

Representando el log  $K_{obs}$  frente a  $1/T$  obtenemos las gráficas de las ecuaciones ajustadas por mínimos cuadrados que se muestran en la figura 5, para cada valor de pH ensayado. Los valores de la Energía de activación  $E_a$  de la ecuación de Arrhenius y los de  $K_2$  se dan en la Tabla III observando que los valores de  $E_a$  son menores de 40 kcal/mol.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) HERRIOT, R. M. (1946) *J. Biol. Chem.* 164:725.
- (2) HOLBROOK, A. (1958) *J. Pharm. Pharmacol.* 10:762.
- (3) STOCK, F. G. (1954) *Analyst.* 79:662.
- (4) BRANDIRSS, M. W. DENNY, E. L. HUBER, A. M. STEINMAN, H. G. (1962) *Antimic. Ag. Chemeoter.* 626.
- (5) WEAVER, W. J., RESCHKE, R. F. (1963) *J. Pharm. Sci.* 52:362.
- (6) SMITH, J. W. DE GRAY, G. E. PATEL, V. J. (1967) *Analyst.* 92:247.
- (7) YASUDA, T. SHIMADA, S. (1971) *J. Antibiotics.* 24:291.
- (8) ALICINO, J. F. (1946) *Ind. Eng. Chem. Anal.* 18:619.
- (9) CANBACH, T. ERLER, I. E. ILVER, REIMERS, F. WEBSER, S. (1950) *J. Pharm. Pharmacol.* 2:364.
- (10) WEISS, P. J. (1959) *J. Antibiot. Chemotherapy.* 9:660.
- (11) GROVE, D. C. RANDALL, W. A. (1955) *Assay Methods of Antibiotics.* Medical Encyclopedia. New York. 16.
- (12) PATTERSON, S. J. EMERY, N. B. (1948) *Analyst.* 73:207.
- (13) *British Pharmacopeia.* (1968. The Pharmaceutical Press. London. 22-602.
- (14) FORD, J. H. (1947) *Anal. Chem.* 19:1004.
- (15) BOXER, G. E. EVERETT, P. M. (1949) *Anal. Chem.* 21:670.
- (16) HEFTMANN, E. (1967) *Chromatography.* Reinhold Publishing Corporation. New York 723-725.
- (17) FISHER, R. LAUTHER, N. (1961) *Arch. Pharm.* 294:1.
- (18) BETINA, V. (1964) *J. Chromatog.* 15:379.
- (19) VADINO, W. A., SUGITA, E. T., CHAANARE, R. L., ANDO, H. Y., NIEBERGALL, P. J. (1979) *J. Pharm. Sci.* 68:10.
- (20) LEBELLE, M., GRAHAM, K., WILSON, W. L. (1979) *J. Pharm. Sci.* 68:5.
- (21) SHARMA, J. P., KORITZ, G. D., PERKINS, E. G., BEVILL, R. F. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:9.
- (22) FABREGAS, J. L., BENEYTO, J. E. (1980) *J. Pharm. Sci.* 69:12.
- (23) DE LEENHER, A. P., NELIS, H. J. (1979) *J. Pharm. Sci.* 68:8.
- (24) TOWNLEY, E., RODEN, P. (1980) *J. Pharm. Sci.* 69:5.
- (25) LEBELLE, M. J., VILIM, A., WILSON, W. L., (1979) *J. Pharm. Pharmacol.* 31:441-443.
- (26) Tabla de preparación de tampones. Merck.
- (27) HOU, J. P., POOLE, J. W. (1969) *J. Pharm. Sci.* 4:447.

Recibido: 17 de marzo 1989.

## Complejos del Rh(III) de acción antitripanosómica.

por

D. G. CRACIUNESCU,\* E. PARRONDO IGLESIAS y A. DOADRIO LOPEZ  
*Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica.*  
*Facultad de Farmacia. U.C.M., 28040-Madrid (España).*

L.M. RUIZ-PEREZ  
*Instituto López Neyra de Parasitología (C.S.I.C., 18001 - Granada) España*

A. OSUNA  
*Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.*  
*Universidad de Granada, 18001-Granada (España)*

N. ERCOLI  
*Instituto de Zoología Tropical. U.C.V. Caracas (Venezuela)*

E. GASTON DE IRIARTE  
*Departamento de Urología. Facultad de Medicina.*  
*U.A.M. 38034-Madrid (España)*

## RESUMEN

En este trabajo las actividades antiparasitarias "in vivo"/"in vitro." frente a las cepas de Tripanosomas Americanos y Tripanosomas Africanos (*T. cruzi*; *T. gambiense*; *T. venezueliense*) desplegadas por siete complejos catiónicos del Rh(III), de estructura general  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , donde L = derivado de tiazol y/o derivado de benzotiazol. Con el fin de apreciar el posible mecanismo de acción antitripanosómico de estos complejos frente a *T. cruzi*, se ha realizado también un estudio de Microscopía Electrónica, de los parásitos *T. cruzi*, tratados con dichos complejos "in vitro".

También se ha realizado un estudio preliminar (mediante medidas de parámetros bioquímicos y/o datos de histopatología en la sangre de las ratas que recibieron 1/2 de la LD50 de los complejos) con el fin de poner de manifiesto los escasos potenciales nefrotóxicos, hepatotóxicos y hematotóxicos que poseen estos nuevos complejos iónicos, de estructura presumiblemente octaédrica del Rh(III).

**Palabras clave:** Complejos catiónicos Rh(III).— Actividades antitripanosómicas.— Microscopía electrónica.— Perfil toxicológico.

\*Autor al que debe dirigirse la correspondencia.

## SUMMARY

## Rh(III) complexes and their antitrypanocidal properties.

The "in vitro" and "in vivo" antitrypanosomic effects of seven Rh(III) cationic complexes belonging to the general structure  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$ , against American and African Trypanosomas (*T. cruzi*, *T. gambiense*, *T. venezueliense*) were reported at first, together with Electronic Microscopy study of the damages produced by the  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$  complexes against epimastigotes of *T. cruzi* ("in vitro").

In all the  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$  complexes reported in this paper the ligands (L), where L = thiazole or benzothiazole derivatives devoided "per se" of any antiparasity properties.

The nephrotoxic, hematotoxic and hepatotoxic potential for the new Rh(III) complexes were determined in the blood of the Wistar rats, which received 1/2 of the LD50 of each complexes, as well as by the histological evaluations of the kidneys, livers and blood of the "treated" rats.

**Key words:** Rhodium (III) cationic complexes.— Antitrypanocidal effects.— Electron Microscopy studies.— Toxicological potential.

## I. INTRODUCCION

A partir de las investigaciones realizadas por N. Farrell y colaboradores en Brasil (1-3), se han ensayado, con bastante éxito, como agentes antitripanosómicos "in vivo" y/o "in vitro", varios complejos del Rh(II) y del Pt(II), originados por los medicamentos orgánicos clásicos de acción antitripanosómica y/o antileishmaniásica ["Berenile", "Metamidium", "Nifurtimox", "Ethidium"] tanto por el mismo autor como por D.G. Craciunescu y colaboradores (complejos de la "Pentamidina", "Benzonidazole", "Stilbamidina") (5). Si bien N. Farrell y colaboradores (1-3) postularon (a través de datos de microscopía electrónica) la baja toxicidad de algunos complejos del Rh(II) y del Pt(II) así como su posible mecanismo de acción frente a *T. rhodesiense*, únicamente los grupos de investigación dirigidos por D.G. Craciunescu y respectivamente A. Osuna y L.M. Ruiz Pérez (los tres grupos trabajando en España), postularon las interesantes actividades "in vitro" y/o "in vivo" desplegadas por los complejos del Rh(III) y del Pt(IV), así como del Pt(II) frente a *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. congolense*, llegando a la conclusión de que los complejos catiónicos del Rh(III), pertenecientes a las estructuras octaédricas  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$ , (donde L = derivado de tiazol, derivado de imidazol, derivado de benzotiazol, derivado de piridina), presentan un especial interés frente a las infecciones parasitarias inducidas por *T. cruzi*, debido a su elevado efecto "in vitro" y también debido a sus bajas toxicidades generales (presentan valores LD50 superiores a los 350 mg/Kg) (4-15).

Estos autores (4-15) realizaron además un detallado estudio de la incorporación de los distintos aminoácidos incorporados "in vitro" por *T. cruzi*, y pusieron de manifiesto el hecho de que se pueden conseguir [para dosis

de 1-100  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de estos complejos del Rh(III)] inhibiciones "in vitro" del orden del 90-100 % de las formas epimastigotas de *T. cruzi* (11, 13, 14).

En el presente trabajo damos cuenta de las actividades antitripanosómicas "in vivo" desplegadas por los complejos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$  arriba mencionados frente a las ratas infectadas con las siguientes líneas parasitarias: *T. cruzi*, *T. gambiense* y *T. venezueliense* (variante disquinetoplásica del *T. evansi*). Además se ha realizado un detallado estudio de Microscopía Electrónica de las formas epimastigotas del *T. cruzi*, tratadas "in vitro" con los mencionados complejos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$ , con el fin de apreciar su posible mecanismo de acción antitripanosómica.

Se ha trabajado con los complejos catiónicos del Rh(III), de estructura presumiblemente octaédrica  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$  descritos por Craciunescu y colaboradores (8, 16) como eficaces agentes duales (antitumorales y antitripanosómicos) donde L = mercaptobenzotiazol; Benzotiazol; 2 Bromotiazol; 2 Aminonaftotiazol; 2 Aminobenzotiazol; 2 Amino 6 etoxibenzotiazol 2 Cloro 6 metoxibenzotiazol.

También se ha valorado "in vivo" la nefrotoxicidad, la hepatotoxicidad y la hematotoxicidad de algunos de estos 7 (siete) complejos catiónicos del Rh(III), que han resultado semejantes a las que presentan los complejos neutros del Rh(III), sintetizados y ensayos recientemente por Craciunescu (6,8) "in vivo" frente a Tripanosomas Africanos y/o Tripanosomas Americanos, pertenecientes a las estructuras octaédricas neutras  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_3]^0$ , (donde L = derivado de alquil y/o aril ditiocarbamato y/o xantato (6,8).

## II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Síntesis de los complejos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$ , donde L = derivado de tiazol y/o derivado de benzotiazol.

Todos los complejos catiónicos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$  estudiados en este trabajo donde L = los derivados de tiazol y/o derivados de benzotiazol mencionados en el apartado I (Introducción), han sido sintetizados de nuevo según los métodos generales descritos por nosotros (6, 16):

1g de  $\text{Na}_3[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cl}_6]$  se disuelve en unos 100  $\text{cm}^3$  de agua caliente (80°C), bajo fuerte agitación. Se le añade la cantidad correspondiente del ligando (L) disuelto en unos 200  $\text{cm}^3$  de etanol absoluto caliente (60 - 70°C) y al que se le añadieron unos 20  $\text{cm}^3$  - 25  $\text{cm}^3$  de HCl 6N.

Se ha trabajado siempre respetando las esteoquimetrías Rh(III): L = 1:4.

La mezcla total de reacción a la que se le añadieron algunos cristales de hipofosfito sódico (catalizador), se concentra (80-90°C) bajo fuerte agitación hasta que llega a 1/4 - 1/3 de su volumen inicial. Se deja enfriar 2 - 3 horas

a la temperatura ambiente cuando precipitan los complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  en forma de polvos microcristalinos de color marrón-rojizo. Los complejos se filtraron sobre crisoles G4, se lavaron con unos 20 cm<sup>3</sup> de etanol absoluto y con unos 100 – 150 cm<sup>3</sup> de éter absoluto.

