



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Química

“SÍNTESIS DE AGENTES QUELANTES Y SU EVALUACIÓN EN INTOXICACIÓN POR PLOMO”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. Javier Eduardo Rubio Cortés

DIRECTOR

Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara

CO-DIRECTOR

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras



Guanajuato, Gto., 27 de octubre 2021

Dra. Clarisa Villegas Gómez
Coordinadora del Posgrado en Química.
División de Ciencias Naturales y Exactas.
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, los que suscriben, se dirigen a usted para informarle que el trabajo de tesis intitulado "*Síntesis de Agentes Quelantes y su Evaluación en Intoxicación por Plomo*", ha sido concluido satisfactoriamente por el C. Javier Eduardo Rubio Cortés del programa de Maestría en Ciencias Químicas de la DCNE de la Universidad de Guanajuato. Asimismo, se declara que el trabajo fue realizado en los laboratorios de Síntesis Orgánica del Departamento de Química y Farmacología y Toxicología del Departamento de Farmacia de la misma institución, que es una investigación original y se desarrolló dentro de los parámetros que exige la línea de investigación por lo que nos responsabilizamos de su autenticidad.

Para los fines administrativos que al interesado convengan, se extiende la presente.

Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara
Profesor-Investigador
Director

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras
Profesor-Investigador
Co-Director

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Síntesis Orgánica del Departamento de Química y Farmacología y Toxicología del Departamento de Farmacia de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara y Dra. Yolanda Alcaraz Contreras con el apoyo económico de los proyectos de investigación CONACYT-CB #A1-S-27694, Laboratorio Nacional UG-UAA-CONACyT 299078 y DAIP-UGto #034/2021.

Tabla de Contenidos

Índice de Figuras.....	1
Índice de Tablas.....	5
Índice de Esquemas	6
Índice de Anexos	6
Estructuras sintetizadas.....	9
Resumen	10
Capítulo 1 Introducción	11
Capítulo 2 Marco teórico	16
2.1 El plomo (Pb).....	16
2.1.1 Exposición	17
2.1.2 Toxicocinética.....	19
2.1.3 Mecanismos de toxicidad, efectos adversos y manifestaciones clínicas ..	22
2.1.4 Tratamiento contra intoxicación	23
2.1.5 Idealidad en agentes quelantes y nuevas tendencias en la quelatoterapia	25
2.2 Toxicidad química de los metales y los principios de la complejación.....	26
2.3 Principios básicos de los quelantes empleados como tratamientos terapéuticos	
.....	27
Capítulo 3 Objetivos e Hipótesis	32
3.1 Objetivo General.....	32

3.2 Objetivos Específicos	32
3.3 Hipótesis	32
Capítulo 4 Metodología	33
4.1.1 Síntesis de 1,3-ditiolanos	33
4.1.2 Síntesis de ésteres	34
4.1.3 Metodología general para la reducción del enlace disulfuro	35
4.2 Metodología general para la evaluación biológica	36
4.2.1 Modelo animal de intoxicación por plomo	36
4.2.2 Esquema de tratamiento y administración de moléculas	36
4.2.3 Grupos de estudio	37
4.2.4 Obtención y preservación de muestras biológicas.....	37
4.3 Metodología general para la cuantificación de plomo y análisis estadístico ..	38
Capítulo 5 Resultados y discusión.....	40
5.1 Análisis computacional de la regla de cinco de Lipinski.....	42
5.2 Síntesis y caracterización de las moléculas de interés.....	46
5.2.1 Síntesis de 1,3-ditiolanos	46
5.2.2 Síntesis de ésteres	50
5.2.3 Reducción del enlace disulfuro.....	52
5.3 Evaluación biológica de compuestos en modelo de intoxicación por Pb.....	59
5.3.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar.....	59

5.3.2 Diagramas de solubilidad y diagramas de distribución de especies	59
5.3.3 Administración y obtención de muestras de interés biológico	74
5.4 Cuantificación de plomo y análisis estadístico	76
Capítulo 6 Conclusiones	98
Perspectivas	99
Sección experimental.....	100
6.1 Material y equipo de laboratorio.....	100
6.1.1 Biológico.....	100
6.1.2 Reactivos.....	100
6.1.3 Análisis estructural de las moléculas sintetizadas	101
6.1.4 Procedimiento general de evaluación biológica	101
Anexos	102

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de la toxicología de los metales pesados.	14
Figura 2. Niveles de plomo asociados con efectos adversos a la salud.....	17
Figura 3. 1,3-ditiolanos sintetizados en el presente trabajo.	33
Figura 4. Ésteres sintetizados en el presente trabajo.	34
Figura 5. Ésteres reducidos sintetizados en el presente trabajo.....	35
Figura 6. Estructuras químicas del ácido lipoico.	40
Figura 7. Estructura de los ácidos mercaptoacrílicos.	41
Figura 8. Estructura química de los 1,3-ditiolanos.....	44
Figura 9. Estructura química de los ésteres.	44
Figura 10. Estructura química de la cisteamina (9) y cisteína (10).....	45
Figura 11. Átomos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno.	45
Figura 12. Comparación de espectros de RMN de ^1H 500 MHz en DMSO- d_6 de los compuestos 1,3-ditiolanos (3a-d) y DMSA (1).....	48
Figura 13. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C 500 MHz en DMSO- d_6 de los compuestos 1,3-ditiolanos (3a-d) y DMSA (1).....	49
Figura 14. Comparación de espectros de RMN de ^1H 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos 7a-b (monoéster), ácido lipoico (4), ácido dihidrolipoico (5) e isosorbide (6).55	
Figura 15. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos 7a-b (monoéster), ácido lipoico (4), ácido dihidrolipoico (5) e isosorbide (6).56	

Figura 16. Comparación de espectros de RMN de ^1H 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos 8a-b (diéster), ácido lipoico (4), ácido dihidrolipoico (5) e isosorbide (6).	57
Figura 17. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos 8a-b (diéster), ácido lipoico (4), ácido dihidrolipoico (5) e isosorbide (6).	58
Figura 18. Gráfico de solubilidad del DMSA, compuesto 1	60
Figura 19. Gráfico de solubilidad del compuesto 3a	60
Figura 20. Gráfico de solubilidad del compuesto 3b	61
Figura 21. Gráfico de solubilidad del compuesto 3c	61
Figura 22. Gráfico de solubilidad del compuesto 3d	61
Figura 23. Gráfico de solubilidad del ácido lipoico, compuesto 4	62
Figura 24. Gráfico de solubilidad del compuesto 5	62
Figura 25. Gráfico de solubilidad del compuesto 7a	63
Figura 26. Gráfico de solubilidad del compuesto 8a	63
Figura 27. Gráfico de solubilidad del compuesto 7b	64
Figura 28. Gráfico de solubilidad del compuesto 8b	64
Figura 29. Gráfico de solubilidad del compuesto 9	65
Figura 30. Gráfico de solubilidad del compuesto 10	65
Figura 31. Diagrama de distribución de especies del DMSA, compuesto 1	67
Figura 32. Diagrama de distribución de especies del compuesto 3a	68
Figura 33. Diagrama de distribución de especies del compuesto 3b	69

Figura 34. Diagrama de distribución de especies del compuesto 3c	69
Figura 35. Diagrama de distribución de especies del compuesto 3d	69
Figura 36. Diagrama de distribución de especies del ácido lipoico, compuesto 4	70
Figura 37. Diagrama de distribución de especies del compuesto 5	70
Figura 38. Diagrama de distribución de especies del compuesto 7a	71
Figura 39. Diagrama de distribución de especies del compuesto 8a	71
Figura 40. Diagrama de distribución de especies del compuesto 8b	72
Figura 41. Diagrama de distribución de especies del compuesto 9	72
Figura 42. Diagrama de distribución de especies del compuesto 10	73
Figura 43. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 2.....	79
Figura 44. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 3.....	81
Figura 45. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 4.....	84
Figura 46. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 5.....	86
Figura 47. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 6.....	88
Figura 48. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 8.....	92

Figura 49. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 9.....	95
Figura 50. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 10.....	97

Índice de tablas

Tabla 1. Principales vías de acceso y sus principales fuentes de exposición	18
Tabla 2. Principales tratamientos en intoxicación por metales pesados	23
Tabla 3. Principales desventajas de los agentes quelantes empleados como tratamiento ...	24
Tabla 4. Propiedades de los ácidos-bases duras-blandas de la teoría de Pearson.....	26
Tabla 5. Dureza y blandura de los iones metálicos y los ligandos	28
Tabla 6. Evaluación computacional de la regla de cinco de Lipinski	43
Tabla 7. Síntesis de los 1,3-ditiolanos	48
Tabla 8. Condiciones experimentales para la síntesis de ésteres.....	50
Tabla 9. Condiciones experimentales para la reducción del enlace disulfuro.....	55
Tabla 10. Valores de pH del sistema digestivo de la rata y el humano	67
Tabla 11. Condiciones de digestión húmeda para muestras biológicas	75
Tabla 12. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g/dL}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb	76
Tabla 13. Niveles de Pb en órganos ($\mu\text{g/g}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb.....	82
Tabla 14. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g/dL}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb	89
Tabla 15. Niveles de Pb en órganos ($\mu\text{g/g}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb.....	93

Índice de esquemas

Esquema 1. Ecuación general de la síntesis de los 1,3-ditiolanos.....	46
Esquema 2. Ecuación general de la síntesis de ésteres.....	50
Esquema 3. Ecuación general de la síntesis del monoéster.....	52
Esquema 4. Ecuación general de la síntesis del diéster.....	52
Esquema 5. Ecuación general de la reducción del ácido lipoico.....	53
Esquema 6. Ecuación general de la reducción del monoéster (8a).	54
Esquema 7. Ecuación general de la reducción del diéster (8b).	54

Índice de Anexos

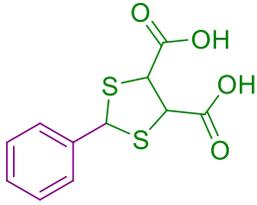
Cromatograma de ESI-MS 1. Compuesto 3a	102
Cromatograma de ESI-MS 2. Compuesto 3b	102
Cromatograma de ESI-MS 3. Compuesto 3c	103
Cromatograma de ESI-MS 4. Compuesto 3d	103
Cromatograma de ESI-MS 5. Compuesto 7a	104
Cromatograma de ESI-MS 6. Compuesto 7b	104
Cromatograma de ESI-MS 7. Compuesto 8a	105
Cromatograma de ESI-MS 8. Compuesto 8b	105

Acrónimos y abreviaturas

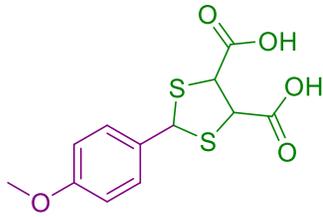
\bar{x}	media o promedio
%	por ciento
%R	porcentaje de rendimiento
~	aproximadamente
°C	grados Celsius
µg	microgramos
δ-ALA	ácido δ-aminolevulínico
¹³ C	carbono 13
¹ H	hidrógeno 1
AcOEt	acetato de etilo
<i>ad libitum</i>	a libre voluntad
ALA	ácido delta aminolevulínico
ALAD	ácido delta aminolevulinato deshidratasa
b.h.	baño de hielo
BAL	British Anti-Lewisite
B-Pb	plomo en sangre
c.c.f.	cromatografía en capa fina
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CDI	1,1-carbonildiimidazol
CERCLA	Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act
CH ₂ Cl ₂ anh.	diclorometano anhidro
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DCU	diciclohexil urea
DDE	diagrama de distribución de especies
DHLA	dihydrolipoic acid
dL	decilitros
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMPS	ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico
DMSA	ácido dimercaptosuccínico
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DPA	D-penicilamina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EDTANa ₂ Ca	etilendiaminotetraacetato de calcio disódico
E-Pb	plomo en eritrocitos
equiv.	equivalentes
ESI-QTOF-MS	electrospray ionization-quadrupole-time -of -flight mass spectrometry
EtOH	etanol

FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
g/mol	gramos por mol
h	horas
H₂O dest.	agua destilada
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
H_A	Hipótesis alterna
H₀	Hipótesis nula
HySS	Hyperquad Simulation and Speciation
i.p.	intraperitoneal
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
kDa	kilodaltons
kg	kilogramo
KHSO₄	bisulfato de potasio
Log P	coeficiente de partición octanol-agua
M	molar
M	cationes solvatados
mg	miligramos
MHz	megahertz
min	minutos
mL	mililitros
MΩ cm⁻¹	miliohms por centímetro
N	normal
n	tamaño de muestra
N₂ (g)	nitrógeno gas
NaBH₄	borohidruro de sodio
Pb	plomo
pH	potencial de hidrógeno
P-Pb	plomo en plasma
ppm	partes por millón
RMN	resonancia magnética nuclear
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SD	desviación estándar
t.a.	temperatura ambiente
Teoría ABDB	teoría de ácido-base duro-blando
THF	tetrahidrofurano
U-Pb	plomo en orina

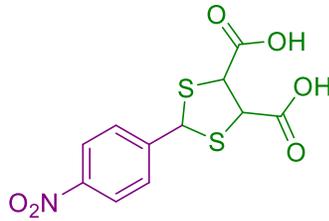
Estructuras sintetizadas



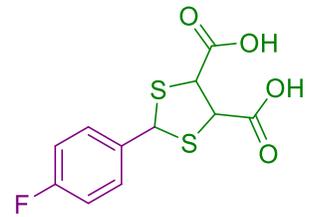
3a



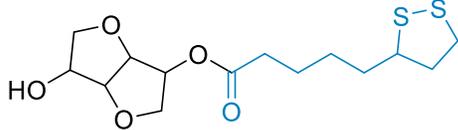
3b



3c



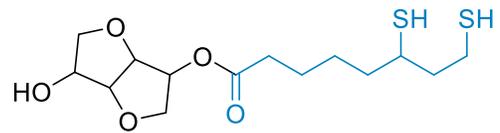
3d



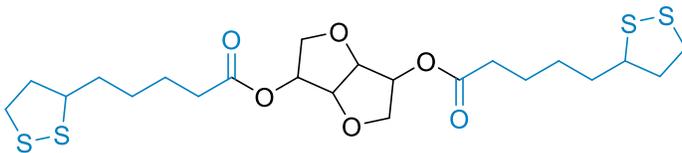
7a



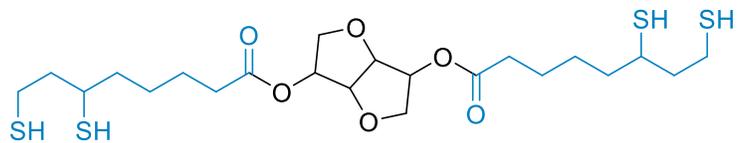
5



7b



8a



8b

Resumen

Los metales pesados como xenobióticos han sido y siguen siendo investigados principalmente en países en vías de desarrollo como México al generar problemas de salud pública debido a su persistencia en el ambiente. De manera particular, el plomo sigue representando un serio problema de salud a nivel mundial, debido a su toxicidad que afecta principalmente a niños, quienes presentan efectos adversos y nocivos a dosis mucho menores que los adultos.

Actualmente, existen diversos tratamientos para contrarrestar los efectos adversos de la intoxicación por metales pesados, dependiendo de la concentración presente en el organismo, siendo una de ellas el uso de agentes quelantes. Los quelantes, son compuestos orgánicos o inorgánicos, capaces de enlazarse mediante enlaces de coordinación a iones metálicos y formar complejos estables de tipo anillo llamados quelatos. Sin embargo, los agentes quelantes empleados como tratamiento para la intoxicación por metales pesados presentan desventajas que limitan su uso. Por ello, resulta fundamental contar con nuevas alternativas que minimicen los efectos secundarios de los tratamientos actuales y que además, permitan una fácil administración, es decir, por vía oral.

