

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Química**



**INFORME DE SUFICIENCIA PARA OPTAR EL TÍTULO  
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA**

**Titulado:**

**Importancia de la Química Inorgánica en el Tratamiento de  
Enfermedades Tropicales**

**Presentado por:**

**Juan Carlos Pozo Quintanilla**

**Asesora: Dra. Ana Valderrama Negrón**

**LIMA-PERÚ**

**2011**

*No perdiste a nadie, el que murió, simplemente se nos adelantó, porque para allá vamos todos. Además lo mejor de él, el amor, sigue en tu corazón. Nacemos para vivir, por eso el capital más importante que tenemos es el tiempo, es tan corto nuestro paso por este planeta que es una pésima idea no gozar cada paso y cada instante, con el favor de una mente que no tiene límites y un corazón que puede amar mucho más de lo que suponemos.*

**DEDICATORIA:**

*A toda mi familia y para el resto de los cuatro, por estar ahí siempre.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Gracias a mi madre y hermanos por apoyarme en los momentos buenos y malos que me ha tocado vivir, espero que algún día pueda contestarles la eterna pregunta de a qué me dedico y para qué sirve todo esto que hago. Y un agradecimiento especial a mi asesora Ana Valderrama, por apoyarme con la información que ha sido necesaria para la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>CÁRATULA</b>	1
<b>DEDICATORIA</b>	2
<b>AGRADECIMIENTO</b>	3
<b>ÍNDICE</b>	4
<b>ABREVIATURAS</b>	7
<b>RESUMEN</b>	8
<b>OBJETIVOS</b>	10
<b>INTRODUCCIÓN</b>	11
<b>CAPÍTULO 1: ENFERMEDADES TROPICALES</b>	13
<b>1. Definición</b>	13
<b>2. Enfermedades tropicales: Leishmaniasis y Malaria</b>	15
<b>2.1. Leishmaniasis</b>	15
2.1.1. Descripción	15
2.1.2. Características del Parásito	15
2.1.3. El vector	16
2.1.4. El ciclo de vida	17
2.1.5. Manifestaciones clínicas	18
<b>2.2. Malaria</b>	19
2.2.1. Descripción	19
2.2.2. Distribución de la malaria a nivel Mundial	19
2.2.3. Ciclo de vida del <i>Plasmodium falciparum</i>	20
2.2.4. Manifestaciones clínicas	21
<b>CAPÍTULO 2: ADN: FORMAS DE INTERACCIÓN CON LOS COMPLEJOS METÁLICOS Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN</b>	22
<b>1. Formas de interacción con el ADN</b>	22
1.1. Interacción electrostática	24
1.2. Unión al Surco	24
1.3. Intercalación	24
<b>2. Técnicas empleadas para el estudio de la interacción de compuestos con el ADN</b>	26
2.1. Medidas de viscosidad	26
2.2. Dicroísmo circular	28
2.3. Espectrometría UV- Visible y fluorimetría	30
2.4. Desnaturalización térmica	31
2.5. Electroforesis en gel	32
<b>CAPÍTULO 3: ARSENAL TERAPÉUTICO Y COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO CONTRA LA LEISHMANIASIS</b>	35
<b>1. Arsenal terapéutico tradicional</b>	35
1.1. Fármacos de primera línea: Antimoniales	35
1.1.1. Mecanismo de acción de los Antimoniales	36
1.2. Fármacos de segunda línea	38

1.2.1. Anfotericina B	38
1.2.2. Pentamidina	39
1.2.3. Ketoconazol	40
<b>2. Complejos metálicos en estudio</b>	<b>41</b>
2.1. Complejos de Pt(II) y Ru(III) con ligandos triazolopirimidina	41
2.1.1. Caracterización del complejo $\text{cis}[\text{PtCl}_2 \cdot (7\text{HtpO})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	42
2.1.2. Actividad biológica	43
2.2. Complejos de cobre (II) con derivados del ligando [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pirimidina	45
2.2.1. Caracterización de los complejos metálicos	46
2.2.2. Actividad biológica	49
<b>3. Complejos metálicos como posibles intercaladores al ADN</b>	<b>51</b>
3.1. Complejo de cobre: Caracterización, estudios de unión al ADN y actividad biológica del complejo $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$ contra la <i>Leishmania mexicana</i> .	52
3.1.1. Caracterización del complejo de Cu (I): $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$	52
3.1.2. Estudios de interacción con el ADN	53
3.1.2.1. Titulaciones espectroscópicas	53
3.1.2.2. Medidas de viscosidad	55
3.1.2.3. Interacción covalente	55
3.1.2.4. Electroforesis en gel de agarosa	56
3.1.3. Estudios biológicos sobre cultivos de <i>Leishmania mexicana</i>	57
3.2. Complejo de Au(III): Caracterización del complejo $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$ . Estudios de interacción y actividad biológica contra la <i>Leishmania (L) Mexicana</i> .	59
3.2.1. Caracterización del complejo $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$	60
3.2.2. Estudios de interacción con el ADN	62
3.2.2.1. Titulaciones espectroscópicas	62
3.2.2.2. Medidas de viscosidad	63
3.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	63
3.2.3. Pruebas biológicas en cultivos	64
<b>CAPÍTULO 4: ARSENAL TERAPÉUTICO Y COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO</b>	<b>66</b>
<b>CONTRA LA MALARIA</b>	
<b>1. Arsenal terapéutico tradicional</b>	<b>66</b>
1.1. Desarrollo de las Aminoquinolinas	67
1.2. Mecanismo de acción de las 4-aminoquinolinas	70
1.3. El rol del grupo en la posición C-7 del anillo quinolínico	71
<b>2. Complejos metálicos en estudio</b>	<b>73</b>
2.1. Complejo de cobre: Síntesis y caracterización de complejos de cobre (II) con ligando piridina-2-carboxamidrazonas	73
2.1.1. Caracterización de los complejos metálicos de cobre	74
2.1.2. Actividad antimalarica de los complejos y ligandos	77
2.2. Complejo de Galio: Complejo antimalárico de Galio(III) con actividad selectiva contra <i>plasmodium falciparum</i> resistente a la Cloroquina	79
2.2.1. Caracterización del complejo de Ga(III)	79

2.2.2. Actividad biológica del complejo	81
<b>2.3. Complejo de Oro: Mecanismo de acción antimalarica del complejo metálico</b>	<b>83</b>
[Au(CQ)(PPh <sub>3</sub> )]PF <sub>6</sub>	
2.3.1. Carácter lipofílico del complejo metálico e inhibición de la $\beta$ hematina	83
2.3.1.1. Interacción con la hematina	83
2.3.1.2. Inhibición de la formación de la $\beta$ -hematina	85
2.3.1.3. Determinación del coeficiente de distribución	88
2.3.2. Estudios de interacción con el ADN	90
2.3.2.1. Titulaciones espectroscópicas	90
2.3.2.2. Titulación fluorimétrica	91
2.3.2.3. Medidas de viscosidad	93
2.3.2.4. Pruebas de electroforesis	94
2.3.2.5. Desnaturalización térmica del ADN	94
2.3.2.6. Dicroísmo circular	95
2.3.2.7. Interacciones covalentes	95
<b>CAPÍTULO 5: METALOCENOS ANTIMALÁRICOS</b>	<b>98</b>
<b>1. Ferroceno</b>	<b>98</b>
<b>2. Ferroquina</b>	<b>99</b>
<b>2.1. Propuestas de mecanismos de acción de la ferroquina</b>	<b>101</b>
2.1.1. Inhibición del pigmento malárico	101
2.1.2. Generación de especies reactivas de oxígeno	102
2.1.3. Interacción con la PfCRT	103
2.1.4. Enlace de hidrógeno intramolecular	103
2.1.5. Modificación de la cadena lateral básica	104
2.1.6. Variación de la posición del grupo ferrocenil	105
2.1.7. Metabolitos secundarios	106
2.1.8. Rutenoquina por ferroquina	107
<b>3. Ferroquina y Rutenoquina: compuestos análogos y actividad antimalárica</b>	<b>109</b>
<b>3.1. Compuestos análogos a la ferroquina y rutenoquina</b>	<b>109</b>
3.1.1. Estructura del compuesto 2b: (7-cloroquinolina-4-il) (2- dimetilaminometilrutenoceno-1-ilmetiyl)amina	110
3.1.2. Estructura molecular del 3a. (7-cloroquinolina-4-il)-N'- (1'- dimetilferroceno-1-ilmetil)-amina	111
3.1.3. Estructura del compuesto 3b (7-Cloroquinolina-4-il) (1'- dimetilaminometilrutenoceno- 1-ilmetil)amine	111
3.1.4. Estructura del compuesto 4a: N-(7-cloroquinolina-4-il)-N'- (2- dimetilaminometilferroceno-1-ilmetiyl)-etano-1,2-diamina	113
<b>3.2. Actividad in vitro de compuestos análogos de la ferroquina y rutenoquina</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>121</b>

## ABREVIATURAS

<b>7HtpO</b>	4,7-dihydro-7-oxo-[1,2,4]-triazolo-[1,5-a]pirimidina.
<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>C</b>	Citosina
<b>Cp</b>	Ciclopentadienilo
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>CT ADN</b>	ADN de timo de ternera
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>dmtp</b>	5,7-dimethyl 1,2,4-triazolo-[1,5-a]pirimidina
<b>dppz</b>	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
<b>dpq</b>	Dipirido[3,2-a:2',3'-h]quinoxolina
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>en</b>	Etilendiamina
<b>Fc</b>	Grupo ferrocenil
<b>FQ</b>	Ferroquina, 7-cloro-4-[(2-N,N-dimetilaminometil) ferrocenilmetilamino quinolina
<b>G</b>	Guanina
<b>HmtpO</b>	4,7-dihydro-5-metil-7-oxo[1,2,4]-triazolo-[1,5-a]pirimidina
<b>HOMO</b>	Orbital molecular ocupado más alto
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria del 50% de un proceso biológico.
<b>ICP</b>	plasma de acoplamiento inductivo
<b>madd</b>	1,12-bis- (2-hidroxi-3-methoxibenzil)-1,5,8,12-tetraazadodecano
<b>MIC</b>	Concentración inhibitoria mínima
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PfCRT</b>	Transportador de resistencia a la CQ del <i>P. falciparum</i>
<b>phen</b>	1,10-fenantrolina
<b>PPh<sub>3</sub></b>	Trifenilfosfina
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SAMDC</b>	S-adenosilmetionina descarboxilasa
<b>SBFI</b>	Suero bovino fetal inactivado
<b>T</b>	Timina
<b>TBE</b>	Tampón tris/borato/EDTA
<b>Tm</b>	Punto de fusión
<b>tp</b>	1,2,4-triazolo-[1,5-a]pirimidina
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>VD</b>	Vacuola digestiva del parásito

## RESUMEN

Este trabajo describe la búsqueda de nuevos agentes con potencial quimioterapéutico basados en complejos metálicos y organometálicos los cuales tienen actividad *in vitro* e *in vivo* contra cepas de leishmania y malaria, principales enfermedades tropicales. En el primer capítulo se da una revisión breve acerca de las principales enfermedades tropicales. La mayoría de estas enfermedades se transmiten por la picadura de un insecto, ya que en las zonas tropicales el clima es caliente y húmedo, creándose las condiciones más apropiadas para la vida de los mismos, estos insectos actúan como vectores transmitiendo de un hombre infectado a un hombre sano, los parásitos, bacterias o virus que son los causantes reales de las enfermedades. La malaria, filariasis, esquistosomiasis, leishmaniasis, tripanosomiasis y la fiebre amarilla son las enfermedades tropicales más comunes. En el capítulo 2 se describen algunos conceptos sobre las formas de interacción de compuestos (que en este caso serán los complejos metálicos) con el ADN, así como la caracterización de estas interacciones mediante técnicas como la viscosidad, desnaturalización térmica, dicroísmo circular, electroforesis etc. Dichas técnicas ayudaron a elucidar las formas de interacción y los posibles mecanismos de acción de los complejos metálicos en estudio. En el tercer capítulo se da una revisión bibliográfica del arsenal terapéutico tradicional disponible para el tratamiento de Leishmaniasis, así como los complejos metálicos y ligandos potenciales en estudio, enfocando principalmente sus mecanismos de acción, de resistencia, actividad farmacológica y toxicidad.

Finalmente, en el cuarto y quinto capítulo se hace una revisión de los agentes disponibles para combatir la malaria, la cual es una enfermedad parasitaria que afecta a cerca de 500 millones de personas y causa más de un millón de muertes al año. Entre las especies de *Plasmodium* que afectan a los seres humanos, *P. Plasmodium falciparum* produce la forma más peligrosa de la enfermedad, la que representa más del 90% de las muertes. Entre los medicamentos antipalúdicos existentes, la cloroquina (CQ), una 4-aminoquinolina, es una droga potente y de bajo costo, siendo

esta última cualidad esencial para las poblaciones con poco acceso a los sistemas de salud. En los últimos años, la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina ha generado la búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos y es aquí donde la química inorgánica medicinal tiene un papel muy importante. Por ejemplo, se destaca el compuesto organometálico denominado ferroquina (FQ, SR97193), que presenta el grupo ferrocenil como parte integrante de la cadena lateral de la CQ. La ferroquina es capaz de afrontar el problema de la resistencia a la cloroquina y su mecanismo de acción ha sido el centro de atención de muchos investigadores. Se cree que la ferroquina es capaz de inhibir la formación de pigmento de la malaria (hemozoina) y generar especies reactivas del oxígeno. En esta revisión se muestra alguna de las modificaciones que ha sufrido la estructura de la ferroquina con el objetivo de entender su mecanismo de acción.

## **OBJETIVO**

Realizar un estudio bibliográfico acerca de los complejos metálicos y organometálicos que presentan actividad farmacológica para el tratamiento de enfermedades tropicales como leishmaniasis y malaria.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales constituyen un peligro para la salud mundial. Se calcula que tres billones de humanos, además de un número mayor de animales domésticos y salvajes, sufren parasitosis. En un sentido científico general, el término parásito incluye a los virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos. Es de amplio conocimiento, que en algunos países tropicales las infestaciones parasitarias son endémicas en un 80% de la población. En estos países este tipo de enfermedades son la principal causa de muerte. Por eso, una de las prioridades de las investigaciones médicas de muchos de estos países es la búsqueda de medicamentos efectivos contra las enfermedades parasitarias. En ese sentido, cabe recordar que los éxitos de la medicina dependen en gran medida de los avances de la química medicinal y la industria farmacéutica, las cuales están estrechamente relacionadas con la química inorgánica, bioinorgánica y la síntesis química. A pesar de los grandes avances en la lucha contra las infecciones durante el siglo pasado, las enfermedades parasitarias humanas representan un problema médico global. Esta situación alarmante se debe principalmente a la falta de interés por parte de la industria farmacéutica de los países industrializados. Dicha ausencia se debe, a que estas enfermedades afectan, principalmente a las personas de escasos recursos en los países del tercer mundo (de regiones tropicales y subtropicales). Aunque los organismos de los parásitos de la leishmania y Malaria son diferentes, se presentan algunas similitudes bioquímicas que facilitarían la búsqueda de fármacos efectivos. La leishmaniasis se viene tratando desde hace unos 60 años con antimoniales pentavalentes que son considerados los fármacos de primera elección para el tratamiento de esta parasitosis, estos tipos de fármacos presentan serias desventajas como efectos cardio, nefro y hepato tóxicos, inactividad por vía oral, eficacia limitada, aunado al incremento desproporcionado de su costo, lo cual obliga a la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas más racionales.

La malaria o paludismo representa una de las enfermedades infecciosas más importantes a nivel mundial, siendo África el lugar donde ocurren el 90% de los

contagios y muertes y la mayoría de los casos fatales son producidos por el *Plasmodium falciparum*. La propagación de la resistencia de este parásito a la cloroquina y a otros fármacos como la quinina, mefloquina, halofantrina y pirimetamina-sulfadoxina, es la principal dificultad que existe en la lucha contra la malaria. Esto hace imperativo el desarrollo de nuevas estrategias para su control quimioterapéutico.

En ese sentido, la química de coordinación representa una de las estrategias que ha surgido actualmente, como un arma para revertir la resistencia a drogas desarrolladas por este tipo de parásitos en especial por el *Plasmodium falciparum*, la más letal de las especies que infectan al hombre.

# Capítulo 1

## ENFERMEDADES TROPICALES

### 1. DEFINICIÓN

Las enfermedades tropicales son enfermedades infecciosas que son prevalentes en regiones tropicales y subtropicales. Estas enfermedades son menos prevalentes en climas templados, debido en parte a la ocurrencia de una estación fría que controla la población de insectos al forzarlos a hibernar. Insectos tales como los mosquitos y las moscas son de lejos los portadores de enfermedades o "vectores" más comunes. Estos insectos pueden transportar un parásito, una bacteria o un virus que es infeccioso para los seres humanos y los animales. Frecuentemente, la enfermedad es transmitida por la picadura de un insecto que ocasiona la transmisión del agente infeccioso por medio de intercambio subcutáneo de sangre. La exploración de selvas tropicales, la deforestación y creciente inmigración y tráfico aéreo internacional ha llevado a una incidencia progresivamente globalizada de tales enfermedades. En la tabla 1 se observan algunas de las enfermedades tropicales y los vectores que las ocasionan.<sup>1</sup>

ENFERMEDAD	PARÁSITO	VECTOR
leishmaniasis	<i>Leishmania sp</i>	<i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i>
Esquistosomiasis	<i>Schistosoma mansoni</i> , <i>S. japonicum</i>	Caracol de agua dulce
	<i>S. haematobium</i>	
Fiebre amarilla	Arbovirus del género <i>Flavivirus</i>	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>
Filariasis	<i>Wuchereria bancrofti</i>	Mosquitos del género <i>Aedes</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> y <i>Mansonia</i>
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	Moscas del género <i>Simulium</i>
Tripanosomiasis africana	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Mosca tse-tsé
	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	
Tripanosomiasis americana	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chinche triatoma
Paludismo o Malaria	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>P. vivax</i> ,	Mosquito <i>Anopheles</i> spp.
	<i>P. ovale</i> y <i>P. malariae</i>	

En la actualidad hay un número limitado de fármacos antiparasitarios efectivos y seguros para uso humano; algunos son poco tolerados debido a sus numerosos efectos secundarios y en otros casos no existe una adecuada terapia, como ocurre por ejemplo en los estadios crónicos de la enfermedad de Chagas. Otros problemas de los fármacos de uso clínico incluyen su limitada disponibilidad, el elevado costo y el incremento cada vez más acelerado de la aparición de resistencia a los mismos, sobre todo en los casos de terapias únicas. Así, los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de estas enfermedades están lejos de ser ideales y muchos de ellos fueron introducidos décadas atrás. Los problemas asociados con algunos de los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la malaria y leishmaniasis así como las terapias combinadas utilizadas o introducidas recientemente<sup>2</sup> se resumen en la tabla 2.

Enfermedad (parasito responsable)	Fármacos utilizados y combinaciones	Desventajas
<b>Malaria</b> <i>Plasmodium spp</i>	Cloroquina Sulfadoxina/Pirimetamina Mefloquina Artemisina Artemeter/lumefantrene Atavaquona/proguanil Clorproguanil/dapsona	Resistencia Efectos secundarios Elevado costo
<b>Leishmaniasis</b> <i>Leishmania spp</i>	Pentamidina Antimonio pentavalente Anfotericina B liposomal Miltefosina	Baja eficacia Resistencia Elevado costo Efectos secundarios

## 2. ENFERMEDADES PARASITARIAS TROPICALES: LEISHMANIASIS Y MALARIA

### 2.1. LEISHMANIASIS

#### 2.1.1. Descripción

La leishmaniasis se describe como una serie de enfermedades antroponóticas con una diversidad epidemiológica y clínica importante. Es causada por un parásito perteneciente al género *leishmania* y transmitida a través de la picadura de insectos dípteros hembra del género *Phlebotomus* en el viejo mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Aunque existen otras posibles vías de transmisión como congénita, sexual y transfusión sanguínea. Afecta el tejido cutáneo, mucosas y órganos del sistema mononuclear fagocítico, produciendo los cuadros clínicos de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea, cutánea difusa y visceral. La leishmaniasis es una enfermedad endémica con una amplia distribución a nivel mundial, se encuentra en los cinco continentes afectando 88 a países de los cuales 72 se encuentran en vías de desarrollo. Tiene una prevalencia de 12 millones de personas y una población en riesgo de 350 millones de casos por leishmaniasis cutánea y medio millón de casos debido a la leishmaniasis visceral. Sin embargo, se considera que el número de casos que se presentan a nivel mundial es mayor que el reportado oficialmente.<sup>3</sup>

#### 2.1.2. Características del parásito

El género *leishmania* es un grupo de protozoos flagelados pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, orden Kinetoplastida, que requiere esencialmente dos hospederos diferentes para completar su ciclo biológico: (a) un insecto que cumple el papel de vector del parásito y (b) un vertebrado, principalmente mamíferos incluyendo al humano, que cumple el papel de reservorio o de hospedero definitivo. El parásito presenta dos estadios (figura 1.1): el promastigote (forma extracelular) y el amastigote (forma intracelular). El promastigote es una forma móvil de aproximadamente veinte

micras de largo que posee un flagelo adherido a un organelo similar a la mitocondria, llamado kinetoplasto. Metabólicamente, utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal de energía en condiciones aerobias. El pH (7) y la temperatura de desarrollo (25 – 27°C) de este estadio del parásito, claramente se parecen a las condiciones biológicas del intestino del insecto. Los amastigotes viven dentro de vacuolas lisosomales de las células fagocíticas.<sup>4</sup> A diferencia de los promastigotes carecen de flagelo y presentan una forma ovalada o redondeada y miden de dos a cinco micras de diámetro mayor, poseen núcleo, generalmente excéntrico y adyacente a éste se encuentra el Kineplasto.<sup>5</sup> Su pH y temperatura óptima de desarrollo es de 4 a 5 y 37°C respectivamente. Bioquímicamente su principal fuente de energía son los ácidos grasos de cadena larga las cuales puede transformar en CO<sub>2</sub> y agua en mayor grado que los promastigotes.



Figura 1.1. Formas promastigote (izquierda) y amastigotes (derecha) de la *leishmania*.<sup>4</sup>

### 2.1.3. El Vector

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de flebotomos, pequeñas moscas que abundan todo el año en las zonas tropicales y en el verano, en las zonas templadas. Se reconocen cinco géneros de flebotomos principales: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Lutzomyia*, *Warileya* y *Brumptomya*. Pero, se reconocen como vectores de la *leishmania* solo a dos: En Europa, Asia y África, el género *Phlebotomus*, y en América, el género *Lutzomyia* <sup>6</sup> (figura 1.2). Se caracterizan por ser insectos pequeños

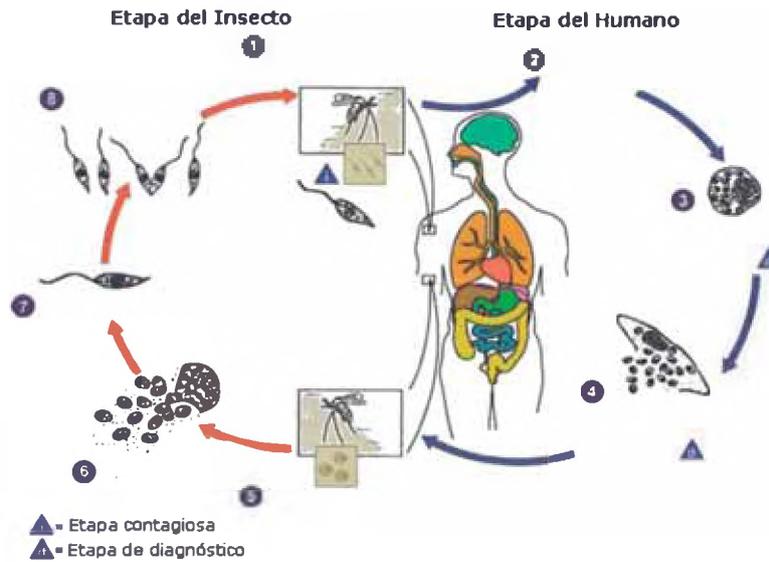
que miden de 2 a 3 mm de longitud y de costumbres nocturnas. A nivel de su saliva se han descrito varias sustancias que desempeñan un papel muy importante en el proceso de transmisión del parásito.



Figura 1.2. Especimen del genero *Lutzomyia* sp.<sup>8</sup>

#### 2.1.4. El ciclo de vida

Todas las especies de *leishmania* son morfológicamente similares en su ciclo de vida involucrando un hospedero vertebrado y uno invertebrado. Puede considerarse que el ciclo inicia cuando el vector pica un reservorio y/o hospedero infectado, ingiriendo con la sangre, los parásitos en forma de amastigotes (figura 1.3); muchos de estos son destruidos en las primera horas pero otros se transforman en promastigotes, se digieren al intestino medio del insecto en donde se multiplican rápidamente por fisión binaria longitudinal, luego migran a la proboscis, localizándose alrededor de la válvula esofagiana. La transmisión del parásito ocurre cuando el insecto se alimenta nuevamente y regurgita los parásitos almacenados en la válvula esofagiana dejándolos en la laguna de sangre que se formó en la piel con la picadura.



1. Inoculación de los promastigotes en la piel
2. Promastigotes fagocitados por macrófagos
3. Promastigotes se transforman en amastigotes intracelularmente
4. Amastigotes se multiplican en células
5. Mosquito absorbe macrófagos infectados con amastigotes
6. Ingestión de células parasitadas en el mosquito
7. Amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino del mosquito
8. División de promastigotes en el intestino

Figura 1.3. Ciclo de vida del parásito de la *leishmania*.<sup>6</sup>

### 2.1.5. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables, dependiendo de la virulencia de la especie infecciosa, la susceptibilidad del huésped y las coinfecciones. Estas pueden ser divididas en tres grupos principales<sup>7</sup>: i) leishmaniasis visceral: conocida como Kala azar, en la que la forma más grave puede atacar el hígado, bazo y médula ósea, llevando al paciente a la muerte, ii) leishmaniasis cutánea, que se caracteriza por úlceras crónicas en la piel que se desarrollan en el local de la picadura del insecto vector y iii) leishmaniasis mucocutánea que se caracteriza por presentar úlceras crónicas similares a la forma cutánea pero tienden a reaparecer a pesar de haberse cicatrizado en las mucosas de la nariz y de la boca. En general están asociadas a infecciones secundarias que conllevan a la destrucción de grandes extensiones de tejido.

## 2.2. MALARIA

### 2.2.1. Descripción

Los plasmodios, parásitos causantes de la malaria, se transmiten por la picadura de mosquitos *Anopheles*. Existen más de 100 especies de *Plasmodium* que infectan reptiles, aves y mamíferos.<sup>8,9</sup> La enfermedad en el hombre está causada por cuatro especies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. De ellas, la especie *P. falciparum* es la más relevante, por ser altamente infectante, producir gran morbilidad, ser la especie más agresiva con el índice de mortalidad más alto, estar ampliamente distribuida y ser la causa más frecuente de malaria endémica (provoca el 80% de los casos de malaria).

### 2.2.2. Distribución de la malaria a nivel mundial

Según la Organización Mundial de la Salud, en su reporte sobre la malaria en el mundo 2005 (figura 1.4), el paludismo o malaria es la causa de muerte de más de un millón de personas anualmente y constituye un riesgo para 3.200 millones de personas que viven en 107 países y territorios. Los niños menores de 5 años representan, con mucho, la mayor parte de las defunciones. El 14% de la población de las Américas vive en situación de riesgo, pero la parte de defunciones de esta región en el total mundial es mínima. Colombia es uno de los países en Sur América de alta incidencia del protozooario *Plasmodium falciparum*, con 160.000 casos reportados en 2003.<sup>10</sup>

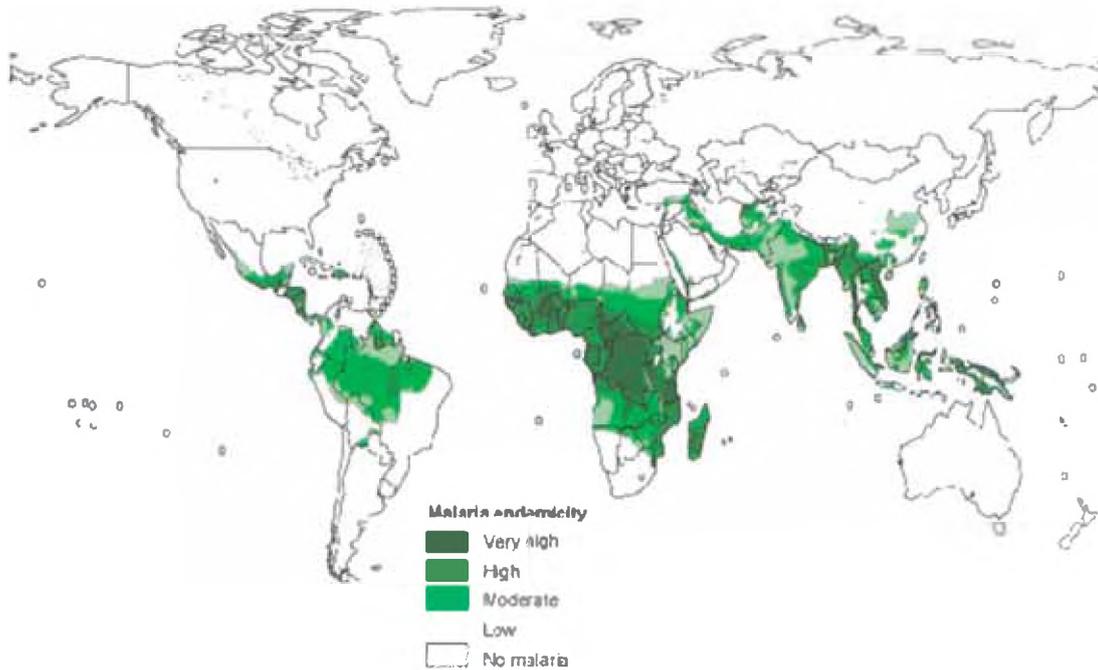


Figura 4. Distribución geográfica de la malaria a nivel mundial.<sup>10</sup>

### 2.2.3. Ciclo de vida del *plasmodium falciparum*

Con la picadura de un mosquito *Anopheles* hembra infectado, los esporozoitos se transfieren a la corriente sanguínea humana (A) (Figura 1.5). Los esporozoitos invaden las células hepáticas e inician su división asexual, que resulta en la producción de varios miles de merozoitos (B). Los merozoitos se liberan desde las células hepáticas para infectar los eritrocitos en la corriente sanguínea (C). Una vez dentro de los eritrocitos, la reproducción asexual ocurre en ciclos de 48 horas (D).<sup>11</sup> Los parásitos se desarrollan en etapas anulares, trophozoitos y luego en esquizontes. En la etapa de segmentación, cada esquizonte se divide, típicamente, en 16 merozoitos eritrocíticos, los cuales se liberan por lisis del eritrocito e inmediatamente invaden nuevos eritrocitos. Una pequeña parte de los parásitos en la etapa sanguínea sufre diferenciación en gametocitos hembras y machos (E), los cuales entran en el mosquito cuando éste pica a una persona infectada.

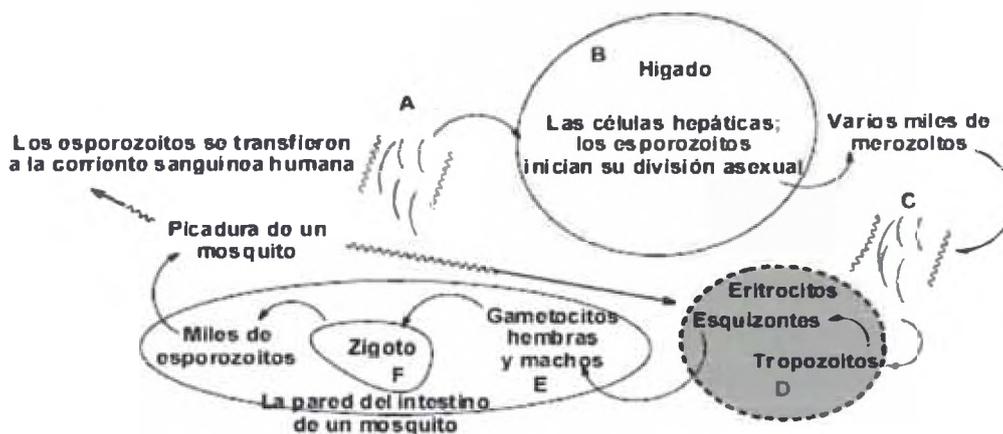


Figura 1.5. Ciclo de vida del parásito de la malaria del *P. falciparum*, esquema simplificado.<sup>11</sup>

En el intestino del mosquito, los gametocitos hembras se desarrollan en macrogametos y los gametocitos machos se dividen de 4 a 8 microgametos flagelados. Los gametos hembra y macho se fusionan formando un cigoto (F). Éste último se transforma en un oocineto móvil que penetra en la pared del intestino y se convierte en un oocisto, residente bajo la membrana externa del intestino medio del mosquito. La división asexual dentro del oocisto produce miles de esporozoitos, liberados al romperse el oocisto, migrando luego hacia las glándulas salivares.<sup>12</sup>

#### 2.2.4. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la malaria son escalofríos y palidez cutánea, que se alternan con sensación de calor y rubefacción cutánea, sequedad e hipertermia. Frecuentemente, el paroxismo febril se acompaña de cefalea, mialgia, hepatoesplenomegalia y anemia. La infección por *P. falciparum* puede complicarse con un cuadro de malaria grave, caracterizada por una anemia importante (hematocrito <20%), hiperparasitemia (>5%), hipoglucemia, afección renal y cerebral, con alteración de la conciencia y coma.

## Capítulo 2

### ADN: FORMAS DE INTERACCIÓN CON LOS COMPLEJOS METÁLICOS Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

#### 1. FORMAS DE INTERACCIÓN CON EL ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico, figura 2.1) es un polímero de nucleótidos que consta de dos cadenas unidas entre sí a través de las bases nitrogenadas orientadas antiparalelamente formando una doble hélice. Los nucleótidos se unen entre sí mediante un enlace éster entre el ión fosfato y la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas son derivadas de anillos púricos (Adenina, A, Guanina, G) o pirimidínicos (Timina, T, Citosina, C) y se unen a través de puentes de hidrógeno de forma complementaria, de tal manera que la adenina siempre se une a la timina y la guanina a la citosina.

