

Survey in the Pharmacies of Puerto de Santa María and disputes with the Colegio de Boticarios de Sevilla: M. Teresa López Díaz y Consolación Martínez García	485
Academic News	501

**Estudio de las actividades farmacológicas duales "in vivo"
(antitripanosómicas y antitumorales) y de las toxicidades de
algunos nuevos complejos neutros del Iridio (III).**

D. G. CRACIUNESCU*, C. MOLINA, J.C. DOADRIO-VILLAREJO,
M.T. GUTIERREZ RIOS, M.P. ALONSO, E. PARRONDO IGLESIAS,
M.I. DE FRUTOS, A. DOADRIO LOPEZ

*Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de
Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España)*

E. GASTON DE IRIARTE

*Departamento de Urología. Facultad de Medicina. Universidad
Autónoma de Madrid, 28034 - Madrid (España).*

G. CERTAD-FOMBONA

*Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas
(Venezuela)*

C.I. GHIRVU

*Departamento de Química Física. Facultad de Tecnología Química. IASI
6600 (Rumania)*

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis y la caracterización físico-química de 27 nuevos complejos neutros de estructura octaédrica del Iridio (III), pertenecientes a la estructura general $(Ir^{III}(L)_3)^0$, donde L = derivados de ditiocarbamato y/o xantano. Los nuevos complejos han sido valorados "in vitro" frente a los tumores ascíticos de Ehrlich, S-180 líquido, ascítico de Landschutz y P-388, así como frente a las ratas infectadas con T. evansi (venezueliense), T. evansi (India), T. congolense, T. equiperdum. El complejo más activo (donde L = pirolidina ditiocarbamato) ha sido estudiado (para valorar su potencial nefrotóxico para 1/2 su LD50) mediante datos de microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones (a las 192 y 360 horas). La toxicidad de todos los complejos se ha valorado (a las 192 horas después de administrar a las ratas 1/2 LD50) mediante la medida de los

*Autor al que debe enviarse toda la correspondencia.

parámetros sanguíneos % mg creatinina, % urea, niveles enzimáticos "SGOT" y "GOT", cociente L/N (L = Linfocitos, N = Neutrófilos). Se ha valorado el posible mecanismo de acción antitripanosómica de algunos complejos ("in vitro") mediante microscopía electrónica de transmisión, sobre *T. evansi*, a unas concentraciones de 1-10 µg/ml (24 horas y 48 horas).

Palabras clave: Complejos del Ir (III).- Actividades antitumorales.- Actividades antitripanosómicas.- Toxicidades.- Microscopía óptica y electrónica.

SUMMARY

The dual pharmacological activities (trypanocidal and antitumour) and toxicities of the new neutral Iridium (III) complexes

In this paper we reported the synthesis and physicochemical characterization of 27 new Iridium (III) complexes, formulated as $(Ir^{III}(L)_3)^0$ (where L = dithiocarbamates or xanthates derivatives), that is as octahedral and neutral Ir(III) complexes. The new Ir(III) complexes are assayed "in vivo" against ascitic Ehrlich tumours, S-180 liquid tumours as well as against Landschutz ascitic and P-388 liquid tumours. Their antitrypanocidal effects were studied on the rats infected with *T. evansi* (venezueliense), *T. evansi* (India), *T. congolense*, *T. equiperdum*. The toxicity of all the Ir(III) complexes was measured after administering 1/2 of their LD50 at 192 hours; % mg creatinine, % Urea, "SGOT" and "GOT" enzymatic levels and L/N ratio (L = Lymphocytes, N = Neutrophils) were determined in the blood of the "Swiss white mice". We performed also a histological study (optical microscopy) of the kidneys of the rats which received (at 192 hours and at 360 hours) 1/2 LD50 of the most active complexes, that is $(Ir^{III}(L)_3)^0$ where L = pyrrolidine dithiocarbamate. E. M. studies were performed on the *T. evansi* treated ("in vitro") with the most active complexes, for 24-48 hours at 1-10 µg/ml concentration ranges.

Key words: Iridium (III) complexes.- Antitumour activities.- Trypanocidal effects.- Toxicities.- Optical and electronic microscopy.

I. INTRODUCCIÓN

Si bien las primeras investigaciones sobre la actividad farmacológica dual "in vivo" (antitumoral y antitripanosómica) de los complejos del grupo del platino, iniciadas en Brasil por N. Farrell en el período 1982-1984 (1.3), pusieron de manifiesto posibles mecanismos de acción antitripanosómicos de algunos antitumorales suaves (complejos del Rh(III), Pt(IV), Ru(III)), *exclusivamente frente a las cepas de T. rhodesiense*, *únicamente los grupos de investigación afincados en España (D. Craciunescu y colaboradores, A. Osuna y colaboradores, L.M. Ruiz Pérez*

y colaboradores) (4-11) realizan un exhaustivo estudio antitripanosómico "in vitro" e "in vivo" con los complejos del Rh(III), Rh(IV), Os(II), Os(IV), Os(III), IR(II), IR(I) e IR(IV), así como con los complejos del Pt(II) y Pt(IV) frente a unas amplias series de tripanosomas africanos y tripanosomas americanos, de interés en las patologías humanas (enfermedad de Chagas, "Kala-Azar") y/o veterinarias (T. brucei brucei, T. congolense, T. equiperdum) (4-11).

Recientemente, Craciunescu y colaboradores (4,12) estudiaron los interesantes efectos duales "in vivo" (antitumorales y anti-*T. brucei brucei*) de algunas nuevas series de complejos del Ir(II) y del Ir(I) con ligandos derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos (4, 12). En este trabajo estudiamos por primera vez los complejos neutros y octaédricos del Ir(III) como agentes potenciales antitripanosómicos "in vivo"; en cuanto al estado de oxidación Ir(III), la mayoría de los trabajos publicados por otros autores indican su falta de potencial antitumoral (debido a la gran "inercia cinética" de estos complejos), a excepción precisamente de algunos complejos neutros $(Ir^{III}(L)_3)^0$, donde L = derivados de piperazin ditiocarbamatos y derivados de morfolin ditiocarbamatos, sintetizados recientemente por Fabretti (16).

Este autor, nos indica, no obstante (hasta la fecha) las líneas tumorales sobre las que son activos dichos complejos neutros y octaédricos del Ir(III).

Teniendo en cuenta la baja toxicidad "in vivo" de los complejos del Ir(III) pertenecientes a la estructura general $(Ir^{III}(L)_3)^0$ donde L = ditiocarbamatos y/o xantatos (LD50 \equiv 3000-3400 mg/Kg vía i.p.), así como las interesantes actividades antiparasitarias (anti-*Leishmania donovani*) "in vivo" y/o "in vitro" que presentaban según Craciunescu y col., (13), y Craciunescu y Osuna (14) los complejos $(Ir^{III}(L)_3)^0$, donde L = pirolidin ditiocarbamato; dietil ditiocarbamato; n-hexil ditiocarbamato, hemos decidido sintetizar y valorar (frente a distintas líneas de infección tripanosómica y frente a distintos tumores), "in vivo", una amplia serie de complejos neutros y octaédricos del Ir(III), de formulación general $(Ir^{III}(L)_3)^0$.

Se ha trabajado con las siguientes ligandos (L): pirolidina ditiocarbamato; N-etilanilin ditiocarbamato; 2-aminotiazol ditiocarbamato; 2-aminoindazol ditiocarbamato; Benzimidazol ditiocarbamato; 2-amino-4-bromo-tiazol ditiocarbamato; 4,5-dimetil-2-amino-tiazol ditiocarbamato;

Imidazol ditiocarbamato; 4-nitro-imidazol ditiocarbamato; 5-nitroimidazol ditiocarbamato; 4,5-fenilimidazol ditiocarbamato; 2-metil benzimidazol ditiocarbamato; n-hexil ditiocarbamato; n-pentil ditiocarbamato; Ciclopentil ditiocarbamato; Ciclohexil ditiocarbamato; Cicloetil ditiocarbamato; Ciclobutil ditiocarbamato; n-butil ditiocarbamato; n-propil ditiocarbamato; Iso-propil ditiocarbamato; Iso-butil ditiocarbamato; dietil ditiocarbamato; Iso-propil xantato; n-hexil xantato; Alil xantato.

Los complejos han sido ensayados "in vivo" sobre varias líneas de infección tripanosómicas y sobre varios tumores. Se ha realizado un estudio de la toxicidad (medida en la sangre de las ratas a las 192 horas después de administrar 1/2 LD50 de cada complejo).

Todos los 27 nuevos complejos neutros del Ir(III) han sido caracterizados mediante datos del análisis químico y de sus espectros I.R.

El complejo más activo, es decir $\text{Ir}^{\text{III}}(\text{pirolidina ditiocarbamato})_3^\circ$, ha sido valorado desde el punto de vista de su potencial nefrotóxico, mediante un estudio de microscopía óptica de los riñones de las ratas que recibieron (a las 192 horas y a las 360 horas) 1/2 de su LD50 por vía i. p. ($\text{LD}_{50} \equiv 3850 \text{ mg/Kg}$).