En el presente trabajo, se abordó la síntesis de nuevas moléculas análogas del DMSA (**3a-d**) y el ácido lipoico (**7a-b** y **8a-b**), donde mediante la comparación de espectros de RMN entre el crudo de reacción y la materia prima, al igual que la obtención de los cromatogramas ESI-MS, se determinó la síntesis de los compuestos de interés. Posteriormente, se realizó la evaluación biológica de la actividad quelante *in vivo* en un modelo murino de intoxicación por plomo, cuantificando mediante ICP-MS la concentración del tóxico en sangre, riñón, hígado y testículo. Finalmente, se determinó mediante el análisis estadístico que los derivados del DMSA (1,3-ditiolanos), presentaron la actividad quelante deseada frente al Pb al disminuir la concentración de éste en comparación con el control positivo en los órganos evaluados. No obstante, los ésteres derivados del ácido lipocico y el isosorbide, no lograron remover el metal en el torrente sanguíneo u otro órgano evaluado al no poseer diferencia estadísticamente significativa.

Capítulo 1 Introducción

Los organismos vivos están constituidos por una amplia variedad de biomoléculas, en cuya composición química prevalecen macro-elementos como el carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S). Sin embargo, ningún organismo podría subsistir sin la presencia de los llamados hetero-elementos, siendo la mayoría de ellos metales.

Los metales son de gran importancia en los procesos biológicos, debido a las propiedades químicas que poseen y por las cuales son capaces de participar en procesos de óxido-reducción y formación de enlaces de coordinación, coadyuvando en la conservación de un estado de equilibrio. Algunos metales y metaloides traza son clasificados como esenciales para los humanos, gracias a la actividad específica benéfica que desempeñan dentro del organismo; estos son: el litio (Li), el hierro (Fe), el cromo (Cr), el zinc (Zn), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el cobalto (Co), el molibdeno (Mo) y el selenio (Se)^{1,2}.

Por otro lado, podemos hacer una segunda clasificación y englobar a todas aquellas especies químicas externas y extrañas a un organismo conocidas como xenobióticos. Los xenobióticos, son compuestos químicos ajenos a un organismo vivo que pueden perjudicar el balance interno del mismo. La lista de xenobióticos incluye contaminantes ambientales clásicos y emergentes, dentro de los cuales destacan los metales pesados y su variedad de formas fisicoquímicas que han sido ampliamente reportadas debido a la toxicidad intrínseca inherente que poseen^{3,4,5}.

¹ Schrauzer, G. N. Lithium: Occurrence, Dietary Intakes, Nutritional Essentiality. *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, *21* (1), 14–21.

² Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 120–129.

³ Jan, A. T.; Azam, M.; Siddiqui, K.; Ali, A.; Choi, I.; Haq, Q. M. R. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (12), 29592–29630.

⁴ Length, F. Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. *Int. J. Phys. Sci.* **2007**, *2* (5), 112–118.

En la actualidad, existe un gran número de fuentes de exposición tanto naturales como antropogénicas (siendo estas últimas las de mayor relevancia), que han comprometido la homeostasis corporal al facilitar la interacción entre el agente tóxico y el organismo. Por ello, la exposición del ser humano ante estos agentes a corto o largo plazo puede provocar efectos adversos a la salud⁴.

Es importante resaltar que la intoxicación por metales pesados pasa desapercibida debido a que se carecen de signos y síntomas iniciales o son poco específicos, por lo cual, al carecer de un signo patognomónico, en la mayoría de los casos es difícil establecer una sospecha diagnóstica y, por lo tanto, su diagnóstico es infravalorado. No obstante, al bioacumularse el agente nocivo o sus metabolitos hasta alcanzar un nivel crítico, es cuando comenzarán a desencadenarse una serie de respuestas que pueden iniciar como una simple alergia o desarrollarse a cuadros graves de intoxicación, enfermedades crónicas, enfermedades congénitas, y en caso de una dosis letal, la muerte.

Los metales pesados como xenobióticos han sido y siguen siendo investigados, debido a que aún no se conoce por completo toda la información referente a ellos; sin mencionar que su mayor prevalencia y afección, se observa principalmente en países en vías de desarrollo como México⁶. Los elementos más estudiados son: el plomo (Pb), el cadmio (Cd), el mercurio (Hg) y el metaloide arsénico (As). En el presente trabajo, nos enfocaremos en el plomo.

De manera general, la mayoría de los metales pesados ingresan al organismo principalmente por la vía oral y una vez dentro, mediante el mimetismo de los metales esenciales, provocarán la disrupción de funciones biológicas al enlazarse con ligandos biológicos y generar un rearrreglo estérico en la biomolécula^{7,8} o, mediante la inducción de un estado de estrés oxidativo al fomentar la formación de radicales libres^{9,10}.

⁵ Nagajyoti, P. C.; Lee, K. D.; Sreekanth, T. V. M. Heavy Metals, Occurrence and Toxicity for Plants: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2010**, 8 (3), 199–216.

⁶ Caravanos, J.; Dowling, R.; Téllez-Rojo, M. M.; Cantoral, A.; Kobrosly, R.; Estrada, D.; Orjuela, M.; Gualtero, S.; Ericson, B.; Rivera, A.; et al. Niveles de Plomo En Sangre En México y Su Implicación Para La Carga Pediátrica de La Enfermedad. *Ann. Glob. Heal.* **2014**, 80 (4), e1–e11.

⁷ Kasprzak, K. S. Oxidative DNA and Protein Damage in Metal-Induced Toxicity and Carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32 (10), 958–967.

Por tal motivo, resulta difícil establecer un mecanismo general de toxicidad para todos los metales. Sin embargo, existen diversos factores que juegan un papel importante en el proceso de intoxicación y la vulnerabilidad del organismo como:

- Factores relacionados con la exposición (la dosis, la ruta de exposición, el tiempo de exposición y la frecuencia de exposición);
- Factores químicos (estado de oxidación y especie química del metal);
- Factores del hospedero (la edad, el sexo, la dieta y el estilo de vida) y;
- Factores adaptativos del hospedero (la absorción y la excreción del metal, el almacenamiento de una forma inerte y el secuestro intencional del metal).

Una vez que se ha establecido que existen los factores de riesgo necesarios que permitirán la interacción entre el organismo susceptible y el agente tóxico, los biomarcadores nos permitirán evaluar el grado de intoxicación y la dirección que deberá seguirse para regresar a un estado de equilibrio. Las matrices biológicas para la evaluación de biomarcadores en la intoxicación por metales pesados son la sangre, la orina y el cabello.

Existen diversas formas de mitigar los efectos adversos de la intoxicación por metales pesados, dependiendo de la concentración presente en la matriz biológica evaluada. Generalmente, si se presenta una concentración en sangre menor a 45 $\mu\text{g/dL}$, la principal recomendación es la remoción del individuo del lugar de exposición, combinada con una terapia de soporte, para permitir al organismo por sí mismo la eliminación del agente causal y, en caso de una concentración en sangre mayor a 45 $\mu\text{g/dL}$, es recomendado el uso de agentes quelantes.

⁸ Wong, D. L.; Merrifield-MacRae, M. E.; Stillman, M. J. Lead (II) Binding in Metallothioneins. *Lead Its Eff. Environ. Heal.* **2017**, 17 (li), 241–269.

⁹ Matović, V.; Buha, A.; Dukić-Ćosić, D.; Bulat, Z. Insight into the Oxidative Stress Induced by Lead and/or Cadmium in Blood, Liver and Kidneys. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, 78, 130–140.

¹⁰ Agrawal, S.; Flora, G.; Bhatnagar, P.; Flora, S. J. S. Comparative Oxidative Stress, Metallothionein Induction and Organ Toxicity Following Chronic Exposure to Arsenic, Lead and Mercury in Rats. *Cell. Mol. Biol.* **2014**, 60 (2), 13–21.

Los agentes quelantes, son compuestos orgánicos o inorgánicos, capaces de unirse mediante enlaces de coordinación a iones metálicos y formar complejos estables de tipo anillo llamados quelatos. La palabra quelación, proviene del vocablo griego *chele*, que se traduce como pinza de langosta, debido al fuerte agarre que poseen los quelantes hacia ciertas especies iónicas metálicas¹¹.

La Figura 1, muestra un panorama general de la toxicología de los metales (modificado de Tokar et al., 2013)¹².

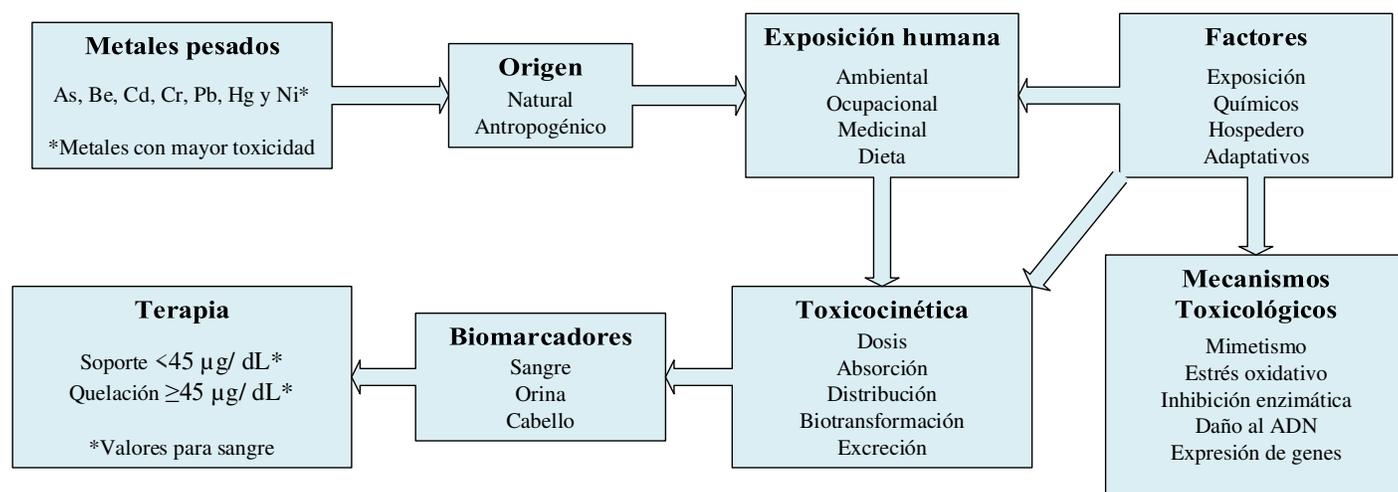


Figura 1. Esquema general de la toxicología de los metales pesados.

Las principales razones para la búsqueda de nuevos tratamientos en la intoxicación por metales pesados se resumen en:

1. No existe un tratamiento profiláctico seguro y efectivo;
2. Los tratamientos recomendados poseen limitantes para su uso;
3. La mayoría de los tratamientos disponibles, requieren ser administrados por un profesional del área de la salud;
4. No existe un tratamiento oral seguro y efectivo disponible y;
5. No existe un antídoto que actué de forma efectiva para remover el tóxico del torrente sanguíneo y los tejidos blandos por completo.

¹¹ Bjørklund, G.; Mutter, J.; Aaseth, J. Metal Chelators and Neurotoxicity: Lead, Mercury, and Arsenic. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91* (12), 3787–3797.

¹² Tokar, E. J.; Boyd, W. A.; Freedman, J. H.; Waalkes, M. P. Toxic Effects of Metals. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons; Klassen, C. D., Ed.; *McGraw-Hill Education*, **2013**; pp 981–1030.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo está dividido en tres etapas, la primera abordará la síntesis de nuevas moléculas análogas al DMSA y el ácido lipoico. Sobre la primera estructura, por ser el tratamiento por excelencia en la intoxicación por plomo y la segunda, por ser el principal antioxidante que contrarresta los efectos nocivos de los radicales libres generados por el xenobiótico. En una segunda etapa, se realizará la evaluación biológica en un modelo murino de intoxicación por plomo, contribuyendo a la investigación de la actividad quelante *in vivo*. En una tercera etapa, cuantificar la concentración del tóxico en el torrente sanguíneo y tejidos blanco mediante ICP-MS, comprobando la afinidad, especificidad y efectividad de las nuevas moléculas propuestas como agentes quelantes y finalmente, mediante el análisis estadístico correspondiente, determinar si existe una diferencia significativa entre los controles y las nuevas moléculas, aportando valiosa información en el área de la quelatoterapia.

Capítulo 2 Marco teórico

2.1 El plomo (Pb)

El plomo (Pb), es el metal pesado más estudiado debido a la gran variedad de aplicaciones en las que se ha empleado desde su descubrimiento y hasta la fecha, varias revisiones sobre su toxicidad han sido publicadas¹³.

La vía de ingreso al organismo se relaciona con la fuente de exposición y, al encontrarse presente en un gran número de productos como: las tuberías de agua, la pintura blanca de casas ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$), los cosméticos, las pilas, las soldaduras, las aleaciones, la cristalería, las municiones, entre muchos más; es como se propicia la intoxicación por dicho metal¹⁴. Aunado a su uso extensivo y al inadecuado manejo de los desechos, hoy en día es considerado como un indicador de contaminación por metales pesados.

El plomo sigue representando un serio problema de salud a nivel mundial, debido a su persistencia en el ambiente, afectando principalmente a niños, quienes presentan efectos adversos y nocivos a dosis mucho menores que los adultos, tomando únicamente como referencia la concentración sanguínea¹⁵. La Figura 2,

¹³ Skerfving, S.; Bergdahl, I. A. Lead, Fourth Edi.; *Elsevier*, **2015**; Vol. 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00043-3>.

¹⁴ Fewtrell, L. J.; Prüss-Üstün, A.; Landrigan, P.; Ayuso-Mateos, J. L. Estimating the Global Burden of Disease of Mild Mental Retardation and Cardiovascular Diseases from Environmental Lead Exposure. *Environ. Res.* **2004**, *94* (2), 120–133.

¹⁵ Meyer, P. A.; Brown, M. J.; Falk, H. Global Approach to Reducing Lead Exposure and Poisoning. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **2008**, 659 (1–2), 166–175.

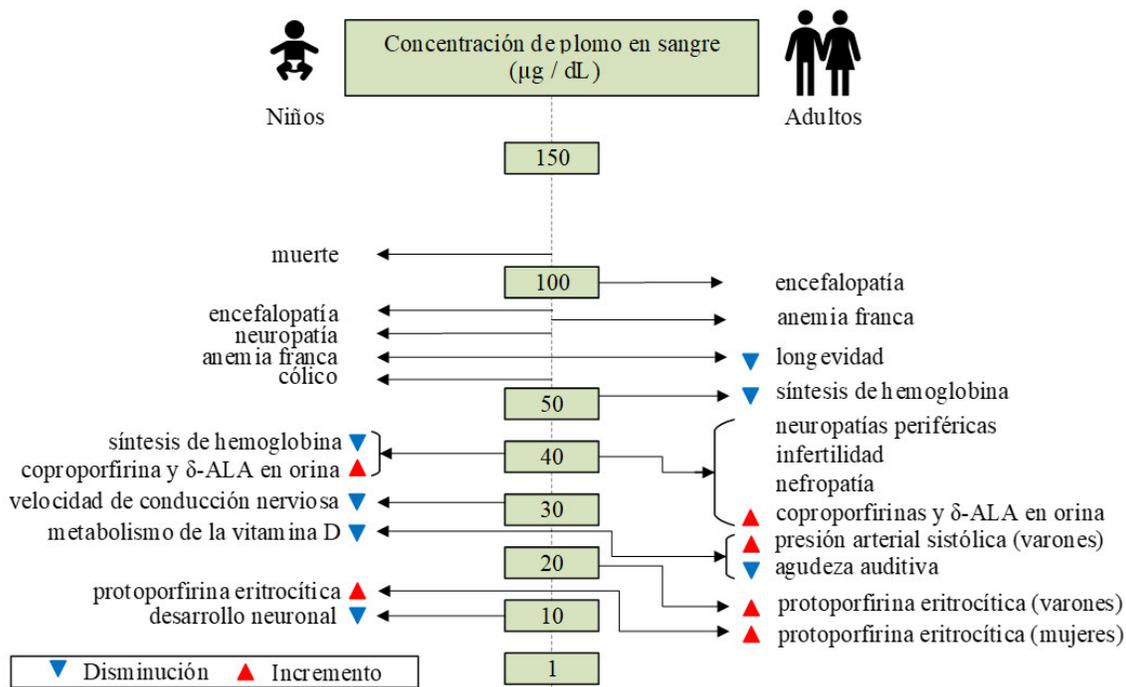


Figura 2. Niveles de plomo asociados con efectos adversos a la salud; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** recuperada de Byrns et al. (2012), nos presenta un diagrama de los principales efectos adversos del plomo en niños y adultos¹⁶.