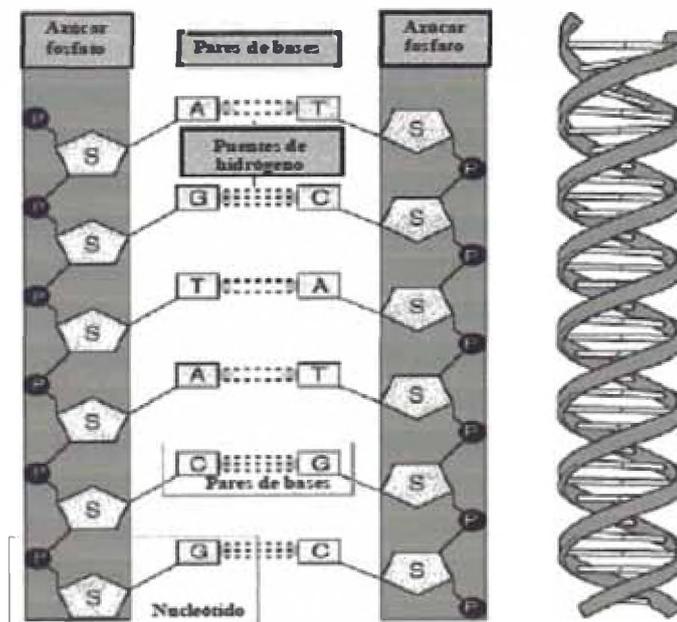


Figura 2.1: Estructura del ADN las cuatro bases nitrogenadas del ADN se disponen a lo largo del esqueleto de azúcar-fosfato en un determinado orden.<sup>13</sup>

Debido al conocido papel determinante del ADN en la replicación celular y la transmisión genética, los ácidos nucleicos son generalmente el primer objetivo en el estudio de la acción de los fármacos. Se conocen muchos compuestos capaces de interactuar con el ADN. La naturaleza de las especies químicas que interactúan con el ADN varía desde cationes metálicos sencillos hasta un grado elevado de complejidad como el de las entidades supramoleculares que resultan de un proceso de autoensamblaje entre ligandos orgánicos y cationes metálicos. Estas interacciones pueden alterar la estructura y funciones (replicación y/o transcripción) de los ácidos nucleicos lo que constituye la base para el uso de estos compuestos en biología molecular y como fármacos antitumorales. En la literatura se pueden encontrar las diferentes formas observadas de interacción entre complejos de metales de transición con ligandos polipiridínicos y ácidos nucleicos. En general, estos modos de interacción pueden ser de tres tipos (figura 2.2): *electrostática (binding externo)*, *binding de superficie en los surcos de la doble hélice del ADN e intercalación*

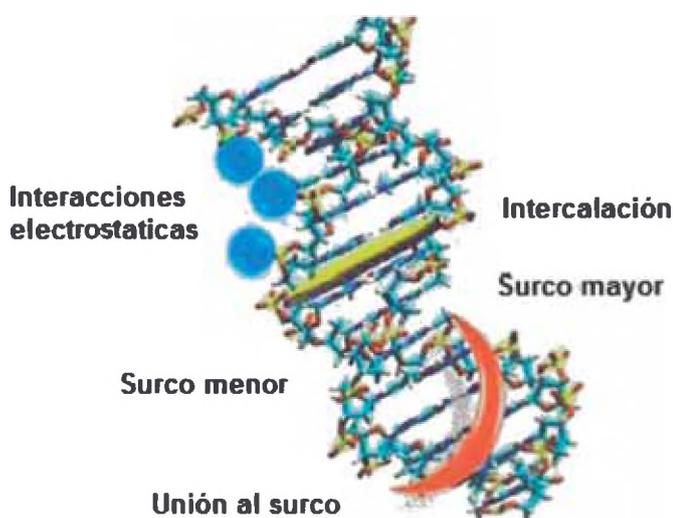


Figura 2.2: Formas de interacción de un compuesto con el ADN: interacciones electrostáticas, intercalación y unión al surco.<sup>13</sup>

### 1.1. Interacción electrostática:

La interacción de tipo electrostática está fuertemente determinada por la carga positiva del metal central y la naturaleza de los ligandos que son los que definen la carga neta del complejo. Los complejos del tipo  $M(L_1)(L_2)_2^{+n}$  donde  $M = Ru(II), Os(II), Rh(III)$ ,  $L_1 =$  diimina bidentada y  $L_2 = 2,2'$ bipiridina, 1,10 fenantrolina y que poseen carga +2 ó +3 son fuertemente atraídos por el esqueleto de fosfatos, cargados negativamente, periféricos de la doble hélice del ácido nucleico. Este tipo de interacción se verifica en varios de estos complejos.

### 1.2. Unión al surco

La unión de superficie ocurre en los surcos mayor y menor de la doble hélice y generalmente está relacionado con interacciones por puente de hidrógeno entre especies que tienen grupos aceptores de enlace de H o grupos donores y los heteroátomos de las bases. Los surcos mayor y menor son formas espaciales que quedan definidas por el ángulo y tipo de torsión de la hélice. El tamaño y otras características de los mismos, dependen del tipo de conformación espacial adoptado por el ADN (condicionada, a su vez, por el medio) y de la composición de las bases que lo constituyen.<sup>13,14</sup> Los compuestos que se unen por los surcos se suelen unir al surco menor. Por lo general, son estructuras alargadas y con múltiples grupos capaces de formar puentes de hidrógeno.

### 1.3. Intercalación

Los complejos metálicos que se unen al ADN por intercalación se denominan metalintercaladores. Estos complejos contienen ligandos aromáticos heterocíclicos planos y espacialmente extendidos los cuales pueden insertarse y anclarse en el espacio existente entre los pares de bases nitrogenadas apiladas de la doble hélice. El ligando dppz reúne todas las condiciones necesarias para introducirse entre las bases

y, por lo tanto, muchos complejos de metales de transición que poseen este ligando interactúan con el ADN por intercalación.<sup>1,15</sup> Este tipo de interacción se caracteriza por presentar en los espectros de absorción, una disminución de la absorbancia y desplazamiento hacia el rojo cuando el complejo está unido al ADN. Cabe aclarar que si a  $\lambda \geq 320$  nm el ADN no absorbe, los cambios en la absorción están relacionados con los cambios en el microambiente del ligando dppz del complejo. Luego de la intercalación entre las bases nitrogenadas los orbitales  $\pi^*$  del ligando intercalado podrían acoplarse con los orbitales  $\pi$  de los pares de bases disminuyendo la energía de la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  produciendo el efecto batocrómico observado. Por otro lado, los orbitales  $\pi$  acoplados estarían, ahora, parcialmente ocupados por electrones, disminuyendo la probabilidad de transición y, consecuentemente, dando como resultado el hipocromismo observado.<sup>16</sup>

Un metalintercalador se puede emplear para producir la rotura del ADN. Mientras que las unidades plano-aromáticas se insertan en el ADN, el metal y los restantes ligandos permanecen en uno de los surcos, y en algunos casos se establecen enlaces de hidrógeno entre grupos funcionales del ligando y el carbonilo o el N-3 de la guanina. Como ejemplo de metalintercalador se presenta los complejos de Rutenio ampliamente estudiados.<sup>17,18</sup> El ligando dppz del complejo se une al ADN por intercalación entre los pares de bases (figura 2.3). Como resultado de la intercalación, las propiedades físicas del ADN se ven modificadas de forma que la inserción del cromóforo plano estabiliza, alarga, fija y desenrolla la doble hélice produciendo alargamiento de la misma, la cual origina variaciones en la viscosidad y en el coeficiente de sedimentación del ADN. El incremento de viscosidad asociado con un proceso de intercalación constituye la base de las medidas viscosimétricas como método experimental para poner de manifiesto la existencia de intercalación.

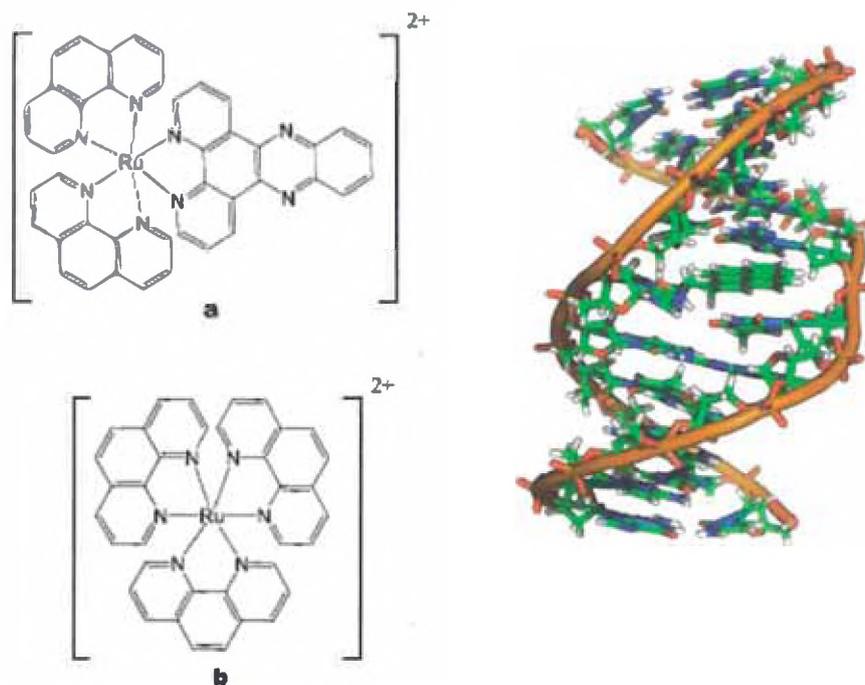


Figura 2.3. Complejos de rutenio con ligandos dppz que se unen al ADN a través de la intercalación entre los pares de bases.<sup>15</sup>

## 2. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPUESTOS CON EL ADN

La gran mayoría de las técnicas empleadas están basadas en los cambios físicos que se producen en el ADN e incluso en el propio compuesto, con la formación de un complejo entre ambos. En lo que resta de este capítulo, se expone de manera resumida el fundamento fisicoquímico y las principales ventajas e inconvenientes relativos de una serie de métodos empleados para estudiar las uniones del compuesto al ADN. Algunas de ellas se describen a continuación.

### 2.1. Medidas de viscosidad

Con la viscosimetría se miden las diferentes velocidades de flujo al paso a través de un tubo capilar (figura 2.4) de una disolución de ADN libre y de ADN en presencia del compuesto de estudio. Se emplea para compuestos intercalantes ya que

la unión de éstos al ADN producen un alargamiento de la doble hélice que ocasiona un aumento considerable de la viscosidad (ver ejemplo en la figura 2.5).

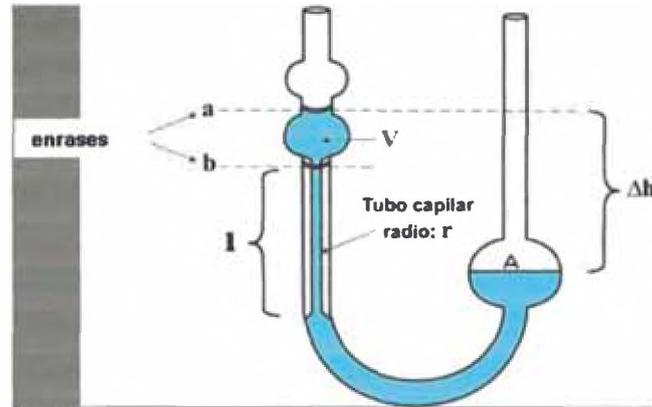


Figura 2.4. Con una pipeta se introduce el líquido a analizar en la ampolla A hasta más de la mitad de la misma. Insuflar aire de modo que le líquido llene el volumen V quedando un poco más arriba del enrase a. Se deja escurrir el líquido poniendo en marcha el cronómetro en el momento en que la superficie del líquido pasa por a y deteniéndolo en el momento que pasa por b.<sup>19</sup>

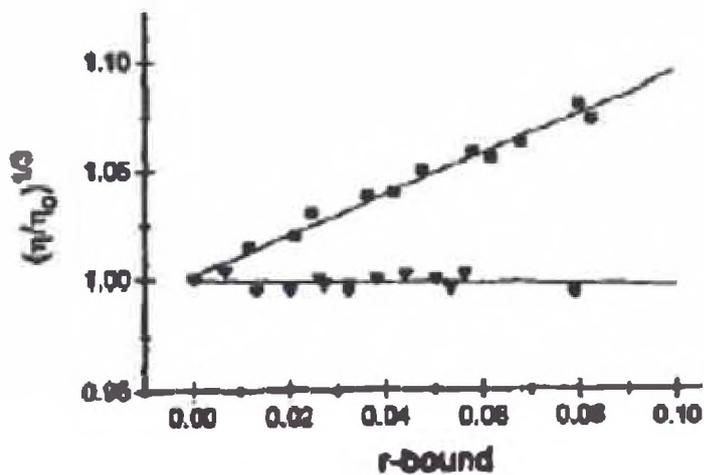


Figura 2.5. Viscosidad específica relativa de ADN de timo de ternera en presencia del intercalante bromuro de etidio (cuadrados) o de Hoechst 33258 (triángulos), que se une al ADN por el surco, representada en función de la relación de ligando unido.<sup>19</sup>

En los artículos presentados en los capítulos 3 y 4 sobre leishmaniasis y malaria respectivamente, las medidas de viscosidad son llevadas a cabo en viscosímetro Ostwald, sumergido en baño de agua a temperatura de 25°C. El ADN es previamente sonicado por 30 min por periodos de 5 min cada uno seguido de 5 min de burbujeo de nitrógeno. La concentración del ADN es mantenida constante en todas las muestras, pero la concentración del complejo se va incrementando. El tiempo de fluidez es medido varias veces usándose como resultado el promedio. Los datos son representados como  $(\eta / \eta^0)^{1/3}$  versus la relación [complejo]/[ADN], donde  $\eta$  y  $\eta^0$  son la viscosidad específica del ADN en presencia y ausencia del complejo respectivamente. Los valores de  $\eta$  y  $\eta^0$  son calculados de la expresión  $(t - t^b) / t^b$ , donde  $t$  es el tiempo de fluidez observado y  $t^b$  es el tiempo de fluidez de la solución tampón. Las viscosidades relativas del ADN son calculadas de la relación<sup>19</sup>  $(\eta / \eta^0)$ .

## 2.2. Dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular se basa en la interacción de la luz polarizada con moléculas ópticamente activas y mide la relación, respecto a la longitud de onda, de la diferencia de absorción de la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda. En los espectros, se representa la elipticidad molar ( $\theta$ ), frente a la longitud de onda, de forma que  $\theta$  se relaciona con los coeficientes de extinción molar para las ondas polarizadas hacia la derecha ( $\epsilon_r$ ) y hacia la izquierda ( $\epsilon_l$ ).

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en los intervalos comprendidos entre 250-350 nm (ultravioleta próximo) y 180-250 nm (ultravioleta lejano) de la radiación electromagnética, porque estas son las regiones que corresponden a las transiciones electrónicas del esqueleto de los péptidos, cadenas laterales de las proteínas y las bases nitrogenadas del ADN. La aplicación de esta técnica a los ácidos nucleicos permite establecer una correlación entre el espectro que observamos y la conformación de la biomolécula (cambio en la estructura secundaria del ADN), debido a que es muy sensible a los pequeños cambios de orientación de las

bases que pueden provocar tanto la apertura como el enrollamiento de la doble hélice. No obstante, no proporciona información sobre la estructura absoluta del polinucleótido. Así, cada una de las conformaciones del ADN presenta un espectro de dicroísmo circular característico, tal y como se muestra en la figura 2.6.

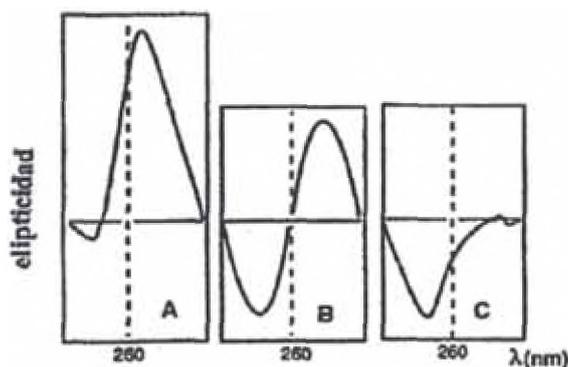


Figura 2.6. Espectros de DC de las formas A, B y C del ADN.<sup>20</sup>

Como ejemplo se presenta el espectro de dicroísmo circular del CT (calf thymus) –ADN (ADN de timo de ternera) en presencia de un metalociclo de Pd. Se aprecia una clara modificación en los espectros a medida que aumenta  $ri$  (Concentración del metalociclo / ADN), lo cual demuestra que la perturbación en la molécula de ADN se debe al metalociclo. Se observa como la elipticidad disminuye tanto en la banda positiva como en la negativa a medida que la concentración del metalociclo aumenta (Figura 2.7). Se ha descrito que la disminución de la elipticidad de la banda positiva es indicativa de una transformación de la forma B a la C del ADN. Este cambio está producido por un desenrollamiento de la hélice debido a una rotación de las bases cuando el compuesto se une al ADN.<sup>20,21,22</sup>

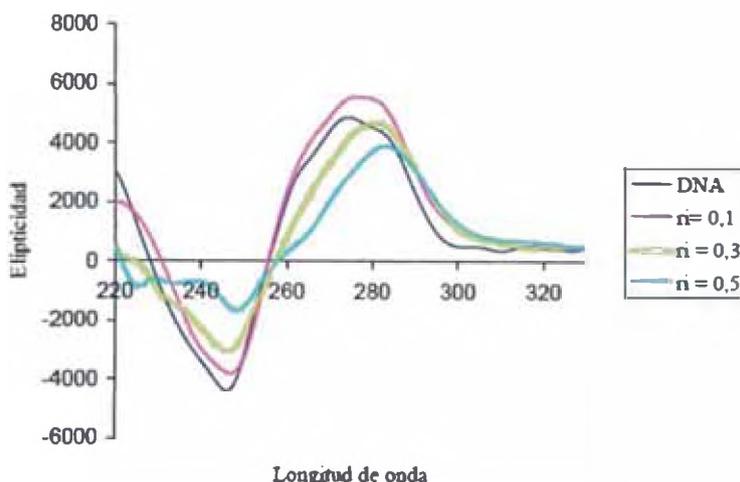


Figura 2.7. Espectros de DC del ADN de *calf Thymus* incubado con el metalociclo de paladio

### 2.3. Espectrometría UV- Visible y Fluorimetría

Se utiliza la espectrofotometría ultravioleta-visible porque el ADN absorbe en la franja del UV-visible, en concreto a una longitud de onda máxima de 260 nm, de manera que se pueden medir los cambios espectrofotométricos que sufren el ADN o los compuestos que se unen a él, al producirse la interacción entre ambos. La fluorimetría se puede emplear en el caso de moléculas fluorescentes (que al aumentar su estado de excitación por la absorción de fotones, vuelven al estado basal emitiendo radiación fluorescente o fosforescente si se da un cambio en el espín electrónico, que hace más lenta la emisión). Este tipo de moléculas suelen estar formadas por un alto número de electrones  $\pi$  deslocalizados, como ocurre con los policiclos aromáticos o los dobles enlaces conjugados, así como sustituyentes electrodonadores como  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $\text{NHCH}_3$ .

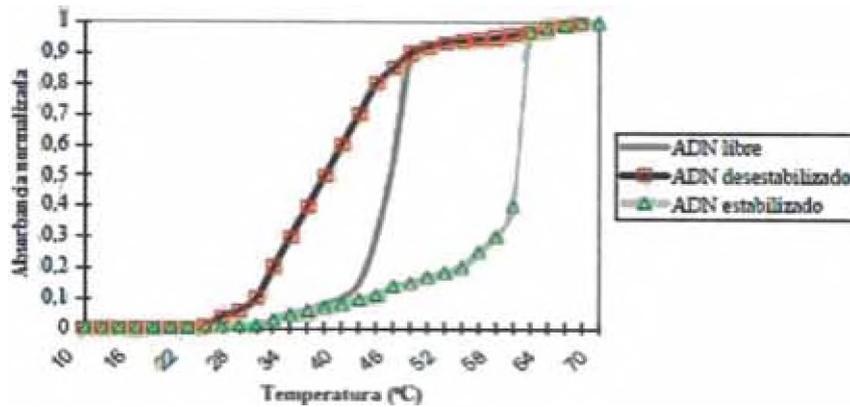
En los artículos presentados en el capítulo 3 sobre leishmaniasis, Las titulaciones espectroscópicas son llevadas a cabo añadiendo cantidades cada vez mayores de *calf thymus* (CT) ADN a una solución del complejo de concentración fija que se encuentra en una celda de cuarzo y los espectros UV-Visible se registran

después de cada adición de CT ADN. La absorción del ADN es restada por adición de la misma cantidad de CT ADN al blanco. La constante de unión  $K_b$  es determinada de la gráfica  $[ADN] / (\mathcal{E}_a - \mathcal{E}_f)$  vs.  $[ADN]$ , donde  $[ADN]$  es la concentración del ADN en los pares de bases y los coeficientes de absorción aparentes ( $\mathcal{E}_a$ ,  $\mathcal{E}_f$  y  $\mathcal{E}_b$ ) corresponden a  $A_{obs} / [M]$ , el coeficiente de extinción del complejo metálico libre y el coeficiente de extinción del complejo metálico en la forma enlazada respectivamente. Los datos son sustituidos en la ecuación (1), donde la pendiente es igual a  $1 / (\mathcal{E}_b - \mathcal{E}_f)$ , el intercepto en  $y$  es  $1 / [K_b (\mathcal{E}_a - \mathcal{E}_f)]$  y  $K_b$  es obtenida de la relación de la pendiente a intercepto.<sup>23</sup>

$$[ADN] / (\mathcal{E}_a - \mathcal{E}_f) = [ADN] / (\mathcal{E}_b - \mathcal{E}_f) + 1 / [K_b (\mathcal{E}_a - \mathcal{E}_f)] \quad (1)$$

#### 2.4. Desnaturalización térmica

La técnica calorimétrica más utilizada es la *técnica de desnaturalización térmica*: el ADN se desnaturaliza a elevadas temperaturas, esto significa que sus dos hebras se separan por rotura de los enlaces de hidrógeno que las unen. A la temperatura que ocurre el fenómeno de desnaturalización se le llama temperatura de fusión ( $T_m$ ). El proceso de determinación de  $T_m$  se realiza subiendo la temperatura gradualmente desde 20° C hasta 80° C, midiendo la absorbancia de forma permanente a 260 nm. El valor de la absorbancia registrado va aumentando con la temperatura hasta alcanzar un máximo, que corresponde con el estado en que las dos hebras se han separado completamente. Cuando se une un compuesto al ADN, esta unión puede estabilizar las dos hebras frente al aumento de la temperatura, elevando así el  $T_m$  de dicho segmento, o por el contrario favorecer la ruptura de los enlaces de hidrógeno, disminuyendo su  $T_m$  (figura 2.8).



**Figura 2.8.** Representación de la curva de transición térmica para el ADN doble hélice libre (-), ADN en presencia de un ligando que desestabiliza la doble hélice ( $\square$ ) y ADN en presencia de un ligando que estabiliza la doble hélice ( $\Delta$ ).<sup>15</sup>

## 2.5. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es uno de los métodos más usuales para estudiar el ADN. Como el ADN es una macromolécula cargada negativamente, esta se somete a un campo eléctrico de dirección y fuerza constante de forma que se produce una migración diferencial de las moléculas o fragmentos de ADN en función de dos factores fundamentales: el tamaño y el grado de superenrollamiento. Para estudios de electroforesis se ha utilizado gel de agarosa y plásmidos de ADN tales como el plásmido pBR322. Los plásmidos se definen como material genético extracromosómico que aparecen en bacterias.<sup>24</sup> Este tipo de ADN presenta una medida fija y las moléculas se pueden encontrar mayoritariamente en dos formas: la forma circular covalentemente cerrada o superenrollada (CCC o forma I), que presenta un cierto número de vueltas superhelicoidales, y la forma circular abierta (OC o forma II) que es la forma relajada.<sup>25</sup> Junto a estas dos formas, de las cuales el mayor porcentaje es de CCC, suele aparecer una tercera forma muy minoritaria que es la forma lineal o forma III (figura 2.9).

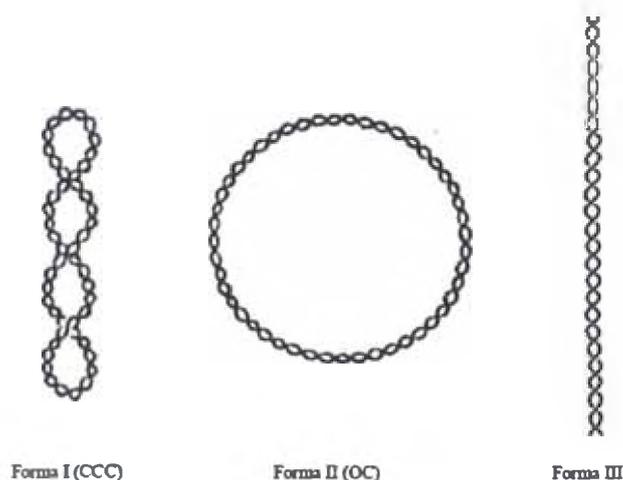


Figura 2.9. Representación esquemática de las formas del plásmido de ADN.<sup>25</sup>

La velocidad de migración depende de muchos factores como la diferencia de potencial aplicada, el tampón usado, la proporción de agarosa en el gel, el tamaño del ADN, el número de vueltas superhelicoidales, etc. Sin embargo, para unas condiciones fijadas, la velocidad de migración pasa a depender únicamente del número de vueltas superhelicoidales, de modo que cuantas más vueltas, más compacta es la estructura, lo cual aumenta su movilidad. Así pues, la forma CCC (forma I) migra más rápido que la OC (forma II). Esto quiere decir que, en principio, se pueden observar dos marcas, una correspondiente a cada una de las dos formas mayoritarias del ADN. La forma III (lineal) no se suele observar por ser muy minoritaria o porque frecuentemente corre junto a la CCC.<sup>26</sup> Los complejos metálicos pueden provocar tanto una disminución del superenrollamiento como una compactación del ADN. Por tanto, se espera una variación en la movilidad electroforética de las diferentes formas, y como consecuencia, esta técnica permite evaluar las modificaciones en la estructura terciaria del ADN provocadas por dichos complejos.

En los artículos presentados en los capítulos 3 y 4 sobre leishmaniasis y malaria respectivamente se presentan resultados de estudios de electroforesis en gel de agarosa. En estas pruebas de electroforesis sobre el ADN, los plásmidos (pUC119 ó PBR322) son mezclados con varias concentraciones del complejo metálico en

estudio previamente disuelto en DMSO. Las muestras son incubadas por 18 horas a 37°C, después del cual la reacción es finalizada por adición de NaCl (1M) para dar una concentración final de cloruros de 0.2M. Se corren ensayos tomando un volumen de 5µL de cada muestra las cuales son agregados sobre un gel de agarosa al 1% con solución tampón 1xTBE (Tris-HCl 0.45 M, Ácido Bórico 0.45 M, EDTA 10 mM) y visualizadas con bromuro de etidio (5µL de bromuro de etidio por 50 mL de mezcla de gel de agarosa). Las bandas formadas son observadas luego con un trasluminador y la imagen capturada con una videocámara.<sup>27</sup>

## Capítulo 3

### ARSENAL TERAPÉUTICO Y COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO CONTRA LA LEISHMANIASIS

#### 1. ARSENAL TERAPÉUTICO TRADICIONAL

El arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de Leishmaniasis, así como de otras enfermedades tropicales es bastante precario. En la actualidad existen dos series de medicamentos en uso: los antimoniales y los no antimoniales. El tratamiento básico de la enfermedad consiste en la administración de estibogluconato sódico (Pentostan®), antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), ambas drogas de primera generación y pentamidina o anfotericina B, ambas de segunda generación<sup>28</sup>

##### 1.1. Fármacos de primera línea: Antimoniales

A pesar de que estos fármacos son los de primera línea, presentan una eficacia limitada y algunas veces toxicidad y efectos adversos significantes.<sup>29</sup> Dentro de los compuestos antimoniales (figura 3.1), destacan los complejos de antimonio trivalentes tales como el tartrato de antimonio y potasio (tartrato emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-disulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®) y tioglicolato de sodio y antimonio, los antimoniales pentavalentes como el antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®, antimoniato de meglumina), gluconato sódico de antimonio(V) (Pentostan®, Solustibosan®, estibogluconato sódico) y estibamina® (nombre comercial de la urea estibamina).<sup>30</sup> Sin embargo, debido a la cardiotoxicidad y a la intolerancia gastrointestinal de los antimoniales trivalentes, Sb(III), son los pentavalentes, Sb(V), los que presentan mayor uso terapéutico. Entre los medicamentos antimoniales más consumidos en el mundo, se destacan el Pentostan® (Glaxo Wellcome), Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) y el Solustibosan® (Bayer).<sup>31</sup> El Glucantime® es producido y comercializado en países de

lengua francesa y española, mientras que el Pentostan® es distribuido principalmente en los países de lengua inglesa. En países como el Brasil, el medicamento antimonial de primera línea es el antimonio de N-metilglucamina, el cual, si se administra de forma continua y en la posología adecuada, resulta eficaz en el tratamiento de los tres grupos de leishmaniasis. A su vez, bajas dosis y tratamientos discontinuos conllevan a fallas en la terapia y en la aparición de formas resistentes.<sup>29</sup>

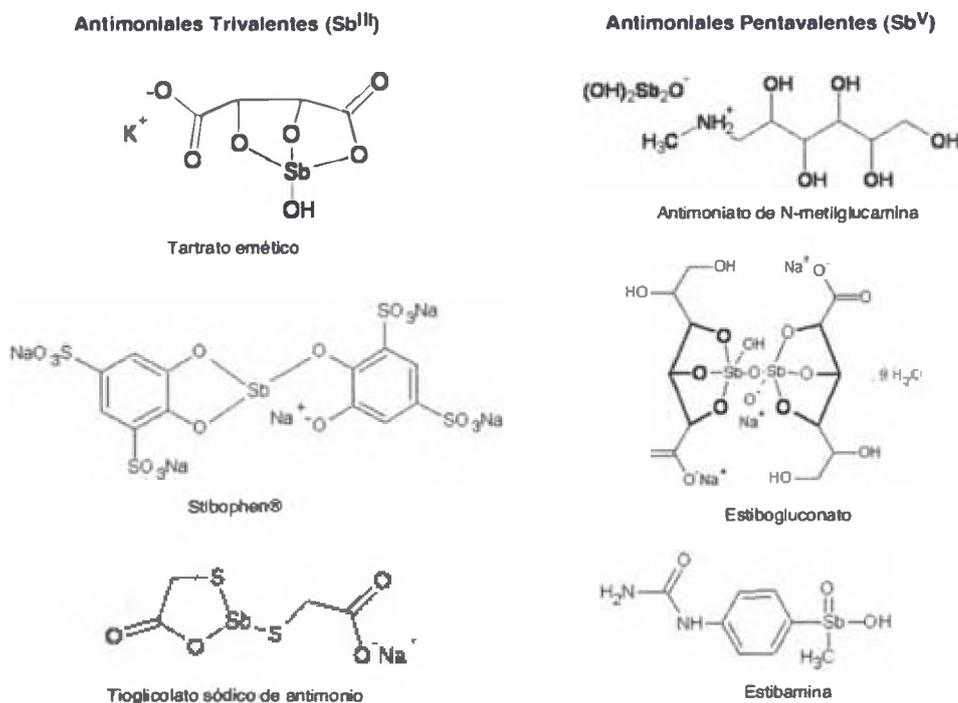


Figura 3.1. Estructura química de antimoniales trivalentes y pentavalentes.<sup>29</sup>

### 1.1.1. Mecanismo de acción y de resistencia en los antimoniales

El mecanismo de acción de antimoniales pentavalentes utilizados en el combate contra la leishmaniasis es aún poco comprendido.<sup>32</sup> Considerando el potencial de reducción de Sb(V) en sistemas biológicos, el mecanismo de óxido-reducción es una de las hipótesis más consideradas, donde se propone la reducción *in vivo* de los complejos de Sb(V) a compuestos más tóxicos de Sb(III). Se destaca aún más el papel que cumplen los grupos tiol, comunes en

biomoléculas que contienen cisteína, los cuales muy probablemente estén implicados en esta conversión.<sup>31</sup> Sin embargo, otros estudios indican que el papel del Sb(III) estaría mucho más asociado a la toxicidad, que a la actividad específica antileishmaniasis.<sup>33</sup>

Por otro lado se ha propuesto también como mecanismo de acción la capacidad del Sb(V) de formar complejos con nucleótidos, interfiriendo en su metabolismo e inhibiendo la topoisomerasa del parásito. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que los nucleósidos y polinucleótidos presentan elevado número de funciones oxigenadas y nitrogenadas convirtiéndose en ligandos potenciales de iones metálicos.