Los rendimientos de obtención estuvieron siempre comprendidos entre el 60 – 70 % de los rendimientos teóricos. Todos los complejos han podido ser recrystalizados de unas mezclas calientes etanol absoluto: HCl (12 N) = 10:1.

Los complejos son estables a la exposición a la luz y a aire. Son poco solubles en el agua, pero muy solubles en DMSO, DMF, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

## 2. Análisis químico de los complejos del Rh(III)

Los complejos han sido atacados con agua regia, y el contenido en Rh % valorado por espectroscopía atómica de absorción. Los contenidos en N % han sido hallados por el método de Kjeldhal; los contenidos en C % H %, en C % han sido hallados respectivamente por métodos standard de microcombustión y (en el caso del contenido en cloro), finalmente con Ag Cl. *Todos estos análisis se han realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia (UCM). Los contenidos en S %, han sido hallados por métodos standard de microcombustión en colaboración con los laboratorios Galbraith (USA) y/o Pascher Analytical Laboratories (R.F.A.).*

En todos los casos, los contenidos hallados en Rh %, N %, C %, Cl %, S %, H % no difieren en más de ± 0,4 % de los contenidos calculados teóricamente para unas estructuras catiónicas presumiblemente octaédricas  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , lo que apunta claramente hacia una correcta formulación de estas estructuras.

## 3. Espectros I.R. de los complejos $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$

Los espectros I.R. de los nuevos complejos del Rh(III) y de los ligandos (L) puros, han sido obtenidos con la ayuda de un espectrofotómetro I.R. Perkin Elmer 238 (rango 4000 – 200 cm<sup>-1</sup>), en pastillas de KCl, en el Departamento de Química Inorgánica (Facultad de Farmacia UCM, Madrid).

Los espectros I.R. de estos complejos  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  estudiados en el presente trabajo, presentan las mismas características que hemos encontrado también para amplias series de complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , donde L = otros derivados de tiazol y/o derivados de benzotiazol (6, 16).

En definitiva, los derivados de tiazol y/o de benzotiazol no sustituidos con grupos –NH<sub>2</sub>, coordinan hacia el ión Rh(III), exclusivamente a través del átomo de nitrógeno del heterocíclico, quedando no implicado en el proceso de coordinación el átomo S (6, 8).

En los casos en los que los ligandos (L) poseen grupos –NH<sub>2</sub> exocíclicos, coordinan alrededor del catión Rh(III) exclusivamente a través de sus grupos –NH<sub>2</sub> exocíclicos, quedando no implicado en el proceso de coordinación el átomo N heterocíclico y el átomo S heterocíclico (6, 16).

*En definitiva, se repite el comportamiento, de los ligandos L (derivados de tiazol, benzotiazol) como ligandos monodentados hacia el catión Rh(III), ampliamente descritos en base a unos detallados espectros I.R. de los complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , donde L = derivados de tiazol y/o benzotiazol similares o idénticos a los descritos en este trabajo (6, 16).*

Todos los complejos presentan además una banda de absorción de intensidad moderada en el rango de frecuencias (340 – 310 cm<sup>-1</sup>), y asignada a las vibraciones de tensión Rh–Cl; esta banda está evidentemente ausente en los espectros I.R. de los ligandos puros (6, 16).

## 4. Ensayos antitripanosómicos "in vivo".

La actividad "in vivo" de los complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  sobre las ratas infectadas con 10<sup>6</sup> formas epimastigotas de *T. cruzi* (por vía i.p.) se ha realizando empleando lotes de 10 (diez) ratones de la cepa Balb/C de aproximadamente 25 g de peso medio, para cada complejo ensayado; también se ha mantenido un lote "Control" de 10 (diez) ratones (15).

A partir del séptimo día post infección con *T. cruzi*, se administraron (por vía i.p. como disoluciones en 2–5 % DMSO en el agua) unas determinadas dosis de cada complejo (siempre inferiores a las LD50 de los complejos), repitiéndose esta administración los días 11 y 15 post infección.

Las actividades antichagásica "in vivo" de los complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  se puede apreciar (15) según el tiempo de sobrevivencia de los animales "tratados" respecto al tiempo de sobrevivencia de los animales "control" (es decir el cociente T/C %). *Todos los animales que lograron sobrevivir 48 días post infección, fueron sacrificados, mostrando siempre en la sangre algunos parásitos, pero siempre en número inferior al que presentaban los ratones no tratados ("controles") el día 5, post infección –véase para más detalles la Tabla I–.*

*Sería interesante observar (véase la Tabla I) que la mayoría de estos complejos del Rh(III), catiónicos, produjeron valores T/C % notables (T/C ≥ 150 %) (15).*

Si bien la parasitemia persiste en todos los casos (el día 48 post infección), y se puede pensar que los complejos (al menos mediante este esquema de administración y bajo estas pautas de administración) no son curativos "in vivo" frente a las ratas infectadas con 10<sup>6</sup> formas epimastigotas de *T. cruzi*, en la autopsias de los animales "tratados" con todos estos complejos, no se observaron síntomas evidentes de la enfermedad de chagas (experimental), es decir esplenomegalia, hepatomegalia y edema parpebral (15).

Tomando en cuenta los resultados recientes de Craciunescu y colabora-

TABLA I

Efectos anti-*T. cruzi* "in vivo" para los nuevos complejos  $(Rh^{III}(L)_4Cl_2L^+Cl^-)$ .

| Complejos   | Superviviencia animales (T/C %) | Dosis total (mg/Kg) inferior al LD50 |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|
| $(Rh (Benzotiazol)_4 Cl_2^+ Cl^-)$                        | 180 %<br>(días 18)              | 200 mg/Kg                            |
| $(Rh (2 \text{ aminobenzotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$         | 160 %<br>(día 25)               | 325 mg/Kg                            |
| $(Rh (2 \text{ aminonaftotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$         | 140 %<br>(día 48)               | 165 mg/Kg                            |
| $(Rh (2 \text{ amino 6 etoxibenzotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$ | 160 %<br>(día 28)               | 80 mg/Kg                             |
| $(Rh (2 \text{ bromotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$              | 160 %<br>(día 36)               | 35 mg/Kg                             |
| $(Rh (2 \text{ mercaptobenzotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$      | 140 %<br>(día 15)               | 42 mg/Kg                             |
| $(Rh (2 \text{ aminomaftotiazol})_4 Cl_2^+ Cl^-)$         | 150 %<br>(día 20)               | 88 mg/Kg                             |

Observaciones: Ya que la LD50 de estos complejos está comprendida en el rango 360 – 600 mg/Kg (vía i.p. como disolución en 2-5 % DMSO en el agua), las dosis totales administradas fraccionariamente (3 inyecciones por cada complejo) fueron siempre inferiores a los valores LD50.

dores (4 – 9) [sobre la actividad antichagásica y/o anti *T. brucei*] de algunos nuevos complejos del Rh(III), Ru(III), Ir(II), Ru(II)], cabe preguntarnos si la administración de estos mismos complejos  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  discutidos en el presente trabajo por vía s.c. y como suspensiones en aceite o "tween" (para evitar posibles procesos óxido-reductores y/o hidrólisis), así como la inoculación de los animales con  $10^5$  parásitos) y la administración de los complejos a los 60 minutos después de realizar la inoculación, no llevaría con casi bastante probabilidad a la obtención de valores T/C % mayores, disminuciones importantes de la parasitemia todavía encontrada en la sangre de las ratas tratadas (el día 48); ya que según los criterios del mencionado "protocolo" un tiempo de sobrevivencia que dobla al de los controles y la falta de parasitemia el 8° día indican "Gran actualidad" para cualquier producto antitripanosómico.

En efecto, el ejemplo de estos métodos de administración, y de las pautas terapéuticas (pero sobre todo la administración de los complejos como suspensiones en aceite o "tween" a los 60 minutos de realizar la inoculación con  $10^5$  parásitos), según el "protocolo" empleado por el prestigioso Instituto antiparasitario alemán "Institute of Veterinary Medicine" Berlín

(Alemania), nos permitió encontrar (4 – 9) (frente a las ratas infectadas con *T. brucei*, *T. congolense* y/o otros tripanosomas) excelentes valores del tiempo de sobrevivencia (T/C %), así como en numerosos casos en que se pudo cualificar el efecto de nuestros diversos complejos del Rh(III), Ru(III), Pt(II), Ir(III), Pt(IV), como "efecto curativo, o de "gran actividad", ya que no se detectaba el día 8 (octavo) ningún parásito en la sangre de las ratas "tratadas" (siempre con dosis inferiores a las LD50 de las complejos – véase una serie de trabajos recién publicados por Craciunescu y colaboradores (7, 8).

En cuanto a la línea parasitaria *T. venezueliense* (variante disquinetoplásica del *T. evansi* en general, los complejos catiónicos del Rh(III) son menos efectivos respecto a la línea parasitaria *T. cruzi* ("in vitro") según datos de *N. ercoli* y Craciunescu (17). En efecto, estos mismos complejos arriba discutidos, para concentraciones muy elevadas (100 – 300  $\mu\text{g/ml}$ ) – en soluciones 2 – 5 % DMSO en el agua – producían inhibiciones "in vitro" del parásito *T. venezueliense* superiores al rango de 80 – 90 % (17, 18). El complejo más activo en esta línea de infección parasitaria, es decir  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  donde L = 2 aminobenzotiazol en una primera serie de experimentos "in vivo" (dosis de 150 mg/Kg, administración s.c. como suspensión en "tween" y/o aceite) no producía valores, T/C % superiores al 135 %, el día 8° post infección, persistiendo el día 5° post infección la parasitemia en la sangre de las ratas, si bien en menor cuantía respecto a las "controles".

La situación empeora aún más cuando se trabaja "in vivo" con las ratas infectadas ( $10^5$  parásitos por vía i.p.) con *T. gambiense*. Aún administrando todos estos complejos como suspensión en aceite y/o en "tween" a los 60 minutos después de realizar la inoculación, los valores T/C % no sobrepasan el 110 – 127 % (el día 8°), aún para dosis cercanas a la mitad de las dosis letales de cada complejo (LD50).

Convendría mencionar que, estos hechos parecen confirmar la gran resistencia que presentan la cepas de tripanosomas Africanos (a excepción del *T. brucei brucei*) (4 – 9, 19), a la actuación de los complejos catiónicos  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , (dónde L = derivado de tiazol, imidazol, sulfonamida, benzotiazol, piridina), y al mismo tiempo apuntan hacia el hecho de que la línea de infección parasitaria (*Tripanosoma cruzi*) parece el más sensible a la actuación de los complejos del Rh(III) pertenecientes a las estructuras iónicas  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$ , presumiblemente octaédricas. Estamos actualmente afianzando esta hipótesis de trabajo, ensayando nuevos complejos sintetizados por el Profesor Dr. D. G. Craciunescu, del Rh(III) de estructura también presumiblemente octaédrica, pero neutros (es decir  $[Rh^{III}(L)_3]^0$ ), tanto en España como en Venezuela, Inglaterra y Estados Unidos.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

Habiendo establecido el hecho de que la línea de infección parasitaria (ratón) *T. cruzi* es la más sensible a la actuación de los siete complejos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^+\text{Cl}^-$ , hemos realizado un estudio ultraestructural (Microscopía Electrónica) de las formas epimastigotas de *T. cruzi* (cultivo  $5 \times 10^5$  epimastigotas/ml tratadas durante 8 horas con concentraciones de  $10 \mu\text{g/ml}$  (en 2 % DMSO-agua) de los complejos del Rh(III). La fijación de las "placas" se hizo después de dejar otras 24 horas los complejos estando en contacto con los parásitos en presencia de 1 ml del glutaraldehído al 2 % en PBS (10-15).