Figura 2. Niveles de plomo asociados con efectos adversos a la salud.

2.1.1 Exposición

Existen dos tipos de que continenen plomo que pueden provocar la intoxicación, los orgánicos y los inorgánicos. Los primeros, se encuentran en desuso debido a la gran exposición que generaban en el ambiente al ser utilizados como aditivos en la gasolina,

¹⁶ Byrns, M. C.; Penning, T. M. Toxicología Ambiental: Cancerígenos y Metales Pesados. In Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica; Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C., Eds.; McGraw-Hill, 2012; pp 1853–1878.

predominando el estado de oxidación mayor (Pb^{4+})¹⁷, y los segundos, empleados en diversos productos donde predomina el estado de oxidación menor (Pb^{2+}).

La exposición a las especies del metal ocurre a través de fuentes tanto naturales como antropogénicas. Por tal motivo, la toxicología ambiental y la ecotoxicología juegan un papel muy importante en la determinación de la presencia y la distribución de los compuestos o partículas que ingresan en el organismo, así como en la evaluación de sus efectos. En adición, la fuente de exposición permitirá determinar la ruta de ingreso al organismo siendo las principales la vía oral y la vía respiratoria, aunque en menor medida, puede absorberse por la piel.

La Tabla 1, sintetiza las principales fuentes de exposición, así como las vías de acceso al organismo^{13,18}.

Tabla 1. Principales vías de acceso y sus principales fuentes de exposición

Ruta de ingreso	Fuente de exposición
<p>Vía respiratoria^{19,20}</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pintura blanca de casas previo a 1978 • Gasolina con aditivos a base de plomo • Emisiones de actividad industrial • Fumar • Demolición de edificios

¹⁷ Grandjean, P.; Nielsen, T. Organolead Compounds: Environmental Health Aspects. *Residue Rev.* **1979**, VOL 72, 98–148. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6214-5_4.

¹⁸ Levin, R.; Brown, M. J.; Kashtock, M. E.; Jacobs, D. E.; Whelan, E. A.; Rodman, J.; Schock, M. R.; Padilla, A.; Sinks, T. Lead Exposures in U.S. Children, 2008: Implications for Prevention. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116* (10), 1285–1293.

¹⁹ Stroh, E.; Lundh, T.; Oudin, A.; Skerfving, S.; Strömberg, U. Geographical Patterns in Blood Lead in Relation to Industrial Emissions and Traffic in Swedish Children, 1978–2007. *BMC Public Health* **2009**, *9* (Figure 1), 1–14.

²⁰ Rabito, F. A.; Iqbal, S.; Shorter, C. F.; Osman, P.; Philips, P. E.; Langlois, E.; White, L. E. The Association between Demolition Activity and Children's Blood Lead Levels. *Environ. Res.* **2007**, *103* (3), 345–351.

Vía oral ^{21,22}	<ul style="list-style-type: none"> • Tuberías de plomo en agua de consumo humano • Cerámica vidriada • Pintura blanca de casas previo a 1978 • Leche materna • Alimentos • Medicina herbolaria oriental
Vía dérmica ^{23,24}	<ul style="list-style-type: none"> • Cosméticos • Joyería

2.1.2 Toxicocinética

El grado de absorción del plomo una vez que ingrese en el organismo, dependerá de la edad del individuo y de su alimentación. Los niños presentan una mayor absorción con un valor cercano al 40%, mientras que en los adultos el valor es <20% siendo más marcado en mujeres que en hombres. Se ha reportado, que la administración simultánea de metales esenciales, agentes antioxidantes y algunas vitaminas, ayudan en la reducción de la absorción gastrointestinal o disminuyen los efectos adversos²⁵.

El mejor biomarcador de exposición al plomo es su determinación en la sangre (B-Pb), ya que el metal se encuentra presente en los eritrocitos (E-Pb) y únicamente <1% en plasma (P-Pb). La presencia de Pb en las células rojas es debida a la gran afinidad que presenta con la enzima ácido δ -aminolevulinato deshidratasa (ALAD)²⁶, que al ser 20 veces

²¹ Jean Brown, M.; Raymond, J.; Homa, D.; Kennedy, C.; Sinks, T. Association between Children's Blood Lead Levels, Lead Service Lines, and Water Disinfection, Washington, DC, 1998-2006. *Environ. Res.* **2011**, *111* (1), 67-74.

²² Pantic, I.; Tamayo-Ortiz, M.; Rosa-Parra, A.; Bautista-Arredondo, L.; Wright, R. O.; Peterson, K. E.; Schnaas, L.; Rothenberg, S. J.; Hu, H.; Téllez-Rojo, M. M. Children's Blood Lead Concentrations from 1988 to 2015 in Mexico City: The Contribution of Lead in Air and Traditional Lead-Glazed Ceramics. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15* (10).

²³ Al-Saleh, I.; Al-Enazi, S.; Shinwari, N. Assessment of Lead in Cosmetic Products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *54* (2), 105-113.

²⁴ Mazumdar, I.; Goswami, K.; Ali, M. S. Status of Serum Calcium, Vitamin D and Parathyroid Hormone and Hematological Indices Among Lead Exposed Jewelry Workers in Dhaka, Bangladesh. *Indian J. Clin. Biochem.* **2017**, *32* (1), 110-116.

²⁵ Ahamed, M.; Siddiqui, M. K. J. Environmental Lead Toxicity and Nutritional Factors. *Clin. Nutr.* **2007**, *26* (4), 400-408.

²⁶ Wetmur, J. G. Influence of the Common Human δ -Aminolevulinic Dehydratase Polymorphism on Lead Body Burden. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102* (SUPPL. 3), 215-219.

mayor que el zinc²⁷, logra reemplazarlo de su sitio de coordinación con ligandos de cisteína, inhibiendo la actividad catalítica de la enzima²⁸.

Anteriormente, se había establecido que la hemoglobina era el principal sitio de unión del ión metálico (~99%); sin embargo, el primer lugar es ocupado por la enzima ALAD (240 kDa), el segundo por una proteína de 45 kDa (probablemente una nucleotidasa), y el tercero una enzima de <10 kDa²⁹. Existen dos isoenzimas de ALAD, ALAD-1 (variante de lisina) y ALAD-2 (variante de asparagina)³⁰. Se ha determinado que la segunda incorpora al plomo en mayor medida y de una forma menos tóxica que la primera, motivo por el cual, conferirá resistencia a los efectos dañinos mediante un factor adaptativo³¹.

La relación entre el E-Pb y P-Pb es curvilínea, debido a que el plomo saturará primero todos los sitios de unión disponibles a ALAD dentro del eritrocito y posteriormente, incrementará la concentración en el plasma³². El Pb será distribuido a distintos órganos a través del plasma sanguíneo, exponiendo a tejidos blandos como el hígado y el epitelio tubular de los riñones a una mayor concentración³³. Con el paso del tiempo, es redistribuido y depositado en huesos, dientes y cabello.

En promedio, 95% de la totalidad del plomo corporal del adulto está en los huesos y es reabsorbido con gran lentitud en el torrente sanguíneo, excepto cuando ocurre una desmineralización, como ocurre durante el embarazo. El plomo, logra atravesar la barrera hematoencefálica y la barrera placentaria¹⁶.

²⁷ Simons, T. J. B. The Affinity of Human Erythrocyte Porphobilinogen Synthase for Zn²⁺ and Pb²⁺. *Eur. J. Biochem.* **1995**, 234 (1), 178–183.

²⁸ Jaffe, E. K.; Martins, J.; Li, J.; Kervinen, J.; Dunbrack, R. L. The Molecular Mechanism of Lead Inhibition of Human Porphobilinogen Synthase. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (2), 1531–1537.

²⁹ Bergdahl, I. A.; Grubb, A.; Schütz, A.; Desnick, R. J.; Wetmur, J. G.; Sassa, S.; Skerfving, S. Lead Binding to δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALAD) in Human Erythrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* **1997**, 81 (4), 153–158.

³⁰ Wetmur, J. G.; Kaya, A. H.; Plewinska, M.; Desnick, R. J. Molecular Characterization of the Human δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase 2 (ALAD2) Allele: Implications for Molecular Screening of Individuals for Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. *Am. J. Hum. Genet.* **1991**, 49 (4), 757–763.

³¹ Kelada, S. N. Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* **2001**, 154 (1), 1–13.

³² Bergdahl, I. A.; Sheveleva, M.; Artamonova, V. G. Plasma and Blood Lead in Humans: Capacity-Limited Binding to δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase and Other Lead-Binding Components 1. *Pharmacia* **1998**, 253, 247–253.

³³ Barry, P. S. I. A Comparison of Concentrations of Lead in Human Tissues. *Br. J. Ind. Med.* **1975**, 32 (2), 119–139.

Al igual que diversos metales, el plomo no es metabolizado por el organismo y es excretado principalmente a través de la orina y la bilis, pero puede estar presente en la saliva, la leche materna, el sudor, las uñas y el cabello. Existe una correlación entre los niveles de plomo en sangre (B-Pb) y la orina (U-Pb), no obstante, la asociación no es lineal. La concentración de U-Pb depende de la concentración presente en el plasma sanguíneo (P-Pb), la cual puede alcanzar concentraciones mayores que B-Pb una vez que se saturan las uniones a ALAD. Por lo tanto, parece existir una relación lineal entre el P-Pb y U-Pb³⁴.

Los biomarcadores de intoxicación pueden clasificarse por exposición o por efecto. Los primeros, cuantifican directamente la concentración de plomo en la sangre completa, el plasma, la orina, el hueso, algunas secreciones u otros tejidos. Mientras que los segundos, cuantifican la inhibición enzimática de ALAD, la ferroquelatasa, la pirimidina 5'-nucleotidasa (5'-NT/ P5N), la NAD⁺ sintetasa/ nicotinamida adenina dinucleótido sintetasa (NADS) dependiente de glutamina o, la acumulación del ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), coproporfirinas, protoporfirina zinc (ZPP) y nucleótidos de pirimidina¹³. Como se mencionó anteriormente, el biomarcador más empleado es la concentración de B-Pb, cuya limitante se relaciona con la saturación de ALAD y el valor del hematocrito, subestimando o sobreestimando la concentración del agente tóxico.

El Pb presenta un modelo toxicocinético tricompartmental, localizándose inicialmente en sangre y posteriormente, distribuyéndose y depositándose en tejido blando y hueso. La concentración del metal en estos sitios dependerá de la vida media de este; y esta a su vez, de la unión y estabilidad con los bioligandos. En caso de la sangre es de aproximadamente 1 mes, con el uso de agentes quelantes ~1 semana y en combinación

³⁴ Bergdahl, I. A.; Schütz, A.; Gerhardsson, L.; Jensen, A.; Skerfving, S. Lead Concentrations in Human Plasma, Urine and Whole Blood. *Scand. J. Work. Environ. Heal.* **1997**, *23* (5), 359–363.

quelantes/hemodiálisis aproximadamente horas. Por su parte, los tejidos blandos ~1 mes y dependiendo del tipo del hueso, ~1 año (hueso trabecular) o décadas (hueso cortical)³⁵.

2.1.3 Mecanismos de toxicidad, efectos adversos y manifestaciones clínicas

El metal es un tóxico inespecífico que presenta distintos mecanismos de acción²⁵. A un nivel biomolecular interactúa con el organismo por tres posibles vías. La primera, al enlazarse e impactar numerosas proteínas enzimáticas, receptoras o estructurales al poseer gran afinidad por ligandos biológicos donadores de electrones, especialmente el grupo sulfhidrilo o tiol -SH. La segunda, al mimetizar cationes divalentes como Ca^{2+} y Zn^{2+} , interfiriendo con rutas metabólicas dependientes de estos metales, particularmente en mitocondrias y sistemas de segundo mensajero que regulan el metabolismo de la energía celular. Y la tercera, al exhibir efectos mutagénicos y mitogénicos en células *in vitro* de mamíferos y efectos carcinogénicos en ratas y ratones³⁶.

El tóxico ocupa el segundo lugar de prioridad en la escala CERCLA 2019¹⁶ y posee efectos hematológicos, carcinogénicos, mutagénicos y efectos en el sistema nervioso, el sistema cardiovascular, el sistema óseo, el sistema endócrino, el sistema inmunológico, el sistema reproductor, los riñones y el tracto gastrointestinal¹³. Es importante recordar que los niños presentan efectos adversos más intensos y a menores concentraciones que un

³⁵ Rentschler, G.; Broberg, K.; Lundh, T.; Skerfving, S. Long-Term Lead Elimination from Plasma and Whole Blood after Poisoning. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2012**, 85 (3), 311–316.

³⁶ Calello, D. P.; Henretig, F. M. LEAD. In Goldfrank's Toxicologic Emergencies; Hoffman, R. S., Howland, M. A., Lewin, N. A., Nelson, L. S., Goldfrank, L. R., Flomenbaum, N. E., Eds.; *McGraw-Hill Education*, **2015**; pp 1219–1234.

adulto³⁷. Los numerosos efectos fisiopatológicos observados inducidos por el plomo, predicen con precisión, que las manifestaciones clínicas de la intoxicación por el tóxico son diversas³⁶. En caso de los niños, las manifestaciones serán consideradas severas con una concentración de B-Pb > 70-100 mg/dL, presentando encefalopatías, vómito persistente y palidez (anemia). Las manifestaciones leves a moderadas se observan con una concentración de B-Pb = 50-70 mg/dL, presentando comportamiento hiperirritable, letargo intermitente, poco interés en jugar, vómito intermitente, dolor abdominal y anorexia. Con una concentración de B-Pb > 49 mg/dL, se presenta deterioro en la cognición, el comportamiento, el equilibrio, la coordinación motora fina, la audición y el crecimiento. Mientras que, para los adultos, las manifestaciones serán consideradas severas con una concentración de B-Pb > 100 mg/dL, moderadas con una concentración de B-Pb > 70-100 mg/dL y leves con una concentración de B-Pb = 20-69 mg/dL.

2.1.4 Tratamiento contra intoxicación

Actualmente, las personas que presenten una concentración de plomo en sangre mayor a 45 µg/dL, son sometidas a terapia de quelación. El principal objetivo de este tratamiento es eliminar el Pb presente en el organismo antes de que ocurran cambios irreversibles. Como el nombre lo indica, la eliminación de Pb se logra mediante el uso de agentes quelantes que formarán compuestos de coordinación atóxicos e hidrosolubles con el metal y posteriormente, serán excretados en orina. Los agentes quelantes son ligandos con la capacidad de enlazarse más de una vez al átomo metálico central, gracias a que poseen más de un átomo con pares de electrones sin compartir que pueden ser donados. El uso de quelantes con fines terapéuticos fue aprobado en 1991 por la FDA³⁸.

La Tabla 2, recuperada y modificada de Kumar et al. (2015), sintetiza los principales agentes quelantes empleados en la intoxicación por diversos metales³⁸.