A diferencia de lo observado en células de mamíferos, los protozoarios son incapaces de volver a sintetizar purinas, por lo que estos parásitos utilizan mecanismos bioquímicos alternativos que tienen como punto de partida la translocación de purinas preformadas. Esta estrategia de una alta producción de purinas en la leishmaniasis puede contribuir también para la formación de complejos Sb(V)-purina, los cuales a su vez tendrían influencia negativa en toda la bioquímica del ADN.<sup>28</sup> Estudios de la cinética de formación de complejos entre mezclas que contienen antimonio de potasio y derivados de la adenina comprueban esta teoría. Se ha constatado por técnicas de resonancia magnética (RMN) y dicroísmo circular (DC), la formación de complejos de Sb(V) con adenosina y adenosina monofosfato utilizando los residuos de ribosa. Este hecho presume la posibilidad de interacciones con otras biomoléculas que contengan ribosa tales como guanina, uracilo, citosina, hipoxantina, así como algunos dinucleótidos.<sup>34</sup> Otra hipótesis habla al respecto de la formación de complejos entre Sb(V) y guanosina 5'-difosfato-D-manosa (5'-GDP) u otros glicoconjugados ricos en manosa, sintetizados por este parásito y ampliamente distribuidos sobre su superficie celular. A su vez, la formación de mono-aductos y bis-aductos entre Sb(V) y 5'-GDP-manosa u otros glicoconjugados interfiere en la virulencia del parásito.<sup>31</sup> Otro probable mecanismo de acción de los compuestos metálicos es la inhibición de la enzima superóxido

dismutasa (SOD), cuya actividad e importancia aumenta en los parásitos infecciosos. Tal inhibición provocaría a la vez un aumento del nivel de radicales superóxido y muerte del parásito.<sup>35</sup>

En relación a la resistencia, se observa que una vez que esta es establecida para complejos trivalentes, se produce paralelamente una alta incidencia en la resistencia a complejos pentavalentes. Sin embargo se ha observado también un aumento de la susceptibilidad a drogas de segunda generación como la pentamidina y anfotericina B lo cual podría explicarse por la intervención de distintos sistemas de transporte que utilizan los compuestos antimoniales y fármacos orgánicos.<sup>36</sup>

## 1.2. Fármacos de segunda línea

### 1.2.1. Anfotericina B

La anfotericina B (figura 3.2) es un macrólido heptaénico que contiene siete dobles enlaces conjugados en la posición *trans* y es 3-amino-3,6 dideoximanosa (micosamina) unida al anillo principal por un enlace glucosídico. Por medio de cristalografía de rayos X, se ha demostrado que la molécula es rígida, cilíndrica y los grupos hidroxilo hidrófilos del anillo de macrólido forman una cara contraria a la porción poliénica lipófila. Existen varias formulaciones comerciales del compuesto, por ser insoluble en agua y se presenta como polvos liofilizados con sales biliares. El mecanismo de acción, así como de toxicidad, envuelve la formación de poros artificiales a lo largo de la membrana celular del parásito y del huésped, alterando la permeabilidad selectiva a cationes y llevando a la muerte celular.<sup>37</sup> En el caso de *Leishmania*, la letalidad del antibiótico es agravada por lisis coloidal osmótica debido al influjo iónico exacerbado. Ya en el caso de los hongos, a pesar de que la pared celular reduce este influjo osmótico, la alteración del pH interno debido a la permeabilidad a  $H^+/OH^-$  produce también daños celulares.<sup>36</sup> La anfotericina B también interfiere en la síntesis del ergosterol, un importante componente de la membrana.<sup>38</sup>



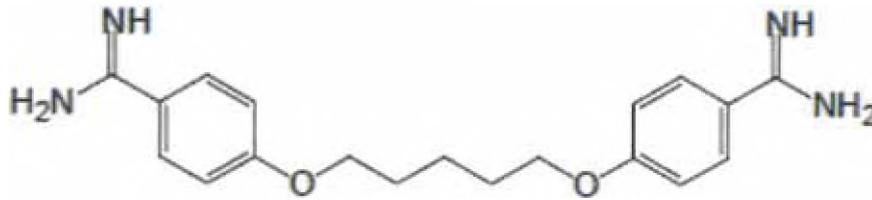


Figura 3.3. Estructura química de la pentamidina.<sup>41</sup>

### 1.2.3. Ketoconazol (Nizoral®)

Es un imidazol antifúngico de amplio espectro, que ha mostrado actividad antiparasitaria sobre *Leishmania sp.* El ketoconazol (figura 3.4) podría ser más efectivo que los antimoniales en el tratamiento de las infecciones causadas por *Leishmania mexicana*, pero menos en las infecciones causadas por *Leishmania braziliensis*. También ha mostrado efectividad contra *L. major*. Su mecanismo de acción se explica por su capacidad de inhibir la enzima 14-alfa-demetilasa, una enzima del sistema microsomal oxidativo dependiente del citocromo P450. De esta forma deteriora la biosíntesis de esteroides de membrana y la función de sistemas enzimáticos conduciendo a la acumulación de 14 alfa metilesteroides.<sup>42</sup>

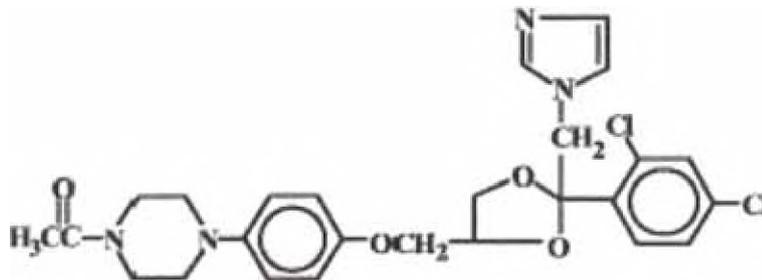


Figura 3.4. Estructura química del Ketoconazol.<sup>42</sup>

## 2. COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO

La demanda por nuevos fármacos leishmanicidas se ha intensificado con el aumento de la resistencia a los antimoniales pentavalentes, así como a fármacos de segunda generación. Sin embargo, el número de quimioterápicos disponibles principalmente para el tratamiento de enfermedades crónicas está muy por abajo de lo satisfactorio. La combinación entre estructura metálica y residuos orgánicos, en especial de fármacos quimioterápicos, es una de las estrategias utilizadas en la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios ya que esto puede conllevar a compuestos menos tóxicos y más activos.<sup>43</sup> Varios complejos metálicos<sup>5</sup> han sido sintetizados por la asociación entre moléculas activas y elementos metálicos como Pt, Rh, Ir, Pd, Ru, Au, Cu, etc. La importancia de compuestos de coordinación y de la bioinorgánica en el desarrollo de antiparasitarios es histórica, lo cual está bastante comprobado por la existencia de un amplio trabajo científico en esta área.<sup>44</sup> En esta parte del capítulo se describe algunos de los complejos metálicos que se encuentran en estudio, los cuales poseen actividad contra la *Leishmania*.

### 2.1. Complejos de Pt(II) y Ru(III) con ligandos triazolopirimidina<sup>45</sup>

La elección de los derivados del compuesto [1,2,4] triazolo[1,5-a]pirimidina presentado en los trabajos de Salas M. y colaboradores<sup>45</sup> está basado en el hecho de que estos ligandos podrían ser considerados como miméticos de las purinas. Se han hecho diferentes estudios de estos compuestos como agentes quimioterapéuticos, encontrándose diferentes propiedades tales como la inhibición del crecimiento de algunos microorganismos.<sup>46</sup> En lo que respecta con su actividad antitumoral, se han hecho estudios sobre varias líneas celulares tales como cáncer de mama.<sup>47</sup> También se ha probado su potencial en el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos tales como el mal de Parkinson.<sup>48</sup> La química de coordinación de los ligandos triazolopirimidina ha sido estudiada extensamente por muchos años.<sup>49</sup> Ellos tienen como donadores potenciales átomos de nitrógeno en las posiciones 1, 3 y 4, siendo el

---

<sup>5</sup> En el anexo se resume la actividad biológica de algunos complejos metálicos

N(3) la posición de enlace preferido por el metal en la forma monodentada (figura 3.5). Otro posible caso es la forma de enlace puente N(3)-N(4) dando complejos metálicos dinucleares.<sup>50</sup> En trabajos previos<sup>51</sup> se ha demostrado la actividad biológica de algunos complejos metálicos con ligandos derivados de la [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina, tales como el ligando 4,7-dihidro-5-metil-7-oxo[1,2,4]-triazolo-[1,5-a]pirimidina (HmtpO), el cual demostró inhibición al crecimiento e indujo severos daños a la ultraestructura de los parásitos de la *Leishmania donovani*. En esta revisión,<sup>45</sup> se presenta los resultados de la caracterización y evaluación de la actividad del complejo cis-[PtCl<sub>2</sub>.(7HtpO)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O (1), así como la actividad biológica de los complejos de [PtCl<sub>2</sub>(5HtpO)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O (2) y RuCl<sub>3</sub>(7HtpO)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (3), donde 5HtpO es 4,5-dihidro-5-oxo-[1,2,4]triazolo-[1,5-a]pirimidina y 7HtpO es 4,7-dihidro-7-oxo-[1,2,4]-triazolo-[1,5-a]pirimidina.

### 2.1.1. Caracterización del complejo cis-[PtCl<sub>2</sub>.(7HtpO)<sub>2</sub>].2H<sub>2</sub>O

Todas las señales <sup>1</sup>H-RMN para este compuesto están desplazada a campos bajos con respecto a la posición de su ligando libre,<sup>52</sup> el más alto desplazamiento corresponde al H(2), en concordancia con la coordinación del N(3) al átomo de Platino. La estructura molecular de 1, se muestra en la figura 3.5, es casi idéntica a la de compuestos análogos<sup>53</sup> con el ligando HmtpO la cual difiere con el ligando 7HtpO por la presencia del grupo metil en la posición 5. Sin embargo ambos compuestos no son cristalográficamente isoestructurales. Este complejo presenta una estructura cuadrada plana (ver distancias y ángulos de enlace en tabla 1). El átomo de Pt está coordinado por dos aniones cloruros y dos átomos de Nitrógeno (N3) del ligando 7HtpO en una disposición cis. La orientación relativa de los ligandos está estabilizada por la presencia de moléculas de agua (O1W) la cual actúa como aceptor de enlaces de hidrógeno de los grupos N4-H de ambos ligandos. La segunda molécula de agua también contribuye a la estabilización del complejo por la formación de enlace de hidrógeno con O1W y el ligando Cloruro (Cl2).

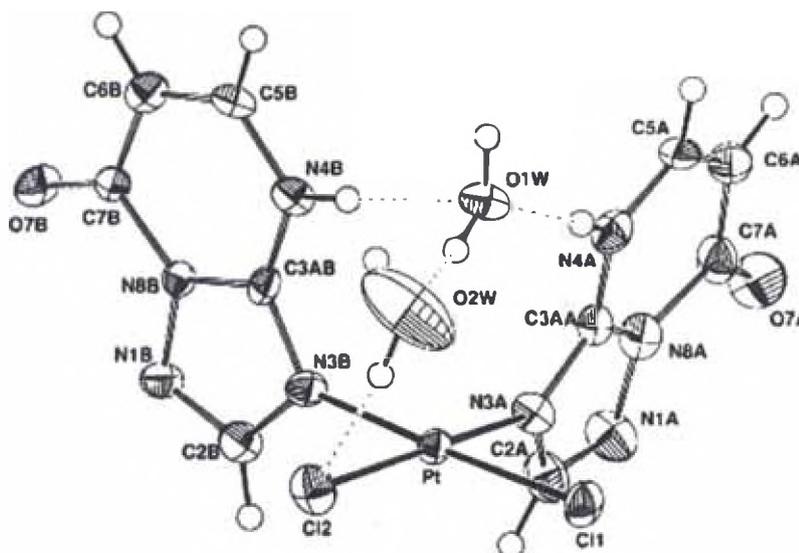


Figura 3.5. Estructura del Complejo cis  $[PtCl_2.(7HtpO)_2].2H_2O$ .<sup>45</sup>

Tabla 1. Distancias de enlace(Å) y ángulos (°) de enlace para el complejo cis- $[PtCl_2.(7HtpO)_2].2H_2O$

Distancias de enlace		Ángulos de enlace		Enlaces de hidrógeno	
Pt-C11	2.298(2)	Cl1-Pt-Cl2	92.10(7)	N4A...O 1W	2.808(10)
Pt-C12	2.278(2)	Cl1-Pt-N3A	91.7(2)	N4B...O1W	2.774(9)
Pt-N3A	2.025(7)	Cl1- Pt-N3 B	177.2(2)	O1W...O2W	2.811(12)
Pt-N3B	2.008(6)	Cl2-Pt-N3A	175.2(2)	O1W...O7B	2.751(8)
		Cl2-Pt-N3B	88.4(2)	O2W...Cl2	3.093(9)
		N3A-Pt-N3 B	88.0(3)		

### 2.1.2. Actividad biológica

Las formas promastigote para el análisis de actividad de los complejos metálicos fueron obtenidas de cepas L133 de *Leishmania donovani* y cultivadas en medio TC-199, suplementadas con suero bovino fetal inactivado (SBFI) al 30%. Los macrófagos J-774.2, obtenidos de ratones, fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementadas con L-glutamina e SBFI al 10% a pH 7.2. Los tres complejos metálicos fueron disueltos en DMSO y probados a concentraciones de 1, 20, 50 y 100  $\mu$ M. Los cultivos fueron mantenidos por 24, 48 y 72 horas a 28°C. Para cada tiempo y dosis de prueba los resultados fueron cuantificados (% de viabilidad celular, tabla 3)

usando una cámara de Neubauer.<sup>δ</sup> Los tres complejos metálicos tuvieron efecto sobre la forma promastigote de *Leishmaniasis donovani*. El resultado está reflejado en la tabla 2, en la cual se muestra que el complejo 1 tiene la más alta actividad inhibitoria de crecimiento sobre los promastigotes. Ninguno de estos complejos presentó citotoxicidad contra la línea celular de macrófagos J774.2,<sup>ξ</sup> a la dosis más alta empleada (50 a 100 μM), lo cual concuerda con observaciones y estudios de otros compuestos con derivados de triazolopirimidina.<sup>54</sup>

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento de formas promastigotes de la *Leishmania donovani* causada por los complejos 1, 2 y 3 a distintos tiempos (24, 72 y 48 horas) y concentraciones

Complejos metálicos	[1 μM]			[20 μM]			[50 μM]			[100 μM]		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
cis-[PtCl <sub>2</sub> (7HtpO) <sub>2</sub> ].2H <sub>2</sub> O (1)	12	25	37	16	36	47	48	48	56	52	62	94
[PtCl <sub>2</sub> (5HtpO) <sub>2</sub> ].2H <sub>2</sub> O (2)	7	15	32	7	18	36	22	35	56	32	45	74
RuCl <sub>3</sub> (7HtpO) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (3)	8	11	16	14	15	34	27	33	43	36	43	59

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad celular\* de los complejos sobre los macrófagos J774.2

Compuestos	24		48		72	
	50 μM	100 μM	50 μM	100 μM	50 μM	100 μM
Control <sup>a</sup>	76.29		93.45		82.88	
(1)	65.00	68.57	95.83	90.20	83.16	87.38
(2)	75.28	95.45	96.74	93.39	90.55	90.91
(3)	78.68	80.91	94.37	89.16	81.56	85.61

\* % del número de células vivas después de la acción de los complejos

a: No se indica el tipo de fármaco usado como comparativo con los complejos metálicos

<sup>δ</sup> La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de células.

<sup>ξ</sup> Es un tipo célula del sistema inmunitario, que se localizan en los tejidos.

## 2.2. Complejos de cobre (II) con derivados del ligando [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pirimidina<sup>56</sup>

Los complejos de metales de transición con ligando [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pirimidinas pueden ser usados como modelo para el estudio de interacciones metal-ligando como los observados en sistemas biológicos. Estas moléculas heterocíclicas pueden ser consideradas como análogos a la purina ya que su sistema de anillos fusionados difiere del esqueleto de la purina principalmente en tener el átomo de nitrógeno pirimidínico en una posición cabeza de puente (figura 3.6) con la desaparición del protón ácido del anillo de cinco miembros.<sup>55</sup> El sitio preferido para la unión de estos heterociclos es en el átomo de nitrógeno N3, la cual es análogo a la posición N9 de las purinas, con una distancia de 2.03 Å.

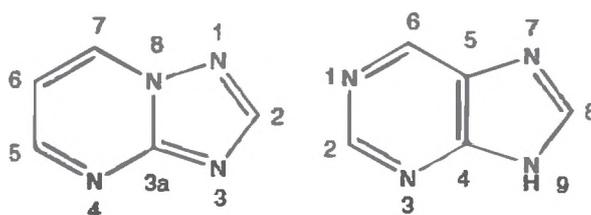


Figura 3.6. Estructura de las [1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pirimidinas y purinas.<sup>56</sup>

Sánchez, M. y colaboradores<sup>56</sup> presentan los efectos antiproliferativos de seis complejos de cobre (II) con dos derivados del compuesto triazolo-pirimidina (1,2,4-triazolo-[1,5-a]pirimidina, tp, y 5,7-dimetil 1,2,4-triazolo-[1,5-a]pirimidina, dmtp) contra la *Leishmania (viannia) peruviana*. Los complejos metálicos evaluados (1-6) presentan además de los ligandos tp y dmtp, un clásico quelato (etilendiamina, en, o la 1,10-fenantrolina, phen) y aniones inorgánicos ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{ClO}_4^-$ ) como ligandos auxiliares. De todos los compuestos analizados aquellos que tuvieron el ligando tp y/o el ligando auxiliar phen (1,10-fenatrolina) fueron los más activos.

### 2.2.1. Caracterización de los complejos

Cinco de los complejos son mononucleares y contienen el ligando phen o en como ligandos auxiliares, siendo sus fórmulas las siguientes:  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{tp})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1),  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{dntp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (2),  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{tp})](\text{NO}_3)$  (3),  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{en})(\text{tp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (4) y  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{en})(\text{dntp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (5). En todos estos complejos el ligando tp o dntp está coordinado al metal de forma monodentada a través del átomo de nitrógeno en la posición 3 y el ligando auxiliar (en o phen) se coordina de forma bidentada cerrando un anillo quelato de cinco miembros. El ligando auxiliar influye en el número de coordinación, el cual es cinco cuando el ligando es phen (la geometría alrededor del átomo metálico corresponde a una pirámide cuadrada en los complejos 1, 2 y 3) y es seis cuando el ligando es en (la geometría alrededor del átomo metálico corresponde a un octaedro distorsionado tetragonalmente en los complejos 4 y 5) mientras que el número de ligandos triazolopirimidinas unidos al átomo central parece estar influenciado por la naturaleza del contra anión. La estructura de estos cinco complejos se muestra en las figuras 3.7 - 3.9 y sus distancias y ángulos de enlace en la tabla 4.

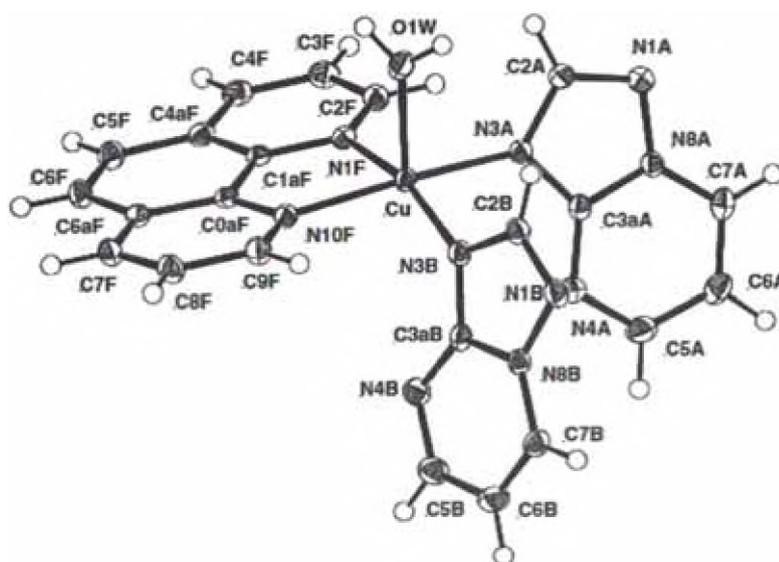


Figura 3.7. Estructura del complejo  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{tp})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1), la estructura del complejo  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{dntp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (2) es análogo a esta.<sup>56</sup>

Figura 3.9. Estructura del complejo  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{en})(\text{tp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (4), la estructura molecular del complejo  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{en})(\text{dmp})_2](\text{ClO}_4)_2$  (5) es similar a esta.<sup>56</sup>

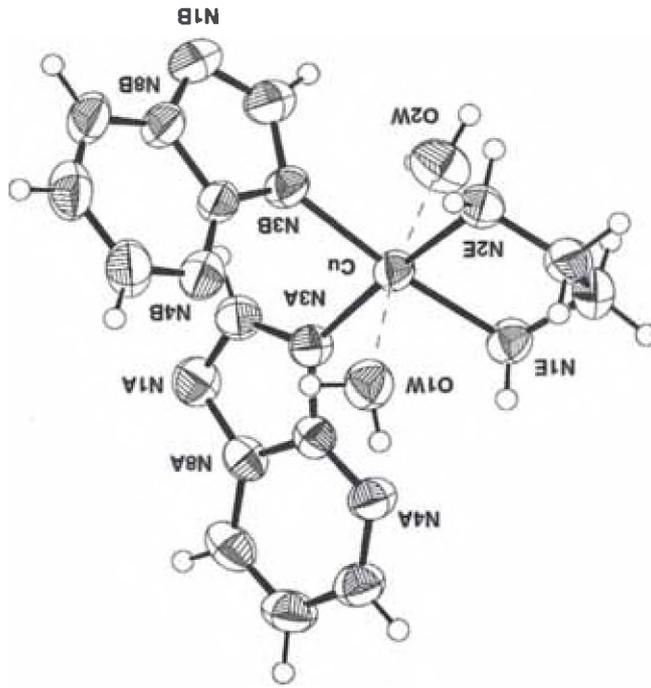


Figura 3.8. Estructura del complejo  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})(\text{tp})](\text{NO}_3)$  (3).<sup>56</sup>

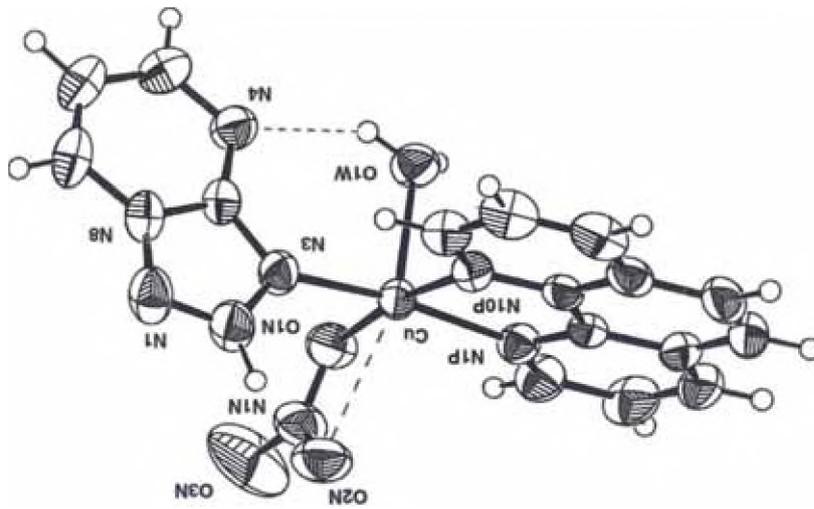


Tabla 4. Distancias(Å) y ángulos(°) de enlace para los complejos 1 al 5

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Cu-N3	1.9980(14) 2.0175(15)	1.9800(13) 2.0037(13)	1.993(2)	2.024(3) 2.028(3)	2.002(2) 2.015(2)
Cu-Na	2.0039(14) 2.0276(15)	2.0202(12) 2.0260(12)	2.008(2) 2.016(2)	2.011(3) 2.017(3)	2.008(2) 2.012(2)
Cu-On			1.9944(19)		
Cu-Ow	2.1891(14)	2.2397(11)	2.2155(19)	2.482(3) 2.494(3)	2.502(2) 2.518(2)
N3-Cu-N3	89.43(6)	90.70(5)		90.86(11)	90.79(9)
Na-Cu-Na	81.71(6)	81.90(5)	81.91(8)	84.77(12)	84.70(10)
N3-Cu-Na	93.29(6) 93.65(6) 172.05(6) 163.53(6)	95.23(5) 91.96(5) 177.07(5) 165.88(5)	93.44(9) 169.56(9)	92.42(11) 92.37(12) 174.78(12) 173.51(12)	91.52(9) 92.95(9) 176.22(9) 171.82(9)
N3-Cu-On			91.23(9)		
Na-Cu-On			92.17(9) 170.85(8)		

Na = Átomo de nitrógeno del ligando phen o en, On = Átomo de oxígeno del nitrato, Ow = Átomo de oxígeno del agua

El sexto complejo evaluado es el complejo dinuclear  $[\text{Cu}_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{2.5}(\text{tp})_5](\text{ClO}_4)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  (6). La unidad asimétrica de este complejo contiene dos átomos de cobre no equivalentes (figura 3.10). En este complejo ambos metales están unidos por dos ligandos puente, un grupo hidróxido y el ligando tp coordinado al átomo de Cu1 a través del átomo de nitrógeno N3 y al átomo de Cu2 a través del átomo de nitrógeno N4 del mismo ligando. En la tabla 5 se presenta los ángulos y distancias de enlace.

Tabla 5. Angulo y distancias de enlace del complejo dinuclear  $[\text{Cu}_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_{2.5}(\text{tp})_5](\text{ClO}_4)_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

	Distancias de enlace (Å)			Ángulo de enlace M-M (°)
Cu1-N3	2.045(3)	O1W - Cu1	2.300(3)	114.61(13)
Cu2-N4	2.063(3)	O2W - Cu1	2.412(3)	
Cu1-OH	1.928(3)	O2W - Cu1	2.697(4)	
Cu2-OH	1.913(3)			

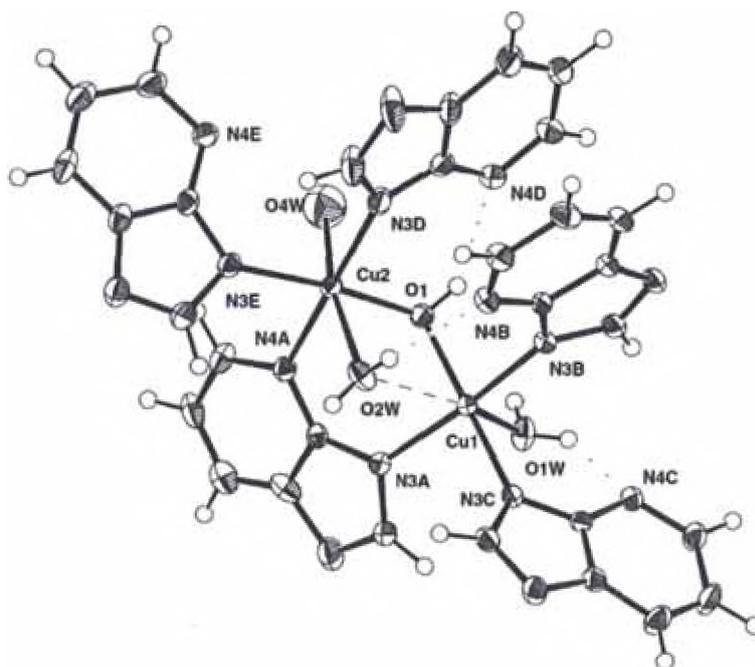


Figura 3.10. Estructura molecular del complejo [Cu<sub>2</sub>(OH)(H<sub>2</sub>O)<sub>2.5</sub>(tp)<sub>5</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·1.5H<sub>2</sub>O (6).<sup>56</sup>

## 2.2.2. Actividad biológica

Existen estudios previos que indican que los derivados de las [1,2,4]Triazolopirimidinas son fármacos quimioterapéuticos prometedores en el tratamiento de enfermedades causadas por miembros de tripanosomatidos.<sup>56</sup> El efecto inhibitorio *in vitro* de los complejos metálicos sintetizados y de los ligandos tp y dntp sobre la forma promastigotes de la *Leishmania peruviana* fue medida a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Los resultados son mostrados en la tabla 6 en la cual se incluyen los fármacos de referencia pentostan y glucantime. Los complejos 1 y 6 fueron muy eficaces en la inhibición de crecimiento contra la forma promastigote de la *Leishmania peruviana*, estos valores son más bajos que los valores de IC<sub>50</sub> (concentración requerida para dar 50% de inhibición) de los fármacos de referencia. Estos dos complejos también presentan valores bajos de toxicidad. La evaluación de toxicidad fue realizada sobre la línea celular de macrófagos J774.2, en este caso de toxicidad el valor de IC<sub>50</sub> sobre esta línea celular de macrófagos es algo de siete veces o más alto que los dos fármacos de referencia.

Los ligandos derivados del compuesto triazolo-pirimidina tp y dntp también probaron ser efectivos en la inhibición de crecimiento de la *Leishmania peruviana* y mostraron baja toxicidad. El complejo 3 fue el más efectivo sobre el crecimiento de la *Leishmania peruviana* con un valor de IC<sub>50</sub> <0.010 μM y en el caso de toxicidad necesitó una concentración aproximadamente 100 veces mayor para afectar a las células de macrófagos J774.2.

**Tabla 6.** Actividad *in vitro* de los derivados de Triazolo-pirimidina sobre la forma promastigote de la *Leishmania (V.) peruviana* y toxicidad sobre los la línea celular de macrófagos J774.2

Compuesto	Inhibición de crecimiento IC <sub>50</sub>	Toxicidad IC <sub>50</sub>
	(μM) <i>L. (V) Peruviana</i>	(μM) Macrófagos J774.2
Pentostan	11.32	9.56
Glucantime	15.33	25.61
tp	20.72	124.54
dntp	24.57	106.56
1	11.06	77.09
2	7.76	14.08
3	< 0.010	1.96
4	8.41	12.35
5	25.35	30.75
6	12.17	186.61

En resumen estos complejos metálicos claramente inhiben *in vitro* la forma promastigote de *L (V) peruviana*. De todos los compuestos analizados, aquellos que presentaron el ligando tp fueron los más activos y de estos los más efectivos tenían el ligando auxiliar 1,10-fenantrolina, dos de estos compuestos son los complejos metálicos de cobre perclorato (1 y 6) y el otro es el complejo de cobre nitrato (3). La presencia del ion nitrato puede conferir mayor potencia en la actividad del complejo contra los parásitos, aunque seguramente este contra anión los hace más tóxicos tal como se ve en los valores de toxicidad de la tabla 6.

### 3. COMPLEJOS METÁLICOS COMO POSIBLES INTERCALADORES AL ADN

En esta parte del capítulo también se mencionan algunos ejemplos de complejos metálicos que actúan como posibles metalintercaladores de ADN. Hace algunos años se ha tenido gran interés en el estudio de metalintercaladores de ADN debido a sus posibles usos como agentes terapéuticos. Los intercaladores son moléculas pequeñas que contienen grupos heterocíclicos aromáticos planares los cuales pueden insertarse y apilarse entre los pares de bases de la doble hélice del ADN sin formación de uniones covalentes.<sup>57,58</sup> Los estudios de metalintercaladores de ADN como posibles agentes quimioterapéuticos han sido enfocados principalmente en el desarrollo de complejos con actividad contra tumores que presentan resistencia al Cisplatín. Se ha propuesto que los ligandos intercaladores podrían actuar como transportadores, incrementando la interacción de los complejos formados con el ADN minimizando la exposición del metal para inactivar nucleófilos celulares como los tiosoles.<sup>59</sup>

Existen diversos complejos metálicos que son intercaladores de ADN los cuales incluyen metales que tienen aplicaciones clínicas ya conocidas (Cobre, Plata, y Oro) y ligandos que son típicamente empleados en la síntesis de metalintercaladores (figura 3.11) tales como los compuestos orgánicos dppz (dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina) y dpq (dipirido[3,2-a:2',3'-h]quinoxolina)<sup>60</sup>

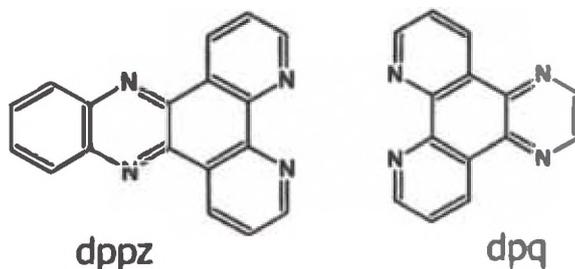


Figura 3.11. Compuestos heterociclos dppz y dpq.<sup>60</sup>

### 3.1. Complejo de cobre: Síntesis, caracterización, estudios de unión al ADN y actividad biológica del complejo $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$ contra la *Leishmania mexicana*.<sup>61</sup>

M. Navarro y colaboradores<sup>61</sup> han sintetizado el complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  por reacción del compuesto  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})]\text{BF}_4$  y el ligando dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina (dppz) en una relación molar de 1:2. El complejo fue caracterizado por espectrometría de masas, RMN, UV-visible y espectroscopia IR. Los estudios de absorción y de viscosidad llevados a cabo en la interacción del complejo  $\text{Cu}(\text{dppz})_2\text{BF}_4$  con CT- ADN sugirió que el complejo se une por intercalación. No se observan uniones covalentes. Además, los resultados obtenidos de la electroforesis mostraron una actividad nucleasa. La actividad biológica del complejo fue probada *in vitro* sobre cultivos de promastigotes de *Leishmania mexicana*. El efecto leishmanicida ( $\text{LD}_{30}$ ) fue observado en 48 horas a una concentración de 41 nM. Estudios preliminares de la ultraestructura de *L. mexicana* tratados con una dosis subletal del complejo ( $\text{IC}_7 = 4.1$  nM) por 48 horas mostró una inducción de desorganización del citoplasma, vacuolización y células binucleadas. Estos hallazgos sugieren que la actividad antileishmania del complejo podría estar asociada con sus interacciones con el ADN del parásito.

#### 3.1.1. Caracterización del complejo de Cu (I): $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$

El complejo de cobre fue sintetizado por reacción del compuesto  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})]\text{BF}_4$  y el ligando dppz en la relación molar de cobre a ligando de 1 a 2. Una solución de dppz (0.32 mmol, 94 mg) en diclorometano (15ml) fue añadida lentamente a una solución de  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})]\text{BF}_4$  (0.15 mmol, 50 mg) en diclorometano (10ml). La solución inicialmente clara se tornó a naranja oscura. La mezcla fue agitada por una hora a temperatura ambiente. Luego la solución fue transferida a un balón con 150 ml de hexano produciéndose la precipitación de un sólido color gris. El hexano fue filtrado y el sólido obtenido lavado con etanol y hexano y secado a vacío.<sup>61</sup>

En el espectro de masas del compuesto, el monocatión  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]^+ = 627$  fue registrado como el pico progenitor. El espectro de absorción mostró el mismo patrón de señales observadas en el espectro del ligando, pero con un cierto cambio del máximo con respecto a la del ligando debido a la coordinación del dppz hacia el metal. El espectro infrarojo exhibió picos asociados con el ligando dppz coordinado al cobre y bandas característica del contra anión  $\text{BF}_4$ , las frecuencias identificadas ( $\text{cm}^{-1}$ ) son las siguientes:  $\nu(\text{C-H}$  estiramiento) 3445;  $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{N}$  estiramiento en heterociclos) 1583,  $\nu(\text{BF}_4)$  1074. Todas las resonancias RMN pudieron ser asignadas. Los protones del ligando dppz coordinado, se ven que están desplazados (a regiones de campos bajos) con respecto al ligando libre, indicando acomplejamiento. De acuerdo con los datos analíticos y de RMN y por analogía con el complejo ya sintetizado,<sup>62</sup>  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ , el complejo en estudio debe poseer una configuración de 18 electrones tetracoordinado. A pesar de que no se obtuvieron cristales de este complejo se presume que la estructura podría corresponder al mostrado en la figura 3.12.

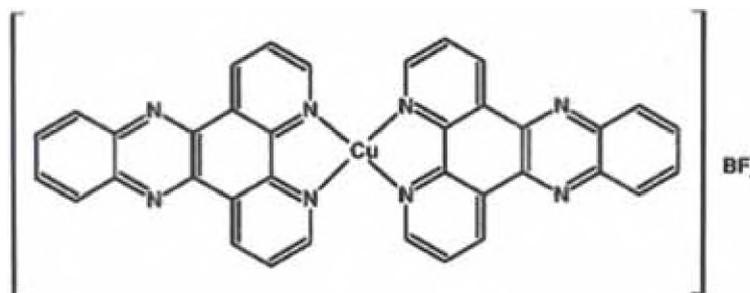


Figura 3.12. Estructura del complejo  $\text{Cu}(\text{dppz})_2\text{BF}_4$ .<sup>61</sup>

### 3.1.2. Estudios de interacción con el ADN

#### 3.1.2.1. Titulaciones espectroscópicas

La interacción de los complejos al ADN causa perturbaciones electrónicas en ellos, estas perturbaciones pueden ser observadas a través de titulaciones espectroscópicas. Las gráficas de la titulación espectroscópica del complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]^{2+}$  ( figura 3.13) y los datos obtenidos de estas pruebas mostraron que los

incrementos de cantidades de CT ADN a soluciones del complejo causaron hipocromismo alrededor del 25% ( a 275 nm) y 28% ( a 361nm y 378nm), originando un desplazamiento batocrómico del espectro de 4 y 6 nm de los máximos en 361 y 378 nm respectivamente, así como un desplazamiento hipsocrómico de 4 nm para la señal en 275 nm y un punto isosbestico en 386 nm.