Las muestras finales para el estudio de Microscopía Electrónica incluidas en resinas epoxi, se estudiaron con ayuda de un microscopio Electrónico Zeiss 1103 (X 10.000 – hasta X 18.000).

– Véase las figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8.

El complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4(\text{Cl}_2)^+\text{Cl}^-]$ , donde L = 2 mercaptobenzotiazol actúa alterando la cromatina del núcleo del *T. cruzi*, observándose su "compactación" y desplazamiento hacia la periferia. Sin embargo, no se encuentra alterado el DNA mitocondrial que permanece con su estructura típica de doble hélice. El citoplasma aparece con un número de condensaciones lipídi-

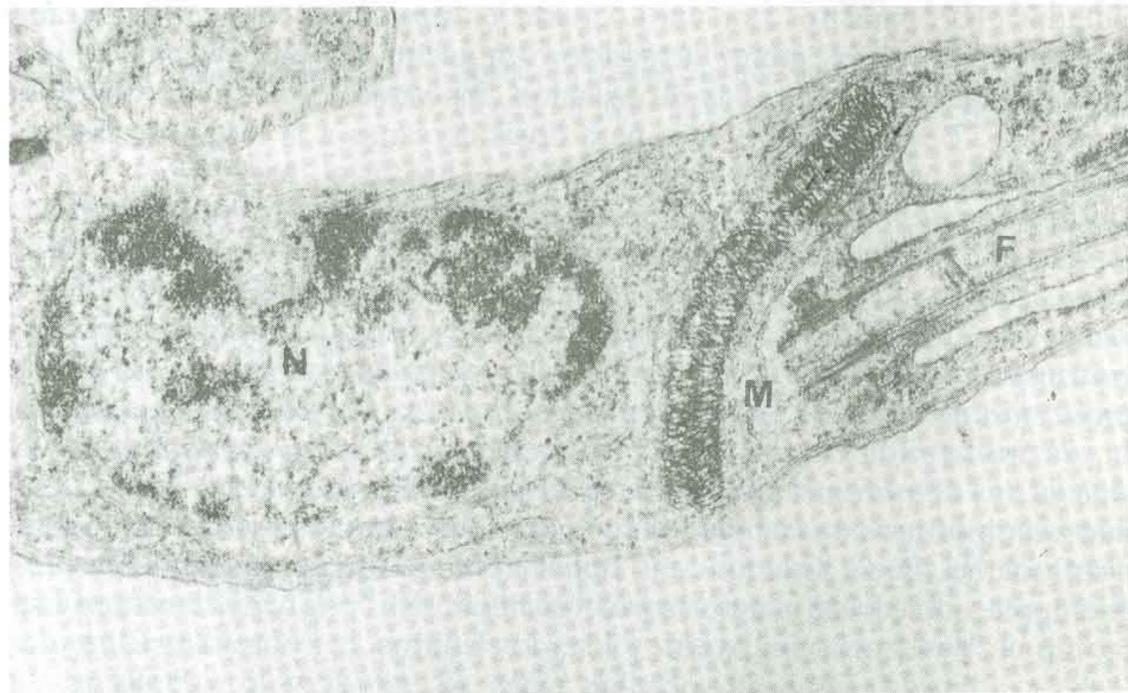


Figura 1.— Fotografía de M.E. (X 14.000) de un parásito *T. cruzi* (formas epimastigotas), no tratadas ("control").

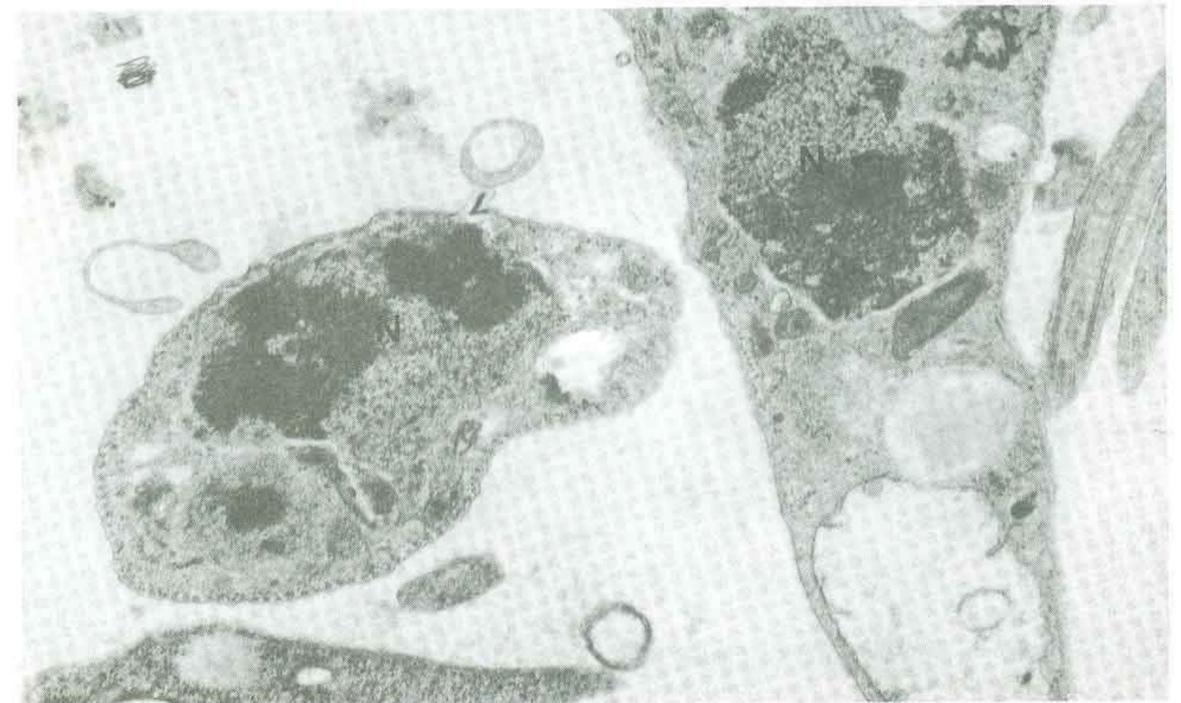
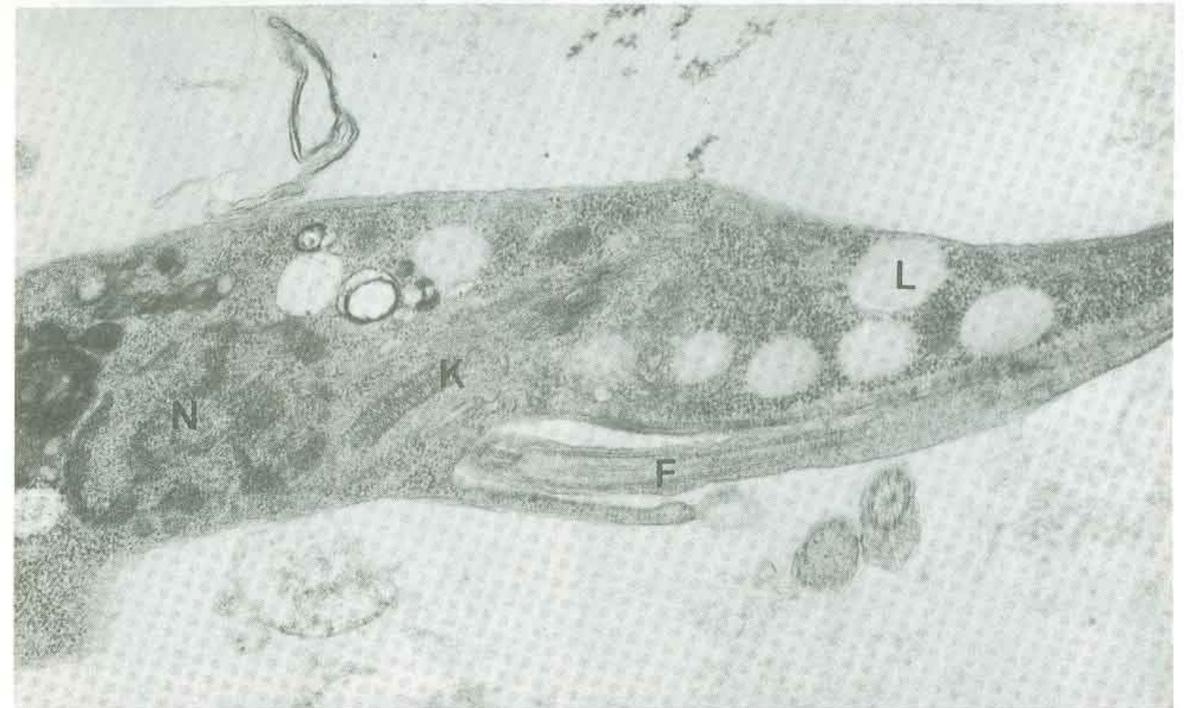


Figura 2.— Fotografías de Microscopía Electrónica (X 10.000) de los parásitos *T. cruzi* tratados con el complejo  $(\text{Rh}^{\text{III}}(2 \text{ mercaptobenzotiazol})_4\text{Cl}_2)^+\text{Cl}^-$ . Comprende dos fotos.