Tabla 2. Principales tratamientos en intoxicación por metales pesados

Agente quelante	Estructura	Fórmula	Grupos de	Elementos
-----------------	------------	---------	-----------	-----------

³⁷ Hon, K.; Fung, C.; Leung, A. K. Childhood Lead Poisoning: An Overview. *Hong Kong Med. J.* **2017**, 23 (6), 616–621.

³⁸ Kumar, V.; Kumar, A.; Kumar, S. Chelating Drug Therapy. An Update. **2015**, 2 (1), 1–5.

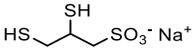
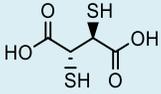
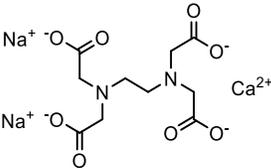
		molecular	coordinación	quelados
D-penicilamina (DPA)		$C_5H_{11}NO_2S$	O, OH, SH y NH ₂	As, Cu, y Zn
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)		$C_{10}H_{16}N_2O_8$	O, N	Cd, Pb y Zn
Dimercaprol, British Anti-Lewisite (BAL)		$C_3H_8OS_2$	OH y SH	As, Au, Hg y Pb
Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS)		$C_3H_8O_3S_3$	O y SH	As, Hg y Pb
Ácido dimercaptosuccínico (DMSA)		$C_4H_6O_4S_2$	O y SH	Cd, Hg y Pb

No obstante, la Tabla 3, enlista las principales desventajas que presentan estos tratamientos quelantes a partir de lo descrito por Flora y Pachauri (2010), por lo cual resulta fundamental contar con nuevas alternativas³⁹.

Tabla 3. Principales desventajas de los agentes quelantes empleados como tratamiento

Agente quelante	Estructura	Desventajas
DPA		-Puede generar reacciones de hipersensibilidad -Teratógeno y latirógeno reconocido -Aumenta excreción de Cu, Zn y Fe
BAL		-Administración intramuscular dolorosa y alérgica -Índice terapéutico pequeño -Olor desagradable (huevo podrido) -Moviliza Pb al cerebro

³⁹ Flora, S. J. S.; Pachauri, V. Chelation in Metal Intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, 7 (7), 2745–2788.

<p>DMPS</p>		<ul style="list-style-type: none"> -No recomendado para Pb -Aprobado sólo en Alemania -Malestar gastrointestinal -Reacciones en la piel -Eleva enzimas hepáticas -Genera reacciones de hipersensibilidad
<p>DMSA</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Malestar gastrointestinal -Eleva enzimas hepáticas -Puede alterar metabolismo de Cu -No atraviesa membrana celular -En intoxicación crónica se ha observado anemia hemolítica
<p>EDTANa₂Ca</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Redistribuye Pb al cerebro -Excreción de metales esenciales Zn, Cu y Mn -Baja absorción gastrointestinal (<5%) -Administración dolorosa -Requiere hospitalización su administración

2.1.5 Idealidad en agentes quelantes y nuevas tendencias en la quelatoterapia

Un agente quelante puede ser clasificado como ideal y ser empleado como tratamiento en la intoxicación por metales pesados, si y sólo si, no sea tóxico, posea gran solubilidad en agua, pueda atravesar barreras biológicas y llegar al sitio donde reside el metal, no sea biotransformado o degradado previo a enlazarse con el metal, que sea más afín al metal que los bioligandos, que se enlace de manera selectiva al catión metálico de interés, presente actividad a un pH fisiológico, no forme un quelato más tóxico que el metal y finalmente, pueda ser excretado fácilmente del organismo³⁹.

Los agentes quelantes presentados en la Tabla 2, cumplen con la mayor parte de estos requisitos de idealidad, sin embargo, poseen efectos secundarios no deseados (Tabla 3), que limitan su uso. Las principales desventajas para considerar es que redistribuyen el Pb en el organismo, excretan metales esenciales, no logran remover del tóxico de sitios intracelulares o presentan hepatotoxicidad y nefrotoxicidad³⁹.

Por tal motivo, se ha optado por hacer uso de nuevas estrategias como la síntesis de nuevos agentes quelantes, el uso de la terapia de combinación o la coadministración de

antioxidantes y micronutrientes. La primera hace uso de la síntesis orgánica para la obtención de nuevas moléculas que tiendan a la idealidad. La segunda, se fundamenta en el hecho de que ambos quelantes administrados poseen distinto mecanismo de acción, uno de ellos con actividad a nivel extracelular, mientras que el otro a nivel intracelular. Y la tercera, en la combinación de un quelante con antioxidantes como el ácido lipoico, que impedirán el daño ocasionado por los radicales libres generados o con micronutrientes, que disminuirán el grado de absorción del metal^{40,41}. Al carecer de un tratamiento seguro, específico y efectivo es necesario continuar con la investigación científica en el área de los metales pesados, resaltando la importancia de poseer un mayor conocimiento dentro del campo de la quelación *in vivo*^{40,42}.

2.2 Toxicidad química de los metales y los principios de la complejación

El cuerpo humano está constituido por un gran porcentaje de agua con respecto a su masa corporal y es por este hecho, que la mayor parte de las reacciones bioquímicas se llevan a cabo en el medio acuoso extracelular o intracelular. Sin mencionar, que la participación de diversos cationes metálicos en las reacciones químicas es de suma importancia para la correcta actividad biológica o en la obtención de los productos deseados. Todo metal será de relevancia toxicológica con base en las propiedades que exhibirá en un medio acuoso en su forma catiónica.

La mayoría de los metales presentes en el organismo se encuentran en forma de cationes solvatados (M). La afinidad de distintos ligandos (bases de Lewis) por ciertos metales (ácidos de Lewis), se fundamenta en la teoría ABDB de Pearson (1963)⁴³. La teoría establece que los elementos metálicos (ácidos) duros de la tabla periódica interaccionarán principalmente con bases duras como el oxígeno, los elementos metálicos intermedios con nitrógeno u oxígeno y los elementos blandos con las bases blandas, como el grupo tiol (-

⁴⁰ Kalia, K.; Flora, S. J. S. Strategies for Safe and Effective Therapeutic Measures for Chronic Arsenic and Lead Poisoning. *J Occup Heal.* **2005**, *47* (47), 1–21.

⁴¹ Pande, M.; Flora, S. J. Lead Induced Oxidative Damage and Its Response to Combined Administration of α -Lipoic Acid and Succimers in Rats. *Toxicology* **2002**, *177* (2), 187–196.

⁴² Aaseth, J.; Skaug, M. A.; Cao, Y.; Andersen, O. Chelation in Metal Intoxication-Principles and Paradigms. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, *31*, 260–266.

⁴³ Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533–3539.

SH) o selenol (-SeH). La Tabla 4, resume las propiedades de los ácidos/ bases duras y los ácidos/ bases blandas.

Tabla 4. Propiedades de los ácidos-bases duras-blandas de la teoría de Pearson

Propiedad	Ácidos y Bases Duras	Ácidos y Bases Blandas
Radio iónico/ atómico	Pequeño	Grande
Estado de oxidación	Alto	Bajo o cero
Polarizabilidad	Baja	Alta
Electronegatividad	Alta	Baja
Afinidad	Enlace iónico	Enlace covalente
Energía HOMO de bases	Baja	Alta
Energía LUMO de ácidos	Alta	Baja

2.3 Principios básicos de los quelantes empleados como tratamientos terapéuticos

La terapia de quelación tiene como finalidad eliminar los iones metálicos tóxicos del organismo, atenuar su toxicidad formando compuestos menos tóxicos al coordinarse con ellos o transferirlos a un sitio donde su acción tóxica no pueda ejecutarse⁴⁴.

Las propiedades esenciales que un agente quelante debe cumplir son:

1. Ser soluble en agua y solución fisiológica;
2. Buena farmacocinética con base en su carga iónica neta que le permita;
 - a. Buena absorción y capacidad para atravesar membranas biológicas;
 - b. Buena distribución y biodisponibilidad al sitio donde reside el metal;
 - c. Bajo metabolismo o biotransformación;
 - d. Buena excreción como complejo para evitar la reabsorción o movilización del metal a otro compartimento del organismo;
3. Alta selectividad por el ión metálico de interés y no los metales esenciales;
4. Alta tasa de intercambio del metal entre ligandos endógenos y los quelantes;

⁴⁴ Crisponi, G.; Nurchi, V. M. Chelating Agents as Therapeutic Compounds-Basic Principles; *Elsevier Inc.*, 2016.

5. Mayor estabilidad del complejo formado con el ligando exógeno que con el endógeno y alta estabilidad a pH fisiológico y pH ácido de orina y;
6. Perfil de toxicidad favorable del agente quelante y sus complejos, es decir, deber ser lo más tolerable posible para la administración a dosis tan altas como sea posible sin presentar fetotoxicidad o teratogenicidad.

El pH fisiológico, juega un papel importante en la formación y estabilidad del complejo. A un pH bajo o ácido, los agentes quelantes se vuelven inestables al protonarse, perdiendo la actividad; mientras que, a un pH alto o alcalino, los iones metálicos tienden a formar hidróxidos insolubles impidiendo su remoción de los sitios de deposición. Por ende, la estabilidad del complejo es un requisito indispensable y necesario, aunque no suficiente, para que el ion metálico pueda transformarse completamente en la especie quelada y posteriormente sea excretado del organismo.

Las constantes de protonación también deben tomarse en cuenta, ya que la formación del complejo depende de la competencia entre el protón y el ion metálico por los mismos sitios básicos del ligando. Extracelularmente, estas interacciones tienen lugar a pH 7.4, intracelularmente ~6.8 y en los espacios gastrointestinales a pH 1-2 y 6 (duodeno).

Los quelantes pueden clasificarse como bidentados, tridentados y así sucesivamente, con base en el número de grupos de coordinación presentes en su estructura química capaces de enlazar al ion metálico. La denticidad del ligando describe el número y la estequiometría de los complejos formados. Los ligandos con baja denticidad forman múltiples complejos cuya especiación depende tanto de la concentración total del ligando como de la relación metal-ligando; mientras que los quelantes hexadentados, forman un solo tipo de complejo. Además de las constantes de protonación y de estabilidad, otros factores como la solubilidad del complejo formado, la estequiometría del complejo, la competencia de protones, etc., contribuyen a la eficiencia de unión entre el ligando y el ión metálico. Los métodos para cuantificar la efectividad de un ligando por un metal fueron

reportados por Bazzicalupi et al. (2012)⁴⁵. Como se ha mencionado, los requisitos de estabilidad, dependen en gran medida de la naturaleza del ion metálico y de los grupos de coordinación en el ligando⁴⁶. La Tabla 5, esquematiza la clasificación dura-intermedia-blanda de varios iones metálicos tóxicos y los principales grupos de coordinación recuperada de Crisponi y Nurchi (2016)⁴².

Tabla 5. Dureza y blandura de los iones metálicos y los ligandos

Iones metálicos (ácidos de Lewis)			Ligandos (bases de Lewis)		
Duros	Inter	Blandos	Duros	Inter	Blandos
Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Mn ²⁺ , Al ³⁺ , Ga ³⁺ , Cr ³⁺ , Fe ³⁺ , Sn ⁴⁺ , (CH ₃) ₂ Sn ²⁺ , UO ₂ ²⁺ , VO ²⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Bi ³⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Sb ³⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Hg ⁺ , Pd ²⁺ , Cd ²⁺ , Pt ²⁺ , Hg ²⁺ , Pt ⁴⁺ , CH ₃ Hg ⁺	H ₂ O, OH ⁻ , F ⁻ , RCOO ⁻ , Cl ⁻ , RO ⁻ , NH ₃ , RNH ₂	RNH ₂	R ₂ S, RSH, RS ⁻

Idealmente, un quelante debería poseer una alta selectividad por el ion metálico de interés y no presentar ninguna interacción con los iones metálicos que se encuentran en los fluidos biológicos a concentraciones significativas. Por ello, la selectividad depende de la estabilidad termodinámica de los complejos formados entre el agente quelante y el ion metálico tóxico en comparación con la de los compuestos del quelante y los iones metálicos esenciales. El comportamiento selectivo de un agente quelante por un determinado ión metálico, puede evaluarse mediante el uso de programas de especiación como HySS⁴⁷, al conocerse las concentraciones de todos los iones metálicos involucrados y el agente quelante, así como, los parámetros termodinámicos, es decir, las constantes de protonación del agente quelante y las constantes de formación de los complejos con el metal tóxico y los metales esenciales.

⁴⁵ Bazzicalupi, C.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Clares, M. P.; García-España, E. Addressing Selectivity Criteria in Binding Equilibria. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256 (1–2), 13–27.

⁴⁶ Pearson, R. G. Chemical Hardness and Density Functional Theory. *J. Chem. Sci.* **2005**, 117 (5), 369–377.

⁴⁷ Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad Simulation and Speciation (HySS): A Utility Program for the Investigation of Equilibria Involving Soluble and Partially Soluble Species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184 (1), 311–318.

No obstante, incluso si los aspectos termodinámicos son favorables, los factores cinéticos pueden influir e interferir fuertemente en el comportamiento del agente quelante. Jones y May (1987), identificaron al menos tres factores cinéticos de relevancia:

1. El comportamiento farmacocinético del agente quelante;
2. El comportamiento cinético del ion metálico tóxico en el organismo, que depende de la velocidad de distribución en los órganos una vez absorbido y de la velocidad de transferencia de los órganos a la circulación sanguínea y;
3. La tasa de interacción entre el agente quelante y el ión metálico tóxico libre o unido a las proteínas transportadoras del plasma, o a las proteínas sobre las cuales ejerce su acción tóxica⁴⁸.

Además, la selectividad es un valor que varía con el tiempo, ya que la concentración del quelante en el organismo posterior a ser administrado y alcanzar una concentración máxima, comenzará a disminuir al igual que su actividad. Lo anterior se podría evitar, administrando un exceso del antídoto.

Sin embargo, esta acción además de favorecer la coordinación completa del tóxico, incluso en presencia de grandes concentraciones de iones metálicos esenciales, conduciría al agotamiento de iones metálicos esenciales⁴⁹.

La disminución en la actividad a través del tiempo se debe a que después de que el agente quelante es absorbido por el organismo y alcanza su concentración máxima en plasma (dependiendo de la vía de administración empleada), comenzará a disminuir debido al metabolismo, la excreción y la transferencia a los tejidos biológicos. Y es por este proceso corporal, que muchos quelantes al metabolizarse en diversas especies pierden la propiedad quelante de la molécula original y reducen o inhiben su acción por completo.

⁴⁸ Jones, M. M.; May, P. M. The Effect of Kinetic Factors on the Thermodynamic Evaluations of Therapeutic Chelating Agents. *Inorganica Chim. Acta* **1987**, *138* (1), 67–73.

⁴⁹ Nurchi, V. M.; Crisponi, G.; Arca, M.; Crespo-Alonso, M.; Lachowicz, J. I.; Mansoori, D.; Toso, L.; Pichiri, G.; Amelia Santos, M.; Marques, S. M.; et al. A New Bis-3-Hydroxy-4-Pyrone as a Potential Therapeutic Iron Chelating Agent. Effect of Connecting and Side Chains on the Complex Structures and Metal Ion Selectivity. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 132–143.

Un segundo proceso que examinar es la tasa de desaparición del ion metálico tóxico del plasma. Si esta tasa es alta, el efecto de cualquier quelante se reduce, lo cual limita su tiempo de acción y únicamente aquel con la misma distribución corporal que el ion metálico, será capaz de presentar su acción a un nivel tisular. Otro punto importante, es la tasa de interacción entre el agente quelante y el ión metálico en los fluidos biológicos, es decir, si esta tasa es lo suficientemente rápida con respecto a la desaparición del quelante del plasma, éste actuará con éxito. De lo contrario, su actividad se verá comprometida por los factores cinéticos.