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. Síntesis de los nuevos complejos neutros del Ir(III)

1 g de $\text{K}_3(\text{Ir}^{\text{III}} \text{Cl}_6)$ -hexaclorodiatato(III) de potasio- se disuelve en 100 cm³ de agua, con agitación y calentamiento suave (40-60 °C). Se le añade la cantidad correspondiente (estequiometría Ir(III): L= 1:3 o bien 1:3,5) del ligando en forma de sal potásica (L^-K^+) disuelta en 200 cm³ de mezcla caliente (70-80 °C) 1:1 = Etanol-Agua. La mezcla total de reacción se calienta (70-80 °C) a reflujo, bajo fuerte agitación, hasta que alcance 1/5-1/6 del volumen inicial. Se deja reposar 2-3 horas, y se filtra el precipitado amarillo o amarillo-marrón sobre crisol filtrante G4. Se lava con 100 cm³ Etanol y con 200 cm³ Eter. Se deja secar en un desecador sobre CaCl_2 . Los nuevos complejos $\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3^\circ$ se obtienen con rendimientos del orden de 70-95 % de los rendimientos teóricos. Son estables a la exposición al aire y a la luz, pero son poco solubles en el agua (0,01-0,0001 mg/ml). Son moderadamente solubles en DMSO, DMF, CH_2Cl_2 y algo menos en piridina y/o tetrahidrofurano. Son poco solubles en

alcoholes. Los ligandos (L^-K^+) han sido sintetizados según las técnicas empleadas por M. P. Alonso (17).

2. Análisis químico de los nuevos complejos del Ir(III)

El contenido en Ir % ha sido hallado mediante la calcinación de los complejos en un horno eléctrico (Ir (0) - Iridio metálico). También ha sido hallado el contenido en Ir % por espectrofotometría de absorción atómica (con ayuda de un aparato AA60Techtron) previa destrucción -ataque de los complejos con mezcla "agua regia" en caliente.

El contenido en N % ha sido hallado por el método de Kjeldhal, y los contenidos en C %, S %, H % hallados por técnicas estándar microcuantitativas de combustión. todos estos análisis se han realizado en el Departamento de Química Inorgánica y BioInorgánica de la Facultad de Farmacia (UCM), así como en colaboración con los "Laboratorios Pascher" (Bonn, Alemania). El resultado de los análisis químicos no difiere en $\pm 0,5 \%$ - $\pm 0,8 \%$ de los resultados calculados teóricamente para unas estructuras neutras y presumiblemente octaédricas $\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3^\circ$. El contenido Cl % de los complejos es nulo (0 %).

3. Espectros I.R.

Los espectros I.R. de los complejos del Ir(III) y de los ligandos puros en forma de sales potásicas (L^-K^+), han sido obtenidos (pastillas de KCl) con la ayuda de un espectrofotómetro I.R. Zeuss-jena UR10 (4000-600 cm⁻¹) y de un espectrofotómetro Perkin Elmer 457 (4000-250 cm⁻¹).

4. Ensayos antitumorales "in vivo"

Los complejos del Ir(III) han sido administrados por vía i.p. como suspensiones en 5 % glucosa en agua, a las ratas de la cepa "Swiss white mice" los días 1, 5, 9 (siendo el día 0 el día del implante del tumor). Para cada dosis empleada se han utilizado lotes de 6 ratones. El criterio de actividad anticancerosa ha sido el cociente T/C % (T = tiempo de supervivencia de animales "tratados" y C = tiempo de supervivencia de animales "control") -vease tabla I- T/C % = 150 % indica "Actividad" para los tumores ascíticos de Ehrlich, ascíticos de Landschutz, S-180

ascítico. Para estos mismos tumores T/C % comprendido entre 125-150 % indica "Actividad maginal" y T/C = 125%, "Falta de actividad".

En el caso de los tumores leucémicos O388, T/C \geq 125% "Actividad", T/C \leq 125 % "Actividad marginal" y T/C = 100 % "falta de actividad". Todos estos ensayos se han realizado en colaboración con el "National Cancer Institute" (USA) y con otros Institutos Anticancerosos.

TABLA I

Resultados de los ensayos antitumorales "in vivo" con los nuevos complejos (Ir^{III} (L)₃)^o

Complejo	Tumor	Dosis (mg/Kg)	TC %
(Ir ^{III} (L ₁) ₃) ^o	Ascítico de Landschutz	600	315
		400	300
		200	279
		100	270
		50	157
(Ir ^{III} (L ₂) ₃) ^o	"	600	280
		400	260
		200	255
		100	139
(Ir ^{III} (L ₃) ₃) ^o	"	600	270
		400	252
		200	250
		100	140
(Ir ^{III} (L ₄) ₃) ^o	"	600	253
		400	230
		200	225
		100	125
(Ir ^{III} (L ₅) ₃) ^o	"	600	200
		400	197
		100	185

TABLA I (CONT.)

Complejo	Tumor	Dosis (mg/Kg)	TC %
(Ir ^{III} (L ₆) ₃) ^o	"	600	221
		400	220
		200	140
(Ir ^{III} (L ₁) ₃) ^o	Ascítico de Ehrlich	600	175
		400	260
		200	240
		100	185
		50	147
(Ir ^{III} (L ₂) ₃) ^o	"	600	250
		400	232
		200	195
		100	185
		50	147
(Ir ^{III} (L ₃) ₃) ^o	"	600	225
		400	215
		200	200
		100	135
(Ir ^{III} (L ₄) ₃) ^o	Ascítico de Ehrlich	600	230
		400	215
		200	142
(Ir ^{III} (L ₅) ₃) ^o	"	600	180
		400	157
		200	128
(Ir ^{III} (L ₆) ₃) ^o	"	600	215
		400	175
(Ir ^{III} (L ₁) ₃) ^o	S-180 ascítico		130
		600	185
		400	162
		200	160
		100	127
	50	120	

TABLA I (CONT.)

Complejo	Tumor	Dosis (mg/Kg)	IC %
$(Ir^{III}(L_2)_3)^{\circ}$	S-180 ascítico	600	175
		400	170
		200	120
$(Ir^{III}(L_3)_3)^{\circ}$	"	600	173
		400	170
		200	140
		100	130
$(Ir^{III}(L_4)_3)^{\circ}$	"	600	157
		400	142
		200	103
$(Ir^{III}(L_5)_3)^{\circ}$	"	600	185
		400	175
		200	151
		100	115
$(Ir^{III}(L_6)_3)^{\circ}$	"	600	170
		400	155
		200	103
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	P-388	600	165
		400	155
		200	140
		100	125
		50	102
		25	100
$(Ir^{III}(L_2)_3)^{\circ}$	"	600	155
		400	125
		200	102
$(Ir^{III}(L_4)_3)^{\circ}$	"	600	152
		400	127
		200	111

TABLA I (CONT.)

Complejo	Tumor	Dosis (mg/Kg)	IC %
$(Ir^{III}(L_5)_3)^{\circ}$	"	600	145
		400	125
		200	100
$(Ir^{III}(L_6)_3)^{\circ}$	P-338	600	135
		400	115
		200	110

Las claves de los ligandos son L_1 = piperidina ditiocarbamato; L_2 = N-etilnilin ditiocarbamato; L_3 = 2-aminotiazol ditiocarbamato; L_4 = Benzimidazol ditiocarbamato; L_5 = 2-amino-4-bromotiazol ditiocarbamato; L_6 = 4,5-dimetil-2-aminotiazol ditiocarbamato. Los complejos $(Ir^{III}(L)_3)^{\circ}$ con los restantes ligandos (descritos en el capítulo I, sección 1) han sido inactivos (para dosis totales de 600 mg/Kg, 400 mg/Kg y 200 mg/Kg) frente a todas las líneas de tumores ensayados. Las dosis que aparecen en la Tabla I (mg/Kg) son las *dosis totales* administradas fraccionariamente los días 1, 5 y 9 (siendo el día 0 el día del implante tumoral).

5. Ensayos antitripanosómicos "in vivo"

Los complejos han sido administrados como suspensiones en "Tween" por vía s.c. dos horas después de inocular a las ratas de la cepa "Swiss white mice" (por vía i.p.) 10^5 de Tripanosomas. El criterio de actividad toma en cuenta el tiempo de sobrevivencia de los animales tratados, y eventualmente la parasitemia (medida en la sangre de las ratas el día 8° y/o el día 30).

2T- "activo"; 2T + 8 - Muy activo (y ningún parásito detectable el 8° día); 2T + 8 - Muy activo (curativo) si no se detecta ningún parásito el día 30.

2T - Moderadamente activo. En todos los casos T = tiempo de sobrevivencia de los animales infectados, no tratados. Para las distintas cepas de T. evansi T = 5 días; para T. equiperdum T = 4 días -véase la tabla II.

TABLA II

Complejo	Parásitos	Dosis	Código
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	T. evansi (venezueliense)	600	Activo
		400	Activo
		200	Moderadamente activo
		100	Inactivo
$(Ir^{III}(L_2)_3)^{\circ}$	"	600	Activo
		400	Activo
		200	Moderadamente activo
		100	Inactivo
$(Ir^{III}(L_3)_3)^{\circ}$	"	600	Activo
		400	Activo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_4)_3)^{\circ}$	"	600	Activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_4)_3)^{\circ}$	"	600	Moderadamente activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_5)_3)^{\circ}$	"	600	Moderadamente activo
		400	Moderadamente activo
		200	Moderadamente activo
		100	Inactivo
$(Ir^{III}(L_6)_3)^{\circ}$	"	600	Moderadamente activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	T. evansi (India)	600	Activo
		400	Moderadamente activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
		800	Activo

TABLA II

Complejo	Parásitos	Dosis	Código
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	T. evansi (India)	600	Activo
		400	Moderadamente activo
		200	Inactivo
		100	Inactivo
		800	Inactivo
$(Ir^{III}(L_2)_3)^{\circ}$	"	600	Moderadamente activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_3)_3)^{\circ}$	"	600	Moderadamente activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	T. congolense	600	Marginalmente activo
		400	Inactivo
		200	Inactivo
$(Ir^{III}(L_1)_3)^{\circ}$	T. equiperdum	600	Marginalmente activo
		400	Inactivo

Las claves de los ligandos son las mismas que aparecen en la Tabla I. Los complejos que no aparecen en la Tabla II, han sido totalmente inactivos frente a todas las cepas de tripanosomas para dosis totales (una sola inyección vía s.c.) de 600, 400, 200 mg/Kg.