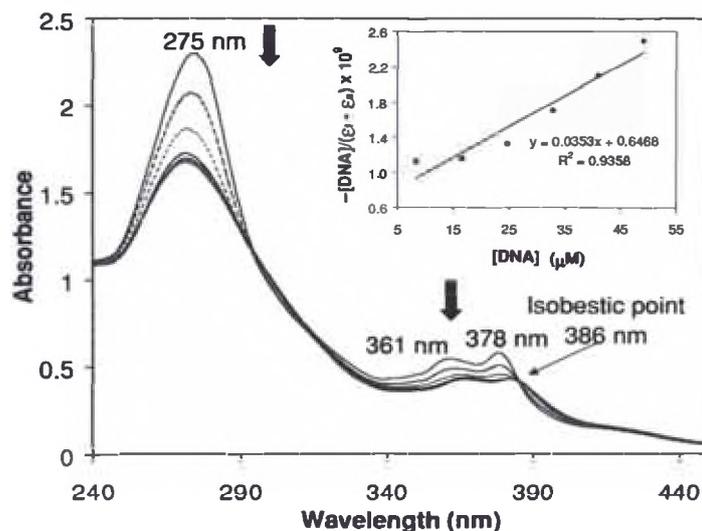


Figura 3.13. Titulación espectroscópica del complejo  $[Cu(dppz)_2]BF_4$ . La concentración del complejo fue  $15\mu M$ . La concentración del ADN usado fue:  $0-49\mu M$ . Adjunto se muestra la gráfica  $[ADN] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[ADN]$ .<sup>61</sup>

La constante de unión  $K_b$  fue determinada de la gráfica  $[ADN] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[ADN]$  insertada en la figura 3.13 siendo este valor de  $(5.1 \pm 0.4) \times 10^4 M^{-1}$  usando la absorción a 275 nm. La constante de unión de este complejo es comparable a las observadas en los complejos<sup>63,64</sup> de  $[Cu(phen)_2]^+$  y  $[Ru(phen)_3]^{2+}$ . Sin embargo, estos hallazgos por perturbaciones electrónicas a través de titulaciones espectroscópicas por el complejo  $[Cu(dppz)_2]^{2+}$ , son insuficientes para demostrar la intercalación, haciendo necesario llevar a cabo medidas tales como la viscosidad.

### 3.1.2.2. Medidas de viscosidad

Los estudios de viscosidad proporcionaron fuertes argumentos para la intercalación. Los resultados de las medidas de viscosidad se muestran en la figura 3.14. La viscosidad incrementa con un incremento en la relación [complejo]/[ADN], de manera similar a la que se reportó<sup>65</sup> para el complejo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ . Este incremento en la viscosidad ha sido atribuido al aumento de la separación entre los pares de bases las cuales son movidas a un lado para acomodar la molécula intercalante.<sup>66</sup>

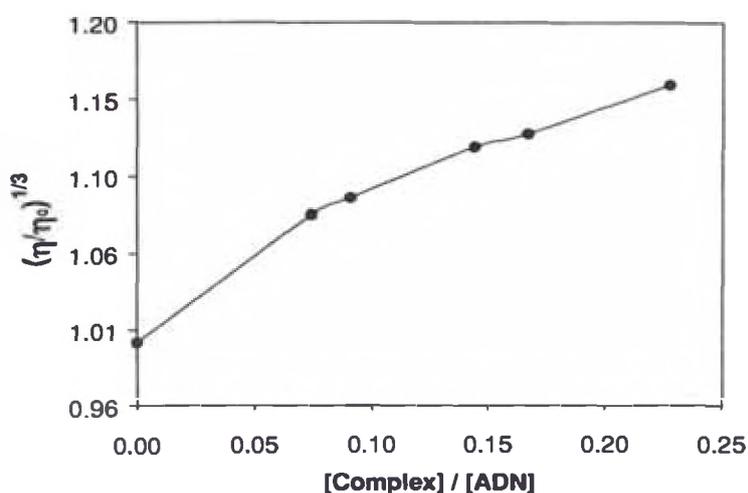


Figura 3.14. Efecto del incremento de la concentración del complejo sobre la viscosidad relativa de CT ADN a 25°C.<sup>61</sup>

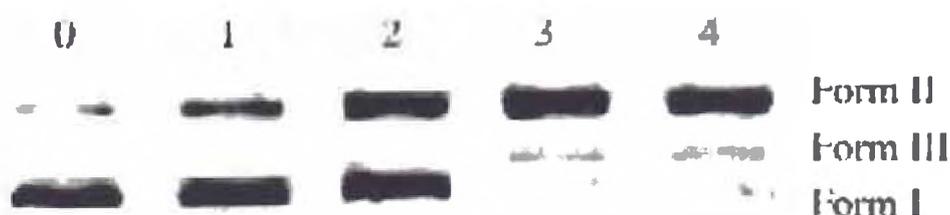
### 3.1.2.3. Interacción covalente

En los estudios de unión covalente, el complejo de cobre fue mezclado con el ADN y dejado en incubación por 72 horas. Las muestras fueron llevadas a bolsas de diálisis que fueron selladas a ambos extremos. Las muestras fueron dializadas contra 5mM de tampón tris (pH 7 por 3 días) y el tampón de diálisis cambiado cuatro veces por todo este periodo de tiempo. Las muestras fueron transferidas de las bolsas de diálisis a tubos para su centrifugado. El ADN fue precipitado por adición de etanol (el doble del volumen de la muestra) y NaCl 2M (la décima parte del volumen de la

muestra). Los tubos fueron centrifugados y el sobrenadante decantado. El exceso de líquido fue eliminado y el ADN fue resuspendido toda la noche en agua. Este ciclo de precipitación-resuspensión fue repetido tres veces y en la resuspensión final se analizó el Cobre por ICP y el ADN por el test de Burton.<sup>67</sup> En los estudios de unión covalente, el complejo de cobre fue mezclado con calf thymus (CT), esta mezcla fue sometida a diálisis exhaustiva y precipitación. La cantidad de cobre unido al ADN medido como nmol de Cu por mg de ADN aislado fue muy baja, alrededor de 10nmol de Cu / mg de ADN. Esto indica que no existen uniones covalentes entre ellos.

### 3.1.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Ya que el complejo de  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  antes mencionado, es muy conocido por su habilidad de unirse ácidos nucleicos por oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno u oxígeno y agentes reductores,<sup>68,69,70</sup> también se exploró esta posibilidad en el complejo estudiado. La reacción de segmentación o de división sobre el ADN plásmido fue monitoreada por electroforesis en gel de agarosa.



**Figura 3.15.** Efecto del incremento de concentraciones del complejo sobre el superenrollamiento del plásmido pUC119. [Complejo] ( $\mu\text{M}$ ): carril 0 = 0; carril 1 = 11; carril 2 = 14; carril 3 = 27; carril 4 = 57.<sup>61</sup>

Cuando el ADN plásmido circular es sujeto a electroforesis, una rápida migración será observada por la forma superenrollada intacta (forma I). Si se produce la escisión de una cadena, el superenrollamiento se relajará para generar una forma circular abierta de movimiento más lento (forma II). Si ambas cadenas se escinden una forma lineal (forma III) será generada la cual migrara entre las formas I y II.

La figura 3.15 muestra la separación electroforética en gel del plásmido pUC119 después de la incubación con diferentes concentraciones de  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$ , en la cual se puede ver que la forma I del plásmido disminuye gradualmente con el incremento de la concentración del complejo en estudio,  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$ , mientras la forma II aumenta.

### 3.1.3. Estudios biológicos sobre cultivos de *Leishmania mexicana*

Las formas promastigotes de *L. mexicana* fueron suplementadas con suero fetal de bovino al 5% inactivadas al calor, tratadas a 26°C con el complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  o el ligando dppz disueltos en DMSO. Los compuestos  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{SO}_4)\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disueltos en agua también fueron probados. El complejo de cobre fue añadido cuando los cultivos alcanzaron una concentración de  $10^7$  parásitos / ml en fase exponencial de crecimiento a 0.41, 4.1 y 41nM de concentraciones finales; el ligando dppz y las sales de cobre fueron añadidas a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente. La cinética de inhibición fue medida durante 48 horas. Estudios ultraestructurales preliminares fueron llevados a cabo con métodos convencionales de microscopía de transmisión electrónica (TEM). El complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  mostró un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis sobre los promastigotes de *L. mexicana*, la tabla 7 muestra que a 48 horas, a una concentración del complejo de 4.1nM (3  $\mu\text{g}$  / ml) reduce la tasa de crecimiento solo un 7% ( $\text{IC}_{7}$ ), mientras que a 41nM (30  $\mu\text{g}$  / ml) el complejo indujo una mortalidad del 30% ( $\text{LD}_{30}$ ). En cambio, el ligando dppz disminuye la tasa de crecimiento de los parásitos en un 25% ( $\text{IC}_{25}$ ) a una concentración que es 243 veces la del complejo. Además, las sales de cobre no tenían efectos inhibitorios aun a concentraciones 2439 veces la del complejo.

Este es el primer reporte de los efectos inhibitorios del complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  sobre promastigotes de *L. mexicana*. Aunque es importante señalar que varios complejos de  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$  también mostraron similar actividad biocida sobre *Staphylococcus aureus* [concentración inhibitoria mínima (MIC) en el rango de 0.5 – 15

µg/ml] y *Escherichia coli*,<sup>71</sup> aunque, hasta donde se sabe, sus actividades antileishmania aún no han sido reportadas. Además, el complejo [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> mostró mayor actividad biológica *in vitro* que los complejos metálicos de Pt(II) y Rh(II) que ya han sido estudiados en contra de formas las promastigotes de *L. donovani* (IC<sub>50</sub> ≅ 100 µg / ml).<sup>72</sup> Adicionalmente, el complejo en estudio es más activo que el complejo [Cu(dppz)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)](NO<sub>3</sub>) que fue probado sobre formas promastigotes de *L. braziliensis* (LD<sub>100</sub> ≅ 10 µg / ml).<sup>73</sup>

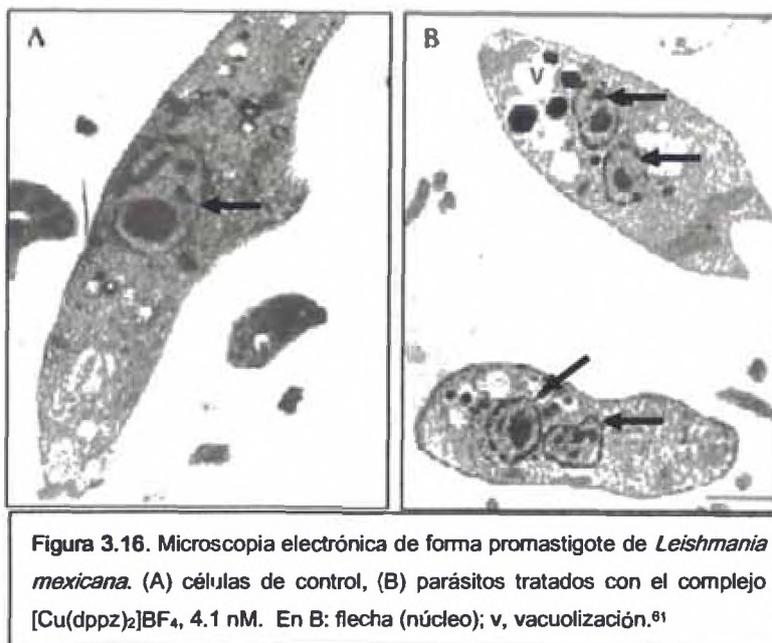
Tabla 7. Efectos del [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub>, dppz y sales de cobre sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* durante 48 horas

Compuesto	Concentración (µM)	Concentración efectiva
[Cu(dppz) <sub>2</sub> ]BF <sub>4</sub>	4.10 x 10 <sup>-3</sup>	IC <sub>7</sub>
[Cu(dppz) <sub>2</sub> ]BF <sub>4</sub>	41.00 x 10 <sup>-3</sup>	LD <sub>30</sub>
Dppz	10.00	IC <sub>25</sub>
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	100.00	**
Cu(SO <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> H <sub>2</sub> O	100.00	**
IC: Concentración inhibitoria;	LD: Dosis letal;	** Sin efectos inhibitorios

La observación a través de microscopía electrónica de los parásitos con la dosis letal del complejo [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> mostro perdida de movimiento y destrucción celular. En estudios preliminares se han observado alteraciones ultraestructurales con parásitos tratados a una dosis subletal de 4.1nM, caracterizada por células binucleadas y desorganización del citoplasma con vacuolización, figura 3.16 (el más reciente fue observado en forma de promastigote de *L. donovani*).<sup>65</sup> Estos resultados sugieren que el blanco celular del complejo podría ser el ADN nuclear.

En resumen los datos hallados sobre los estudios de absorción y viscosidad respaldan la hipótesis de que el complejo [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> puede unirse al ADN y la naturaleza de esta unión puede involucrar intercalación parcial de uno de los anillos del ligando dppz del complejo entre los pares de bases del ADN. El complejo en estudio es también capaz de realizar una escisión del ADN basado en los resultados de la electroforesis. Además, los resultados observados para el complejo en estudio son similares a los complejos ya reportados<sup>74,75</sup> de [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

La potente actividad leishmanicida *in vitro* observada contra la forma promastigote de *L. mexicana* constituye hallazgos prometedores para futuros estudios en modelos experimentales de leishmaniasis.



### 3.2. Complejo de Au(III): Síntesis y caracterización del complejo $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$ . Estudios de interacción y actividad biológica contra la *Leishmania (L) mexicana*<sup>76</sup>

Maribel navarro y colaboradores<sup>76</sup> han sintetizado el complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  por reacción de ácido cloroaúrico  $\text{HAuCl}_4$  en exceso del ligando dppz. Este complejo fue caracterizado por análisis elemental, RMN, espectroscopia UV-visible, infraroja y masas. Las interacciones del complejo metálico y el ADN fueron estudiadas por titulaciones espectroscópicas, medidas de viscosidad y pruebas electroforéticas. Estos estudios mostraron que el complejo de oro interactúa con el ADN por intercalación. Estas observaciones permiten llevar a cabo pruebas biológicas sobre cultivos de formas promastigotes de *Leishmania (L) mexicana*. El complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  indujo una actividad antiproliferativa dependiente de la dosis empleada con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 3.4nM y una dosis letal de  $\text{LD}_{26}$  de 17nM por 48 horas. Los resultados obtenidos sugieren que una fuerte actividad antileishmania podría estar asociada a los procesos celulares que interviene en el

ADN del parásito, constituyendo una nueva alternativa terapéutica en el desarrollo para la cura de la leishmaniasis.

### 3.2.1. Caracterización del complejo $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$

Una solución del ligando dppz (114mg; 0.4 mmol) en etanol (10 mL) fue agregada a una solución del ácido cloroaúrico (38 mg; 0.1 mmol) en etanol (3 ml). La mezcla fue sometida a reflujo durante 4 horas. Al inicio de la reacción se observa un sólido de color amarillo, la cual se torna naranja al término de reflujo. Finalmente, el sobrenadante fue filtrado y el sólido obtenido lavado con abundante alcohol y secado. El análisis elemental calculado corresponde a %C 49.8; %N 12.9 y %H 2.3; mientras que el encontrado corresponde a %C 49.6; %N 13.6; %H 2.5. El análisis elemental del complejo concuerda con la fórmula molecular calculada de la estructura propuesta, en la cual dos moléculas de dppz y tres átomos cloruros por átomo de oro están presentes. Los resultados de espectrometría de masas muestra un pico correspondiente al ion molecular  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$  con una relación m/z de 761. Los espectros de absorción mostraron el mismo patrón de señales observadas para el espectro del ligando (tabla 8).

Tabla 8. Coeficientes de extinción del ligando dppz y el complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$

Compuesto	$\epsilon_{271} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{363} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\epsilon_{383} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
DPPZ	$6.2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
$[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$	$9.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$

El espectro infrarojo presentó picos asociados con el ligando dppz coordinado al átomo de oro. Todas las señales RMN pudieron ser asignadas. Los protones del ligando coordinado mostraron sólo una serie de señales, desplazado a campos bajos con respecto al ligando libre, indicando que la coordinación del ligando dppz al átomo de oro es a través del nitrógeno imínico como ligando bidentado (tabla 9)

Tabla 9. Datos de  $^1\text{H}$  RMN y frecuencias IR seleccionadas del ligando libre y el complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$

Compuesto	$^1\text{H}$ RMN					Bandas IR seleccionadas	
	H <sub>A</sub> (ppm)	H <sub>B</sub> (ppm)	H <sub>C</sub> (ppm)	H <sub>D</sub> (ppm)	H <sub>E</sub> (ppm)	$\lambda_{\text{C=N}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{C=C}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
DPPZ	9.46	7.92	9.19	8.35	8.04	1619	1577
$[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$	9.61	80.8	9.24	8.37	8.08	1614	1573

Solo la parte  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$  del complejo fue analizada, la estructura propuesta se presenta en la figura 3.17. Los cálculos en química cuántica indican que es posible tener un complejo de Au(III) estable con dos ligandos dppz. En la estructura de más baja energía de este complejo el átomo de Au tiene una geometría cuasi cuadrada plana con uno de los ligandos dppz retorcidos. Todos los átomos de nitrógenos enlazados al átomo de oro tienen la misma distancia Au-N la cual corresponden a 2.095 Å, y un ángulo diedro entre los ligandos de 16.2°, tal como se muestra en la figura 3.17. Este retorcimiento es debido al arreglo entre la tendencia de los complejos de  $\text{Au}^{3+}$  a ser cuadrado planos y la repulsión estérica entre los dos ligandos dppz. De acuerdo a los datos disponibles, la formulación para el complejo en estudio corresponde a una configuración de Au(III) de 16 electrones.



Figura 3.17. Estructura propuesta para  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]^{3+}$ . <sup>76</sup>

### 3.2.2. Estudios de interacción con el ADN

#### 3.2.2.1. Titulaciones espectroscópicas

Las pruebas de titulación espectroscópica mostraron que los incrementos de cantidades de CT ADN a soluciones del complejo causaron hipocromismo (figura 3.18) de 45% (entre 271 y 276nm) y 7% (para ambas longitudes de onda, 363 y 382nm) en el máximo de la señal del complejo. Un desplazamiento de 6nm hacia el rojo correspondiente al máximo fue observado en el rango de 271-276nm. Esta observación nos da una evidencia de la interacción entre el complejo de Au y el ADN.<sup>77</sup> Además, basados en los valores obtenidos en las titulaciones espectroscópicas, la constante de unión del complejo-ADN fue calculada  $((1.8 \pm 0.4) \times 10^5)$ . Este valor obtenido está dentro de los valores de los compuestos que son considerados a tener interacción con el ADN.<sup>78</sup>

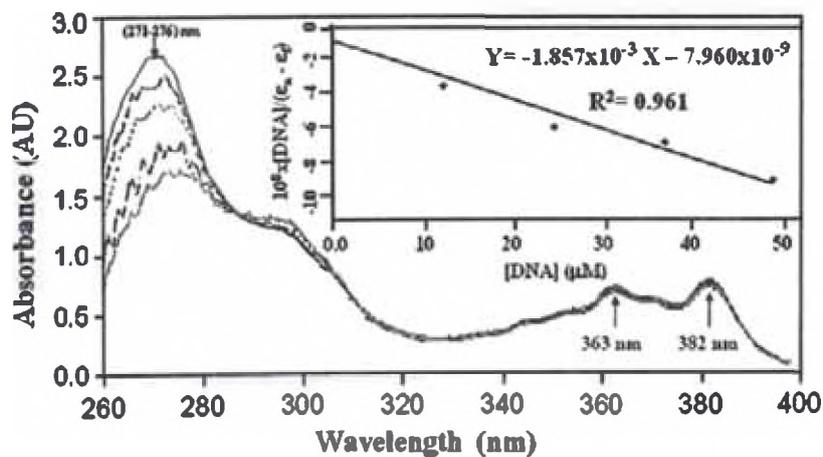


Figura 3.18. Espectro de las titulaciones espectroscópicas del complejo  $[Au(dppz)_2]Cl_3$  con CT-ADN [Complejo] =  $2.44 \times 10^{-5}$  M y [ADN] = 0-120  $\mu$ M.<sup>78</sup>

A pesar de que las titulaciones espectroscópicas proveen información acerca de una posible interacción de un complejo metálico con el ADN, ellas no nos dicen algo sobre el tipo de interacción que tiene lugar. Por eso es importante llevar a cabo pruebas hidrodinámicas. Tales experimentos han sido frecuentemente usados para evaluar cambios estructurales en la hélice del ADN por interacción intercalativa,

observada por bromuro de etidio la cual es un clásico intercalador<sup>78</sup> y por muchos otros complejos metal-dppz previamente reportados.<sup>79,80</sup>

### 3.2.2.2. Medidas de viscosidad

Las medidas de viscosidad del ADN en presencia de diferentes concentraciones del complejo en estudio se muestran en la figura 3.19. En la figura se observa que un incremento en la concentración del complejo produce un incremento de la viscosidad del ADN. De esta manera, se puede deducir que el complejo, sin duda es un intercalador del ADN.

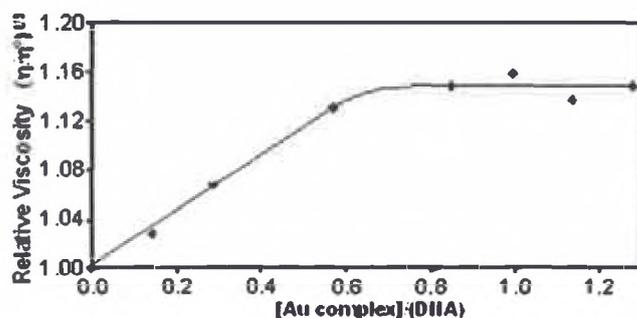


Figura 3.19. Efecto del incremento de la concentración del complejo  $[Au(dppz)_2]Cl_3$  en la viscosidad relativa del Calf-thymus ADN a 25°C.<sup>78</sup>

### 3.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

En la figura 3.20 se observa la diferencia en la movilidad del plásmido solo (superenrollada) y el plásmido incubado con diferentes concentraciones del complejo. El incremento en la concentración del complejo de oro causó cambios en la movilidad del plásmido. Dos bandas pueden ser vistas de 0 a 86  $\mu M$ , uno debido al plásmido en la forma superenrollada (forma I de la figura 3.20) y la otra debido a cierta cantidad en la forma circular (forma II). A concentraciones más altas de 86  $\mu M$  solo la banda correspondiente a la forma circular es observada. Este resultado es similar a los ya reportados para los complejos<sup>7</sup>  $[Cu(dppz)(NO_3)]NO_3$  y  $[Cu(dppz)_2(NO_3)](NO_3)$ .

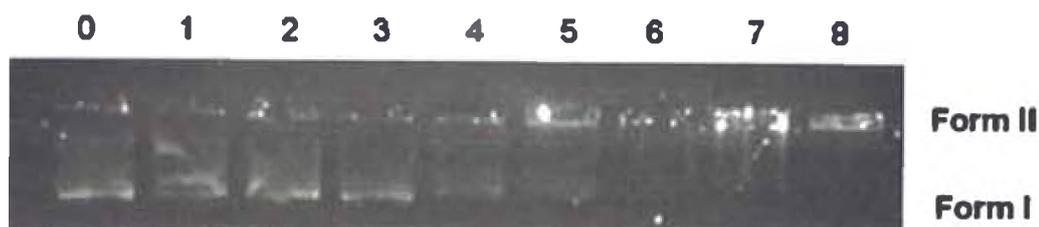


Figura 3.20. Efecto del incremento de la concentración del complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  en el superenrollamiento del plásmido pUC119.  $[\text{pUC119}] = 126 \mu\text{g/mL}$ ,  $[\text{Complejo}] (\mu\text{M})$ : línea 0 = 0, línea 1 = 13, línea 2 = 17, línea 3 = 29, línea 4 = 57, línea 5 = 86, línea 6 = 129, línea 7 = 171, línea 8 = 214.<sup>76</sup>

### 3.2.3. Pruebas biológicas en cultivos

Los promastigotes de *L. mexicana* fueron suplementadas con suero fetal de bovino al 5% inactivada al calor, tratadas a 26°C con el complejo disuelto en DMSO. Las concentraciones finales del complejo entre 0,34 nM y 34 se agregaron por triplicado a los cultivos de promastigotes en fase de crecimiento exponencial. El ligando dppz también fue añadido a una concentración máxima de 10  $\mu\text{M}$ . La cinética de inhibición de crecimiento fue medida durante 48 horas por conteo directo en una cámara de Neubauer, y por conteo indirecto en un espectrofotómetro a 560 nm. La viabilidad fue medida por exclusión del azul tripano. Este método convencional consiste en la adición de azul tripano (compuesto diazoico, que se agrega al 0.1% por 5 min) a muestras de cultivos después de la incubación con el complejo. Las células muertas son permeables a teñirse permitiendo fácilmente observación directa de ellas y el respectivo conteo.<sup>81</sup> El complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  indujo una potente actividad antiproliferativa dependiente de la dosis con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 3.4 nM y una dosis letal ( $\text{LD}_{26}$ ) de 17 nM por 48 horas (figura 3.21). Los parásitos mostraron menor movilidad, inflamación y vacuolización del citoplasma antes de la rotura de la membrana celular. Resultados similares fueron obtenidos con el complejo  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  ( $\text{LD}_{30}$  of 41 nM), las cuales estaban asociados a alteraciones ultraestructurales caracterizadas por células binucleadas a concentraciones subletales.<sup>82</sup>

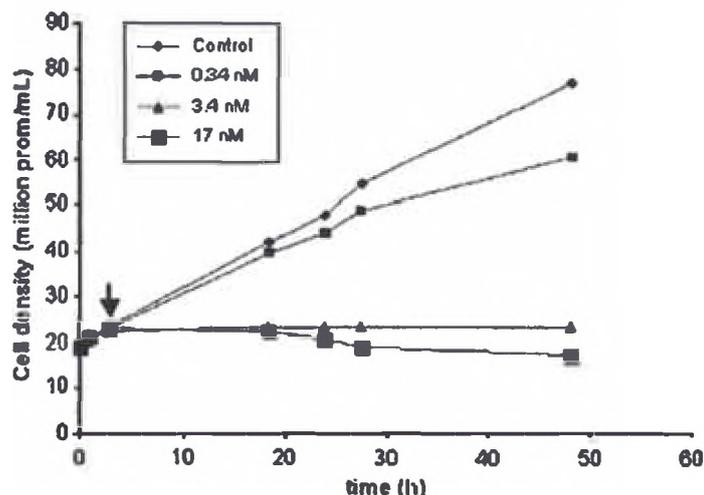


Figura 3.21. Efecto del complejo de  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (L) mexicana*. ↓ = adición del complejo. Densidad celular calculada por triplicado con desviación estándar =  $\pm 2$  millones promastigotes / mL.<sup>76</sup>

Por otro lado, el ligando dppz a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (tres órdenes de magnitud superior a las concentraciones efectivas del complejo) solo indujo un leve efecto leishmanicida disminuyendo la velocidad de crecimiento de los parásitos en 25%. Esta baja concentración efectiva del complejo  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$  constituye un buen punto de inicio para el desarrollo de un posible metalofármaco de oro para el tratamiento quimioterapéutico de la *Leishmania*. Aunque las investigaciones sobre este complejo se encuentran en una primera etapa, los resultados obtenidos sugieren que un posible mecanismo de acción leishmanicida involucra la interacción del complejo de oro con el ADN del parásito.

## Capítulo 4

### ARSENAL TERAPÉUTICO Y COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO CONTRA LA MALARIA

#### 1. ARSENAL TERAPÉUTICO TRADICIONAL

Diseño y síntesis de nuevos agentes antiparasitarios utilizando un producto natural como prototipo son tareas importantes de la química medicinal. Uno de los ejemplos más sobresalientes involucra a los indígenas sudamericanos, quienes extraían la corteza de los árboles *Cinchona*, usando el extracto para combatir los escalofríos y la fiebre en el siglo XVII. En 1633 se introdujo esta medicina herbal en Europa, donde se le dio el mismo uso y también contra la malaria. En 1820 se aisló el componente activo, determinándose posteriormente que se trataba de la quinina (1), el primer compuesto en exhibir actividad antimalárica significativa. Para eliminar sus efectos tóxicos, se intentó mantener, sintéticamente, algunas de las características químicas y estructurales de este alcaloide usándolo como compuesto líder, así se produjo el análogo sintético, la cloroquina (CQ) (2), que fue, inicialmente, un tratamiento excelente para la malaria (Figura 4.1).<sup>83</sup>

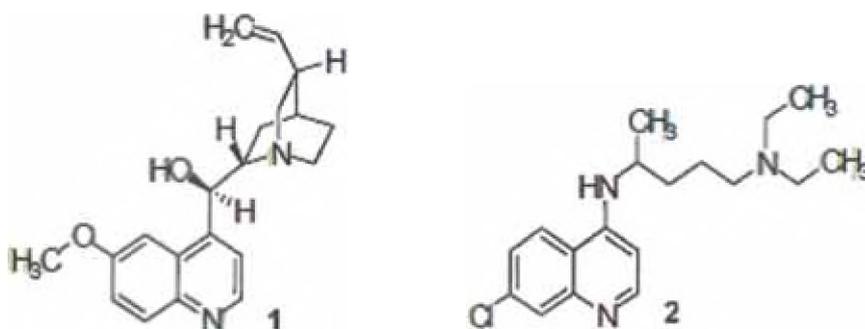


Figura 4.1. Estructura de la Quinina (1) y de su análogo sintético la Cloroquina (CQ) (2)<sup>83</sup>

### 1.1. Desarrollo de las Aminoquinolinas

A pesar de su baja eficacia y tolerabilidad, la quinina aun juega un rol importante en el tratamiento de la malaria multirresistente debido a su alta solubilidad y porque se puede suministrar intravenosa en pacientes que ya no pueden tolerar la medicación oral. La pamaquina (3) (Figura 4.2), sintetizada en 1925, es una 8-aminoquinolina y uno de los primeros antimaláricos sintéticos que resultó ser más potente que la quinina al erradicar las etapas hepáticas del parásito en humanos y el resurgimiento de la malaria por *Plasmodium vivax*. En 1932 se desarrolló la mepacrina (4) (Figura 4.2), la cual es activa contra las etapas sanguíneas del *P. falciparum*, también es conocida como atebrina o quinacrina y recordada de la Segunda Guerra Mundial por la pigmentación amarilla que producía en la piel de los soldados.<sup>84</sup>

La CQ (2) (Figura 4.1) se sintetizó en 1934 pero sólo se inició su uso hasta 1946 por ser considerada, inicialmente, muy tóxica. Su síntesis se llevó a cabo en los laboratorios de Bayer en Alemania bajo el nombre de resoquina.<sup>85</sup> Desde entonces, la CQ ha sido el antimalárico más importante y efectivo, de tal forma que se utilizó desmesuradamente en un esfuerzo para erradicar la malaria del planeta, llegando incluso a suministrarse a la población en la sal de cocina. Poco después de que este programa de erradicación diera inicio, se presentaron los primeros casos de cepas resistentes al medicamento en las mismas regiones donde se distribuyó la sal de cocina con la CQ. Como alternativa, se introdujo el fármaco amodiaquina (5) (Figura 4.2), activo contra las cepas resistentes a la cloroquina aun cuando ésta última todavía representa el medicamento más usado, por su muy bajo costo de producción. El uso de la amodiaquina se limitó desde los ochenta debido a la aparición ocasional de agranulocitosis<sup>λ</sup> en los pacientes. También la mefloquina (6), que se considera un agente terapéutico estándar contra la malaria resistente a la cloroquina, se ha

<sup>λ</sup> Reducción de la cantidad normal de células blancas de la sangre en el flujo sanguíneo.

restringido en uso por su alto costo y por la aparición de efectos colaterales neuropsiquiátricos en algunos pacientes.

Entre los compuestos quinolónicos en desarrollo clínico se cuentan la primaquina (7), usada desde los cuarenta contra las etapas hepáticas del *P. vivax*, por lo que también sirve como profiláctico; además, previene la maduración de los gametocitos fértiles. La optimización en la estructura de la primaquina (7) y la pamaquina (3) llevó a la tafenoquina (8), un compuesto menos tóxico y con un tiempo de vida media más largo en el plasma sanguíneo, de 2 a 3 semanas. Es activo contra las etapas eritrocíticas del parásito y susceptible contra las cepas multirresistentes a la CQ. La pironaridina (9) tiene similitudes estructurales con la CQ, la mepacrina (4) y la amodiaquina. Se desarrolló en China, donde fue registrada desde los ochenta, es muy activa incluso contra los parásitos resistentes a la CQ.