El índice de labilidad para cada ion metálico se puede determinar a partir de la tasa de intercambio que exhibirá un ion metálico coordinado originalmente al agua y que, posteriormente, formará un nuevo compuesto de coordinación con el quelante empleado como antídoto. Las características estructurales del sitio de unión en las proteínas, así como la denticidad del agente quelante, influyen también en gran medida con la velocidad de interacción del agente quelante y el ión metálico.

Lipinski et al. (1997), establecieron una serie de requisitos que una molécula debe cumplir para poseer buena solubilidad en agua y buena permeabilidad en las membranas biológicas, para poderse administrar por vía oral⁵⁰:

1. Número de donadores de puente de hidrógeno (enlaces N-H y O-H) < 5;
2. Numero de aceptores de puentes de hidrógeno (átomos de N y O) < 10;
3. Masa molecular < 500 g/mol y;
4. Coeficiente de partición octanol- agua (Log P) < 5

Como se describe en los antecedentes, la necesidad de contar con moléculas nuevas a las que actualmente son empleadas como tratamiento contra la intoxicación por plomo, que minimicen los efectos secundarios y además permitan una fácil administración, se ha convertido en el enfoque principal de muchos grupos de investigación. Por ello, el presente proyecto tiene como finalidad la síntesis de nuevas estructuras orgánicas a partir de

⁵⁰ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.

precursores que poseen actividad quelante y antioxidante. En adición, que parte de la estructura pueda incrementar su biodisponibilidad.

Capítulo 3 Objetivos e Hipótesis

3.1 Objetivo General

- Sintetizar y evaluar nuevas moléculas derivadas del ácido lipoico y el ácido dimercaptosuccínico (DMSA) como posibles agentes quelantes en un modelo de intoxicación por plomo.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar moléculas derivadas del ácido lipoico y el DMSA
- Evaluar la actividad quelante de las nuevas moléculas en un modelo murino de intoxicación por plomo y;
- Determinar los niveles de plomo en distintos tejidos biológicos de interés.

3.3 Hipótesis

- Hipótesis nula (H_0): No hay remoción significativa del metal comparada con el control positivo (grupo expuesto a plomo sin tratamiento).
- Hipótesis alterna (H_A): La remoción de plomo es significativa en por lo menos uno de los grupos de tratamiento con respecto al control positivo.

Capítulo 4 Metodología

4.1.1 Síntesis de 1,3-ditiolanos

La síntesis de los 1,3-ditiolanos **3a-d** (Figura 3), se realizó con base a la metodología reportada por Fischer y Speier, con algunas modificaciones⁵¹. Se emplearon diferentes aldehídos (1 equivalente) y DMSA (1.1 equivalentes) en tolueno como disolvente y agitación por 3 minutos a temperatura ambiente. Mientras continuaba la agitación, se adicionó lentamente el H_2SO_4 (0.20 equivalentes ó 20% mol). Concluida la adición del catalizador ácido, se reflujo con trampa de Dean-Stark. El tiempo de reacción fue monitoreado por c.c.f. analizando el consumo del reactivo limitante (aldehído).

⁵¹ Fischer, E.; Speier, A. B. *Dass. Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, 3252–3258.

La purificación de los compuestos se realizó con base en el trabajo publicado por Xu et al. (2011), con algunas modificaciones⁵². Finalizada la reacción, se adicionó solución básica saturada de carboanto de potasio. A continuación, se realizaron 2 extracciones con éter de petróleo y se acidificó la fase acuosa a pH 2 empleando solución saturada de KHSO₄. Finalmente, se realizaron 3 extracciones con AcOEt y un proceso de recristalización generó los productos deseados (Figura 3).

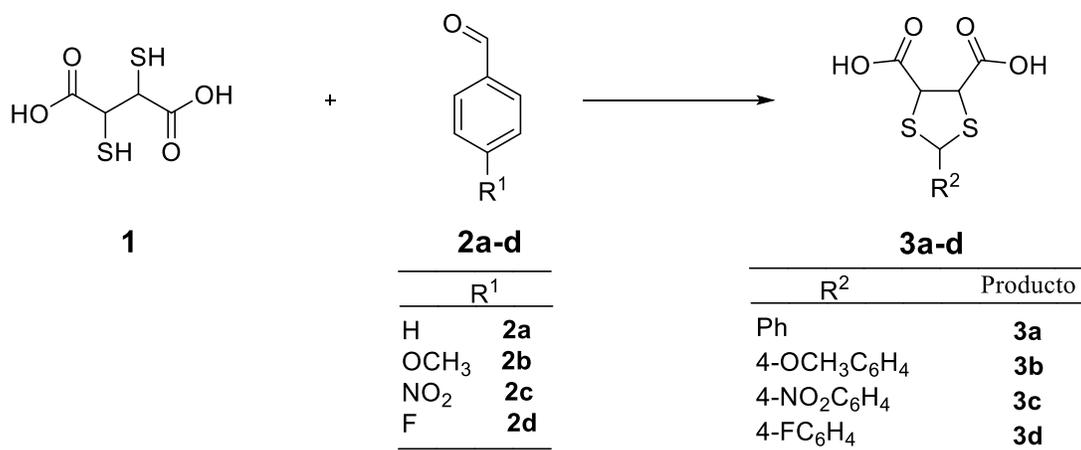


Figura 3. 1,3-ditiolanos sintetizados en el presente trabajo.

4.1.2 Síntesis de ésteres

El monoéster y el diéster **7a** y **7b** (Figura 4), se sintetizaron con base en la metodología reportada por Neises y Steglich, con algunas modificaciones⁵³. Se empleó el respectivo ácido carboxílico (1 equivalente), el agente acoplante (1.1 equivalentes) y la 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0.15 equivalentes ó 15% mol). Se adicionó diclorometano anhidro (CH₂Cl₂ anh.) a una concentración de 0.3 M. Después, se sonicó la reacción el tiempo suficiente para homogenizar los materiales y se adicionó el respectivo alcohol (1.1 equivalentes). Se agitó a temperatura ambiente y purgó con N₂ (g), se incrementó la temperatura hasta reflujo. La reacción fue monitoreada por c.c.f. en un sistema 3:7 hexano: acetato de etilo con ácido acético al 0.1% para evitar corrimiento de la señal del ácido

⁵² Xu, Y.; Wang, Y.; Zhao, M.; Hou, B.; Peng, L.; Zheng, M.; Wu, J.; Peng, S. Lead Detoxification Activities and ADMET Hepatotoxicities of a Class of Novel 5-(1-Carbonyl-l-Amino-Acid)-2,2-Dimethyl-[1,3]Dithiolane-4-Carboxylic Acids. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (6), 1754–1757.

⁵³ Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1978**, *17* (7), 522–524.

carboxílico. Una vez terminada la reacción, se adicionó HCl 2 N, se realizaron extracciones y recristalización para purificar los compuestos.

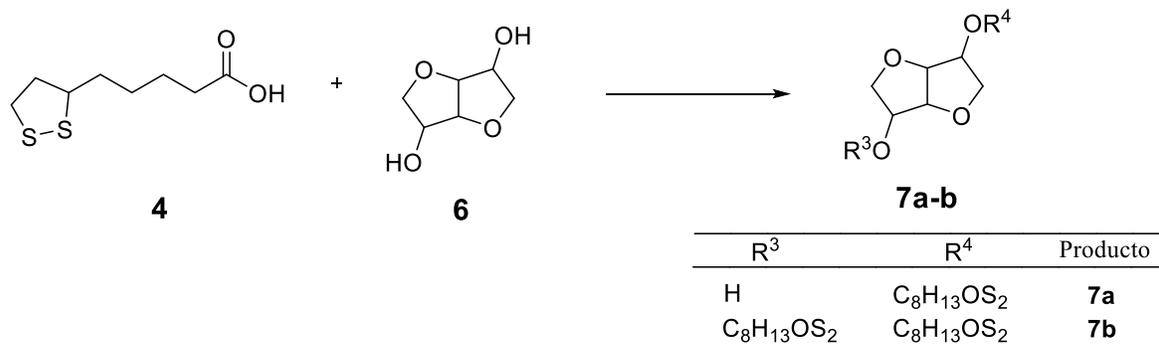


Figura 4. Ésteres sintetizados en el presente trabajo.

4.1.3 Metodología general para la reducción del enlace disulfuro

La reducción del enlace disulfuro **8a-b** (Figura 5), se realizó con base en la publicación de Chen et al. (2018), con algunas modificaciones para el caso de los ésteres⁵⁴. Se empleó 1 equivalente de **8a-b** y THF hasta obtener una concentración de 0.3 M. Una vez disuelto, se colocó el matraz en un baño de hielo con agitación constante, y posteriormente se adicionó poco a poco el borohidruro de sodio (NaBH₄, 3 equivalentes por enlace disulfuro presente en la estructura de la molécula). La reacción se dejó en agitación durante 30 minutos y se reflujó hasta observar por c.c.f. la desaparición de la materia prima.

⁵⁴ Chen, D.; Zhang, G.; Li, R.; Guan, M.; Wang, X.; Zou, T.; Zhang, Y.; Wang, C.; Shu, C.; Hong, H.; et al. Biodegradable, Hydrogen Peroxide, and Glutathione Dual Responsive Nanoparticles for Potential Programmable Paclitaxel Release. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (24), 7373–7376.

Al finalizar la reacción, se adicionó HCl 2 N hasta obtener un pH 1.0 en el medio y se procedió a realizar 3 extracciones con AcOEt. Finalmente, se filtró la fase orgánica a través de una cama de Na₂SO₄, se concentró el compuesto y se analizó el crudo de reacción por resonancia.

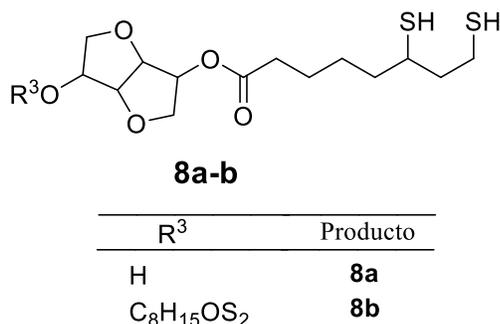


Figura 5. Ésteres reducidos sintetizados en el presente trabajo.

4.2 Metodología general para la evaluación biológica

4.2.1 Modelo animal de intoxicación por plomo

La evaluación biológica se realizó con base en trabajo publicado por Alcaraz-Contreras et al. (2016), con algunas modificaciones⁵⁵. Las ratas Wistar empleadas en la evaluación biológica poseían un peso de 200 ± 20 g y fueron obtenidas del bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. Previo a la administración oral de las moléculas, se realizó la exposición *in vivo* del metal tóxico a los distintos grupos de ratas empleando la vía de administración *ad libitum*, es decir, a libre voluntad. El principio de esta metodología consiste en separar a los animales en grupos

⁵⁵ Alcaraz-Contreras, Y.; Mendoza-Lozano, R. P.; Martínez-Alcaraz, E. R.; Martínez-Alfaro, M.; Gallegos-Corona, M. A.; Ramírez-Morales, M. A.; Vázquez-Guevara, M. A. Silymarin and Dimercaptosuccinic Acid Ameliorate Lead-Induced Nephrotoxicity and Genotoxicity in Rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **2016**, *35* (4), 398–403.

pequeños (n=5), colocándolos en cajas separadas, donde tengan acceso libre a comida y agua. Esta última es empleada como fuente de exposición, al sustituirse por una solución de 3000 ppm de Pb^{2+} , que en un periodo de 6 semanas incrementará gradualmente la concentración del tóxico en sangre y en el organismo en general. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con los lineamientos éticos institucionales y con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio con base en la NOM-062-ZOO-1999⁵⁶.

4.2.2 Esquema de tratamiento y administración de moléculas

El esquema de tratamiento seleccionado en el presente trabajo fue propuesto con base en el esquema de DMSA empleado en intoxicación por plomo en humanos, que consiste en la administración oral del agente quelante a una dosis de 30 mg/kg durante una semana (7 días), seguido de una semana de reposo para movilizar el plomo de los órganos diana al torrente sanguíneo y concluye nuevamente con la administración del quelante a una dosis de 15 mg/kg por otra semana más.

Una vez establecido el esquema de tratamiento y cumplido el periodo de intoxicación de los animales, se procedió a la administración oral de las moléculas a evaluar como agentes quelantes. Sin embargo, previo a la administración y mediante el uso del programa Chemicalize[®] y SwissADME[®] se analizaron las propiedades de las moléculas para determinar de manera teórica el comportamiento de su solubilidad a distintos valores de pH, al preferir la administración oral de las moléculas.

4.2.3 Grupos de estudio

El estudio se dividió en cuatro grupos (n=5), por lote de moléculas a evaluar. El primer grupo o Control (-), conformado por ratas sin exposición alguna al metal. El segundo grupo o Control (+), conformado por las ratas que únicamente fueron expuestas al

⁵⁶ Norma Oficial Mexicana, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Nom-062-Zoo 1999, 1–58.

agente tóxico, pero que no recibieron tratamiento subsecuente. El tercer grupo conformado por las ratas que fueron expuestas y recibieron como tratamiento al quelante DMSA. Finalmente, el cuarto grupo estuvo conformado y subdividido por las ratas que fueron expuestas y recibieron como tratamiento los compuestos sintetizados.

4.2.4 Obtención y preservación de muestras biológicas

Posterior a las 24 h de haber administrado la última dosis del tratamiento comenzó el proceso para la obtención de las muestras biológicas de interés. Cada rata por separado se anestesió vía intraperitoneal con una dosis única de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Una vez dormido el animal, se verificó el estado de anestesia mediante un pequeño tirón (sin ejercer fuerza) en sus patas delanteras y traseras. De la misma forma, lo anterior se ratificó humedeciendo el tórax con etanol que, en caso de necesitar más tiempo para un efecto completo, la rata retraería las patas o temblaría por el efecto refrescante del alcohol.

Bajo anestesia, se realizó la punción intracardiaca y recolección de una porción de muestra de sangre en tubos al vacío libres de plomo con heparina sódica como anticoagulante (tubo verde), que fueron agitados suavemente por inversión para evitar la coagulación.

Posteriormente, se extrajeron los órganos de interés (hígado, riñones, cerebro, fémur y testículos), y se colocaron en un frasco estéril. Las muestras de sangre fueron preservadas en el refrigerador a 4°C, mientras que los órganos en el congelador a una temperatura de -20°C.

4.3 Metodología general para la cuantificación de plomo y análisis estadístico

La metodología para la cuantificación del catión metálico mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), se realizó con base en el trabajo publicado por Martínez-Alfaro et al. (2012), con algunas modificaciones⁵⁷. Cada muestra

⁵⁷ Martínez-Alfaro, M.; Hernández-Cortés, D.; Wrobel, K.; Cruz-Jiménez, G.; Rivera-Leyva, J. C.; Piña-Zentella, R. M.; Cárabez Trejo, A. Effect of Melatonin Administration on DNA Damage and Repair Responses in Lymphocytes of Rats Subchronically Exposed to Lead. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, *742* (1–2), 37–42.

biológica se acondicionó por separado y dependiendo del tipo de tejido biológico a procesar se determinó la cantidad de materia a digerir en el ácido. Para el caso de la sangre, se recolectaron 2 muestras adicionales (previas al sacrificio), para determinar la concentración de Pb a las 24 h de finalizar la exposición (Pb basal) y a las 24 h de concluir la primera semana de tratamiento (Pb intermedio). Estos muestreos se realizaron por goteo mediante una punción retroorbital.