Para cada complejo se ha utilizado (para cada dosis) un lote de 6 ratas de la cepa "Swiss white mice".

6. Estudios de toxicidad

Los complejos, suspendidos en "Tween" han sido administrados por vía i.p. (valores equivalentes a 1/2 LD50 de cada complejo) a unos lotes de 6 ratas por cada complejo (ratones "Swiss white mice"). A las 192 horas después de la administración de los complejos se han medido

en la sangre de las ratas los parámetros % mg urea, % mg cratinina, niveles enzimáticos "GOT" y SGOT", cocientes L/N (L = "Linfocitos", N = "Nuetrófilos") para apreciar la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y hematotoxicidad -vease la Tabla III-.

TABLA III

Perfil toxicológico de los nuevos complejos $(Ir^{III}(L)_3)^o$, para la administración de 1/2 LD50 de los complejos (vía i.p. a las 192 horas).

Complejo	% mg urea	% mg creatinina	GOT	SGOT	L/N
$(Ir^{III}(L_1)_3)^o$	56,71	0,753	51,3	18,29	6,12
$(Ir^{III}(L_2)_3)^o$	58,31	0,912	51,21	18,11	6,10
$(Ir^{III}(L_3)_3)^o$	57,57	0,915	52,30	18,03	6,09
$(Ir^{III}(L_4)_3)^o$	57,60	0,871	53,10	17,80	6,08
$(Ir^{III}(L_5)_3)^o$	48,92	0,892	51,95	18,88	6,10
$(Ir^{III}(L_6)_3)^o$	59,13	0,920	52,02	18,85	6,11
CONTROLES	42,65	0,620	51,20	17,92	6,14

Las claves de los ligandos L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 y L_6 son las que aparecen en la Tabla I.

También se ha realizado un estudio de histopatología renal (microscopía óptica) a las 192 y a las 360 horas después de administrar 1/2 LD50 del complejo más interesante -es decir $(Ir^{III}(L)_3)^o$, donde L = pirolidina ditiocarbamato- a un lote de 6 ratas (vía i.p. como suspensión en "Tween"); así como a las 360 horas después de la administración del 1/2 LD50 de este mismo complejo (LD50 = 3850 mg/Kg). Las técnicas y medios de tinción, han sido descritos en otros trabajos nuestros (4-7) - véase la Figura I, Figura II y Figura III

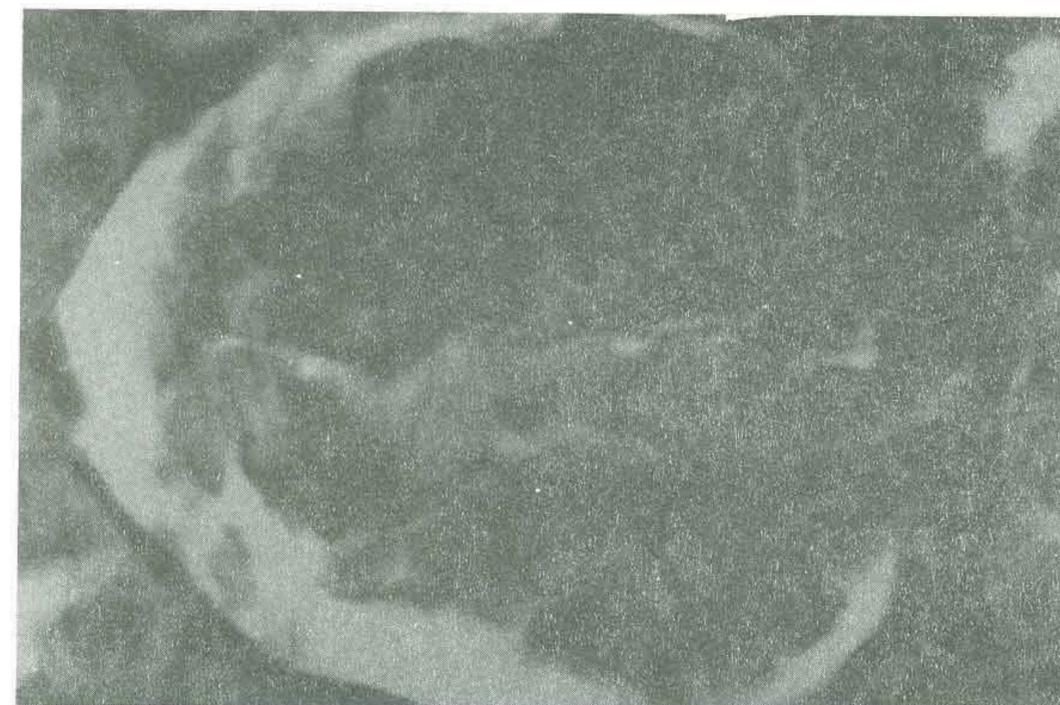
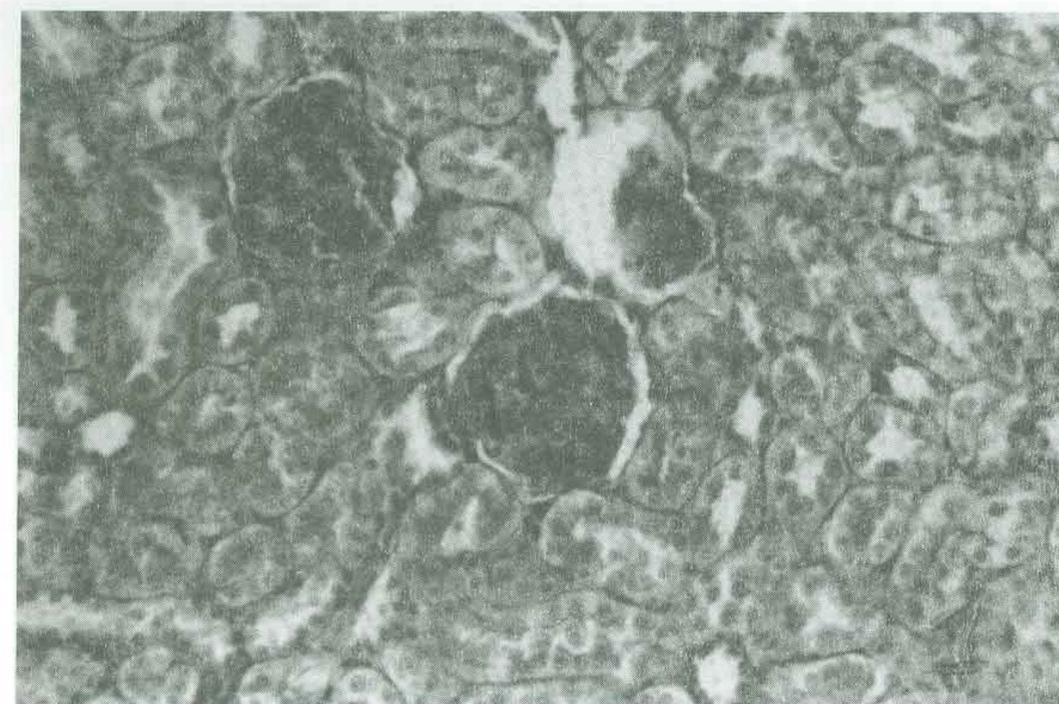


Figura I.- Histología renal (M.O.) a las 192 horas, para la administración i.p. de 1/2 LD50 del compeljo $(Ir^{III}(2\text{-pirolidina ditiocarbamato})_3)^o$, comprende las microfotografías 1, 2, 3, 4 y 5.