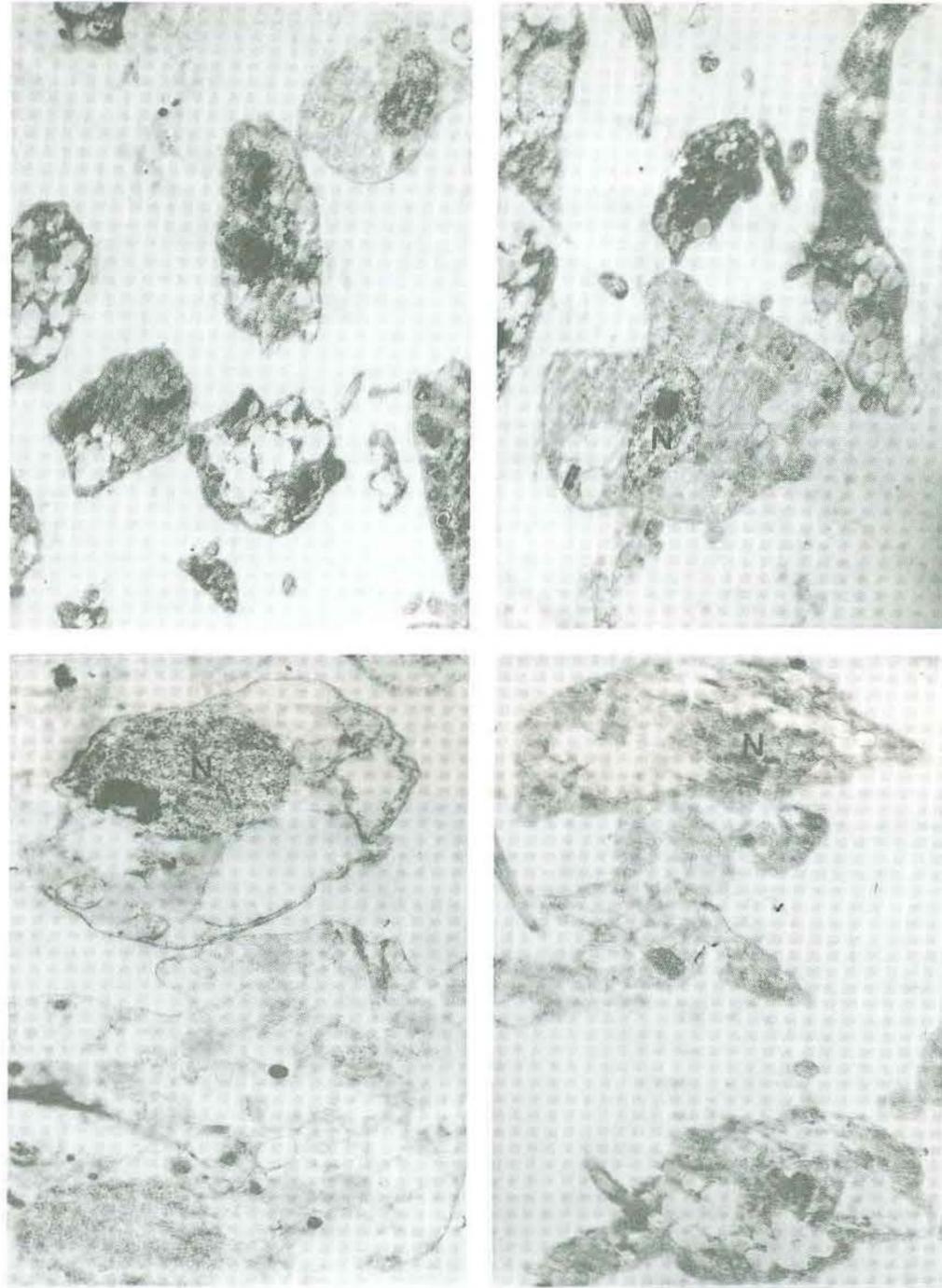


Figura 3.— Parásitos *T. cruzi* tratados con  $(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{benzotiazol})_4\text{Cl}_2)^+\text{Cl}^-$  (X 10.000).  
Comprende cuatro fotografías.

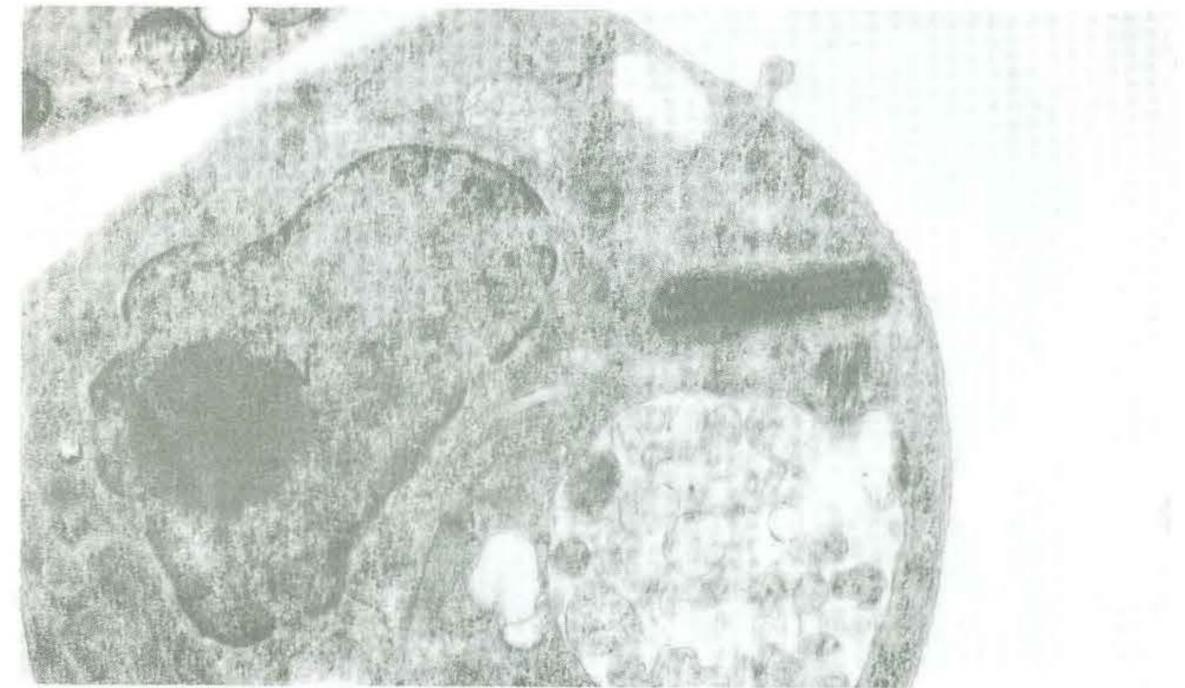
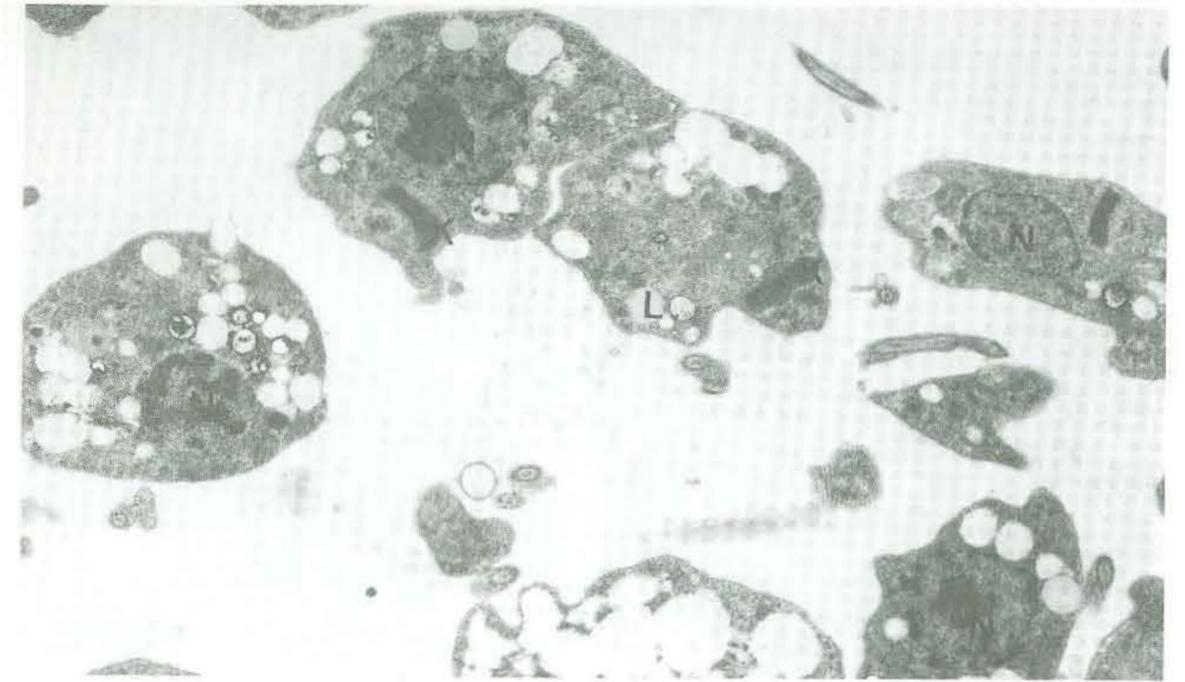


Figura 4.— Parásito *T. cruzi* tratado con  $(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{bromotiazol})_4\text{Cl}_2)^+\text{Cl}^-$  (X 40.000).  
Comprende dos fotografías.

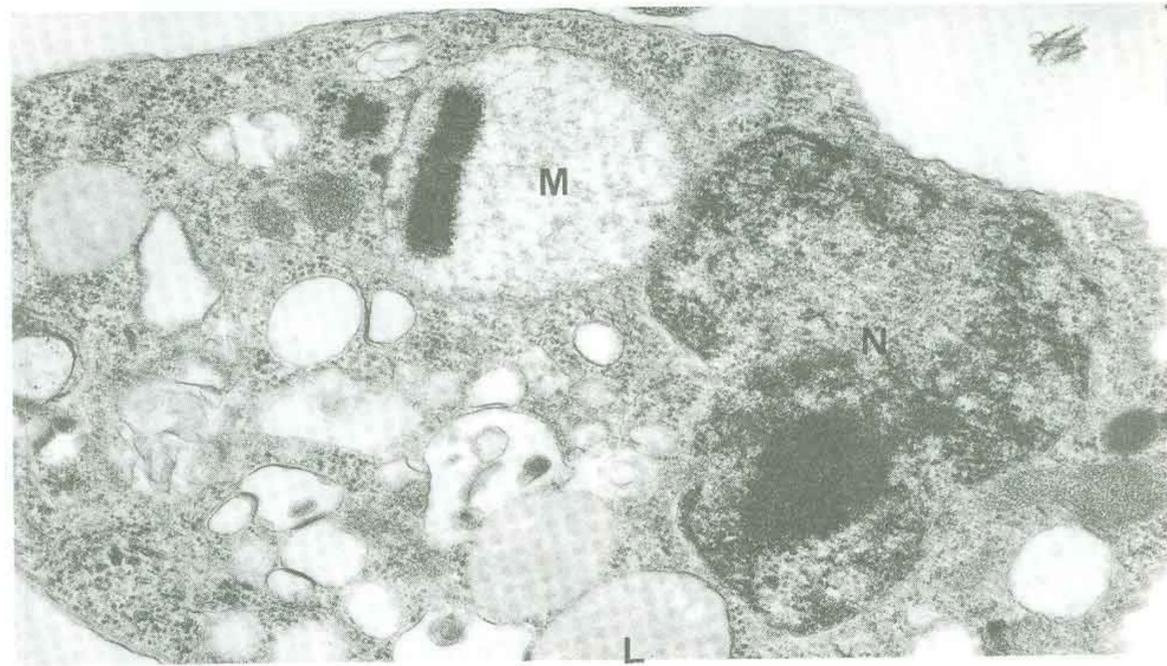


Figura 5.— Microscopía Electrónica (X 14.000) del *T. cruzi* tratada con  $\text{Rh}^{\text{III}}(2 \text{ aminoNaftotiazol})_4\text{Cl}_2^+\text{Cl}^-$ . Comprende dos fotografías.