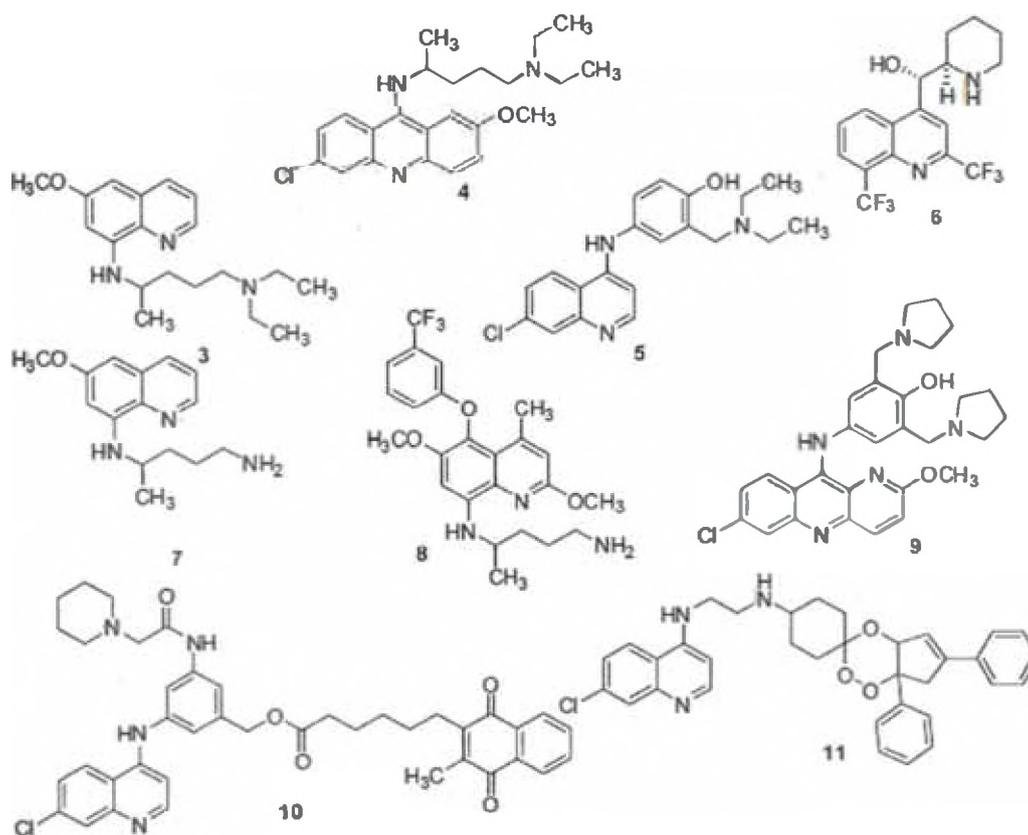


Figura 4.2. Estructura de diversos fármacos antimaláricos.<sup>64</sup>

Una estrategia para contrarrestar la resistencia de los parásitos a las 4-aminoquinolinas, involucra la síntesis de profármacos quiméricos o híbridos: 4-aminoquinolinas con actividad antimalárica conocida unidas a otro fragmento con algún tipo de actividad diferente, en este caso un inhibidor (10) de glutatión-reductasa, ambos enlazados a través de un enlace éster metabólicamente lábil. El desarrollo de las trioxaquinas también combina las ventajas farmacológicas de los peróxidos y las 4-aminoquinolinas; de éstas, la más activa es la DU-1102 (11), también altamente eficiente contra los *P. falciparum* resistentes a la CQ (Figura 4.2).

Entre otros compuestos activos de la actualidad se encuentra el sesquiterpeno artemisinina (12) (Figura 4.3), un 1,2,4-trioxano, el potente componente antimalárico de la ancestral *Artemisia annua*, empleada como remedio herbal en China para la fiebre y más recientemente para el tratamiento de *P. falciparum* multirresistentes. Sin embargo, su valor terapéutico disminuye debido a su pobre solubilidad; como consecuencia se han desarrollado varios derivados. Por reducción de la artemisinina se obtiene la dihidroartemisinina (13), a partir de la cual se llega a una serie de derivados semisintéticos de primera generación: Artemeter (14) y Arteter (15) (Figura 4.3), compuestos más potentes que la Artemisinina pero más tóxicos para el SNC (sistema nervioso central) y con menor tiempo de vida en el plasma, rápidamente excretados en la orina.<sup>86</sup>

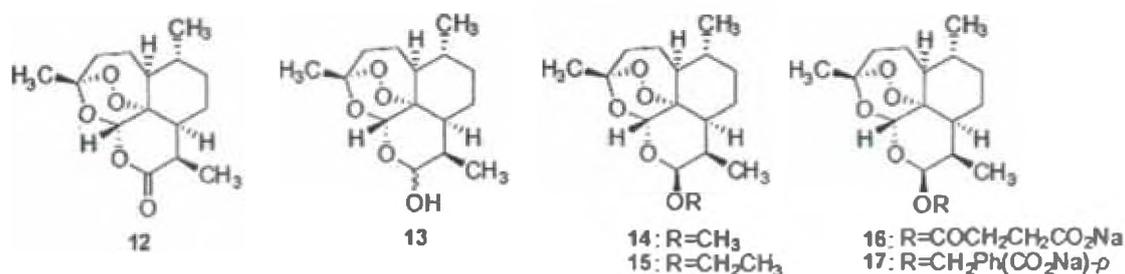


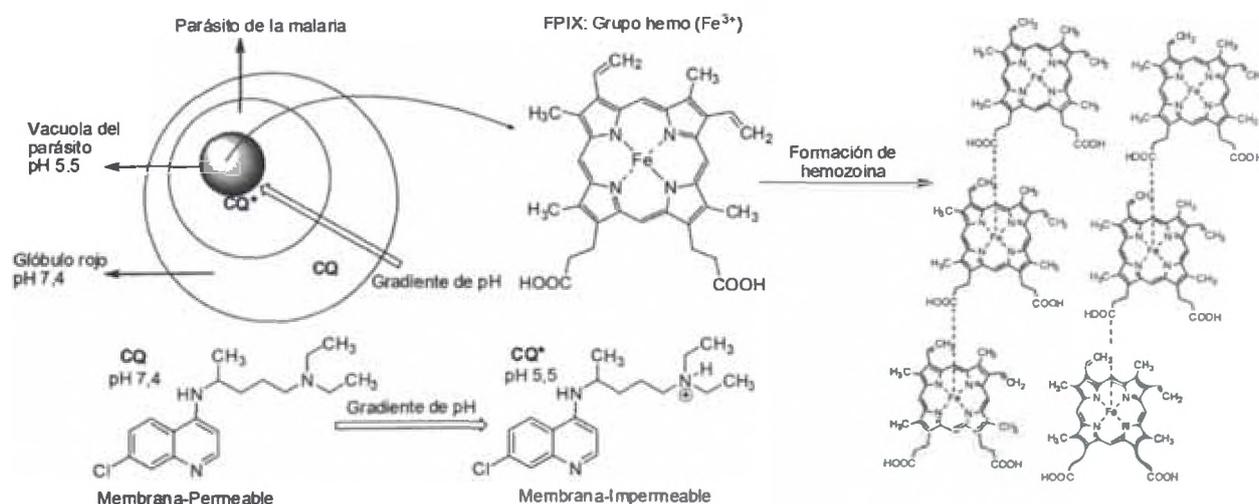
Figura 4.3. Estructura química del producto natural artemisinina (12) y de sus derivados semi-sintéticos (13-17).<sup>86</sup>

Como una nueva alternativa se desarrollan el artesunato de sodio (16) y el artelinato de sodio (17), con menor toxicidad en el SNC. Este tipo de moléculas representan una nueva clase de compuestos antimaláricos que no se basan en la estructura de la quinolina y que además son activos contra las cepas multirresistentes, sin surgimiento de resistencia alguna hasta el momento, convirtiéndose rápidamente en el fármaco de elección en la mayoría de los casos de malaria en los países donde se presenta y constituyéndose en la clase de antimalárico más importante disponible actualmente.<sup>87</sup> Se ha podido establecer que la unidad de peróxido de estos trioxanos es esencial para su potencia como antimalárico. El entendimiento del mecanismo de acción y el metabolismo de la artemisinina (12) y los endoperóxidos semisintéticos (13- 17) (Figura 4.3) es un objetivo esencial para el desarrollo de nuevos trioxanos antimaláricos.<sup>88</sup>

## **1.2. Mecanismo de acción de las 4-aminoquinolinas**

Por muchos años se ha aceptado que la digestión de la hemoglobina del eritrocito hospedador se desarrolla en la vacuola digestiva, donde existen enzimas proteolíticas (proteasas aspártico, cisteínicas y metaloproteasas) que son activas bajo condiciones ácidas. De esta forma el parásito adquiere los aminoácidos requeridos para la síntesis de sus propias proteínas mientras que desarrolla un proceso de desintoxicación del hemo libre, para evitar la toxicidad ocasionada por la acumulación del mismo, debido a la generación de especies superóxidos y peróxidos que desencadenarían modificación de aminoácidos, así como daños a las membranas celulares y al ADN.<sup>89</sup> Este proceso de desintoxicación consiste en oxidar el hemo libre (Fe(II)FPIX) a hematina (Fe(III)FPIX) para generar posteriormente por polimerización de la hematina el pigmento malárico inocuo denominado Hemozoína o  $\beta$ -hematina (figura 4.4).<sup>90</sup> Ya que tanto la liberación de los aminoácidos como la desintoxicación por el grupo Fe(III)FPIX por polimerización son esenciales para la supervivencia del parásito, ambos procesos podrían ser blancos de los medicamentos 4-aminoquinolínicos. Entonces, las 4-aminoquinolinas como la CQ podrían formar

complejos con el grupo Fe(III)FPIX libre impidiendo que el parásito la polimerice para desintoxicarse, de hecho, la afinidad de la cloroquina por el parásito es similar a la afinidad de del Fe(III)FPIX por la cloroquina. Esta hipótesis se fortaleció al comprobarse que el complejo cloroquina-Fe(III)FPIX es incluso más tóxico para el *Plasmodium* que el Fe(III)FPIX libre. Esto, sumado a la elevada concentración que alcanza la cloroquina dentro de la vacuola, miles de veces superior, comparada con su concentración en las células eritrocíticas, hacen de las 4-aminoquinolinas compuestos interesantes para explorar las razones que han llevado a la resistencia hacia el medicamento cloroquina.



**Figura 4.4.** Procesos bioquímicos durante la ingestión de la hemoglobina y el blanco de la CQ. La CQ es una base débil diprótica ( $pK_{a1}=8.1$ ;  $pK_{a2}=10.2$ ), en su forma protonada puede atravesar las membranas de los eritrocitos invadidos y moverse con el gradiente de pH para acumularse en la vacuola (pH=5.5) del invasor, donde se cree que las 4-aminoquinolinas ejercen su mecanismo de acción. La CQ se acumula hacia abajo del gradiente de pH, de tal forma que su acumulación en el parásito es 10,000 veces mayor que en el glóbulo rojo.<sup>90</sup>

### 1.3. El rol del grupo en la posición C-7 del anillo quinolínico

Buscando los componentes estructurales necesarios para conseguir el nuevo agente antimalárico que supere los problemas de resistencia y mantenga una excelente bioactividad y baja o nula toxicidad, se ha encontrado que 7-bromo y 7-yodo aminoquinolinas con cadenas laterales diaminoalcanicas cortas (2 ó 3 carbonos) y largas (10-12 carbonos) son activas contra parásitos *P. falciparum* resistentes y

sensibles a la cloroquina. Los resultados sugieren que el número de carbonos entre los dos nitrógenos de la cadena diaminoalcanica de las 7-bromo o las 7-yodo aminoquinolinas es crucial para la actividad contra los *P. falciparum* resistentes, al igual que con las aminoquinolinas 7-cloro sustituidas.<sup>91</sup> Las evidencias permiten proponer un detallado modelo de relación estructura-actividad para la CQ así: el núcleo de la 4-aminoquinolina provee, por sí solo, una estructura acomplejante del grupo hemo, pero no lo suficiente para la inhibición de la formación de hemozoina; el cloro en la posición 7 es responsable por la inhibición en la formación de hemozoina pero, probablemente, tiene poca influencia en la fuerza de asociación con el hemo; la cadena lateral aminoalquílica es un requerimiento para la fuerte actividad antiplasmódica, probablemente ayuda con la acumulación en la vacuola y también parece aumentar la fuerza de asociación con el hemo en algunos casos (Figura 4.5).<sup>92</sup>

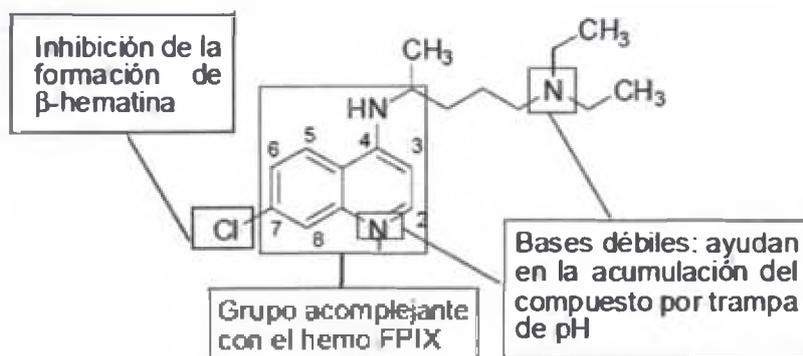


Figura 4.5. Relación estructura-actividad propuesta para los compuestos basados en la cloroquina.<sup>92</sup>

Los cambios en la longitud de la cadena lateral diaminoalquílica tienen poca influencia sobre la actividad contra las cepas sensibles a la CQ, pero una influencia profunda contra las cepas resistentes. Parece que con tan solo hacer grandes cambios en tal cadena lateral se puede superar la resistencia a la CQ, sin tener que hacer cambios en el fragmento 4-amino-7-haloquinolínico, responsable del acomplejamiento con el grupo hemo y la inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina, lo cual se correlaciona con la capacidad electroatrayente del grupo en la posición C-7 del sistema quinolínico. Por su tamaño y propiedades, el grupo 7-cloro se ha identificado

como una característica necesaria para la inhibición en la formación de  $\beta$ -hematina sobre otros grupos electroatrayentes o electrodonantes.<sup>93</sup>

## 2. COMPLEJOS METÁLICOS EN ESTUDIO

El principal problema en la lucha contra la malaria lo representa la resistencia hacia múltiples fármacos desarrollada por los parásitos del género *Plasmodium*, agentes causales de la malaria; requiriéndose nuevas estrategias para solventar esta situación. Una estrategia que ha cobrado auge es la incorporación de una porción organometálica a drogas antimaláricas estándar, con la finalidad de revertir la resistencia y prolongar su vida útil como antimalárico; tal es el caso de la ferroquina (FQ) y sus distintos derivados. Encontramos que los complejos de oro, rutenio y rodio derivados de cloroquina (CQ), así como la síntesis de complejos multidentados de metales (III), han sido reportados como potenciales antimaláricos.<sup>5</sup> A continuación se presenta una breve revisión del desarrollo de estos compuestos, haciendo énfasis en los diversos mecanismos de acción que pudieran estar involucrados en dicha actividad.

### 2.1. Complejo de cobre: Síntesis y caracterización de complejos de cobre (II) con ligando piridina-2-carboxamidrazonas<sup>94</sup>

Gokhale H. y colaboradores<sup>94</sup> han reportado algunos complejos de cobre (II) con ligando piridina-2 carboxamidrazonas. El complejo caracterizado 8a muestra una geometría cuadrada plana altamente distorsionada con una coordinación intermolecular débil por parte del ligando sulfuro tiofenil teniendo como resultado una disposición en forma de apilamiento en la red cristalina. Las actividades *in vitro* de los compuestos sintetizados contra el cepas de *Plasmodium falciparum* son reportados por primera vez, la cual muestra claramente la ventaja de formación del complejo de cobre y el requisito de una geometría tetraordinada alrededor del átomo de cobre

<sup>5</sup> En el anexo se resume la actividad biológica de algunos complejos metálicos y organometálicos

como una de las principales características estructurales para el diseño de tales antimaláricos.

### 2.1.1. Caracterización de los complejos metálicos de cobre

Los compuestos heterociclos tiosemicarbazonas tales como la 2-acetilpiridina tiosemicarbazona (1) (figura 4.6) han mostrado poseer una gran actividad antimalarica.<sup>95</sup> Las carboxamidrazonas (2) tienen un gran parecido estructural a estas tiosemicarbazonas y han demostrado tener prometedoras propiedades antitumorales.<sup>96</sup> Como parte lógica de estas semejanzas, Gokhale H. y colaboradores<sup>94</sup> hacen un estudio de las actividades antimaláricas contra el *Plasmodium falciparum* de una serie de complejos de Cobre(II) con ligando piridina-2-carboxamidrazonas.

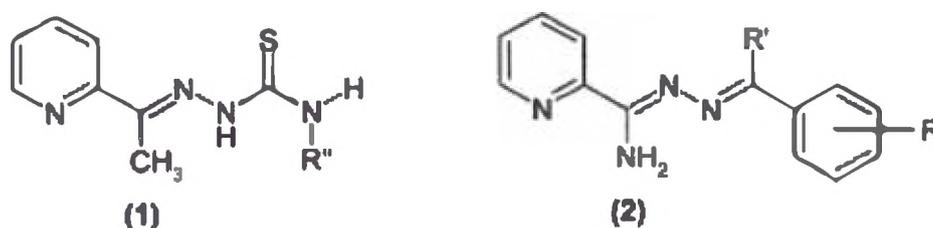
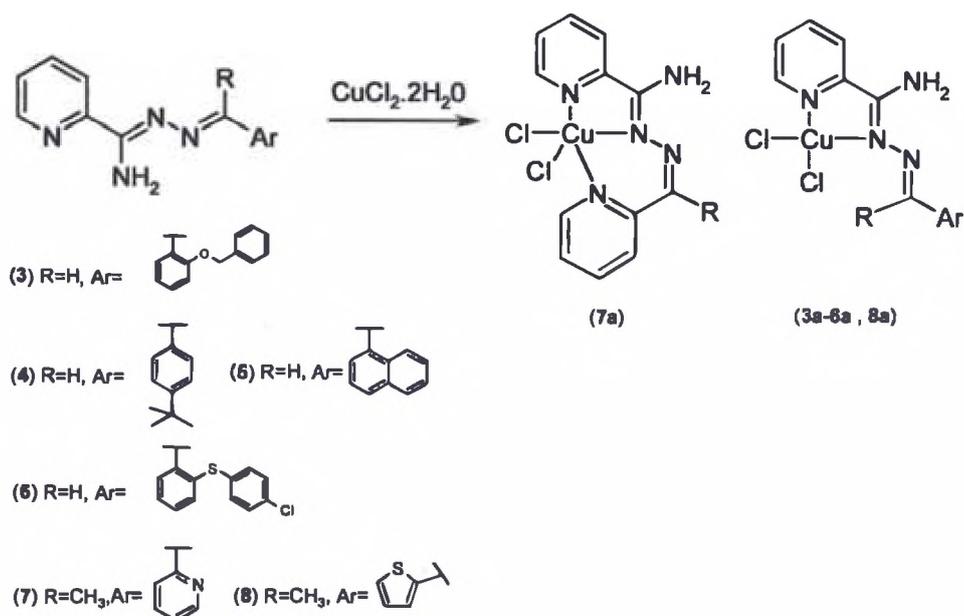


Figura 4.6. Estructuras de los heterociclos tiosemicarbazonas (1) y Carboxamidrazonas (2).<sup>94</sup>

Los complejos de cobre<sup>96,97</sup> fueron sintetizados de acuerdo al esquema 1. Típicamente, el ligando piridina-2-carboxamidrazona y la sal de cloruro de cobre dihidratada se mezclan en una relación molar de 1 a 1 en etanol y bajo reflujo durante 1 hora. Finalizada la reacción Los cristales obtenidos se filtran y secan a vacío. Los cristales marrones que se obtuvieron del complejo 8a fueron sometidos a recristalización y difracción de rayos X para su estudio cristalográfico. Los datos obtenidos de longitudes y ángulos de enlace se muestran en la tabla 1.



**Esquema 1.** Complejos de cobre (II) con ligando piridina-2-carboxamidrazona (3a- 8a) y ligandos correspondientes (3-8).<sup>94</sup>

La estructura molecular del compuesto 8a (figura 4.7) corresponde a un complejo mononuclear con el ligando 8 actuando de forma bidentada a través de dos átomos de Nitrógeno (N(1) y N(3)) formando un anillo quelato de cinco miembros. Este anillo quelato es formado por una rotación de 180° del grupo piridilo alrededor del enlace C(5)-C(6). La esfera de coordinación alrededor del cobre (1) es completada por dos ligandos cloruros y presenta una geometría plana cuadrada altamente distorsionada.

**Tabla 1.** Ángulos y distancias de enlace del complejo 8a

Ángulos de enlace (°)				Distancias de enlace (Å)	
N(1)-Cu(1)-N(3)	81.2(2)	Cl(1)-Cu(1)-Cl(2)	98.05(7)	Cu(1)- N(1)	1.986(6)
N(1)-Cu(1)-Cl(2)	150.76(16)	N(1)-Cu(1)-S(1 <sup>a</sup> )	76.68(16)	Cu(1)-N(3)	1.979(6)
N(3)-Cu(1)-Cl(2)	100.42(16)	N(3)-Cu(1)-S(1 <sup>a</sup> )	84.99(16)	Cu(1)-Cl(1)	2.2369(19)
N(1)-Cu(1)-Cl(1)	96.46(17)	Cl(1)-Cu(1)-S(1 <sup>a</sup> )	128.59(7)	Cu(1)-Cl(2)	2.2109(18)
N(3)-Cu(1)-Cl(1)	145.17(17)	Cl(2)-Cu(1)-S(1 <sup>a</sup> )	74.41(6)	Cu(1)-S(1 <sup>a</sup> )	3.510(2)

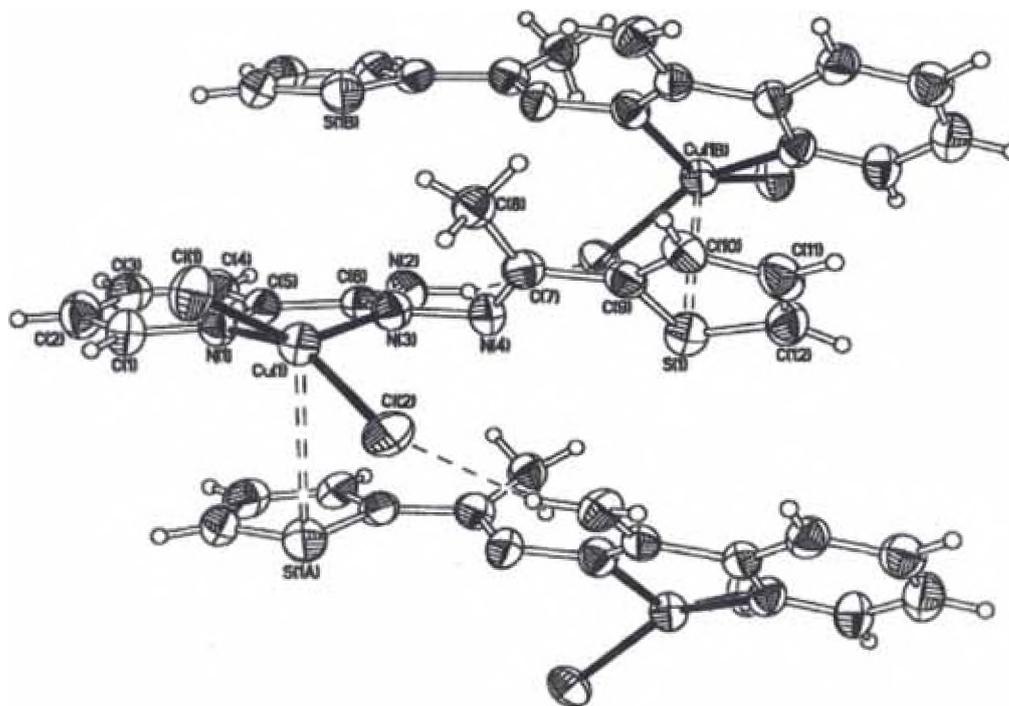


Figura 4.7. Estructura molecular del complejo  $[Cu(8)Cl_2]$  **8a**, con interacciones intermoleculares Cu-S. **8**: corresponde al ligando; **8a** es el complejo.<sup>94</sup>

Aunque las distancias Cu-N son similares, como también lo son las distancias Cu-Cl, el Cl(1) está desplazado una distancia de 1.184(6) Å por encima del plano formado por los átomos NCCNCu y el Cl(2) desplazado 1.136(6) Å por debajo del plano en mención. El ángulo diedro entre este plano y los planos que abarcan el  $CuCl_2$  es de 43.74(12)°. La fuerza impulsadora para esta distorsión parece estar en los efectos estéricos ejercidos por el voluminoso grupo metil en C(8), el cual es desplazado fuera del plano de la amidrazona lejos del cloruro Cl(2). Un contacto intermolecular débil (3.510(2) Å) es observado entre el Cu (1) y los átomos de S(1) de la molécula adyacente, resultando en un apilamiento de moléculas en la estructura cristalina (figura 4.7). Este apilamiento es reforzado por enlaces de hidrógeno entre el grupo amino, N(2), y los ligandos cloruros de la molécula del complejo adyacente. Los ligandos (3-8) presentan fuertes bandas de absorción alrededor de 3300-3500  $cm^{-1}$  debido al enlace de hidrógeno intramolecular del grupo  $NH_2$  mientras que el grupo imino (C=N) bandas alrededor de 1630-1590  $cm^{-1}$ . Las bandas  $NH_2$  correspondientes al complejo de cobre son desplazadas a frecuencias más bajas debido a la pérdida del

hidrógeno intramolecular (tabla2), mientras que las frecuencias del grupo imino C=N son desplazadas a mayores.<sup>98</sup>

Tabla 2. Datos analíticos para los complejos (3a-8a)

Complejo	IR (cm <sup>-1</sup> )		UV-Vis (nm) <sup>a</sup>	Análisis elemental <sup>b</sup>			E <sub>1/2</sub> (V)
	$\nu(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	_____	%C	%H	%M	
3a	3388, 3224	1628, 1697	833, 625	51.61 (51.71)	3.68 (3.87)	13.48 (13.57)	-0.05
4a	3416, 3316	1633, 1601	830	49.19 (49.27)	4.11 (4.83)	15.18 (15.21)	+0.10
5a	3400, 3276	1626, 1616	842	50.01 (49.23)	3.41 (3.43)	15.44 (15.44)	+0.47
6a	3369, 3270	1635, 1597	818	45.46 (44.60)	3.00 (3.47)	12.82 (12.60)	+0.19
7a	3342, 3274	1653, 1560	663	40.83 (41.73)	3.36 (3.47)	16.42 (16.99)	+0.26
8a	3482, 3352	1660, 1566	727	38.60 (38.01)	3.08 (3.16)	16.71 (16.77)	+0.23

a: En solvente DMF,

b: Los valores en paréntesis son los valores calculados.

Los resultados de los espectros de los complejos en solvente DMF mostraron amplias bandas de absorción d-d alrededor de 700-800 nm característico de un complejo octaédrico distorsionado.<sup>99</sup> La amplitud de estas bandas puede implicar que el solvente forma parte de la esfera de coordinación.<sup>100</sup>

### 2.1.2. Actividad antimalarica de los complejos y ligandos<sup>94</sup>

La actividad antimalarica de todos los compuestos fueron probados contra cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum* y los valores de ED<sub>50</sub> (dosis efectiva en la cual es observado el 50% de inhibición del parásito) son mostrados en la tabla 3. Los resultados de estos valores de dosis efectivas en los ligandos revelan que el compuesto 7 es el más activo de todos los ligandos con un valor de ED<sub>50</sub> de 0.9 µg/ml. Una posible explicación es por la estrecha analogía que tiene con el heterociclo tiosemicarbazona y que posee actividad antimalarica. La incorporación del heterociclo de azufre (como en 8) o la cadena lateral del orto-tioeter (como en 6) sobre la amidrazona parece tener muy poca influencia en la actividad antimalarica. De ello puede deducirse que la presencia del 2-piridil-etilideno puede ser el motivo estructural más importante de la actividad antimalarica de las carboxamidrazonas.

Las actividades antimaláricas de los complejos de cobre se encuentran en el rango de 0.13-1.48  $\mu\text{g/ml}$  (excepto para el complejo 7a con un valor de 9.40  $\mu\text{g/ml}$ ) indicando claramente la mejora en la potencia por la conjugación del cobre. La más alta actividad antimalarica fue obtenida por el complejo 8a el cual exhibe el valor más bajo ( $\text{ED}_{50} = 0.13 \mu\text{g/ml}$ ). Se observa que la geometría plana cuadrada es la característica estructural preferida en estos compuestos. El otro factor que incrementa la actividad de estos complejos son sus potenciales de reducción positivos los cuales facilitan su reducción a Cu(I) que es perjudicial para el crecimiento del parásito.

Tabla 3. Actividad antimalárica de ligandos (3-8) y complejos (3a-8a) contra cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum*

Compuestos	$\text{ED}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
3(R =H, Ar = 2-OCH <sub>2</sub> Ph-Ph)	3.50
4(R=H, Ar- 4-t-Bu-Ph)	2.70
5(R= H, Ar- Naftil)	3.50
6(R=H, Ar- 4-Cl <sub>2</sub> S-Ph-Ph)	7.30
7(R=Me, Ar- 2-acetilpiridina)	0.90
8(R=Me, Ar- 2-acetiltiofeno)	>30
[Cu(3)Cl <sub>2</sub> ] 3a	1.25
[Cu(4)Cl <sub>2</sub> ] 4a	0.44
[Cu(5)Cl <sub>2</sub> ] 5a	1.48
[Cu(6)Cl <sub>2</sub> ] 6a	1.09
[Cu(7)Cl <sub>2</sub> ] 7a	9.40
[Cu(8)Cl <sub>2</sub> ] 8a	0.13
Cloroquina	0.01

En resumen los complejos de cobre con ligando carboxamidrazona presentan gran actividad antimalarica contra cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum* probablemente como un resultado de sus geometrías planares, aumento de su liposolubilidad y su fácil reducción a especies de Cobre (I).

## 2.2. Complejo de Galio: Complejo antimalárico de Galio(III) con actividad selectiva contra *plasmodium falciparum* resistente a la Cloroquina<sup>101</sup>

Sharma, V. y colaboradores<sup>101</sup> reportan la caracterización química, estructura cristalina y la demostración directa de la inhibición de la polimerización del hemo libre por el complejo  $[[1,12\text{-bis-(2-hidroxi-3-metoxibenzil)-1,5,8,12-tetraazadodecano}]\text{gallium(III)}] \{[\text{Ga(madd)}]^{+1}\}$ . El galio pertenece al grupo 13 del sistema periódico de los elementos y presenta propiedades generales y características de coordinación muy similares a las de sus congéneres Al(III) e In(III). Pero, adicionalmente, tiene también fuertes similitudes con el Fe(III). Por esta razón se elige el Galio (III) como modelo del Fe(III) ya que ambos poseen similares propiedades. Así, el radio iónico del Ga(III) en coordinación octaédrica es de 0.76 Å y resulta comparable al del Fe(III) de alto espín en igual coordinación (0.785 Å). Por otra parte, ambos cationes se comportan como ácidos duros, mostrando fuerte afinidad por ligandos duros o intermedios y, en particular a átomos donores de oxígeno o nitrógeno. Por estas razones es esperable que el Ga(III) siga caminos metabólicos similares a los bien conocidos para el hierro. Sin embargo, hay una diferencia fundamental entre ambos y que tal vez sea relevante para la actividad biológica del galio. Así, el Ga(III) posee una estructura electrónica externa estable ( $3d^{10}$ ) resultante de la pérdida de dos electrones 4s y un electrón 4p, de manera que el Ga(III) debe ser considerado como un catión inactivo, desde el punto de vista redox en condiciones fisiológicas, lo que inhibe su participación en proteínas involucradas en el metabolismo del oxígeno y en procesos de óxido reducción, a diferencia del Fe(III) que puede ser fácilmente reducido a Fe(II).

### 2.2.1. Caracterización del complejo de Ga(III)

Para el análisis el ligando requerido amino fenol, H<sub>2</sub>madd, fue obtenido por medio de la reducción del producto de condensación de cantidades estequiométricas de bis(*N,N'* aminopropil) etilenediamina y 3-metoxisalicialdehído.<sup>102,103</sup> El complejo

[Ga(madd)]<sup>+1</sup> (figura 4.8) fue obtenido disolviendo el ligando H<sub>2</sub>madd en metanol con la sal hidratada de perclorato de galio(III). El espectro <sup>1</sup>H RMN del complejo en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO mostró tener señales de sobresolapamiento por el eje hidrocarbonado y un conjunto de señales por los protones aromáticos que concuerdan con ambientes aromáticos químicamente equivalentes. El protón desacoplado del espectro <sup>13</sup>C RMN registro bajo condiciones similares 12 resonancias de un máximo de 24 indicando permanencia de un alto grado de simetría alrededor de la fracción etilénica en la coordinación del metal-ligando.

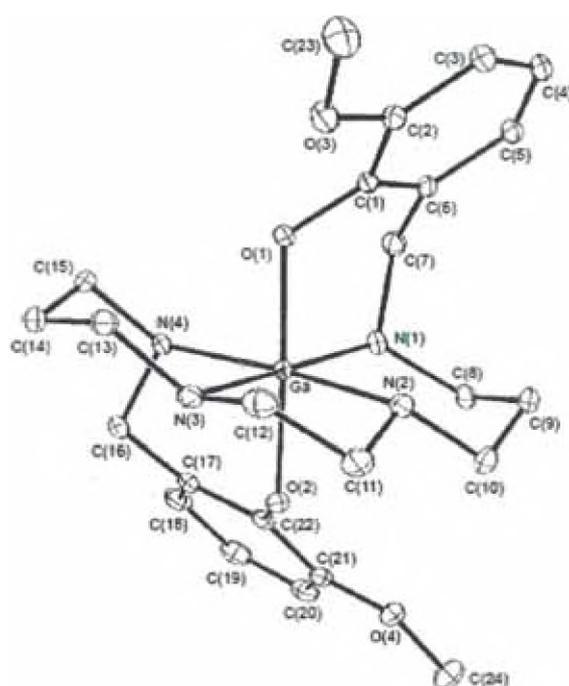


Figura 4.8. Estructura del complejo catiónico [Ga(madd)]<sup>+1</sup> en [Ga(madd)]ClO<sub>4</sub>.<sup>101</sup>

El Ga(III) está coordinado por 6 átomos en un ambiente de coordinación del tipo N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: involucra dos átomos de oxígenos del fenolato y cuatro átomos de nitrógeno amínicos proporcionando una estructura octaédrica. Además, la estructura revela la formación de cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco miembros en el metal coordinado. El ángulo más pequeño N(2)-Ga-N(3), se atribuye a las restricciones del anillo quelato de cinco miembros formado por los átomos de N(2), C(11), C(12), N(3) y Ga. Los ángulos trans (tabla 4) que se forman por N(1)-Ga-N(3), N(2)-Ga-N(4) y

O(1)–Ga–O(2) tienen un promedio de 175.4°, mientras que los ángulos cis que se forman por O–Ga–N promedian 90.0°, lo cual indica que se trata de una geometría octaédrica ligeramente distorsionada. Los ángulos y distancias de enlace de los átomos pertenecientes a la esfera de coordinación son similares a los ya reportados complejos antimaláricos<sup>104,105</sup> de Galio(III) con ligando 5-bromo amino fenol y base de Schiff con ambiente de coordinación N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.

