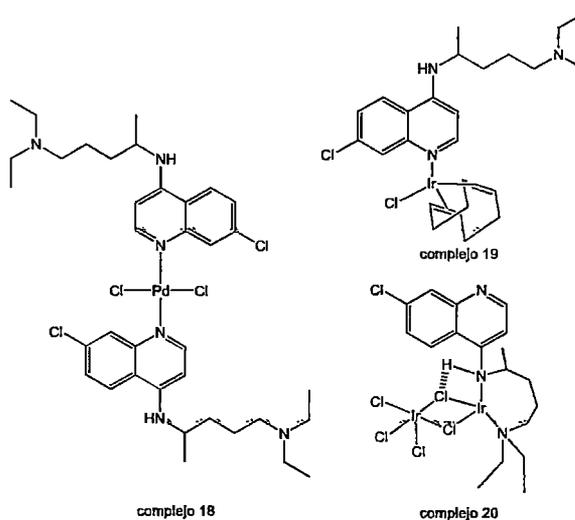


Figura 7. Estructura propuesta para los complejos: a) $\text{PdCl}_2(\text{CQ})_2$, b) $\text{IrCl}(\text{COD})(\text{CQ})$ y c) $\text{Ir}_2\text{Cl}_6(\text{CQ})_3\text{H}_2\text{O}$.^{18,19}

2.6 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE LA CLOROQUINA Y SUS COMPLEJOS METÁLICOS

2.6.1 Malaria y antimaláricos de cloroquina

El paludismo o malaria es una de las enfermedades sin un fármaco óptimo para su cura y se considera reemergente en el Perú y el mundo por ser una enfermedad antigua que en los últimos años ha vuelto a adquirir gran magnitud. Es causada por los protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, y es transmitida a los humanos por la hembra del mosquito Anófeles, presente en casi todos los países subtropicales. Existen aproximadamente 380 especies de anófeles, pero sólo unos 60 transmiten la malaria; y hay más de 120 especies

de *Plasmodium*, cuatro de los cuales infectan a los humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*). De las cuatro, la malaria por *P. falciparum* es la responsable de la mayoría de infecciones y es la más letal.²⁴

En el Perú, la malaria es endémica y tiene un patrón definido: es cíclico, estacional, y está asociado geográfica y ecológicamente a zonas tropicales amazónicas y desérticas irrigadas de la costa norte. El 35% de la población nacional se encuentra en riesgo de contraer malaria, y el 75% del territorio nacional es considerado como área de transmisión, distribuido en tres grandes escenarios epidemiológicos: la cuenca amazónica, los valles occidentales de la costa norte y los valles interandinos hasta los 2 300 m.s.n.m.²⁵ El 90% de los casos de malaria en el Perú son causados por *P. vivax*, y en mucho menor grado por *P. falciparum*. Según el reporte del MINSA hasta la Semana 33 (Del 11 al 17 de agosto del 2013) en el Perú se han reportado 27231 casos de malaria por *P. vivax* y 4884 casos por *P. falciparum*,²⁶ siendo este último número peligrosamente mayor al total de casos anuales reportados en los últimos años (Tabla 1). La zona que presenta la mayor incidencia es el departamento de Loreto.

Tabla 1. Casos de Malaria por especies y por años reportados en el Perú desde el 2008.²⁷

| Tipo | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013* |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P. Vivax | 37293 | 33177 | 28204 | 22675 | 30194 | 27231 |
| P. Falciparum | 4529 | 3893 | 2312 | 2645 | 4012 | 4884 |

(*) Hasta la semana 33 (11-17 de agosto).

Como parte del proceso de desarrollo del Plan Nacional Concertado de Salud, el MINSA ha hecho público un diagnóstico con los principales problemas de salud de la población nacional, distinguiendo las enfermedades transmisibles VIH/SIDA, tuberculosis, y malaria.²⁸

La quinina y su prototipo simple - la cloroquina (CQ), son los fármacos más importantes y actuales en la lucha contra la malaria, siendo el primero más letal por lo que su uso está limitado a casos extremos.¹³ La CQ ha resultado ser un fármaco muy exitoso porque: (1) es

barato, (2) es estable y de fácil transporte biológico, (3) puede ser tolerada en altas dosis, y (4) su objetivo es el proceso de digestión del hemo por el parásito dentro del eritrocito.²⁴ Y si bien, antes se pensaba que su principal mecanismo de acción antimalárica residía en la formación de complejos con el ADN del parásito, hoy es más aceptado que las 4-aminoquinolinas interfieren con la desintoxicación del hemo libre (ferroprotoporfirina IX, FPIX), generada durante la degradación de hemoglobina dentro de la vacuola digestiva del parásito.^c En este proceso, la hemoglobina es reducida a péptidos pequeños y aminoácidos esenciales para el parásito, formándose también la FPIX tóxica (hemo en la figura 8), que es convertida en cristales insolubles de β -hematina (hemozoína o pigmento de malaria). Adicionalmente, el hemo libre se degrada por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generado por la oxidación espontánea de Fe^{2+} a Fe^{3+} en el hemo. El fármaco inhibe la degradación oxidativa y la polimerización, formando un complejo con el hemo libre, desencadenando un efecto tóxico por el aumento de su concentración, resultando en la muerte del parásito.¹⁰ La figura 8 ilustra el proceso digestivo en el parásito: la hemoglobina es absorbida por endocitosis y degradada por proteasas dentro de la vacuola digestiva ácida (figura 8A); los restos tóxicos del hemo se polimerizan en cristales de hemozoína facilitado por "catalizadores de polimerización del grupo hemo" (figura 8B). Las especies reactivas de oxígeno son neutralizados por un sistema de defensa antioxidante donde el hemo actúa como las catalasas y peroxidasas (figura 8C).^d La cloroquina puede interferir con la actividad catalasa del hemo, y la promoción de la peroxidación de los lípidos.

^c Las vacuolas digestivas son cavidades celulares rodeadas por una membrana donde las enzimas degradan los nutrientes macromoleculares antes de ser liberados al interior de la célula.

^d Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, mientras que las peroxidasas catalizan reacciones donde el peróxido de hidrógeno se utiliza como oxidante.

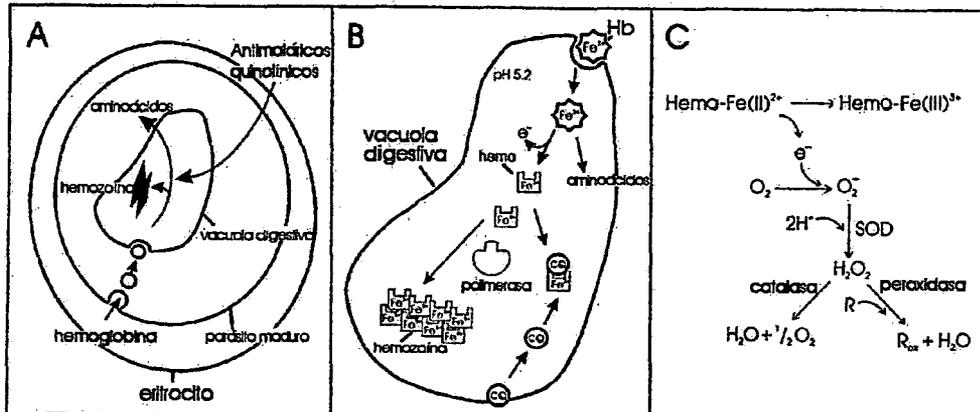


Figura 8. Proceso digestivo en eritrocitos infectados con parásitos de malaria y el mecanismo de acción de la CQ: (A) degradación de la hemoglobina, (B) polimerización del grupo hemo por acción de la polimerasa y su inhibición por la CQ. (C) desintoxicación de los radicales libres por el hemo donde actuaría la CQ.²⁹

Un mecanismo común en el fenómeno de resistencia a fármacos en bacterias, parásitos, o células tumorales es la mutación del blanco del fármaco, por lo que se pensaba que era poco probable la aparición cepas de *plasmodium* resistentes a la cloroquina porque el parásito, obviamente, no puede mutar la hemoglobina o alterar su estructura directamente, ya que estos están hechos por el huésped. Sin embargo, en 1957 cepas CQ-resistentes se registraron por primera vez en el sudeste de Asia (cerca de la frontera de Tailandia y Camboya). Desde entonces, casos esporádicos de resistencia a la CQ se registraron en Sudamérica (Venezuela y Colombia) en 1960; en Oceanía (Papúa Nueva Guinea) a mediados de los 70s y, en África alrededor de 1978.³⁰ Cuando el *P. falciparum* resistente a la CQ se introdujo en el África sub-sahariana, se propagó rápidamente desde el este al oeste, y a mediados de los 80s se identificaron casos en todos los países africanos endémicos para la malaria. En algunas áreas del este de África, el 80% o más de las infecciones por *P. falciparum* exhiben un grado de resistencia *in vivo* entre moderado y alto.³¹

Otras tres vías de resistencia a los medicamentos son: aumento de la expresión de la diana del fármaco, aumento del catabolismo/degradación del fármaco, o la alteración de la accesibilidad del fármaco a la diana, causada frecuentemente por el tráfico alterado del fármaco en la célula (es decir, existe menor contacto entre el fármaco y la diana), y/o alguna

perturbación física o química del grupo hemo que disminuye su accesibilidad a, o afinidad por, el fármaco. Los parásitos de la malaria no pueden aumentar la expresión de hemoglobina, y no se beneficiarían de aumentar el hemo libre, ya que se formarían más complejos hemo-CQ tóxicos. Aunque la acumulación total del fármaco puede tardar minutos en completarse, las moléculas individuales de CQ alcanzan su objetivo (el hemo en la vacuola digestiva) en cuestión de segundos, dejando poco tiempo para degradar el fármaco. Por lo tanto, la acción más probable para la resistencia (también sustentado por estudios de acumulación de fármacos) es que ocurriría una alteración de la accesibilidad a la diana *in vivo* de tal manera que la capacidad del fármaco para inhibir la formación de hemozoína se ve reducida.²⁴

Diversas mutaciones en uno solo de los genes de *P. falciparum*, el gen *pfcr* del cromosoma 7, que corresponde a la proteína PfCRT de la membrana de la vacuola digestiva, serían las responsables de la resistencia del parásito a la CQ.³² Se ha propuesto que la PfCRT podría actuar como un canal o un transportador de CQ que disminuye su acumulación en la vacuola digestiva.

El diseño de tratamientos contra la malaria bajo la premisa que la teoría de fármacos dirigidos a la polimerización del hemo o la digestión de la hemoglobina, asumiendo que las otras vías de resistencia a los fármacos se comprendan y se manejen correctamente, aún sigue siendo eficaz, debido a que el blanco biológico permanece inalterado. La actividad antimalárica reportada por las metalocloroquinas ha reforzado la idea.

La síntesis de las primeras metalocloroquinas se reportaron a finales de 1996 por el grupo de Sánchez-Delgado¹⁶ que preparó dos complejos metálicos de cloroquina, por reacción directa de la base libre (cloroquina) con el precursor de rodio $[\text{RhCl}(\text{COD})]_2$ (COD = 1,5-ciclooctadieno), y por reacción directa para el caso de rutenio. Las pruebas contra *falciparum berghei in vitro* e *in vivo* mostraron que la incorporación de los metales generaba un incremento en la eficacia antimalárica de la cloroquina; más aún, no se observó ningún signo de toxicidad aguda en los animales experimentales después de un período

prolongado de administración. La consecuencia más resaltante fue que el complejo $\text{RuCl}_2(\text{CQ})_2$ resultó ser considerablemente más activo que la difosfato de cloroquina en pruebas *in vitro* contra variedades de *P. falciparum* cloroquina-resistentes.

En 1997, el grupo de Navarro¹⁷ publicó los resultados de un nuevo complejo, $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$, sintetizado por la reacción de la CQ base con el precursor AuClPPh_3 . Este complejo exhibió una actividad *in vitro* contra la fase sanguínea de dos variedades de *P. falciparum* cloroquina-resistentes, considerablemente superior a los primeros complejos. El complejo fue además, activo *in vitro* e *in vivo* contra *P. berghei* mostrando que la incorporación del ion de oro producía un marcado incremento en la eficacia de la CQ.

En la última década, resultados como los anteriores se reportaron para metalocloroquinas con cobre, zinc,²⁰ paladio,¹⁸ iridio¹⁹ y platino.^{33,34} Cada uno de estos con una actividad biológica potenciada contra cepas de malaria, incluyendo aquellas CQ-resistentes. Estos resultados ilustran perfectamente el potencial del método basado en la coordinación de fármacos con metales que promueven el desarrollo de quimioterapias principalmente contra la malaria y otras enfermedades tropicales.

Para encontrar una explicación de la actividad biológica de las metalocloroquinas y proponer su posible mecanismo de acción, se han realizado estudios de interacción de algunas metalocloroquinas con hematina por titulación espectrofotométrica encontrándose que las constantes de asociación de los complejos son ligeramente menor al valor del difosfato de cloroquina, lo que indicaría que las metalocloroquinas (o sus derivados) también inhiben la formación de la β -hematina. Correcciones en el método experimental propuestas por Sanchez-Delgado²² demostraron que frente a una interface acuo-lipídica las metalocloroquinas (más específicamente sus derivados) son más potentes que el difosfato de cloroquina para inhibir la agregación del hemo cerca de la interface, en concordancia a la mayor actividad *in vitro* e *in vivo* exhibida por las metalocloroquinas.

2.6.2 Artritis reumatoide y antiartríticos tipo cloroquina

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica, crónica y progresiva que afecta frecuentemente al 0,5-1% de la población mundial, se caracteriza por inflamación de las articulaciones que tienen movimiento, provocando incapacidad, mala calidad de vida y una muerte prematura. La AR y las enfermedades músculo-esqueléticas, por tanto, se han convertido en un problema de salud debido a su frecuencia y los altos costos en su tratamiento.³⁵

Las 4-aminoquinolinas, Cloroquina (CQ) e Hidroxicloroquina (HCQ) (figura 9), son utilizadas en el tratamiento de las enfermedades reumáticas, especialmente para artritis reumatoide.³⁶ Son los únicos antimaláricos de uso clínico. La HCQ es la más prescrita en los Estados Unidos, mientras que en regiones como Latinoamérica y la India se utiliza con más frecuencia la CQ, posiblemente por las limitaciones económicas y su fácil disponibilidad.³⁷

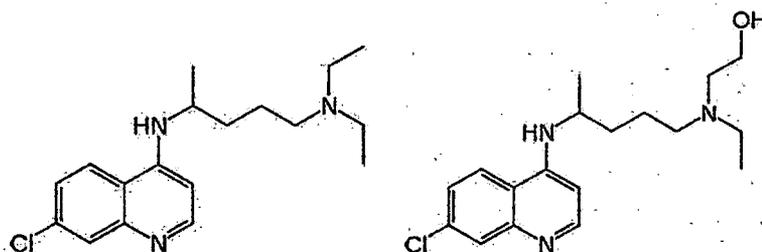


Figura 9. Compuestos 4-aminoquinolinas usados en el tratamiento de la artritis reumatoide: la cloroquina (izquierda) y la hidroxicloroquina (derecha).

Los antimaláricos son considerados fármacos antirreumáticos de acción lenta debido a su farmacocinética caracterizada por una extensa acumulación en los tejidos, con grandes rangos de distribución por lo que presentan una larga vida media. Para alcanzar niveles estables en el plasma se necesitan de 3 a 4 meses, y hasta un máximo de 6 meses para conseguir resultados óptimos en los pacientes (acción terapéutica retardada). La ventaja de estos fármacos es su baja toxicidad respecto a otros antirreumáticos de acción lenta.³⁷

Aunque algunos mecanismos de acción no son del todo claros, se conoce que los antimaláricos presentan un efecto antiinfeccioso (base del tratamiento antimalárico), alteran

la activación de los monocitos, macrófagos y polimorfonucleares por su extensa acumulación en el sistema de vesículas ácidas de estas células (efecto inmunosupresor), e inhiben la producción de factores mediadores de la inflamación como la interleucina 1 (efecto antiinflamatorio). Otros efectos conocidos son su capacidad de disminuir los niveles de lípidos y de inhibir la agregación de plaquetas, ayudando a prevenir fenómenos trombóticos.

Entre los fármacos más utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide sobresalen complejos de oro tipo aurotiolatos, aurotiomalatos y aurotioglucosas. Por tanto, el complejo $[(CQ)(Et_2O)Au(Cl)(SR)]Cl$ (HSR = 1-tio- β -D-glucosa-2,3,4,6-tetracetato)²¹ (complejo 12, figura 6) con la misma naturaleza aurotioglucosídica, presentaría actividad antirreumática, aunque estos estudios no se han reportado.

2.6.3 Cáncer y anticancerígenos de cloroquina

La lucha contra el cáncer es uno de los campos de la investigación que se encuentra en continuo desarrollo en los últimos años, debido al aumento del número de casos en el mundo; sin embargo, las tasas de mortalidad van disminuyendo debido a que los diagnósticos son más precoces y los tratamientos son más eficaces.⁷

La mayoría de agentes metálicos utilizados en quimioterapia, están basados en complejos de platino, aunque debido a sus efectos secundarios, se tiende a la sustitución de los mismos por otros complejos de titanio, galio, estaño, rutenio, paladio, cobre y otros metales que presenten su misma efectividad antiproliferativa y menores efectos nocivos contra la salud del paciente.⁷

La CQ es un lisosomotrópico que se acumula en los lisosomas, eleva el pH intralisosomal, e interfiere con su degradación autofagosomal. Esta propiedad única de la CQ es importante para aumentar la muerte celular de una variedad de tumores, y su acumulación en ambientes con bajo pH puede ser útil en el tratamiento selectivo de tumores sólidos que se

desarrollan en ambientes extracelulares ácidos. Estudios revelan que además interacciona con el ADN afectando su síntesis y reparación.³⁸ La cadena dietilamino de la CQ puede formar enlaces de hidrogeno con las bases nitrogenadas del ADN, facilitando el intercalamiento del anillo quinolínico entre bases nitrogenadas. Además, los datos publicados sugieren que las terapias combinadas de CQ con otros fármacos son muy prometedoras para aumentar su eficacia terapéutica y disminuir los efectos secundarios no deseados.

Con los excelentes resultados reportados para el tratamiento de malaria por parte de las metalocloroquinas, y debido a la semejanza de mecanismos de acción de la CQ con los fármacos anticancerígenos, se han sintetizado complejos de CQ con iones metálicos con actividad anticancerígena comprobada (paladio, rutenio, y platino) logrando obtener nuevos compuestos con actividad potencializada: El complejo *trans*-[Pd(CQ)₂Cl₂] se probó contra cuatro líneas de células tumorales humanas, PANC-1, SKBR-3, MDA-MB 231 y HT-29 (tumores de páncreas, mama y colon respectivamente). Los resultados muestran que el complejo presenta un aumento de la citotoxicidad en comparación con el ligando libre para PANC-1, SKBR-3 y MDA-MB 231.¹⁸ Los complejos [Ru(η^6 - *p*-cimeno)(CQ)Cl₂] y [Ru(η^6 - *p*-cimeno)(η^6 -CQDP)][BF₄]₂ (CQDP= difosfato de cloroquina) muestran propiedades anticancerígenas contra las líneas celulares HCT-116 y LS141 de cáncer de colon.²³ El primer compuesto muestra una mayor actividad contra células tumorales tipo liposarcoma, que no suele responder a los agentes quimioterapéuticos actualmente disponibles. Los complejos Pt(CQDP)₂, Pt(CQDP)₂Cl₂ y Pt(CQ)₂Cl₂ han demostrado actividad contra 6 tipos de tumores (PC-3, MCF-7, SKBR-3, HT-29, LoVo y B16/BL6) siendo el último más activo que el cisplatín y transplatín.³⁹ Los estudios muestran que estos complejos presentan una fuerte interacción con ADN.

2.6.4 VIH-1/SIDA y antivirales de cloroquina

El VIH/SIDA o HIV/AIDS (Human immunodeficiency virus infection/ acquired immunodeficiency syndrome),^o se ha convertido en una de las principales enfermedades de la humanidad, especialmente en el Tercer Mundo, donde el acceso a la atención médica es muy limitado o inexistente y se tiene tasas de seroprevalencia terribles (20 - 30%).⁴⁰

El uso clínico de la CQ en el control de infecciones virales se examinó por primera vez en la década de los noventa, en base a sus efectos sobre el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1).⁴¹ En el tratamiento con CQ de células infectadas por virus, se observó una disminución significativa del número de células y virus relacionado con las glicoproteínas envoltantes gp120 del HIV-1.⁴² El efecto de la CQ sobre los virus infecciosos se debería a la inhibición de la enzima VIH-1 integrasa⁴³ y la proteína Tat⁴⁴ (Transactivador de la Transcripción); y la interferencia de la glicosilación terminal de las proteínas secretoras en la red *trans* Golgi.⁴⁵ Además, la CQ interfiere en el proceso proteolítico, donde las proteasas del VIH-1 transforman largas cadenas de gp160 en gp41 y gp120 necesarios para la fijación a la célula huésped. Así, los antimetabólicos quinolínicos como la CQ inhiben la replicación del VIH-1 por un mecanismo distinto a los demás fármacos de uso clínico, lo que puede resultar en efectos sinérgicos si se combina con otros antirretrovirales conocidos.

Si, bien aún no existen estudios sobre metalocloroquinas en el tratamiento de enfermedades virales como el VIH-1, no se puede descartar su posible aplicación.

2.6.5 Enfermedades dermatológicas y su tratamiento con compuestos tipo cloroquina

La piel funciona como una barrera flexible, gracias a los componentes de colágeno y elásticos de la dermis; proporciona un escudo único que sirve de protección frente a fuerzas mecánicas e impide la penetración de diversos agentes químicos; controla la pérdida de agua del organismo; y lo protege contra los efectos de la luz natural y artificial, del calor y

^o El VIH puede ser VIH-1 y VIH-2, aunque generalmente se habla de VIH refiriéndose al HIV-1. El VIH-2 es menos común en el mundo, y la evolución del SIDA producido es más lenta y leve.

del frío. Además, la piel intacta y sus secreciones constituyen una barrera defensiva bastante eficaz frente a los microorganismos, siempre que no se altere por lesiones químicas o mecánicas.⁴⁶ Por esto, la piel es conocida ahora como el órgano inmunoreactor más extenso e importante del organismo, con toda la significación que involucra este conocimiento para comprender la causa de muchas enfermedades cutáneas.

Las enfermedades dermatológicas varían con la situación geográfica y probablemente son influenciadas por factores étnicos y ambientales. En los países tropicales en desarrollo, las enfermedades dermatológicas constituyen un importante problema de salud pública, principalmente las de causa infecciosa. Debido a esto, están consideradas en el proyecto de control de enfermedades prioritarias del Banco Mundial, la OMS y el Centro Fogarty Internacional.⁴⁷

Además de la CQ, otros antimaláricos como la hidroxicloroquina (HCQ) y la quinacrina (Qn), se han usado para tratar enfermedades de la piel por más de 50 años.⁴⁸ Los efectos de la CQ y la HCQ se explican mejor por varios factores, ya que presentan propiedades inmunomoduladoras, anti-inflamatorias, y antiproliferativas, alivian la inflamación inducida por UV, inhiben la agregación de trombocitos, mejoran la tolerancia a la glucosa, y causan el aumento de la excreción de porfirina. Estos efectos hacen que estas sustancias sean útiles para la terapia.⁴⁹

Los datos indican que los antimaláricos son capaces de disminuir las reacciones inducidas por radiación UV tanto en los individuos normales como en los que tienen sensibilidad a la luz (producen la remisión de procesos fotoinducidos). Sin embargo, el mecanismo de acción de este efecto fotoprotector parece no deberse a su espectro de absorción ni a que actúen como una simple pantalla, sino que intervienen inhibiendo la respuesta inflamatoria inducida por los UV, o bien incrementando la acción de algunas de las vías que, en condiciones normales, participan en la respuesta protectora de la epidermis frente a los UV.⁵⁰

En cuanto a la piel misma, la CQ y sus análogos tienen una alta afinidad por la melanina y se acumulan en los tejidos con un alto contenido de esta, como los ojos y la piel.⁵¹ Si bien, la acumulación en los ojos es la causa de los efectos secundarios de la CQ, la acumulación

preferencial en la piel serviría para tratamientos de enfermedades cutáneas mejor dirigidos si se usaran fármacos híbridos de cloroquina o metalocloroquinas.

Los usos más destacados de la CQ en la dermatología son en el tratamiento de enfermedades inducidas por la exposición solar, como el lupus eritematoso cutáneo, erupción polimorfa solar, urticaria solar, infiltración linfocítica de Jessner. También se emplea en enfermedades con base inmunológica (dermatomiositis, vasculitis urticarial, pénfigo foliáceo fotoinducido y esclerodermia localizada), enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, granuloma anular diseminado, queilitis granulomatosa), así como en otros procesos tales como linfocitoma cutis, mucinosis eritematosa, porfiria cutánea tarda, dermatitis atópica, liquen plano, paniculitis idiopáticas.⁵²

2.5 LA PLATA(I)

2.5.1 La plata (Ag) como elemento del grupo 11

La palabra *plata* deriva del latín *plattus* o *platus* (llano), que a su vez se deriva del griego πλάτος (*platos*);⁵³ *mientras que* su símbolo químico (Ag) deriva del latín *argentum*, que proviene del griego αργος (*argos*): brillante o blanco.⁵⁴

Junto al cobre y el oro, la plata forma parte del grupo 11 de la tabla periódica, también llamado grupo de los "metales de acuñación" por su empleo tradicional en la fabricación de monedas; y fueron ciertamente los tres primeros metales conocidos por el ser humano.⁵⁴

Todos ellos están presentes en la naturaleza en su forma elemental o "nativa". La abundancias relativas (en ppm) de estos metales en la corteza terrestre son: Cu 68 ppm, Ag 0.08 ppm, Au 0.004 ppm;⁵⁴ y mientras el cobre se encuentra fundamentalmente como sulfuro, el oro y la plata están presentes como metales elementales y en muchos minerales sulfurados. La más importante mena de plata es la argentita (Ag₂S),² aunque también está presente como querargirita o plata córnea (AgCl), estefanita (Ag₅SbS₄), polibásita

$[(Ag,Cu)_{16}Sb_2S_{11}]$, prouisitita o plata roja clara (Ag_3AsS_3) y piragirita o plata roja oscura (Ag_3SbS_3).⁵⁵

Fuera de la estequiometría, similar en los compuestos con el mismo estado de oxidación (y que no siempre tienen la misma estructura), existen semejanzas en el grupo - o cuando menos entre dos de los tres elementos:⁵⁶

1. Los tres metales cristalizan con estructura cúbica centrada en la cara (ecc).
2. El Cu_2O y el Ag_2O tienen la misma estructura cúbica centrada en el cuerpo, donde cada átomo metálico tiene dos átomos de oxígeno vecinos y, además, cada átomo de oxígeno está rodeado tetraédricamente por cuatro átomos metálicos.
3. A pesar de que la secuencia de la constante de estabilidad para los complejos de halogenuros de muchos metales es $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$, el Cu^I y la Ag^I pertenecen al grupo de iones de los metales más nobles, en los que la secuencia está invertida.
4. El Cu^I y la Ag^I (y en un grado menor el Au^I) forman casi los mismos tipos de iones y compuestos, tales como $[MCl_2]^-$, $[Et_3AsMI]_4$ y K_2MCl_3 .
5. Ciertos complejos de Cu^{II} y Ag^{II} son isomorfos. Los iones Ag^{III} , Au^{III} y Cu^{III} también forman complejos similares.

A pesar de la similitud de las estructuras electrónicas y potenciales de ionización, existe poca semejanza entre los miembros del grupo, y no hay explicación para muchas de dichas diferencias. Cada uno tiene estados de oxidación preferenciales distintos (Cu , +2; Ag , +1; Au , +1 y +3), y la única propiedad en común es que ninguno tiene fem positiva para $M \rightarrow M^{n+}$; haciendo que los metales libres no sean afectados por los ácidos simples ni se oxiden con facilidad, por lo cual se utilizan para el "acuñamiento".⁵⁷

2.5.2 Propiedades atómicas y físicas^{54,56}

- La plata es un metal blanco, brillante, suave y maleable (p.f. 961.8°C). Sin embargo, cuando esta finamente fraccionado presenta un color negro.
- El elemento metálico presenta estructura FCC en estado sólido.
- Es el metal con mayor conductividad eléctrica y térmica conocidas.
- Presenta dos isótopos: ^{107}Ag y ^{109}Ag , ambos con spin nuclear ($\frac{1}{2}$) RMN-activos.
- Electronegatividad: 1.93 (escala Pauling).
- Afinidad electrónica: 125.6 KJmol^{-1} .
- Su estado de oxidación preferente es +1.

2.5.3 Propiedades químicas

El comportamiento químico de la plata está directamente relacionado con su configuración electrónica ($4d^{10}5s^1$). La influencia de la carga nuclear sobre la envolvente electrónica, cuya parte más externa está poco apantallada por la capa d llena provoca que la primera energía de ionización (I_1 , Tabla 2) aunque baja, sea mayor al de los alcalinos donde la capa p llena ejerce un apantallamiento más efectivo, dando un pequeño radio iónico. Por el contrario, la menor repulsión electrónica y mayor separación de electrones en los orbitales 4d (en Ag^+) hace más difícil extraer un segundo electrón, provocando una alta segunda energía de ionización (I_2 , Tabla 2), y haciendo menos accesible el estado de oxidación +2 en los compuestos de plata. La tercera energía de ionización (I_3 , Tabla 2) relativamente baja es consistente con la estabilidad de Ag^{III} y la ocurrencia de la desproporción de los compuestos de Ag^{II} .⁵⁸

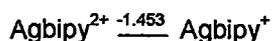
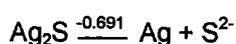
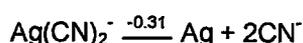
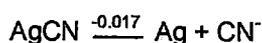
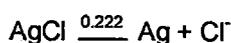
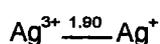
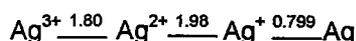
Tabla 2. Energías de ionización (kJmol^{-1}) de los metales del grupo 11.⁵⁸

| | Cu | Ag | Au |
|-------|------|--------|--------|
| I_1 | 745 | 731 | 890 |
| I_2 | 1958 | 2073 | 1978 |
| I_3 | 3554 | 3361 | (2900) |
| I_4 | 5326 | (5000) | (4200) |

*Los valores en paréntesis son valores calculados.

2.5.4 Los iones acuosos

Mientras que el ion Ag^+ es estable en solución acuosa, los iones Ag^{2+} y Ag^{3+} son, o bien inestables, o sólo existen en compuestos insolubles o en especies complejas. La comparación mutua de los potenciales de reducción tiene una utilidad limitada, debido a que dependen fuertemente de la naturaleza del anión. Entre los que tienen utilidad están:^{57,59}



De los potenciales anteriores, puede verse que los iones Ag^{2+} y Ag^{3+} son agentes oxidantes fuertes, y que el ion Ag^+ es estable a la desproporción en medio acuoso, aunque esto puede no cumplirse en presencia de ligandos macrocíclicos que estabilizan mejor los estados +2 y/o +3.

Si bien se pensaba que el ion Ag^+ (d^{10}) en medio acuoso formaba el complejo lineal $[\text{Ag}(\text{OH}_2)_2]^+$, estudios usando técnicas como resonancia del espín electrónico (ESR)⁶⁰ y espectroscopía de rayos X (EXAFS),⁶¹ indican que el complejo acuoso presenta un número de coordinación 4 (y no 2) con geometría tetraédrica. Esto mismo ocurriría en metanol y acetonitrilo, pero no en etanol.

El catión Ag^+ , poco ácido, precipita como hidróxido (AgOH) a un pH relativamente elevado donde coexiste con pequeñas concentraciones de argentito (AgO^-); y no se disuelve en

exceso de OH^- , sino que se transforma espontáneamente en su óxido Ag_2O de color café oscuro, termodinámicamente más estable (figura 10). El Ag_2O es más soluble en soluciones fuertemente alcalinas, donde se forma AgOH y $\text{Ag}(\text{OH})_2^-$.

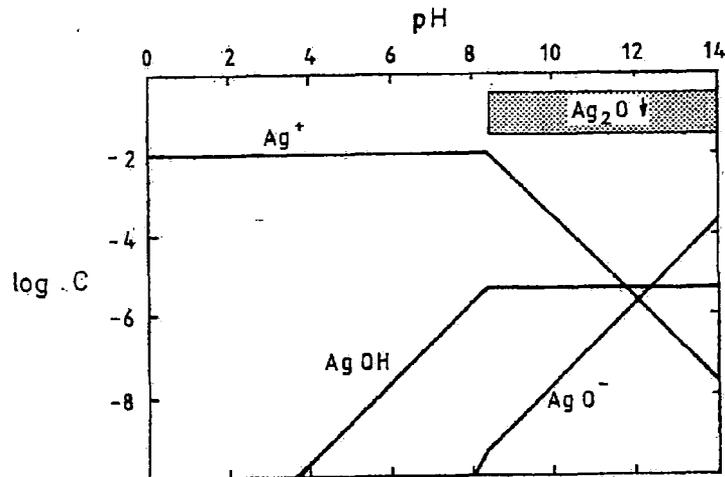


Figura 10. Diagrama logC - pH para $\text{Ag}(\text{I}) 10^{-2} \text{ M}$.⁶²

Los compuestos de plata solubles en agua son incoloros e incluyen al AgNO_3 , AgClO_3 , AgClO_4 , AgBF_4 y AgF ; mientras que los insolubles son, por lo general, fuertemente coloreados como el AgI , AgBr , Ag_2PO_4 , Ag_2CrO_4 y $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, a excepción de otros cuantos como el AgCl , AgCN , AgSCN , $\text{Ag}_2\text{S}\bar{\text{O}}_4$ y $\text{AgO}\bar{\text{O}}\bar{\text{C}}\bar{\text{C}}\bar{\text{H}}_3$ que son sólidos blancos poco o nada solubles en agua. Tanto el AgCN y AgSCN poseen estructuras poliméricas (figura 11), con enlaces predominantemente covalentes.