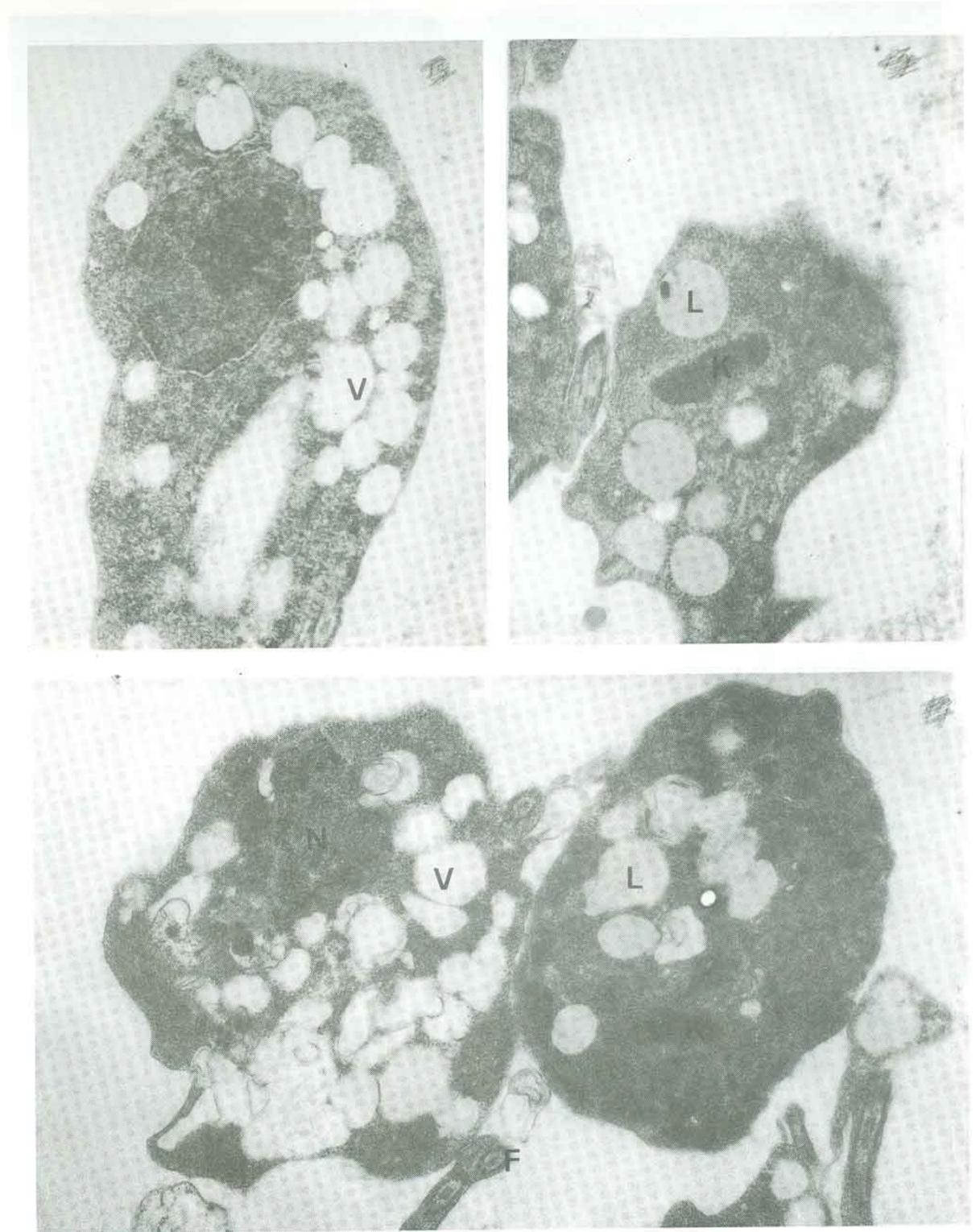


Figura 6.— Parásito *T. cruzi* (X 10.000) tratado con  $\text{Rh}^{\text{III}}(2 \text{ aminobenzotiazol})_4\text{Cl}_2^+\text{Cl}^-$ . Comprende 3 fotografías.

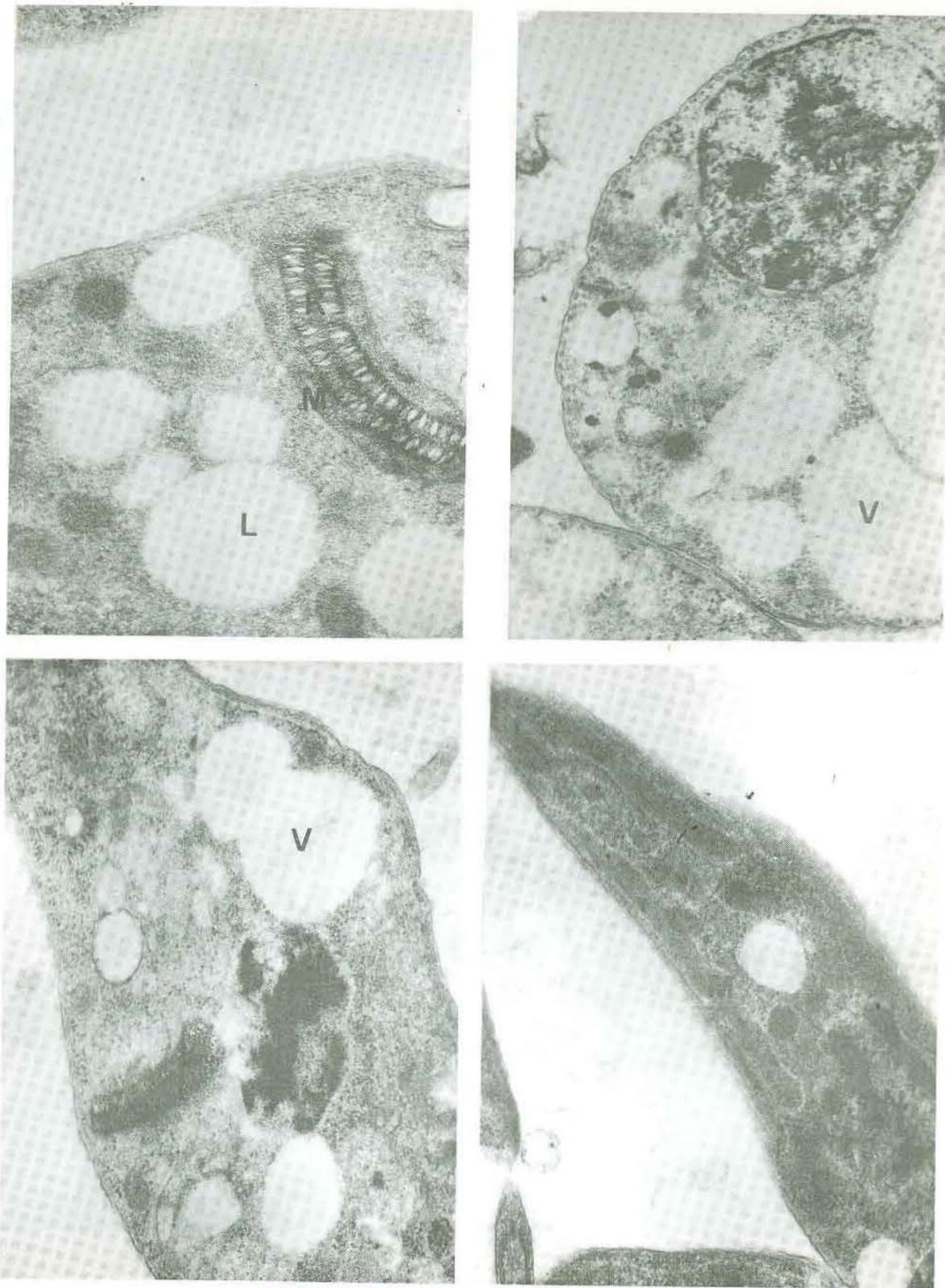


Figura 7.— Microscopía Electrónica (X 18.000) del parásito *T. cruzi* tratado con  $\text{Rh}^{\text{III}}$  (2 amino 6-etoxibenzotiazol) $_4\text{Cl}_2$  $^+\text{Cl}^-$ . Comprende cuatro fotografías.

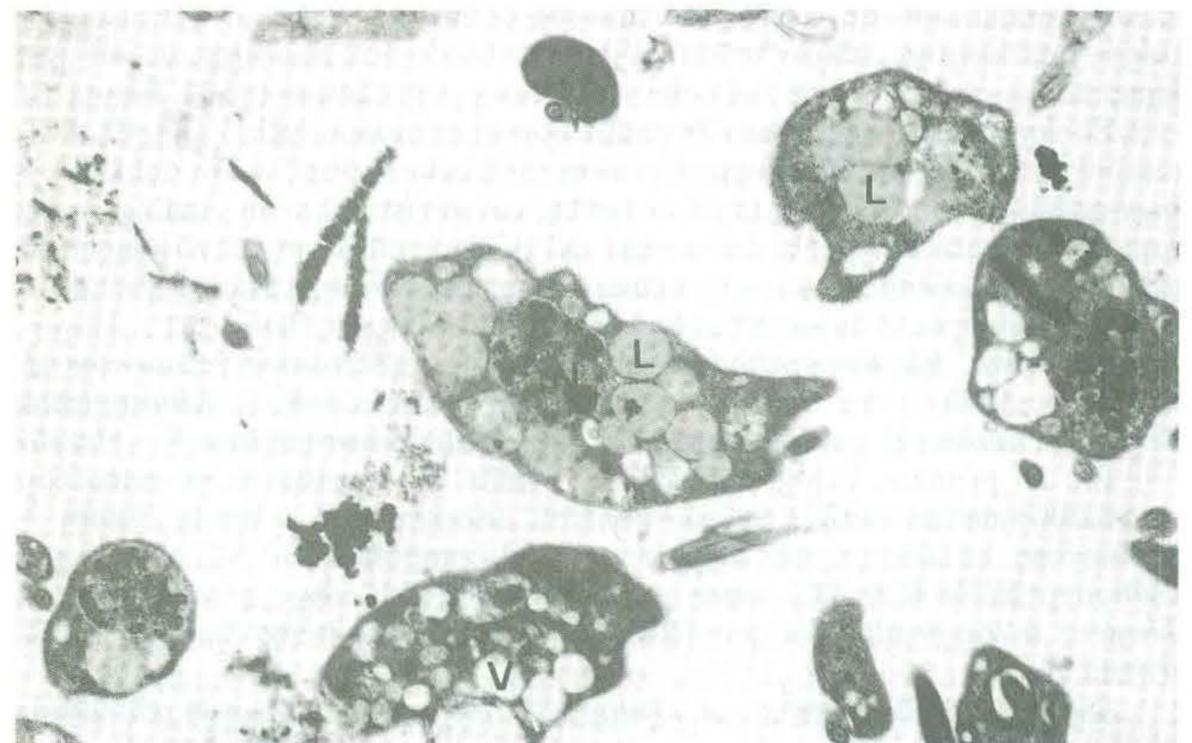


Figura 8.— Fotografía del parásito *T. cruzi* (X 18.000) tratado con  $\text{Rh}^{\text{III}}$  (2 cloro-6 metoxibenzotiazol) $_4\text{Cl}_2$  $^+\text{Cl}^-$ . Comprende dos fotografías.

cas anormales y abundantes vacuolas autofágicas (véase la Figura 2). Los parásitos *T. cruzi* tratados con el complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_3]^\dagger\text{Cl}^-$ , donde L = benzotiazol, presentan alterada totalmente su estructura, con la cromatina del núcleo condensada de forma anormal y dispuesta bien en su endosoma central o bien en la periferia del núcleo. El kinetoplasto igualmente se encuentra anormalmente condensado, y todos los parásitos (a las 8 horas de tratamiento) poseen un estado muy avanzado de degeneración con aumento notable de vacuolas autofágicas (véase la Figura 3).

El complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$ , donde L = 2 bromotiazol, induce en los parásitos *T. cruzi* una alteración en la disposición de la cromatina del núcleo, presentándose periféricamente y con un endosoma central. El kinetoplasto presenta una disposición anormal, observándose en el citoplasma un aumento del número de vacuolas autofágicas (véase la Figura 4).

Los parásitos *T. cruzi* tratados con el complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$ , donde L = aminonaftotiazol, presentan un núcleo con un endosoma y con la cromatina condensada en la periferia del núcleo. El DNA-K se presenta electrodenso y compacto, no observándose la disposición típica en doble hélice, y con la mitocondria degenerada. El citoplasma presenta un aumento anormal de vacuolas lipídicas y autofágicas (véase Figura 5).

Con el complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}]^\dagger\text{Cl}^-$ , donde L = 2 aminobenzotiazol, se observa que el núcleo de los parásitos *T. cruzi* aparecen también con la cromatina condensada de forma anormal así como DNA-K muy electrodenso y con una configuración "anormal" presentando los parásitos un enorme aumento en el número de vacuolas lipídicas y autofágicas (véase Figura 6).