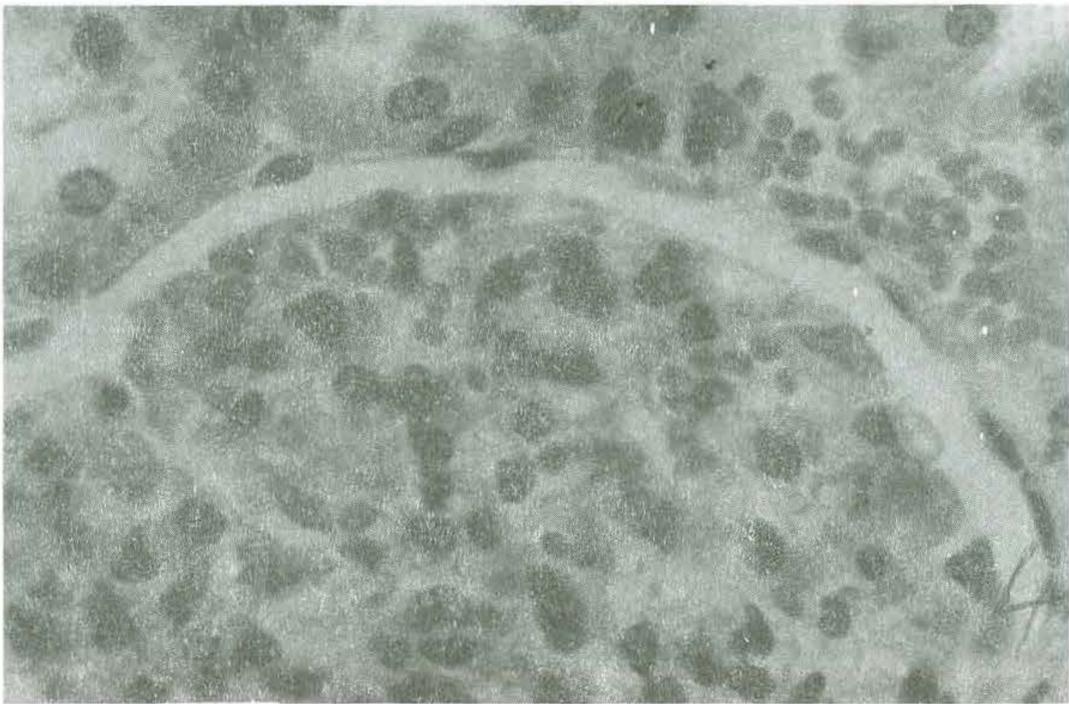
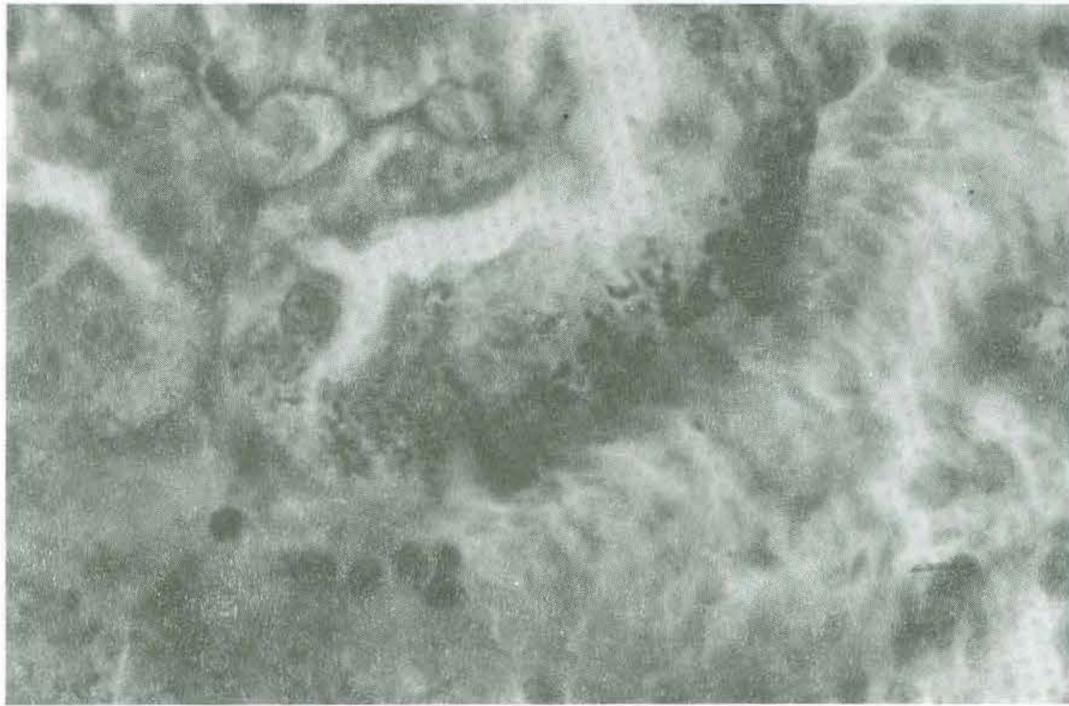


Figura I.- (continuación)

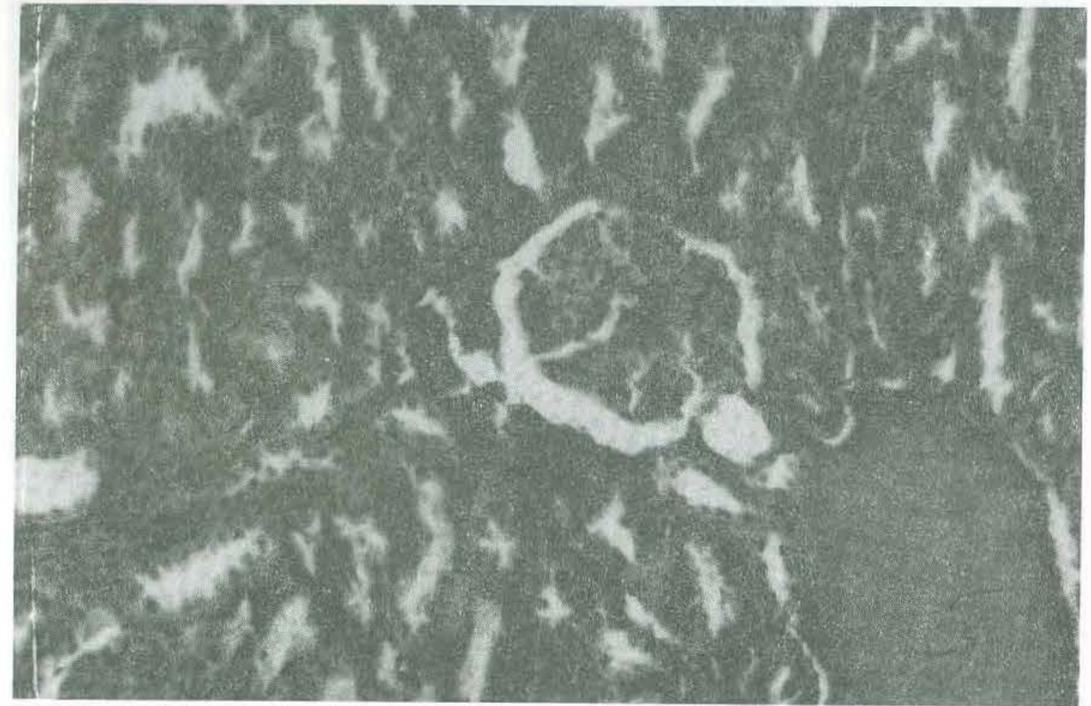


Figura I.- (continuación)

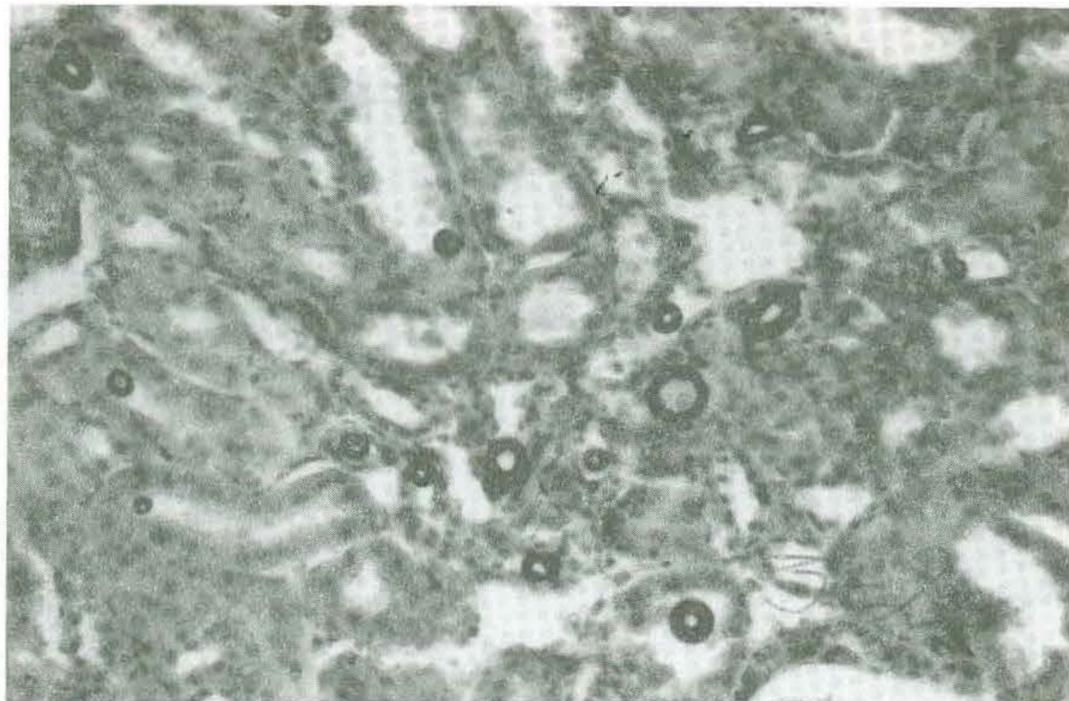
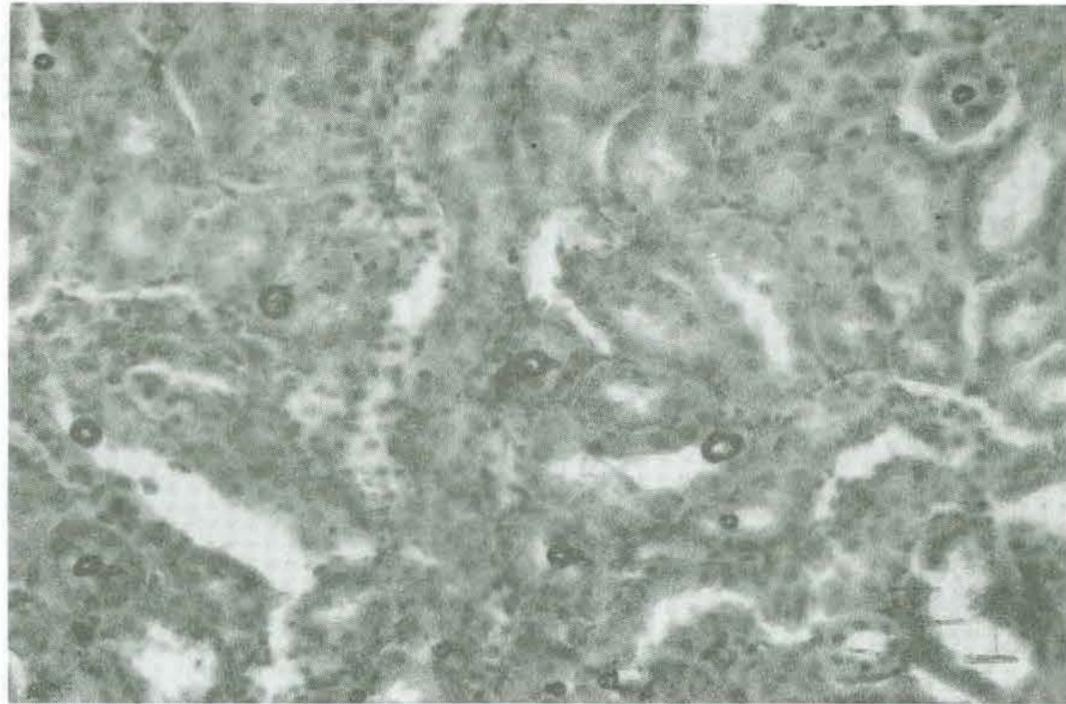