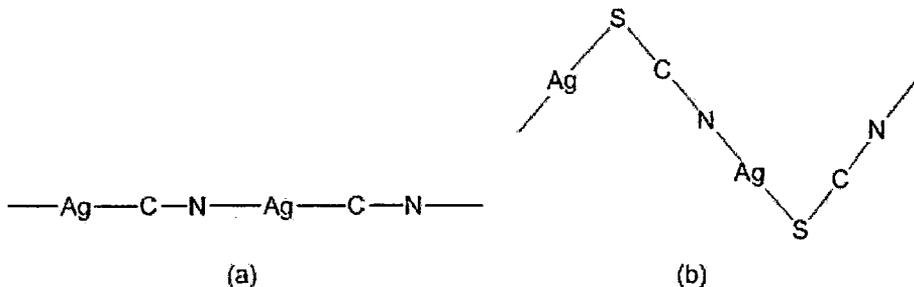


Figura 11. Estructuras poliméricas de (a) AgCN y (b) AgSCN .⁵⁶

2.6 QUÍMICA DE COORDINACIÓN DE LA Ag(I)

La química de coordinación de la plata se ha centrado históricamente en la reacción del ion Ag^+ con ligandos N-dador y halogenuros. Sin embargo, ahora existe una extensa química para ligandos P- y S-dadores, y algo menos estudiado pero con buen número de complejos para ligandos O-dadores (β -dicetonatos, carboxilatos, éteres corona, etc). Basado en la reactividad y estabilidad de estos compuestos de coordinación, el ión plata (I) ha sido caracterizado como un ácido de clase B o "blando", para el cual se ha observado el siguiente orden de estabilidad: $\text{N} \ll \text{P} > \text{As} > \text{Sb}$; $\text{O} \ll \text{S} \sim \text{Se} \sim \text{Te}$; $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$. Estudios comparativos entre ligandos con estos átomos dadores permitieron determinar que la estabilidad relativa de enlace sigue el orden $\text{P} > \text{S} > \text{N} > \text{O}$.⁶³

Los ligandos de azufre más importantes son los tiolatos, ditiocarbamatos, tioureas (tu), y tioéteres. Con tiolatos, se han descrito muchos oligómeros tipo $[\text{Ag}(\text{SR})]_n$; con otros ligandos se obtienen fácilmente complejos tipo clúster; y con macrociclos de azufre, complejos penta y hexacoordinados. Con las fosfinas y arsinas, se conocen muchos compuestos estables y sus estructuras dependen del requerimiento estérico de los ligandos. Las fosfinas voluminosas favorecen estructuras tipo silla y cubano (figura 12). Los clústeres calcogenuro de plata de alta nucleáridad estabilizados con ligandos de fosfiná poseen interesantes estructuras tipo "frameworks" y van desde clústeres pequeños hasta muy grandes, por ejemplo, $[(\text{Ag}_{172}\text{Se}_{40}\text{SeBu}^{\text{I}})_{92}(\text{dppp})_4]$ (donde dppp = 1,3-bis(difenilfosfino)propano). Los complejos con ligandos N-dadores son muy estables y numerosos, también forman estructuras inusuales que van desde especies moleculares normales hasta redes supramoleculares 2D y 3D.⁶⁴ Con ligandos O-dadores se forman complejos fotosensibles, como los tiosulfatos, usados en fotografía. A diferencia de otros iones metálicos blandos, el ion Ag^+ se une al Me_2SO (o DMSO) por los átomos de oxígeno en el complejo $\text{Ag}(\text{DMSO})_2\text{ClO}_4$, y no por los átomos de azufre.⁵⁸

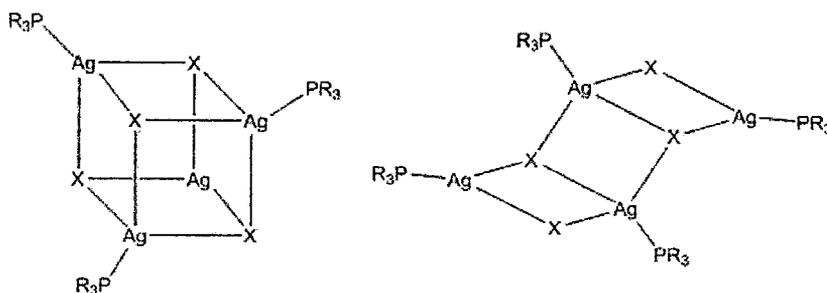


Figura 12. Estructuras cubano y de silla adoptado por complejos $(R_3P)AgX$.⁵⁸

Al igual que el complejo $[H_3N-Ag-NH_3]^+$, un buen número de los complejos de $Ag(I)$ (en solución o en estado sólido) son de geometría lineal, por lo que por muchos años se creyó que el número de coordinación 2 era el característico del ion Ag^+ . Con el desarrollo de la química de coordinación de la plata se halló un amplio rango de geometrías; y especialmente en solución, el ión Ag^+ adopta arreglos tetragonales.⁶³

Tabla 3. Energía de separación (eV) entre los estados de transición para los elementos del grupo 11.⁵⁸

| | Cu^+ | Ag^+ | Au^+ |
|-----------------|--------|--------|--------|
| $d^{10}-d^9s^1$ | 2.72 | 4.86 | 1.86 |
| $d^9s^1-d^9p^1$ | 5.72 | 5.07 | 5.96 |
| $d^{10}-d^9p^1$ | 8.44 | 9.93 | 7.82 |

La formación de complejos lineales se debería a que ocurre una hibridación entre los orbitales d_z^2 y s , favorecida por la pequeña diferencia de energía entre los orbitales d llenos y el orbital s vacío (separación $d^{10}-d^9s$, Tabla 3). El par de electrones inicialmente en el orbital d_z^2 , ocupa ψ_1 , generando una región circular con densidad electrónica en el plano xy que repele a los ligandos. Por una mezcla posterior de los orbitales ψ_2 y p_z , se pueden formar los orbitales híbridos ψ_3 y ψ_4 , con sus lóbulos apuntando a lo largo del eje z y capaces de aceptar pares electrónicos de los ligandos (figura 13).⁵⁸

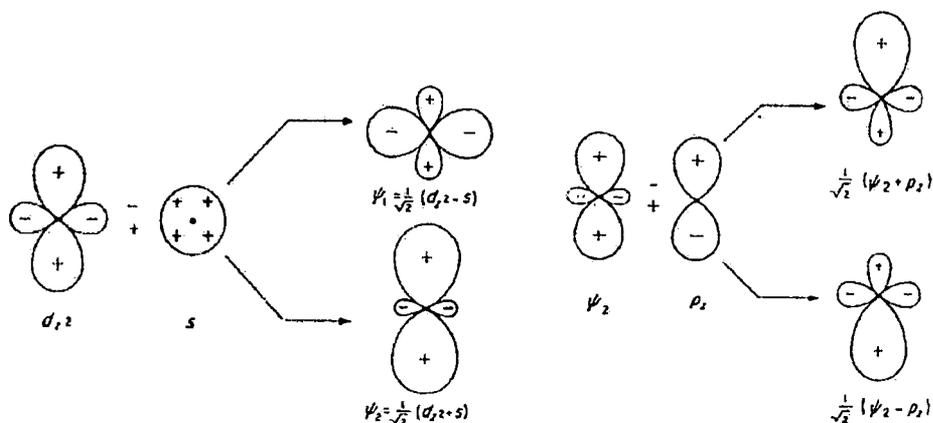


Figura 13. Orbitales híbridos, ψ_1 y ψ_2 , formados de un orbital d_{z^2} y un s , y los híbridos formados de los orbitales ψ_2 y p_z . En cada esquema el eje z es vertical y el orbital es la figura generada haciendo girar el dibujo alrededor del eje z .⁶⁸

Dado que el número de coordinación es sensible a la naturaleza del ligando y de los aniones, la Ag^+ presenta una diversidad de números de coordinación y geometrías debido a las posibilidades de los enlaces sp^2 y sp^3 , además de la hibridización lineal. Para los ligandos monodentados (L) pueden existir complejos AgL^+ , AgL_2^+ , AgL_3^+ y AgL_4^+ , donde K_1 y K_2 son generalmente más altas que K_3 y K_4 , lo que explica en algunos casos la mayor estabilidad de los complejos AgL_2^+ .⁶⁶ Por otro lado, los ligandos quelatos no pueden formar dichos iones simples, y por lo general, tienden a dar iones complejos polinucleares; mientras que los ligandos multidentados pueden formar complejos mononucleares con números de coordinación 3 a 6 e inclusive 7 y 8 cuya geometría adopta diferentes formas (figura 14).⁶⁵

Si bien se ha mostrado la preferencia del ion Ag^+ por los ligandos con átomos donadores "blandos"; ha de notarse también, que otros factores pueden afectar la posibilidad de formación del enlace $Ag-L$ con ligandos cuyos átomos donadores son "duros". Así, un análisis de 22 estructuras cristalinas de compuestos de $Ag(I)$ con bases duras muestra que los compuestos incoloros tienen números de coordinación 1 ó 2, mientras que los compuestos rojos siempre muestran un número de coordinación 3 ó 4.⁶⁶

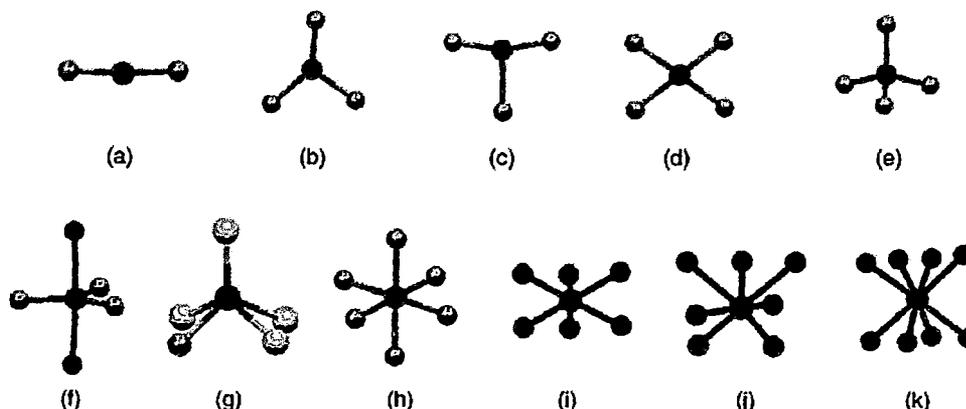


Figura 14. Representación esquemática de los números de coordinación y geometrías que adopta la plata(I) en sus complejos: (a) dicoordinada lineal; tricoordinada (b) trigonal y (c) conformación de T; tetracoordinada (d) plano cuadrada y (e) tetraédrica; pentacoordinada (f) bipirámide trigonal y (g) pirámide cuadrada; hexacoordinada (h) octaédrica y (i) prisma trigonal; (j) heptacoordinada; (k) octacoordinada prisma tetragonal.⁶⁷

Dado que el ligando CQ, presenta como principales puntos de coordinación átomos de nitrógeno, es necesario hacer una revisión de los complejos con ligandos N-donadores.

2.6.1 Compuestos de coordinación con ligandos N-donadores^{58,63,64}

El complejo más simple es el $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, el cual forma el complejo $\text{Ag}(\text{NH}_3)_4^+$, aislable en amoníaco líquido.

En solución, la plata tiende a formar complejos lineales similares al $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ con aminas monodentadas (metilamina, etilamina, propilamina, etc) donde se ha observado que la estabilidad del complejo aumentará con el tamaño de la cadena lateral, aunque en las aminas con cadenas laterales grandes la interacción hidrofóbica sería la responsable de los valores experimentales menores a los esperados. Los complejos de aminas secundarias y terciarias son generalmente menos estables que sus análogas aminas primarias.

Aunque el estudio de las aminas bidentadas, y en general de las polidentadas, es más complicado que las monodentadas: se han obtenido complejos polinucleares, complejos amina-protonados e incluso hidroxocomplejos en solución. Se ha encontrado que el máximo

número de coordinación de la plata(I) en estos complejos es 2, aunque existan dos moléculas coordinadas. Si bien el complejo $[\text{Ag}(\text{en})]\text{ClO}_4$ existe como especie monomérica 1:1 (hidratado y con el ligando actuando como quelante) en solución; en el estado sólido forma una cadena polimérica con el ligando actuando como puente (figura 15).

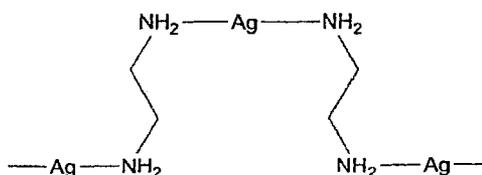


Figura 15. Estructura polimérica del complejo $[\text{Ag}(\text{en})]\text{ClO}_4$.

Las aminas aromáticas son, por lo general, menos estables que las aminas alifáticas; pueden formar complejos 1:2 de estructura lineal, y además complejos 2:1 debido a que una segunda $\text{Ag}(\text{I})$ puede ser coordinada a través del anillo aromático; y el número de coordinación puede llegar hasta 6.

Se han reportado una variedad de complejos con ligandos N-heterociclos. Debido a su naturaleza bidentada los ligandos pirazol (Hpz), imidazol (im) y nitroimidazol (NO_2im) forman fácilmente polímeros; sin embargo, por modificaciones del método de síntesis pueden obtenerse complejos monoméricos ($\text{Ag}(\text{im})(\text{PPh}_3)_3^+$, $\text{Ag}(\text{NO}_2\text{im})_2^+$), diméricos ($\text{Ag}_2(\mu\text{-pz})_2(\text{PPh}_3)_2$), y triméricos ($[\text{Ag}(\text{pz})_3]$). Complejos lineales tipo $[\text{AgL}_2^+]$ se han encontrado para los ligandos pirazol, imidazol, nitroimidazol, metilimidazol y bencimidazol. Los ligandos pirazólicos N-sustituídos también pueden formar complejos trigonales, mientras que el complejo perclorato de bis(imidazol) plata(I) puede formar un cluster tipo $(\text{Ag}^+)_6$ (figura 16).

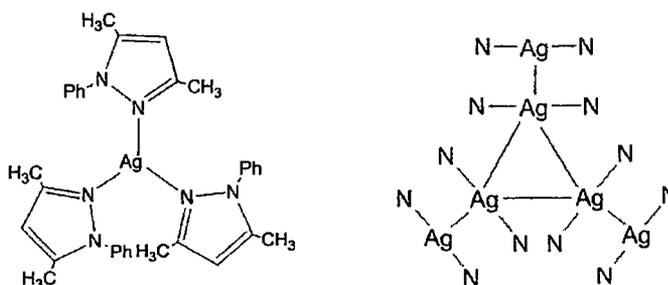


Figura 16. Estructura de los complejos nitrato de tris(1-fenil-3,5-dimetilpirazol) plata(I) (izquierda) y perclorato de bis(imidazol) plata(I) tipo cluster (derecha).

Con ligandos piridina (py) y sus derivados sustituidos se han obtenido complejos lineales (Ag(py)_2^+) y tetraédricos (Ag(py)_4^+), siendo más estable el complejo lineal. En complejos de piridinas sustituidas como aminopiridinas, y cianopiridinas la coordinación ocurre principalmente a través del nitrógeno piridínico.

Complejos tipo $[\text{AgL}_2^+]$ con bipyridina (bipy), fenantrolina (phen), terpiridina (terpy), y sus derivados también se han preparado como intermediarios en la obtención de sus complejos de plata(II). En complejos con terpiridinas sustituidas, sólo dos de los tres átomos de nitrógeno piridínicos están coordinados al Ag(I) debido al efecto estérico de los sustituyentes en arreglos tetraédricos.

2.6.2 Compuestos de coordinación con aminoácidos, proteínas y péptidos⁶³

Debido a que los aminoácidos pueden actuar como ligandos se han preparado un gran número de complejos metálicos incluyendo a los de plata(I). Estudios comparativos de complejos de plata(I) con ω -aminoácidos $\text{NH}_3^+(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2^-$ ($n=1-5$) han demostrado que la estabilidad de los complejos aumenta con el tamaño de la cadena alifática. Del mismo modo la presencia de dobles enlaces en la cadena incrementa la estabilidad de los complejos de plata(I). Si bien se ha encontrado que los puntos de coordinación pueden ser los grupos NH_2 y CO_2^- del aminoácido la presencia de grupos sulfhídrico provoca que la coordinación sea principalmente a través del átomo de azufre.

Se ha encontrado, además que la plata(I) reacciona con la cisteína, presente en la hemoglobina, y con la histidina presente en la mioglobina, tripsina y carboxipeptidasa A.

Estudios con di y tripeptidos muestran que en casos como el complejo $\text{Ag}(\text{HGly-Gly})\text{NO}_3$ la plata está coordinada a oxígenos de grupos carboxílicos diferentes formando un dímero con puentes carboxilato, mientras que en los complejos con ciclo-(Gly-L-His), ciclo-(L-Met-L-His) y ciclo-(L-His-L-His) la coordinación ocurre a través del átomo de azufre del grupo tioeter y del átomo de nitrógeno del grupo imidazol, pero no a través de los grupos amida.

2.7 IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE LA PLATA Y SUS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN

Durante siglos la plata ha sido usada para prevenir y tratar diversas enfermedades. El estudio histórico de su uso medicinal se puede dividir en épocas marcadas por los avances y el entendimiento de las aplicaciones medicinales de la plata y sus compuestos. Los antiguos persas, fenicios, griegos, romanos y egipcios usaron la plata (metálica) en recipientes para preservar alimentos y conservar fresca el agua; los macedonios ya usaban placas de plata para acelerar la cicatrización de heridas; Hipócrates usó preparados de plata para tratar úlceras y promover la curación de heridas. El uso medicinal del nitrato de plata se menciona en una farmacopea publicada en Roma en el año 69 antes de nuestra era.⁶⁸ Hasta 1800, las numerosas aplicaciones medicinales de la plata (purificar sangre, eliminar el mal aliento, curación de heridas, tratar trastornos del sistema nervioso, prevenir enfermedades usando vasos y platos de plata, etc) se hacían empíricamente, pues aún no se conocía de la existencia de los microbios y su participación como agentes infecciosos. La posterior invención del microscopio; el descubrimiento de las "infecciones microbiológicas" como causa de enfermedades; y las investigaciones de Pasteur, Koch y Ehrlich en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, promovieron el entendimiento de las enfermedades infecciosas y la aplicación de la plata en diferentes presentaciones (hilos, laminas, suspensiones coloidales de plata, y soluciones de AgNO_3) para suturar heridas, prevenir infecciones posoperatorias, tratar úlceras, quemaduras, fracturas compuestas, y gonorrea oftálmica en los recién nacidos lavando sus ojos con soluciones de AgNO_3 al 2% (luego 1%).^{68,69} Para 1900, las aplicaciones medicinales de la plata y sus compuestos parecía avanzar con sus nuevos usos (tratamiento de úlcera corneal, queratitis intestinal, blefaritis, dacriocistitis, sepsis puerperal y estafilocócica, tonsilitis, epididimitis aguda, y otras enfermedades infecciosas).⁶⁸ Sin embargo, el surgimiento de los antibióticos para tratar enfermedades infecciosas, y el descubrimiento de la toxicidad y los efectos secundarios en el tratamiento con compuestos inorgánicos de metales pesados limitó el avance de la química medicinal de la plata. Si bien la aparición de las sulfonamidas parecía fortalecer aún

más el predominio de los fármacos orgánicos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la aparición de la sulfadiazina de plata marcó el renacimiento de la plata en la medicina.⁷⁰ La aparición de bacterias resistentes a las sulfamidas provocó la retirada de la sulfadiazina de plata en hospitales a mediados de los 70's limitando nuevamente las investigaciones de la plata y sus compuestos. Sin embargo, un segundo renacimiento de la plata en el tratamiento de infecciones se produjo debido a la aparición de vendajes capaces de liberar iones Ag^+ con excelente actividad biológica conocida.⁷⁰ Los buenos resultados obtenidos en estos materiales y el bum de la nanotecnología de los metales de transición inspiraron otras muchas aplicaciones aún en desarrollo en los últimos años.

2.7.1 Tratamiento de enfermedades de origen microbiano

De las aplicaciones antimicrobiales actuales de la plata se puede mencionar que:

- Las soluciones de nitrato de plata aún se utilizan para prevenir la conjuntivitis en los recién nacidos, principalmente infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.⁷¹ Para prevenir infecciones oftálmicas asociadas al uso de lentes de contacto se han desarrollado lentes de contacto conteniendo nanopartículas de plata.⁷²
- La plata metálica (incluyendo su forma nanoparticulada) se usa en amalgamas dentales, prótesis y cementos bioactivos para regeneraciones óseas, prótesis vasculares, agujas y suturas quirúrgicas, implantes cardiacos, tubos endotraqueales, y junto a sus sales se impregna en catéteres y vestimentas hospitalarias para reducir el riesgo de infecciones intrahospitalarias.^{70,72,73}
- Dado que es tóxico para cualquier microbio aún a bajas concentraciones, la plata y sus compuestos se usan como agentes antisépticos y germicidas persistentes.⁷¹
- Debido a que ha demostrado ser activa contra cocos gram positivos, bacilos gram negativos, y hongos, la sulfadiazina de plata, junto al acetato de mafenide y el

nitrate de plata aún siguen estando entre los compuestos más usados en el control de heridas por quemaduras.⁷¹ En esta misma área se desarrollan películas biopoliméricas y vendajes conteniendo nuevos compuestos de plata.^{70,72}

- También se usa para esterilizar agua, y prevenir las legionelosis asociada a su consumo. Los iones activos Ag^+ son generados electrolíticamente (ajustando el amperaje para regular la cantidad producida) manteniendo su concentración en el agua entre 0.02 - 0.04ppm.⁷¹
- Debido a la elevada actividad antibacterial de la plata, empresas de electrodomésticos como Samsung Electronics y LG Electronics han basado sus nuevas producciones (refrigeradoras, lavadoras y filtros de agua, acondicionadores de aire, etc) en tecnología usando plata nanoparticulada.⁷²
- Todas las aplicaciones mencionadas se basan en la idea que los materiales de plata se ionizan en presencia de agua, fluidos corporales, o exudaciones tisulares liberando los iones bioactivos Ag^+ , y que su acción antimicrobiana es proporcional a la cantidad de Ag^+ producida y "biodisponible" para interactuar con las biomoléculas bacterianas.⁷⁰

Diferentes estudios se han realizado en busca de elucidar los posibles mecanismos de actividad antibacteriana de la plata y sus compuestos. Y aunque estos estudios se han centrado principalmente en la actividad del ión libre Ag^+ formado o liberado en los medios biológicos, se puede mencionar que:^{70, 71,74}

- Interacciona con la membrana celular bacteriana y tiene afinidad por los grupos sulfhidrilos de la cisteína presente en sus sistemas enzimáticos, interfiriendo en la transferencia de energía transmembrana y en el transporte de electrones.
- Interfiere con el transporte electrónico (cadena respiratoria) en dos sitios específicos: entre el citocromo b y d, y entre la entrada al sitio del sustrato en la cadena respiratoria y la flavoproteína en las regiones de la nicotinamida adenina

dinucleótido hidrogenasa (NADH) y la succinato deshidrogenasa (SDH), provocando el colapso de la fuerza protón-motriz, y la interferencia en la absorción de fosfato.

- Se enlaza al ADN inhibiendo su replicación.
- Inhibe la oxidación de glucosa, glicerol, fumarato, succinato, y lactato.

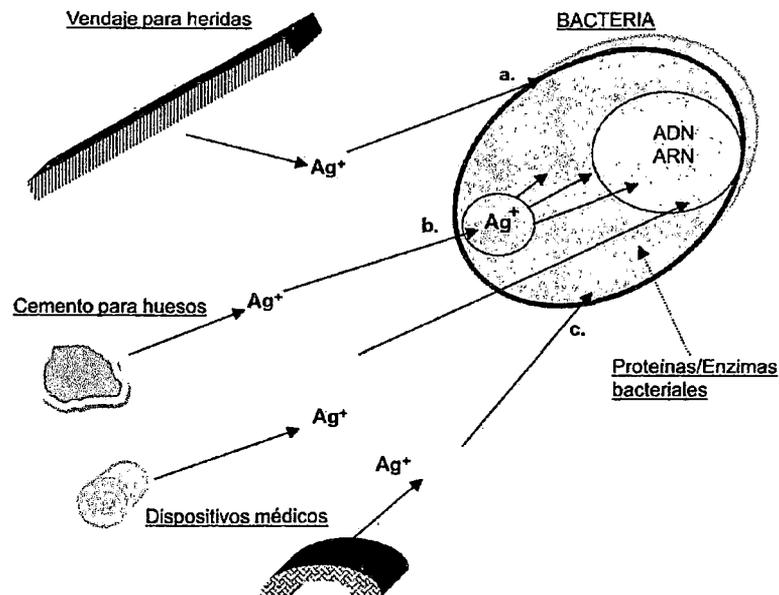


Figura 17. Acción antimicrobiana de la plata (Ag^+) ilustrando tres vías principales: (a) unión a la membrana celular, (b) absorción o difusión transmembrana en la célula (vesículas pinocíticas), (c) coagulación y desnaturalización de las enzimas bacterianas y proteínas.⁷⁵

Los estudios sobre la actividad biológica de diferentes complejos de plata(I) realizados en las últimas décadas han demostrado que existe una relación muy estrecha entre la actividad antimicrobiana y la fuerza del enlace metal-ligando en el complejo. Se ha encontrado un cumplimiento más o menos fiel del principio HSAB de Pearson para los complejos de plata(I) extensible a su actividad biológica; esto es, que si la plata(I) actúa como un ácido de Lewis blando tiene una relativamente baja afinidad por los átomos donadores duros como O, una moderada afinidad por átomos de N, y una alta afinidad por los átomos dadores blandos como S, Se, P y As.⁷⁶ Entonces los complejos de plata(I) más estables se formarán con ligandos que presenten estos últimos átomos dadores. Pero,

como se mencionó antes, la actividad biológica de la plata(I) y sus complejos depende de la fuerza de interacción del ión metálico con las biomoléculas; es decir, de su capacidad biomolécula-coordinante, y su habilidad para intercambiar ligandos biológicos. Por tanto, los complejos de plata(I) con átomos donadores duros (O y N) exhibirán efectivas y amplios espectros de actividad biológica, mientras que los complejos de plata(I) con átomos donadores blandos tendrán limitada actividad biológica (caso de S) o ninguna (caso de P).⁷⁷ Otros factores como la neutralidad (o no) del ligando, la solubilidad, la quiralidad o el grado de polimerización del complejo afectan en mucho menor grado su actividad biológica.^{76, 78, 79}

Los problemas más comunes en los complejos de plata que limitan su aplicación práctica son: los compuestos poliméricos resultan, por lo general, insolubles en agua (por ejem. $[Ag(imd)]_n$); y los compuestos catiónicos solubles presentan inestabilidad frente a la luz (por ejem. $[Ag(Himd)_2][NO_3]$).⁸⁰ En ese respecto se han realizado diversos trabajos enfocados a resolver estos problemas. Así por ejemplo, se prepararon los complejos $\{[Ag(Hhis)] \cdot 0.2EtOH\}_2$ ($H_2his = L$ -histidina; entorno Ag_2N_4),⁸⁰ $\{[Ag(S-Hpyrriid)]_2\}_n$, $\{[Ag(R-Hpyrriid)]_2\}_n$ y $[Ag(S-Hpyrriid)(R-Hpyrriid)]_n$ ⁸¹ ($H_2pyrriid$ - ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico: entorno Ag_2O_4) solubles en agua, estables a la luz y con elevada actividad antimicrobiana.

2.7.2 Tratamiento de cáncer y VIH-1 con compuestos de plata

Si bien el desarrollo de la química medicinal de la plata, desde la antigüedad hasta nuestros días, se ha centrado en su actividad antimicrobiana, en los últimos años los complejos de plata han atraído más la atención debido al descubrimiento de su actividad anticancerígena y antiviral.

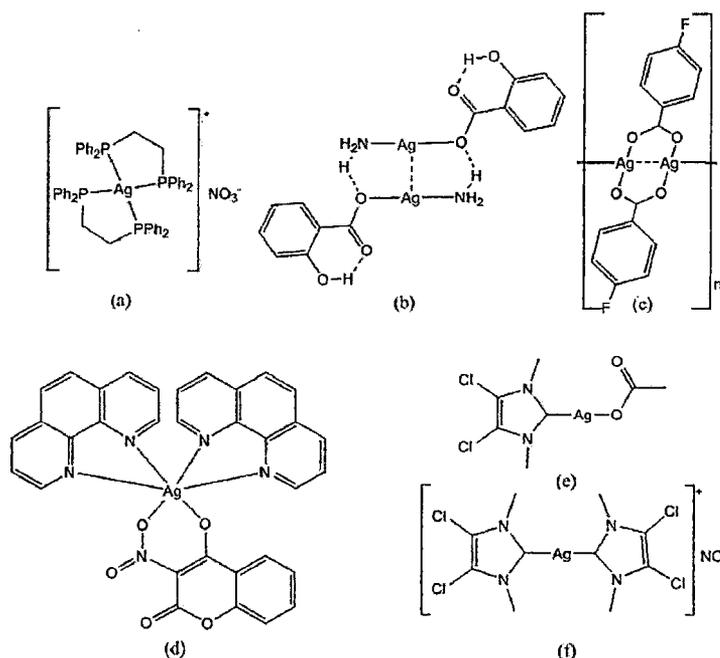


Figura 18. Complejos de plata(I) con actividad antitumoral.⁸³⁻⁸⁷

Dentro de los complejos anticancerígenos más importantes se puede encontrar los fosfino-complejos (y fosfinoquelatos), los carboxilato-complejos, y más reciente los compuestos organoargénticos. En el primer grupo, los complejos de Ag^{I} con fosfinas terciarias quirales demuestran una actividad antitumoral *in vitro* comparable al reconocido cisplatín para mastocitoma P815, melanoma B16, leucemia P388 y los carcinomas de ovario humano 41M y CH1.⁸² Igualmente los complejos con quelatos difosfina tipo $[\text{Ag}(\text{P-P})_2]\text{NO}_3$, donde P-P es la difosfinaquelato (figura 18-a)⁸³ han demostrado buena actividad antitumoral. Entre los carboxilatos, el salicilato de plata(I) dimérico⁸⁴ (figura 18-b) presenta excelente actividad contra carcinoma escamoso de lengua (Cal-27), carcinoma hepatocelular (Hep-G2) y el adenocarcinoma renal (A-496), y carboxilato-complejos poliméricos⁸⁵ (figura 18-c) presentan actividad contra adenocarcinoma de cuello uterino (Hela), carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma gástrico (BGC), carcinoma de pulmón (95-D) y rinocarcinoma (CNE). En tanto, los compuestos organoargénticos (figura 18-e y f) muestran alta actividad frente a carcinoma ovárico (OVCAR-3), de mama (MB157), cervical (Hela)⁸⁶ y cáncer de pulmón (NCI-H460).⁸⁷

Aunque aún no se ha elucidado por completo los mecanismos de actividad anticancerígenas se ha encontrado que el blanco biológico directo no sería el ADN tumoral,⁸⁸ y algunos estudios muestran que ocurre una rápida acumulación en la mitocondria con la posterior inhibición de la ATP-sintasa.⁸² Al igual que para su actividad antimicrobial, se ha propuesto que los ligandos sin actividad anticancerígena servirían como transportadores de los iones Ag^+ , y que estos al ser liberados pueden unirse a las proteínas y/o incluso al ADN tumoral.⁸⁸

Por otro lado, complejos de plata(I) con mercaptosulfonatos muestran baja actividad anti VIH-1, pero una citotoxicidad mayor que el complejo de platino contra células MT-4 infectadas con el virus, y además presenta selectividad al ARN del virus sincitial respiratorio (RSV).⁸⁹ Y el complejo $\{[\text{Ag}_6(\mu_3\text{-Hmna})_4(\mu_3\text{-mna})_2]^{2-} \cdot [(\text{Et}_3\text{NH})^+]_2 \cdot (\text{DMSO})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})\}$, donde Hmna es el ácido 2-mercapto-nicotínico, muestra actividad anti-HIV-RT (una enzima que interviene en la replicación del VIH-1),⁹⁰ y en los últimos años se han reportado estudios sobre la actividad y el mecanismo anti VIH-1^{91, 92} y anti hepatitis B⁹³ de la plata nanoparticulada.

CAPÍTULO III:

PARTE EXPERIMENTAL

La obtención de la cloroquina base CQ y la síntesis del complejo AgCQNO_3 se realizaron en el Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Los reactivos usados en el trabajo experimental (Anexos A2) fueron adquiridos con un alto grado de pureza y se utilizaron sin purificar.

La caracterización de la cloroquina base CQ y del complejo AgCQNO_3 se hicieron en colaboración con:

- Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo - Brasil (Análisis elemental de N, C, H; y espectroscopía FTIR)
- Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (Espectroscopía UV, análisis de Ag por espectrofotometría de AA y medidas de la conductividad molar)
- Laboratorio de Resonancia Ciclotrónica de Iones del Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC - España (Espectrometría de masas FT-ICR).
- Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED – España (Espectroscopía RMN en solución y en estado sólido).

- Laboratorio de Química Inorgánica Sintética e Estructural - Bioinorgánica e Metalofármacos del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo - Brasil (Verificación de la conductividad molar).

3.1 OBTENCIÓN DE CLOROQUINA BASE (CQ) A PARTIR DE SU SAL DIFOSFATO DE CLOROQUINA

Para la obtención de la cloroquina base (CQ), se trabajó con su sal difosfatada (CQDP) siguiendo el método descrito por Sánchez-Delgado:¹⁶

- i Se colocan 10 g (19.45 mmol) de difosfato de cloroquina en un vaso sobre un baño de hielo, se agrega 10 mL de amoníaco concentrado y se agita por 5 minutos.
- ii Se agrega 100 mL de éter dietílico y se homogeniza la mezcla agitando por otros 10 minutos.
- iii Se filtra el residuo sólido enjuagándolo con pequeñas porciones de agua y se recibe el líquido de filtración sobre una pera de separación.
- iv Se tapa la pera y se agita repetidamente hasta por 3 veces cuidando liberar la presión generada. Se deja reposar la mezcla hasta la separación completa de las fases acuosa y orgánica.
- v Se separa la fase acuosa dejándola caer en un vaso, y luego se vierte la fase orgánica sobre un erlenmeyer.
- vi Se seca la fase orgánica agregando 1 g de sulfato de sodio anhidro que luego se elimina por filtración.
- vii Se evapora el éter dietílico del extracto sometiéndolo a la corriente de aire de una campana extractora hasta que sólo quede una pasta aceitosa.
- viii Se agrega 20 mL de acetonitrilo y se agita hasta la completa disolución de la pasta.

- ix Se deja reposar a -5°C en una refrigeradora durante una noche; y luego, el sólido precipitado se filtra a vacío enjuagándolo con pequeñas porciones de acetonitrilo.
- x La cloroquina filtrada se seca a temperatura ambiente en un desecador a vacío por 10 horas y se pesa para verificar el rendimiento de obtención.