En los parásitos *T. cruzi* tratados con el complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$ , donde L = 2 amino 6 etoxibenzotiazol no se afecta la disposición del DNA-K (que presenta con la configuración típica, característica) y en cambio se observa una afectación de la cromatina del núcleo que se puede visualizar alterada y disponiéndose de una manera anormal. El citoplasma presenta un aumento importante de vacuolas lipídicas y autofágicas (Figura 7).

*En todas las fotografías de Microscopía Electrónica (aumentos de 10.000 – 18.000) los símbolos N significan Núcleo; K – Kinetoplasto; M – mitocondria; L – cuerpo lipídico; V – vacuolas autofágicas; F – flagelo.*

En la primera fotografía (véase Figura 1) se observa la estructura (X 14.000) del parásito *T. cruzi* "control" (no tratado). En la Figura 8, se observan las alteraciones inducidas por el complejo  $[\text{Rh}^{\text{III}}(2 \text{ cloro-6 metoxibenzotiazol})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  sobre el parásito *T. cruzi* cuyos efectos con casi idénticos a los producidos por  $[\text{Rh}^{\text{III}}(2 \text{ amino-6 etoxibenzotiazol})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  (Figura 7).

*Según L.M. Ruiz-Pérez y A. Osuna (15, 20) se puede sacar la conclusión general de que en las formas epimastigotas de T. cruzi tratadas con los complejos iónicos del Rh(III), la característica ultraestructural más importante estaría determinada por una gran acumulación de vacuolas lipídicas, aparición de vacuolas autofágicas y una posterior citolisis del protozoo.*

*Si detallamos estas observaciones generales de Microscopía Electrónica de las formas epimastigotas [tratadas "in vitro" durante 8 horas con los siete complejos Rh (III)] con el fin de apreciar mejor el posible mecanismo de acción antitripanosómica de los complejos Rh(III), podemos pensar en el hecho de que los complejos  $[\text{Rh}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  alteran no solamente la cromatina nuclear (su disposición y su tamaño natural), sino también el tamaño y la disposición del nucleolo. Indudablemente el DNA del kinetoplasto aparece a veces electrodenso, pero no muestra los efectos que se observan en presencia de los complejos del Pt(II) de simetría molecular "cis", agentes alquilantes y/o intercalantes (15). Se puede interpretar la existencia de un gran número de vacuolas lipídicas y autofágicas así como los llamados "cuerpos mielínicos" como resultados de los procesos degenerativos y autofágicos del *T. cruzi* en presencia de estos complejos del Rh(III). También se puede suponer que todas las alteraciones que los complejos iónicos del Rh(III) inducen sobre el protozoo, pueden deberse a efectos indirectos, consecuencia de un bloqueo enzimático que impida la incorporación normal de la Timidina y de la Uridina, si bien no debe alterar de manera rápida la biosíntesis de proteínas (15, 24).*

Esto reforzaría la idea de que el mecanismo de acción antitripanosómica (formas epimastigotas de *T. cruzi*) es distinto (24) en el caso de los complejos iónicos del Rh(III), pertenecientes a las estructuras octaédricas  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  respecto al mecanismo de acción antitripanosómica desplegada por otros *antitumorales* [complejos cis-Pt(II)] donde se asignó una acción intercalante alquilante, sobre el DNA-K del *Tripanosoma cruzi* (13 – 15). *Todas estas impresiones quedan reforzadas por los recientes trabajos realizados por nosotros, en los que no se pudo poner de manifiesto ninguna interacción importante "in vitro" ante el DNA "puro" y los complejos  $[\text{Rh}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  (21). El estudio de la incorporación de los distintos aminoácidos, por parte de las formas epimastigotas *T. cruzi* en presencia de algunos complejos  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  y  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Br}_2]^\dagger\text{Br}^-$  apoya asimismo la hipótesis de que estos complejos de acción dual antitripanosómica y antitumoral poseen un interesante potencial inmunoestimulador, que adquiere especial interés pensando en el hecho de que los valores de sus LD50 oscilan entre 300 – 650 mg/Kg (ratas) (15, 18).*

Craciunescu y colaboradores describieron los bajos potenciales nefrotóxicos, hepatotóxicos y/o hematotóxicos (para 1/2 de su LD50), que presentan tanto los complejos iónicos de estructura general  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_4\text{Cl}_2]^\dagger\text{Cl}^-$  como los complejos neutros del Rh(III), es decir  $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_3]^\circ$  (6, 7).

Un primer estudio exploratorio de los potenciales hepatotóxicos, nefrotóxicos y hematotóxicos de estos complejos, indican que administrando 1/2 de su LD50 a las ratas Wistar (lotes de 6 ratas para cada complejo) la elevación de los contenidos mg % urea, mg % creatinina (a las 192 horas), y del cociente L/N (L = linfocitos, N = neutrofilos) medidas en la sangre de las ratas de la cepa Wistar también a las 192 horas, no aumentan en más de un

1 — 5 % indicándose así un escaso-nulo efecto nefrotóxico, ni tampoco producen bajas importantes (por debajo del 30 % en los cocientes L/N), comprobándose de esta manera el escaso potencial hematotóxico de estos complejos del Rh(III) iónicos —véase la Tabla II—.

TABLA II

Evaluación de los potenciales hematotóxicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos de los nuevos complejos  $[Rh^{III}(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  (para 1/2 de sus valores LD50).

|                         | % mg creatina | % mg urea | LN    | GOT   | SCOT ("SGPT") |
|-------------------------|---------------|-----------|-------|-------|---------------|
| Controles               | 0,621         | 42,67     | 6,15  | 51,21 | 17,90         |
| $(Rh(L_1)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,629         | 42,75     | 6,063 | 76,4  | 22,05         |
| $(Rh(L_2)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,631         | 43,82     | 6,041 | 68,3  | 19,39         |
| $(Rh(L_3)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,644         | 42,78     | 6,052 | 68,51 | 22,87         |
| $(Rh(L_4)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,647         | 44,02     | 6,058 | 63,5  | 22,91         |
| $(Rh(L_5)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,703         | 42,63     | 6,172 | 69,12 | 35,11         |
| $(Rh(L_6)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,655         | 42,75     | 6,090 | 68,32 | 35,02         |
| $(Rh(L_7)_4Cl_2)^+Cl^-$ | 0,671         | 42,77     | 6,071 | 75,12 | 36,02         |

Observaciones:  $L_1$  = benzotiazol;  $L_2$  = 2 aminobenzotiazol;  $L_3$  = 2 aminonaftotiazol;  $L_4$  = 2 amino-6-etoxibenzotiazol;  $L_5$  = 2 bromotiazol;  $L_6$  = 2 mercaptobenzotiazol;  $L_7$  = 2 aminonaftotiazol. Se administra siempre (lotes de 6 ratas Wistar) 1/2 de la LD50 de cada complejo. Las medidas en la sangre se hicieron a las 192 horas. Una elevación del más del 10–25 % en los niveles de los parámetros del funcionamiento renal y hepático (sobre todo si se sobrepasa el 25 % en el caso de los niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT" (o "GPT")), son inicios claros de afectación renal y respectivamente hepático.

Como se puede observar en la Tabla II, el hecho de que la hematotoxicidad de estos complejos del Rh(III) es nula (se produce mínimos descensos de los valores L/N = 6,1 para los "controles"), en el caso de los animales tratados con 1/2 de los LD50 de los complejos de Rh(III), parece también permitir suponer que el mecanismo de acción de los complejos del Rh(III) es distinto de los mecanismos de acción de los agentes antitumorales —complejos del Pt(II)—, alquilantes dotados también de actividades antitripanosómicas [como el  $cis-Pt(NH_3)_2(Cl)_2$  "Neoplatin" y el "Carboplatin"], que producían, debido a sus intensos efectos inmunosupresores descensos enormes del cociente L/N (en el rango 1,6 — 2,3), frente a los "controles" cuyos valores L/N oscilaron entre 6,1 — 6,3 (9, 22). Esto reforzaría también las observaciones [comunicadas a título privado en el año 1988 al Profesor Dr. D. G. Craciunescu por el Profesor Dr. S. Croft (Londres, Inglaterra)] (23) en el sentido de que se debe tener muy presente el gran potencial inmuno-

estimulador de algunos de los complejos iónicos del Rh(III) de estructura general  $[Rh^{III}(L)_4X_2]^+X^-$  ( $X = Cl^-$  o  $Br^-$ ), cuyos valores LD50 > 300 — 600 mg/Kg (6, 15).

A continuación estudiaremos, con más detalles los perfiles nefrotóxicos (datos histopatológicos) de los complejos del Rh(III) iónicos, así como sus efectos hepatotóxicos (datos histopatológicos), ya que aparecen suaves elevaciones en los valores "SGOT" y "GOT" que indican una leve hepatotoxicidad (20-25 % elevación de los valores enzimáticos "GOT" y "SGOT" (medidas en unidades de actividad enzimática).

Tomando en cuenta el hecho de que el factor limitante en lo relacionado a los efectos tóxicos, secundarios, de todos los complejos de grupo del Platino [al que pertenece también los complejos del Rh(III) es la nefrotoxicidad, se ha administrado, en una segunda serie de experimentos 3/4 de las LD50 de los complejos (por vía s.c. a unos lotes de 6 ratas para cada complejo); no observándose aún en esta situación de administración de dosis extremadamente elevadas el hecho de que la función renal sea comprometida.

En efecto (respecto a los controles), en este segundo esquema de administración los contenidos medios en la sangre, % mg urea; % mg creatinina; % mg ácido úrico, no sobrepasan en un 5-6 % los valores correspondientes de los controles; este hecho constituye una clara manifestación de la falta de nefrotoxicidad de todos los complejos del Rh(III) estudiados en el presente trabajo. Aún más, tampoco se alteran los potenciales hematotóxicos, respecto a los controles [si se administra 3/4 de las LD50 de los complejos y lo medido del cociente L/N se hace en el rango a las 192 h], ya que dicho cociente no desciende en  $\pm 1-1,5$  % respecto a los controles, lo que vuelve a confirmar también el nulo potencial hematotóxico de los complejos  $[Rh(L)_4Cl_2]^+Cl^-$  estudiados en este trabajo, comprobándose además el hecho de que a diferencia de los complejos del platino [Pt(II), Pt(IV)] de acción dual [antitumoral y antitripanosómico], no se trata de agentes inmunosupresores. Para todos estos experimentos se emplearon lotes de ratas Wistar (6 animales) para cada complejo, y todos los complejos fueron administrados vía s.c. como suspensión en "aceite" y/o "Tween".

Administrando una dosis muy elevada (igual al LD50 del complejo más activo  $[Rh^{III}(benzotiazol)_4Cl_2]^+Cl^-$ ), por vía s.c. como suspensión en aceite (LD50  $\cong 605$  mg/Kg) se observa (a las 192 horas) una elevación del enzima "GOT" del orden de 32 % y una elevación del enzima "SGOT" (en las sangres de las ratas) del orden de 35 % respecto a los "controles". Según A. M. Guarino y colaboradores (25) de estos resultados no se puede deducir sino un efecto hepatotóxico moderado. El estudio de microscopía óptica y electrónica de los hígados de las ratas (6 ratas de las cepas wistar) tratadas con el complejo  $[Rh^{III}(benzotiazol)_4Cl_2]^+Cl^-$  en dosis muy elevadas (equivalentes al valor LD50  $\cong 605$  mg/Kg) vuelve a confirmar los datos que indican las medias de los parámetros "GOT" y "SGOT", en el sentido de que se puede observar la existencia de cortes de hígado edemas focales (no generalizados),

y un cierto engrosamiento de la cápsula de Bowman, *pero ni se observaron inclusiones densas a nivel mitocondrial ni aparición de mielina, ni un enorme (importante) engrosamiento de la cápsula de Bowman*, como en el caso de los complejos "Carboplatin" "Neoplatin" y otros cis-complejos del Pt(II) (26). Podríamos por lo tanto poner una vez más de relieve, también la baja moderada toxicidad hepática de algunos complejos del Rh(III), de estructura octaédrica, comparada con los agentes duales (complejos del Pt(II)) aún en estas situaciones límite (administración de dosis *no fraccionadas* muy elevadas, equivalentes al LD50).