Tabla 4. Ángulos y distancias de enlace del complejo [Ga(madd)]<sup>+1</sup>

Ángulos de enlace (°)		Distancias de enlace (Å)			
N(1)–Ga–N(2)	92.15(11)	O(1)–Ga–N(1)	90.29(10)	Ga–O(1)	1.911(2)
N(2)–Ga–N(3)	83.22(11)	O(1)–Ga–N(4)	88.59(10)	Ga–O(2)	1.950(2)
N(3)–Ga–N(4)	90.62(11)	O(2)–Ga–N(2)	87.87(10)	Ga–N(1)	2.130(3)
N(4)–Ga–N(1)	94.08(10)	O(2)–Ga–N(3)	90.87(10)	Ga–N(2)	2.103(3)
O(1)–Ga–O(2)	177.99(8)	C(1)–O(1)–Ga	122.4(2)	Ga–N(3)	2.109(3)
N(1)–Ga–N(3)	174.87(10)	C(22)–O(2)–Ga	119.1(2)	Ga–N(4)	2.105(3)
N(2)–Ga–N(4)	173.43(10)				

### 2.2.2. Actividad biológica del complejo

La cloroquina se concentra dentro de la vacuola digestiva del parásito donde la hemoglobina es digerida para la obtención de aminoácidos y produciendo hemo libre (ferriprotoporfirina IX), el grupo hemo es tóxico para el parásito por lo cual lo polimeriza formándose un pigmento negro insoluble llamado hemozoina o β-hematina. La CQ inhibe la polimerización, permitiendo que el hemo libre, que es tóxico para el parásito, se acumule en la vacuola digestiva. La resistencia que ofrece el parásito al fármaco (CQ) parece estar mediada por cierta habilidad adquirida en reducir la captación de la CQ o expulsarla fuera de la vacuola digestiva.<sup>106</sup> Como la formación de la hemozoina es única en el organismo de la malaria, la inhibición de polimerización del hemo libre es el principal blanco para los metalofarmacos en desarrollo. Se encontró que el complejo [Ga(madd)]<sup>+1</sup> es único en poseer una actividad antimalarica selectiva contra clones D2d del *Plasmodium falciparum* resistentes a la CQ. El valor de IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria del 50%) en cepas HB3 sensibles a la CQ es mucho mayor a

20  $\mu\text{M}$ , mientras que para el complejo estudiado el valor fue de 0.5 y 0.6  $\mu\text{M}$  en cepas FCR-3 e Indo-1 resistentes a la CQ respectivamente. Sin embargo, la actividad del complejo para inhibir directamente la polimerización del hemo libre *in vitro* fue similar a otros antimaláricos en esta clase (figura 4.9). Por ejemplo, para simular el ambiente de la vacuola digestiva del parásito,<sup>107</sup> el grupo hemo fue incubado junto con hemozoina preformada nucleadas bajo condiciones ácidas sin y con la presencia del complejo. Se encontró que el complejo es un potente inhibidor de la polimerización del grupo hemo ( $\text{IC}_{50} = 1.2 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ), demostrando que es de dos a tres veces más potente que la cloroquina bajo las mismas condiciones.

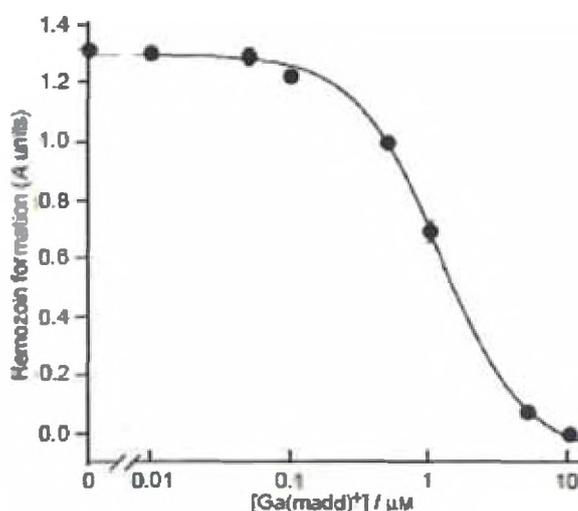


Figura 4.9. Inhibición de la polimerización del hemo por el complejo  $[\text{Ga}(\text{madd})]^+1$ .<sup>101</sup>

La evaluación del complejo también reveló que los ángulos de enlace Ga–O(1)–C(1) y Ga–O(2)–C(22) cuyo valor en promedio es  $120.8^\circ$ , es  $2.5^\circ$  más agudo que el ángulo reportado para el complejo con ligando 5-bromo amino fenol lo que sugiere que la únicas propiedades que determina la actividad del complejo probablemente reside en la orientación espacial de las regiones periféricas a la fracción aromática, incluyendo el grupo metoxi, más que el núcleo metálico central.

### 2.3. Complejo de Oro: Mecanismo de acción antimalárica del complejo metálico $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$

Maribel Navarro y colaboradores<sup>108</sup> reportan el posible mecanismo de acción antimalárica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  la cual es activa *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* resistentes a la CQ e *in vivo* contra el *P. berghei*. Dicho estudio ha sido investigado en relación a la formación de la hemozoina y ADN como posibles blancos. El complejo en mención interactúa con el grupo hemo e inhibe la formación de la  $\beta$ -hematina tanto en fase acuosa como cerca de las interfases agua/n-octanol en pH ~5 hasta un rango mayor que la cloroquina difosfato (CQDP) u otros metalofarmacos conocidos; la alta actividad de inhibición está relacionada probablemente al alto carácter lipofílico observado en el complejo a través de las medidas de los coeficientes de partición a bajos valores de pH, con respecto a al CQDP. Las interacciones del complejo metálico de oro con el ADN fueron exploradas usando titulaciones espectrofotométricas y fluorimétricas, dicroísmo circular, viscosidad, estudios de puntos de fusión, electroforesis y pruebas de interacciones covalentes. Los resultados de estos estudios indican que el complejo interactúa con el ADN predominantemente por intercalación y asociación electrostática de la fracción planar de la CQ, similarmente a la CQDP libre. El mecanismo más probable para el complejo metálico es por tanto la inhibición de la acumulación del grupo hemo; las altas actividades observadas en contra de la resistencia de los parásitos son probablemente debido a la modificación estructural de la CQ introducida por la presencia del fragmento oro-trifenilfosfina, junto con el incremento del carácter lipofílico.

#### 2.3.1. Carácter lipofílico del complejo metálico e inhibición de la $\beta$ -hematina

##### 2.3.1.1. Interacción con la hematina

La constante de asociación (K) del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  ( figura 4.10) con la ferriprotoporfirina IX [ Fe(III)FPIX] es obtenida a partir del procedimiento descrito

por Egan y colaboradores.<sup>109</sup> Este procedimiento es como sigue: Una solución de Hemina fue preparada disolviendo 3.5 mg de la misma en 15 mL de DMSO (solución madre). Soluciones acuosas-DMSO (40%v/v) de Fe(III)FPIX se prepararon diariamente mezclando 140  $\mu$ L de solución madre de Hemina con 4 mL de DMSO y 1 mL de tampón Tris (0.2 M, pH 7.5) completando todo a 10 mL con agua destilada. La concentración de la Fe(III)FPIX en estas soluciones fue de 4  $\mu$ M y las lecturas de absorbancias fueron hechas a una longitud de onda de 402 nm. Los datos obtenidos fueron llevados a la ecuación  $A=(A_0+A_{\infty}K[C])/(1+K[C])$  para un modelo de acomplejamiento 1 : 1 usando un ajuste de mínimos cuadrados no lineales, con omisión de los primeros puntos con muy baja relación fármaco a hematina, donde el ajuste es deficiente.  $A_0$  es la absorbancia de la Hemina antes de la adición del complejo metálico o CQDP,  $A_{\infty}$  es la absorbancia para el aducto fármaco-hemina a saturación, A es la absorbancia en cada punto de la titulación y K es la constante de asociación condicional.

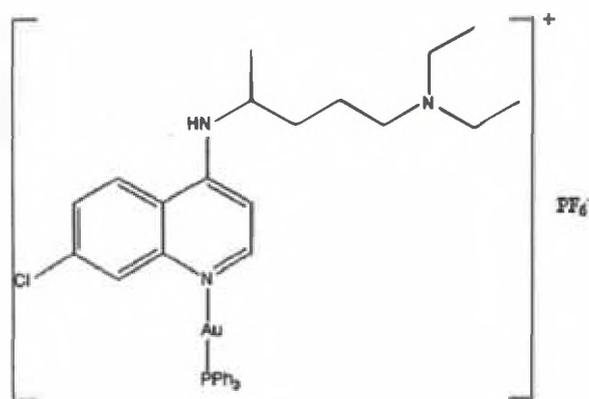


Figura 4.10. Estructura del complejo  $[Au(CQ)(PPh_3)]PF_6$ .<sup>108</sup>

La interacción del complejo  $[Au(CQ)(PPh_3)]PF_6$  con la Fe(III)FPIX fue estudiada por titulación espectrofotométrica a la longitud de 402 nm tal como se ve plasmada en la figura 4.11. Cuando la concentración del complejo fue incrementada a saturación, el hipocromismo alcanzó un 70%. Siguiendo el procedimiento descrito y el ajuste de datos para un modelo de asociación 1:1, se midieron los valores de  $\log K =$

5.84±0.01 para la CQDP (a pH 7.4) los cuales concuerdan con los reportados por Sánchez-Delgado.<sup>110</sup> Los datos obtenidos para el complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> también fueron ajustados de manera similar obteniéndose el valor de log K= 7.69±0.01 a pH 7.4. Estos resultados de los logaritmos indican que el complejo de Au-CQ interactúa con la hematina con mayor fuerza que la CQDP bajo las mismas condiciones.

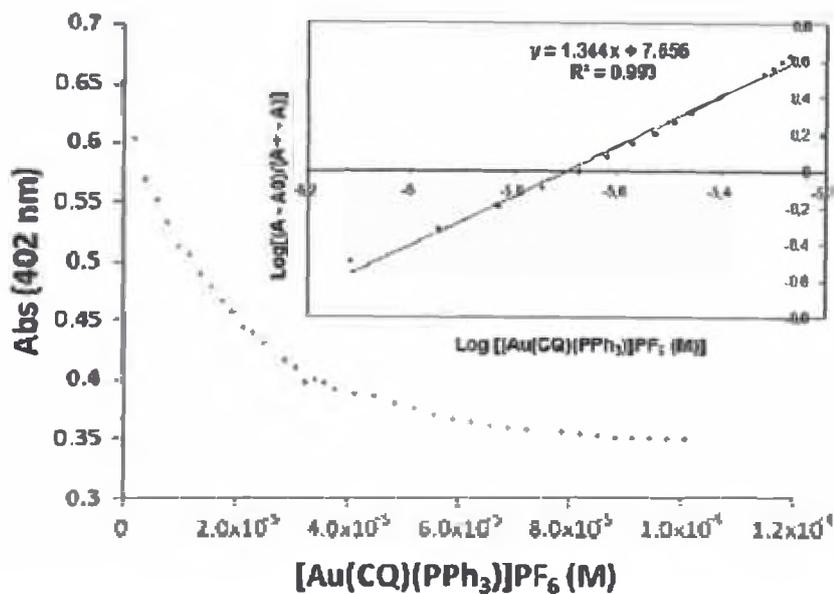


Figura 4.11. Variación en absorbancia de la Fe(III)FPIX a 402 nm como una función de la concentración del complejo. Condiciones: 40% DMSO, pH 7.5, tampón HEPES 0.02 M, [complejo]= 26.98x10<sup>-6</sup> M a 25°C. Adjunto: log [(A-A<sub>0</sub>) / (A-A)] vs log { [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub>(M) } .<sup>108</sup>

### 2.3.1.2. Inhibición de la formación de la β-hematina

La transformación de hemina a β-hematina en soluciones acidas de acetato fue estudiada usando espectroscopia infraroja tomando el método desarrollado por Egan.<sup>111</sup> La concentración inhibitoria al 50% IC<sub>50</sub> de la formación de β-hematina en solución de tampón fue realizado de acuerdo al método descrito por Domínguez y col.<sup>112</sup> Una solución de hemina (50 μL, 4 mM), disuelto en DMSO, fue distribuida en 96 microplacas. El complejo fue disuelto en DMSO y añadido por triplicado a las microplacas (50 μL cada una) y llevados a una concentración final de 0-20 mM. La formación de la hemozoina fue iniciada por adición de tampón acetato (100 μL, 0.2 M,

pH 4.4). Las microplacas fueron incubadas a 37°C por 48 horas para finalizar la reacción y centrifugadas a 4000 rpm x 15 min. Después de desechar el sobrenadante, las microplacas fueron lavadas dos veces con DMSO (200 µL) y disueltas en NaOH (200 µL, 0.2 N). Las soluciones fueron adicionalmente diluidas en la relación 1:2 con NaOH (0.1N) y la absorbancia fue tomada a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición de hemozoina.

La formación de β-hematina en la interfase agua / octanol fue realizada de acuerdo al método propuesto por Egan y colaboradores<sup>113</sup> y modificado por Martínez y colaboradores.<sup>114</sup> La hemina fue disuelta en una solución de NaOH 0.1 M para generar hematina y la acetona fue añadida hasta que la relación de acetona: agua sea 4:6; la solución final contenía 15 mg de Hematina/mL. Una muestra de esta solución (200 µL) fue cuidadosamente introducida en un vial cilíndrico de diámetro interno de 2.5 cm cerca de la interfase entre n-octanol (2 mL) y la solución acuosa de tampón acetato (5 mL, 8 M, pH 4.9). La mezcla fue incubada a 37°C por 2 horas y al final de este tiempo el producto (β-hematina) fue aislado por centrifugación. Las microplacas fueron lavadas dos veces con DMSO (2 mL), centrifugados otra vez por 20 minutos, lavados con 2 mL de etanol y finalmente disueltos en 25 mL de NaOH 0.1 M para proceder a la cuantificación espectroscópica. Para las medidas de la actividad de inhibición de acumulación del grupo hemo, una cantidad apropiada del fármaco fue disuelto en DMSO (obteniéndose una concentración de 23 mM); luego del cual se agita por 30 minutos para equilibrar el fármaco entre las 2 fases, la solución de hematina fue añadida cerca de la interfase y el procedimiento seguido fue como el que se describe en el párrafo anterior.

Teniendo en cuenta los resultados de la interacción con la hematina, el efecto del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  sobre la inhibición de la formación de la β-hematina fue determinada cualitativamente usando espectroscopia infraroja por inspección de las bandas características de la β-hematina a 1660 y 1207  $\text{cm}^{-1}$ . La figura 4.12a muestra los espectros IR de la β-hematina obtenida en ausencia del complejo

metálico. La ausencia de las bandas a 1660 y 1210  $\text{cm}^{-1}$  fue evidente después de la adición de 3 equivalentes del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  (figura 4.12b), indicando que la  $\beta$ -hematina no fue producida, lo cual es similar a resultados obtenidos para CQ y otros agentes antimaláricos.<sup>111</sup>

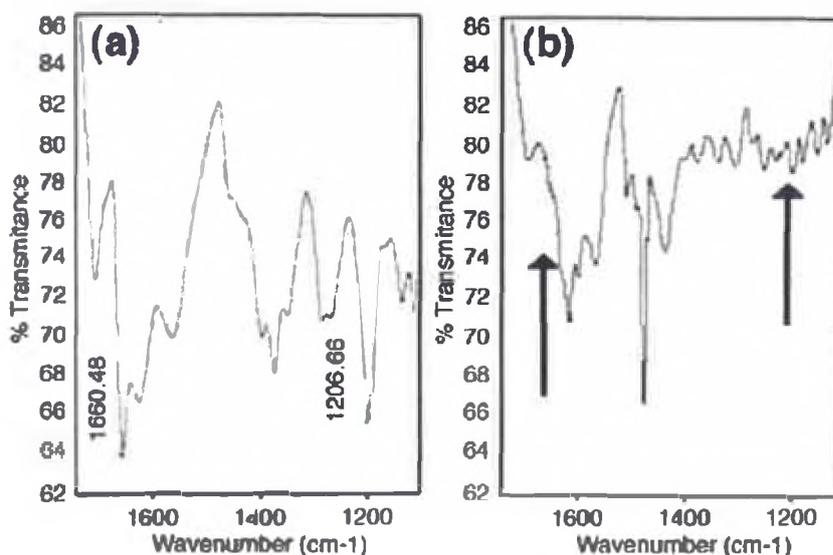


Figura 4.12. Espectro infrarrojo de (a)  $\beta$ -hematina obtenida de la hemina, (b) producto de la acumulación del grupo hemo en presencia de 3 eq de  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ . En ambos casos los espectros IR obtenidos después de una incubación a 60°C, a pH 4.5. Las flechas del espectro IR en b, indican el lugar donde aparecen las bandas de  $\beta$ -hematina.<sup>108</sup>

Con el fin de obtener resultados cuantitativos de la actividad del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  para inhibir la acumulación del grupo hemo (HAIA), Navarro y colaboradores realizaron una segunda serie de experimentos en tampón acetato y en la interfase n-octanol / tampón acuoso. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en la CQDP (tabla 5). La concentración inhibitoria del 50%  $\text{IC}_{50}$  para el complejo fue medido en tampón acetato a pH 5 el cual fue un orden de magnitud más alto que el obtenido por CQDP, en contradicción con la alta actividad antimalarica *in vitro* observada para el complejo metálico. Cuando el valor de  $\text{IC}_{50}$  fue medido usando el método (HAIA) en la interfase n-octanol / tampón, como es reportado por las referencias 116 y 121, el complejo fue aproximadamente 5 veces mejor inhibidor que la CQDP, la cual coincide con los resultados de actividad antimalarica *in vitro* para el

complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> contra cepas FCB1 y FCB2 de *P. falciparum* resistentes a al CQ (tabla 5).<sup>115</sup> Los resultados apoyan la idea de que los valores obtenidos de inhibición de acumulación del grupo hemo en la interfase n-octanol / tampón acuoso son mejores vaticinadores de la actividad biológica *in vitro* que el método clásico en tampón ácido. Un resumen de los valores de interacción del grupo hemo junto con la actividad antimalarica reportada previamente se muestra en la tabla 5. La alta actividad inhibitoria de acumulación del grupo hemo en la interfase y la alta actividad antimalarica del complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub>, con respecto a la CQ, podría estar relacionado al carácter lipofílico del complejo. En general se acepta que la resistencia a la CQ se asocia a una mutación específica en el gen *pfcr*t y que los fármacos altamente lipofílicos son más capaces de superar la resistencia.<sup>114,115,116</sup>

Tabla 5. Inhibición de la formación de la β-hematina, coeficiente de partición y actividad antimalarica del complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> y CQDP

Complejos	Inhibición de la formación de la β-hematina	HA <sub>I50</sub> (mM) en tampón <sup>a</sup>	HA <sub>I50</sub> (mM) en interfase	Log K <sup>c</sup>	Efecto sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de cepas de <i>P. falciparum</i> (IC <sub>50</sub> nM) <sup>d</sup>	
					FCB1	FCB2
[Au(CQ)(PPh <sub>3</sub> )]PF <sub>6</sub>	+	3.42±1.89(0.1)	0.64±0.02(5)	7.69±0.01	5.1	23
CQDP	+	0.35±0.09(1)	3.38±0.13(1)	5.84±0.01	47	110

HA<sub>I50</sub> es la relación fármaco a hemina requerida para inhibir el 50% de la acumulación del grupo hemo

a: los valores en paréntesis son la actividad relativa con respecto a CQDP

b: después de 24 horas de reacción, c: después de 2 horas de reacción, d: a 25°C

### 2.3.1.3. Determinación del coeficiente de distribución

Los coeficientes de distribución agua-octanol fueron determinados según el método indicado en la referencias.<sup>117,118</sup> Se prepararon mezclas de agua saturado en octanol y octanol saturado en agua, se sometieron a fuerte agitación luego del cual se dejaron en reposo por una semana hasta que las fases se separen. Se preparó una curva de calibración UV-Visible para el complejo metálico en octanol saturado en agua en el rango de 2-50 μM. Una mezcla de 10 mL de n-octanol y 10 mL de agua (cada una saturada en la otra) fue sometida a agitación por 2 horas a 37°C, después de

agregar la cantidad correcta de muestra a ser analizada. El pH fue mantenido en 5.1 y 6.9 usando para ello los tampones MES y Tris respectivamente. Una vez alcanzado el equilibrio las fases acuosas y orgánicas fueron separadas y centrifugadas. Finalmente, la concentración del fármaco en cada una de las fases fue mediada espectrofotométricamente para determinar los valores de distribución  $D = \frac{[\text{fármaco}](\text{en octanol})}{[\text{fármaco}](\text{en agua})}$ .

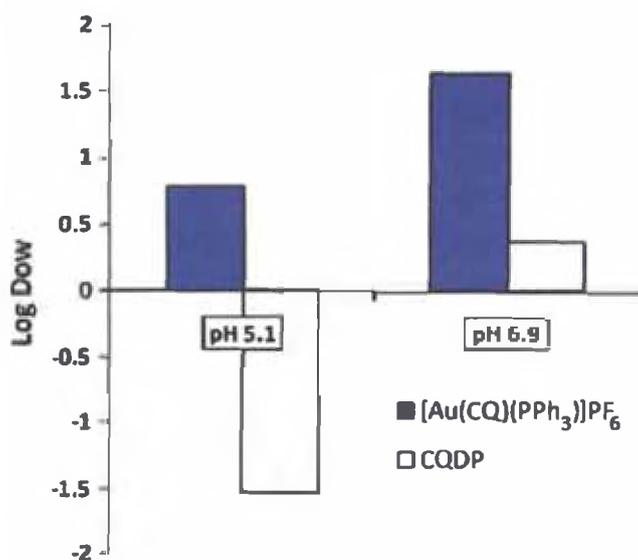


Figura 4.13. Coeficientes de partición del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  y CQDP en una mezcla 1:1 n-octanol-agua.<sup>108</sup>

La figura 4.13 muestra el resultado de los coeficientes de distribución para el complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  a pH 5.1 y 6.9, las cuales simulan la vacuola digestiva del parásito y las condiciones citosólicas respectivamente. A pH 5.1 el complejo es mucho más lipofílico que la CQDP ( el logaritmo de coeficiente de distribución ,Log D, es de 0.79 para el complejo metálico y para la CQDP es -1.37) lo cual puede llevar a una doble implicancia: (1) el mayor carácter lipofílico del complejo favorece su acumulación en la interfase lípido/agua dentro de la vacuola digestiva del parásito, donde se da la formación de hemozoina,<sup>119,120</sup> y (2) el mecanismo de resistencia no podría estar operando eficientemente para el complejo Au-CQ, debido a que la proteína pfCRT mutada no es capaz de reconocer este fármaco. La combinación de la mayor afinidad

por la Fe(III)FPIX, el incremento del carácter lipofílico y una importante modificación estructural de todos los fármacos con respecto a la CQDP provee una mejor explicación del incremento de la actividad antimalarica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ . Esta combinación de efectos estructurales e incremento del carácter lipofílico del fármaco resulta en una mayor acumulación del fármaco en las interfases lípido/agua la cual está de acuerdo con los mecanismos de acción propuestos previamente para los complejos de Rutenio-CQ<sup>121</sup> y ferroquina.<sup>122</sup> Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la presencia de un ion metálico en la estructura de esta molécula puede también llevar a interacciones con el ADN las cuales podrían ser otro importante componente del mecanismo de acción antimalarica para el complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ .

### 2.3.2. Estudios de interacción con el ADN

#### 2.3.2.1. Titulaciones espectroscópicas

Los estudios de absorción fueron llevados a cabo mediante la adición de una solución de calf thymus (CT) ADN a una solución de determinada concentración del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  disuelto en DMSO y registrando los valores de absorbancia del espectro UV-Visible a 330 nm y 343nm tras cada adición de CT ADN. La absorción del ADN fue restada por adición de la misma cantidad de CT ADN al blanco. La afinidad por los sitios de unión fueron obtenidos usando la ecuación de Scatchard  $r/C_f = K(n-1)$  para interacciones ligando-macromolécula con sitios de unión no cooperativas<sup>123,124</sup> donde r es el número de moles del complejo metálico unido a 1 mol de CT ADN ( $C_b/C_{\text{ADN}}$ ), n es el número de sitios de unión equivalentes y k es la afinidad del complejo por esos sitios. Las concentraciones de complejo libre ( $C_f$ ) y unido ( $C_b$ ) fueron calculadas de  $C_f = C(1-\alpha)$  y  $C_b = C - C_f$  respectivamente, donde C es la concentración total de Au. La fracción del complejo unido ( $\alpha$ ) fue calculada de acuerdo a  $\alpha = (A_f - A) / (A_f - A_b)$ , donde  $A_f$  y  $A_b$  son las absorbancias del complejo libre y unido a la longitud de onda seleccionada y A es la absorbancia a un punto dado durante la

valoración.  $K_b$  es obtenido de la pendiente de la gráfica.<sup>125</sup> La gráfica de valoración espectrofotométrica se muestra en la figura 4.14 la cual muestra que los incrementos de ADN añadidos a la solución del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  hasta saturación causaron hipocromismo de 17% a una longitud de onda de 340nm de máxima absorbancia, un desplazamiento hacia el azul de 3 nm y un punto isosbético en 322 nm. Esta observación da evidencia que hay interacción entre el complejo metálico y CT ADN. Además, los valores de constante de unión  $K_b$  del complejo al ADN a 340 nm son  $K_{b1} = (3.79 \pm 0.01) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{b2} = (1.84 \pm 0.89) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , las cuales se encuentran dentro del rango para un compuesto considerado como interaccionantes con el ADN.<sup>126,127</sup>

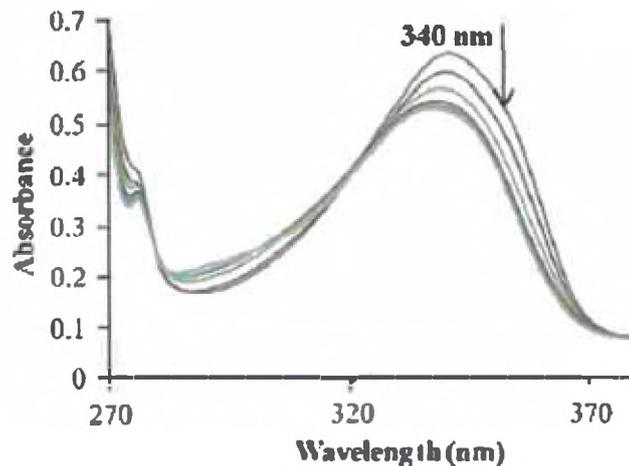


Figura 4.14. Valoración espectrofotométrica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  con CT-ADN,  $[\text{complejo}] = 9.98 \times 10^{-4} \text{ M}$  y  $[\text{ADN}] = 0-50 \text{ Mm}$ .<sup>108</sup>

### 2.3.2.2. Titulación fluorimétrica

Para medir la interacción del complejo con CT ADN por titulación fluorimétrica las longitudes de onda de emisión y excitación para el complejo se fijaron en 343 y 380 nm respectivamente. El complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  fue disuelto en un tampón que contenía 70% de DMSO y 30% de Tris-HCl (Tris-HCl 5 mM y NaCl 50 mM a un pH de 7.4) para obtener una solución de 700  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{L}$  de esta solución patrón fue diluida

con 1980  $\mu\text{L}$  del mismo tampón en una cubeta de cuarzo y titulado con adiciones de 10  $\mu\text{L}$  de una solución de CT ADN 90 Mm (la cual contiene Tris-HCl 5 mM a un pH 7.2 más tampón de NaCl de 50 nM). El espectro de emisión fue monitoreado a 380 nm y 550 nm hasta que la saturación fue alcanzada. La afinidad por los sitios de unión fueron obtenidos usando la ecuación de Scatchard  $r/C_f = K(n-1)$ .

La valoración fluorimétrica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  se observa en la figura 4.15; el complejo presenta luminiscencia a una longitud de onda de 389 nm. Esta banda de emisión decrece en intensidad cuando se incrementa las cantidades de ADN hasta llegar a la saturación. Las constantes de unión obtenidas para el complejo usando la gráfica de Scatchard<sup>125</sup> son  $K_{b1} = (5.27 \pm 1.82) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{b2} = (2.44 \pm 1.69) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , estos valores son consistentes con los calculados por estudios de absorción y similares a los obtenidos para la CQ y complejos<sup>114,121</sup> de Ru-CQ y otros,<sup>128</sup> indicando que el complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  interactúa con el ADN en forma análoga a estos compuestos. Se podría interpretar estos resultados como una posible intercalación por medio de la fracción planar de la cloroquina más una interacción electrostática entre el complejo y los residuos fosfatos en el polímero de ácido nucleico que están cargados negativamente.

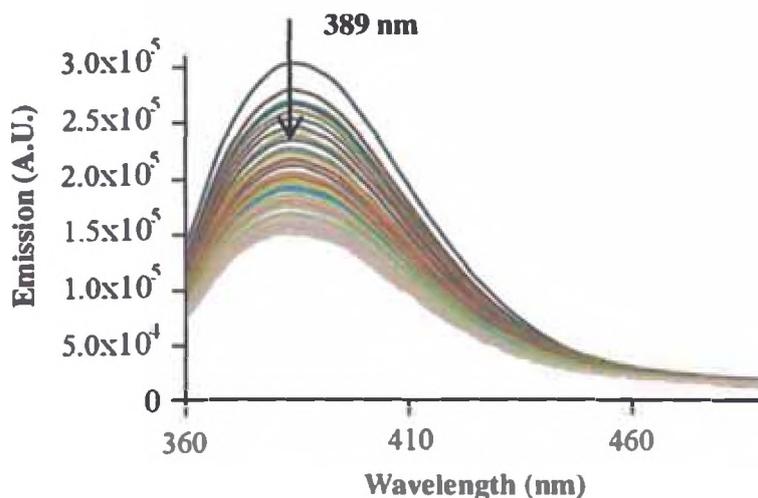


Figura 4.15. Valoración fluorimétrica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  con CT-ADN,  $[\text{complejo}] = 7.32 \times 10^{-4} \text{ M}$  y  $[\text{ADN}] = 0-10 \mu\text{M}$ .<sup>100</sup>

### 2.3.2.3. Medidas de viscosidad

Los experimentos de viscosidad son muy sensibles al cambio en la longitud de la doble hélice del ADN y son considerados uno de los métodos inequívocos para determinar la intercalación o los modos de unión no intercalativos del complejo al ADN.<sup>122</sup> los resultados de las medidas de viscosidad se muestran en la figura 4.16. El incremento de la relación molar [complejo]/[ADN] conlleva a un incremento de la viscosidad, similar a los complejos ya reportados de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ , el cual actúa como el clásico intercalador bromuro de etidio.<sup>129</sup> El incremento en la viscosidad puede ser atribuido al agrandamiento en la separación entre los pares de bases del ADN los cuales son movidos para acomodar entre ellas la molécula intercalante.<sup>130</sup> Por lo tanto esta es una evidencia más de que este complejo podría actuar como intercalador del ADN (tabla 6).

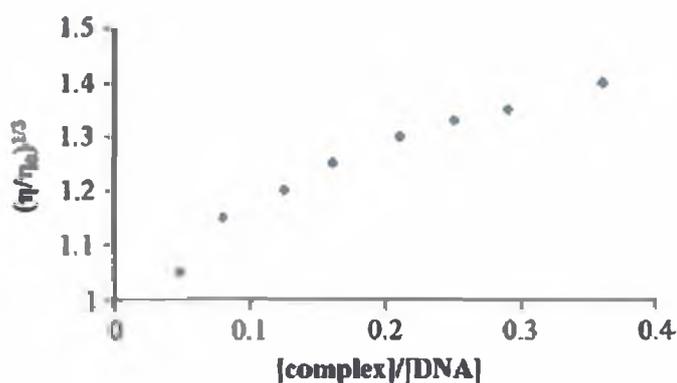


Figura 4.16. Efecto del incremento de la concentración del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  sobre la viscosidad relativa del CT ADN a 25°C.<sup>108</sup>

Tabla 6. Constantes de afinidad para la interacción entre  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  y Calf thymus (CT) ADN

Compuesto	Absorción		Emisión	
	$K_{b1} (\times 10^7 \text{ M}^{-1})^a$	$K_{b1} (\times 10^5 \text{ M}^{-1})^a$	$K_{b1} (\times 10^7 \text{ M}^{-1})^b$	$K_{b1} (\times 10^5 \text{ M}^{-1})^b$
CQDP	1.38±0.56	1.02±0.15	3.24±1.21	3.26±1.01
$[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$	3.79±0.01	1.84±0.89	5.27±1.82	2.44±1.69

a promedio de los valores calculados a 340 nm en el espectro de absorción.

b promedio de los valores calculados a 389 nm en el espectro de fluorescencia.

### 2.3.2.4. Pruebas de electroforesis

Los resultados de la prueba evidencian que no hay modificación de la movilidad electroforética del plásmido pBR322 a diferentes concentraciones molares de [complejo] / [ADN], indicando que el complejo de oro no es capaz de provocar perturbaciones de la estructura terciaria del ADN a las concentraciones en estudio.

### 2.3.2.5. Desnaturalización térmica del ADN

Las curvas de fusión fueron registradas en una solución de tampón Tris-HCl 5 mM (a pH 7.29) la cual contiene una solución de NaCl 50 mM. Las medidas de absorbancia fueron realizadas a una longitud de onda de 260nm con soluciones de CT ADN (3 mL, 70  $\mu$ M) antes y después de la incubación con una solución del fármaco en estudio (35  $\mu$ M) por una hora a temperatura ambiente. La temperatura fue incrementada a razón de 0.5  $^{\circ}$ C/min entre 40 y 55 $^{\circ}$ C y por 3 $^{\circ}$ C/min entre 55 y 70 $^{\circ}$ C y entre 70 y 90 $^{\circ}$ C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 e indican que el complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> causo un incremento en el punto de fusión del ADN por cada incremento adicional del mismo. Estos resultados indican que hay una estabilización de la doble hélice del ADN por la interacción del complejo metálico, probablemente debido a la intercalación de la fracción planar de la CQ entre las bases del ADN. Esto también es apoyado por los resultados obtenidos usando solo la cloroquina y el ADN a una relación molar Ri de 0.5, la cual llevo a un incremento del punto de fusión de 15.7  $^{\circ}$ C

Tabla 7. Datos de desnaturalización térmica del ADN

	Ri 0	Ri 0.05	Ri 0.11	Ri 0.21	Ri 0.31	Ri 0.52
Tm ( $^{\circ}$ C)	65.4	65.6	68.6	78.6	80.9	86.6
( $\Delta$ Tm)	–	+0.2	+3.2	+13.2	+15.5	+21.2

Curvas de desnaturalización térmica de CT ADN en presencia del complejo [Au(CQ)(PPh<sub>3</sub>)]PF<sub>6</sub> a pH 7. En las mismas condiciones el punto de fusión de CT ADN es 65.4  $^{\circ}$ C

### 2.3.2.6. Dicroísmo circular

Una solución patrón del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  de concentración 5 mM fue preparada en DMSO. Una cantidad de la solución patrón del complejo fue añadida a 3 mL de solución de CT ADN de 195  $\mu\text{M}$ , la que a su vez se encuentra en solución tampón de Tris-HCl (pH 7.29), para alcanzar una relación molar de 0, 0.5, y 1.0 de Complejo/ADN. Las muestras fueron incubadas a 37°C por un periodo de 18 horas. Todos los espectros de dicroísmo circular del ADN y del complejo-ADN fueron registrados a 25°C y en el rango de 220-330 nm. Los datos finales son expresados en elipticidad molar (miligrados). La figura 4.17 muestra los resultados del espectro de dicroísmo circular del ADN los cuales indican que el complejo metálico no produce cambio alguno en los espectros, lo que significa que este no es capaz de producir perturbaciones en la estructura terciaria del ADN.