La reacción involucrada en el proceso es:

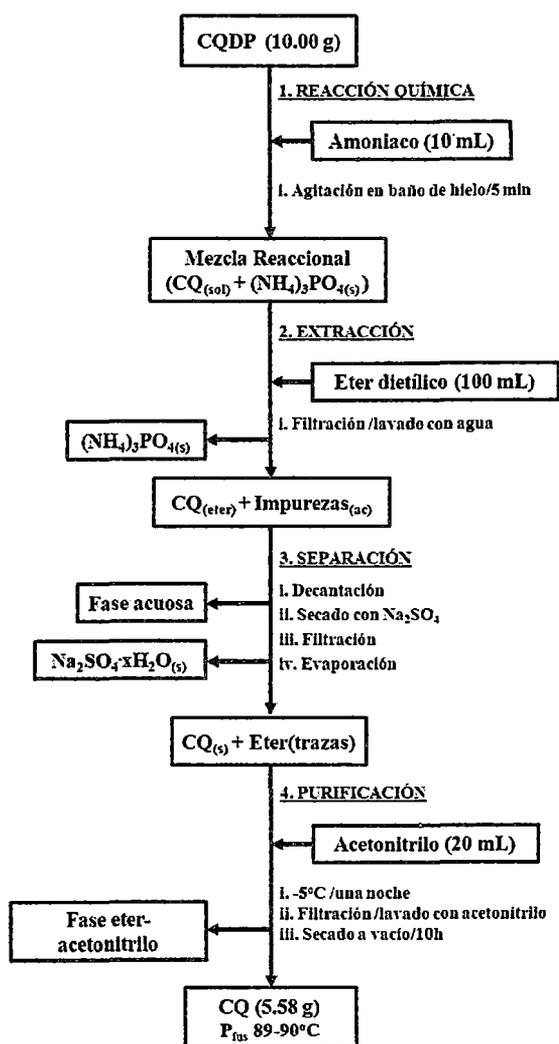
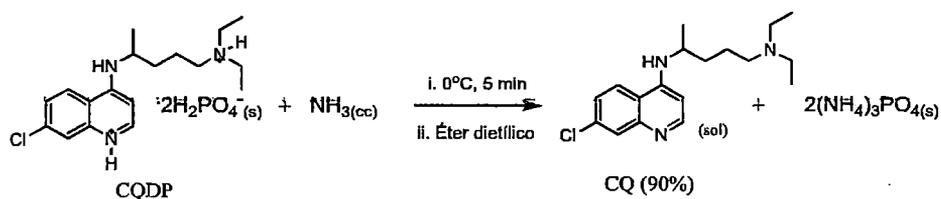


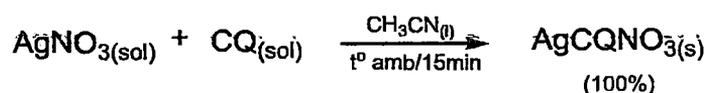
Diagrama 3. Método de obtención de cloroquina base (CQ).

3.2 SÍNTESIS DE LA METALOCLOROQUINA AgCQNO_3

El complejo AgCQNO_3 se sintetizó a través del procedimiento siguiente:

- i. Se coloca 0.32 g (1 mmol) de cloroquina base en un balón de destilación, se agrega 30 mL de acetonitrilo y una pastilla de agitación, y se agita hasta completar la disolución sobre un agitador magnético.
- ii. En un vaso se disuelve 0.17 g (1 mmol) de AgNO_3 con 10 mL de acetonitrilo y se coloca en un embudo de adición.
- iii. Se instala el embudo de adición sobre el balón cubierto con aluminio y en agitación constante se deja caer lentamente toda la solución de AgNO_3 sobre la de cloroquina base en el balón. La agitación se continúa 15 minutos más hasta la aparición de un precipitado blanco.
- iv. El precipitado se filtra a vacío sobre un embudo de placa porosa enjuagándolo repetidamente con porciones de una mezcla helada de acetonitrilo:éter dietílico (5:1).
- v. El sólido blanco se seca en un desecador a vacío por 10 horas cubriéndolo con papel aluminio para evitar fotodescomposición.

La reacción química involucrada es:



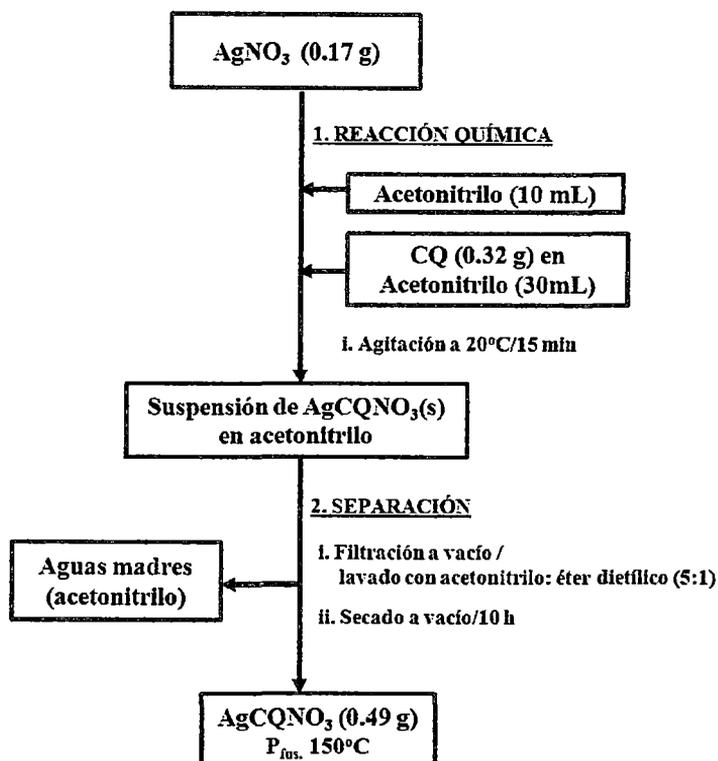


Diagrama 4. Método de síntesis del compuesto AgCQNO_3 en acetonitrilo.

3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

3.3.1 Análisis elemental

Se analizó el contenido de carbono (%C), hidrógeno (%H) y nitrógeno (%N) en dos muestras de CQ base obtenida, con la finalidad de determinar su grado de pureza. Del mismo modo, para el complejo AgCQNO_3 se analizó además el contenido de plata (%Ag) para determinar la relación estequiométrica de Ag: CQ: NO_3 (fórmula empírica).

El análisis de H, C y N se realizó en un analizador de C, H, N Perkin-Elmer 2400; de la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo = Brasil, y el contenido de Ag se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer

AAAnalyst 200 con lámpara de cátodo hueco ($\lambda = 338.3$ nm) del Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

3.3.2 Espectroscopía ultravioleta

Se obtuvieron espectros UV de la cloroquina base obtenida (CQ) y de su sal difosfatada (CQDP) luego de preparar soluciones 10^{-4} M en HCl 0.01N, con la finalidad de verificar la obtención y pureza de CQ base por el método de remoción de fosfatos utilizado.

Los espectros UV se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 25 a 293 K, con lámpara de tungsteno (visible) y deuterio (UV), y celdas de cuarzo de 1 cm de espesor en el Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

3.3.3 Espectroscopía FTIR

Se tomaron espectros Infrarrojo del ligando CQ, su sal difostada (CQDP) y del complejo AgCQNO_3 a 293K en pastillas de KBr ($4000 - 400$ cm^{-1}), con la finalidad de identificar grupos funcionales y comparar las diferencias existentes entre cada par de compuestos.

Los espectros IR se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR Bomem MB-100 de la Central Analítica del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo – Brasil. Los datos se registraron en modo absorbancia que se convirtió a transmitancia para comparación con las referencias.

3.3.4 Espectroscopía CP/MAS RMN

Se obtuvieron espectros de RMN (^1H , ^{13}C y ^{15}N) en solución del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 para identificar los sitios de coordinación, pero no se hace mayor discusión de ellos por su falta de aplicabilidad en el complejo.

Si bien se pueden obtener buenos espectros del ligando (en solución), no ocurrió lo mismo con el complejo; por lo que se planteó el uso de la técnica en estado sólido (CP/MAS RMN). Las muestras fueron cuidadosamente empacadas en rotores cilíndricos de zirconio de 4 mm de diámetro y tapas de Kel-F. Las condiciones de operación incluyen 3.2 μ s para pulsos de 90° en ^1H y desacoplamiento a una intensidad de campo de 78.1 kHz por secuencias de TPPM (two-pulse phase modulated, dos pulsos con fase modulada). Para los espectros de ^{13}C se usó como referencia original una muestra de glicina y luego los desplazamientos se recalcularon al estándar TMS (δ del C carbonilo en la glicina =176.1 ppm), y en los espectros de ^{15}N se usó como referencia el $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ y convertido a la escala estándar del nitrometano usando la relación: $\delta^{15}\text{N}(\text{CH}_3\text{NO}_2) = \delta^{15}\text{N}(\text{NH}_4\text{Cl}) - 338.1$ ppm. Los parámetros típicos de adquisición para ^{13}C CP/MAS fueron: ancho espectral, 40 kHz; tiempo de recuperación del sistema, 5 s; tiempo de adquisición, 30 ms; tiempo de contacto, 2 ms; y velocidad de giro 12 kHz. Para distinguir los átomos de carbono protonados y desprotonados se realizaron experimentos de NQS (Non-Quaternary Suppression, supresión no cuaternaria) por polarización cruzada convencional. Los parámetros para ^{15}N CP/MAS RMN fueron: ancho espectral, 40 kHz; tiempo de recuperación del sistema, 5 s; tiempo de adquisición, 35 ms; tiempo de contacto, 7 ms; y velocidad de giro 6 kHz. Los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{15}N -RMN en solución se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DRX 400 (9.4 Tesla, 400.13MHz para ^1H , 100.62 MHz para ^{13}C y 40.56 MHz para ^{15}N), con sonda de detección inversa de 5 mm para H-X, equipado con bobina de gradiente en el eje Z para ^1H , ^{13}C y ^{15}N . Los espectros de ^{13}C -RMN y ^{15}N -RMN en estado sólido (CP/MAS RMN) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker WB 400 (9.4 Tesla, 100.73 MHz para ^{13}C y 40.60 MHz para ^{15}N), con cabezal TVP de 4mm. Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Alta Resolución de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED – España.

3.3.5 Ensayos de conductividad en solución

Con el fin de determinar la existencia de especies iónicas en el complejo se hicieron medidas de conductividad de AgNO_3 , CQ y del complejo AgCQNO_3 en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las conductividades en solución se midieron con un conductímetro ProfiLine Cond 1970i en el Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, y se verificaron con un conductímetro Digimed MD-31 en el Laboratorio de Química Inorgánica Sintética e Estructural - Bioinorgánica e Metalofármacos del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo – Brasil. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (25°C) inmediatamente después de preparar soluciones 1.0×10^{-3} M en DMSO, usando una solución patrón de KCl, con conductancia específica 146.9 uS/cm y una constante de celda de $K = 0.1 \text{ cm}^{-1}$, como un estándar de referencia para disolventes orgánicos.

3.3.6 Espectrometría de masas ESI/FT-ICR

Se obtuvieron espectros de masas con la finalidad de determinar fragmentos estructurales del complejo AgCQNO_3 y dar explicación a algunos fenómenos como la descomposición de dicho complejo en solución. Las muestras fueron disueltas en DMSO, y mezclas de DMSO/MeCN DMSO/ H_2O . Las soluciones recién preparadas fueron inyectadas a la fuente ESI con una velocidad de flujo de $20 \text{ }\mu\text{L/min}$. Las guías de iones cuadrupolar y hexapolar, la celda de colisión hexapolar y los otros componentes se ajustaron para optimizar la detección en los rangos m/z de 100-1300 Da. La calibración y sintonía de los modos catiónico y aniónico se realizaron usando cerveza comercial de malto-oligosacáridos.

Los espectros de masas (ESI/FT-ICR) se obtuvieron en un espectrómetro de alta resolución y sensibilidad FT-ICR Varian-920 en el Laboratorio de Resonancia Ciclotrónica de Iones del Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC - España, provisto de un imán superconductor con blindaje activo de 7.0 Tesla, equipado con una fuente de ionización por electrospray

(ESI) y un detector de triple cuadrupolo Varian-320 MS. Los experimentos de fragmentación por IRMPD (Disociación Multifotónica Infrarroja) se realizaron usando pulsos de un láser de CO₂ (10.6 μm) Synrad Modelo 48-2. La formación de iones se optimizó modificando los pulsos de láser alrededor de 700 ms al ~45% de la energía total (25 wats).

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CLOROQUINA BASE OBTENIDA

La cloroquina base obtenida (CQ) presenta las características señaladas en las diferentes referencias científicas:^{94, 95} es un sólido blanco débilmente amarillo, bastante soluble en éter etílico y cloroformo, e insoluble en agua (Anexo A4, tabla A3); cuyo punto de fusión fue de 89 - 90°C. Por el contrario, el difosfato de cloroquina (CQDP) es un sólido blanco cristalino muy soluble en agua, e insoluble en cloroformo y éter etílico (Anexo A4, tabla A3), cuyo punto de fusión fue de 203°C.

4.1.1 Análisis del espectro ultravioleta

Los espectros UV (en medio ácido) de la cloroquina base obtenida (CQ) y su sal difosfatada (CQDP) se muestran superpuestas en la figura 19, donde se observa máximas absorbancias a 343, 330 y 257 nm, siendo la banda a 343 nm la más importante analíticamente.⁹⁵ Como en otros alcaloides quinolínicos las bandas se deben a las transiciones electrónicas: $\pi \rightarrow \pi^*$ (257 nm) del anillo aromático, y $n \rightarrow \pi^*$ (330 y 343 nm) por la presencia de heteroátomos y grupos sustituyentes con capacidad de donar sus electrones libres al anillo aromático (figura 20), provocando un "efecto batocrómico" respecto al benceno (o naftaleno) en las bandas antes mencionadas.

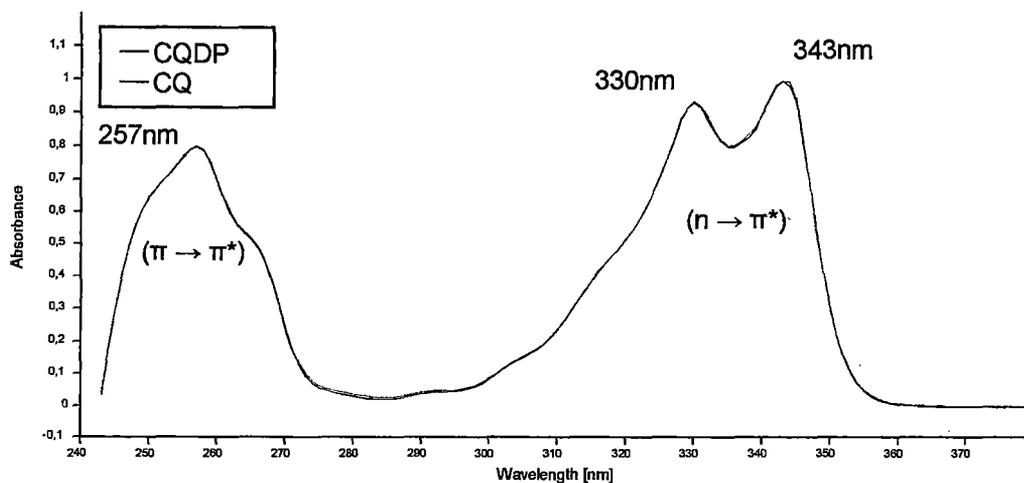


Figura 19. Espectros UV de CQDP y CQ 10^{-4} M en HCl 0.01N.

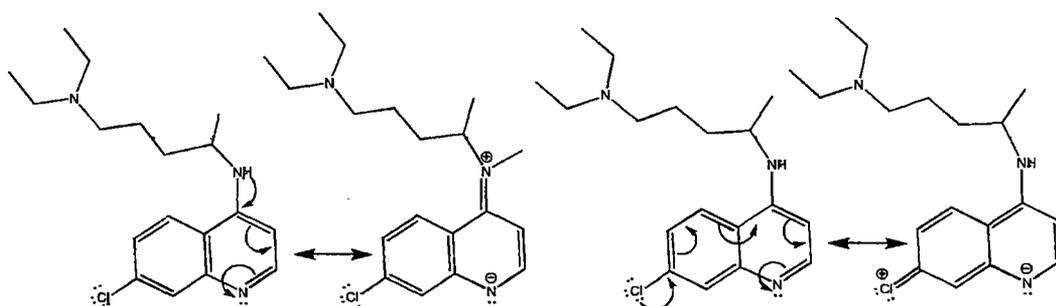


Figura 20. Formas resonantes causantes del efecto batocrómico en el espectro electrónico de la CQ.

Si bien la superposición casi perfecta de ambos espectros en la figura 19 (obtenidos en las mismas condiciones de análisis) es un buen indicativo de la identidad y pureza de la CQ obtenida, es necesario seguir un procedimiento analítico para asegurar la pureza de la misma. Por ello, a continuación se analiza las absorbancias máximas de acuerdo a la ley de Beer (existe una relación directa entre concentración y absorbancia) que para nuestro objetivo puede derivar a la ecuación:

$$\% \text{ pureza de CQ} = \frac{\text{Absorbancia de CQ obtenida } (\lambda_0)}{\text{Absorbancia de patrón CQDP } (\lambda_0)} \times 100$$

donde las absorbancias se miden a la longitud de onda λ_0 .

En la tabla 4 se presentan las medidas de absorbancia para cada banda del espectro de una muestra de CQ obtenida y de un patrón de CQDP (figura 19). También se muestra el %CQ en la muestra obtenida, calculado usando la ecuación anterior. Como se observa en los resultados el porcentaje de pureza es bastante alto (>98%) para todas las bandas, y aún más (~100%) para la banda a 343 nm, lo que demuestra que el método usado para la remoción de fosfatos presentes del CQDP fue el adecuado.

Tabla 4. Máximas absorbancias de CQDP y CQ 10^{-4} M en HCl 0.01N, y el porcentaje de pureza aprox. de CQ obtenida.

| λ_{\max} (nm) | CQDP | CQ | % de CQ* |
|-----------------------|--------|--------|----------|
| 257 | 0,7865 | 0,8002 | 98,29 |
| 330 | 0,9513 | 0,9362 | 101,61 |
| 343 | 1,0000 | 0,9982 | 100,18 |

* Los resultados son sólo aproximados (no se hicieron repeticiones).

4.1.2 Análisis elemental (C, H y N)

Al igual que los resultados obtenidos por espectrofotometría UV, los resultados encontrados por análisis elemental (tabla 5) muestran un excelente grado de pureza (concordancia de valores calculados y experimentales) de las muestras obtenidas por el método de remoción de fosfatos usado. En cualquier comparación directa de resultados calculados y encontrados la pureza de las muestras es mayor al 99%.

Tabla 5. Contenido de C, H, N calculado y experimental en dos muestras de CQ obtenidas.

| $C_{18}H_{26}N_3Cl$ | % <i>Calculado</i> | % <i>Experimental</i> | |
|---------------------|--------------------|-----------------------|-------|
| C | 67.59 | 67.86 | 67.88 |
| H | 8.19 | 8.10 | 8.07 |
| N | 13.14 | 12.97 | 12.98 |

4.1.3 Análisis de los espectros FTIR

Los espectros Infrarrojo de la CQ base y su sal difostada CQDP (Figuras 22 y 23) muestran las bandas principales asociadas a la CQ (tabla 6). Las diferencias entre ambos espectros resultan de su diferencia estructural por la protonación de los nitrógenos básicos (figura 21). El CQDP presenta además, bandas características de los grupos fosfatos (2682, 1309, 1062 y 551 cm^{-1}), y O-H ácidos (3435, 2492 y 943 cm^{-1})^{96,97} ausentes en el espectro de la CQ.

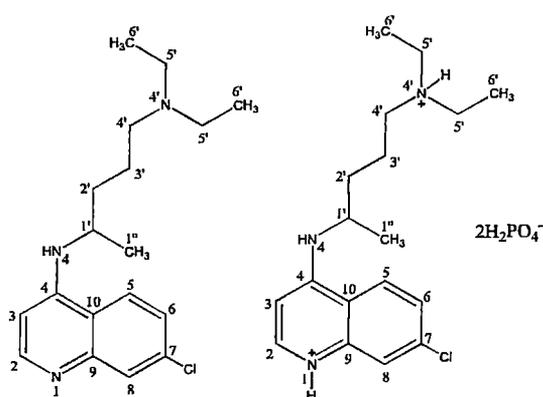


Figura 21. Estructuras de la CQ base (neutra) y el CQDP (protonado).

Tabla 6. Identificación de grupos funcionales de CQ y CQDP.

| <i>Grupo Funcional</i> | Número de onda (cm^{-1}) | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| | CQ | CQDP |
| N-H | 3231 ^a | 3228 |
| C-H aromático | 3105-3014 ^b | 3101-3022 |
| C-H (CH_2 , CH_3) | 2962-2802 ^b | 2974-2789 |
| C=C (carbocíclico) | 1612 ^a | 1630 |
| C=N | 1587 ^a | 1614 |
| C=C (heterocíclico) | 1572 ^a | 1589 |
| N-H | 1547 ^{a,b} | 1553 |
| | | 1564 |
| $\bar{\text{C}}\text{-NH}$ | 1329 ^b | 1369 |
| C-N | 1161 ^b | 1153 |

^a De Hong, D.D.⁹⁵

^b De Coates, J.⁹⁸

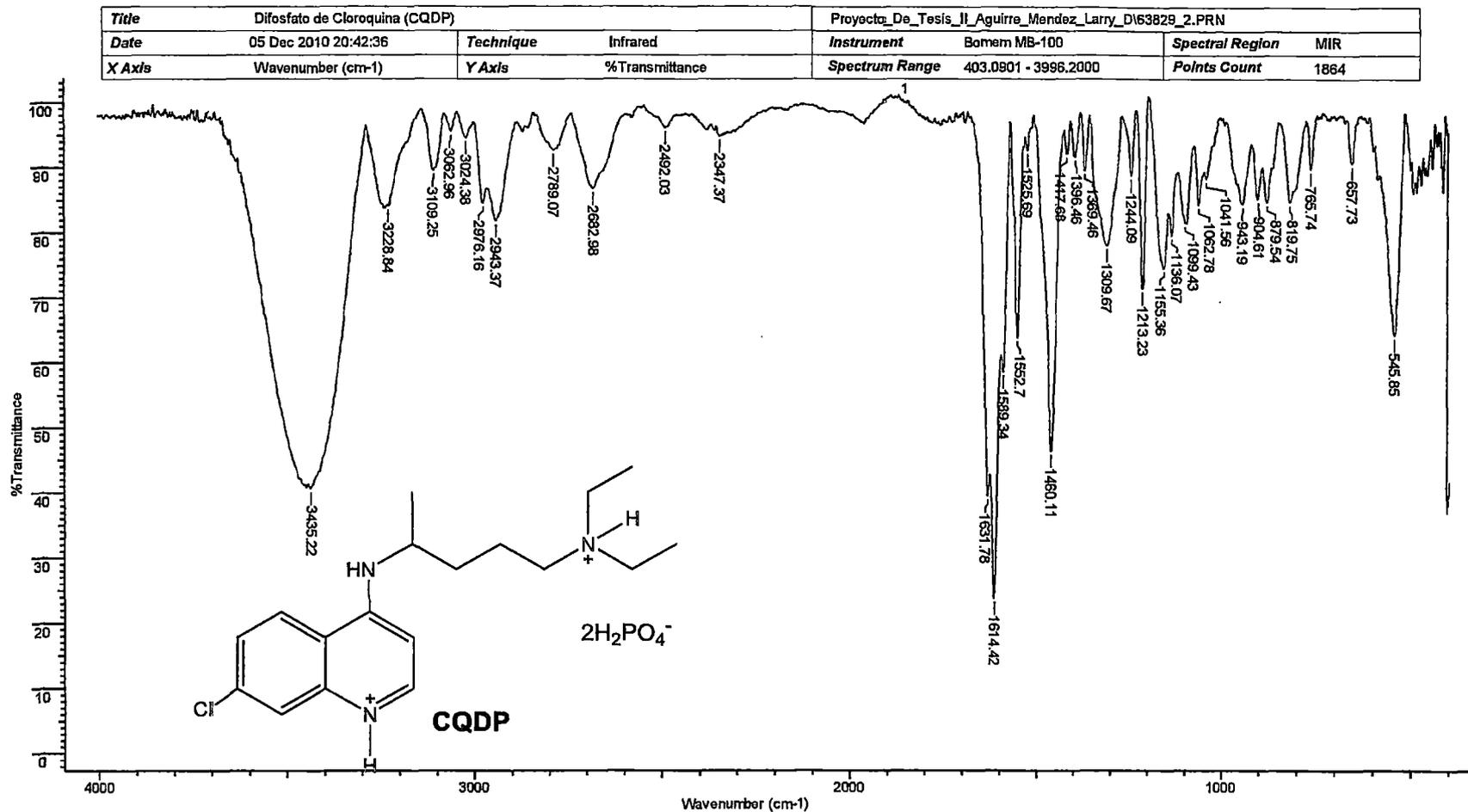


Figura 23. Espectro Infrarrojo de la sal difosfato de cloroquina (CQDP) en pastillas de KBr.

4.1.4 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{13}C

En la figura 24-A se muestra el espectro CP/MAS RMN de ^{13}C de la CQ base, donde se aprecian 16 señales diferentes de carbono, cuya asignación se logró haciendo uso de las técnicas de NQS (Supresión no cuaternaria), y tiempo de adquisición (p15) = 200 μs , cuyos resultados se muestran en las figuras 24-B y 24-C respectivamente. Adicionalmente, las asignaciones para cada átomo de carbono se verificaron usando espectros RMN de ^{13}C en solución (DMSO- d_6)⁹⁵ y por comparación con resultados experimentales y teóricos en el estado sólido llevados a cabo por De Dios y col.⁹⁹

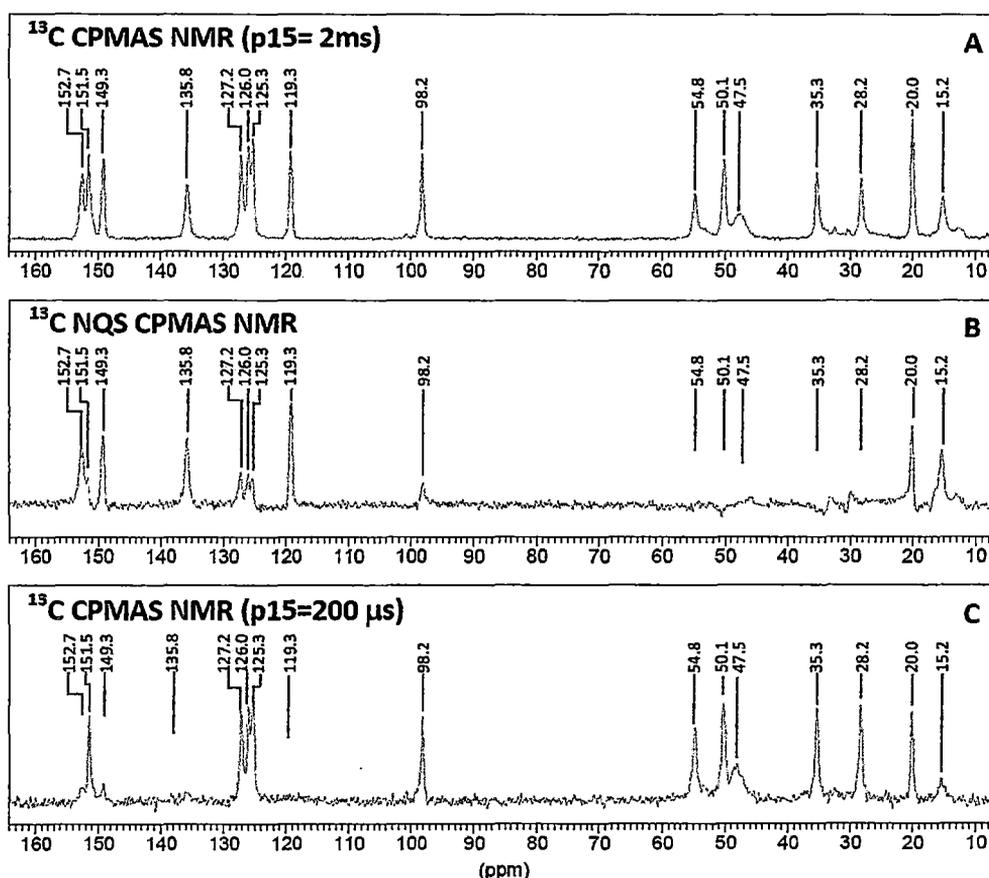


Figura 24. Espectros CP/MAS RMN de ^{13}C de la CQ base.

En el espectro NQS CP/MAS RMN de ^{13}C (figura 24-B) se encuentra que los carbonos cuaternarios C_4 , C_9 , C_7 y C_{10} (ver notación en la figura 21 o en anexos) aparecen a 152.7, 149.3, 135.8 y 119.3 ppm respectivamente. Además, se observan carbonos metilos a 15.2 y

20.0 ppm (señales ligeramente disminuidas). El último valor de desplazamiento químico se debería al solapamiento de señales de un carbono C_6 y el carbono C_1 . Los dos carbonos C_6 presentan desplazamientos diferentes debido a su inequivalencia química en el estado sólido. Si bien la diferencia de 4.8 ppm entre ambos carbonos es mayor a los 2 ppm previstos en los cálculos *ab initio* de De Dios y col., esto se debería a efectos del empaquetamiento en el sólido.¹⁰⁰

El tiempo de adquisición del espectro CP/MAS RMN de ^{13}C en la figura 24-C favorece únicamente la observación de carbonos unidos a hidrógenos. Los $\delta(^{13}\text{C})$ a 28.2, 35.3, 47.5 y 54.8 ppm corresponden a los carbonos metilenos C_3 , C_2 , C_5 , y C_4 ; mientras que el carbono metino C_1 aparece a $\delta = 50.1$ ppm debido a que se encuentra más protegido que el carbono C_4 . Como se mencionó antes en el estado sólido no existen carbonos equivalentes; por tanto, los dos carbonos C_5 tampoco presentan igual δ . Si bien, se esperaba una diferencia de 10 ppm entre ambos carbonos, experimentalmente fue de 2.6 ppm ($\delta = 50.1$ y 47.5 ppm para los carbonos C_5) por los efectos de empaquetamiento antes mencionado. Dado que los desplazamientos químicos para los carbonos metino del anillo quinolinico se encuentra en los rangos esperados (figura 24-A y 24-C) su asignación resulta más sencilla: $\delta(C_3)=98.2$, $\delta(C_5)=125.3$, $\delta(C_6)=126.0$, $\delta(C_2)=151.5$ ppm. La tabla 7 resume los resultados encontrados y la correspondiente asignación de cada carbono.

Tabla 7. Asignaciones de $\delta(^{13}\text{C})$ en solución y en estado sólido de la CQ.

| Carbono N° (C_n , figura 24) | δ (ppm) relativo al TMS | |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| | En DMSO- d_6 (95) | En estado sólido |
| 2 | 151.8 (151.85) | 151.5 |
| 3 | 98.8 (98.79) | 98.2 |
| 4 | 149.5 (149.6) | 152.7 |
| 5 | 124.3 (124.40) | 126.0 |
| 6 | 123.7 (123.71) | 125.3 |
| 7 | 133.3 (133.36) | 135.8 |
| 8 | 127.4 (127.55) | 127.2 |
| 9 | 149.3 (149.47) | 149.3 |
| 10 | 117.5 (117.67) | 119.3 |

Tabla 7. Asignaciones de δ (^{13}C) en solución y en estado sólido de la CQ.

| Carbono N ^o (C _n , figura 24) | δ (ppm) relativo al TMS | |
|--|--|------------------|
| | En DMSO- <i>d</i> ₆ (⁹⁵) | En estado sólido |
| 1' | 47.5 (47.72) | 50.1 |
| 2' | 33.3 (33.46) | 35.3 |
| 3' | 23.4 (23.60) | 28.2 |
| 4' | 52.1 (52.25) | 54.8 |
| 5' | 46.1 (46.27) | 47.5 (50.1)* |
| 6' | 11.6 (11.7) | 15.2 (20.0)* |
| 1'' | 19.8 (19.83) | 20.0 |

* Los pares de carbonos 5' y 6' no presentan equivalencia química en el estado sólido.

4.1.5 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{15}N

El espectro CP/MAS RMN de ^{15}N de la cloroquina obtenida (figura 25) es de más fácil interpretación y asignación. El ambiente químico de cada nitrógeno es diferente por lo que el rango en el que aparece su señal es diferente: El N quinolínico (N₁ en la notación usada, figura 21) es el menos protegido por lo que aparece a $\delta = -120.6$ ppm; el N tipo anilina (N₄ en la notación usada, figura 21) aparece a $\delta = -278.3$ ppm; y el N trialquilamínico (N_{4'} en la notación usada, figura 21) que es el más protegido aparece a $\delta = -329.1$ ppm. La asignación propuesta está conforme a los resultados tanto en solución como en estado sólido publicados y encontrados experimentalmente (tabla 8).⁹⁹

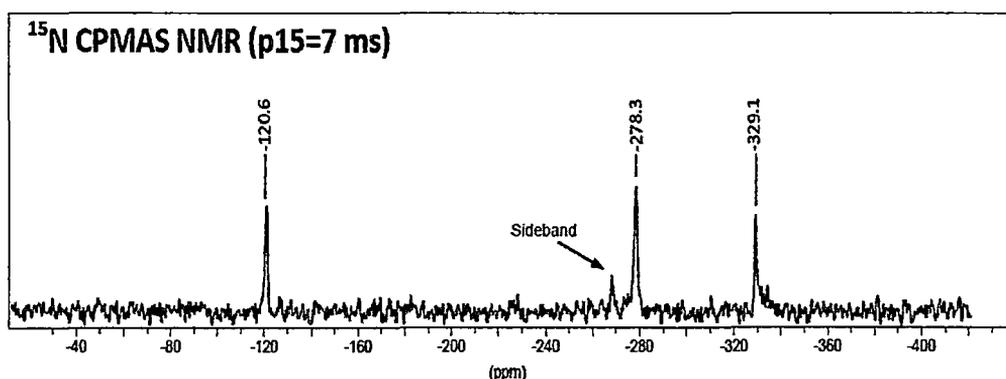


Figura 25. Espectro CP/MAS RMN de ^{15}N de CQ base.

Tabla 8. Asignaciones de $\delta(^{15}\text{N})$ en solución y en estado sólido de la CQ.

| Nitrógeno N° | δ (ppm) relativo al CH_3NO_2 | |
|--------------|---|------------------|
| | En $\text{DMSO-}d_6$ | En estado sólido |
| 1 | -111,6 | -120,6 |
| 4 | -285,7 | -278,3 |
| 4' | -336,1 | -329,1 |

4.2 CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LA METALOCOLORQUINA AgCQNO_3

El complejo sintetizado AgCQNO_3 es un polvo blanco sensible a la luz, insoluble en la mayoría de solventes (n-hexano, cloroformo, acetonitrilo, metanol, agua, etc), soluble en DMSO, donde se descompone lentamente precipitando plata metálica al cabo de unos días expuesto a la luz por lo que fue imposible su recristalización. Se funde a $\sim 150^\circ\text{C}$ formando un líquido oscuro.

4.2.1 Análisis elemental (C, H, N y Ag)

Tabla 9. Contenido de C, H, N y Ag calculado y experimental de dos muestras del complejo AgCQNO_3 .

| $\text{AgC}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$ | % Teórico | % Experimental | |
|---|-----------|----------------|-------|
| Ag | 22.03 | 22.4 | 22.5 |
| C | 44.14 | 44.11 | 44.18 |
| H | 5.35 | 5.23 | 5.29 |
| N | 11.44 | 11.24 | 11.20 |

Los resultados calculados y experimentales (tabla 9) concuerdan en la fórmula empírica $\text{AgC}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{ClO}_3$, que corresponde a una estequiometría $\text{CQ}:\text{AgNO}_3$ (1:1).