Según los datos de microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones (X 420), tratadas con una gran cantidad del complejo (equivalente a si LD50, que es  $LD50 \cong 605 \text{ mg/Kg}$ ), a las 240 horas se observan importantes lesiones renales. (Véase la Figura 9 que corresponde a las microfotografías 16, 17, y 18) y la Figura 10 (que corresponde a las microfotografías 19, 20 y 21), correspondiendo esta última figura a la administración fraccionada (a las 24 horas y a las 48 horas de la LD50).

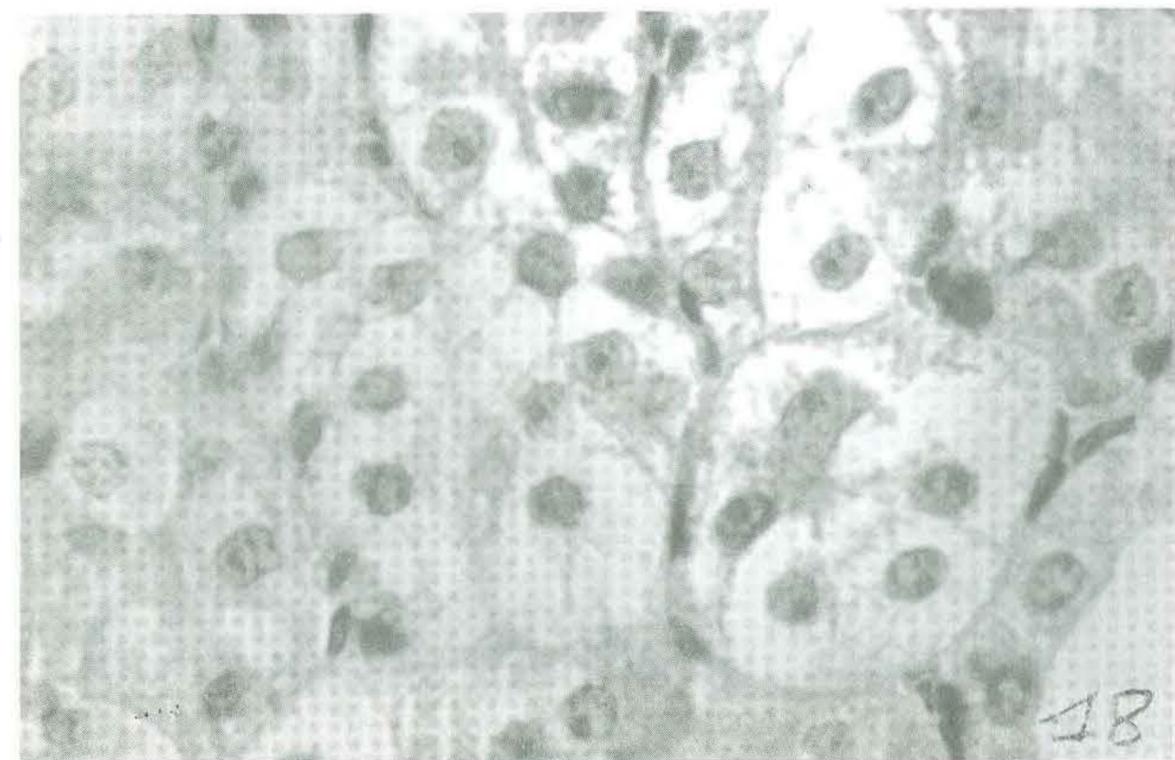
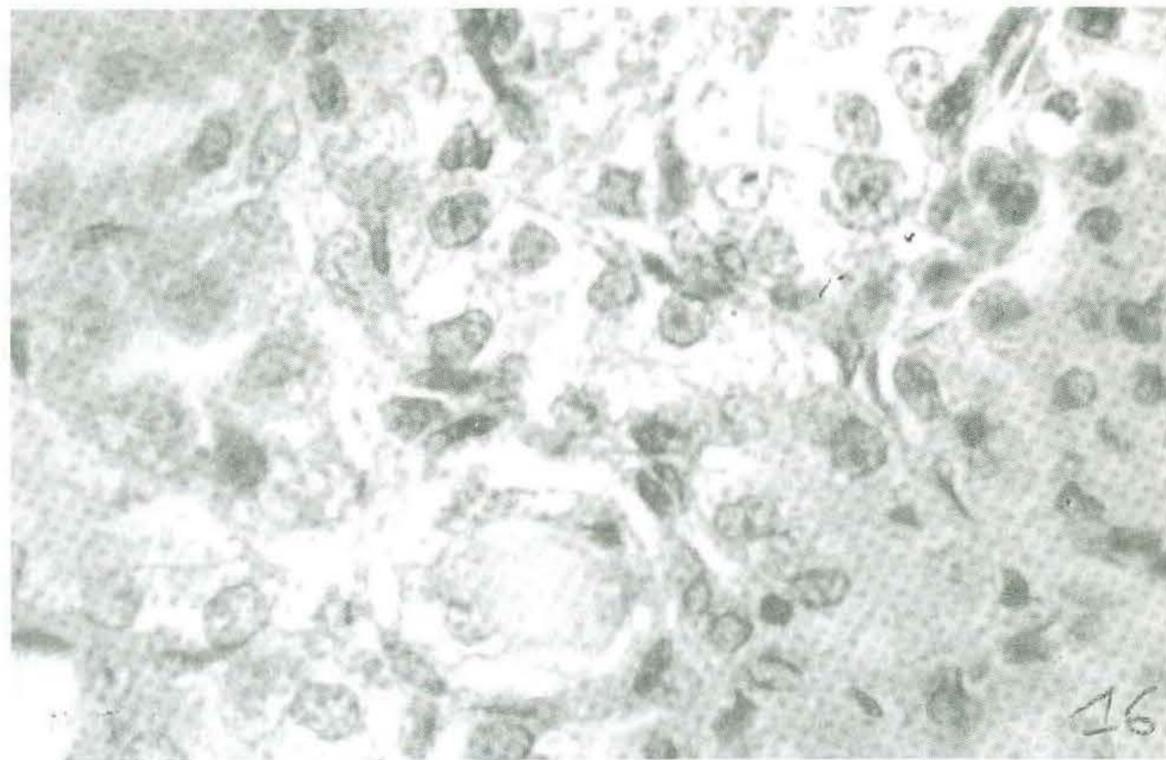


Figura 9.— Datos de microscopía óptica (X 420) de los riñones de las ratas que recibieron la LD50 (605 mg/Kg) en una sola inyección (240 horas). Comprende las fotos 16, 17, y 18.

Figura 9.— (Continuación)

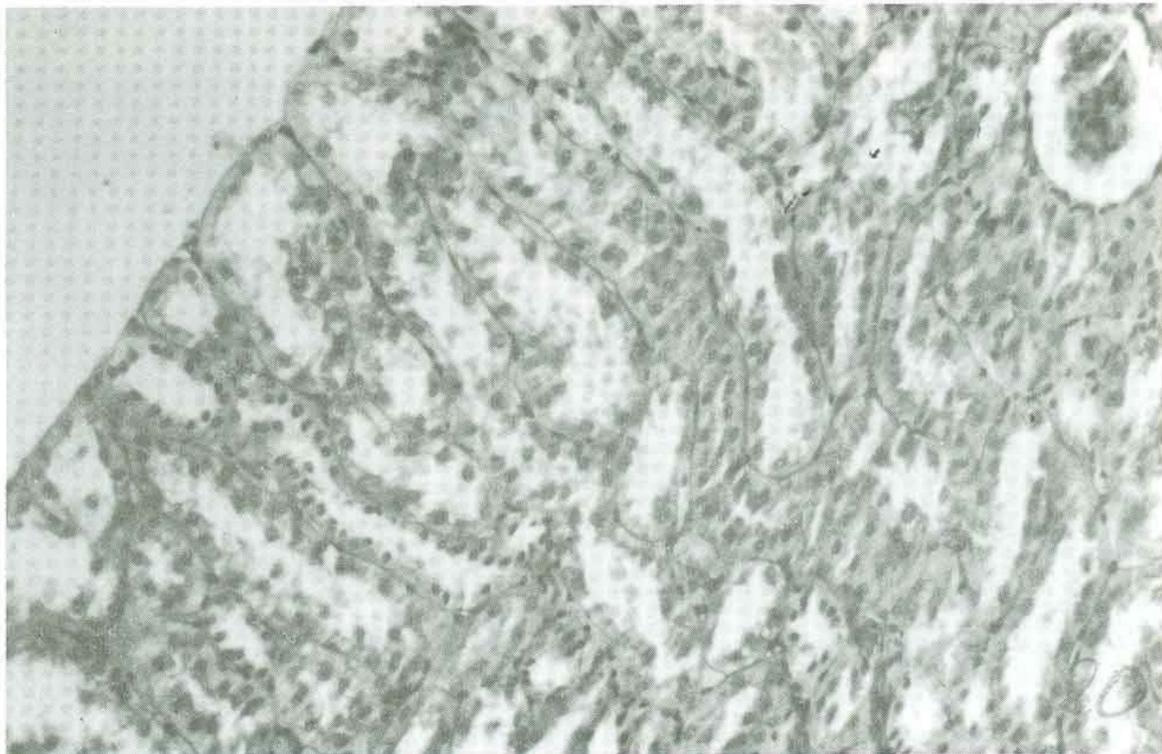
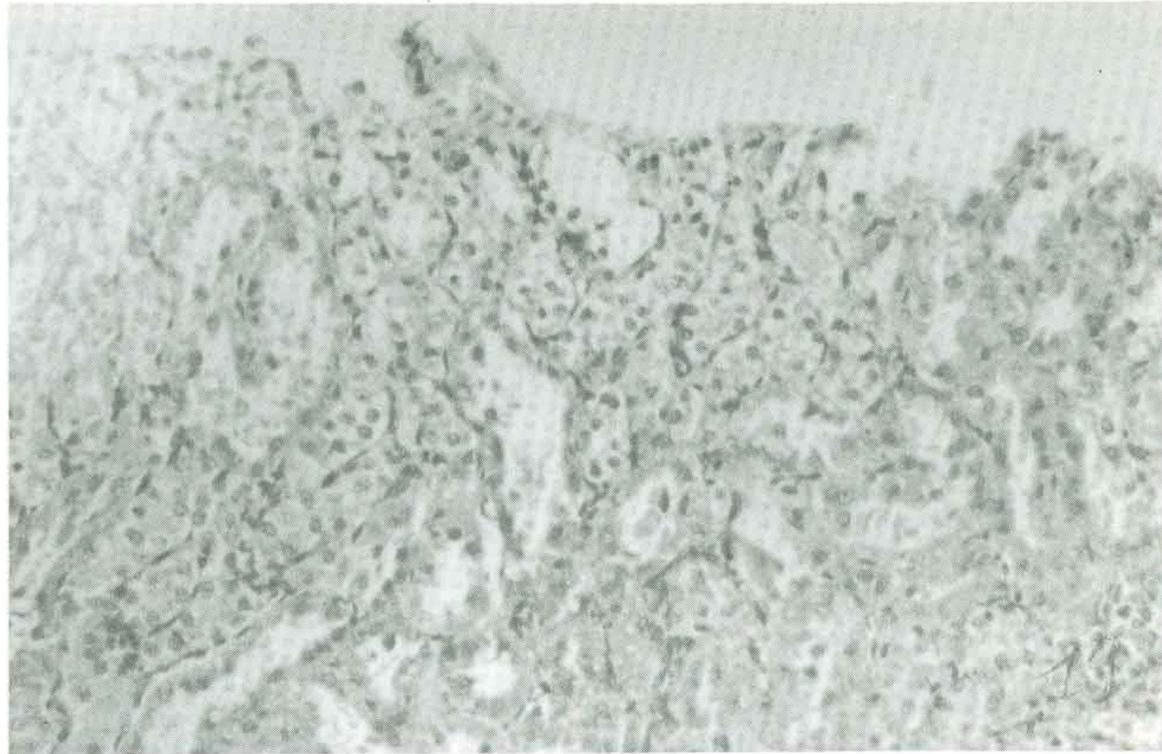


Figura 10.— Datos de microscopía óptica (X 420) de los riñones de las ratas que recibieron la LD50 (605 mg/Kg) en 2 inyecciones (resultados a las 240 horas). Comprende las fotos 19, 20 y 21.