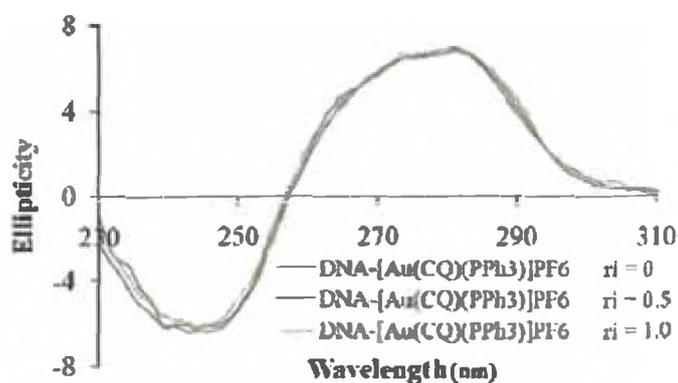


Figura 4.17. Dicroísmo circular del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ . Los valores de  $R_i$  corresponden a la relación Complejo: ADN.<sup>108</sup>

### 2.3.2.7. Interacciones covalentes

En los estudios de unión covalente, 1 mL del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  a una concentración de 0.2 mM fue mezclado con 1 mL de CT ADN 1 mM en tampón Tris-HCl ( Tris HCl 5 mM,  $\text{NaClO}_4$ , pH 7.29) y dejado en incubación por 72 horas. Las muestras fueron transferidas a tubos para su centrifugado. El ADN fue precipitado por

adición de etanol (el doble volumen de la muestra) y NaCl 2M (la décima parte del volumen de la muestra). Los tubos fueron centrifugados y el sobrenadante decantado. El exceso de líquido fue eliminado y el ADN fue resuspendido toda la noche en agua. Este ciclo de precipitación-resuspensión fue repetido tres veces y en la resuspensión final se analizó el Oro por ICP y el ADN por el test de Burton.<sup>131</sup> Los estudios de unión covalente indican que la cantidad de Oro unido al ADN medido como nmol de Au por mg de ADN aislado fue muy baja, alrededor de 10nmol de Au / mg de ADN. Esto indica que no existen uniones covalentes entre ellos.

En resumen el mecanismo de acción antimalarica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  fue estudiado teniendo en cuenta dos posibles blancos, la  $\text{Fe}(\text{III})\text{FPIX}$  y el ADN. De los resultados obtenidos se puede concluir: (i) el complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  interactúa con el grupo hemo con una mayor constante de afinidad que a la de cloroquina difosfato u otros metalofarmacos con actividad antimalarica. Los compuestos derivados de Au-CQ también muestran una mayor habilidad que la CQDP para inhibir la formación de  $\beta$ -hematina particularmente en la interfase agua / n-octanol, lo cual es consistente con el comportamiento observado en los ensayos biológicos contra el *P. falciparum*. Estas propiedades están relacionadas al incremento del carácter lipofílico del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ , el cual probablemente le permite acumularse en las cercanía de las interfases agua-lípido dentro de la vacuola digestiva del parásito, donde se da la acumulación del grupo hemo y le impide ser expulsado por la proteína responsable de la resistencia, lo que es similar a reportes previos por otros metalofarmacos antimaláricos. (ii) las titulaciones espectrofotométricas y fluorimétricas, puntos de fusión del ADN, dicroísmo circular, medidas de viscosidad, electroforesis en gel y uniones covalentes indican que el complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  interactúa con el ADN en forma similar a la CQDP, predominantemente por intercalación y asociación electrostática de la fracción planar de la CQ; estas interacciones no representan componente importante en el mecanismo antimalárico. En resumen, se propone que el mecanismo principal de acción antimalarica del complejo  $[\text{Au}(\text{CQ})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$  contra cepas resistentes de *P.*

*falciparum* es la inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina. Tanto el incremento de actividad y la habilidad de este compuesto para disminuir la resistencia a la cloroquina está relacionada al alto carácter lipofílico de complejo metálico y a la importante modificación estructural de la estructura de la CQ impuesta por la presencia del fragmento que contiene el metal.

## Capítulo 5

### METALOCENOS ANTIMALÁRICOS

La cloroquina (CQ), es el fármaco antimalárico más empleado hasta el presente, debido a su eficiencia, tolerancia, bajo costo y viabilidad. Sin embargo, la resistencia a la misma por parte del parásito se ha propagado a todas las regiones endémicas. Esta resistencia incluye otras drogas como la quinina, mefloquina y halofantrina, lo cual ha limitado la eficiencia de la quimioterapia antimalárica. Una de las estrategias empleadas en la síntesis de nuevos compuestos con actividad antimalárica consistió en asociar una molécula de ferroceno con la cloroquina, surgiendo la ferroquina (FQ), (4, figura 5.2), un derivado que ha demostrado actividad a concentraciones nanomolares contra parásitos de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina.<sup>132</sup> La porción ferrocenil posee gran estabilidad en medio ácido o básico, lo que lo hace un candidato ideal para la síntesis de metalo-drogas.<sup>133</sup> La ferroquina es capaz de superar el problema de resistencia a la CQ y su mecanismo de acción viene siendo centro de atención de varios investigadores. Se cree que la FQ es capaz de inhibir la formación del pigmento malárico (hemozoina) y generar especies reactivas de oxígeno. En este capítulo se hace una revisión de las modificaciones que son realizadas en la estructura de la ferroquina a fin de entender mejor su mecanismo de acción.

#### 1. Ferroceno

Fue descubierto accidentalmente en 1951 y desde ese entonces ha jugado un papel importante en la apertura de una nueva área de la química organometálica. Comparado con otros metalocenos, el ferroceno (1, figura 5.1) ha sido ampliamente usado en el diseño de fármacos usualmente como sustituto de los grupos fenil o alquil. El ferroceno es un compuesto estable, no tóxico, de alto carácter lipofílico

( $\log P_{\text{octanol/agua}} = 3.28$ ) y se espera que su inclusión en una molécula mejore la permeabilidad de la membrana y posiblemente la biodisponibilidad del compuesto final. Exhibe interesantes propiedades de oxi-reducción las cuales se deben a su capacidad de sufrir oxidación reversible con generación de una especie del tipo catión- ion ferrocenio. La formación del ion ferrocenio puede ser entendida con la ayuda de los orbitales moleculares del ferroceno, que también explica la naturaleza diamagnética del ferroceno, ya que todos los electrones de la capa de valencia se encuentran apareados.<sup>134</sup>

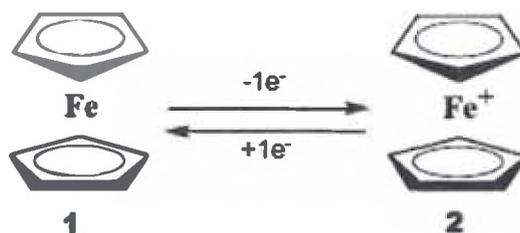


Figura 5.1: ferroceno e ion ferrocenio

El ferroceno (1, figura 5.1) es un compuesto organometálico que obedece a la regla de los 18 electrones, semejante a la regla del octeto. Del total de los 18 electrones disponibles para la coordinación (6 electrones de la capa de valencia del  $\text{Fe}^{2+}$  y 6 electrones de cada ligando ciclopentadienato  $\text{Cp}^-$ ), 12 se encuentran en orbitales enlazantes y los otros 6 en orbitales no enlazantes  $e_{2g}$  y  $a_{1g}$ . Esa configuración es muy importante ya que son los electrones no enlazantes los que determinan el comportamiento redox y muchas propiedades químicas del compuesto. Es del orbital HOMO  $a_{1g}$  que un electrón puede ser fácilmente removido, generando una especie del tipo catión- ion ferrocenio (2, figura 5.1).

## 2. Ferroquina

En 1997, inspirados por los trabajos pioneros de Biot y colaboradores,<sup>135</sup> emergió el candidato 7-cloro-4-[(2-N,N'-dimetilaminometil) ferrocenilmetilamino] quinolina (SR97193), más conocida como ferroquina (FQ). Este compuesto mostró

una impresionante actividad antimalárica mucho más activa que la cloroquina en contra de cepas de *P. falciparum* sensibles y resistentes ( $IC_{50}(CQ) = 24 \text{ nM}$  y  $IC_{50}(FQ) = 11 \text{ nM}$ ). En realidad los valores de  $IC_{50}$  para la ferroquina varían de 1,8 a 13,4nM dependiendo del origen del tipo de cepa de *P. falciparum*. Diversos estudios mostraron que la actividad de la FQ es independiente de las mutaciones de los genes del *Plasmodium falciparum* lo que no ocurre con la cloroquina.<sup>136</sup> Tal factor sugiere que este fármaco, presenta diferentes modos de acción.<sup>137</sup> Como puede ser visto en la figura 5.2, la FQ se da por la sustitución de dos grupos metilenos de la cadena lateral de la CQ por una unidad del grupo ferrocenil. Debe de resaltarse que el ferroceno, propiamente dicho, no presenta actividad antimalarica.<sup>138</sup>

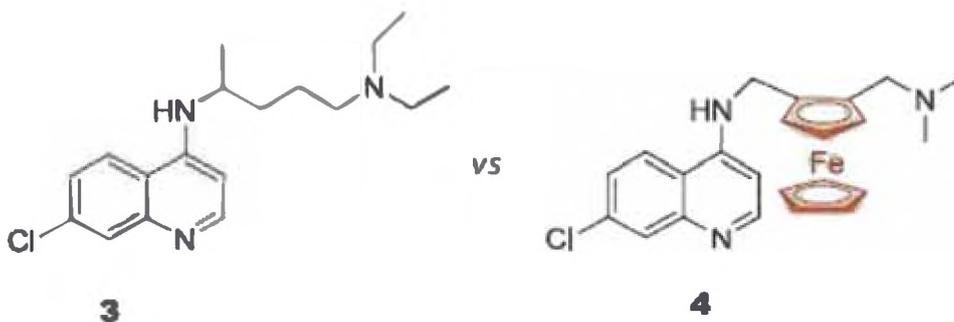


Figura 5.2. Estructura química de la cloroquina (3, CQ) y ferroquina (4, FQ).<sup>137</sup>

La síntesis de FQ es relativamente simple y económica el cual se torna un compuesto atractivo para fomentar la investigación en países en desarrollo (figura 5.3).<sup>139</sup> La ferroquina está siendo investigada por el grupo farmacéutico Sanofi-aventis y en el año 2007 se inició la fase II de ensayos clínicos en combinación con el artesunato de sodio y amodiaquina, según lo recomendado por la OMS.<sup>140</sup>

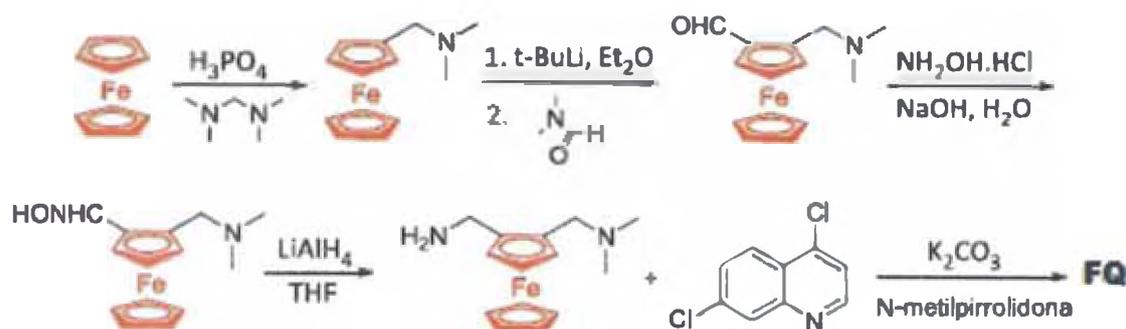


Figura 5.3. Síntesis de la ferroquina (FQ).<sup>139</sup>

## 2.1. Propuestas de mecanismos de acción de la ferroquina

Diversos autores vienen tratando de elucidar el mecanismo de acción de la FQ y comparar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas con las de la CQ. A continuación se presentan algunas de estas propuestas.

### 2.1.1. Inhibición del pigmento malárico

El estudio del comportamiento de la Cloroquina y Ferroquina en función del pH vacuolar (5.2) evidenció que la concentración de las formas monoprotonadas o neutras de la ferroquina es cerca de 10 veces mayor que la cloroquina.<sup>141</sup> Se cree por tanto que la cloroquina debe estar concentrada en regiones acuosas y la ferroquina en regiones lipídicas (o al menos en la interfase de las zonas lípida y acuosa). De esa forma se presume que la ferroquina, en forma semejante a la cloroquina, inhibe la formación del pigmento malárico. De hecho, hay evidencias de cristalización del grupo hemo en zonas lipofílicas de diversos parásitos.<sup>142</sup> Por lo tanto el aumento de la actividad de la ferroquina podría ser justificada por su localización preferencial en el sitio de cristalización de la hemozoina, por ser más lipofílica que la cloroquina. De esa forma, la ferroquina, podría inhibir la propia organización del cristal de hemozoina y generar especies reactivas de oxígeno que podría causar peroxidación lipídica.<sup>143,144</sup>

### 2.1.2. Generación de especies reactivas de oxígeno

En la vacuola digestiva (VD) del parásito, el grupo hemo libre es convertido rápidamente a hematina, es decir, el Fe(II) es oxidado a Fe(III). Durante este proceso, los electrones liberados promueven la formación de especies reactivas de oxígeno tales como radicales anión superóxido y peróxido de hidrógeno.<sup>145</sup> Las especies reactivas de oxígeno pueden causar daño celular. El peróxido de hidrógeno podría también ser usado para la degradación del grupo hemo. En este contexto, la influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el comportamiento redox de la FQ y las implicancias para la actividad antimalárica son cuestionadas. Bajo condiciones específicas (ácidas y oxidantes) simulando la VD del parásito, la FQ muestra una reacción redox reversible de un electrón.<sup>146,147</sup> Esto permitiría la generación de la especie ferriquinium y a su vez formación de radicales hidroxilo (figura 5.4), con cinéticas que son relevantes para la actividad antimalárica en el *Plasmodium falciparum*.

Otros estudios adicionales han demostrado que la CQ no es capaz de producir radicales OH• por si mismos en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las condiciones ácidas de pH (5,2) de la VD del parásito. Sin embargo en las mismas condiciones experimentales que la CQ, los radicales OH• son producidos por la FQ en concentraciones micromolares (15 µM).<sup>147</sup> Por lo tanto esta baja concentración de radicales OH• sería suficiente para inducir daño significativo al parásito, debido a la alta reactividad de esas especies. Los radicales OH• son conocidos por ser particularmente agresivos frente a los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana de los fosfolípidos, promoviendo una extensa reacción en cadena, generando diversos productos de peroxidación.<sup>148</sup> De esa forma, la ferroquina podría inducir daños al parásito y amplificar la inhibición de formación de la hemozoina antes de la acción de algún mecanismo de resistencia.

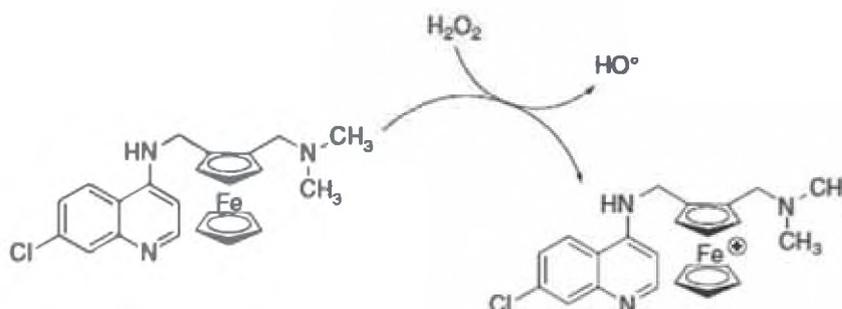


Figura 5.4. Generación de radicales hidroxilo por la ferrocina.<sup>145</sup>

### 2.1.3. Interacción con la PfCRT

Otra propuesta para el mecanismo de acción se basa en el hecho de que los parásitos resistentes a la CQ, eliminan mucho más rápidamente las células rojas que aquellos parásitos sensibles a este fármaco. Este proceso es catalizado por una proteína transmembranal del *P. falciparum* (PfCRT).<sup>149</sup> Se propuso que la ferrocina podría entonces bloquear a la PfCRT por medio de sus propiedades lipídicas, actuando como un agente de reversión de resistencia<sup>141</sup>, sin embargo, ninguna relación directa fue encontrada entre la proteína PfCRT (responsable por la resistencia de la cloroquina) y su susceptibilidad a la ferrocina.<sup>148</sup> A pesar de que el mecanismo de acción de la ferrocina no está totalmente elucidado, se sabe que el grupo ferrocenil debe estar necesariamente ligado de forma covalente al esqueleto de la cloroquina.<sup>150</sup> Teniendo en cuenta esto, se viene haciendo modificaciones a la estructura básica de la ferrocina con el objeto de entender mejor su mecanismo de acción.

### 2.1.4. Enlace de hidrógeno intramolecular

Fueron sintetizados nuevos derivados análogos a la FQ modificados en el átomo de nitrógeno N2 (5-9, figura 5.5). Al analizarse la estructura de la FQ, se observa la posibilidad de que exista un enlace de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno unido al N2 y el nitrógeno N3 de la cadena lateral, haciendo que la molécula

se encuentre parcialmente torcida. La formación de este enlace parece ser importante para la actividad antimalárica, ya que los compuesto del 5 al 9 (figura 5.5) presentan menor actividad antimalárica que la ferroquina contra las cepas de tipo W2 de *P. falciparum* y que puede ser asociado a la ausencia de esta unión.<sup>151</sup>

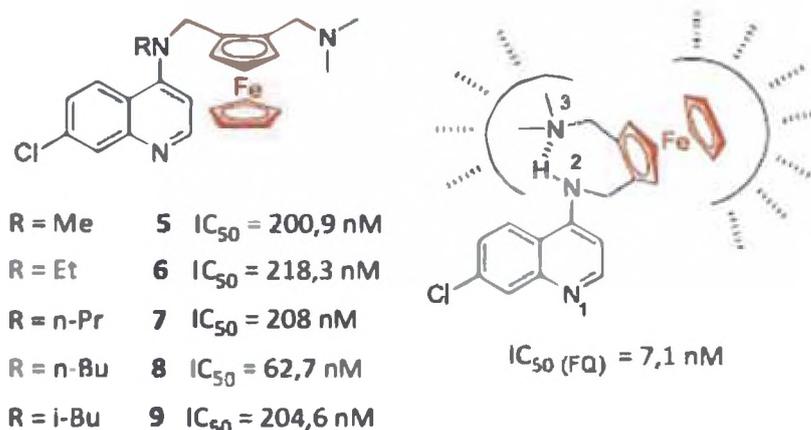


Figura 5.5. Actividades antimaláricas de los derivados análogos a la ferroquina (FQ), e ilustración del enlace de hidrógeno intramolecular en la molécula FQ.<sup>151</sup>

### 2.1.5. Modificación de la cadena lateral básica

Otros derivados análogos de la FQ fueron sintetizados, variando la naturaleza del grupo alquil enlazado al átomo de nitrógeno N3 de la cadena lateral de la FQ (Figura 5.6). La actividad antimalárica contra cepas resistentes a la cloroquina (W2, IC<sub>50</sub> (CQ)=452,4 nM) mostró que la sustitución de los grupos metilo de la FQ por grupos etilo llevo a compuestos más activos que la cloroquina, pero aún menos activos que la ferroquina (W2, IC<sub>50</sub> (FQ) = 8,1 nM), siendo resaltante la actividad alcanzada por los compuestos 10 y 12 de la figura 5.6. La sustitución de un grupo alquil por un hidrógeno provoco una disminución de la actividad. Además de eso, los compuestos que contenían unidades ferrocenil adicionales presentaron un aumento en los valores de IC<sub>50</sub> (compuestos 13,14 y15 de la figura 5.6).<sup>152</sup>



cloroquina (3, figura 5.2) por una unidad  $-\text{CH}_2\text{Fc}$  (Fc: grupo ferrocenil) da origen al compuesto 18, que fue muy activo *in vitro* contra cepas resistentes de cloroquina, pero un poco menos activo que la ferroquina. Este compuesto introdujo profundos cambios en las propiedades farmacológicas de la cloroquina, tales como la distribución electrónica y carácter lipofílico.<sup>151</sup>

### 2.1.7. Metabolitos secundarios

Se sabe que en el hombre, la cloroquina es metabolizada en el hígado, en su mayor parte por la oxidación a través del sistema enzimático citocromo P-450, dando origen a los compuestos monodesetilcloroquina (19, figura 5.8) y didesetilcloroquina (20, figura 5.8). Se cree que la ferroquina puede presentar un comportamiento metabólico similar, los productos esperados del metabolismo de la ferroquina fueron sintetizados y testeados (21 y 22, figura 5.8).

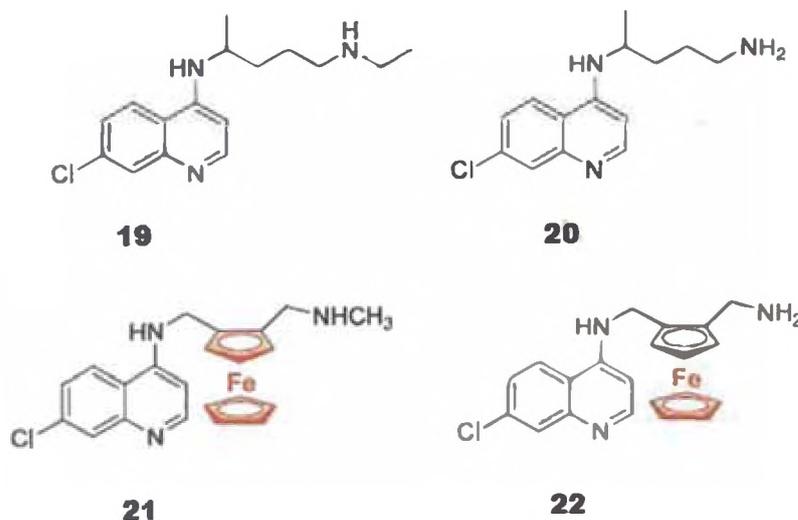


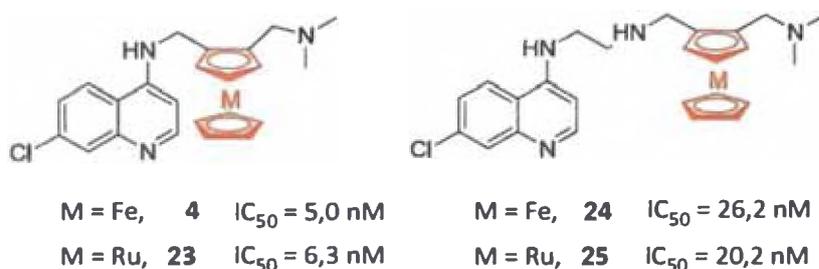
Figura 5.8. Estructuras de los metabolitos de la cloroquina (19, 20) y de la ferroquina (21, 22)

De hecho el compuesto 21 se mostró más activo *in vitro* que la ferroquina contra cepas sensibles a la cloroquina ( $\text{IC}_{50}^{21} = 13 \text{ nM}$  vs  $\text{IC}_{50}^{(\text{FQ})} = 26 \text{ nM}$ ) y cepas resistentes ( $\text{IC}_{50}^{21} = 23 \text{ nM}$  y  $\text{IC}_{50}^{(\text{FQ})} = 27 \text{ nM}$ ). Aunque el metabolito 22 presento

menor actividad que la ferroquina ( $IC_{50}^{22} = 54 \text{ nM}$ ), este es aún más activo que la cloroquina ( $IC_{50} \text{ (CQ)} = 137 \text{ nM}$ ).<sup>151</sup>

### 2.1.8. Rutenoquina por ferroquina

Como la química organometálica del ferroceno es semejante al del rutenoceno y con el objetivo de entender mejor el comportamiento del centro metálico de Fe(II) en la ferroquina. Beagley y colaboradores.<sup>153</sup> sintetizaron la rutenoquina (23, 24 y 25, figura 5.9), análogo a la ferroquina. Además de la dificultad de la síntesis, los resultados biológicos mostraron que no hay diferencia significativa entre la actividad antimalárica de la ferroquina y rutenoquina. Este resultado sugiere que el comportamiento redox de los metallocenos no es un factor relevante para la alta eficacia de estos compuestos contra *P. falciparum*, ya que el potencial redox del rutenoceno ( $E_{1/2} = 0,73 \text{ V vs S.C.E.}$ ) es mayor que el del ferroceno ( $E_{1/2} = 0,40 \text{ mV vs S.C.E.}$ ), siendo por lo tanto más difícil que las rutenoquinas generen radicales libres. Estudios de comportamiento redox de la rutenoquina y sus derivados siguen siendo necesarios para entender su mecanismo de acción.<sup>153</sup>



**Figura 5.9.** Actividad de los compuestos análogos a la ferroquina con modificación del metal Fe por Ru frente a cepas de *P. falciparum* K1, resistente a la cloroquina.<sup>153</sup>

En resumen, la actividad de la ferroquina se debe a más de una ruta (figura 5.10). Debido a las propiedades fisicoquímicas, la ferroquina podría tener como blanco la zona lipofílica de la formación de hemozoina. Su mecanismo de acción debería ser en parte similar al de la Cloroquina, basado en la inhibición de la formación de la

hemozoina. Sobre condiciones específicas en la vacuola digestiva del parásito (acidez y oxidantes), la producción de especies reactivas de oxígeno por la ferroquina debería ser lo suficiente para producir daño en las membranas de la vacuola digestiva del parásito. La gran actividad de la ferroquina sobre cepas resistentes a la cloroquina de *P. falciparum* sugieren que hay diferencias fundamentales en la interacción con los mecanismos de resistencia del parásito.

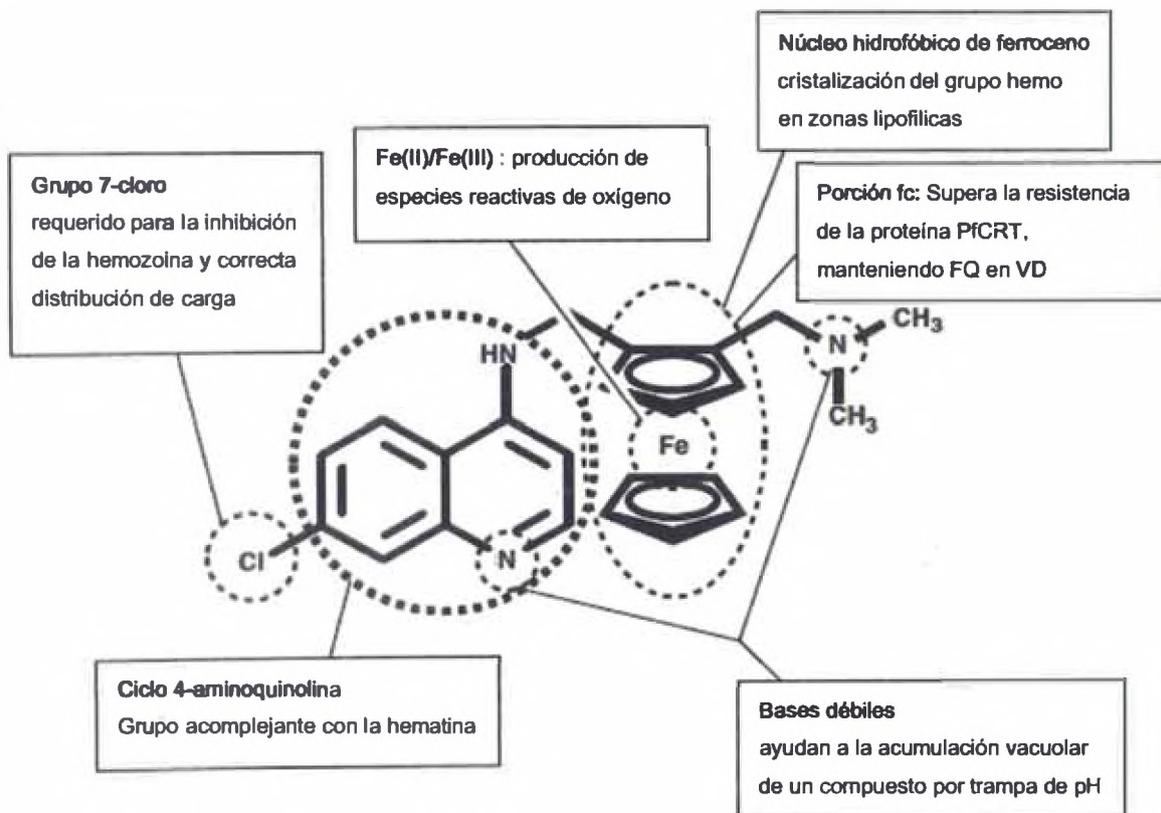


Figura 5.10. Propuesta de la relación actividad-estructura para la ferroquina

### 3. Ferroquina y Rutenoquina: compuestos análogos y actividad antimalárica

La cloroquina (1, figura 5.11) ha sido un fármaco antimalárico efectivo desde 1940. Desafortunadamente, en muchas áreas afectadas, el agente causante del *Plasmodium falciparum* ha desarrollado resistencia a la cloroquina y otros antimaláricos quinolónicos.<sup>154</sup>

Ya que la malaria afecta entre 300 y 500 millones de personas cada año y es responsable por las muertes de 1.5 a 2.7 millones, la aparición de la resistencia a los fármacos quinolónicos es el mayor problema en la actualidad.<sup>155</sup> Para superar este problema numerosas aminoquinolinas<sup>156</sup> y complejos metálicos de las aminoquinolinas<sup>157</sup> han sido evaluados contra el *P. falciparum*, de estos la ferroquina parece ser el más promisorio y las pruebas clínicas en la actualidad van en progreso.<sup>158</sup> Ya que la química del ferroceno es similar a la del rutenoceno y para establecer el rol del hierro/ferroceno en la ferroquina se han realizado diversos estudios de relación estructura-actividad.<sup>159</sup> Parte de estos estudios implica la preparación de una serie de compuestos 7-cloro-4-aminoquinolinas conteniendo en la cadena lateral amino alquílica la fracción ferroceno y rutenoceno (figura 5.11).

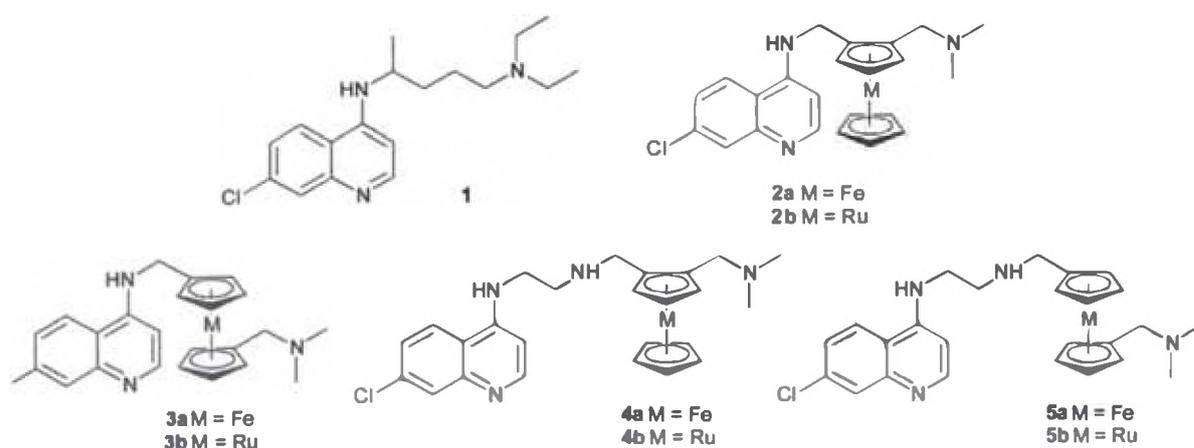


Figura 5.11. Cloroquina (1) y derivados de la ferroquina y rutenoceno.<sup>159</sup>

3.1.1. Estructura de 2b: (7-cloroquinolina-4-il)(2-dimetilaminometilrutenoceno-1-ilmetil)amina<sup>160</sup>

La estructura de este compuesto se muestra en la figura 5.12. La distancias de átomo de Rutenio a los dos anillos ciclopentadienilo Cp son ligeramente distintas (1.807(2) y 1.818(2) Å), siendo la distancia más corta la del anillo Cp disustituido al átomo metálico. La orientación del anillo disustituido está fijada dentro de la red cristalina ya que los grupos dimetil-aminometril y 4-aminometilquinolil son voluminosos resultando en un fragmento antisimétrico. La estructura cristalina confirma la presencia de un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular el cual es observado por espectroscopia infraroja (3668 cm<sup>-1</sup>); este enlace de hidrógeno es mostrado en la figura 12 en forma de línea discontinua. El átomo de nitrógeno N(3) del grupo dimetilamino acepta un fuerte enlace de hidrógeno intramolecular de la amina secundaria con una distancia N⋯H de 2.098(4) Å. También hay un débil enlace de hidrógeno intermolecular que se da entre el átomo de nitrógeno de la quinolina y el átomo de hidrógeno perteneciente al anillo fenilo fusionado (N⋯H7', 2.098(5) Å.).

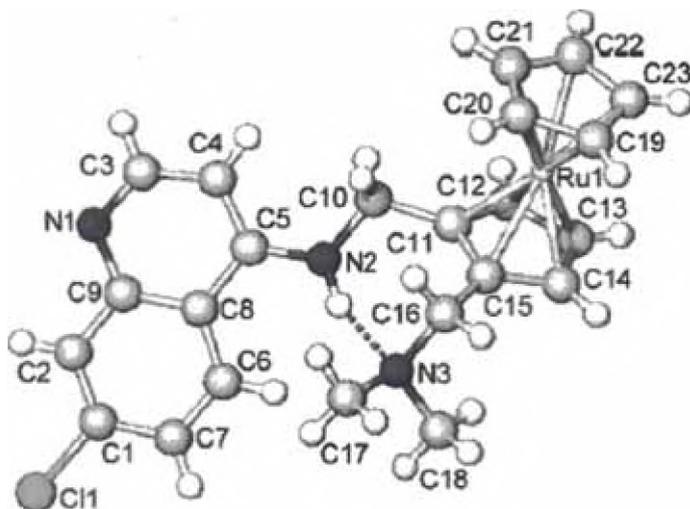


Figura 5.12. Estructura de la rutenocina (2b).<sup>160</sup>

### 3.1.2. Estructura molecular de 3a. (7-cloroquinolina-4-il)-N'-(1'-dimetilferroceno-1-ilmetil)-amina<sup>161</sup>

La estructura molecular del compuesto 3a.H<sub>2</sub>O excluyendo la molécula de agua, se muestra en la figura 5.13. Esta es isoestructural a la estructura de su análogo rutenoceno monohidratado (3b. H<sub>2</sub>O). La conformación del ferroceno es casi eclipsada con ángulos de torsión que varían de 9.5(4)° a 11.8(3)°. Las distancias del átomo de Fe al anillo ciclopentadienilo (Cp) son 1.653(2) y 1.654(2) Å. La unidad asimétrica de este compuesto contiene una molécula de agua la cual se comporta como un donador de enlace de hidrógeno para la amina terciaria y el átomo de nitrógeno quinolínico y también acepta un enlace de hidrógeno de la amina secundaria. Este patrón de enlace de hidrógeno se asemeja a la observada en su análogo 3b. H<sub>2</sub>O.