Tomando en cuenta que la química de coordinación de la CQ (capítulo II), sugiere como puntos de coordinación más favorables los nitrógenos quinolínico y trialkilamino (N_1 y N_4 , en la notación usada, figura 21), siendo N_1 preferente para los ácidos blandos como la $Ag(I)$. Considerando que la $Ag(I)$ presenta preferencia por números de coordinación de 2-4, el valor más bajo (2) lo alcanza uniéndose a dos grupos ligantes de la CQ, mientras que una posible coordinación de los iones nitratos completaría un número de coordinación más alto (3 o 4). Los números de coordinación más altos no serían posibles por las características fisicoquímicas del complejo obtenido.⁶⁶

De las consideraciones hechas, la estequiometría encontrada hace posible predecir que el complejo obtenido es un dímero (similar al $[Ru_2CQ_2Cl_2]^{16}$) o un polímero (figura 26).

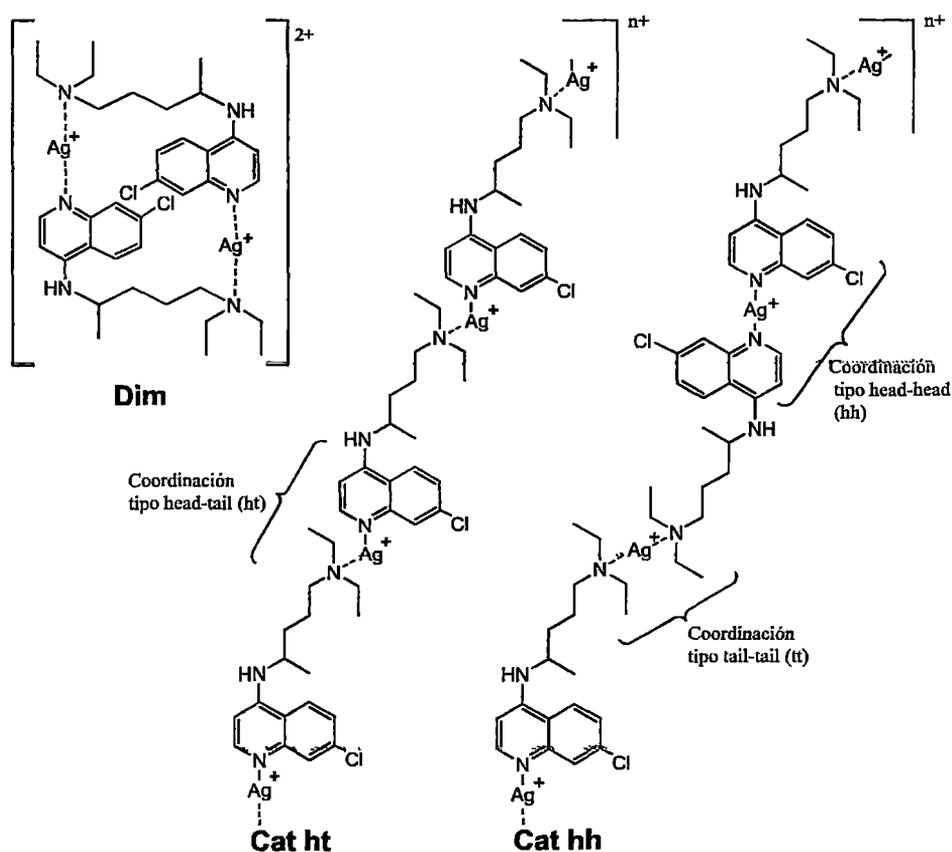


Figura 26. Estructuras probables para la metalocloroquina $AgCQNO_3$: el Dímero $Ag_2CQ_2^{2+}$ (Dim) y dos polímeros $[AgCQ]^{n+}$ (Cat-ht y Cat-hh). No se ha tomado en cuenta los iones NO_3^- por sus diferentes posibilidades de coordinación que se discuten más adelante.

4.2.2 Análisis de los espectros FTIR

El espectro FTIR del complejo AgCQNO_3 (figura 27) muestra todas las bandas características del ligando CQ, así como bandas que se deberían al anión nitrato presente (tabla 10).

Tabla 10. Identificación de grupos funcionales en el compuesto AgCQNO_3 y su comparación con el ligando libre CQ.

| Grupo funcional | Número de onda (cm^{-1}) | |
|---|-------------------------------------|-----------|
| | AgCQNO_3 | CQ |
| N-H (N tipo anilina) | 3336 | 3231 |
| C-H aromático | 3107-3070 | 3105-3014 |
| C-H alifático (CH_2 y CH_3) | 2995-2839 | 2962-2802 |
| C=C (carbocíclico) | 1610 | 1612 |
| C=N | 1570 | 1587 |
| C=C (heterocíclico) | 1593 | 1572 |
| N-H (N tipo anilina) | 1543 | 1547 |
| C-NH | 1329 | 1329 |
| C-N | 1143 | 1161 |
| $\nu_3(\text{NO}_3)$ | 1359 | |
| $\nu_2(\text{NO}_3)$ | 847 | |
| $\nu_4(\text{NO}_3)$ | 743 | |
| $\nu(\text{Ag-N})$ | 455 | |
| $\nu(\text{Ag-N})$ | 415 | |

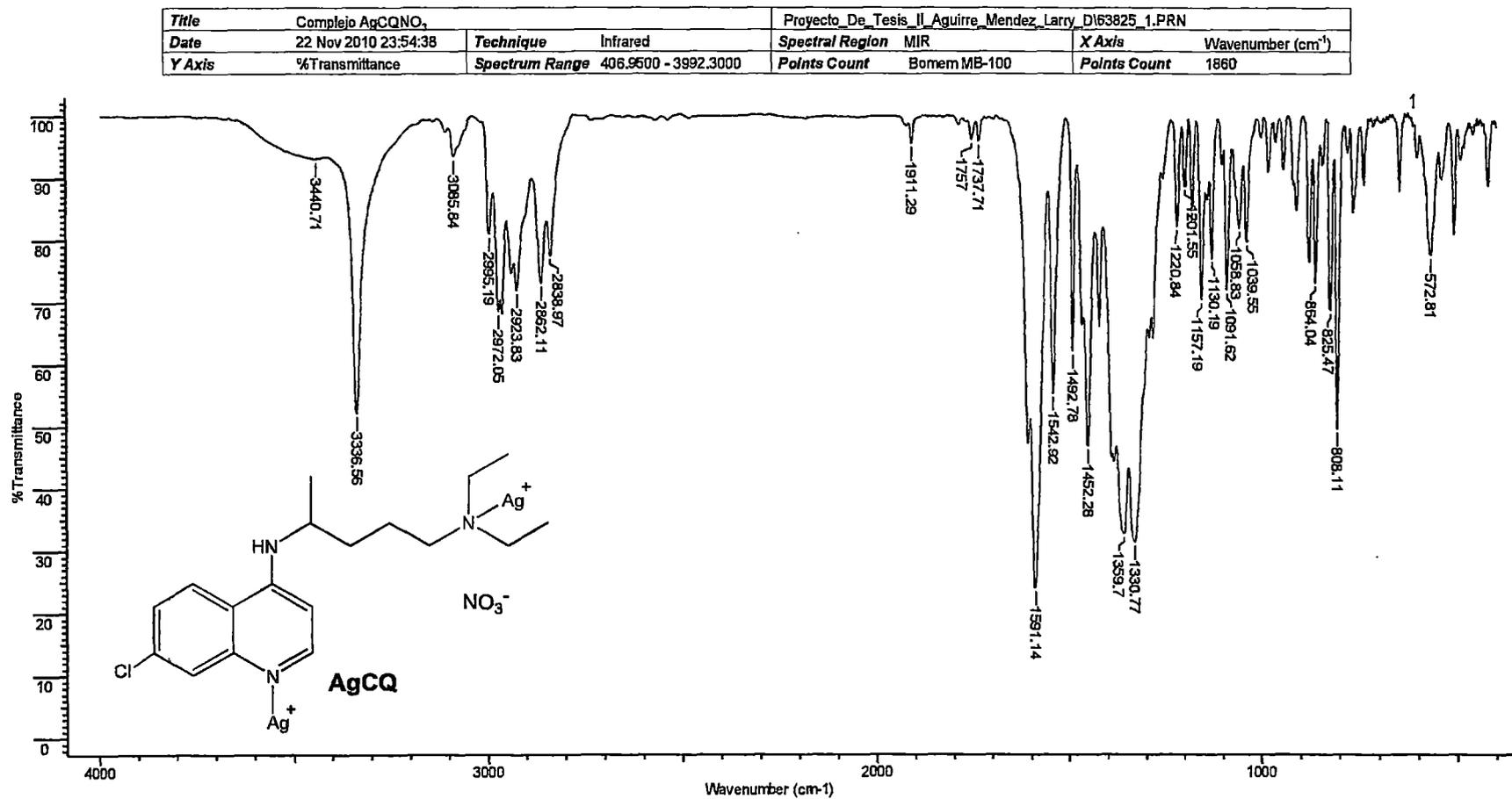


Figura 27. Espectro Infrarrojo del complejo AgCQNO₃ en pastillas de KBr.

Para una mejor comprensión; a continuación se muestra un análisis detallado de las zonas más importantes del espectro infrarrojo del complejo (figura 27).

En la zona entre $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ ambos espectros (ligando y complejo, figura 28), presentan las bandas de tensión características del grupo N-H tipo anilina; y de los enlaces C-H aromáticos ($C_{sp^2}\text{-H}$) y alifáticos ($C_{sp^3}\text{-H}$) de la CQ.

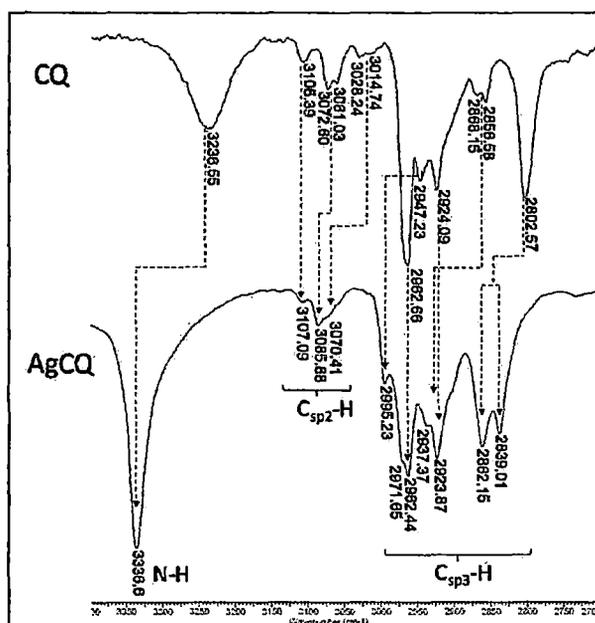


Figura 28. Fragmento ampliado en la región $3400 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

Las observaciones más importantes en la figura 28 son:

- El complejo presenta la banda $\nu(\text{N-H})$ desplazada a mayor frecuencia y más intensa, que se debería a la pérdida de asociaciones por puente de hidrogeno ($\text{N-H}\cdots\text{N}$) presentes en el ligando en estado sólido (figura 29), similar al CQDP (figura 23), mas no por la formación de enlace metal-ligando a través de este nitrógeno.

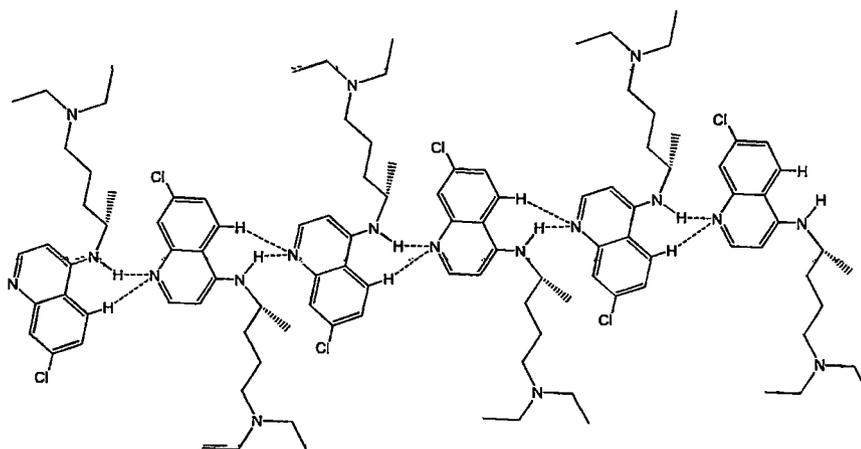


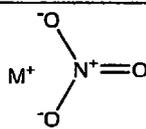
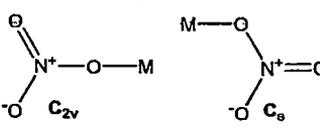
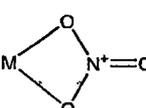
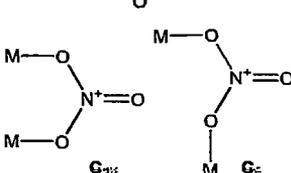
Figura 29. Enlaces puentes de hidrógeno en la molécula de CQ¹⁰¹

- El grupo de bandas $\nu(\text{C-H})$ aromáticas de la CQ están desplazadas a mayor frecuencia en el complejo AgCQNO_3 .
- Las bandas $\nu(\text{C-H})$ a 2947 y 2866 (2856) cm^{-1} de tensión simétrica y asimétrica de los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) enlazados al nitrógeno trialquilamino están desplazados hasta 2995 y 2937 (2923) cm^{-1} en el complejo.
- Las bandas $\nu(\text{C-H})$ a 2963 y 2924 cm^{-1} que corresponden a la tensión simétrica y asimétrica de los grupos metilos ($-\text{CH}_3$) permanecen sin variación; mientras que la banda $\nu(\text{C-H})$ a 2803 cm^{-1} del carbono enantiomero ($\text{C}_{1''}$)¹⁰² presenta dos bandas en el complejo.

Debido a las variaciones observadas en estas bandas existiría coordinación del ion $\text{Ag}(\text{I})$ a través de los nitrógenos quinolínico y trialquilamino (N_1 y N_4 en la notación usada).

La región entre 2500 y 1600 cm^{-1} es usada para identificar bandas relacionadas con los aniones nitratos y determinar el tipo de coordinación de este ion en sus complejos. Por tanto, es necesario hacer una breve descripción de los modos de coordinación del ion nitrato, y como esto afecta su simetría vibracional y su identificación mediante espectroscopía infrarroja.

Tabla 11. Tipos de coordinación del ion nitrato en sus complejos.

| Tipo de coordinación | Estructura | Simetría |
|------------------------|---|------------------|
| Iónico (no coordinado) |  | D_{3h} |
| Monodentado |  | C_{2v} o C_s |
| Bidentado |  | C_{2v} |
| Puente |  | C_{2v} o C_s |

Si bien existe una amplia variedad de modos de coordinación del ion nitrato,¹⁰³ los más comunes en complejos metálicos (tabla 11 y figura 30) son:

1) **IÓNICO**. De simetría D_{3h} , presenta seis modos normales de vibración, de los cuales dos están doblemente degenerados (tabla 12, figura 30). El modo vibracional ν_1 (A_1') es inactivo en el infrarrojo.

Tabla 12. Frecuencias de absorción y asignaciones para el ion nitrato (D_{3h}).¹⁰⁴

| Frecuencia (cm^{-1}) | Vibración | Asignación |
|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 1050 | ν_1 (A_1') | tensión NO_2 (simétrica) |
| 831 | ν_2 (A_2'') | flexión fuera del plano |
| 1390 | ν_3 (E') | tensión NO_2 (asimétrica) |
| 720 | ν_4 (E') | flexión en el plano |

A \equiv vibración simétrica respecto al eje principal de rotación; E \equiv vibración doblemente degenerada.

2) **MONODENTADO, BIDENTADO**. Cuando el ión nitrato se coordina a un metal, disminuye su simetría de D_{3h} a C_{2v} (o C_s), la doble degeneración de los modos E' se desdobra en dos componentes (A_1 y B_1), resultando todos los seis modos vibracionales activos en el infrarrojo

(tabla 13 y figura 30). La separación entre las bandas ν_4 y ν_1 ha sido usada para diferenciar entre la forma monodentada y bidentada del nitrato coordinado, y su magnitud depende de la naturaleza del metal y su estado de oxidación.¹⁰⁵

Tabla 13. Frecuencias de absorción y asignaciones para el ion nitrato (C_{2v}).¹⁰⁶

| Frecuencia (cm^{-1}) | Vibración | Asignación |
|---------------------------------|--------------|------------------------------------|
| 1034-970 | ν_2 (A1) | tensión N-O |
| 800-781 | ν_6 (B2) | flexión fuera del plano |
| 1531-1481 | ν_4 (B1) | tensión NO_2 (asimétrica) |
| 1290-1253 | ν_1 (A1) | tensión NO_2 (simétrica) |
| 739 | ν_3 (A1) | flexión NO_2 (simétrica) |
| 713 | ν_5 (B1) | flexión NO_2 (asimétrica) |

B = vibración antisimétrica con respecto al eje de rotación de mayor orden.

3) PUENTE INTRA O INTERMOLECULAR, uniendo dos centros metálicos o entre un centro metálico y otro átomo (tabla 11). Debido a su baja simetría presenta los seis modos vibracionales activos en el infrarrojo semejante al nitrato monodentado y bidentado.

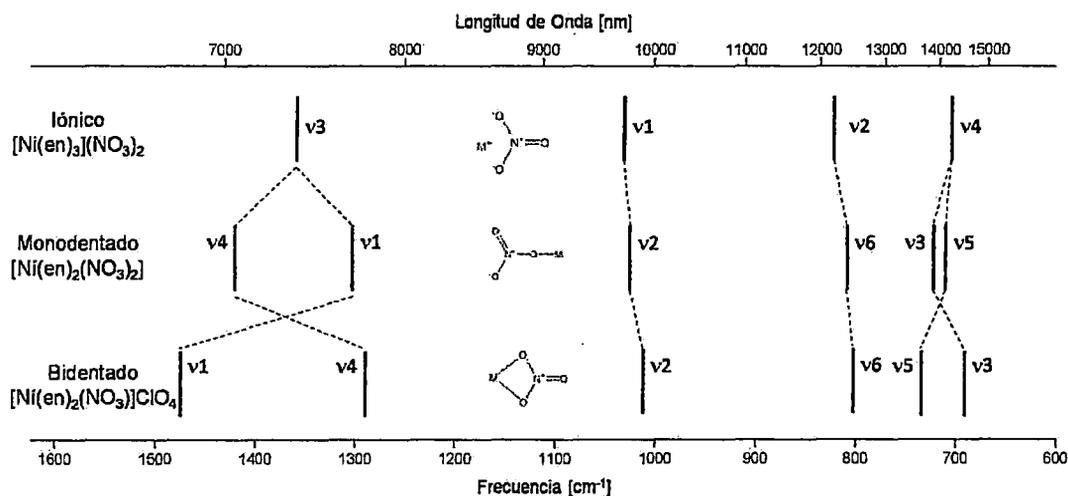


Figura 30. Posición de las bandas de nitratos en el espectro infrarrojo.¹⁰⁷

Si bien en el complejo las bandas del ligando CQ impiden diferenciar con claridad las bandas del grupo nitrato, se han encontrado bandas a 1359, 844 y 742 cm^{-1} que corresponderían a un nitrato iónico.

Por otro lado, dos zonas en la región de $2400 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ aportan valiosa información de los grupos nitratos debido a la aparición de bandas que resultan de la combinación de bandas simples. Muchos estudios al respecto sirven de soporte para identificar el tipo de coordinación existente en sus complejos metálicos.

La zona entre $2400 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ se caracteriza por la presencia de bandas débiles y anchas, debido a la combinación de las bandas de tensión de los nitratos. El nitrato iónico presenta una única banda de la combinación $(\nu_1 + \nu_3)$,¹⁰⁷ mientras que los nitratos coordinados presentan dos bandas debido a las combinaciones $(\nu_2 + \nu_1)$ y $(\nu_2 + \nu_4)$.¹⁰⁸ Estas bandas aparecen más separadas cuando se tienen nitratos bidentados con un mínimo experimental de $\sim 190 \text{ cm}^{-1}$.¹⁰⁷ El complejo AgCQNO_3 exhibe bandas de baja intensidad en $2363 - 2330 \text{ cm}^{-1}$ propias del ligando, además de una banda a 2397 cm^{-1} que se debería a la combinación $(\nu_1 + \nu_3)$ de un nitrato iónico (figura 31).

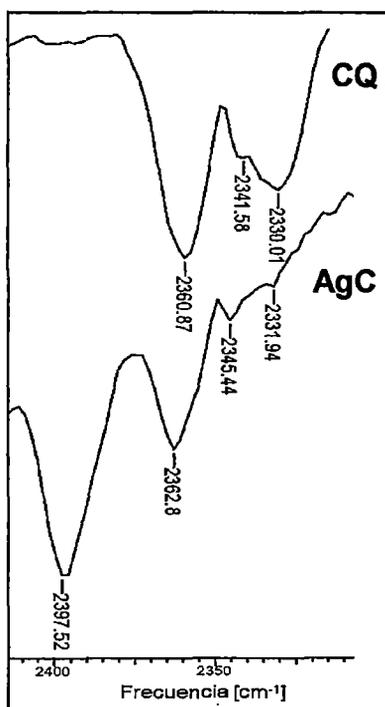


Figura 31. Fragmento ampliado en la región $2430 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ del espectro Infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

Una segunda zona de interés en los complejos de nitratos se encuentra entre $1800 - 1700 \text{ cm}^{-1}$. En esta zona el nitrato iónico presenta una única banda alrededor de 1760 cm^{-1} debido

a la combinación ($\nu_1 + \nu_4$),¹⁰⁷ mientras que los nitratos coordinados presentan dos bandas debido a las combinaciones ($\nu_2 + \nu_5$) y ($\nu_2 + \nu_3$).¹⁰⁸ Para diferenciar entre los modos de coordinación (monodentado o bidentado) se ha propuesto que la diferencia de bandas ($\Delta\nu$) para el nitrato monodentado es de 5 - 26 cm^{-1} , mientras que para el nitrato bidentado es de 20 - 66 cm^{-1} . En los casos que ocurren ambos modos de coordinación y/o adicionalmente existe la presencia de nitrato iónico se observan hasta cuatro bandas con separaciones aún menores (figura 32).¹⁰⁵ La intensidad de las bandas decrece en el orden iónico, monodentado y bidentado.¹⁰⁷

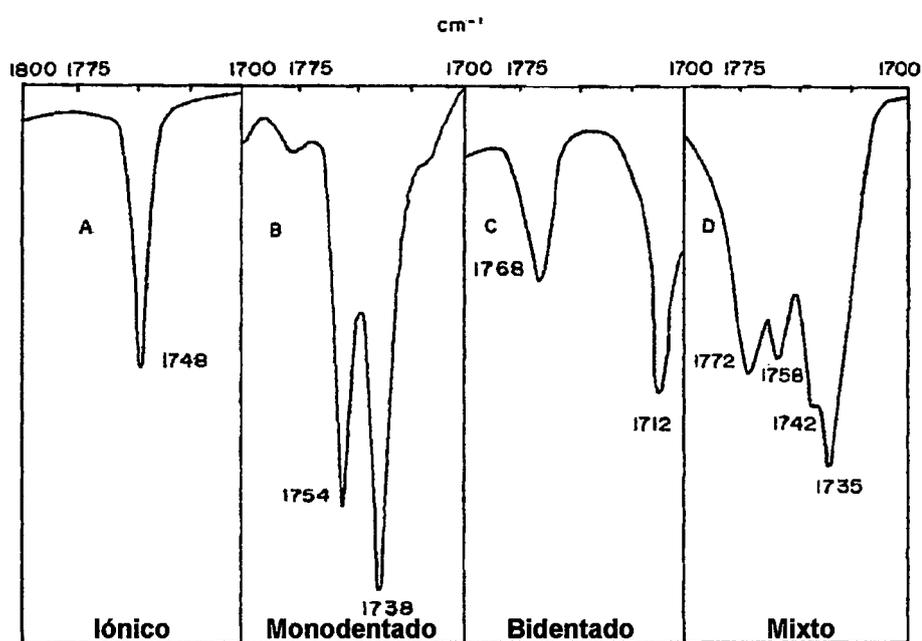


Figura 32. Bandas de combinación típicas de complejos con nitratos (A) iónico $\text{Cu}(\text{asym-Et}_2\text{en})_2(\text{NO}_3)_2$, (B) coordinado monodentado $\text{Co}(\text{asym-Me}_2\text{en})(\text{NO}_3)_2$, (C) bidentado $\text{Ni}(\text{Py})_2(\text{NO}_3)_2$, (D) mezcla de ambos $\text{Co}(\text{3-Pic})_3(\text{NO}_3)_2$.¹⁰⁵

A pesar de la presencia de bandas del ligando CQ en esta zona, en el complejo se logra apreciar una banda a 1755 cm^{-1} ausente en el ligando, que se debería la combinación ($\nu_1 + \nu_4$) del nitrato iónico (figura 33).

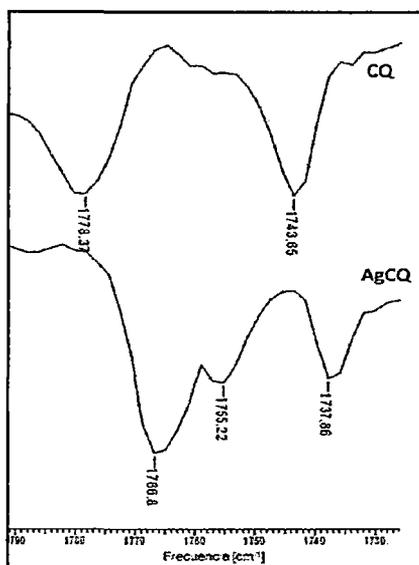


Figura 33. Fragmento ampliado en la región $1800 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro Infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

La región entre $1650 - 800 \text{ cm}^{-1}$ muestra las bandas características del ligando. La posición de dichas bandas y su asignación hacen posible determinar la presencia de enlaces metal-ligando, basado en los desplazamientos de dichas bandas.

Las bandas intensas entre $1613 - 1570 \text{ cm}^{-1}$ se asignan a las vibraciones de tensión en el anillo quinolínico. Si bien no se observa un apreciable desplazamiento de la banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ del anillo carbocíclico, si presenta un significativo desplazamiento ($\Delta\nu \approx 21 \text{ cm}^{-1}$) en la banda $\nu(\text{C}=\text{C})$ del anillo heterocíclico. Además, junto a la banda a 1571 cm^{-1} del ligando CQ se observa un hombro correspondiente a la tensión $\nu(\text{C}=\text{N})$, que en el complejo aparece a menor frecuencia junto a la banda a 1593 cm^{-1} (figura 34). Estos desplazamientos en las bandas del anillo quinolínico apuntan a la coordinación del ion Ag(I) a través del nitrógeno quinolínico N_1 . La banda correspondiente al grupo NH tipo anilina (1546 cm^{-1}) presenta un desplazamiento demasiado pequeño para afirmar su posible coordinación al ion metálico.

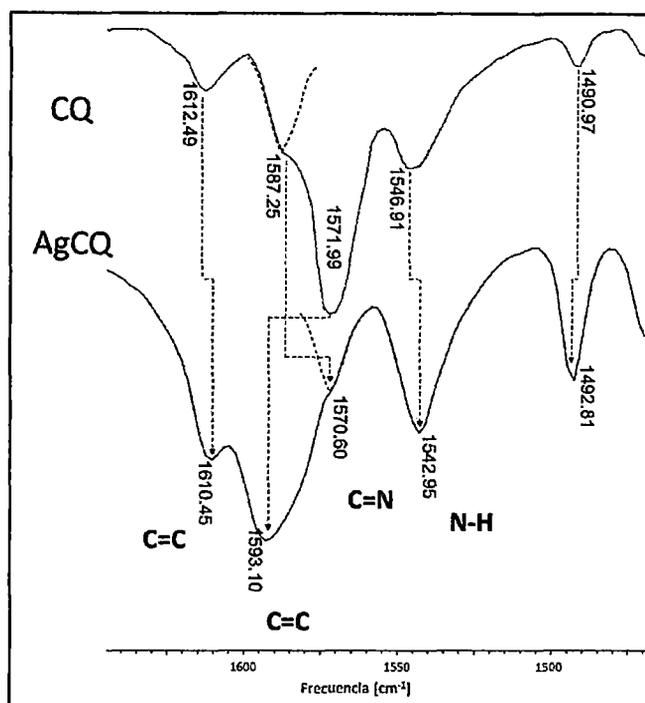


Figura 34. Fragmento ampliado en la región $1650 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO₃.

Si bien en la región de $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ los espectros muestran muchas bandas del ligando CQ, se mencionan aquellas que resultan importantes para confirmar o rechazar una posible coordinación al ion Ag(I):

- En la zona de $1400 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ (figura 35) las bandas referentes al anillo aromático ($1383 - 1375 \text{ cm}^{-1}$) en el complejo aparecen desplazadas a mayor frecuencia ($1392 - 1382 \text{ cm}^{-1}$); mientras que las bandas de flexión simétrica de los grupos metilo (1368 cm^{-1}) y de tensión C_{Ar}-NH (1329 cm^{-1})¹⁰⁹ aparecen casi a la misma frecuencia en el complejo AgCQNO₃. En el complejo además sobresale una banda intensa a 1359 cm^{-1} asignable a la tensión asimétrica NO₂ de un nitrato iónico.

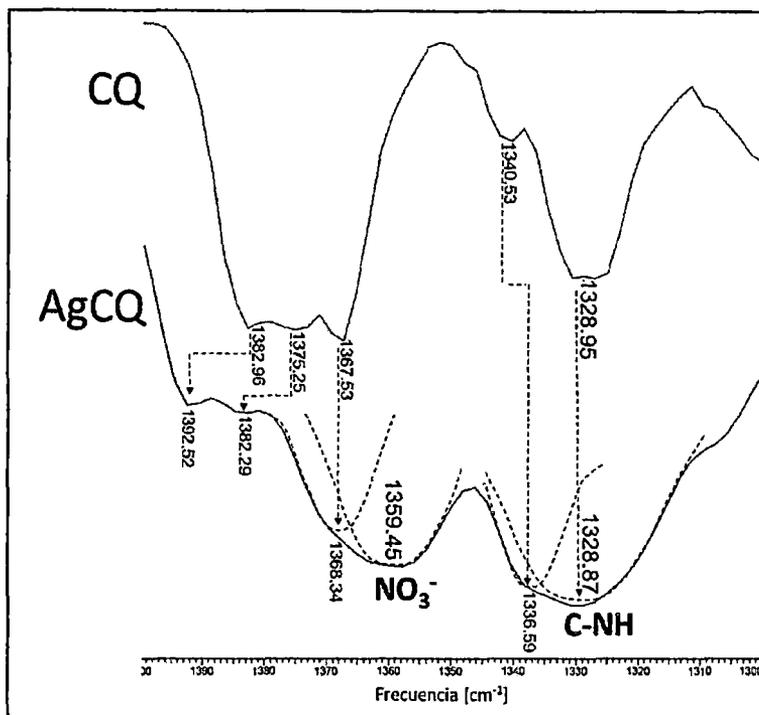


Figura 35. Fragmento ampliado en la región $1400 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

- La zona entre $1200 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ (figura 36) presenta bandas de flexión C-H en el plano del anillo quinolínico junto a una pequeña banda de tensión C-N de la amina terciaria.¹⁰⁹ Si bien en el complejo las bandas C-H no presentan importantes desplazamientos, esto sí ocurre con la banda C-N del grupo trialquilamina.

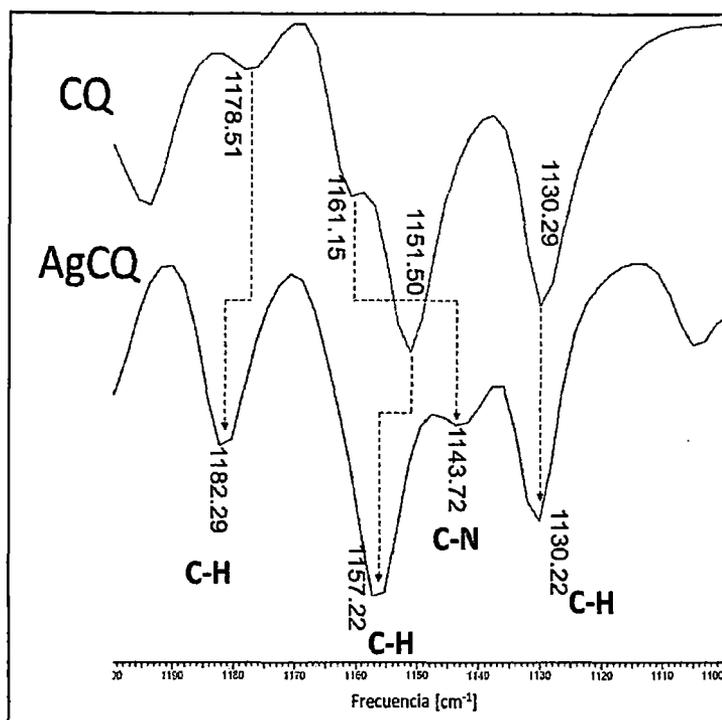


Figura 36. Fragmento ampliado en la región $1200 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

De lo anterior se confirma la existencia de un enlace metal-ligando a través del nitrógeno trialquilamina N_4 y por el contrario una ausencia de enlace a través del nitrógeno tipo anilina N_4 .

La zona entre $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ (figura 37) muestra principalmente bandas C-H aromáticas de flexión fuera del plano ($874 - 800 \text{ cm}^{-1}$), flexión N-H de la amina secundaria (770 cm^{-1}), flexión asimétrica CH_2 en el plano (721 cm^{-1}). Adicionalmente el complejo AgCQNO_3 presenta bandas de flexión en el plano y fuera del plano a 743 y 847 cm^{-1} respectivamente típicas en los nitratos iónicos.

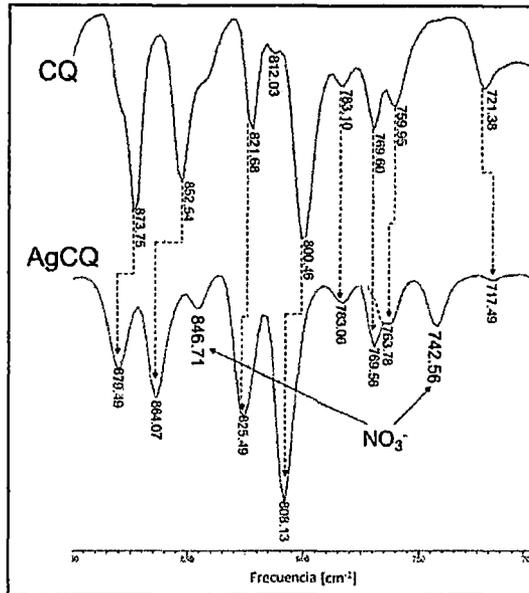


Figura 37. Fragmento ampliado en la región $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

Además, el espectro del complejo AgCQNO_3 presenta 2 bandas de baja intensidad a 455 y 415 cm^{-1} ausentes en el ligando (figura 38), que son asignables a las vibraciones $\nu(\text{Ag-N})$ de los grupos trialquilamino y quinolínico respectivamente. ^{110,111}

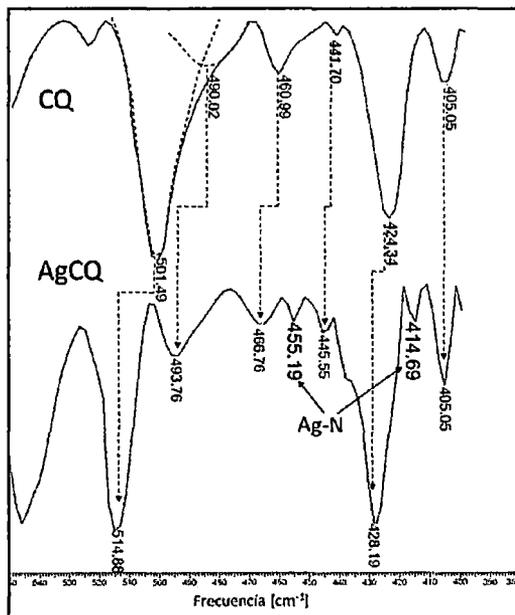


Figura 38. Fragmento ampliado en la región $500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo del ligando CQ y del complejo AgCQNO_3 .