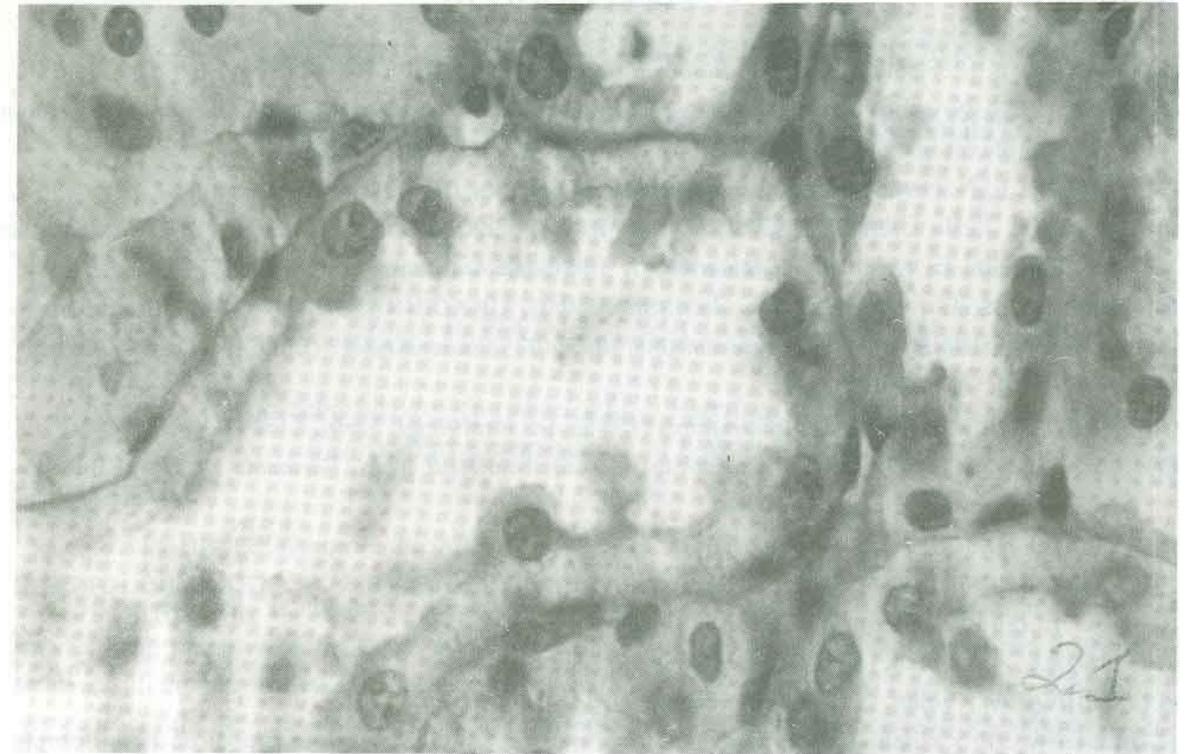


Figura 10.— (Continuación).

En efecto las lesiones degenerativas de las células epiteliales tubulares son bastante intensas, pudiendo ser clasificadas como “degeneración hidrópica” (véase las microfotografías 16, 17 y 19 de las Figuras 9 y 10), siendo en algunas células tan intensa que las mencionadas lesiones toman un aspecto “Balonizado” e hinchado; produciéndose una reducción de la luz del túbulo que a su vez está ocupado por una masa eosinófila acelular amorfa que corresponde al aparato de microvellosidades del ribete en cepillo (tal como se detalla en la fotografía 18). En el caso de la administración fraccionada de la dosis LD50, (a las 24 horas y a las 48 horas), los datos de microscopía óptica de los riñones de las ratas Wistar (véase Figura 10, que corresponde a las fotografías 20 y 21), las lesiones son similares, sólo que menos intensas, respecto a la situación de referencia (administración de la LD50 en una sola inyección y examen histopatológico de los riñones a las 240 hora después de administrar el complejo).

#### IV AGRADECIMIENTOS

El profesor Dr. D. G. Craciunescu agradece a las Compañías “Platinum Rustenburg Mines” (Suráfrica) y “Johnson-Matthey Ltd” (Inglaterra) por las sales de  $\text{Na}_3[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cl}_6]$  y  $\text{K}_3[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cl}_6]$  recibidas gratuitamente:

## V. BIBLIOGRAFIA

- (1) FARRELL, N. y colab. (1984) *J. Biochem. Pharmacology* 33:961-971.
- (2) FARRELL, N. y colab. (1983) Ponencia presentada al "The Fourth Int. Congress on Platinum complexes in cancer Chemotherapy" (Vermont, USA, Julio, 1983).
- (3) FARRELL, N. (1986) Comunicación privada al Profesor Dr. D. G. Craciunescu.
- (4) SCORZA, J. B., CRACIUNESCU, D., RIVERA, P., DOADRIO LOPEZ, A. (1988) Artículo en imprenta en "Archivos de Malariología y Sanidad Ambiental" (Venezuela).
- (5) DREYFUSS, G., GAYRAL, G., LOISSEAU, PH, CRACIUNESCU, D. (1987) Comunicación presentada al "Congress International sur les Trypanosomiasis" (Limoges, Francia, Octubre, 1987).
- (6) CRACIUNESCU, D. G. y colaboradores (1985) *An. Real Acad. Farm.* 51:241-268.
- (7) CRACIUNESCU, D. G. y colaboradores (1988) *Anal Real Acad. Farmacia* 54:1645; *Ibid Anal Real Acad. Farmacia* 54:46-49.
- (8) CRACIUNESCU, D. G. y colaboradores (1987) *An. Real Acad. Farmacia*, 53:205-232.
- (9) CRACIUNESCU, D. G., FURLANI, A. SCARCIA, V. GHIRVU, C. y PARRONDO IGLESIAS, E. (1987) *Acta Farmacéutica Fennica* 96:157-166.
- (10) OSUNA, A. y colab. (1986). *Drug Research* 36 (1) 13-16.
- (11) OSUNA, A. y colab. (1988) *Drug Research* 38 (1) 312-314.
- (12) OSUNA, A. y colab. (1985) Ponencia presentada al "Congreso Internacional de Parasitología" (Ankara, Turquía, Septiembre, 1985).
- (13) RUIZ PEREZ, L. M. y colab. (1987) *Tropical Medicine & Parasitology* 38:45-48.
- (14) RUIZ PEREZ, L. M. y colab. (1987) *J. Parasitology* 73 (2), 272-277.
- (15) RUIZ PEREZ, L. M. (1985) Tesis Doctoral (Granada, España). Dirigida por el profesor D.A. Osuna.
- (16) CRACIUNESCU, D. G. y colab. (1981) *Anales de Química* 77b, 5-9; *Ibid Inorganic Perspectives in Medicine* (1978) 1:223-231.
- (17) CRACIUNESCU, D. ERCOLI, N., D'ALLOYA, M. G., GINDICE, G. (1983) Ponencia presentada al "Congreso Internacional de Química Terapéutica" (Pamplona, España, Septiembre, 1983).
- (18) ERCOLI, N. Comunicación privada al Profesor Dr. D.G. Craciunescu (1984).
- (19) CRACIUNESCU y colab. (1987) Ponencia presentada al "Congreso Internacional de Quimioterapia" (Santiago de Compostela, España, Septiembre, 1987).
- (20) OSUNA, A. (1985) Comunicación privada al Profesor Dr. D. G. Craciunescu.
- (21) LOPEZ LOPEZ, M. C. RUIZ PEREZ, L. M., CRACIUNESCU, D., OSUNA, A., RUIZ PEREZ L. M., DOADRIO, A. y ALONSO, C. (1986) *Chemical Biological Interactions* 59:99-111.
- (22) CRACIUNESCU, D. G. (1986). *An. Real Acad. Farmacia* 52:45-64.
- (23) CROFT, S. Comunicación privada al Profesor D. G. Craciunescu (Julio de 1988).
- (24) WILLIAMSON, J. (1987) Comunicación privada al Profesor Dr. D.G. Craciunescu.
- (25) GUARINO A. y colab. (1979) *Cancer Research* 39:2204-2210.
- (26) GASTON DE IRIARTE, E. Comunicación privada al Profesor Dr. D. G. Craciunescu (1987).

Recibido: 14 Octubre 1988.

## Influencia del diluyente en la detección de microorganismos en medicamentos tópicos.

por

C. J. PLAZA, M.C. DE LA ROSA, M.L. GARCIA ARRIBAS y M.A. MOSSO

*Departamento de Microbiología.— Facultad de Farmacia,  
Universidad Complutense.— 28040-Madrid.*

### RESUMEN

Se ha estudiado la influencia de algunos diluyentes en la detección de la contaminación microbiana de medicamentos hidrófilos de administración tópica. Los diluyentes empleados han sido triptona sal con diferentes concentraciones de polisorbato 20 y 80 y caldo TAT (triptona, azolectina y polisorbato). Para detectar la contaminación bacteriana y fúngica se han utilizado los métodos de recuento en placa y NMP, y se han investigado los siguientes microorganismos: *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. El diluyente más adecuado para este tipo de productos fue una disolución de triptona sal que contenía 10 % polisorbato 80.

**Palabras clave:** Medicamentos tópicos.— Microorganismos.— Diluyente.

### SUMMARY

**Influence of diluent on the microbial analysis of topical drugs.**

It has been studied the influence of some diluents (tryptone-salt solutions with different rates of polysorbate 20 and 80, besides TAT (tryptone, azolectine polysorbate) broth on the detection of the microbial contamination of hydrophilic topical drugs. The plate and MPN methods have been used for the bacterial and fungal counts. Detection of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* has also been performed. Having regard to our results, the most useful diluent for this kind of products is tryptone-salt solution containing 10 % of polysorbate 80.

**Key words:** Topical drugs.— Microorganisms.— Diluent.

### INTRODUCCION

El estudio de la contaminación microbiológica de los productos farmacéuticos de aplicación tópica se enfrenta con grandes inconvenientes, como la falta de métodos exactos, contrastados y normalizados, la distribución