Figura II.- (comprende las microfotografías 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5). Microscopía óptica de los cortes de riñones de las ratas que recibieron i.p. (a las 360 horas) $1/2$ LD₅₀ del complejo $(\text{Ir}^{\text{III}}(2\text{-pirilidina ditiocarbamato})_3)^{\circ}$.

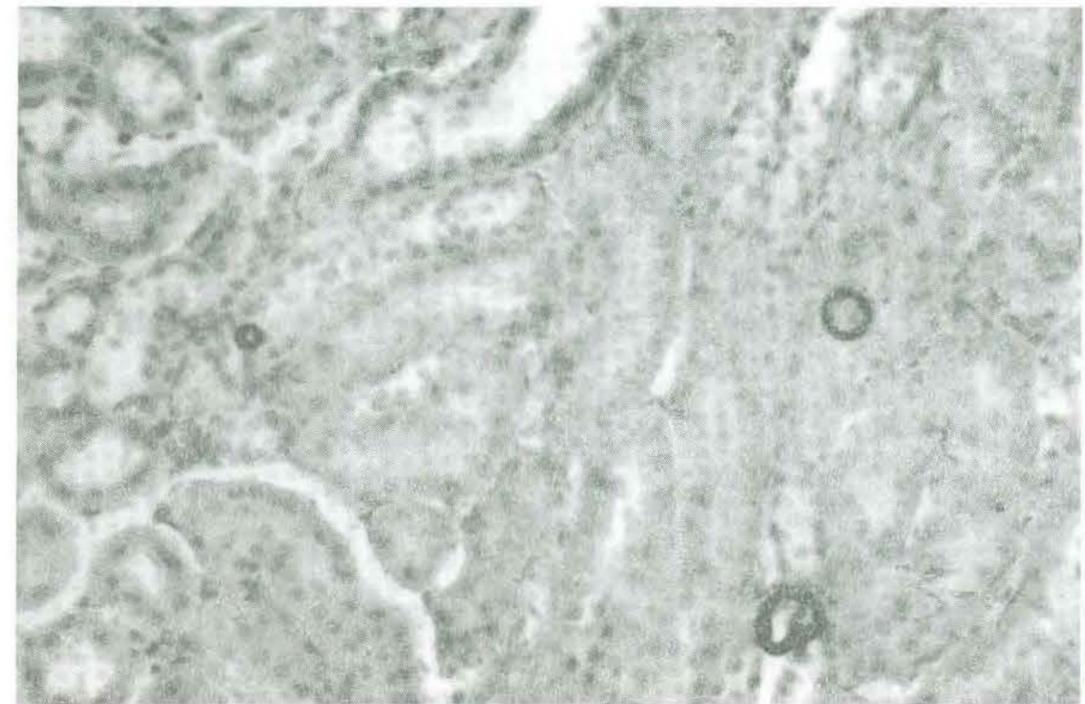


Figura II.- (continuación)

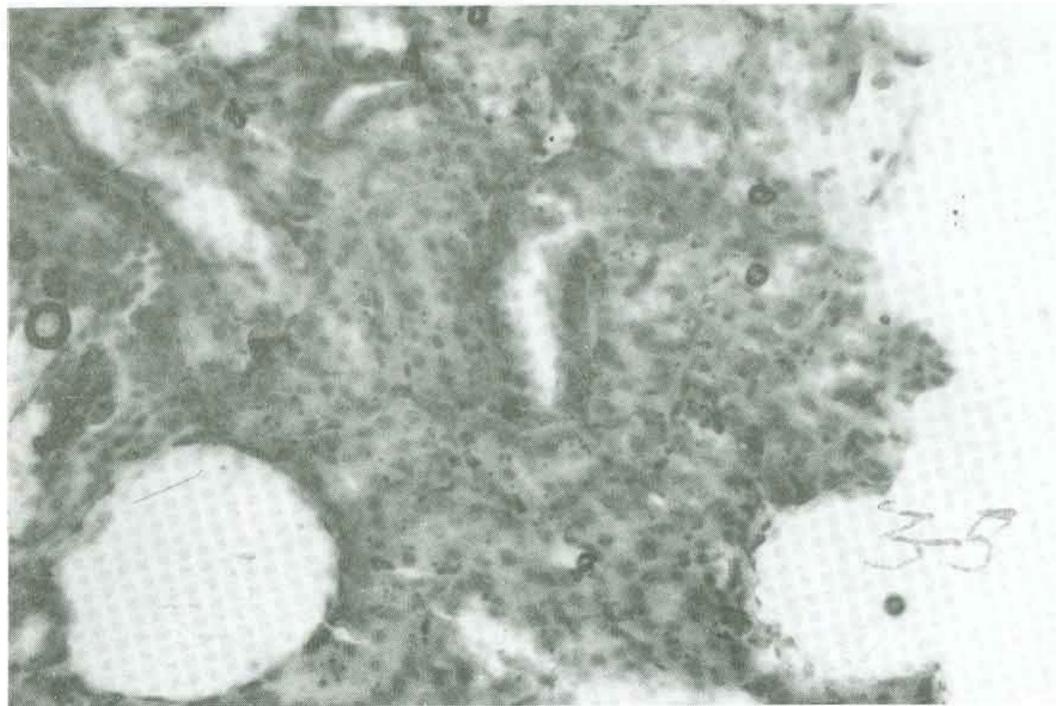


Figura II.- (continuación)

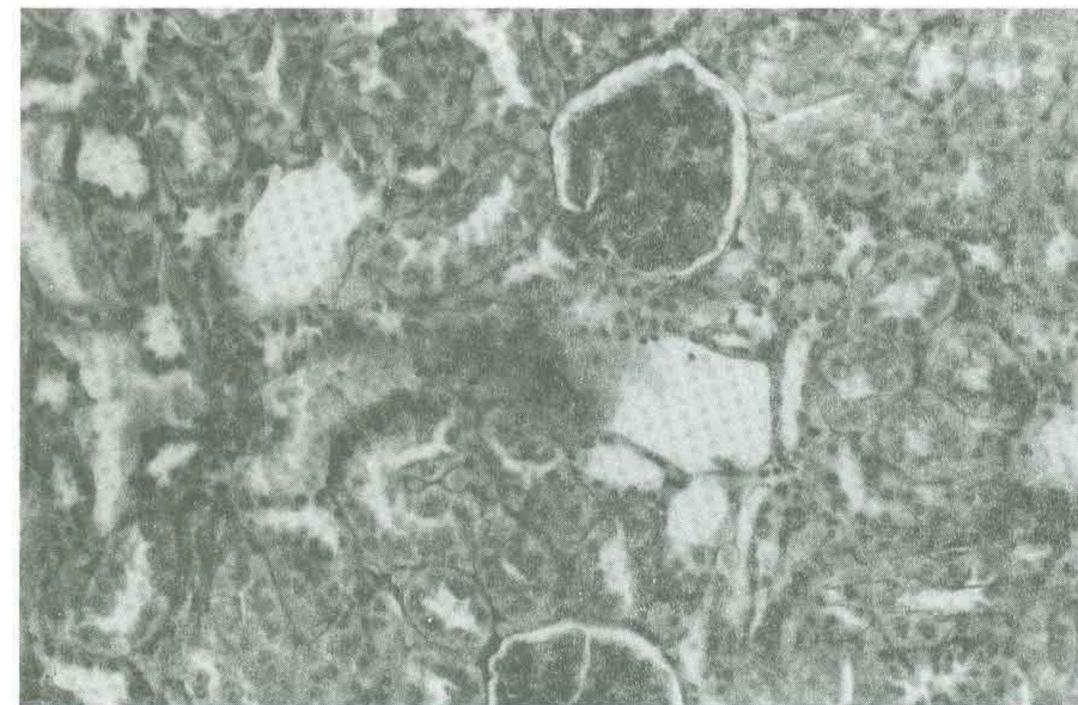
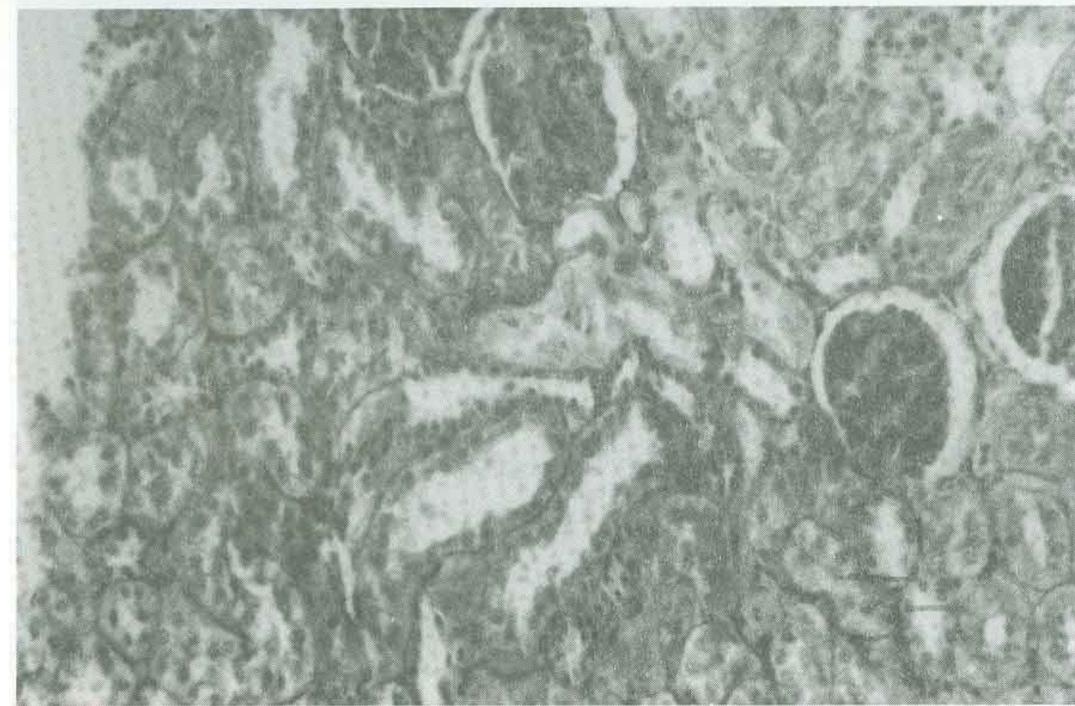