De todo el análisis por FTIR discutido antes se puede concluir que el complejo AgCQNO_3 consiste en un polímero tipo $[\text{AgCQ}]_n^{\text{n}+}$ donde los iones Ag(I) están enlazados a la CQ a través de los nitrógenos quinolínicos y trialquilamino (N_1 y N_4 en la notación usada) y los iones nitratos se encuentran actuando como contraiones fuera de la esfera de coordinación.

4.2.3 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{13}C

Debido a su falta de solubilidad, el complejo AgCQNO_3 no produce cristales para su estudio por difracción de rayos X y la obtención de sus espectros RMN en solución resulta complicado por su falta de estabilidad en DMSO (Ver anexo A6). Por tal motivo se recurrió al análisis poco convencional de RMN en estado sólido (CP/MAS RMN).

Con las asignaciones hechas en la sección 4.1.4 para todos los carbonos en el ligando, resulta más sencillo realizar la interpretación del espectro CQ/MAS RMN de ^{13}C (figura 39-A) para el complejo AgCQNO_3 valiéndonos de la técnica de supresión no cuaternaria NQS (figura 39-B). Así, los desplazamientos químicos (δ) a 14,7 y 16,9 ppm corresponden a los carbonos C_6 , no equivalentes, mientras que $\delta = 22,2$ ppm corresponde al carbono $\text{C}_{1'}$. Los grupos metileno presentan δ (ppm) = 32,0 (C_3), 34,5 (C_2), 50,2 y 55,1 (C_5), 60,0 ppm (C_4), mientras que el carbono metino $\text{C}_{1'}$ aparece a $\delta = 50,2$ ppm. Los carbonos metino del anillo quinolínicos aparecen en un rango semejante al ligando (figura 39-A). Los desplazamientos de los carbonos C_2 y C_4 en el complejo están invertidos respecto al ligando como ocurre cuando el nitrógeno quinolínicó está protonado.¹⁰⁹

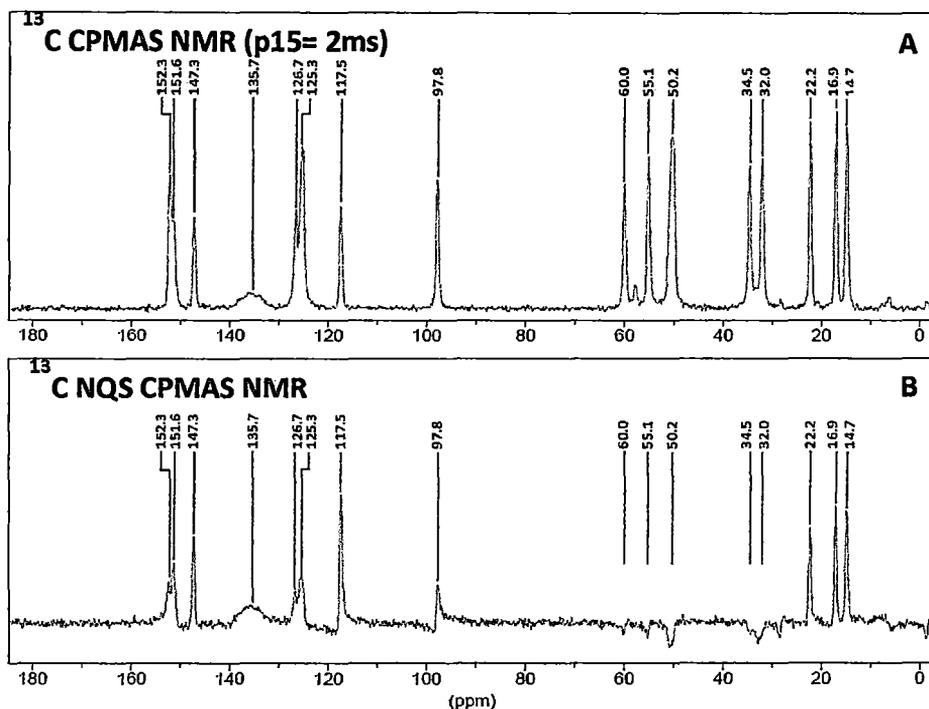


Figura 39. Espectros CP/MAS RMN de ^{13}C del complejo AgCQNO_3 .

La figura 40 y la tabla 14 resumen las diferencias entre los $\delta(^{13}\text{C})$ del ligando libre CQ y el complejo AgCQNO_3 . Además, la tabla 14 muestra la variación de los desplazamientos químicos respecto al ligando libre ($\Delta\delta$), donde sobresalen las variaciones de los desplazamientos químicos para los carbonos aromáticos y los carbonos alrededor del nitrógeno trialquilamina N_4 , mientras que el carbono metino C_1 permanece casi inalterable.

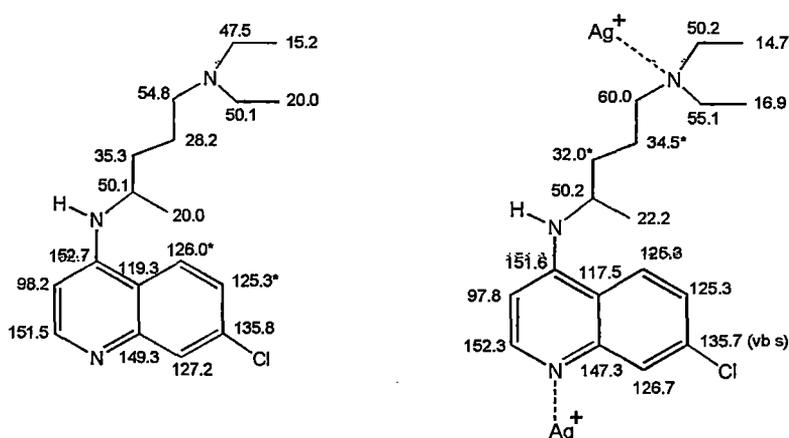


Figura 40. Resumen de los $\delta(^{13}\text{C})$ del ligando CQ (izquierda) y del complejo AgCQNO_3 (derecha).

Tabla 14. Asignaciones de los $\delta(^{13}\text{C})$ en estado sólido del complejo AgCQNO_3 , y su variación respecto al ligando CQ: $\Delta\delta = |\delta(\text{CQ}) - \delta(\text{AgCQNO}_3)|$.

| Carbono (C_n) | δ (ppm) relativo al TMS | $\Delta\delta$ (ppm) |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 2 | 152.3 | 0,8 |
| 3 | 97.8 | 0,4 |
| 4 | 151.6 | 1,1 |
| 5 | 125.3 | 0,7 |
| 6 | 125.3 | 0 |
| 7 | 135.7 | 0,1 |
| 8 | 126.7 | 0,5 |
| 9 | 147.3 | 2 |
| 10 | 117.5 | 1,8 |
| 1' | 50.2 | 0,1 |
| 2' | 34.5 | 0,8 |
| 3' | 32.0 | 3,8 |
| 4' | 60.0 | 5,2 |
| 5' | 55.1 (50.2)* | 5.0 (2.7)* |
| 6' | 16.9 (14.7)* | 3.1 (0.5)* |
| 1'' | 22.2 | 2.2 |

* Los pares de carbonos 5' y 6' no presentan equivalencia química en el estado sólido.

Las variaciones en los desplazamientos observados indican que la formación de enlaces metal-ligando ocurren a través de los nitrógenos quinolínico (N_1) y trialquilamina (N_4).

4.2.4 Análisis de los espectros CP/MAS RMN de ^{15}N

La figura 41 muestra el espectro CP/MAS RMN de ^{15}N del complejo AgCQNO_3 , donde se observan apreciables variaciones en el desplazamiento químico de los nitrógenos quinolínico (N_1) y trialquilamina (N_4) respecto al ligando libre (tabla 15). Además, debido al acoplamiento entre los núcleos de ^{15}N con los de ^{107}Ag y ^{109}Ag (RMN-activos) las señales de los nitrógenos directamente enlazados a iones Ag^+ (N_1 y N_4) se presentan como dobletes en el espectro, mientras que el nitrógeno tipo anilina (N_4) no presenta variación apreciable

en su desplazamiento químico y aparece como singulete por la ausencia de enlace $\text{Ag}^+ - \text{N}_4$. Estos resultados confirman inequívocamente la existencia de enlaces metal-ligando en el complejo AgCQNO_3 , con la participación únicamente de los nitrógenos quinolínico (N_1) y trialquilamina (N_4) como puntos de coordinación a los centros metálicos de Ag^+ .

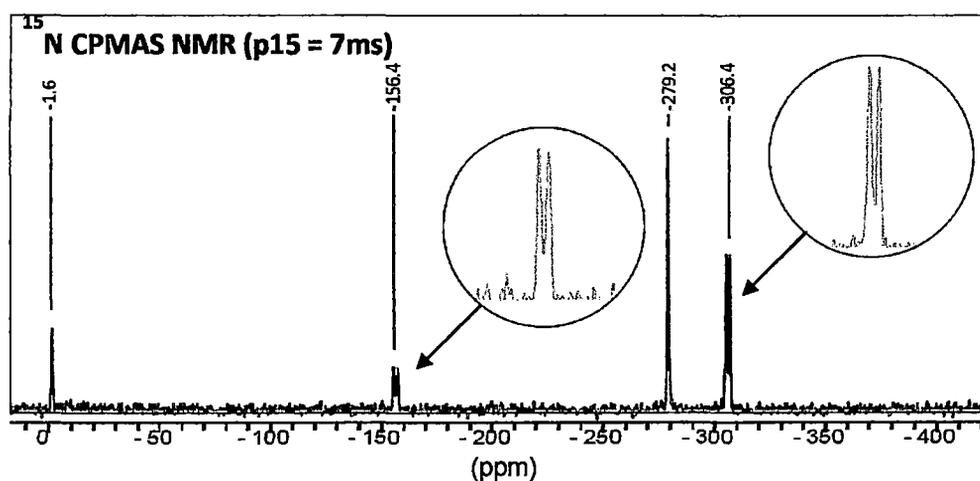


Figura 41. Espectro CP/MAS RMN de ^{15}N del complejo AgCQNO_3 .

La figura 42 y la tabla 15 resumen las diferencias entre los $\delta(^{15}\text{N})$ del ligando libre CQ y el complejo AgCQNO_3 , donde además se muestra el $\delta(^{15}\text{N})$ del ión nitrato.

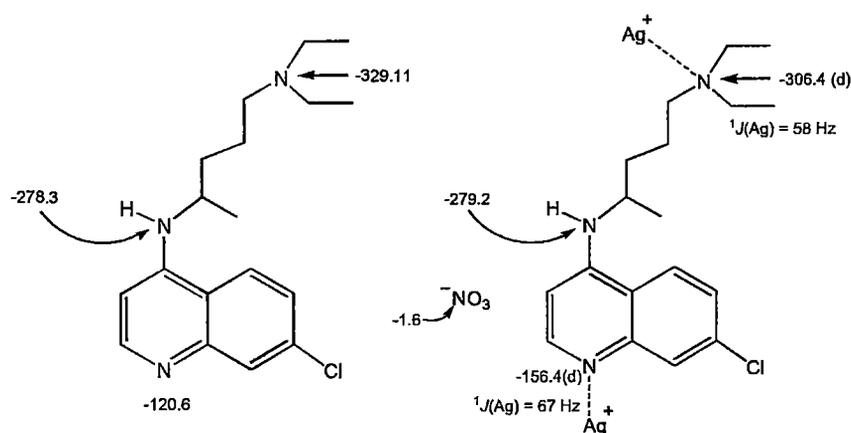


Figura 42. Resumen de los $\delta(^{15}\text{N})$ del ligando CQ (izquierda) y del complejo AgCQNO_3 (derecha).

Tabla 15. Asignaciones de los $\delta(^{15}\text{N})$ en estado sólido del complejo AgCQNO_3 , y su variación respecto al ligando CQ: $\Delta\delta = \delta(\text{CQ}) - \delta(\text{AgCQNO}_3)$.

| Nitrógeno (N_n) | δ (ppm) relativo al CH_3NO_2 | $\Delta\delta$ (ppm) |
|----------------------------|--|----------------------|
| 1 | -156.4 | 35.8 |
| 4 | -279.2 | 0.9 |
| 4' | -306.4 | 22.7 |

* El Nitrógeno de los iones nitrato presenta $\delta = -1.6$ ppm.

4.2.5 Análisis de la conductividad en DMSO

La conductancia molar de la metalocloroquina AgCQNO_3 recién disuelta en DMSO se encuentra en el rango de electrolitos 1:1 sugerido por Geary¹¹² y si bien este rango no está totalmente establecido, la ionización del complejo ($\Lambda_M = 35.3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) es comparable al AgNO_3 ($\Lambda_M = 38.0 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) confirmando que se trata de un electrolito tipo 1:1.¹¹³ De este resultado se extraen dos conclusiones: Primero, la existencia de nitrato fuera de la esfera de coordinación, es decir actuando sólo como contraión de la forma $[\text{Ag}(\text{CQ})]\text{NO}_3$, y no como ligando. Segundo, se descarta la posibilidad del dímero $[\text{Ag}(\text{CQ})]_2[\text{NO}_3]_2$ por ser un electrolito de tipo 1:2. Por lo tanto, la única forma posible del complejo es de un polímero tipo $[\text{AgCQ}]_n[\text{NO}_3]_n$ como se propuso en el análisis por FTIR. El ligando CQ no presenta conductividad en DMSO.

4.2.6 Análisis de los espectros ESI/FT-ICR

El espectro ESI/FT-ICR obtenido del complejo AgCQNO_3 en DMSO (figura 43) muestra tres picos intensos (>40%) que corresponden a los siguientes monocaciones: cloroquina protonada CQH^+ ($m/z = 320.2$), plata-cloroquina AgCQ^+ ($m/z = 428.1$) y cloroquina-plata-cloroquina CQAgCQ^+ ($m/z = 747.3$). Cada pico presenta su respectiva distribución de masa isotópica por la presencia de átomos con más de un isotopo abundante (Ag y Cl).

Otros picos menores (intensidad < 20%) corresponden a los monocaciones: plata libre Ag^+ ($m/z=106.9$), $[\bar{\text{C}}\bar{\text{Q}}\text{-N}(\bar{\text{C}}_2\text{H}_5)_2]^+$ ($m/z=247.1$) que es $\bar{\text{C}}\bar{\text{Q}}$ sin su fragmento $\text{N}(\bar{\text{C}}_2\text{H}_5)_2$; complejo $\text{CQAg}^+(\text{AgCN})$ ($m/z=561.0$); y los dicaciones: CQH^{2+} ($m/z=160$), CQH_2^{2+} ($m/z=160.6$), $\bar{\text{C}}\text{QAg}^{2+}$ ($m/z=214.0$), $\bar{\text{C}}\text{QAgCQ}^{2+}$ ($m/z=373.6$).

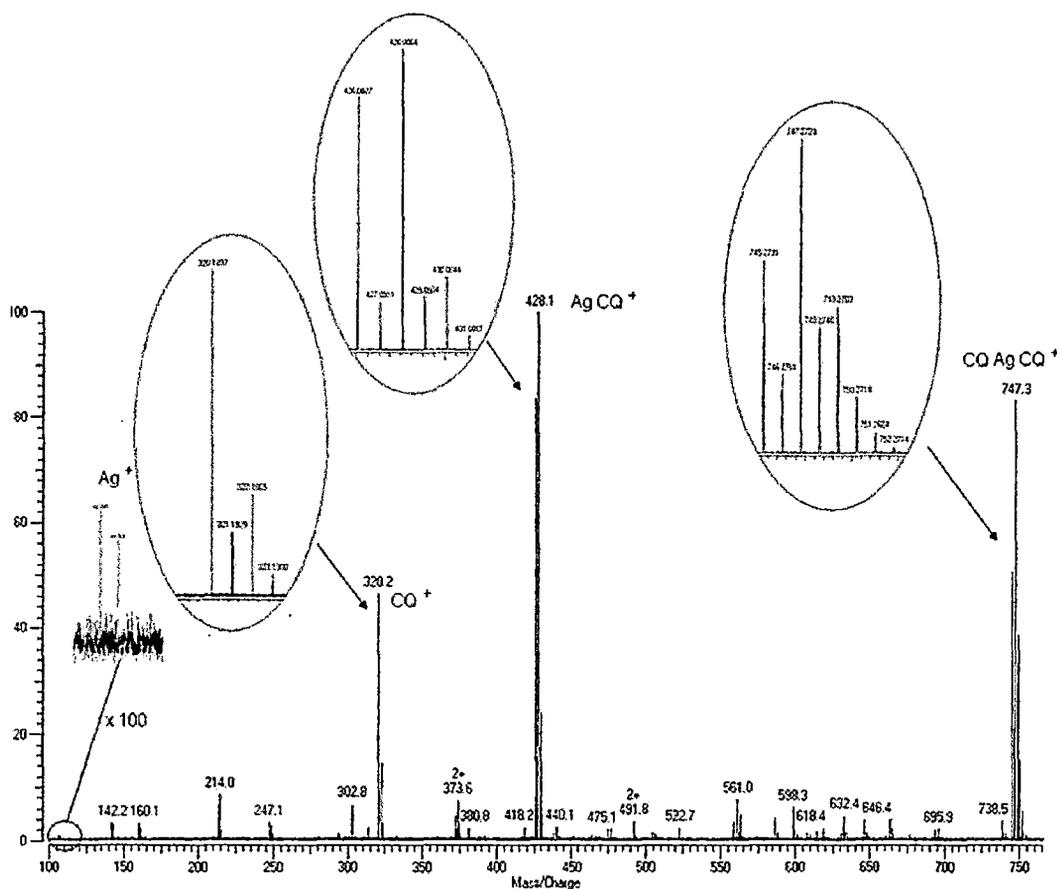


Figura 43. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO_3 en DMSO ($100 \mu\text{g/mL}$).

Para rangos m/z mayores que 700 Da se registraron complejos monocatiónicos del tipo $\text{CQAgCQ}^+(\text{AgCN})_n$ ($n = 0, 1, 2, \dots$) (figura 44), que podrían deberse a productos residuales en el proceso de síntesis, aunque no se descarta que se formen durante un proceso de descomposición del complejo AgCQNO_3 .

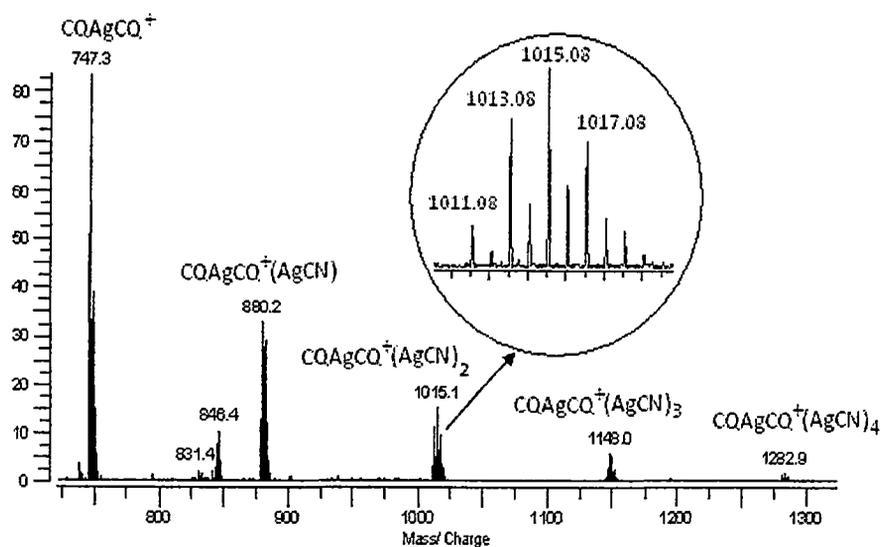


Figura 44. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO_3 en DMSO ($100 \mu\text{g/mL}$) para $m/z > 700$ Da.

El espectro ESI/FT-ICR del complejo en una mezcla de DMSO-Agua (4:96) incluye principalmente cloroquinas protonadas (CQH^+ , CQH^{2+}) y el fragmento $[\text{CQ}-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]^+$ (figura 45). Para este caso en particular no se detectó ningún complejo de plata.

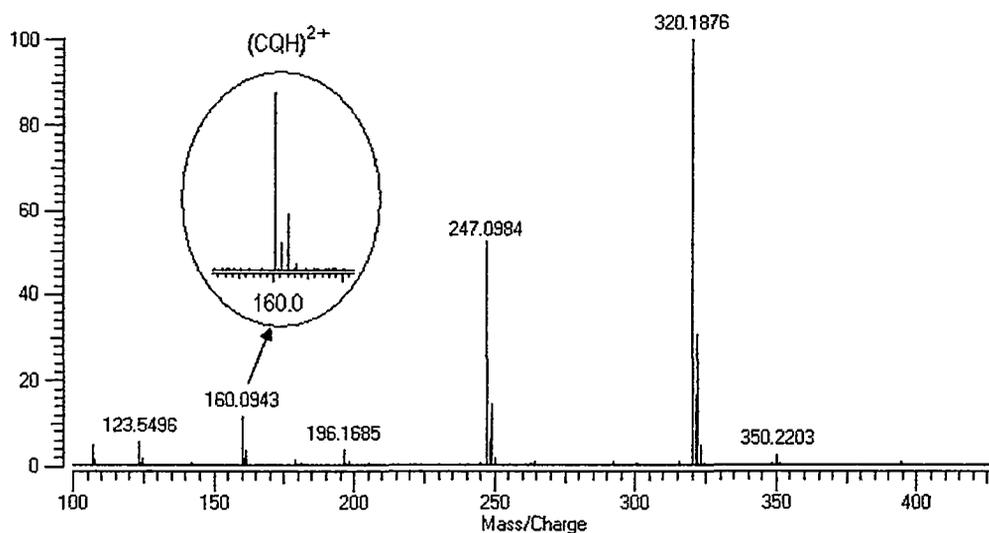


Figura 45. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO_3 en DMSO:agua (4:96, $100 \mu\text{g/mL}$).

El espectro ESI/FT-ICR del complejo en una mezcla de DMSO-ACN (4:96, 100 μ g/mL) presenta, además de los picos del complejo en DMSO, un pico muy pequeño asignable a la especie $(\text{CQAgCQ})^+\text{AgNO}_3$ ($m/z = 916$) (figura 46). Esta señal logra incrementarse para bajas concentraciones del complejo (40 μ g/mL).

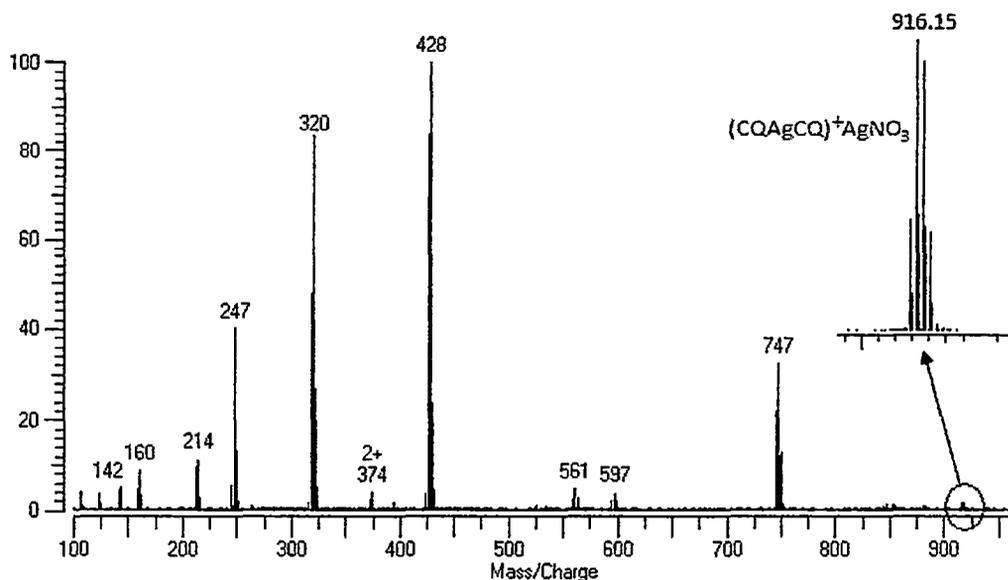


Figura 46. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO_3 , en DMSO:ACN (4:96, 100 μ g/mL).

Los resultados antes descritos son interesantes: Primero, se observa la existencia de dos complejos monoméricos Ag-CQ de estequiometrias 1:1 (AgCQ) y 1:2 (AgCQ_2); Segundo, las especies complejas presentan ausencia de nitrato coordinado, lo que descarta su participación como ligando o que sólo presentaría una débil interacción con el metal. Tercero, además de las especies complejas se ha observado una cantidad apreciable del ligando libre (CQ) y pequeñísimas cantidades de Ag^+ libre, lo que indicaría que todas las especies anteriores serían los primeros productos de descomposición del complejo AgCQNO_3 , que en presencia de agua ocurre de manera mucho más rápida.

Fragmentación por IRMPD (Disociación Multifotónica Infrarroja) de la especie compleja CQAgCQ^+ ($m/z = 747.3$).

El monocatión CQAgCQ^+ fue aislado y luego fragmentado usando pulsos IRMPD de 700 ms (60%P). El espectro de masas de los fragmentos presenta resultados muy similares al espectro del complejo, donde los picos con mayor intensidad Ag^+ ($m/z=106.9$) y AgCQ^+ ($m/z= 428.1$) (figura 47), indican que la disociación del complejo CQAgCQ procede vía pérdida de CQ y Ag^+ según la siguiente secuencia:

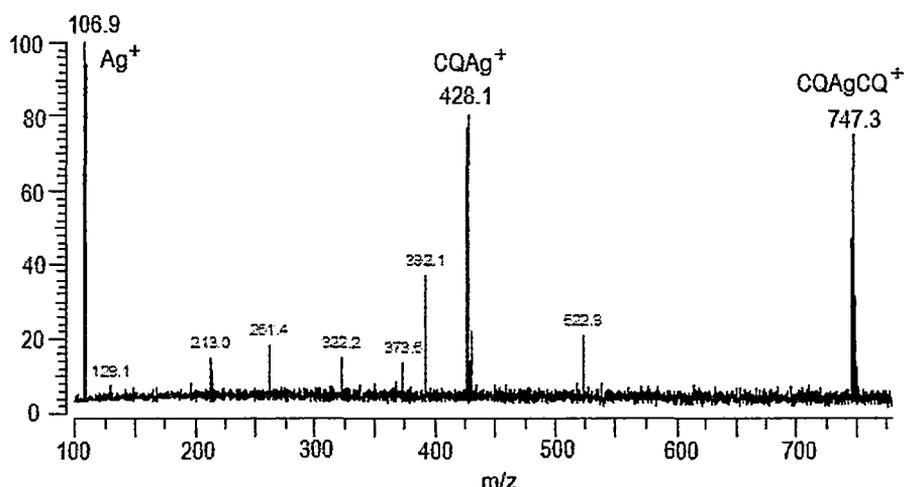


Figura 47. Espectro de masas de la especie CQAgCQ^+ fragmentada por IRMPD.

Para explicar el fenómeno de descomposición del complejo debemos analizar la fuerza de los enlaces metal-ligando en el complejo y como la competencia de los iones Ag^+ y H^+ por el ligando CQ puede afectar la ruptura de estos enlaces favoreciendo la descomposición del complejo. Para determinar la fuerza de enlace relativa $\text{Ag}^+ - \text{N}$ una buena aproximación válida es la teoría HSAB¹¹⁴ según la cual el orden de dureza de los nitrógenos en la CQ es $\text{N}_4(\text{sp}^3) > \text{N}_4(\text{sp}^3) > \text{N}_1(\text{sp}^2)$, donde el nitrógeno quinolínico (N_1) es el más blando y el nitrógeno tipo anilina (N_4) es el más duro; luego con el ión blando Ag^+ se forman enlaces cuyo fuerza disminuye en forma inversa a la dureza del nitrógeno. Por tanto, como se encontró en los experimentos, los enlaces más favorables son $\text{Ag}^+ - \text{N}_1$ y $\text{Ag}^+ - \text{N}_4$ (en ese orden). Ahora bien,

la fuerza H^+-N puede analizarse por la basicidad de los nitrógenos N_1 y N_4 . De acuerdo a los valores de pK_a (8.1 para N_1 y 10.2 para N_4) se favorece una protonación primaria del nitrógeno trialkilamina (N_4), lo que indica que en solventes próticos como el agua la descomposición ocurriría primero por la ruptura de los enlaces $Ag-N_4$, favorecido por la facilidad de protonación del nitrógeno y el débil enlace metal-ligando. Finalmente ocurriría la ruptura de los enlaces $Ag-N_1$.

En contraste, cálculos DFT realizados por el grupo de Dávalos¹⁰⁰ para las especies en la figura 48 muestran que la afinidad metal-iónica (en fase gaseosa), definido como cambio de entalpía en la reacción 1, $\Delta_r H^0(1)$, es mayor en N_1 que en N_4 (tabla 16). Esto implica que la energía de disociación de enlaces para $Ag^+-CQ(N_1)$ es mucho mayor que para su correspondiente $Ag^+=CQ(N_4)$ lo que explicaría por qué no se observan especies Ag_2CQ^{2+} durante la ruptura de enlaces en medios próticos como el agua (figura 45).

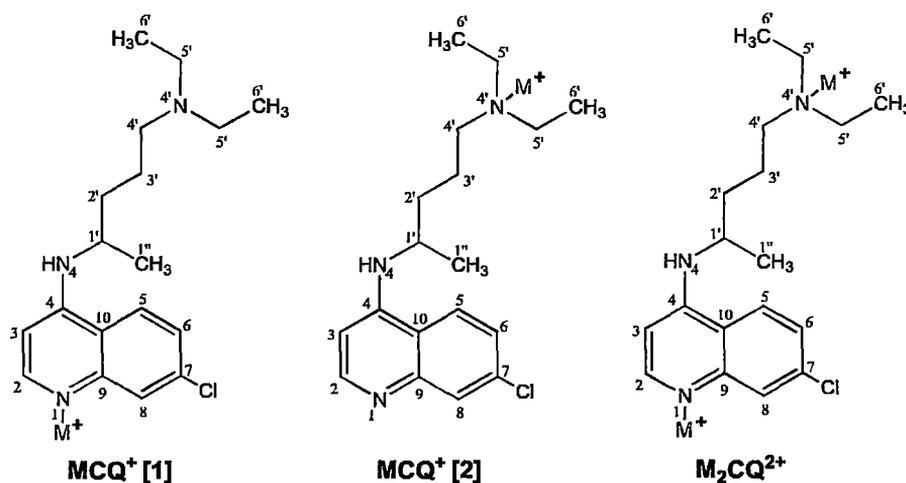


Figura 48. Compuestos usados por Dávalos y col.¹⁰⁰ como modelos teóricos para el cálculo de las afinidades protónicas ($M = H$) y Ag^+ -catiónicas ($M = Ag$) de los nitrógenos en la CQ.

Además, los datos en la tabla 16 muestran una mayor afinidad protónica que metal-iónica del ligando, lo que explicaría por qué se favorece la formación de las especies protonadas de cloroquinina en solventes próticos.

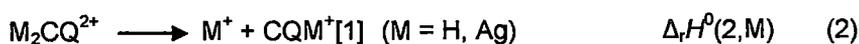


Tabla 16. Afinidades protónica (M=H) y Ag-catiónica (M=Ag) de la CQ en fase gaseosa.

| Sitio de enlace | CQ | | MCQ ⁺ [1] | |
|--|---------------------------------|------------------------------------|---|--|
| | Afinidad protónica ^a | Afinidad Ag-catiónica ^a | 2 ^{da} afinidad protónica ^{a,b} | 2 ^{da} afinidad Ag-catiónica ^{a,b} |
| N ₁ (sp ²), [1] | 996.5 | 191.5 | | |
| N ₄ (sp ³), [2] | 963.6 | 166.0 | 791.1 | 87.3 |

^a En kJ·mol⁻¹, ^b Definido por la ecuación 2.

Con las energías de enlace Ag⁺-N conocidas es posible predecir las especies que se formarán en la descomposición del complejo AgCQNO₃. Así, el dímero [AgCQ]₂²⁺ y el polímero cat-ht sólo generan las especies AgCQ⁺, CQ y Ag⁺ en las secuencias de descomposición mostradas en las figuras 49 y 50; mientras que el polímero cat-hh además genera la especie CQAgCQ⁺ (figura 51). El polímero **cat-hh** disuelto en DMSO se disocia primeramente por los enlaces más débiles Ag⁺-N₄, y luego por los enlaces Ag⁺-N₁, produciendo las especies Ag⁺, CQAgCQ⁺, AgCQ⁺ y CQ detectadas en el espectro ESI/FT-ICR.

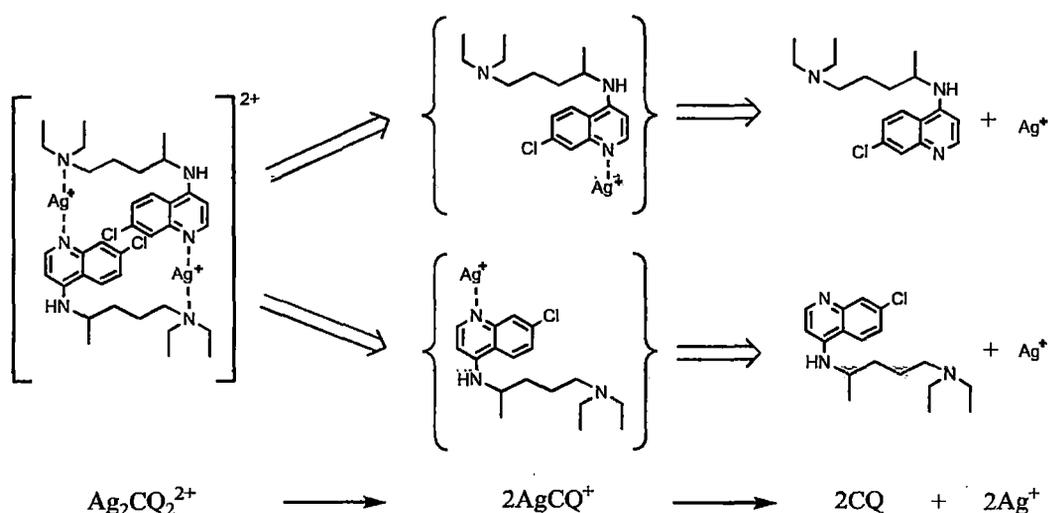


Figura 49. Secuencia de descomposición del dímero $Ag_2CQ_2^{2+}$ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag⁺-N en la CQ.