Todos los tejidos biológicos sin importar su composición o concentración de plomo fueron acondicionados mediante una digestión húmeda con HNO₃ ultrapuro. En una primera etapa, la muestra se descongeló a temperatura ambiente por lo menos durante 10 minutos para una mejor manipulación. A continuación, se pesó por separado cada muestra en un tubo de vidrio libre de plomo con taparroscas, se adicionó el ácido y se sometió a un proceso de sonicación para facilitar la destrucción de la materia orgánica. Todos los tubos fueron colocados en una placa metálica multipozos, donde las muestras se calentaron durante 2 h a 110 °C. Después del primer calentamiento, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les adicionó H₂O₂ ultrapuro y se calentaron nuevamente por 1 h a 110°C. Concluida la digestión, se vertió la mezcla en tubo cónico libre de plomo con tapa hermética y se aforó a base de peso con agua tipo I con resistividad de 18.2 MΩ cm⁻¹.

Finalmente, todas las muestras digeridas fueron centrifugadas a 13 000 rpm por 10 minutos antes de cuantificarse en el equipo. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar ($\bar{x} \pm SD$) y la comparación de medias se realizó mediante el análisis de varianza de un factor (one-way ANOVA), complementado con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ son considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el Software Minitab 19 y los gráficos en Microsoft Excel.

Capítulo 5 Resultados y discusión

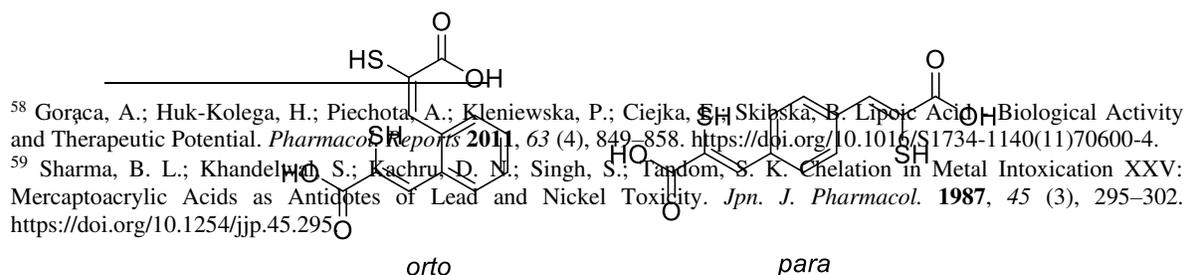
La estructura química de las moléculas sintetizadas y evaluadas como agentes quelantes, fue propuesta con base en las propiedades farmacológicas de los componentes individuales y en la teoría ABDB de Pearson. El DMSA fue seleccionado como el esqueleto base de algunas moléculas por ser el agente quelante con mayor eficacia y menor riesgo que se ha empleado como tratamiento en la remoción de Pb. En adición, se ha reportado que las moléculas derivadas de éste han presentado una mejor actividad⁴⁷, por lo que indagar el comportamiento de diferentes grupos funcionales (sustituyentes), que se pudiesen enlazar a su estructura mediante la síntesis orgánica, nos permitiría contar con nuevas alternativas para futuros tratamientos. La remoción de plomo del organismo se logra por la formación de dos enlaces de coordinación entre los pares de electrones sin compartir de un átomo de azufre y uno de oxígeno del DMSA y el catión metálico, cuya selectividad se fundamenta en la teoría de Pearson.

El ácido lipoico fue seleccionado como el componente antioxidante, debido a que el organismo lo biosintetiza para la eliminación de radicales libres, que son un tipo de mecanismo toxicológico mediante el cual los metales pesados desencadenan daños en el organismo. Asimismo, se ha reportado que el ácido lipoico posee actividad quelante⁵⁸. No obstante, hasta la fecha no hay reportes de esta actividad en estado reducido, de su evaluación *in vivo* en un modelo murino de intoxicación sin ser coadministrado con otros quelantes o de su administración por vía oral. La Figura 6, representa el **Figura 6**. Estructuras químicas del ácido lipoicoequilibrio químico entre la forma oxidada y la forma reducida del antioxidante.



Figura 6. Estructuras químicas del ácido lipoico.

Los diversos aldehídos que fueron empleados para la síntesis de los 1,3-ditiofanos se seleccionaron teniendo en consideración una fracción aromática en su estructura química, debido a que existe poca información de derivados del DMSA con este tipo de sustituyentes que hayan sido evaluados como agentes quelantes y que, además le otorguen una mayor estabilidad al DMSA. En el estudio reportado por Sharma et al. (1987), se concluyó que el compuesto mercaptoacrílico (Figura 7), con el patrón de sustitución *orto* en comparación con *para*, incrementaba la excreción urinaria del plomo y reducía las alteraciones bioquímicas generadas por el tóxico⁵⁹. No obstante, es importante considerar que las moléculas del presente trabajo poseen una estructura distinta a los compuestos mercaptoacrílicos, por lo cual, resultó interesante evaluar y conocer el comportamiento que tendrían estas moléculas con grupos electrodonadores o electroattractores en posición *para* del anillo aromático en un escenario *in vivo*.



⁵⁸ Gorąca, A.; Huk-Kolega, H.; Piechota, A.; Kleniewska, P.; Ciejka, S.; Skipska, B. Lipoic Acid Biological Activity and Therapeutic Potential. *Pharmacokinetics* **2011**, *63* (4), 849–858. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4).

⁵⁹ Sharma, B. L.; Khandelwal, S.; Kachru, D. N.; Singh, S.; Tandon, S. K. Chelation in Metal Intoxication XXV: Mercaptoacrylic Acids as Antidotes of Lead and Nickel Toxicity. *Jpn. J. Pharmacol.* **1987**, *45* (3), 295–302. <https://doi.org/10.1254/jjp.45.295>

Figura 7. Estructura de los ácidos mercaptoacrílicos.

Por otro lado, el isosorbide, fue seleccionado como componente soluble con base en las propiedades que posee como derivado de azúcar, al ser obtenido de la deshidratación catalizada por ácido del sorbitol, que a su vez es sintetizado por la hidrogenación de la glucosa. La propiedad más relevante y el motivo por el que es empleado en medicina como un diurético osmótico, es su gran capacidad higroscópica. Por ende, se espera que las moléculas derivadas de este compuesto posean buena solubilidad para ser administradas por vía oral y a la par, incrementen el gasto urinario eliminando el Pb con mayor facilidad.

El aminoácido L-cisteína y el clorhidrato de cisteamina, fueron seleccionados para la evaluación biológica como agentes quelantes (sin modificación y purificación previa), debido a que en su estructura química poseen un grupo tiol y un grupo amino con pares de electrones sin compartir capaces de interaccionar con los iones metálicos del Pb con base en la teoría de Pearson. De manera particular, el aminoácido L-cisteína es empleado por el organismo en la biosíntesis del tripéptido glutatión, el cual desempeña diversas funciones en el organismo, como por ejemplo la unión, el transporte y el almacenamiento de metales pesados. Asimismo, la cisteamina promueve el transporte de L-cisteína al interior de las células, donde será empleado en la síntesis de glutatión, un antioxidante endógeno con los que cuenta el organismo para defenderse de los efectos nocivos de los radicales libres.

5.1 Análisis computacional de la regla de cinco de Lipinski

Toda nueva molécula que desea administrarse por vía oral debe cumplir con la regla de cinco de Lipinski cuyos parámetros se describen a continuación y que son empleados para indicar el comportamiento de los compuestos descritos en este proyecto:

1. Número de donadores de puente de hidrógeno (enlaces N-H y O-H) < 5;
2. Numero de aceptores de puentes de hidrógeno (átomos de N y O) < 10;
3. Masa molecular < 500 g/mol y;
4. Coeficiente de partición octanol- agua (Log P) < 5

Analizando la estructura de referencia, el DMSA (Tabla 6), además de poseer los mejores beneficios y los menores riesgos, cumple con cada uno de estos parámetros y es por tal motivo, que es comercializado como tratamiento para la intoxicación por diversos metales pesados. El DMSA a diferencia de otros quelantes, es administrado por la vía oral, lo cual facilita el apego de los pacientes al tratamiento farmacológico contra la intoxicación por plomo principalmente. Sin embargo, al igual que el resto de los quelantes, tiene una serie de desventajas que limitan su uso (ver: Tabla 3. Principales desventajas de los agentes quelantes empleados como tratamiento), por lo que contar con nuevas moléculas derivadas de su estructura química, resultaría una buena estrategia para asegurar la actividad quelante y aumentar sus ventajas.

La Tabla 6, recopila los resultados obtenidos del análisis computacional realizado con el programa Chemicalize[®] para las distintas moléculas orgánicas propuestas en el presente trabajo con lo cual se determinó el cumplimiento de los parámetros de Lipinski para proceder a la síntesis orgánica en una siguiente etapa. Realizando un análisis más detallado, se establece que el DMSA cumple con todos los parámetros de la regla de cinco de Lipinski, teniendo una masa molecular de 182.21 g/mol y un Log P de 0.259, corroborando así, que es buena opción como esqueleto base de las nuevas moléculas a sintetizar.

Tabla 6. Evaluación computacional de la regla de cinco de Lipinski

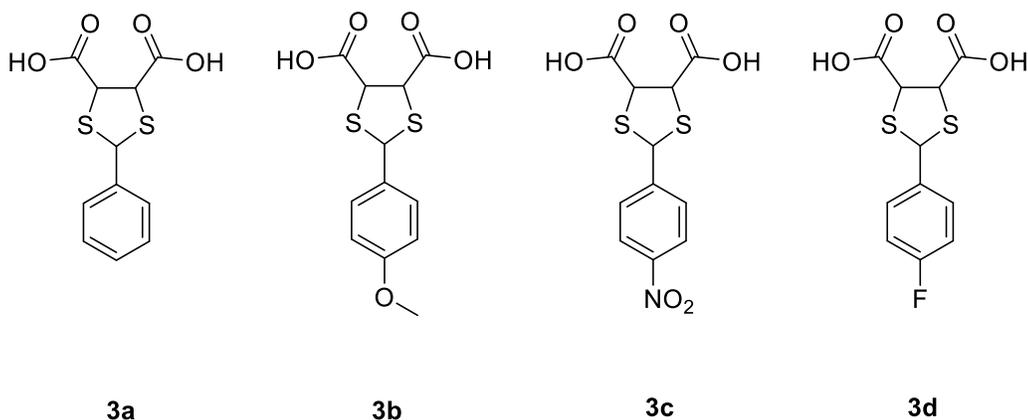
Parámetro	Estructuras												
	DMSA	3a	3b	3c	3d	4	5	7a	7b	8a	8b	9	10

1^a	4	2	2	2	2	1	3	1	0	3	4	2	3
2^b	4	4	5	6	4	2	2	4	4	4	4	1	3
3^c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	✓
4^d	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[a]= Número de donadores de puente de hidrógeno, [b] = número de aceptores de hidrógeno, [c] = masa molecular y [d] = coeficiente de partición octanol-agua

De la misma forma, los 1,3-ditiolanos (Figura 8), que forman parte de las moléculas de sintetizadas en la segunda etapa de este proyecto, cumplieron con todos los parámetros de Lipinski y se obtuvieron de la protección de los grupos carbonilo de los aldehídos aromáticos por parte de los grupos tiol del DMSA. Los valores calculados fueron:

- Compuesto **3a** (derivado del benzaldehído y el DMSA), con una masa molecular de 270.32 g/mol y un Log P de 2.316;
- Compuesto **3b** (derivado del 4-metoxibenzaldehído y el DMSA), con una masa molecular de 300.34 g/mol y Log P de 2.158;
- Compuesto **3c** (derivado del 4-nitrobenzaldehído y el DMSA), con una masa molecular de 315.31 g/mol y un Log P de 2.256 y;



- Compuesto **3d** (derivado del 4-fluorobenzaldehído y el DMSA), con una masa molecular de 288.31 g/mol y Log P de 2.459.

Figura 8. Estructura química de los 1,3-ditiolanos.

En el caso de los ésteres (Figura 9), derivados del componente antioxidante (ácido lipoico) y el componente soluble (isosorbide), únicamente dos moléculas incumplieron con el parámetro 3 de una masa molecular menor de 500 g/mol. Sin embargo, analizando sus

masas, se determinó que la diferencia no incumplía por mucho el parámetro, por lo que se siguieron considerando como propuestas de quelantes. Los valores calculados fueron:

- Compuesto **7a** (monoéster 1:1 ácido lipoico/isosorbide), con una masa molecular de 334.45 g/mol y un Log P de 1.372;
- Compuesto **7b** (diéster 2:1 ácido lipoico/isosorbide), con una masa molecular de 522.75 g/mol y Log P de 4.150;
- Compuesto **8a** (monoéster con enlace S-S reducido), con una masa molecular de 336.46 g/mol y un Log P de 1.461 y;
- Compuesto **8b** (diéster con dos enlaces S-S reducidos), con una masa molecular de 526.78 g/mol y Log P de 4.328.

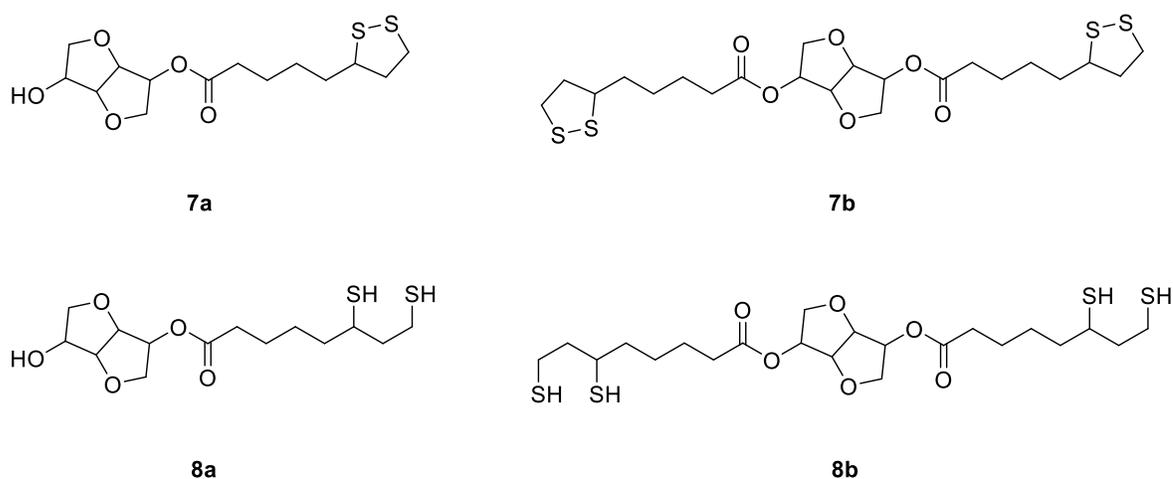


Figura 9. Estructura química de los ésteres.

Finalmente, las moléculas **9** y **10** (Figura 10), clorhidrato de cisteamina y la L-cisteína respectivamente, no fueron sintetizadas en una segunda etapa, pero si evaluadas en la tercera etapa del proyecto. Los valores fueron:

- Compuesto **9**, con una masa molecular de 113.60 g/mol y Log P de -0.417 y;
- Compuesto **10**, con una masa molecular de 121.15 g/mol y Log P de -2.782.

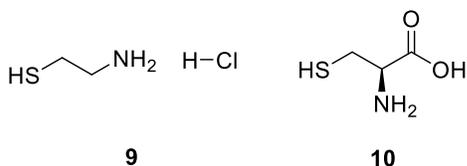


Figura 10. Estructura química de la cisteamina (**9**) y cisteína (**10**).

En la Figura 11, se establecen los átomos donadores de puente de hidrógeno (círculo azul) y los grupos aceptores (círculo amarillo), si ambas propiedades coinciden en un átomo, se encontrarán encerrados en círculo verde.