Figura III.- (Comprende las microfotografías 3-6. 3-7. 3-8. 3-9. 3-10). Lesiones renales (M.O.) inducidas por la administración i.p. (a las 360 horas) de 1/2 LD50 del complejo $(\text{Ir}^{\text{III}}(2\text{-pirolidina ditiocarbamato})_3)^{\circ}$.

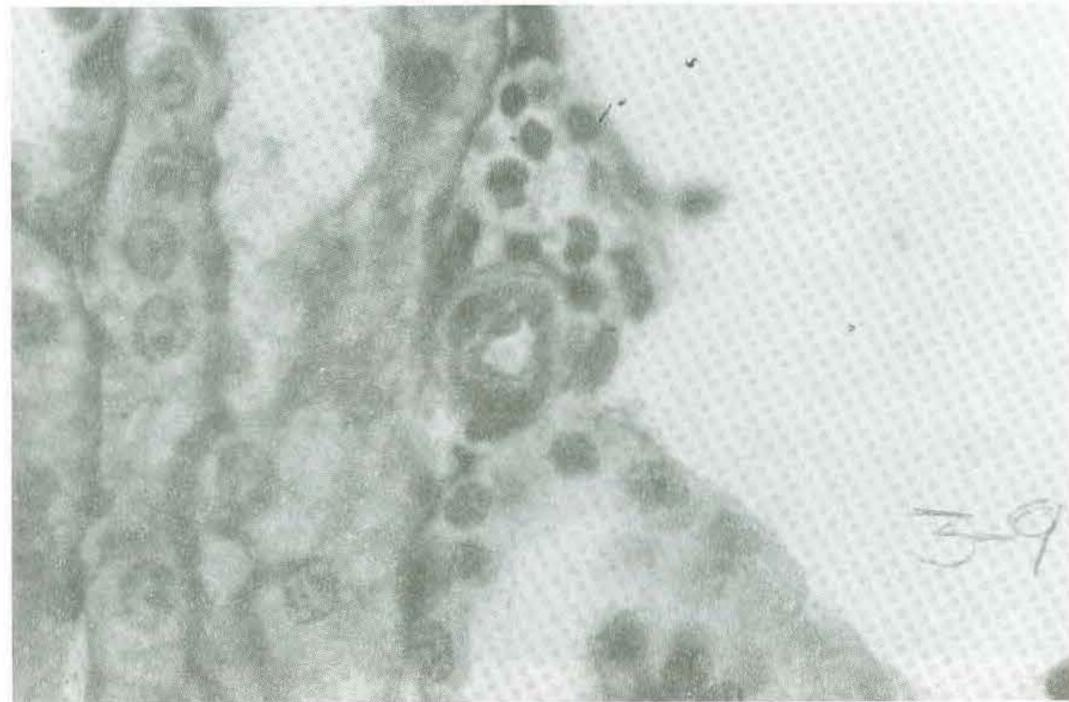
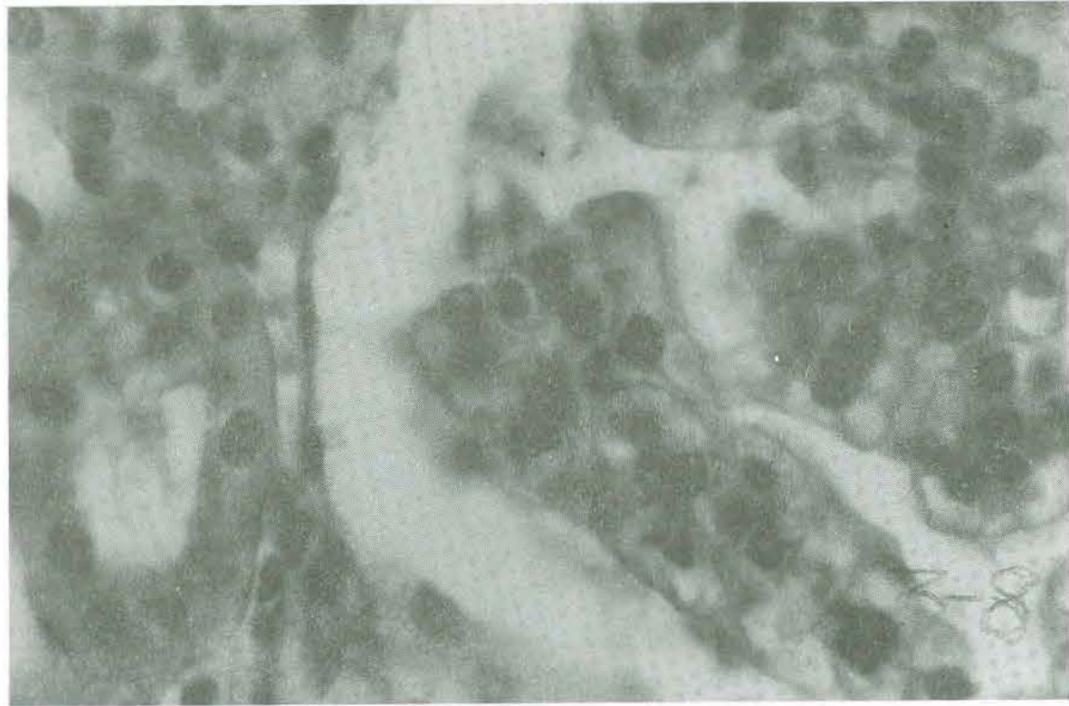


Figura III.- (continuación)

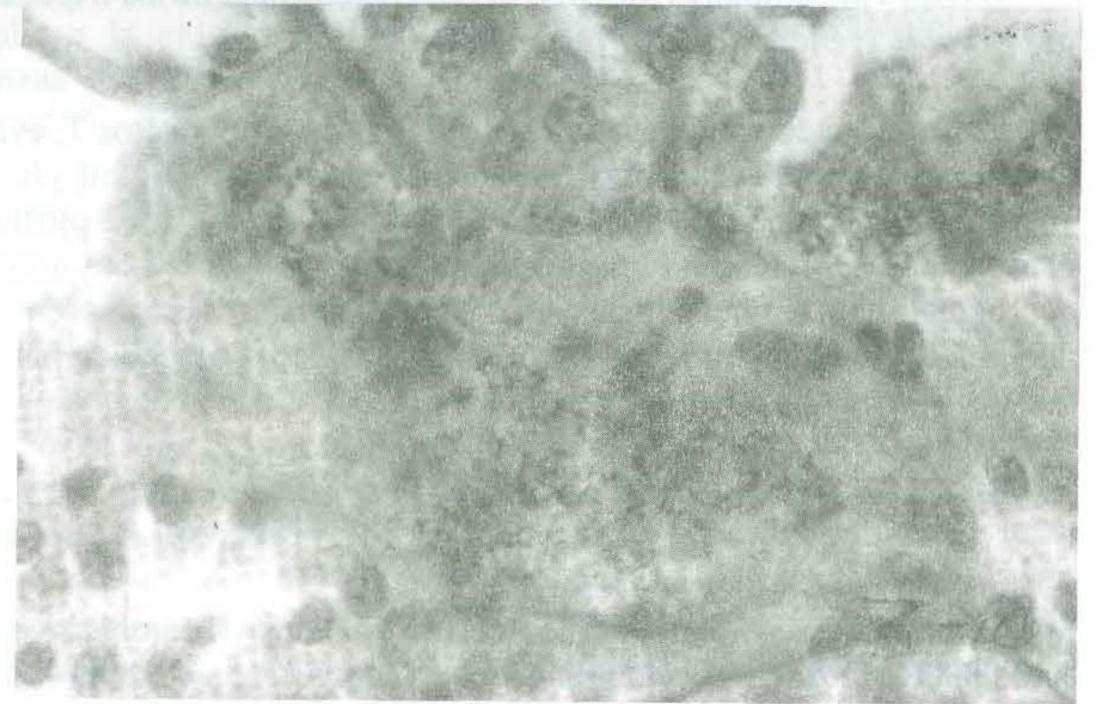


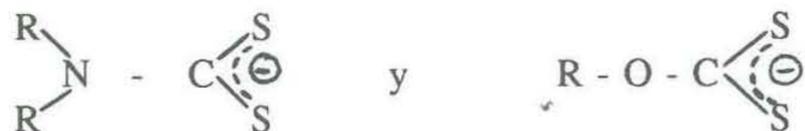
Figura III.- (continuación)