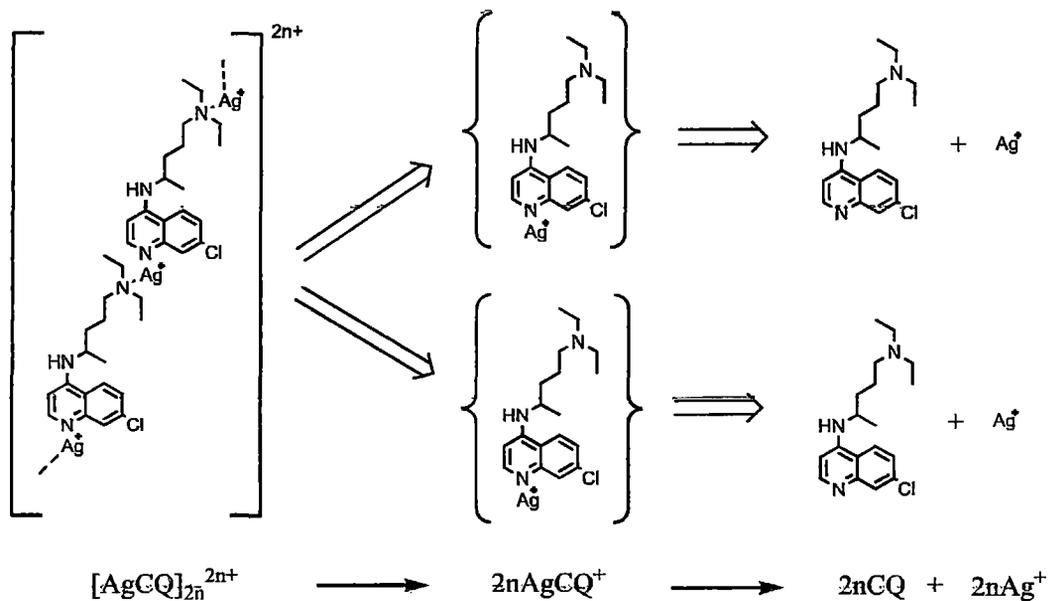


Figura 50. Secuencia de descomposición del polímero cat-hh $[AgCQ]_{2n}^{2n+}$ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag^+-N en la CQ.

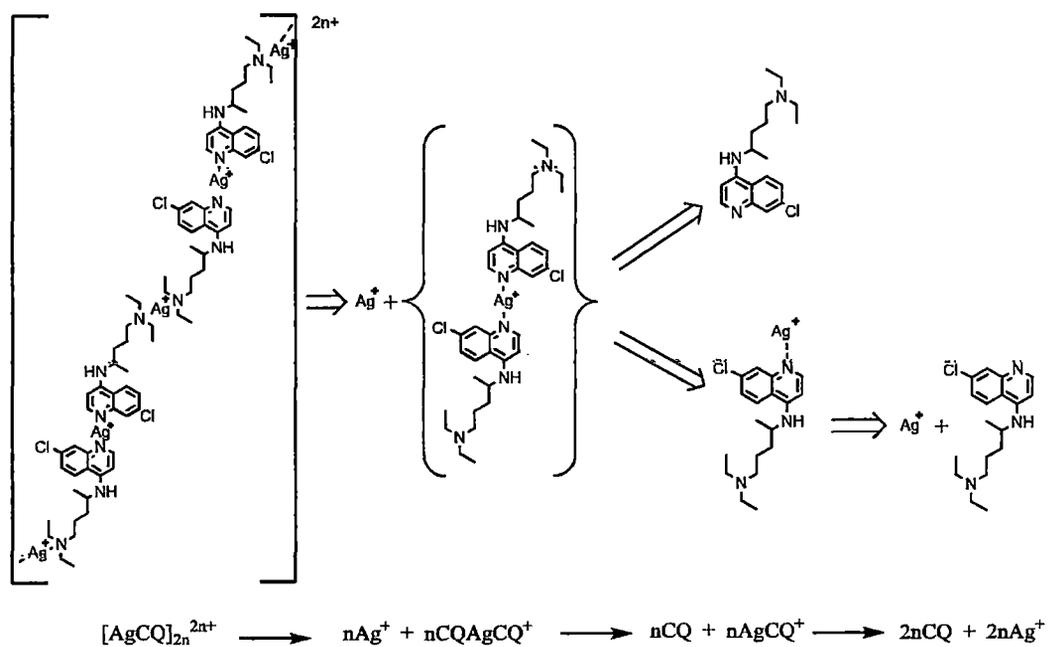


Figura 51. Secuencia de descomposición del polímero cat-hh $[AgCQ]_{2n}^{2n+}$ de acuerdo a las fuerzas de enlace Ag^+-N en la CQ.

En este contexto, los resultados encontrados por todas las técnicas de caracterización son consistentes y demuestran que los cationes detectados por FT-ICR son especies provenientes de la descomposición del polímero cat-hh (figura 26 y anexos), lo que nos llevan a proponer para el complejo AgGQNO_3 la estructura mostrada en la figura 52.

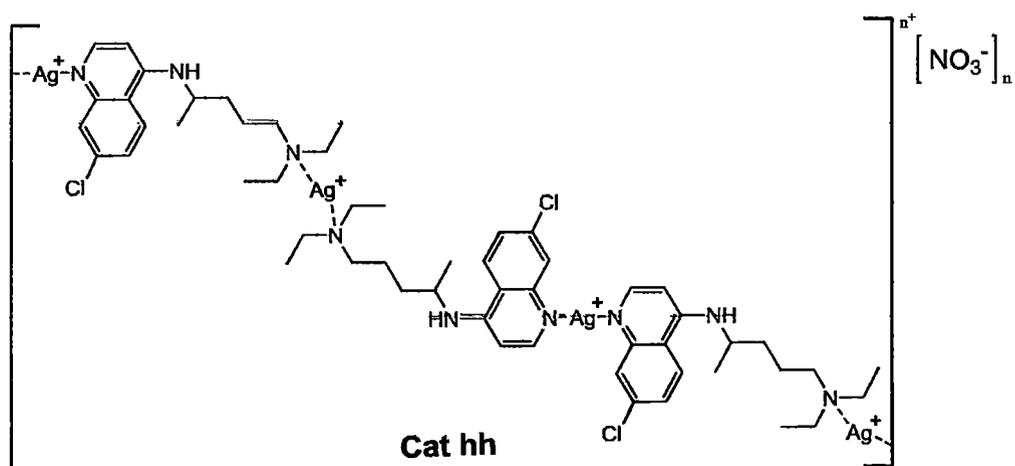


Figura 52. Estructura propuesta para el complejo AgGQNO_3 , un catémero tipo cabeza-cabeza (cat hh), cola-cola (cat tt).

CAPÍTULO V:

ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.1 REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS (ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN EN AGAR)^{115,116}

El antibiograma es un método de estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos frente a los agentes infecciosos, y tiene como finalidad proporcionar información útil para el diseño de nuevas terapias antiinfecciosas o modificación de las existentes. Con los resultados obtenidos puede clasificarse a las bacterias como sensibles o resistentes a un determinado antimicrobiano.

Si bien una variedad de métodos se pueden usar para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a los antimicrobianos, el más usado es la difusión en agar (método de difusión por disco o Kirby-Bauer). Se trabaja con la medición del halo de inhibición de las cepas patógenas que se genera durante el proceso de incubación, donde el agente antimicrobiano se difunde radialmente a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco hasta un punto determinado, en que la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de causar inhibición. El diámetro del área de inhibición refleja la sensibilidad o resistencia del microorganismo (figura 53); y su tamaño está influenciado por el grosor del medio de cultivo, la concentración del inóculo, la carga (concentración o peso) del antimicrobiano entre otros factores, que habrán que tenerse en cuenta en la realización de la técnica.

Utilizando una modificación del método de difusión en agar (pozos de solución en vez de discos impregnados), se midieron las propiedades antibacterianas del complejo AgCQNO_3 , y los compuestos involucrados en su síntesis.

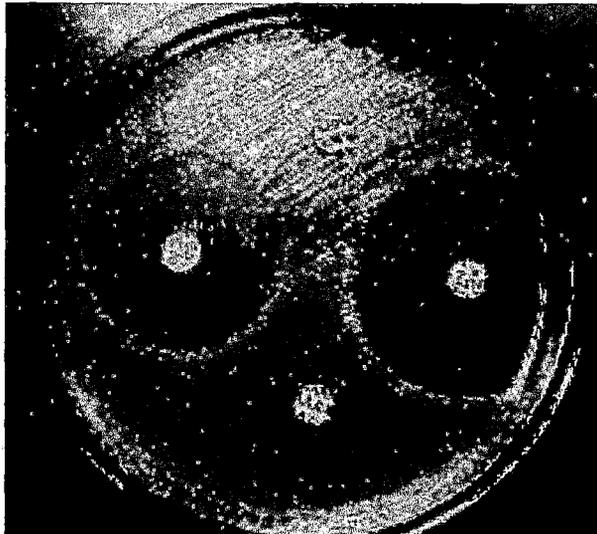


Figura 53. Antibiograma de *Escherichia coli* efectuado por método de Kirby-Bauer, donde se aprecia resistencia (superior e inferior de la figura), y sensibilidad (derecha e izquierda).¹¹⁵

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron las cepas gram negativas *Pseudomona aeruginosa* (27853), *Escherichia coli* (25922) y las cepas gram positivas *Staphylococcus aureus* (25923) y *Bacillus subtilis* (6051) certificadas por la ATCC (Colección Americana de Especies Tipo).

5.3 EQUIPOS

- Estufa incubadora
- Autoclave

5.4 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Müller-Hinton Merck
- Agar Casoy Merck
- Caldo Casoy Merck

5.5 PROCEDIMIENTO

5.5.1 Preparación del medio de cultivo

Se preparó una solución de agar Müller Hinton disolviendo 5,7310 g en 155 mL de agua destilada, con agitación en caliente. Luego la solución se esterilizó en autoclave, a 121 °C y 15 psi de presión, durante 30 minutos. Posteriormente, la solución, aún caliente (45-50 °C), se distribuyó en las placas Petri estériles (cerca de 13 mL de la solución por cada placa, formándose, al enfriar, una placa de agar sólido de aproximadamente 2 mm de espesor.

5.5.2 Preparación de las muestras

Se prepararon soluciones 20 mg/mL de CQDP, CQ, AgNO₃ y el complejo AgCQNO₃ en DMSO. Además, se preparó un blanco del solvente DMSO.

5.5.3 Preparación de los inóculos

Se cultivaron las cepas bacterianas sobre agar Casoy y luego de 24 horas de crecimiento de cada una se llevó un inóculo a una solución fisiológica de 0,85% de NaCl (3 mL de la solución fisiológica por cada tubo de ensayo, un tubo para cada cepa, cuatro en total). El inóculo se ajustó a una población de 1×10^8 UFC/mL, y se realizó la coloración gram para determinar la pureza de cada cultivo.

5.5.4 Realización de la prueba de actividad antimicrobiana

Una vez obtenida la turbidez adecuada en los tubos de ensayo, se impregnó un hisopo estéril con cada suspensión y se eliminó el exceso de líquido rotando varias veces y presionándolo sobre las paredes internas del tubo, y se sembró sobre la superficie seca del agar Müller–Hinton, contenido en las placas de Petri estériles, pasando el hisopo en cuatro direcciones diferentes, sobre toda la superficie del agar. Se dejó secar 5 minutos y

se perforaron hoyos de 0,8 cm sobre los cuales se sembraron 1 mL de cada muestra disuelta. Se incubó las placas a 37°C por 24 horas, y se midió los diámetros de los halos de inhibición con una regla.

5.5.5 Lectura de placas

Se midió los diámetros de los halos con la ayuda de una regla milimetrada. La medida de los diámetros se muestra en la tabla 17.

5.6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la tabla 17 y la figura 54 se muestran las medidas (y su comparación) de los halos de inhibición de las soluciones del complejo AgCQNO_3 , el ligando CQ y la sal AgNO_3 en DMSO.

Tabla 17. Medida (en mm) del diámetro de los halos de inhibición del complejo AgCQNO_3 y los compuestos implicados en su síntesis.

| Solución (20mg/mL) | Gram positivas | | Gram negativas | |
|-----------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| AgCQNO_3 | 19.2 | 20.4 | 15.0 | 19.2 |
| CQ | 8.8 | 9.8 | 10.0 | 10.0 |
| AgNO_3 | 19.2 | 20.4 | 16.0 | 28.8 |
| DMSO | 8.8 | 9.8 | 10.0 | 9.6 |

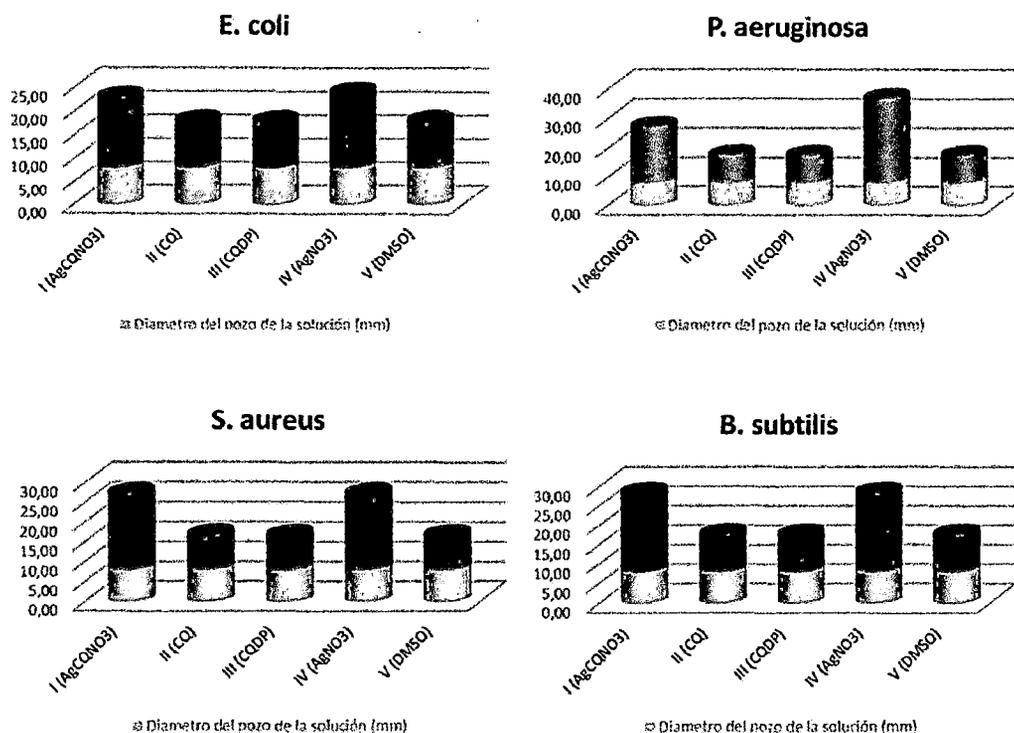


Figura 54. Gráficas comparativas de la capacidad inhibitoria de los compuestos AgCQNO_3 , CQ, CQDP y AgNO_3 sobre cepas gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) y gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*).

De los datos reportados puede notarse que:

- El ligando libre CQ y su sal CQDP no muestran actividad antibacteriana significativa en las condiciones estudiadas.
- Los compuestos conteniendo plata(I) -el complejo y el nitrato- presentan mayor actividad antimicrobiana frente a todas las cepas probadas.
- Las bacterias gram positivas usadas presentan la misma sensibilidad frente al AgNO_3 y el complejo AgCQNO_3 en las condiciones de estudio. Mientras que las bacterias gram negativas probadas son más sensibles al AgNO_3 que al complejo AgCQNO_3 en las condiciones de estudio. La *Pseudomona aeruginosa* presenta mayor sensibilidad al AgNO_3 .

Para responder estas cuestiones, es necesario, no sólo entender los mecanismos de acción biológica posibles para los compuestos usados, sino también los mecanismos de protección, desintoxicación y resistencia de las bacterias frente a estos compuestos. Por ello, en base a los reportes encontrados en la literatura se proponen las posibles causas de estos fenómenos:

1. Para ejercer su actividad biológica la cloroquina, como base débil diprótica, se acumula en las zonas ácidas (como vesículas) de los parásitos y células tumorales. Sin embargo, esto no sería posible en las bacterias usadas pues, a diferencia de los antes mencionados, presentan un sistema de regulación de pH citoplasmático entre 7.2 - 7.8¹¹⁷ y carecen de vesículas eucarióticas que puedan generar el gradiente de pH necesario para la acumulación de las especies cloroquinicas. Por ello, como se aprecia en los resultados se espera una baja actividad de los compuestos CQ y CQDP.
2. De acuerdo a lo anterior, se esperaría que sólo los compuestos conteniendo plata(I) bioactiva presentaran actividad antibacteriana, como se observa en los resultados de la tabla 17 y la figura 54. De estos resultados se puede resaltar un hecho muy importante: el complejo AgCQNO_3 conserva la bioactividad del ion libre Ag^+ . Como ocurre en algunos complejos de plata(I), el ligando CQ serviría de acompañante/estabilizante de la plata(I), y el complejo actúa como un compuesto liberador de especies iónicas de Ag(I) (ver sección de espectrometría de masas FT-ICR) que ejercen la verdadera actividad antibacteriana; y debido a que el complejo libera menos iones libres Ag^+ por unidad de masa, se esperaría que el AgNO_3 presentara la mayor actividad antibacterial, tal como se aprecia en los resultados experimentales. Sin embargo, debe notarse que las pruebas de actividad biológica se hicieron con una misma masa de los compuestos y no con una cantidad equimolar, por lo que no es posible afirmar que la sal de plata(I) sea más efectiva que el complejo AgCQNO_3 . Por el contrario, debido a que el complejo contiene menos de la mitad de plata(I) que la sal nitrato, el complejo sería mucho más activo. La determinación de los MIC_{50} dilucidarán la verdadera eficiencia de los compuestos de plata(I) frente a las bacterias estudiadas.

3. Los principales mecanismos de defensa de las bacterias frente a metales tóxicos son: a) la precipitación extracelular de los iones tóxicos por sustancias excretadas por las bacterias; b) la unión de los cationes metálicos en las cubiertas celulares, por lo general basada en las cargas negativas de los constituyentes de la pared celular; c) la acumulación intracelular por la unión de los iones metálicos a los componentes citoplasmáticos; d) las transformaciones redox que convierten algunos iones en especies químicas menos tóxicas; y, e) los sistemas de expulsión de la membrana que impiden la acumulación de los iones nocivos.¹¹⁸ Sin embargo, las diferencias (morfológicas y fisiológicas) entre bacterias no permite que actúen con los mismos mecanismos de defensa, sino que estos son diferenciados de acuerdo al tipo de bacteria. Así, la diferencia de las paredes celulares entre bacterias gram positivas y gram negativas juega un rol fundamental para disminuir o aumentar la sensibilidad a los biocidas metálicos, y generar nuevos mecanismos de resistencia a los mismos, ya que la gran mayoría de compuestos actúan sobre los componentes de la superficie celular y/o de la membrana citoplasmática de las bacterias, lo que implica una resistencia natural a través de la estructura de la pared celular y su composición química.

La mayor complejidad de las membranas (externa e interna) de las bacterias gram negativas con alto contenido de proteínas (figura 55) le induce mayor sensibilidad a los biocidas metálicos debido a que estas resultan ser muy buenos blancos para la coordinación de los iones metálicos. Y aunque estas bacterias presentan una resistencia intrínseca a través de las porinas y otros sistemas de expulsión catiónicas energía-dependientes, es mayor el ingreso de iones Ag^+ a través de las porinas.

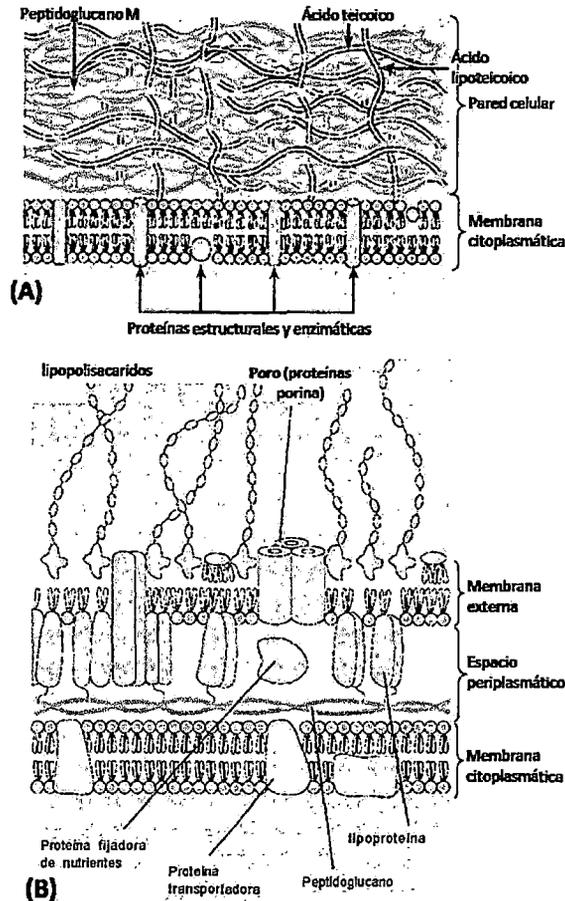


Figura 55. Comparación de la pared celular de las bacterias (A) gram positivas y (B) gram negativas.¹¹⁹

Reportes indican que bacterias *E. coli* mutantes carentes de porinas en la membrana externa son más resistentes a especies Ag^+ .¹²⁰ Por otro lado, la gruesa capa de peptidoglucanos, y ácidos teicoico y lipoteicoico (figura 55) en las bacterias gram positivas forman una barrera acumuladora de iones metálicos. Si bien resultados encontrados se contrastan mucho con los reportados en la literatura,⁷⁶ la falta de correlación con algunos de los resultados preliminares presentados aquí se debería al efecto solvatante del DMSO en los compuestos de Ag^+ (se forman especies hasta $\text{Ag}(\text{DMSO})_4^+$ en solución de AgNO_3 en DMSO),¹²¹ y la composición del medio de cultivo.¹²²

Los resultados "preliminares" presentados hasta aquí confirman la buena actividad del complejo frente a bacterias gram positivas y gram negativas, es decir, la actividad antimicrobial del ion libre Ag^+ se conserva en la metalocloroquina AgCQNO_3 . Además, los resultados indican que su

mecanismo de acción sería el de liberación de especies iónicas conteniendo cloroquina y plata(I) bioactiva, como ocurre con muchos compuestos de plata incluyendo las nanopartículas, que interactuarían de modo similar a los iones Ag^+ frente a las biomoléculas de las bacterias.⁷⁰

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES

- Se sintetizó la metalocloroquina AgCQNO_3 , inexistente en la literatura, a través de una reacción estequiométrica entre AgNO_3 y CQ base obtenida de CQDP, usando acetonitrilo como solvente.
- El análisis elemental de la metalocloroquina sintetizada proporcionó la fórmula empírica $\text{AgC}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$, y los ensayos de conductividad en DMSO demostraron su naturaleza iónica en la forma $[\text{AgCQ}]^+[\text{NO}_3]^-$.
- La caracterización de la metalocloroquina por las técnicas espectroscópicas de FTIR y CP/MAS RMN demostraron que la coordinación a los centros metálicos de Ag^+ ocurre a través de los nitrógenos quinolínicos (N_1) y triquilamínicos (N_4); mientras que el estudio por espectrometría de masas FT-ICR confirmó la naturaleza iónica y polimérica siendo más probable una estructura de tipo cabeza-cabeza (cat-hh) poco común entre los complejos de plata e inexistente entre las metalocloroquinas conocidas hasta la actualidad. Además, los estudios por FT-ICR han llevado a plantear un mecanismo mediante el cual la metalocloroquina se descompone en disolución generando especies iónicas de plata y cloroquina. Los resultados también muestran que la presencia de agua en el medio acelera la descomposición de la metalocloroquina, verificándose por cálculos computacionales que el carácter básico Brønsted es predominante en la competencia Ag^+/H^+ por la CQ en medios próticos como el agua.

- Los ensayos preliminares de actividad antimicrobial muestran que la metalocloroquina AgCQNO_3 presenta una actividad biológica similar a las sales de plata(I) frente a bacterias gram positivas y gram negativas, por lo que su mecanismo de acción, sustentado en los estudios de descomposición, sería la liberación de especies bioactivas de Ag(I)-CQ que ejercen su verdadera actividad como ocurre con muchos compuestos de plata de similar comportamiento.
- Los resultados antes mencionados nos llevan a pensar que cómo en el caso de las metalocloroquinas de oro y otros compuestos de plata, la metalocloroquina AgCQNO_3 presentaría buenas propiedades frente a otras enfermedades como malaria y cáncer, lo que habrá que verificarse en trabajos posteriores.

ANEXOS

A1. NOTACIÓN Y ENUMERADO DE ÁTOMOS USADOS PARA LA CQ

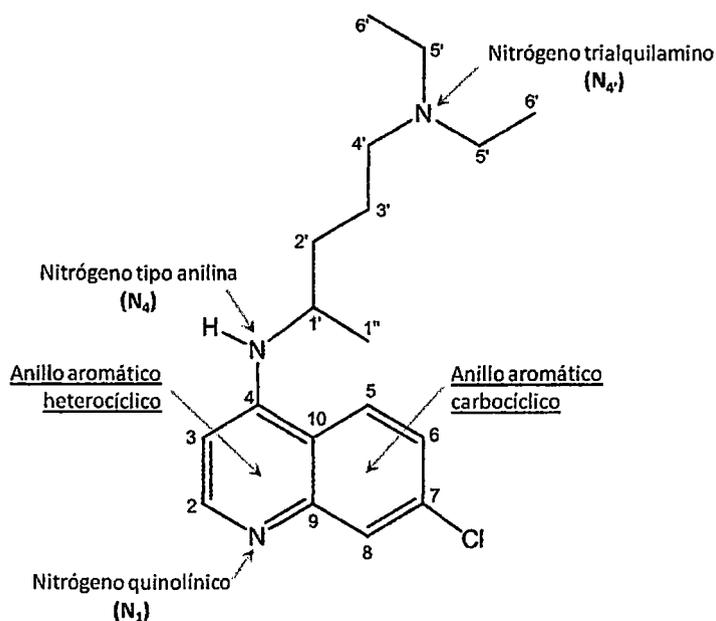


Figura A1. Estructura de la cloroquina (CQ) = 7-Cloro-4-(4'-dietilamino-1'-metilbutilamino)quinolina

A2. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Análisis elemental de C, H, N

El análisis elemental por combustión se utiliza para la identificación y análisis químico de muestras sólidas y líquidas de alta pureza (mayor al 99%). La técnica está basada en el método clásico propuesto por Pregl-Dumas: la muestra colocada en capsulas de aluminio o estaño se introducen a un horno donde ocurre su oxidación completa e instantánea por la combustión en exceso de oxígeno puro a altas temperaturas (~1100°C) usando catalizadores para asegurar que la reacción sea completa. El peso (%) de cada elemento (C, H, N) se obtiene de la cantidad de gases producidos (CO₂, H₂O, N₂) separados y determinados por técnicas cromatográficas.

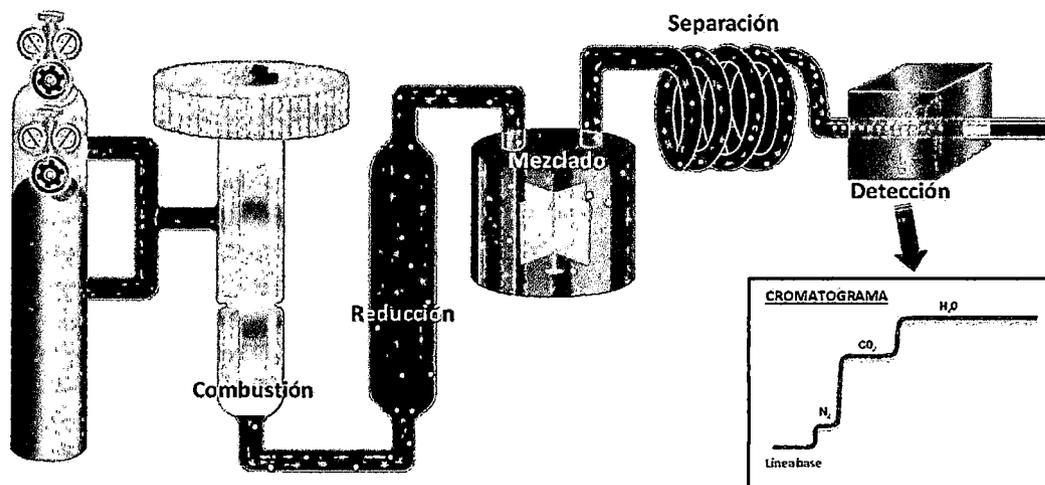


Figura A2. Principio de operación de un analizador elemental: la muestra se quema en la cámara de combustión, los gases pasan al tubo de reducción para que salgan sólo N_2 , CO_2 y H_2O , y luego a la cámara de mezcla donde se mantienen en condiciones controladas de presión, temperatura y volumen. Posteriormente los gases N_2 , CO_2 y H_2O se separan en la columna de separación y se miden sus eluciones con un detector de conductividad térmica.¹²³

Espectroscopía molecular (Ultravioleta-Visible e Infrarrojo)¹²⁴

Cuando un material transparente (sólido, líquido o gaseoso) es irradiado con una radiación electromagnética, parte de la energía (en forma de fotones) es absorbida por sus átomos y moléculas que lo conforman, los mismos que pasan de un estado de más baja energía o fundamental, a un estado de mayor energía o excitado. Los fotones de diferente energía producen diferentes transiciones energéticas, es decir que su absorción ocurre en diferentes regiones del espectro electromagnético. En la figura A3 se muestra los diferentes tipos de transiciones, donde además se menciona las regiones del espectro electromagnético a donde pertenece dicha transición.

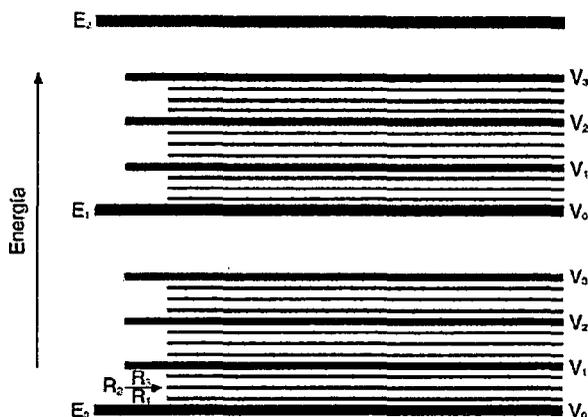


Figura A3. Estados electrónicos (E), vibracionales (V) y rotacionales (R) de una molécula poliatómica. Las transiciones electrónicas de mayor energía ocurren en la región UV-Vis, mientras que las transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía ocurren en la región del IR medio y lejano respectivamente.¹²⁴

La espectroscopía molecular está basada, en la medida de la radiación absorbida (o transmitida) por una molécula, y que es capaz de generar transiciones electrónicas en la molécula (Espectroscopía UV-Vis) o transiciones vibracionales/rotacionales (Espectroscopía Infrarroja). Las técnicas reciben el nombre precisamente de la región del espectro electromagnético donde ocurre dicho fenómeno. De manera práctica se ha encontrado que para que una molécula sea activa en la espectroscopía UV-Vis es necesario la existencia de grupos cromóforos (grupo de átomos con electrones σ , π , n , d o f que sean capaces de absorber la radiación durante sus transiciones electrónicas); y para la espectroscopía Infrarroja es necesario que el componente eléctrico de la radiación interactúe con el momento dipolar del enlace, es decir exista un cambio neto en el momento dipolar del enlace. Por ello, la espectroscopía UV-Vis ayuda a identificar ciertos grupos (cromóforos) orgánicos e inorgánicos, y la espectroscopía infrarroja sirve para identificar grupos funcionales a través de la vibración/rotación de sus enlaces interatómicos a determinadas longitudes de onda o frecuencias.

Espectroscopía RMN en estado sólido^{125,126}

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en el fenómeno de RESONANCIA MAGNÉTICA que exhiben algunos núcleos con espín $I \neq 0$, cuando son colocados en un campo magnético intenso e irradiados con energía proveniente de un oscilador de radiofrecuencias (4 – 900 MHz). La aplicación del campo magnético origina $(2I + 1)$ niveles discretos de energía debido al desdoblamiento de los niveles de energía de los núcleos inicialmente degenerados (Efecto Zeeman). La separación energética de los niveles desdoblados se encuentra en la región de las ondas de radio por lo que un barrido en un rango determinado de esta región genera un "espectro de resonancia magnética nuclear" característico para un compuesto y su estructura química, similar a la espectroscopía infrarroja. Los valores de radiofrecuencia dependen del núcleo que se desea estudiar.

Un esquema sencillo de un espectrómetro se muestra en la figura A4. En él, la muestra en rotación es sometida a un campo magnético estático (Imán solenoide) mientras se le aplica pulsos de radiofrecuencia perpendicular al campo magnético a través de una espiral (Bobina de RF). La emisión de radiofrecuencia la recoge la misma bobina cuando se conecta al circuito de detección después de un retraso de microsegundos tras el final del pulso de RF. Las bobinas *shim* y la rotación de la muestra sobre su eje sirven para compensar la heterogeneidad del campo magnético aplicado.

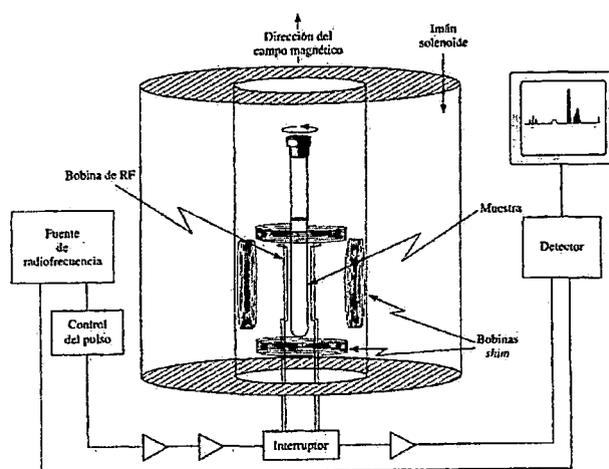


Figura A4. Esquema de un instrumento de FT-RMN.¹²⁷

La posición de los picos de absorción de resonancia (desplazamiento químico, δ) se miden con

relación al pico de resonancia de una sustancia patrón interno (tetrametilsilano, TMS, para ^1H y ^{13}C ; nitrometano para ^{15}N).

Mientras que en líquidos y disoluciones se obtienen espectros de alta resolución con picos estrechos donde se observan casi fácilmente los acoplamientos entre distintos núcleos; y por tanto, no es complicado determinar átomos enlazados, entornos de coordinación y otros datos de relevancia; en estado sólido aparecen bandas anchas y poco definidas, de las que apenas se puede sacar información. La causa principal se debe a que muchas de las interacciones entre los momentos magnéticos nucleares y el campo magnético (tabla A1) dependen de la orientación de éstos, y en una muestra sólida no es posible promediar estos efectos, como sí sucede en líquidos.