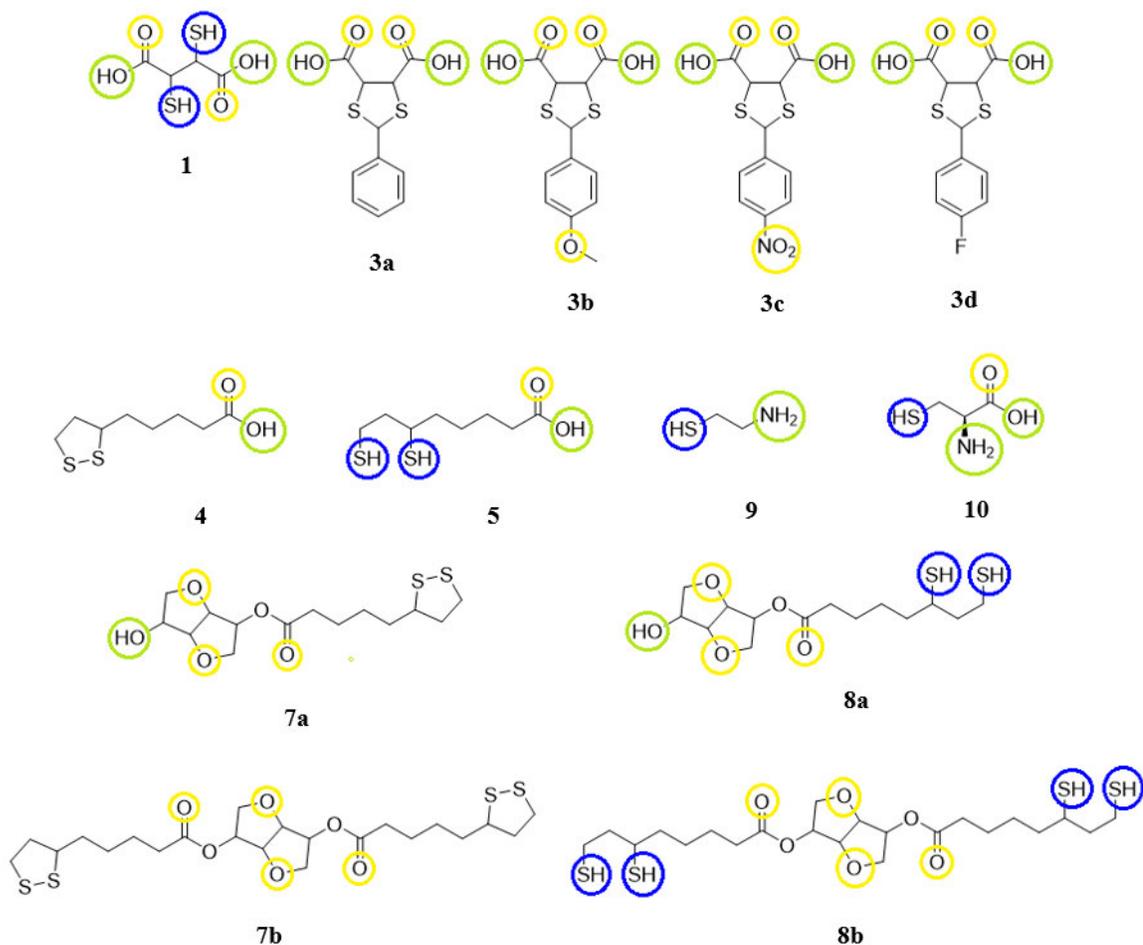


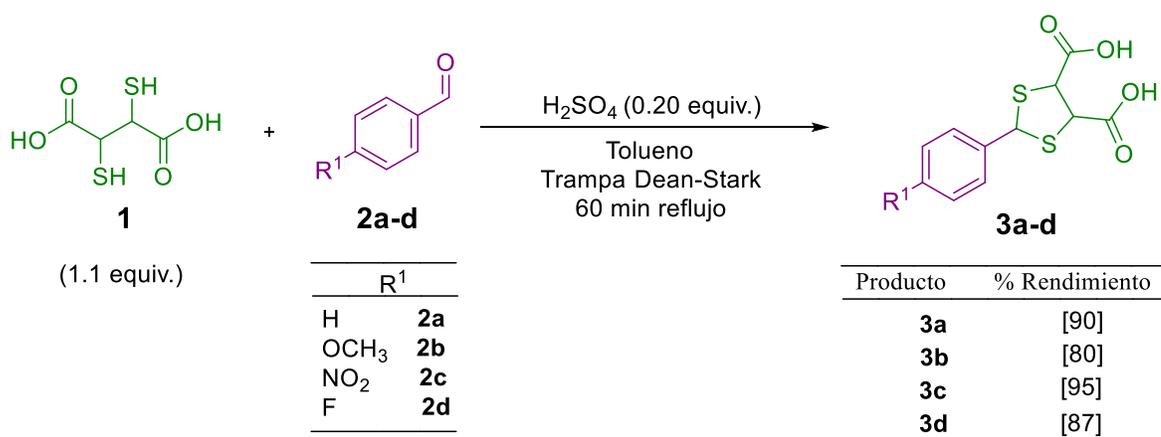
Figura 11. Átomos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno.

5.2 Síntesis y caracterización de las moléculas de interés

Analizadas las propiedades de las moléculas de interés computacionalmente y habiendo determinado el cumplimiento de los criterios de Lipinski o en su defecto con la mayoría de ellos, se procedió a realizar la síntesis orgánica con base en las metodologías del diseño experimental.

5.2.1 Síntesis de 1,3-ditiofanos

El Esquema 1, representa la ecuación general de la síntesis de los 1,3-ditiolanos en conjunto con las condiciones experimentales empleadas para la obtención de los productos deseados. En caso de estos productos, no fue requerida la modificación de las condiciones experimentales, variando únicamente el tipo de electrófilo empleado (Tabla 7 **Tabla 7**. Síntesis de los 1,3-ditiolanos). De manera general, se aprecia que el aldehído fue considerado como reactivo limitante debido a la facilidad de monitoreo por c.c.f. y el DMSA el reactivo en exceso. Además, en este tipo de reacciones donde se hace uso de una trampa Dean-Stark, es importante mencionar que tanto el matraz como el brazo de la trampa, deben estar recubiertos con aluminio a fin de que todo el sistema mantenga una temperatura superior al punto de ebullición del agua, permitiendo la formación del



azeótropo y evitando la reversibilidad de la reacción.

Esquema 1. Ecuación general de la síntesis de los 1,3-ditiolanos.

Concluida la reacción, la purificación representó un mayor reto al tener que realizar múltiples pasos. En primer lugar, la solución básica empleada para neutralizar el ácido fue de carbonato de potasio hasta obtener el pH deseado, ocurriendo una reacción ácido-base entre los cationes del catalizador ácido, los cationes de los grupos carboxílicos de la molécula. En este paso, se procedió a lavar con éter de petróleo y realizar el proceso de extracción. Posteriormente, se bajó el pH a 2.0 con una solución saturada de KHSO₄, y se realizó su extracción. Finalmente, la fase orgánica se pasó por Na₂SO₄ para secarla y concentrar el producto. Todos los productos obtenidos fueron sólidos.

En la Tabla 7, se presentan los rendimientos para cada producto sintetizado. Analizando los rendimientos de esta reacción de protección para el grupo aldehído, se aprecia que el mejor rendimiento se obtuvo al emplear el 4-nitrobenzaldehído (**2c**), debido al efecto electroattractor, aumentando así el carácter electrofílico del aldehído y su susceptibilidad frente a los grupos tiol (-SH) del DMSA. De forma contraria, el menor rendimiento se observa con el 4-metoxibenzaldehído (**2b**), debido al efecto electrodonador y con ello, una menor reactividad en el aldehído, pero no la suficiente para que la reacción no procediera. Por último, hubo un comportamiento muy similar entre el benzaldehído (**2a**) y el 4-fluorobenzaldehído (**2c**).

Los compuestos obtenidos fueron caracterizados mediante diferentes técnicas espectroscópicas. Para ejemplificar su caracterización, se establecieron señales de relevancia que se monitorearían para su elucidación. Para la serie de compuestos **3a-d**, el análisis del crudo de reacción por RMN ^1H indica la desaparición de la señal proveniente del protón del aldehído a 10 ppm (Figura 12, flecha roja) y la aparición de los metinos entre 5.0 a 5.8 ppm del producto deseado. También, se observó por RMN ^{13}C (Figura 13), la desaparición de la señal proveniente del carbono carbonílico del aldehído (190 ppm) y se determinó que efectivamente, mediante las condiciones mencionadas se consumía el reactivo limitante y se obtenía el producto deseado. Finalmente, se ratificó la obtención de los diversos derivados mediante el análisis de masas de alta resolución (ver Anexos), donde se aprecia la concordancia entre el ion molecular obtenido y las masas reportadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Síntesis de los 1,3-ditiolanos

Experimento	Nucleófilo	Electrófilo	Producto [%]	Masa exacta (g/mol)
1		Benzaldehído (2a)	3a [90]	270.0021
2	DMSA (1)	4-metoxibenzaldehído (2b)	3b [80]	300.0126
3		4-nitrobenzaldehído (2c)	3c [95]	314.9871
4		4-fluorobenzaldehído (2d)	3d [87]	287.9926

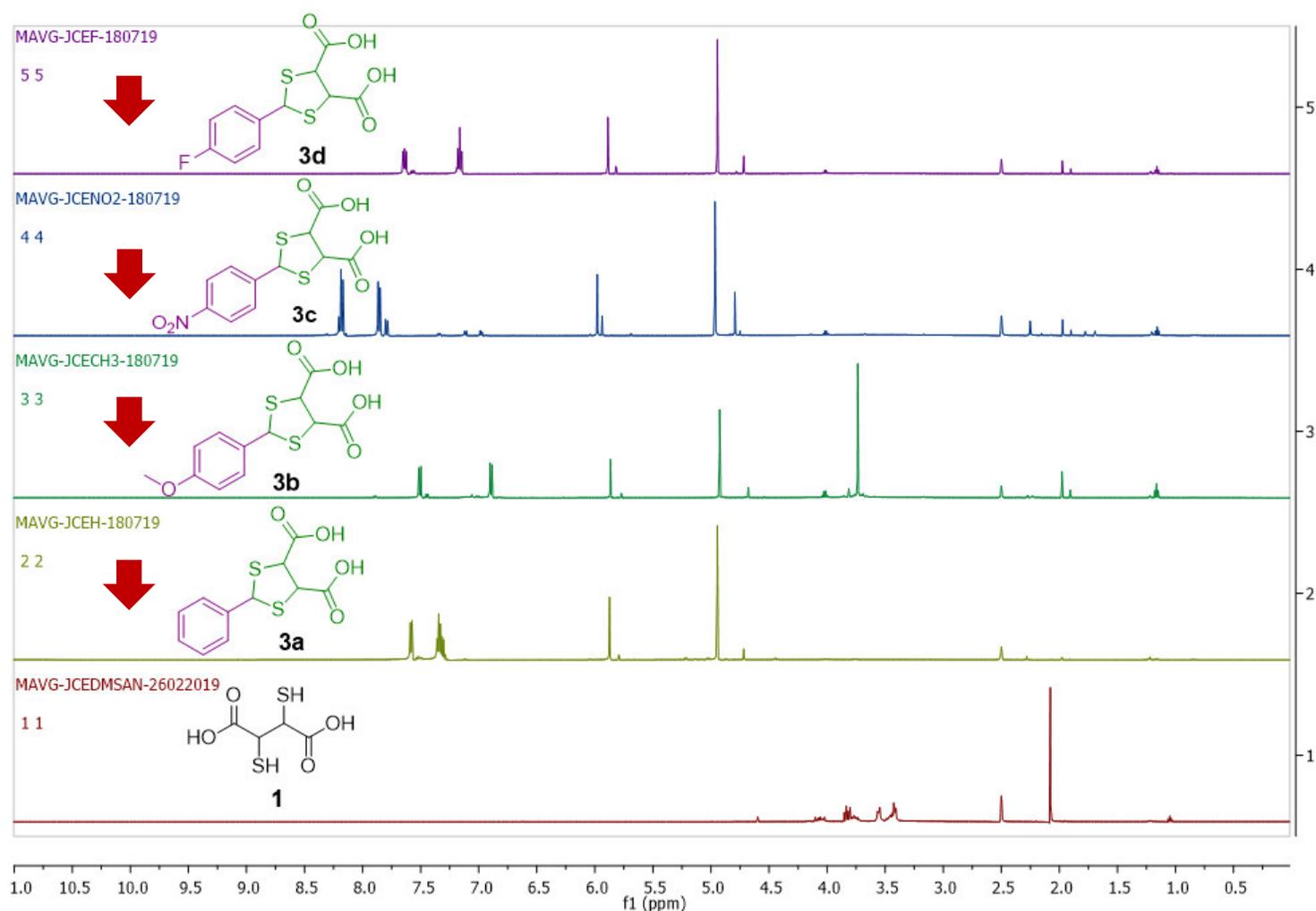


Figura 12. Comparación de espectros de RMN de ¹H 500 MHz en DMSO-d₆ de los compuestos 1,3-ditiolanos **3a-d** y DMSA (**1**).

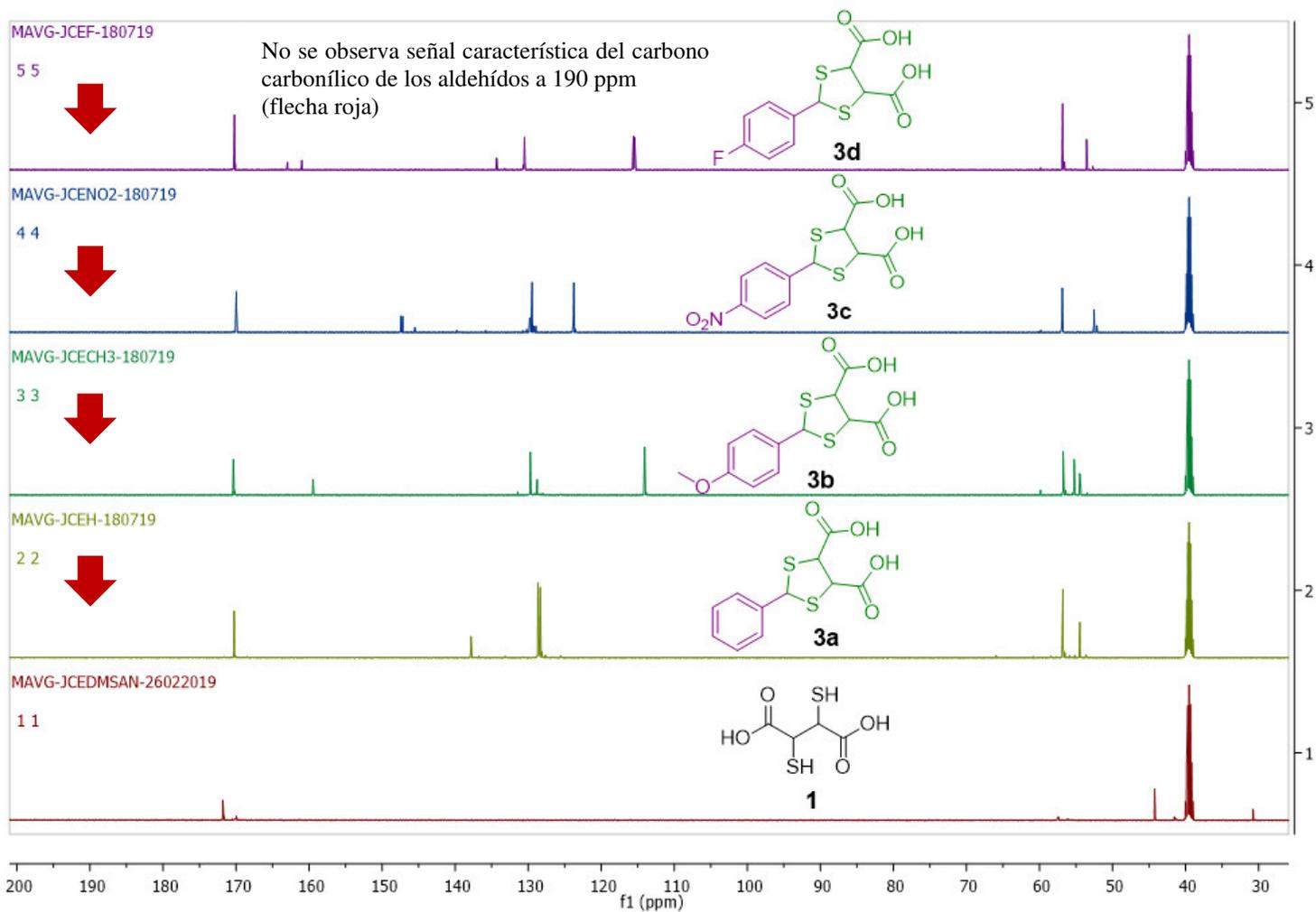
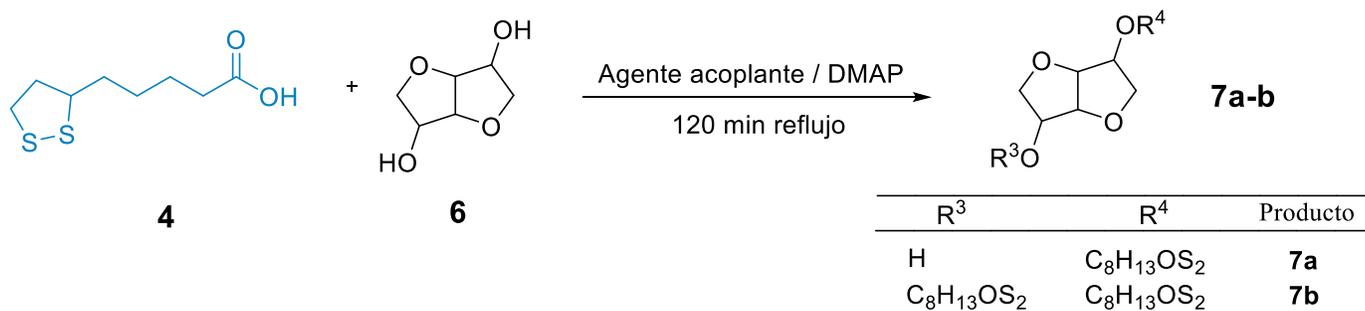


Figura 13. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C 125 MHz en DMSO-d_6 de los compuestos 1,3-ditiolanos (**3a-d**) y DMSA (**1**).