7. Datos preliminares de Microscopía electrónica de los tripanosomas (*T. evansi* (venezueliense)) tratados "in vitro"

Se han obtenido algunas microfotografías de los parásitos *T. evansi* (venezueliense) tratados "in vitro" durante 48 horas con 1 µg/ml y/o con 10 µg/ml de los complejos más interesantes (es decir $(\text{Ir}^{\text{III}}(2\text{-pirilidina ditiocarbamato})_3)$, $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{anilinditiocarbamato})_3)$ y $(\text{Ir}^{\text{III}}(2\text{-aminotiazol ditiocarbamato})_3)$), empleando las técnicas de tinción descritas en otro trabajo nuestro (4-7) y un microscopio electrónico Carl Zeiss-Jena (x 40.000).

8. Cálculos O.M. Huckel para las moléculas de los ligandos puros ($L\cdot K^+$)

Se ha realizado -para algunos de los ligandos (L) empleados- un cálculo O.M. Huckel, tomando en cuenta la existencia de las formas resonantes que implican deslocalización π electrónica, es decir

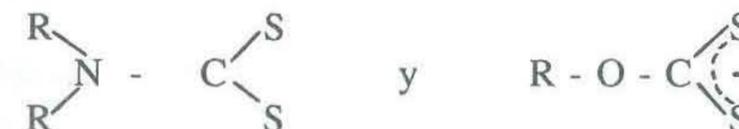


Estos cálculos han sido realizados en el "Centrul de Calcul" Iasi, Rumanía.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis químicos indican que las estructuras propuestas -complejos $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3)^{\circ}$ - son ciertas, ya que los resultados encontrados para los contenidos en Ir %, N %, C %, H %, S % no difieren en $\pm 0,5 - 1$ % de los valores teóricos correspondientes a tal estructura, neutra y presumiblemente octaédrica de los complejos del Ir(III): Los espectros I.R. indican que, como en el caso de otros complejos $(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_3)^{\circ}$, $(\text{Rh}^{\text{I}}(\text{CO})_2(\text{L}))^{\circ}$ y también $(\text{Ir}^{\text{I}}(\text{CO})_2(\text{L}))^{\circ}$ donde L = derivados de ditiocarbamatos y/o xantatos (estudiados por nosotros 4, 12)), los

ligandos coordinan hacia el catión Ir(III) en las formas resonantes que implican la existencia de una deslocalización π electrónica sobre las "pinzas" CS_2^- , es decir



En efecto, en los espectros I.R. de los complejos, aparece una única banda de tensión $\nu\text{C-S}$ (en el rango de frecuencias $1100-1150\text{ cm}^{-1}$) lo que no hubiera sido compatible con la existencia de 2 órdenes de enlaces distintos ($\text{C}=\text{S}$ y C-S). Estas indicaciones se corresponden con los datos de Frabretti y colaboradores (15, 16) que también postularon (para varios complejos $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3)^{\circ}$, donde L = derivados de piperación ditiocarbamato y derivados de morfolin ditiocarbamato) la actuación coordinadora de los ligandos en las formas resonantes que implican la existencia de deslocalización π electrónica sobre sus "pinzas" CS_2^- . Los complejos también presentan bandas de intensidad moderada ($480-510\text{ cm}^{-1}$), asignadas a las vibraciones de tensión $\nu\text{Ir-S}$; estas bandas están ausentes en los espectros de los ligandos.

Respecto a las actividades anticancerosas "in vitro" -véase la Tabla I- podríamos poner de relieve las siguientes observaciones:

- 1) Todos los complejos son más activos frente a los tumores ascíticos de Landschutz y a los tumores ascíticos de Ehrlich (por este orden).
- 2) La mayoría de los complejos son inactivos (aún para dosis de 400-800 mg/Kg) frente a los tumores S-180 ascíticos y P-388 leucémicos.
- 3) De los 27 complejos del Ir(III) únicamente 6 (seis) presentan una cierta actividad antitumoral "in vivo", especialmente frente a los tumores ascíticos de Ehrlich y de Landschutz.
- 4) Las actividades antitumorales se presentan únicamente para dosis muy elevadas (400-600 mg/Kg), y esto desaconseja un posterior estudio antitumoral (con otras líneas tumorales) de estos complejos del Ir(III), aún si se tiene en cuenta su baja toxicidad general

(valores LD50 aproximados comprendidos entre 3000-3900 mg/Kg).

- 5) Todos los seis complejos encontrados como activos, presentan una actividad anticancerosa muy inferior al medicamento clásico de referencia "Neoplatin".
- 6) *Los complejos donde los ligandos L son derivados de ditiocarbamato presentan siempre una actividad antimitótica "in vivo" muy superior frente a los complejos del Ir(III) donde los ligandos L son derivados de xantatos.*

El cálculo preliminar O.M. Huckel indica que las cargas electrónicas localizadas sobre las "pinzas" CS_2^- de los ligandos (L) disminuyen en la secuencia pirolidina ditiocarbamato > N-etilanilin ditiocarbamato > 2-aminotiazol ditiocarbamato > Benzimidazol ditiocarbamato (alcanzando el valor máximo de 1,9352 para el pirolidina ditiocarbamato, y el valor mínimo de 1,6522 para el n-hexilxantato). Tomando en cuenta precisamente el hecho de que los complejos donde los ligandos son la 2-pirolidina ditiocarbamato, N-etilanilin ditiocarbamato; 2-aminotiazol ditiocarbamato, presentan los más altos efectos antitumorales, se podría pensar que a medida que aumenta la interacción entre las "pinzas" CS_2^- de los ligandos (L) y el catión Ir(III), se obtendrán estructuras más "estables" y se observaría un mayor efecto antitumoral "in vivo" pudiendo "llegar" así los complejos "intactos" $(Ir^{III}(L)_3)^0$ a interactuar con las células antitumorales, antes de ser metabolizadas y excretadas del organismo.

En cuanto a las actividades antitripanosómicas "in vivo" desplegadas por los nuevos complejos del Ir(III) -se podrán sacar las siguientes observaciones generales de los datos de la Tabla II

a) Los complejos del Ir(III) son más activos frente a las líneas de infección parasitaria T. evansi (T. evansi (venezueliense), T. evansi (India), por este orden, siendo poco activos o inactivos frente a T. congolense y T. equiperdum.

b) De los 27 complejos ensayados, únicamente 4 son activos o moderadamente activos frente a T. evansi,

c) *Los complejos donde los ligandos (L) son derivados de Xantatos, son mucho menos activos que los complejos donde L =*

derivados de ditiocarbamato, en todas las líneas de infección parasitaria (tripanosómica).

d) El complejo más activo es el $(Ir^{III}(\text{pirolidina ditiocarbamato})_3)^0$, precisamente el mismo complejo que mejores respuestas antitumorales inducía.

e) *Parece que hay un claro paralelismo entre las actividades antitripanosómicas y antitumorales "in vivo", y que únicamente los complejos que presentan cierta o moderada actividad antitumoral también poseen ciertos efectos antitripanosómicos "in vivo" -véase también la Tabla II-. El estudio preliminar de los efectos "in vitro" (Microscopía Electrónica) de los complejos donde L = pirolidina ditiocarbamato, 2-aminotiazol ditiocarbamato y N-etilanilin ditiocarbamato -concentración en el rango de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ - frente a T. evansi (venezueliense) (x 40.000) indican que el sitio primario de actuación parece ser la mitocondria del parásito, observándose también importantes áreas en las que aparecen vacuolas autofágicas. Esto parece confirmar la elevada toxicidad "in vitro" de estos complejos relacionados con la naturaleza "per se" de los ligandos puros (L) que son muy eficaces moduladores de la "SOD" (superóxido dismutasa), pudiendo actuar por lo tanto, prioritariamente los complejos $(Ir^{III}(L)_3)^0$ sobre los procesos de "respiración" de los tripanosomas.*

Respecto a los efectos tóxicos "in vivo" para 1/2 LD50 de los complejos, valorados a las 192 horas en la sangre de las ratas (véase la Tabla III) parece que la toxicidad limitante es la nefrotoxicidad, ya que los valores % mg urea, % mg creatinina suben en más de 20-30 % respecto a los controles, los niveles enzimáticos "GOT" y "SGOT" no suben en más de 5-10 % respecto a los controles, y el cociente L/N no disminuye significativamente (respecto a los controles); todo esto indica falta de hepatotoxicidad y de hematotoxicidad para los nuevos complejos $(Ir^{III}(L)_3)^0$ y apunta hacia su elevado potencial nefrotóxico en un lapso de tiempo relativamente elevado (192 horas).