Tabla A1. Resumen de las principales interacciones en RMN en estado sólido.¹²⁵

| INTERACCIÓN | CAUSA | EFEECTO |
|------------------------------------|--|--|
| <u>Interacción de Zeeman</u> | Interacción del momento magnético del núcleo con el campo magnético aplicado. | Responsable de la separación de los niveles de energía |
| <u>Desplazamiento químico</u> | Apantallamiento del campo magnético externo por los electrones del núcleo. | Cambio en la frecuencia de resonancia del núcleo. |
| <u>Interacciones dipolares</u> | Interacción entre espines nucleares a una distancia r que depende de la estructura. | Ensanchamiento de las líneas de resonancia |
| <u>Interacciones de espín</u> | Interacción indirecta entre espines nucleares mediada por electrones. | Ensanchamiento de las líneas de resonancia |
| <u>Interacciones cuadrupolares</u> | Interacción del espín nuclear con el gradiente de campo eléctrico no esférico de la red. | Dar lugar a varias bandas en el espectro RMN |

Todas las interacciones que se dan en RMN poseen un componente isotrópico que no depende de la orientación del campo magnético aplicado, y otro anisotrópico, que sí. En la tabla A1 se presenta un resumen de estas interacciones. Debido a que muchas de las partes anisotrópicas de

las interacciones dependen de la expresión matemática $3\cos^2\theta-1$, la interacción del campo magnético con las moléculas en las distintas orientaciones en estado sólido se miden por el ángulo θ . Consideraciones geométricas simples han permitido concluir que el giro de una muestra policristalina dispuesta con un ángulo θ respecto al campo magnético aplicado (figura A5) conduce a un promedio único de la función $\langle 3\cos^2\theta-1 \rangle$. Por tanto, si el ángulo θ se elige de tal modo que $3\cos^2\theta-1=0$ ($\theta = 54^\circ 44'$), todas las interacciones que dependan de la expresión $3\cos^2\theta-1$ se anulan. Este ángulo es conocido como ángulo mágico, y es el que da nombre a este tipo de técnica, MAS RMN (Resonancia magnética nuclear bajo giro en ángulo mágico). Sin embargo, no siempre se pueden eliminar todas las interacciones porque no sólo dependen del término angular, sino también de su magnitud, lo que obliga a usar elevadas velocidades de giro para mejorar la resolución del espectro de RMN (figura A6).

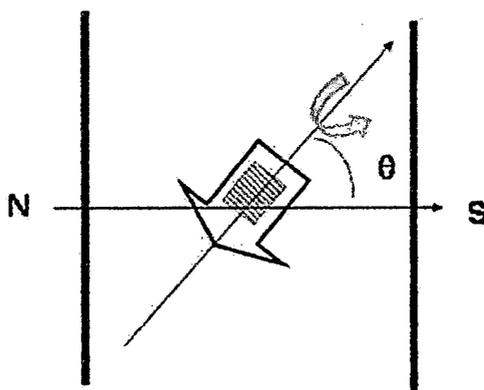


Figura A5. Representación esquemática de la disposición experimental para el giro de la muestra en el análisis por RMN en estado sólido. En MAS, $\theta = 54^\circ 44'$.¹²⁵

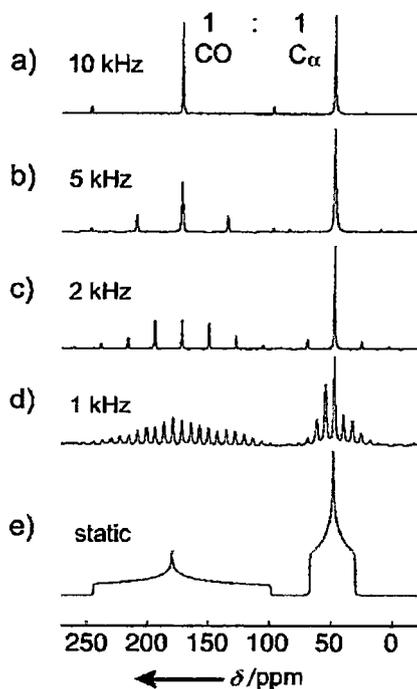


Figura A6. Espectro MAS RMN de ^{13}C (125MHz) de glicina en polvo uniformemente marcada con ^{13}C (10%) a diferentes velocidades de rotación (en la figura se señalan las frecuencias de rotación).¹²⁸

La detección directa de núcleos poco abundantes como ^{13}C , ^{29}Si o ^{15}N conduce normalmente a una baja polarización de su espín, y por lo tanto, a una relación señal/ruido baja; y los tiempos de relajación para estos núcleos son largos debido a la ausencia de interacciones dipolares homonucleares asociados a dichos núcleos. Para aumentar la intensidad de la señal de núcleos como el ^{13}C y el ^{15}N , muchos experimentos de RMN en estado sólido incluyen la transferencia de polarización de núcleos abundantes (normalmente ^1H) utilizando la técnica de *Polarización Cruzada* (CP) que consiste en una secuencia de pulsos mediante los cuales se transfiere la polarización de núcleos muy polarizados de ^1H (núcleos abundantes) hacia los núcleos poco polarizados de ^{13}C o ^{15}N (núcleos poco abundantes), lo que agiliza la obtención del espectro de RMN. La figura A7 muestra esquemáticamente la ocurrencia de la polarización cruzada.

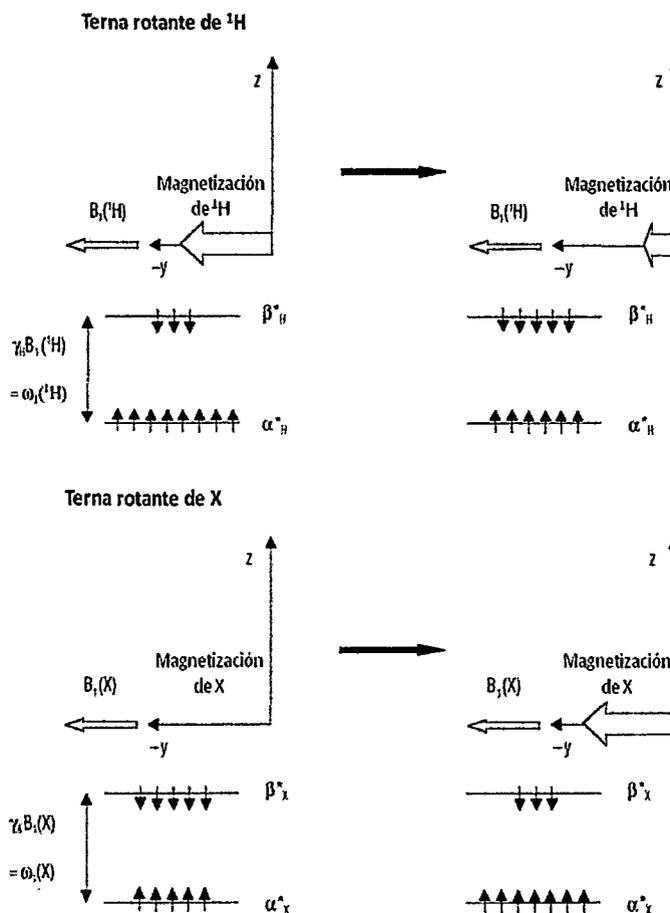


Figura A7. Explicación del fenómeno de Polarización cruzada (CP) en RMN.¹²⁹

Debido a que en ^{13}C NMR, los carbonos metileno y metino se polarizan más rápido que los carbonos metilo y cuaternario, un tiempo de contacto corto durante la polarización cruzada produce un espectro consistente de señales CH y CH_2 . La *supresión no cuaternaria* (NQS, Non-Quaternary Suppression) o desacoplamiento interrumpido es una técnica sencilla que permite distinguir los átomos de carbonos cuaternarios de aquellos con uno o dos protones directamente enlazados. Esta discriminación está basada en el acoplamiento dipolar entre los protones y los átomos de carbono directamente enlazados. La secuencia de pulsos NQS usa periodos o "ventanas" de tiempo del orden de $40\mu\text{s}$ antes de la adquisición del espectro, cuando los campos de radiofrecuencia están apagados.

Espectrometría de masas FT-ICR¹³⁰

La Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FT-ICR) es la espectrometría de masas con la mayor resolución alcanzable actualmente, y está basada en el efecto de un campo magnético sobre la trayectoria de partículas cargadas (movimiento ciclotrónico). Los iones generados por ionización electrónica, o provenientes de una fuente externa (ESI, MALDI, etc.) se introducen en una celda de confinamiento y análisis. La celda está situada dentro de la región de un campo magnético permanente homogéneo e intenso (B_0 , entre 1 y 25 T) producido generalmente por una bobina superconductora. La figura A8 muestra un esquema sencillo de un sistema ESI/FT-ICR.

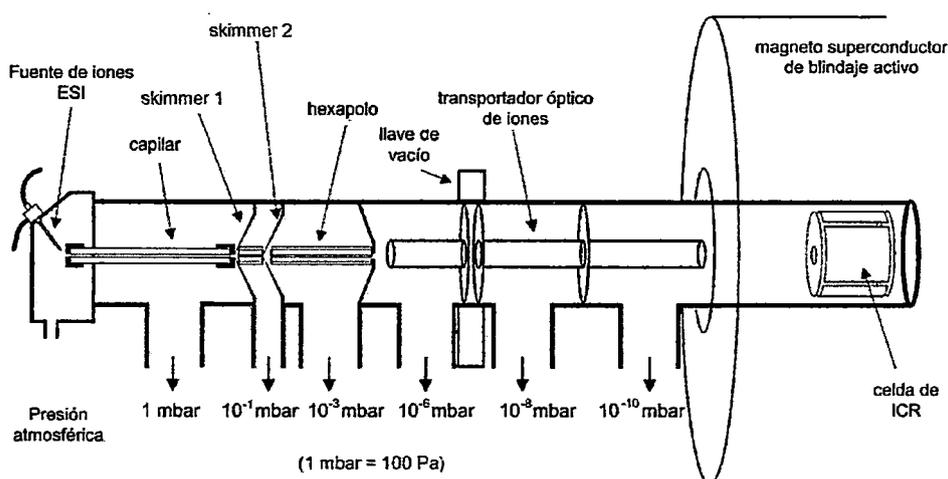


Figura A8. Transportador óptico de iones y estadios de bombeo diferencial para adaptar una fuente ESI a un instrumento FT-ICR. Sólo la celda ICR está dentro del magneto superconductor.¹³¹

Dentro de la celda ICR, los iones son acelerados (proceso de excitación) coherentemente mediante pulsos de radiofrecuencia (RF) hasta alcanzar radios de giro adecuados e inducir señales de corriente imagen en las placas de detección (proceso de detección) como se muestra en la figura A9. La señal completa está formada por señales sinusoidales, cada una de las cuales tiene la frecuencia ciclotrónica de la correspondiente especie iónica presente en la celda. Una vez amplificada, la señal se digitaliza y acumula en un ordenador, luego mediante un algoritmo rápido de Transformada de Fourier (FT) se extrae la frecuencia y amplitud para cada componente, deconvolucionando y registrando de esta manera un espectro de intensidades en función de la

relación m/q (espectro de masas, figura A9).

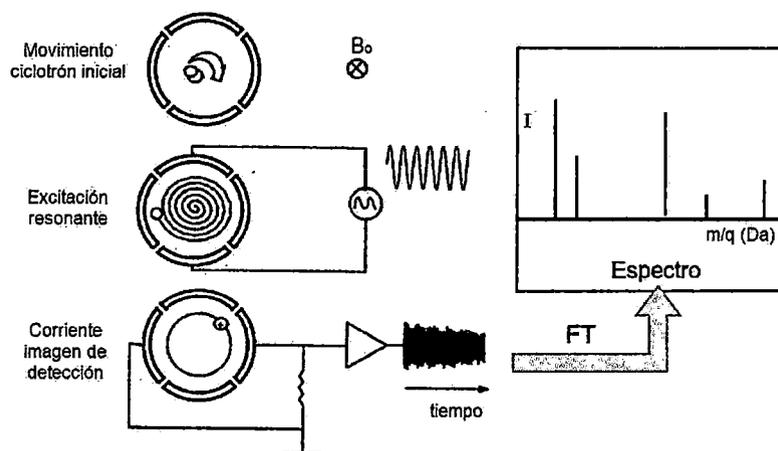


Figura A9. Representación esquemática del proceso de excitación y detección en una celda ICR.¹³²

Una ventaja de la FT-ICR sobre otras técnicas radica en la posibilidad de almacenar iones (positivos y negativos) en la celda ICR en un tiempo que va desde milisegundos a minutos a muy baja presión. Ello permite observar y seguir las reacciones entre iones y moléculas neutras obteniéndose información cuantitativa sobre la cinética y la termodinámica de los procesos. Además, los iones se pueden aislar y someter a estudios individualizados como la excitación cinética con radiofrecuencias o la activación selectiva de algunos de sus enlaces por medio de radiación proveniente de láseres apropiados. Esta última opción conduce a una fragmentación controlada de los iones y proporciona una información muy valiosa sobre su estructura. Las técnicas de Disociación multifotónica infrarroja (*Infrared Multiphoton Dissociation*, IRMPD), Colisión superficial inducida (*Collision-induced dissociation*, CID), fotodisociación ultravioleta (*Ultraviolet photodissociation*, UVPD), Disociación por radiación infrarroja de cuerpo negro (*Blackbody infrared radiative dissociation*, BIRD) y Disociación por captura electrónica (*Electron-capture dissociation*, ECD) son muy usadas para la activación y fragmentación selectiva de los iones seleccionados, muchas veces complementado con cálculos computacionales.

Ensayos de conductividad en solución¹³³

La capacidad de sus disoluciones para conducir la corriente eléctrica, es un importante método de caracterización de las sustancias iónicas. Así, las sustancias cuyas disoluciones tienen mayor conductividad constan de un mayor número de iones (una disolución de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$ tiene una conductancia inferior que una de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ de la misma concentración). Midiendo la conductividad (conductancia molar, Λ_M) de la disolución de un compuesto, es posible determinar si una unidad de fórmula de dicho compuesto consta de 2, 3, 4 ó más iones; es decir, para un complejo metálico puede predecir la presencia y el número de especies iónicas fuera de su esfera de coordinación (tabla A2).

Tabla A2. Intervalos de conductancias molares (Λ_M) esperados para electrolitos de 2, 3, 4 y 5 iones ($\sim 10^{-3}$ M) en solventes comunes a 25°C.¹³³

| Disolvente | Constante dieléctrica | Tipo de electrolito | | | |
|------------------|-----------------------|---------------------|---------|---------|---------|
| | | 1:1 | 2:1 | 3:1 | 4:1 |
| Agua | 78.4 | 118-131 | 235-273 | 408-435 | ~560 |
| Dimetilsulfóxido | 46.6 | 23-42 | | | |
| Nitrometano | 35.9 | 75-95 | 150-180 | 220-260 | 290-330 |
| Nitrobenceno | 34.8 | 20-30 | 50-60 | 70-82 | 90-100 |
| Acetona | 20.7 | 100-140 | 160-200 | | |
| Acetonitrilo | 36.2 | 120-160 | 220-300 | 340-420 | |
| Dimetilformamida | 36.7 | 65-90 | 130-170 | 200-240 | |
| Metanol | 32.6 | 80-115 | 160-220 | | |
| Etanol | 24.3 | 35-45 | 70-90 | | |

Aunque las medidas típicas de conductividad de complejos sencillos de (por lo general) ligandos inorgánicos se realizan en sus soluciones acuosas, el uso de agua como un disolvente para medir la conductancia de otros muchos complejos es, a menudo, indeseable debido a problemas de hidrólisis, o es impracticable debido a la falta de solubilidad del complejo. Por ello, el uso de disolventes orgánicos ha aumentado rápidamente. Por desgracia, el número de los disolventes que se utilizan para el estudio de los compuestos de coordinación, la amplia variación en los tipos de complejos estudiados, y las diferencias en las condiciones experimentales, ha llevado a la

situación actual en la que hay mucha confusión en relación al rango de conductancia esperado para un tipo de electrolito en particular, por lo que las medidas de conductancia molar deben complementarse con otras técnicas de caracterización.

A3. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron:

- Nitrato de Plata (Merck), AgNO_3 (M = 169.87 g/mol; P.fus. = 212 °C)
- Difosfato de Cloroquina (Sigma), $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{Cl}\cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4$ (M = 515.92 g/mol; P.fus.= 193 °C)
- Hidróxido de Amonio (Fermont), NH_4OH (M = 35.05 g/mol; P.vapor = 475 mm Hg a 20 °C)
- Eter dietílico (Fermont), $\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ (M=74.12 g/mol; P.eb. = 34.6 °C),
- Acetonitrilo (Tedia), CH_3CN (M = 41.05 g/mol, P.eb. = 82 °C)
- Dimetilsulfóxido (Fermont), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (M = 78.13 g/mol, P.eb. = 189 °C)
- n-hexano (Fermont), C_6H_{14} (M= 86.18 g/mol; P.eb. = 69 °C)
- Acetona (Fermont), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (M = 58 g/mol; P.eb. = 56°C)
- Metanol (Fermont), CH_3OH (M =32 g/mol P.eb.= 64°C)
- Etanol (Fermont), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (M =46 g/mol P.eb.= 78°C)
- Cloroformo (Fermont), CHCl_3 (M = 119.5 g/mol P.eb = 61°C)

A4. SOLUBILIDADES DE CLOROQUINA (CQ) Y DIFOSFATO DE CLOROQUINA (CQDP).

Tabla A3. Solubilidades de CQ y CQDP a 20°C.

| Solvente | Polaridad ¹³⁴ | CQ | CQDP |
|------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| Agua | 100.0 | Insoluble | Muy soluble |
| Metanol | 76.0 | Poco soluble | Soluble |
| Etanol | 65.4 | Poco soluble | Poco soluble |
| Acetonitrilo | 46.0 | Poco soluble | Poco soluble |
| Dimetilsulfóxido | 44.4 | Soluble | Poco soluble |
| Cloroforno | 25.9 | Muy soluble | Insoluble |
| Éter etílico | 11.7 | Muy soluble | Insoluble |

A5. ESPECTROS UV

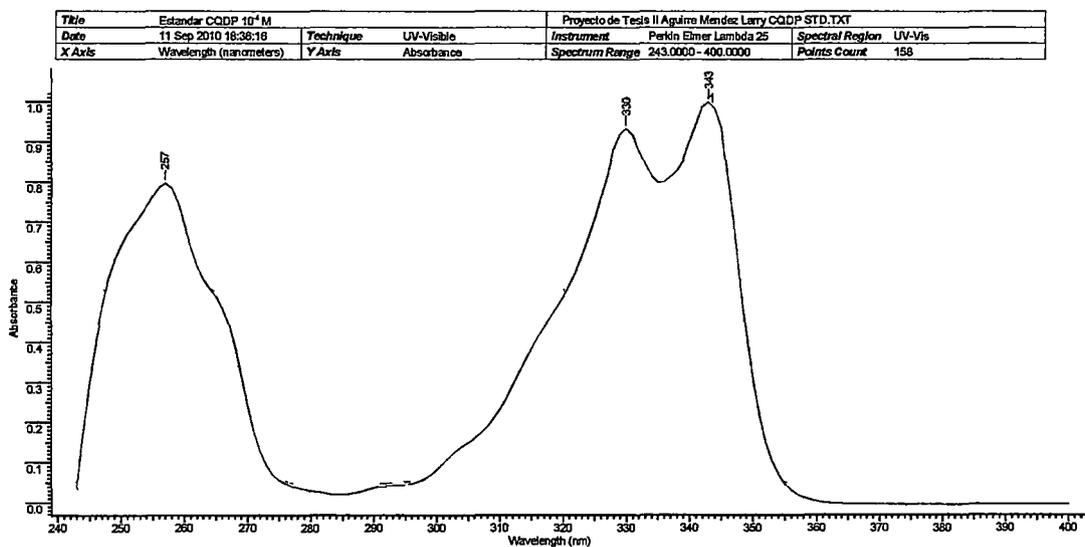


Figura A10. Espectro UV de un patrón de fosfato de cloroquina (CQDP) a 10⁻⁴M en medio HCl 0.01N.

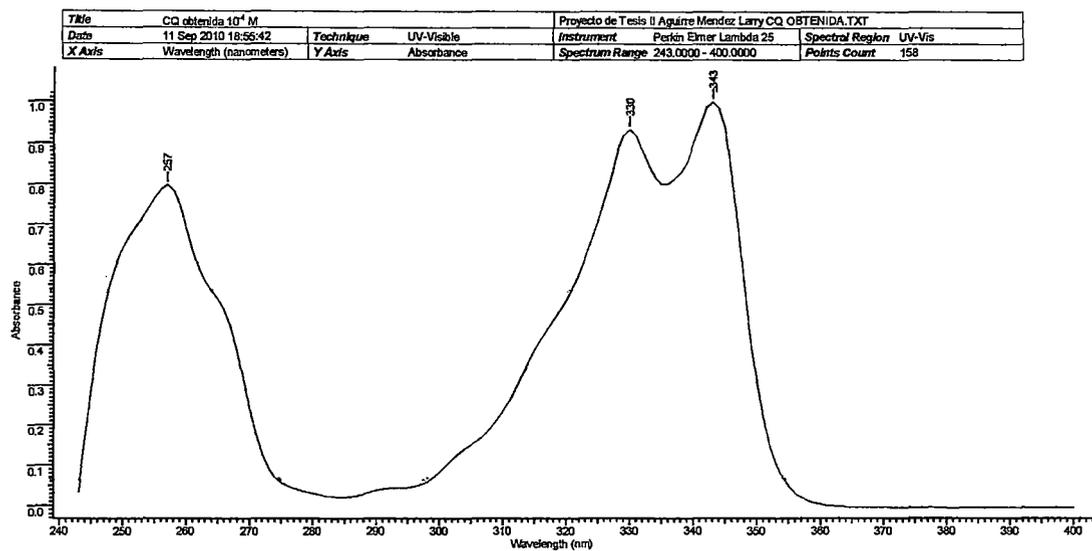


Figura A11. Espectro UV de la cloroquina base obtenida (CQ) a 10^{-4} M en medio HCl 0.01N.

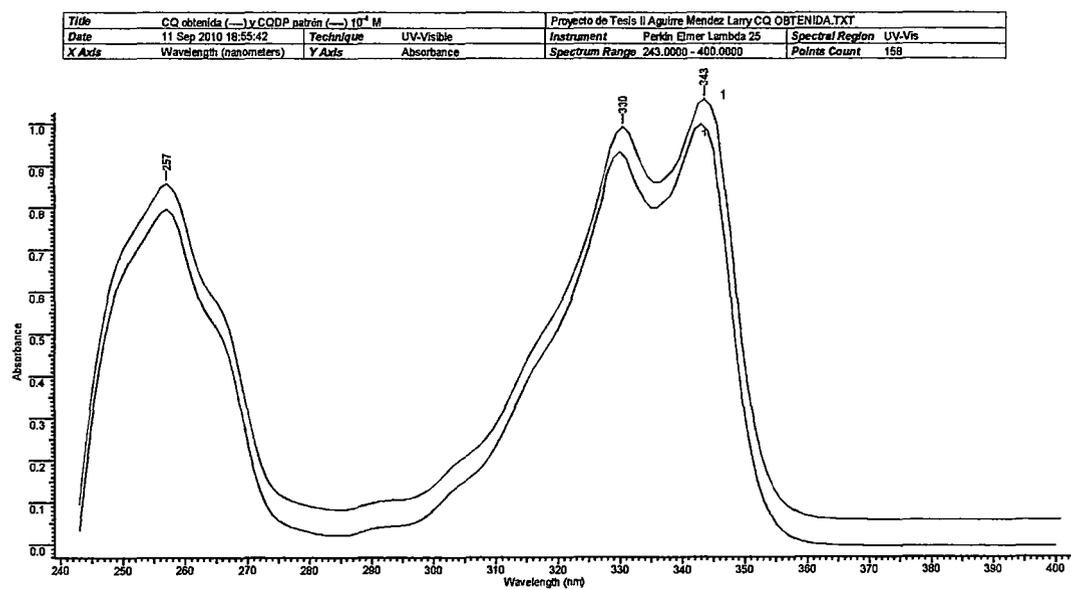


Figura A12. Espectros UV superpuestos de la CQ base obtenida (en rojo) y del patrón CQDP (en negro) a 10^{-4} M en medio HCl 0.01N.

A6. RESULTADOS DE RMN EN SOLUCIÓN

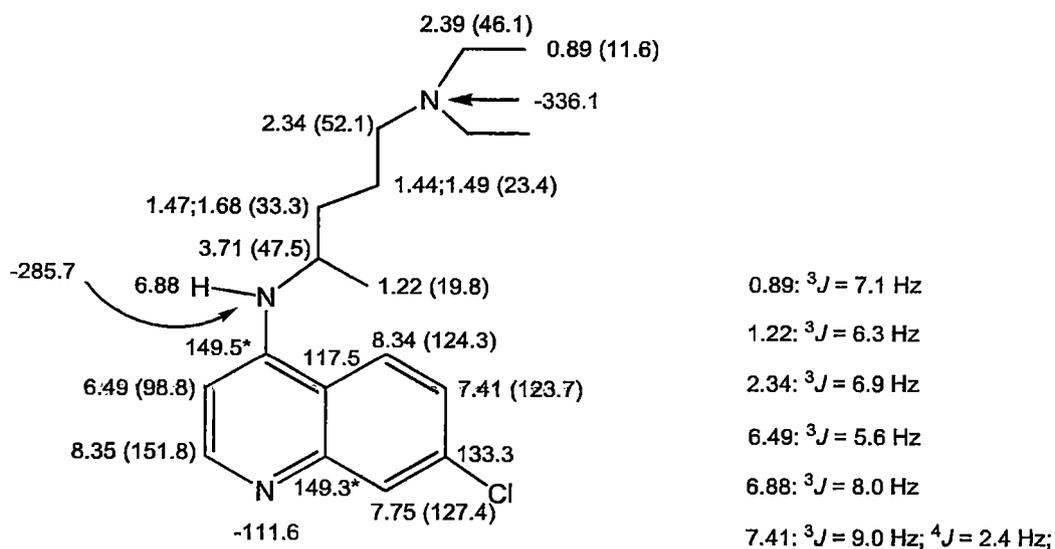


Figura A13. Resumen de asignaciones de los $\delta(^1\text{H})$, $\delta(^{13}\text{C})$ y $\delta(^{15}\text{N})$ para la CQ en $\text{DMSO}-d_6$.

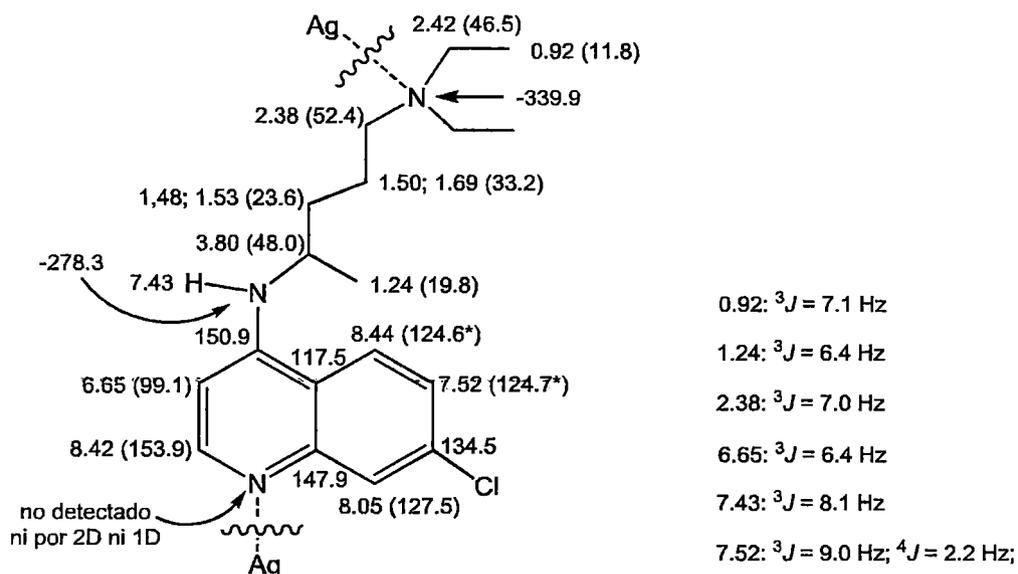


Figura A14. Resumen de asignaciones de los $\delta(^1\text{H})$, $\delta(^{13}\text{C})$ y $\delta(^{15}\text{N})$ para el complejo AgCQNO_3 en $\text{DMSO}-d_6$. Los resultados indican la ruptura de los enlaces Ag-CQ por la descomposición del complejo.

A7. OTROS ESPECTROS FT-ICR

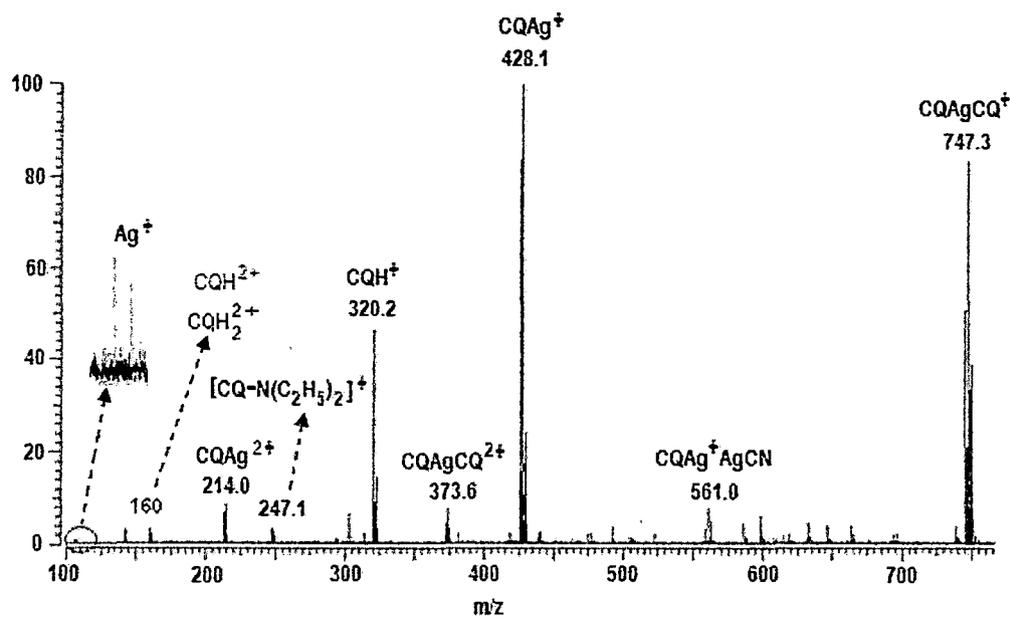


Figura A15. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO₃ en DMSO (100 µg/mL).

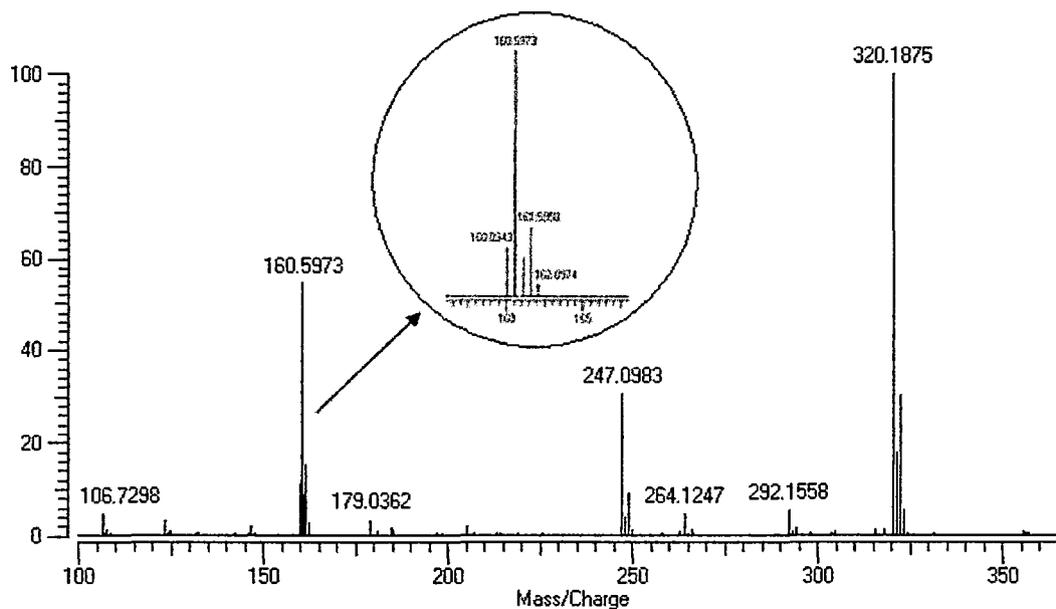


Figura A16. Espectro ESI/FT-ICR del complejo AgCQNO₃ en DMSO (40 µg/mL).

A8 ANTIBIOGRAMAS

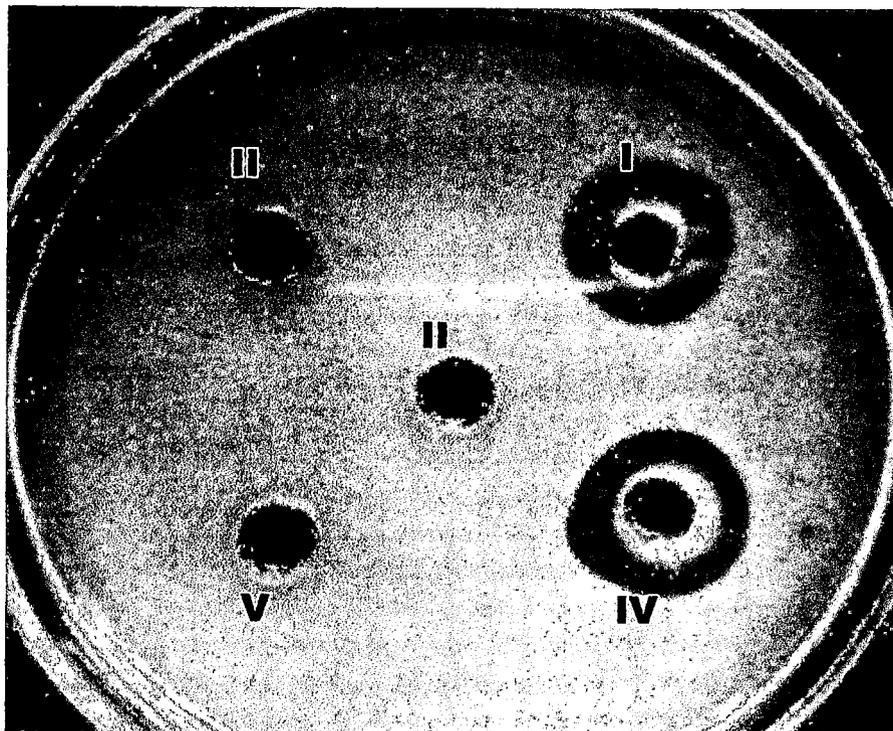


Figura A17. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO_3 , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO_3 a 20mg/mL sobre *Staphylococcus aureus*.