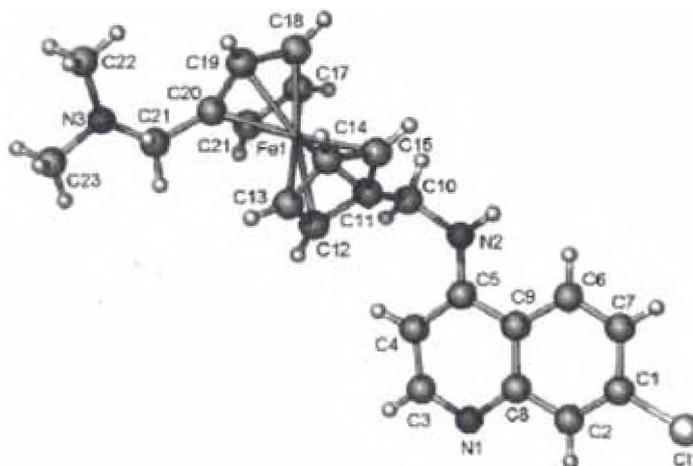


Figura 5.13. Estructura del compuesto 3a.<sup>161</sup>

### 3.1.3. Estructura de 3b: (7-Cloroquinolina-4-il)(1'-dimetilaminometilrutenoceno- 1-ilmetil)amina<sup>160</sup>

La estructura molecular del compuesto 3b.H<sub>2</sub>O sin incluir la molécula de agua se muestra en la figura 5.14. El rutenoceno ha adoptado una conformación eclipsada pero a diferencia del compuesto 2b las dos distancias del átomo metálico a los anillos

ciclopentadienilo son las mismas (1.814(2)Å). La unidad asimétrica de este compuesto contiene un molécula de agua la cual se comporta como un donador de enlace de hidrógeno hacia los átomos de nitrógeno de la amina terciaria y del grupo quinolínico con distancias N····H de 1.871(3) y 2.002(4)Å respectivamente. La molécula de agua también acepta el enlace de hidrógeno de la amina secundaria con una distancia N····H de 2.176(4)Å. A diferencia de la estructura del compuesto 2b, no hay enlaces de hidrógeno intermoleculares debido a la presencia de la molécula de agua y la gran distancia entre los potenciales átomos donadores y aceptores. Es poco probable que la molécula del agua sea requerida para facilitar la cristalización pero su inclusión resulta en formación de enlaces de hidrógeno, dejando una estructura ordenada (figura 5.15).

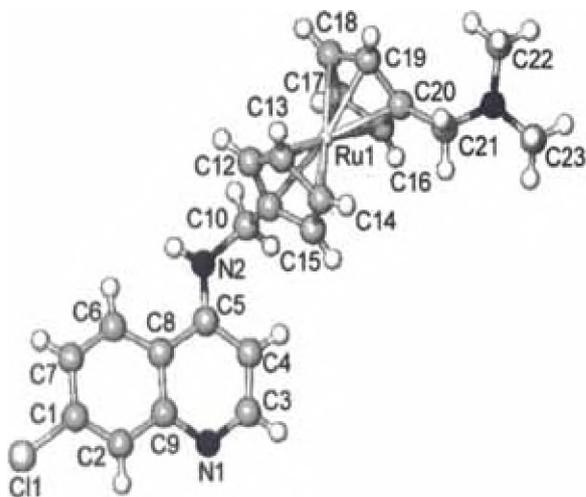


Figura 5.14. Estructura molecular del compuesto 3b, la molécula de agua es omitida.<sup>160</sup>

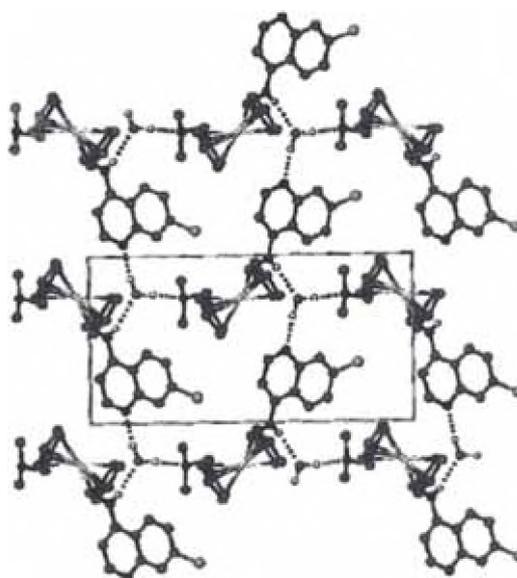


Figura 5.15. La extensa red de enlaces de hidrógeno en la estructura del compuesto 3b.<sup>160</sup>

### 3.1.4. Estructura de 4a: *N*-(7-cloroquinolina-4-il)-*N*-(2-dimetilaminometilferroceno-1-ilmetil)-etano-1,2-diamina<sup>161</sup>

La estructura de este complejo es mostrado en la figura 5.16. El ferroceno adopta una conformación eclipsada con ángulos de torsión en el rango de 8.1(3) a 9.0(4)°. Las distancias del átomo metálico a los anillos ciclopentadienilo son 1.643(2)Å y 1.652(2)Å siendo la distancia más corta a la del anillo Cp sustituido. La línea punteada en la figura 6 muestra el enlace de hidrógeno intramolecular con una distancia N⋯N de 3.171(2)Å entre las aminas secundarias y terciarias del ferroceno.

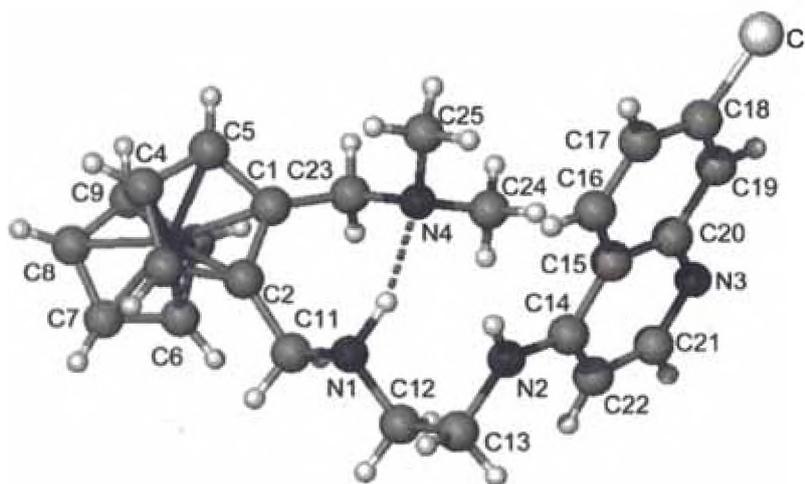


Figura 5.16. Estructura molecular del compuesto 4a.<sup>161</sup>

### 3.2. Actividad *in vitro* de compuestos análogos de la ferroquina y rutenoquina<sup>160, 161</sup>

Los resultados de actividad antimalárica contra cepas resistentes y sensibles a la cloroquina se muestran en la tabla 1. Estos resultados muestran que las estructuras tipo ferroquina son las que presentan mayor actividad antimalárica (2a y 2b), ya que al introducir un grupo metileno como espaciador o cambiando la posición de los sustituyentes del metaloceno conlleva a una disminución de la actividad antimalárica contra las cepas K1. Esto es consistente con la observación de que un factor importante en la determinación de la actividad antimalárica de las 4-aminoquinolinas

es la distancia entre las aminas en la cadena lateral.<sup>162</sup> Alternado el modelo de sustitución alrededor del metaloceno (compuestos 3b y 5b) o incluyendo un espaciador aminoalquil (compuestos 4b y 5b) se incrementa la distancia entre el átomo de nitrógeno terminal y el nitrógeno 4-aminoquinolinico.

Tabla 1. Resultados de la actividad antimalarica *in vitro* sobre cepas sensibles(D10) y resistentes (K1) al parásito del *Plasmodium falciparum*

Compuesto	D10	K1
	IC <sub>50</sub> / nM	IC <sub>50</sub> / nM
CQ.2H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	23	352
2a	18	14
2b	19	13
3a	19	49
3b	25	29
4a	33	37
4b	20	20
5a	16	65
5b	34	127

Es difícil de dar un significado de la relación estructura-actividad de los compuestos presentados, sin embargo es evidente que: (i) a pesar del diverso rango de parte de las cadenas empleadas, todos los compuestos muestran moderada a fuerte actividad antimalarica contra las cepas D10 del *plasmodium falciparum* sensibles a la cloroquina. (ii) Los compuestos 1,1'-disustituidos 3a, 3b, 5a y 5b exhibieron menor actividad antimalarica contra las cepas K1 resistentes que las cepas D10 sensibles a la cloroquina. Sin embargo, es de destacar que estos compuestos aun fueron más activos que la cloroquina en las cepas K1. (iii) Comparado a los compuestos 1,1'-disustituidos (3a y 3b), los metalocenos 1,2-disustituidos (2a y 2b) exhibieron alta actividad en cepas K1 resistentes a la cloroquina. (iv) Estos resultados confirman, basados en reportes anteriores, la equipotencia de los análogos del rutenoceno y ferroceno. Esto sugiere que la diferencia en la química redox y reactividad química de estas dos fracciones no son un factor en la eficacia de estos compuestos. La eficacia observada podría ser asociada al carácter lipofílico o al volumen del grupo metaloceno.

Estudios comparativos en el compartimiento de la CQ y la FQ han llevado a la conclusión de que el efecto de la forma, volumen, carácter lipofílico, basicidad y perfil electrónico de la porción ferrocenil conduce a la modificación del comportamiento farmacológico de sus compuestos análogos.<sup>163</sup> Aún no se ha establecido cuál de estos factores es más importante. En las cepas resistentes a la cloroquina del *Plasmodium falciparum*, un transportador de proteína o también llamado PfCRT (transportador de resistencia a la cloroquina del *plasmodium falciparum*), ha sido identificado el cual permite el flujo de salida de la cloroquina desde la vacuola digestiva del parásito. Se ha notado que la resistencia a la ferroquina no puede ser inducida bajo presión de fármacos en cepas W2 del *Plasmodium falciparum*. Esto lleva a la conclusión de que la fracción voluminosa lipofílica del ferroceno supera la resistencia del PfCRT. Además, la ferroquina mantiene todas sus características que han sido identificadas como necesarias en la estructura de la cloroquina (figura 5.10). La similitud en el comportamiento de la ferroquina y rutenoquina abre un nuevo camino en la investigación de estos compuestos. Los sitios de acumulación de la rutenoquina pueden ser establecidos fácilmente usando microscopia electrónica. En ratones infectados con *Plasmodium berghei N* y tratados con rutenoquina, se encontró que el fármaco se acumulaba cerca del pigmento malárico y en la membrana del parásito. La cloroquina no presenta tanta acumulación en la membrana del parásito.<sup>164</sup> Es posible que la ferroquina presente un modelo similar de acumulación a la rutenoquina, sin embargo aún no se ha establecido. La razón para esta acumulación de la rutenoquina en la membrana aún no ha sido comprobada, pero bien podría estar asociado con el incremento en el aporte lipofílico del grupo metalocénico.

## CONCLUSIÓN

A pesar de que el estudio de los complejos metálicos con actividad antimalárica y antileishmania es relativamente reciente, las investigaciones de los últimos años han generado resultados positivos centrados en su importancia como una de las principales estrategias para afrontar la propagación de la resistencia hacia múltiples fármacos. De todos los compuestos, quizás los derivados de ferroquina son los que probablemente posean mayor viabilidad para comenzar a emplearse comercialmente como agente terapéutico. Sin embargo, el estudio de complejos metálicos empleando agentes quelantes, y la búsqueda de ligandos orgánicos que puedan emplearse como drogas patrones para la síntesis de nuevos complejos metálicos que realcen la actividad antimalárica y antileishmania, sigue representando un reto en el área de la síntesis de complejos metálicos con aplicación medicinal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *World Health Report*. 2008
2. Pink, R.; Hudson, A.; Mouriés, M. A.; Bending, M. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 727-740.
3. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 27, 305-318.
4. Tellaheche, A. Nota relativa a onchocercosis. Trabajo para ingresar a la Sociedad Mexicana de Geografía y Estadística. Mimeo: *La enfermedad historia natural en México*. México; junio 2001; 1-6
5. Pepin, J.; Khonde, N.; Maiso, F.; Doua, F.; Jaffar, S.; Ngampo, S. Short-course eflornithine in Gambian trypanosomiasis: a multicentre randomized controlled trial. *Bull World Health Organ* 2000; 78:1284-95
6. De Almeida M. C.; Vilhena V.; Barral A.; Barral-Neto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003, 98, 861-870.
7. Dardari, Z.; Lemrani, A.; Sebban, M.; Hassar, S.; Kitane, M. Berrada & M. Boudouma (2004) // *Farmaco* 59: 195-9.
8. Garham PCC. Malaria parasites and other Haemosporidia. Blackwell Scientific: Oxford, 1966.
9. Garham PCC. Malaria parasites in man: life cycles and morphology (excluding infrastructure). En: Wernsdorfer WH, McGregor I (eds): *Malaria*. Vol. I Churchill-Livingstone: Edinburgh, 1988:61-96.
10. Carmona-Fonseca, J. Nuevos tratamientos para paludismo en Colombia, 2006. *Acta Médica Colombiana*, 2007, 32: 157-163.
11. Vickerman, K. The lure of life cycles: Cyril Gamham and the malaria parasites of primates. *Protist*, 2005, 156:433-449.
12. Good, M.F. Genetically modified *Plasmodium* highlights the potential of whole parasite vaccine strategies. *Trends in immunology*, 2005, 26: 295-297.
13. A. Kirsch-De Mesmaeker, J-P Lecomte and J.M. Kelly, *Topics en Current Chemistry*, 1996, 177, 25-76.
14. Pink, R.; Hudson, A.; Mouriés, M. A.; Bending, M. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 727-740.
15. Ekkila, K.E.; Odom, D.T.; and Barton, J.K. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2777-2795.
16. Zhang, Q-L.; Liu, J-H.; Ren, X-Z.; Huang, Y. *J. Inorg. Biochem.* 95, 2003, 194-198.
17. Wilhelmsson, L.M.; et al. *J Am Chem Soc*, 2002. 124(41): p. 12092-3.
18. Westerlund, F.; et al., *Binding geometry and photophysical properties of DNA-threading binuclear ruthenium complexes*. *J Phys Chem B*, 2007. 111(1): p. 310-7.
19. Satyanarayana, J.C. ; Dabrowiak, J.B. Chaires, *Biochemistry* 31 (2003) 401-408. (1992) 9319-9324.
20. Bravec, V.; Klenwächter, V.; Butour, J.; Johnson, M.P. *Biophys. Chem.*, 1990, 35, 129.
21. Johnson, A.; Qu, Y.; Van Hounten, B.; Farrell, N. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 1697.
22. Johnson, W.C.; Itzwoitz, M.S.; Tinoco, Y. *Biopolymers*, 1972, 11, 225.
23. Wolfe, A.; Shimer, G.H.; Maehan, T. *Biochemistry* 26 (1987) 6392- 6396.
24. Grinsted, J.; Bennett, P. *Methods in Biology*, vol. 21: *Plasmid Technology*, Academic Press, London, 1998.

25. Lippard, S. J. *Acc. Chem. Res.*, 1978, 11, 211.
26. Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J.; A Piedrola-Angulo, G. *Tratado de Microbiología y Parasitología Médica*, Salvat, Barcelona, 1991.
27. Zhang, B.; Seki, S.; Akiyama, K.; Tsutsui, K.; Nagao, K. *Acta Med. Okayama* 46 (1992) 427-434.
28. Demicheli, C.; F. Frézard, M. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1570: 192-8.
29. Amato, V.S.; Padilha, A.C.; Duarte, M.; Valentini, M. (2000) *Int. J. Infec. Dis.* 4: 153-7.
30. Rath, S.; Trivelin, T.R.; Imbrunito, D.M.; Tomazela, M.N. (2003) *Química Nova* 26: 550-5.
31. Sereno, D.; Holzmüller & J.L. Lemestre (2000) *Acta Tropica* 74: 25-31.
32. Chai, Y.; Yan, I.L.K.; Wong, L.M.C; Chow & H. Sun (2005) *J. Inorg. Biochem.* 99: 2257-63.
33. Dzamitika, S.A.; Falcão, F.B.; De-Oliveira, C.; Marbeuf, A.; Gamier-Suillerot, C.; Demicheli, B. Rossi-Bergmann & F. Frézard (2006) *Chem. Bio. Int.* 160: 217-24.
34. Dardari, Z.; Lemrani, A.; Sebban, M.; Hassar, S.; Kitane, M. Berrada & M. Boudouma (2004) // *Farmaco* 59: 195-9.
35. Raychaudhury, B.; Banerjee, S.; Gupta. (2005) *Acta Trop.* 95: 1-8.
36. Ouellette, M.; Légaré, A.; Haimneur, K.; Grondin, G.; Roy, C.; Brochu & B. Papadopoulou (1998) *Drug Resist. Updates* 1: 43-8.
37. Cohen, B.E. (1998) *Int. J. Pharm.* 162: 95-106.
38. Dogra, J. & V.N. Saxena (1996) *Int. J. Parasitol.* 26: 1213-5.
39. Kramp, K.L.; Dewitt, J.W.; Flora, D.C.; Slunt & T.A Houston (2005) *Tetrah. Lett.* 46: 695-8.
40. Basselin, M.; Coombs & M.P. Barrett (2000) *Mol. Biochem. Parasitol.* 109: 37-46.
41. Mukherjee, A.; Padmanabhan, M.H.; Sahami, M.P. Barrett & R. Madhubala (2006) *Mol. Biochem. Parasitol.* 145: 1-10.
42. Bennett, E.; Hardman, J.; Limbird, L.; Goodman, A, editores. Goodman & Gilman *The pharmacological basis of therapeutics*. New York Internacional Edition. 2001.p.1295-1312.
43. Mbongo, N.; P.M. Loiseau, F. Lawrence, C.; Craciunescu & M. Robert-Gero (1997) *Parasitol. Res.* 83: 515-7.
44. Sanchez-Delgado, R.A. & A. Anzellotti . (2004) *Mini-Rev. Med. Chem.* 4(1): 23-30.
45. Salas, M.; Quiros, M.; Haj, A. (2001). *Metal Based Drugs.* 8:121-124
46. Fischer, G., *Adv. Heter. Chem.* 57, 81, 1993.
47. Chae, M.Y.; Swenn, K.; Kanugula, S.; Dolan, M.E. *J. Med. Chem.* 38, 359, 1995.
48. Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Villatoro, M.J.; Zocchi, C.; Dionisotti, S.; Orgini, E.; *J. Med. Chem.* 39 1164, 1996.
49. Salas, J.M.; Romero, M.A.; Sinchez, M.; Quiros, M. *Coord. Chem. Rev.* 193-195, 1119, 1999.
50. Navarro, J.A.R.; Romero, M.A., Salas, J.M.; Quiros, M.; El Bahraoui J.; Molina J.; *Inorg. Chem* 35, 7829, 1996.
51. Luque, F.; Femández-Ramos, C.; Entrala, E.; Rosales, M.J.; Navarro, J.A.R.; Romero, M.A.; Salas, J.M.; Sfinchez-Moreno, M. *Comp. Biochem. Phys.* C126, 39, 2000.
52. Abul Haj, M.; Salas, J.M.; Quiros, M.; Molina, J.; Faure, R. *J. Mol. Struct.* 519, 165, 2000.

53. Navarro, J.A.R.; Salas, J.M.; Romero, M.A.; Vilaplana, R.; Gonzb.lez-Vilchez, F.; Faure, R. *J. Med. Chem.* 41,332, 1998.
54. Baraldi, P.G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Villatoro, M.J.; Zocchi, C.; Dionisotti, S.; Orgini, E.; *J. Med. Chem.* 39, 1164, 1996.
55. Fischer, G. *Adv. Heterocycl. Chem.* 57 (1993) 81.
56. Sánchez, M.; Marín, C.; Urbano, J.; Guitierrez-Sánchez, R. *Drug Metabolism Letters*, 2009, 3, 35-44.
57. Lerman LS. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Mol Bioi* 1961; 3:18-30.
58. Jannetre KW; Lippard, S.; Vassiliades, G.A. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71:3839-3843.
59. Holmes, R.J., McKeage, M.; Murray, V. *Inorg Biochem* 2001; 85:209-217.
60. Ekkila, KE.; Odom, DT.; Barton, JK. *Chem Rev* 99, 1999: 2777-2795
61. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.; Fernandez-Mestreb, M.; Arriechec, D. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97 (2003) 364-369.
62. Healy, P.C.; Engelhardt, L.M.; Patrick, V.A.; White, A.H. *J. Chem. 2297-2802. Soc.*, Dalton Trans. (1985) 2541-2545.
63. Veal, J .M.; Rill, R.L. *Biochemistry* 30 (1991) 1132-1140.
64. Barton, J .K.; Danishefsky, A.T.; Goldberg, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2172-2176.
65. Haq, I.; Lincoln, P.; Suh, D.; Norden, B.; Chaires, J.B. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4788-4796
66. Satyanarayana, S.; Dabrowiak, J.C.; Chaires, J.B. *Biochemistry* 31 (1992) 9319-9324.
67. Burton, K. *Biochem. J.* 62 (1956) 315-322.
68. Sigman, D .S. *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 180-186.
69. Graham, D .R.; Marshall, L.; Reich, K.A.; Sigman, D.S. *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5419-5421.
70. Sigman, D .S.; Mazumder, A.; Perrin, D.M. *Chem. Rev.* 93 (1993) 2297-2802.
71. Zoroduu, M.; Zanetti, S.; Pogni, R.; Basosi, R. *J. Inorg. Biochem.* 63(1996) 291-300.
72. Mesa-Valle, C .M.; Moraleda-Lindez, V.; Craciunescu, D.; Osuna, A. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 91 (5) (1996) 625-633.
73. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.; Sierraalta, A.; Fernandez- Mestre, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 (2003) 401-408.
74. Veal, J .M.; Rill, R.L. *Biochemistry* 30 (1991) 1132-1140.
75. Sigman, D .S. *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 180-186.
76. Navarro, M.; Hemandez, C.; Colmenares, I.; Hemandez, P. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101 (2007) 111-116.
77. Long, E.C.; Barton, J.K. *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 271-273.
78. Moucheron, C.; Kirch-De Mesmaeker, A.; Kirsch, A.; Kelly, J.M. *Struct. Bond.* 92 (1998) 163-216.
79. Haq, I.; Lincoln, D.; Norden, B.; Chaires, J.B. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4788-4796.
80. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.; Sierraalta, A.; Fernandez- Mestre, M.; Silva, P. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 (2003) 401-408.

81. Galan, A.; Garcia-Bermejo, M.J.; Troyano, A. Vilaboa, N.E. ; Kazanietz, P.; Aller, J. *Biol. Chem.* 275 (2000) 11418–11424.
82. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.; Fernandez-Mestreb, M.; Arriechec, D. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97 (2003) 364–369.
83. Woster, P.M. *Annual reports in medicinal chemistry: New therapies for parasitic infection.* Academic press, cap. 10, San Diego, 2001.
84. Foley, M.; Tilley, L. Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacological Therapy*, 1998, 79: 55-87.
85. O'Neill, P.M.; Bray, P.G.; Hpwley, S.R.; Ward, S.A.; Park, B.K. 4-Aminoquinolines. Past, present and future: A chemical perspective. *Pharmacological Therapy*. 1998, 77: 29-58.
86. Biagini, G.A.; O'Neill, P.M.; Nzila, A.; Ward, S.A.; Bray, P.G. Antimalarial chemotherapy: Young guns or back to the future? *Trends in parasitology*, 2003, 19: 479-487.
87. Krishna, S.; Uhlemann, A.C.; Haynes, R.K. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*, 2004, 7: 233-244.
88. Posner, G.H.; O'Neill, P.M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P-450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Accounts of Chemical Research*, 2004, 37: 397-404.
89. Tilley, L.; Loria, P.; Miller, S. & Foley, M.; 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem. J.* 339: 363-30.
90. Egan, T.J. (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets*. 2003; 2: 115-124.
91. Krogstad, D.J.; DE, D.; Krogstad, F.M.; Byers, L.D. Structure-activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, 41: 4918-4926.
92. Egan, T.J.; Hunter, R.; Kaschula, C.H.; Marquez, H.M.; Misplon, A.; Walden, J. Structure-function relationship in aminoquinolines: Effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of  $\alpha$ -hematin formation, and antiplasmodial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43: 283-291.
93. Egan, T.J.; Hunter, R.; Kaschula, C.; Basilico, N. Structure-activity relationship in 4-aminoquinoline antiplasmodials. The role of the group at the 7-position. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, 45: 3531-3539
94. Gokhale H.; Padhye, B.; Billington D. *Inorganica Chimica Acta* 349 (2003) 23\_ 29
95. World Health Organization. World Malaria Situation in 1992. *Weekly Epidemiol. Rec.* 69 (1994) 309.
96. Gokhale, S.; Padhye, D.; Rathbone, D.; Billington, P.; Lowe, C.; Schwalbe, C. *Inorg. Chem. Commun.* 4 (2001) 26\_ 29.
97. Gokhale, N.; Padhye, S.; Padhye, S.; Anson, C. Powell, A. *Inorg. Chim. Acta* 319 (2001) 90.
98. K. Bruger, in: I.T. Miller, D.W. Allen (Eds.), *Coordination Chemistry: Experimental Methods*, Butterworth, London, 1973, p. 110.
99. Sutton, D. *Electronic Spectra of Transition Metal Complexes*, McGraw Hill, London, 1968.
100. Lal, T.; Gupta, R.; Mahapatra, S.; Mukherjee, R. *Polyhedron* 18 (1999) 1743.

101. Sharma, V.; Beatty, A.; Goldberg, D. *Chem. Commun.*, 1997, 2223-2224
102. Wong, E.; Liu, S.; Luggner, T.; Hahn F. E. *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 93.
103. Sharma, V.; Crankshaw C.; Piwnica-Worms, D. *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 3483.
104. Wong, E.; Caravan, P.; Liu, S.; Rettig S. J.; Orvig, C. *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 715.
105. Tsang, B. W.; Mathias, C. J.; Fanwick P. E.; Green, M. A. *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 4400.
106. Wellems, T. E.; Panton, L. J.; Gluzman, I. Y.; Rosario V. E.; *Nature*, 1990, **345**, 253.
107. Orjih, H.; Banyal, R.; Chevli, K.; Fitch, C. *Science*, 1981, **214**, 667.
108. Navarro M.; Sanchez-Delgado, R. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 276–282
109. Egan, T.J.; Mavuso, W.W.; Ross, D.C.; Marques, H.M. J. *Inorg. Biochem.* 68 (1997) 137–145.
110. McGhee, J.D.; Von Hippel, P.H. *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469–489.
111. Egan, T.J.; Ross, D.C.; Adams, P.A. *FEBS Lett.* 352 (1994) 54–57.
112. Domínguez, J.N.; León, C.; Rodrigues, J.; Gamboa de Domínguez, N.; Rosenthal, P.J.; // *Farmaco* 60 (2005) 307–311.
113. Egan, T.J.; Chen, J.Y.J.; Villiers, K.A.; Mabothe, T.E.; Naidoo, K.J.; Ncokazi, K.K.; Langford, S.J. *FEBS Lett.* 580 (2006) 5105–5110.
114. Rajapakse, C.S.K.; Martínez, A.; Naoulou, B.; Jarzecki, A.A.; Suárez, L.; Sánchez- Delgado, R.A. *Inorg. Chem.* 48 (2009) 1122–1131.
115. Navarro, M.; Pérez, H.; Sánchez-Delgado, R.A. *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1937–1939.
116. Sánchez-Delgado, R.A.; Navarro, M.; Pérez, J H.; Urbina, A.J. *Med. Chem.* 39 (1996) 1095–1099.
117. Danielsson, L.G.; Zhang, Y.H. *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 188–196.
118. Rappel, C.; Galanski, M.; Yasemi, A.; Habala, L.; Keppler, B. *Electrophoresis* 26 (2005) 878–884.
119. Van Schalkwyk, D.A.; Egan, T.J. *Drug Res. Updat.* 9 (2006) 211–226.
120. Warhurst, D.C. *Malar. J.* 2 (2003) 31–43.
121. Martínez, A.; Rajapakse, C.S.K.; Jalloh, D.; Dautriche, C.; Sánchez-Delgado, R.A. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 863–871.
122. Long, E.C.; Barton, J.K. *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 271–273.
123. McGhee, J.D.; Von Hippel, P.H. *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469–489.
124. Cusumano, M.; Di Pietro, M.L.; Giannetto, A. *Inorg. Chem.* 38 (1999) 1754–1758.
125. Satyanarayana, S.; Dabrowiak, J.C. *Biochemistry* 31 (1992) 9319–9324.
126. Slater, A.F.G.; Cerami, A. *Nature* 355 (1992) 167–169.
127. Cohen, S.N.; Yielding, K.L. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54 (1965) 521–527.
128. Krajewski, W.A. *FEBS Lett.* 361 (1995) 149–152.
129. Haq, I.; Lincoln, P.; Suh, D.; Norden, B.; Chowdhry, B.Z.; Chaires, J.B. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4788–4796.
130. Graves, D.E.; Watkins, C.L.; Yielding, L.W. *Biochemistry* 20 (1981) 1887–1892.
131. Burton, K. *Biochem. J.* 62 (1956) 315–323.
132. Brocard, j.; Biot, c.; Glorian, g. & Maciejewski, L. 1997. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* 40: 3715-3718.
133. Charragher, Ch.; Pittman, Ch.; Sheats, J. & Zeldin, M. 2004. *Macromolecules containing metal and metal-like elements*. Vol. 3. Biomedical Applications. John Wiley and sons, Inc., pp. 1-18.
134. Neuse, E. W. *J. Inorg. Organomet. Polymer Mater.* 2005, **15**, 3.

135. Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski L.A.; Brocard, J.S. *J. Med. Chem.*, 40, 3715–3718 (1997).
136. Daher, W.; Biot, C.; Fandeur, T.; Jouin, H.; Pelinski, L.; Viscogliosi, E.; Fraisse, I.; Pradines, B.; Brocard, J.; Khalife, J.; Dive, D. *Malar. J.* 2006, 5, 11.
137. Domarle, O.; Blampain, G.; Agnani, H.; Nzadiyabi, T.; Lebibi, J.; Brocard, J.; Maciejewski, L.; Biot, C.; Georges, A. J.; Millet, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 540.
138. Neuse, E. W. *J. Inorg. Organomet. Polymer Mater.* 2005, 15, 3.
139. Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L.; Brocard, J. S. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 3715.
140. Site da U.S. National Institutes of Health Clinical Trials. Disponível em <<http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00563914>>. Acesso em 20 outubro 2010.
141. Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I.; Maciejewski, L. A.; Boyce, M.; Nowo-grocki, G.; Brocard, J. S.; Basilico, N.; Ollivaro, P.; Egan, T. J. *Mol. Pharm.* 2005, 2, 185.
142. Egan, T. J. *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1288.
143. Egan, T. J. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2008, 157, 127
144. Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 1504.
145. Kannan, R.; Kumar K.; Sahal, D.; Kukreti, S. *Biochem J.* (2005) 385:409.
146. Chavain, N.; Vezin, V.; Dive, D.; Paul, J.-F.; Buisine, E.; Biot, C. *Mol Pharmaceutics.* (2008) 5:710.
147. Chavain, N.; Vezin, V.; Dive, D.; Paul, J.-F.; Buisine, E.; Biot, C. *Mol Pharmaceutics.* 2008, 5:710.
148. Cherubini, A.; Ruggiero, C.; Polidori, M. C.; Mecocci, P. *Free Radical Biol. Med.* 2005, 39, 841.
149. Atteke, C.; Ndong, J. M.; Aubouy, A.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Lebibi, J.; Deloron, P. *J. Antimicrob. Chemother* 2003, 51, 1021.
150. Biot, C. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 2004, 3, 135.
151. Biot, C.; Chavain, N.; Dubar, F.; Pradines, B.; Trivelli, X.; Brocard, J.; Forfar, I.; Dive, D. *J. Organometal. Chem.* 2009, 694, 845.
152. Biot, C. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 2004, 3, 135.
153. Chibale, K.; Moss, J.; Beagley, P.; Blakie, M.A.; Clarkson, C. & Smith, P.; 2002. Synthesis and antimalarial activity in vitro of new ruthenocene-chloroquine analogues. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4426-4433.
154. Winstanley, P. A. *Parasitol. Today*, 2000, 16, 146.
155. Weekly Epidemiological Record, W.H.O., 1997, vol. 72 (No I, II, III), p. 1.
156. Egan, T. J. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2001, 11, 185 and references therein.
157. Sánchez-Delgado, R. A.; Navarro, M.; Pérez H.; Urbina, J. A. *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1095.
158. Biot, C.; Glorian, G.; Maciewski, L.; A. Brocard, J. S.; Domarle, O.; Blampain, G.; Millet, P.; Georges, A. J. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 3715.
159. Blackie, M.; Beagley, P.; Moss, J. R.; Kendrick, H.; Croft S. L. submitted for publication
160. Beagley, P.; Chibale, K.; Clarkson, C.; Smith, J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 4426–4433
161. Beagley, P.; Chibale, K.; Clarkson, C.; Smith, J. *Dalton Trans.*, 2003, 3046 – 3051
162. De, D.; Krogstad, F. M.; Cogswell, F. B.; Krogstad, D. *J. Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 55, 579.
163. Biot, C.; Taramelli, D.; Forfar-Bares, I. "Insights into the mechanism of action of ferroquine. Relationship between physicochemical properties and antiplasmodial activity," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 2, no. 3, pp. 185–193, 2005.

164. Dzekunov, S. M.; Ursos, L. M. B.; Roepe, P. D. "Digestivevacuolar pH of intact intraerythrocytic *P. falciparum* eithersensitive or resistant to chloroquine," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 110, no. 1, pp. 107–124, 2000.