También hemos realizado un estudio complementario de microscopía óptica de la toxicidad renal desplegada (a las 192 horas y a las 360 horas), por la administración vía i.p. de la 1/2 LD50 del complejo más activo $(Ir^{III}(\text{pirolidina ditiocarbamato})_3)^0$ sobre los cortes semifinos de los riñones de las ratas (véase la Figura I, Figura II y Figura III), se han empleado las técnicas de tinción y equipos mencionados en otros trabajos nuestros (4-7).

En la Figura I (que comprende las microfotografías 1, 2, 3, 4 y 5) se pueden examinar los efectos inducidos (a las 192 horas) por la administración vía i.p. de 1/2 LD50 del complejo $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{pirolidona ditiocarbamato})_3)^{\circ}$ sobre los cortes semifinos de los riñones de las ratas de la cepa "Swiss white mice". En las fotos 1 y 2 (pertenecientes a la Figura I) se observa (HE 45%) un área de parenquima renal sin alteraciones significativas a excepción del desprendimiento parcial y ocasional del ribete en cepillo de algunas luces tubulares proximales (foto 1) y un detalle de glomérulo a gran aumento en el cual se objetiva un acúmulo -deposito de materios sero-albuminoso en el estapacio de Bowmann, y desprendimientos de matriz mesagial (foto 2). En las fotos 3 y 4, respectivamente (ambas pertenecientes a la Figura I) se observa un foco hemorrágico a nivel del túbulo con aumento del volumen citoplasmático de las células parietales y pérdida de microvellosidades (foto 3) así como el aspecto del área parenquimatosa renal con glomérulo presentando importante grado de afectación; desprendimiento-rotura de matriz mesangial, foco hemorrágico de anillo con deterioro capsular (foto 4). También en la foto 5 (de la figura I) se obserba que en los túbulos adyacentes hay una importante afectación de las células parietales con material sero-albuminoide y células en sus luces.

Estos datos, indican una moderada nefrotoxicidad, coinciden con los resultados que aparecen en la Tabla III que muestran unas importantes elevaciones de los niveles % mg urea, % mg creatinina en la sangre de las ratas, a las 192 horas después de administrar por vía i.p. 1/2 de la LD50 ($\text{Ld}_{50} = 3900 \text{ mg/Kg}$) del complejo $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{pirolidina ditiocarbamato})_3)^{\circ}$.

La valoración mediante datos de microscopía óptica de los cortes semifinos de los riñones de las ratas tratadas a las 360 horas con 1/2 LD50 del mismo complejo (véase la Figura II y la Figura III) indican una nefrotoxicidad muy elevada; el complejo manifiesta mayores efectos nefrotóxicos a las 360 horas después de la administración de 1/2 LD50, que a las 192 horas.

En la Figura II (que comprende las microfotografías 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5) -(HE 40 x)- se pueden apreciar áreas tubulares renales con acusados signos degenerativos celulares y figuras de hialina (degenerativo celular), así como contenido celular en luz tubular, edemoa zonal de células tubulares y focos hemorrágicos aislados, con otros focos de infiltración polimorgonuclear.

En la Figura III (que comprende las microfotografías 3-6, 3-7, 3-8, 3-9 y 3-10) -HE 80X- se aprecian formaciones glomerulares con aspecto estructural bastante consevado. A nivel tubular se observan áreas de necrosis tubular (foto3-6) y también procesos de vertido de contenido sero-albuminoide y hemático (foto 3-7). las células de los túbulos muestran edema discreto y en determinados puntos afectación necrótica. En las fotos 3-8 y 3-9 (pertenecientes también a la Figura III), se observan detalles a gran aumento de los cortes antes estudiados mostrando el edema celular de las luces tubulares con acúmulo voluminoso citoplasmático. En la foto 3-10 (también perteneciente a la Figura III) se recoge zona de infiltración celular hemorrágica.

Como conclusiones generales respecto a los efectos tóxicos desplegados por la administración de 1/2 LD50 del complejo más prometedor $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3)^{\circ}$, donde L = pirolidina ditiocarbamato, se confirma así su elevado potencial nefrotóxico, más acentuado a las 360 horas después de la administración del complejo, que a las 192 horas (en ambos casos se administra el complejo como suspensión en "Tween" por vía i.p.). No obstante a las 192 horas después de administrar tanto este complejo como los restantes (1/2 LD50) complejos -véase la Tabla III- no se evidencian efectos hepatotóxicos o bien hematotóxicos.

Actualmente estamos ensayando estos complejos del Ir(III) frente a las infecciones producidas por otros parásitos (especialmente cepas de *Leishmania donovani*, *Leishmania Braziliensis* y/o *Leishmania mexicana*) "in vivo" y tomando en cuenta los prometedores resultados "in vivo" obtenidos (frente a las ratas infectadas con *L. donovani*) con los complejos análogos $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{pirolidin ditiocarbamato})_3)^{\circ}$, $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{dietil ditiocarbamato})_3)^{\circ}$ y también $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{n-hexil ditiocarbamato})_3)^{\circ}$ en colaboración con el Profesor S. K. Croft y con el Prof. Dr. R. Neal (13). Estamos también estudiando la incorporación de algunos de los complejos neutros $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_3)^{\circ}$ en distintas nanopartículas (derivados de poliacrilatos), con el fin de conseguir mayores respuestas antitripanosómicas y/o anti-L donovani "in vivo", ya que la baja solubilidad en el agua de todos los complejos $(\text{Ir}^{\text{III}}(\text{L})_{30})_{\circ}$ discutidos (rango de 0,01-0,0001 mg/ml) influye negativamente en la biodisponibilidad de dichas estructuras neutras y octaédricas del Ir(III).

IV AGRADECIMIENTOS

El Profesor Dr. D. G. Craciunescu agradece a las Compañías "Johnson-Matthey Ltd" (Inglaterra) y "Platinum Rustenburg Mines" (Sur Africa) por las sales $K_3 (Ir^{III} Cl_6)$ y $Na_3 (Ir^{III} Cl_6)$ recibidas gratuitamente.

V. BIBLIOGRAFÍA

- (1) N. FARRELL Y COLABORADORES (1984). *J. Biochem. Pharm.* 133, 961-971.
- (2) N. FARRELL Y COLABORADORES (1983). Comunicación al Congreso "Platinum complexes in Cancer Chemotherapy" (Vermont, U.S.A., Junio 1983).
- (3) N. FARRELL (1985) Comunicación privada al Prof. Dr. D. G. Craciunescu.
- (4) D. G. CRACIUNESCU Y COLABORADORES (1990). *An. Real Acad. Farmacia* 56, 181-200.
- (5) D. G. CRACIUNESCU Y COLABORADORES (1988). *An. Real Acad. Farmacia* 54, 440-466.
- (6) D. G. CRACIUNESCU Y COLABORADORES (1989). *Anticancer Research* 9, 781-786.
- (7) D. G. CRACIUNESCU Y COLABORADORES (1990). *Drug Research* 40 (1) 183-187.
- (8) A. OSUNA Y COLABORADORES (1986). *Drug REsearch* 36, 13-16.
- (9) A. OSUNA Y COLABORADORES (1986). *Chem. Biol. Interactions* 59, 99-111.
- (10) C. MESA VALLE, D. CRACIUNESCU, E. PARRONDO-IGLESIAS, A. OSUNA (1989). *Drug Research* 38 (2), 838-842.
- (11) L. M. RUIZ-PÉREZ Y COLABORADORES (1987) *J. Parasitology* 73 (2), 272-277.
- (12) D. G. CRACIUNESCU Y COLABORADORES (1988). *An. Real Acad. Farmacia* 54, 46-69.
- (13) S. L. CROFT, R. NEAL, D. CRACIUNESCU, E. PARRONDO IGLESIAS (1990). Comunicación al "Congreso Int. Parasitología" (París, Francia, Agosto, 1990).
- (14) A. OSUNA, C. MESA VALLE, D. CRACIUNESCU (1990). Comunicación al "Congreso Int. de Parasitología" (París, Francia, Agosto, 1990).
- (15) A. C. FABRETTI Y COLABORADORES (1984). *Inorgánica Chim. Acta* 86, 127-131.
- (16) A. C. FABRETTI Y COLABORADORES (1987). Comunicación al "Congreso Int. sobre Complejos del Pt en la Quimioterapia del Cáncer" (Padova, Italia, Julio 1987).
- (17) M. P. ALONSO. (1988). Comunicación privada al Prof. Dr. D. G. Craciunescu.

Recibido: 14 diciembre 1990

Estudio de la actividad antimicrobiana de compuestos triterpénicos aislados de *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera

M. J. AYUSO GONZALEZ, M. REYES RUIZ y M. V. TORO SAINZ
Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia.
Facultad de Farmacia. 41012 - Sevilla

RESUMEN

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana de un extracto metanólico de *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera y dos compuestos triterpénicos aislados del mismo (ácido ursólico y α -amirina).

De estos compuestos, sólo la α -amirina contribuye a la actividad antibacteriana detectada para el extracto.

Ninguna de las muestras mostró actividad antifúngica frente a los hongos ensayados.

Palabras claves: Antimicrobianos, triperpenos, *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera.

SUMMARY

Antimicrobial activity of isolated triterpenic compounds from *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera.

Antimicrobial activity of methanolic extract and isolated triterpenes compounds from *Erica andevalensis* Cabezudo-Ribera has been studied, resulting that only, α -amirina, contributes to antibacterial activity from the extract.

None of the samples showed antifungic activity against the fungus tested.