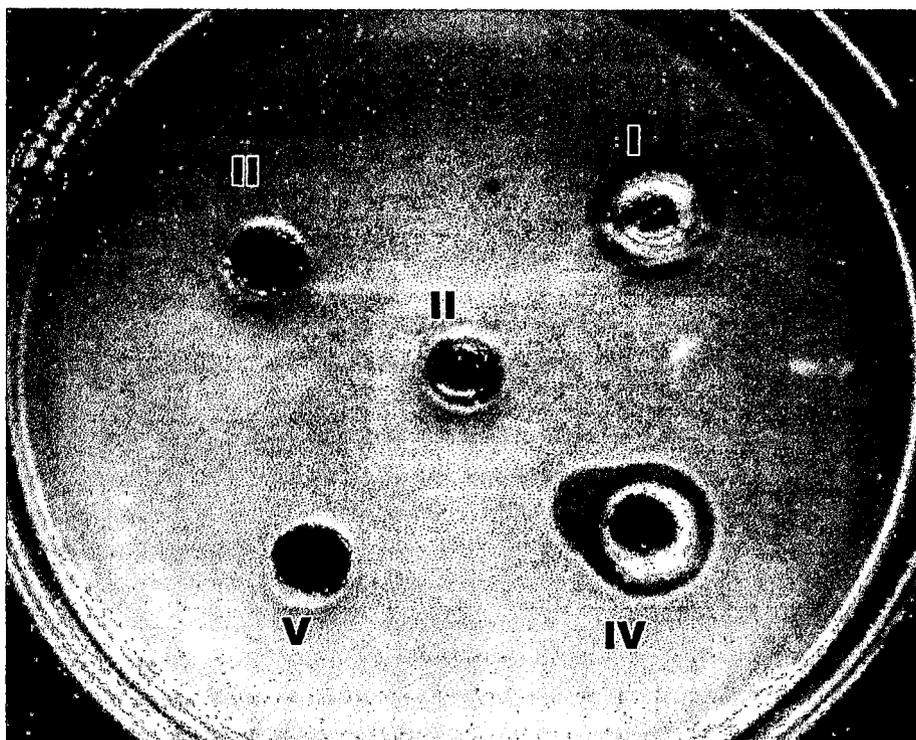


Figura A18. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO_3 , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO_3 a 20mg/mL sobre *Escherichia coli*.

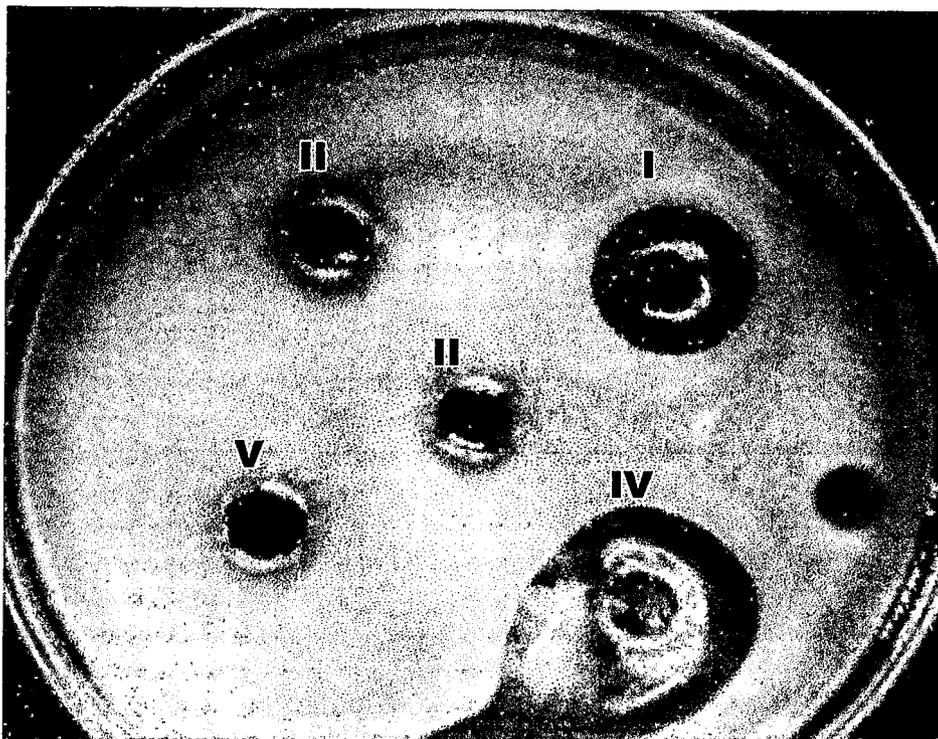


Figura A19. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO_3 , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO_3 a 20mg/mL sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

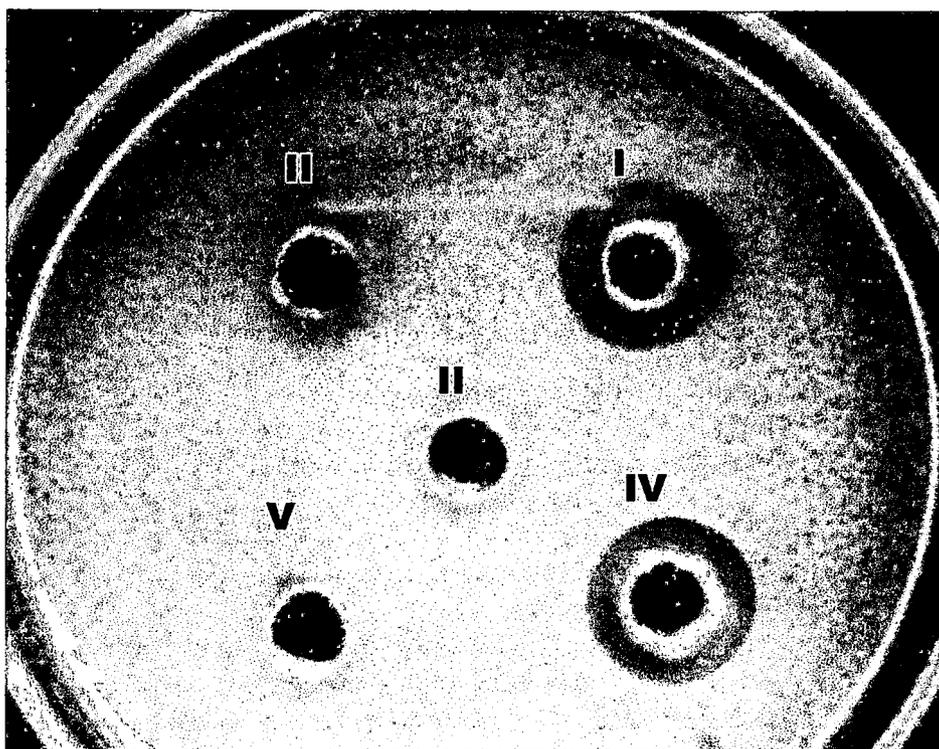


Figura A20. Pruebas de inhibición bacterial de: (I) AgCQNO_3 , (II) CQ, (III) CQDP y (IV) AgNO_3 a 20mg/mL sobre *Bacillus subtilis*.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ¹ Thompson, K. H. & Orvig, C. (2006) Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Translation*, 761-764.
- ² Barriero Magdalena, E. (2007). *3(Aril)-2-Sulfanilpropenoatos de plata y oro con potencial actividad farmacológica*. (Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela). Recuperado de http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2351/1/9788497509411_content.pdf
- ³ Orvig, C. & Abrams, M. J. (1999). Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chemical Reviews*, 99(9), 2201-2203.
- ⁴ Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P. & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, 70 (5), 1129-1143.
- ⁵ Ronconi, L. & Sadler, P.J. (2007). Using Coordination Chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*, 251, 1633-1648
- ⁶ Jones, C.J. & Thornback, J.R. (2007). *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. (pp. 1-3). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- ⁷ Gómez-Ruiz, S. (2010). Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial como agentes antitumorales. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 106(1), 13-21.
- ⁸ Ming, L.-J. (2003). Structure and Function of "Metalloantibiotics". *Medicinal Research Reviews*, 23(6), 697-762.
- ⁹ Jones, C.J. & Thornback, J.R. (2007). *Medicinal applications of Coordination Chemistry*. (pp. 22-27). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- ¹⁰ Meléndez-Gómez, C. & Kouznetsov, V. (2005). Alcaloides quinolínicos: Importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum*, 10(2), 5-18.
- ¹¹ Epperson, M.T., Hadden, C.E. & Waddell, T.G. (1995). Mechanistic basis for rate enhancements in the methanolysis of aliphatic esters of quinine. *The Journal of Organic Chemistry*, 60, 8113-8114.
- ¹² Solomon, V.R. & Lee, H. (2009). Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, 625, 220-233.
- ¹³ Kouznetsov, V. & Amado Torres, D. (2008). Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 306-320.
- ¹⁴ Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H. & Schlitzer, M. (2003). New antimalarial drugs. *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 5274- 5293.
- ¹⁵ Fu, S., Bjorkman, A., Wahlin, B., Ofori-Adjei, D., Ericsson, O. & Sjoqvist, F. (1986). *In vitro* activity of chloroquine, the two enantiomers of chloroquine, desethylchloroquine and pyronaridine against *plasmodium falciparum*. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 22, 93-96.

- ¹⁶ Sánchez-Delgado, R.A., Navarro, M., Pérez, H. & Urbina, J.A. (1996). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of new ruthenium and rhodium-chloroquine complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *39*, 1095-1099.
- ¹⁷ Navarro, M., Pérez, H. & Sánchez-Delgado, R.A. (1997). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of the new gold-chloroquine complex $[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_6$. *Journal of Medicinal Chemistry*, *40*, 1937-1939.
- ¹⁸ Navarro, M., Prieto, N., Colmenares, I., González, T., Arsenak, M., & Taylor, P. (2006). Synthesis and characterization of new palladium-clotrimazole and palladium-chloroquine complexes showing cytotoxicity for tumor cell lines *in vitro*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *100*, 152-157.
- ¹⁹ Navarro, M., Pekerar, S. & Pérez, H.A. (2007). Synthesis, characterization and antimalarial activity of new iridium-chloroquine complexes. *Polyhedron*, *26*, 2420-2424.
- ²⁰ Navarro, M., Goitia, H., Silva, P., Velásquez, M., Ojeda, L.E. & Fraile, G. (2005). Synthesis and characterization of new copper- and zinc-chloroquine complexes and their activities on respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *99*, 1630-1636.
- ²¹ Navarro, M., Vásquez, F., Sánchez-Delgado, R. A., Pérez, H., Sinou, V. & Schrével, J. (2004). Synthesis and *in vitro* antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*, 5204-5209.
- ²² Biot, C., Castro, W., Bottéd, C. Y. & Navarro, M. (2012). The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. *Dalton Transactions*, *41*, 6335-6349.
- ²³ Rajapakse, C.S.K., Martínez, A., Naoulou, B., Jarzecki, A.A., Suárez, L., Deregnaucourt, C., Sinou, V., Schrével, J., Musi, E., Ambrosini, G., Schwartz, G. K. & Sánchez-Delgado, R. A. (2009). Synthesis, characterization, and *in vitro* antimalarial and antitumor activity of new ruthenium (II) complexes of chloroquine. *Inorganic Chemistry*, *48*, 1122-1131.
- ²⁴ Ursos, L.M.B. & Roepe, P.D. (2002). Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Medicinal Research Reviews*, *22*(5), 465-491.
- ²⁵ Vargas Herrera, J. (2003). Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*, *11*(1). Recuperado de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/epidemiologia/v11_n1/pdf/a05.pdf
- ²⁶ Ministerio de Salud del Perú, Dirección General de Epidemiología. (2013). Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú, del 11 al 17 de Agosto de 2013. *Boletín Epidemiológico (Lima)*, *22*(33), 712-716. Recuperado de http://www.dge.gob.pe/Boletin_sem/2013/SE33/se33-00.pdf
- ²⁷ Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA (2013). Sala de situación 33. Recuperado de <http://www.dge.gob.pe/vigilancia/sala/2013/SE33/malaria.pdf>.
- ²⁸ Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. (2011). *Prioridades de investigación en salud en el Perú 2010-2014: La experiencia de un proceso participativo y descentralizado*:

sistematización de la experiencia. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Prioridades%20%5B13.6.11%5D.pdf>

²⁹ Foley, M. & Tilley, T. (1998). Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 79(1), 55-87.

³⁰ Arrow, K. J., Panosian, C. & Gelband, H. (2004). *Saving lives, buying time: Economics of malaria drugs in an age of resistance*. Edited by Committee on the Economics of Antimalarial Drugs (131-132). Washington DC: The National Academies Press. Recuperado de http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=11017

³¹ Schantz, P.M. (2003). Orígenes y naturaleza de la resistencia a las drogas en parásitos. En Wisnivesky, C. (Ed.), *Ecología y epidemiología de las infecciones parasitarias*. (333-346). Cartago: Libro Universitario Regional.

³² Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M.B., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, XZ, Wootton, J.C., Roepe, P.D. & Wellems, T.E. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*, 6, 861-871.

³³ De Souza, N.B., Carmo, A.M., Lagatta, D.C., Alves, M.J., Fontes, A.P., Coimbra, E.S., da Silva, A.D. & Abramo C. (2011). 4-aminoquinoline analogues and its platinum(II) complexes as antimalarial agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65, 313-316.

³⁴ Ajibade, P.A. & Kolawole, G.A. (2008). Synthesis, characterization and antiprotozoal studies of some metal complexes of antimalarial drugs. *Transition Metal Chemistry*, 33, 493-497.

³⁵ Caballero, C.V. (2006). Impacto socioeconómico y costos de la artritis reumatoide (AR). En Caballero, C.V. (Ed.) *Retos para el diagnóstico y tratamiento de la artritis reumatoide en América Latina*. Barranquilla: Ediciones Uninorte.

³⁶ Tett, S., Cutler, D., & Day, R. (1990). Antimalarials in rheumatic diseases. *Baillieres Clinical Rheumatology*, 4(3), 467-489.

³⁷ Restrepo, J.F., Guzmán, R. & Iglesias, A. (2002). Antimaláricos como drogas inductoras de remisión en la artritis reumatoidea. *Revista Colombiana De Reumatología*, 9(1), 62-68.

³⁸ Solomon, V.R. & Lee, H. (2009) Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, 625, 220-233.

³⁹ Navarro, M., Castro, W., Higuera-Padilla, A.R., Sierraalta, A., Abad, M.J., Taylor, P. & Sánchez-Delgado, R.A. (2011). Synthesis, characterization and biological activity of trans-platinum(II) complexes with chloroquine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1684-1691.

⁴⁰ Savarino, A., Gennero, L., Chen, H.C., Serrano, D., Malavasi, F., Boelaert J.R. & Sperber, K. (2001). Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity. *AIDS*, 15(17), 2221-2229.

⁴¹ Di Trani, L., Savarino, A., Campitelli, L., Norelli, S., Puzelli, S., D'Ostilio, D., Vignolo, E., Donatelli, I., & Cassone A. (2007). Different pH requirements are associated with divergent inhibitory effects of chloroquine on human and avian influenza A viruses. *Virology Journal*, 4 (39). Recuperado de <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422x-4-39.pdf>

-
- ⁴² Tsai, W.P., Nara, P.L., Kung H.F., & Oroszlan, S. (1990). Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 6, 481-489.
- ⁴³ Fesen, M.R., Kohn, K.W., Leteurtre, F. & Pommier, Y. (1993). Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(6), 2399-2403.
- ⁴⁴ Jiang M.C., Lin J.K. & Chen S.S. (1996). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated transactivation by quinacrine and chloroquine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 1-7.
- ⁴⁵ Savarino, A., Gennero, L., Boelaert, J.R. & Sperber, K. (2001). The anti-HIV-1 activity of chloroquine. *Journal of Clinical Virology*, 20, 131-135.
- ⁴⁶ Birmingham, D.J. (1998). Overview: Occupational Skin Diseases. En M. McCann (Ed.), *Encyclopaedia Of Occupational Health And Safety Volume 01, Fourth Edition*. Recuperado de http://www.ilo.org/safework_bookshelf/english?d&nd=170000102&nh=0
- ⁴⁷ Gutierrez, E.L. Galarza, C., Ramos, W., Tello, M., Rojas, I., Chía, H., Ronceros, G. & Ortega-Layza, A.G. (2009). Prevalencia de Enfermedades Dermatológicas en una comunidad rural de Ucayali, Perú. *Dermatología Peruana*, 19(2), 104-112.
- ⁴⁸ Kalia, S. & Dutz, J.P. (2007). New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology. *Dermatologic Therapy*, 20, 160-174.
- ⁴⁹ Ochsendorf, F.R. (2010). Use of antimalarials in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8, 829-845.
- ⁵⁰ Bielsa, I. (2003). Uso de los antimaláricos en dermatología. *Piel*, 18(9), 515-518.
- ⁵¹ Wolf, R., Wolf, D. & Ruocco, V. (2000). Antimalarials: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology*, 18(1), 17-35.
- ⁵² Sánchez-Saldaña, L. (2008). Medicamentos antiguos y vigentes en dermatología. *Dermatología Peruana*, 18(3), 229-261.
- ⁵³ Real Academia Española (RAE). *Diccionario de la lengua española - vigésima segunda edición*. Recuperado de <http://lema.rae.es/drae/?val=plata>
- ⁵⁴ Greenwood, N. & Earshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements*. (pp. 1173-1200). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- ⁵⁵ Valle Bourrouet, G. (2004). *Química Descriptiva de los elementos de transición: Una revisión de los compuestos binarios*. (p. 7). Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- ⁵⁶ Cotton, A., Wilkinson, G. (1997) *Química inorgánica avanzada Cuarta edición*. (pp. 1161-1171). México: Ed. Limusa.
- ⁵⁷ Huheey, J., Keiter, E. & Keiter, R. (2005). *Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad Cuarta edición*. (pp. 637-638). México: Ed. Alfaomega.
- ⁵⁸ S.A. Cotton. (1997). *Chemistry of precious metals*. (pp. 273-327). London: Chapman & Hall.

- ⁵⁹ Vanýsek, P. "Electrochemical Series" (2010). En Lide, D.R. (Ed.), *GRG Handbook of Chemistry and Physics*, 90th Edition (pp. (5-80)-(5-89)). Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis.
- ⁶⁰ Texter, J., Hastreiter, J.J. & Hall, J.L. (1983) Spectroscopic confirmation of the tetrahedral geometry of $\text{Ag}(\text{H}_2\text{O})_4^+$. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(23), 4690-4693.
- ⁶¹ Yamaguchi, T., Johansson, G., Holmberg, B., Maeda, M. & Ohtaki, H. (1984). The Coordination and complex formation of silver(I) in aqueous perchlorate, nitrate, and iodide solutions. *Acta Chemica Scandinavica*, A38, 437-451.
- ⁶² Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S. & Hernandez, J. (2003). *Química Analítica cualitativa Octava Edición*. (p. 422). Madrid: Paraninfo Thomson Ed.
- ⁶³ Lancashire, R.J. (1987). Silver. En Wilkinson, G.; Gillard, R. D.; McCleverty, J. A. (Eds.), *Comprehensive Coordination Chemistry Volume 5* (pp. 775-859). Oxford: Pergamon Press.
- ⁶⁴ Gimeno, M.C. & Laguna, A. (2004). Silver and Gold. En Fenton, D.E. (Ed.), *Comprehensive Coordination Chemistry II Volume 6* (pp. 911-1145). Oxford: Elsevier/Pergamon Press.
- ⁶⁵ Angulo Cornejo, J. (1992). Stereochemical Aspects of Copper(I), Silver(I) and Gold(I) Complexes with Chelating Ligands. Bratislava: Slovenska Technika Univerzita.
- ⁶⁶ Holloway, C.E., Melnik, M., Nevin, W.A. & Liu, W. (1995). Silver Coordination and Organometallic Compounds: Classification and Analysis of Crystallographic and Structural Data. *Journal of Coordination Chemistry*, 35(1), 85-178.
- ⁶⁷ Sun, W.Y., Bai, Z.S. & Yu, J.Q. (2010). Supramolecular Chemistry of Silver. En Michael Harmata (Ed.), *Silver in Organic Chemistry* (pp. 329-356). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- ⁶⁸ Alexander, J.W. (2009). History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 10(3), 289-292.
- ⁶⁹ Lansdown, A.B. (2002). Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care*, 11(4), 125-130.
- ⁷⁰ Lansdown, A.B. (2006). Silver in Health Care: Antimicrobial effects and Safety in Use. *Current Problems in Dermatology*. Basel, Karger, 33, 17-34.
- ⁷¹ Weber, D.J. & Rutala, W.A. (2001). Use of metals as microbicides in preventing infections in healthcare. En Block, S.S. (Ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation* (pp. 415-430). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- ⁷² Black, V.A. & Njewel, G. (2010). Search for the next "Silver Bullet": A review of literature. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 64, 50-56.
- ⁷³ Wong, K.K.Y. & Liu, X. (2010). Silver nanoparticles—the real "silver bullet" in clinical medicine? *Medicinal Chemistry Communications*, 1, 125-131.
- ⁷⁴ Kecskes, C. E. (2003). Infección relacionada con catéteres de nutrición parenteral. En San Juan, J.A., Rodríguez, A., Rello, J. & Álvarez, L. (Eds.), *Infecciones por catéteres vasculares volumen 2: En situaciones particulares* (pp. 1-8). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.

- ⁷⁵ Lansdown, A.B. Silver as an Antibiotic: Problems of Resistance (2010). En Lansdown, A.B. (Ed.), *Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use* (pp. 72-91). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- ⁷⁶ Nomiya, K., Tsuda, K., Sudob, T., & Oda, M. (1997). Ag(I)-N bond-containing compound showing wide spectra in effective antimicrobial activities: Polymeric silver(I) imidazolate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 68, 39-44.
- ⁷⁷ Kasuga, N.C., Sato, M., Amano, A., Hara, A., Tsuruta, S., Sugie, A. & Nomiya, K. (2008). Light-stable and antimicrobial active silver(I) complexes composed of triphenylphosphine and amino acid ligands: Synthesis, crystal structure, and antimicrobial activity of silver(I) complexes constructed with hard and soft donor atoms (n -[[Ag(L)(PPh₃)₂]] with L = α -ala⁻ or asn⁻ and n = 1 or 2). *Inorganica Chimica Acta*, 361, 1267-1273.
- ⁷⁸ Nomiya, K., Tsuda, K. & Kasuga, N.C. (1998). Synthesis and X-ray characterization of helical polymer complexes [Ag(1,2,3-L)(PPh₃)₂]_n and [Ag(1,2,4-L)(PPh₃)₂]_n (HL = triazole) and their antimicrobial activities. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1653-1659.
- ⁷⁹ Nomiya, K., Takahashi, S. & Noguchi, R. (2000). Synthesis and crystal structure of three silver(I) complexes with (S)-(-)-5-oxo-2-tetrahydrofurancarboxylic acid (S-Hothf) and its isomeric forms (R-Hothf and R,S-Hothf) showing wide spectra of effective antibacterial and antifungal activities. Chiral helical polymers in the solid state formed by self-assembly of the dimeric [Ag(othf)]₂ cores. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1343-1348.
- ⁸⁰ Nomiya, K., Takahashi, S., Noguchi, R., Nemoto, S., Takayama, T. & Oda, M. (2000). Synthesis and Characterization of Water-Soluble Silver(I) Complexes with L-Histidine (H₂his) and (S)-(-)-2-Pyrrolidone-5-carboxylic Acid (H₂pyrrld) Showing a Wide Spectrum of Effective Antibacterial and Antifungal Activities. Crystal Structures of Chiral Helical Polymers [Ag(Hhis)]_n and {[Ag(Hpyrrld)]₂]_n in the Solid State. *Inorganic Chemistry*, 39, 3301-3311.
- ⁸¹ Nomiya, K., Takahashi, S. & Noguchi, R. (2000). Water-soluble silver(I) complexes of (R)-(+)- and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid and their antimicrobial activities. Chiral helical polymer and polymer sheet structures in the solid-state formed by self-assembly of dimeric [Ag(Hpyrrld)]₂ cores. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 4369-4373.
- ⁸² McKeage, M.J., Papathanasiou, P., Salem, G., Sjaarda, A., Swiegers, G.F., Waring, P. & Wild, S.B. (1998). Antitumor activity of gold(I), silver(I) and copper(I) complexes containing chiral tertiary phosphines. *Metal-Based Drugs*, 5, 217-223.
- ⁸³ Berners-Price, S.J., Johnson, R.K., Giovenella, A.J., Faucette, L.F., Mirabelli, C.K. & Sadler, P.J. (1988). Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver(I) complexes: comparison with copper and gold. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 33, 285-295.
- ⁸⁴ Coyle, B., McCann, M., Kavanagh, K., Devereux, M., McKee, V., Kayal, N., Egan, D., Deegan, C. & Finn, G.J. (2004). Synthesis, X-ray crystal structure, anti-fungal and anti-cancer activity of [Ag₂(NH₃)₂(salH)₂] (salH₂=salicylic acid). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 1361-1366.
- ⁸⁵ Zhu, H.L., Zhang, X.M., Liu, X.Y., Wang, X.J., Liu, G.F., Usman, A. & Fun, H.K. (2003). Clear Ag-Ag bonds in three silver(I) carboxylate complexes with high cytotoxicity properties. *Inorganic Chemistry Communications*, 6, 1113-1116.

- ⁸⁶ Medvetz, D.A., Hindi, K.M., Panzner, M.J., Ditto, A.J., Yun, Y.H. & Youngs, W.J. (2008). Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole. *Metal-Based Drugs*, 2008, 384010.
- ⁸⁷ Siciliano, T.J., Deblock, M.C., Hindi, K.M., Durmus, S., Panzner, M.J., Tessier, C.A. & Youngs, W.J. (2011). Synthesis and anticancer properties of gold(I) and silver(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696, 1066-1071.
- ⁸⁸ Tan, S.J., Yan, Y.K., Lee, P.P. & Lim, K.H. (2010). Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. *Future Medicinal Chemistry*, 2(10), 1591-1608.
- ⁸⁹ Bergstrom, D. E., Lin, X., Wood, T. D., Witvrouw, M., Ikeda, S., Andrei, G., Snoeck, R., Schols, D. & De Clercq, E. (2002). Polysulfonates derived from metal thiolate complexes as inhibitors of HIV-1 and various other enveloped viruses *in vitro*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 13, 185-195.
- ⁹⁰ Zachariadis, P.C., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis, N., Michaelides, A., Skoulika, S., Ming, Y. & Yu, X. (2003). Synthesis, study and structural characterization of a new water soluble hexanuclear silver(I) cluster with the 2-mercapto-nicotinic acid with possible antiviral activity. *Inorganica Chimica Acta*, 343, 361-365.
- ⁹¹ Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H. & Yacaman, M.J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(6). Recuperado de <http://www.jnanobiotechnology.com/content/pdf/1477-3155-3-6.pdf>
- ⁹² Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N.V., Ixtapan-Turrent, L. & Rodriguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1). Recuperado de <http://www.jnanobiotechnology.com/content/pdf/1477-3155-8-1.pdf>
- ⁹³ Lu, L., Sun, R.W., Chen, R., Hui, C.K., Ho, C.M., Luk, J.M., Lau, G.K. & Che, C.M. (2008). Silver Nanoparticles Inhibit Hepatitis B Virus Replication. *Antiviral Therapy*, 13, 253-262.
- ⁹⁴ A. C. Moffat. (1986). *Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material* (pp. 452-454). London: Pharmaceutical Press.
- ⁹⁵ Hong, D.D. (1976). Chloroquine. En Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances Volume 5* (pp. 62-85). New York-San Francisco-London: Academic Press.
- ⁹⁶ Mandel, S., Tas, A.C. (2010). Brushite (CaHPO₄·2H₂O) to octacalcium phosphate (Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄·5H₂O) transformation in DMEM solutions at 36.5 °C. *Materials Science and Engineering C*, 30, 245-254.
- ⁹⁷ Nakamoto, K. (2009). Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds. Part A: Theory and applications in inorganic chemistry Sixth Edition. (p. 202). New jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- ⁹⁸ Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. En Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 10815-10837). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

- ⁹⁹ De Dios, A.C., Tycko, R., Ursos, L.M.B & Roepe, P.D. (2003). NMR Studies of Chloroquine - ferriprotoporphyrin IX complex. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107, 5821-5825.
- ¹⁰⁰ Davalos, J.Z, Gonzales, J., Guerrero, A., Valderrama Negrón, A., Aguirre Mendez, L., Claramunt, R., Santa María, D., Alkorta, I. & Elguero, J. (2013). Silver complex of chloroquine: Synthesis, characterization and structural properties. *New Journal of Chemistry*, 37, 1391-1401.
- ¹⁰¹ Kaiser, C.R., Pais, K.C., de Souza, M.V.N., Wardell, J.L., Wardell, S.M.S.V. & Tiekink, E.R.T. (2009). Assessing the persistence of the N–H/N hydrogen bonding leading to supramolecular chains in molecules related to the anti-malarial drug, chloroquine. *CrystEngComm*, 11, 1133-1140.
- ¹⁰² Hamada, Y., Tsuboi, M., Nakata M., & Tasumi, M. (1988). Infrared spectrum of isopropylamine. *Chemical Physics*, 125, 55-62.
- ¹⁰³ Morozov, I.V., Serezhkin, V.N. & Troyanov, S.I. (2009). Modes of coordination and stereochemistry of nitrate groups in organic and organometallic nitrates. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 58(12), 2407-2417.
- ¹⁰⁴ Moëllèr, T. (1994). *Quimicà Inorgànica: Nuèva versióh puèsta al dia* (pp. 367-368). Bàrcelòna: Ed. Reverte.
- ¹⁰⁵ Lever, A.B.P., Mantovani, E., & Ramaswamy, B.S. (1971). Infrared combination frequencies in coordination complexes containing nitrate groups in various coordination environments. A probe for the metal-nitrate interaction. *Canadian Journal of Chemistry*, 49(11), 1957-1964.
- ¹⁰⁶ Addison, C.C. & Gatehouse, B.M. (1960). The Infrared Spectra of Anhydrous Transition-metal Nitrates. *Journal of the Chemical Society*, 613-616.
- ¹⁰⁷ 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.
- ¹⁰⁸ Kubota, M., Johnston, D.L. & Matsubara, I. (1966). Complexes of succinonitrile with silver(I). A nitrate-silver compound. *Inorganic Chemistry*, 5(3), 386-391.
- ¹⁰⁹ Socrates, G. (2001). *Infrared and raman characteristic group frequencies: Tables and charts. Third Edition* (pp. 107-114, 165-168). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- ¹¹⁰ Geddes, A.L. & Bottger, G.L. (1969). The infrared spectra of silver-ammine complexes. *Inorganic Chemistry*, 8(4), 802-807.
- ¹¹¹ Bowmaker, G.A., Lim, K.C., Skelton, B.W., Sukarianingsih, D., White, A.H. (2005). Syntheses, structures and vibrational spectroscopy of some 1:2 and 1:3 adducts of silver(I) oxyanion salts with pyridine and piperidine bases containing non-coordinating 2,(6)-substituents. *Inorganic Chimica Acta*, 358, 4342-4370.
- ¹¹² 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.
- ¹¹³ Isab, A.A., Ahmad, S. & Arab, M. (2002). Synthesis of silver(I) complexes of thiones and their characterization by ¹³C, ¹⁵N and ¹⁰⁷Ag NMR spectroscopy. *Polyhedron*, 21, 1267-1271.

-
- ¹¹⁴ Pearson, R.G. (1963). Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3533-3539.
- ¹¹⁵ Gona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19(2), S77-81.
- ¹¹⁶ García, P., Paredes, F. & Fernández, M.T. (1994). *Microbiología Clínica Práctica Segunda Edición* (pp.132-144). Cadiz: Servicio de Publicaciones UCA.
- ¹¹⁷ Wilks, J.C. & Slonczewski, J.L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5601-5607.
- ¹¹⁸ Vargas, E., Alvarez, A.H. & Cervantes, C. (1998). Sistemas bacterianos de expulsión de metales tóxicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 40(1-2), 53-71.
- ¹¹⁹ Murray, P.R., Rosenthal, K.S & Pfaüer, M.A. (2006). *Microbiología Médica Quinta Edición*. (p. 12). Madrid: Elsevier España..
- ¹²⁰ Percival, S.L., Bowler, P.G. & Russell, D. (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, 60, 1-7.
- ¹²¹ Gaizer, F., Johansson, G. (1988). Silver iodine complexes in DMSO and DMF solutions. *Acta Chemica Scandinavica*, A42, 259-268.
- ¹²² Clement, J.L. & Jarrett, P.S. (1994). Antibacterial silver. *Met. Based Drugs*, 1, 467-482.
- ¹²³ PerkinElmer, Inc. (2011). *2400 Series II CHNS/O Elemental Analysis (Catalogo)*. Recuperado de http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74386BRO_2400_SeriesII_CHNSO_Elemental_Analysis.pdf
- ¹²⁴ Alonso, M.M. (2011). Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). En Fardos, M. & Goberna, C. (Eds.), *Técnicas de análisis y caracterización de materiales Segunda edición* (pp. 54). España: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- ¹²⁵ Escudero, A. (2004). Ressonanță magnetică nucleară aplicată al ȧstăd ȧolid. *Anăles de la Real Sociedad Española de Química*, 100(2), 27-36.
- ¹²⁶ Bryce, D.L., Bernard, G.M., Gee, M., Lumsden, M.D., Eichele, K. & Wasylshen, R.E. (2001). Review: Practical Aspects of Modern Routine Solid-State Multinuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: One-Dimensional Experiments. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 46, 46-82.
- ¹²⁷ Rubinson, K.A. & Rubinson, J.F. (2001). *Análisis Instrumental* (p. 516). Madrid: Pearson Education. S.A.
- ¹²⁸ Laws, D.D., Bitter, H.M.L. & Jerschow, A. (2002). Solid-state NMR spectroscopic methods in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(17), 3096-3129.
- ¹²⁹ Duer, M.J. (2002). Essential Techniques for Spin-1/2 Nuclei. En Duer, M.J. (Ed.), *Solid State NMR Spectroscopy: Principles and Applications* (p. 100). Cambridge: Blackwell Science Ltd.

¹³⁰ Davalos, J.Z., Guerrero, A., Herrero, R., Jimenez, P. & Abboud, J.L.-M. (2008). Espectrometría de Resonancia Ciclotrónica de Iones (FT-ICR): Una poderosa herramienta para el análisis estructural y el estudio de reacciones ion-molécula de una amplia variedad de especies. *REVCUNI*, 12(1), 25-32.

¹³¹ Gross, J.H. (2004). *Mass Spectrometry* (p. 171). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

¹³² Duckworth, D.C., Eyler, J.R. & Watson, C.H. (2000). Ion traps and their applications to elemental analysis. En Barshickc, C.M., Duckworth, D.C. & Smith, D.H. (Eds.), *Inorganic mass spectroscopy* (p. 356). New York: Marcel Dekker, Inc.

¹³³ Girolami, G.S., Rauchfuss, T.B. & Angelici, R.J. (1999). *Synthesis and technique in Inorganic chemistry: A laboratory manual third ed.* (p. 254). Sausalito: University Science Books.

¹³⁴ Smallwood, I.M. (1996). *Handbook of organic solvents properties*. London: Arnold.