5.2.2 Síntesis de ésteres

El Esquema 2, representa la ecuación general de la síntesis del monoéster y diéster entre el ácido lipoico y el isosorbide y la Tabla 8, las condiciones experimentales.



Esquema 2. Ecuación general de la síntesis de ésteres.

Tabla 8. Condiciones experimentales para la síntesis de ésteres

Experimento ^[a,b]	Disolvente	Agente acoplante ^[c]	Disolvente para extracciones	Producto [%]	Masa exacta (g/mol)
1 ^a	DCM	CDI	DCM	7a [-]	522.1238
2 ^a		CDI	AcOEt	7a [50]	
3 ^a		DCC	DCM	7a [-]	
4 ^a		DCC	AcOEt	7a [90]	
5 ^b		CDI	DCM	7b [-]	334.0909
6 ^b		CDI	AcOEt	7b [50]	
7 ^b		DCC	DCM	7b [-]	
8 ^b		DCC	AcOEt	7b [95]	

[a] Condiciones monoéster: **4** (1 equiv.), **6** (1.1 equiv.), DMAP (0.15 equiv.)

[b] Condiciones diéster: **4** (2 equiv.), **6** (1.2 equiv.), DMAP (0.30 equiv.)

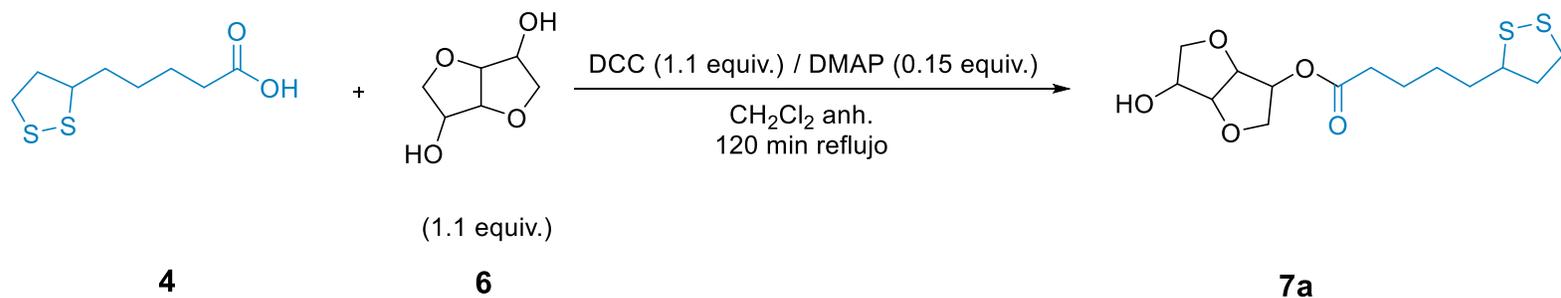
[c] CDI: carbonildiimidazol, DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

La esterificación de Steglich posee una gran aplicabilidad en la síntesis de ésteres estéricamente demandantes o sustratos lábiles a las condiciones ácidas típicas de la esterificación de Fischer recurriendo a condiciones más “suaves” mediante el uso de agentes acoplantes (Tabla 8). Por tal motivo, se decidió hacer uso de esta metodología, cuyo principio radica en la activación del ácido carboxílico, la formación de un anhídrido mixto y finalmente la obtención del éster al reaccionar el alcohol.

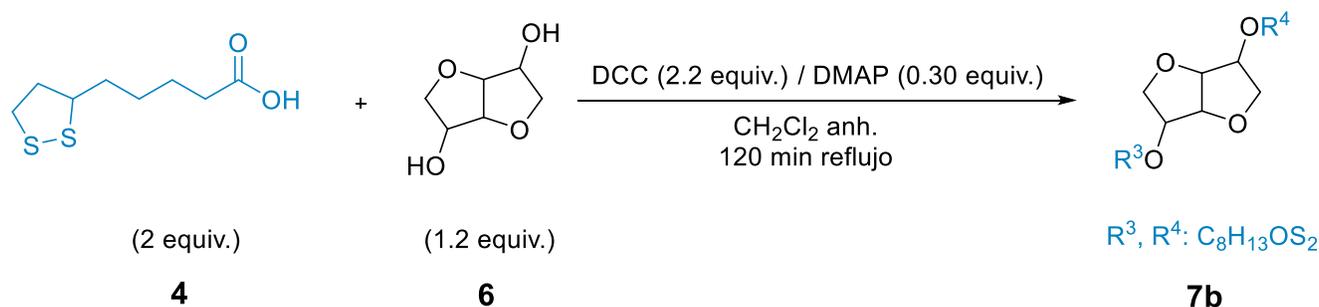
De la Tabla 8, se aprecia que el disolvente empleado en el apartado de las extracciones tuvo un papel crucial en la recuperación de los productos. Este hecho se evidenció cuando se utilizó el DCM como disolvente en las extracciones y en ambos casos el producto deseado pasaba de un líquido viscoso a un tipo de polímero insoluble.

A pesar de que el acetato impedía la formación del sólido insoluble, no había un buen porcentaje de recuperación cuando se usaba el CDI como agente acoplante. Analizando los espectros de RMN ^{13}C , se determinó que el bajo rendimiento era debido a que el ácido lipoico no reaccionaba por completo con el alcohol, es decir, la esterificación no era completa al apreciarse una señal en 180 ppm (característica del carbono del ácido carboxílico) y otra a 170 ppm (característica del carbono del éster), por lo que se sustituyó por DCC. Al emplear este agente acoplante, hubo una conversión completa al mono y diéster en los espectros de RMN ^{13}C (Figura 15 y Figura 17), al observarse únicamente una señal en 180 ppm en comparación con la materia prima. Sin embargo; el desafío se presentó en la remoción del subproducto generado del uso de este agente acoplante la dicitclohexilurea (DCU). La eliminación de la DCU se llevó a cabo con el uso tolueno que redisolvió el producto deseado y al mismo tiempo precipitaba el contaminante.

El Esquema 3 y Esquema 4, representan las condiciones experimentales empleadas en la síntesis del monoéster y diéster respectivamente. Cabe mencionar que, a pesar de que se empleaba el DCM como disolvente de la reacción, el producto no solidificaba al rotaevaporarlo concluida la reacción, caso contrario a cuando era empleado en las extracciones de la etapa de purificación. Por ende, se empleó como disolvente polar aprótico para la reacción de acoplamiento en la etapa de síntesis.



Esquema 3. Ecuación general de la síntesis del monoéster.



Esquema 4. Ecuación general de la síntesis del diéster.

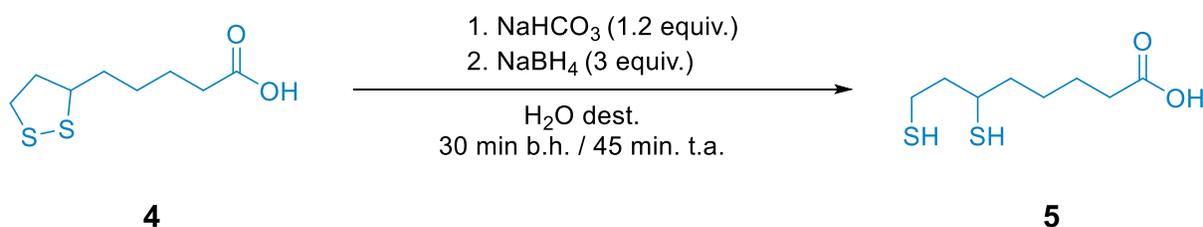
5.2.3 Reducción del enlace disulfuro

La reducción del enlace disulfuro se realizó con base en la metodología del diseño experimental, donde una vez establecidas las condiciones experimentales para la materia prima, se procedió a realizar la reducción de los productos sintetizados, es decir, el mono y diéster.

El Esquema 5, representa la ecuación general de la reducción del enlace disulfuro presente en el ácido lipoico en conjunto con las condiciones experimentales empleadas. Para llevar a cabo esta reducción de manera exitosa, fue necesario realizar la reacción en dos pasos. En un primer paso, se adicionó en un matraz el ácido, NaHCO_3 y agua como disolvente, dejando agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A pesar de que el ácido lipoico, no es soluble en su totalidad en agua, este comenzó a solubilizarse al reaccionar con el bicarbonato mediante una reacción ácido-base. Concluida la solubilidad, se colocó el matraz en un baño de hielo con sal y comenzaron a adicionarse poco a poco los 3 equivalentes del agente reductor (NaBH_4). Este tipo de reducción puede realizarse en medio acuoso, a pesar de tratarse de un hidruro, debido a que el borohidruro reacciona lentamente con el agua a un pH elevado (alcalino), pero es indispensable que la temperatura sea baja al tratarse de una reacción exotérmica. La reacción se dejó durante 30 minutos en baño de hielo y otros 45 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el segundo tiempo, se ajustó el pH a 1.0 con HCl 2 N. Por último, se extrajo el producto con AcOEt, se secó con Na_2SO_4 y se concentró en el rotaevaporador.

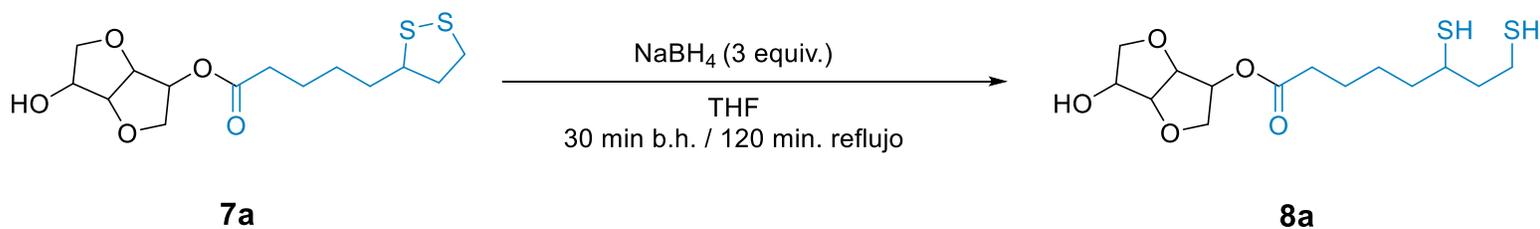
Las señales de principal interés para el lipoico reducido, conocido como ácido dihidrolipoico (DHLA, por sus siglas en inglés), fueron las de los hidrógenos de los grupos tiol (-SH) a 1.3 ppm que se observan en el espectro de RMN ^1H en la Figura 14 y Figura 16 con una flecha roja. Tanto el espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del ácido lipoico y del ácido dihidrolipoico fueron empleados para comparar los ésteres sintetizados. Finalmente, se diferenciaron los diversos ésteres mediante el análisis de masas de alta resolución (ver Anexos), donde nuevamente coincidió el ion molecular obtenido con las masas reportadas en la Tabla 9, ya que como se observa, los espectros de RMN son muy similares dada la estructura de los compuestos.



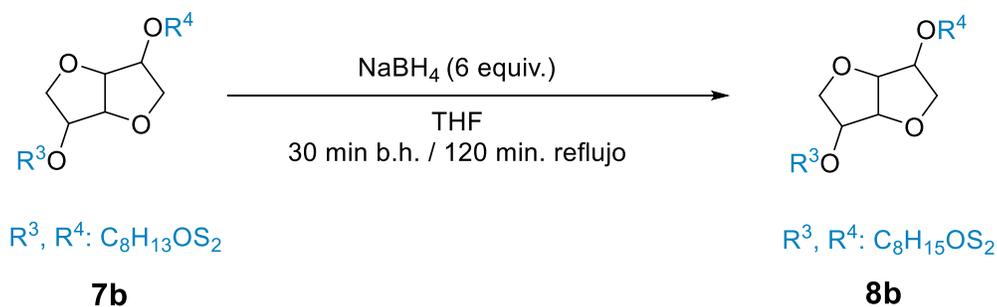
Esquema 5. Ecuación general de la reducción del ácido lipoico.

El Esquema 6 y Esquema 7

Esquema 7. Ecuación general de la reducción del diéster, representan la ecuación general y las condiciones experimentales para la reducción del mono y diéster respectivamente empleando 3 equivalentes para el monoéster y 6 equivalentes para el diéster del agente reductor. Para estas reducciones, no se empleó como disolvente el agua, debido a que los productos no eran solubles y además se podía generar la hidrólisis del éster. Por ende, fue empleado el THF como disolvente polar aprótico. Adicionalmente, se requirió un calentamiento posterior a la agitación en baño de hielo, para reducir por completo ambos ésteres.



Esquema 6. Ecuación general de la reducción del monoéster (**8a**).



Esquema 7. Ecuación general de la reducción del diéster (**8b**).

Tabla 9. Condiciones experimentales para la reducción del enlace disulfuro

Experimento ^[a,b]	Compuesto a reducir	Disolvente	Agente reductor ^[c,d]	Producto [%]	Masa exacta (g/mol)
1 ^[a]	4	H ₂ O	NaBH ₄	5 [96]	208.0592
2 ^[b]	7a	THF		8a [96]	336.1065
3 ^[b]	7b	THF		8b [96]	526.1551

[a] Condiciones ácido lipoico (**4**): NaHCO₃ (1.2 equiv.), baño de hielo y temperatura ambiente

[b] Condiciones compuesto (**7a**) y compuesto (**7b**): baño de hielo (30 min) y reflujo (120 min)

[c] Condiciones ácido lipoico (**4**) y compuesto (**7a**): NaBH₄ (3 equiv.)

[d] Condiciones compuesto (**7b**): NaBH₄ (6 equiv.)

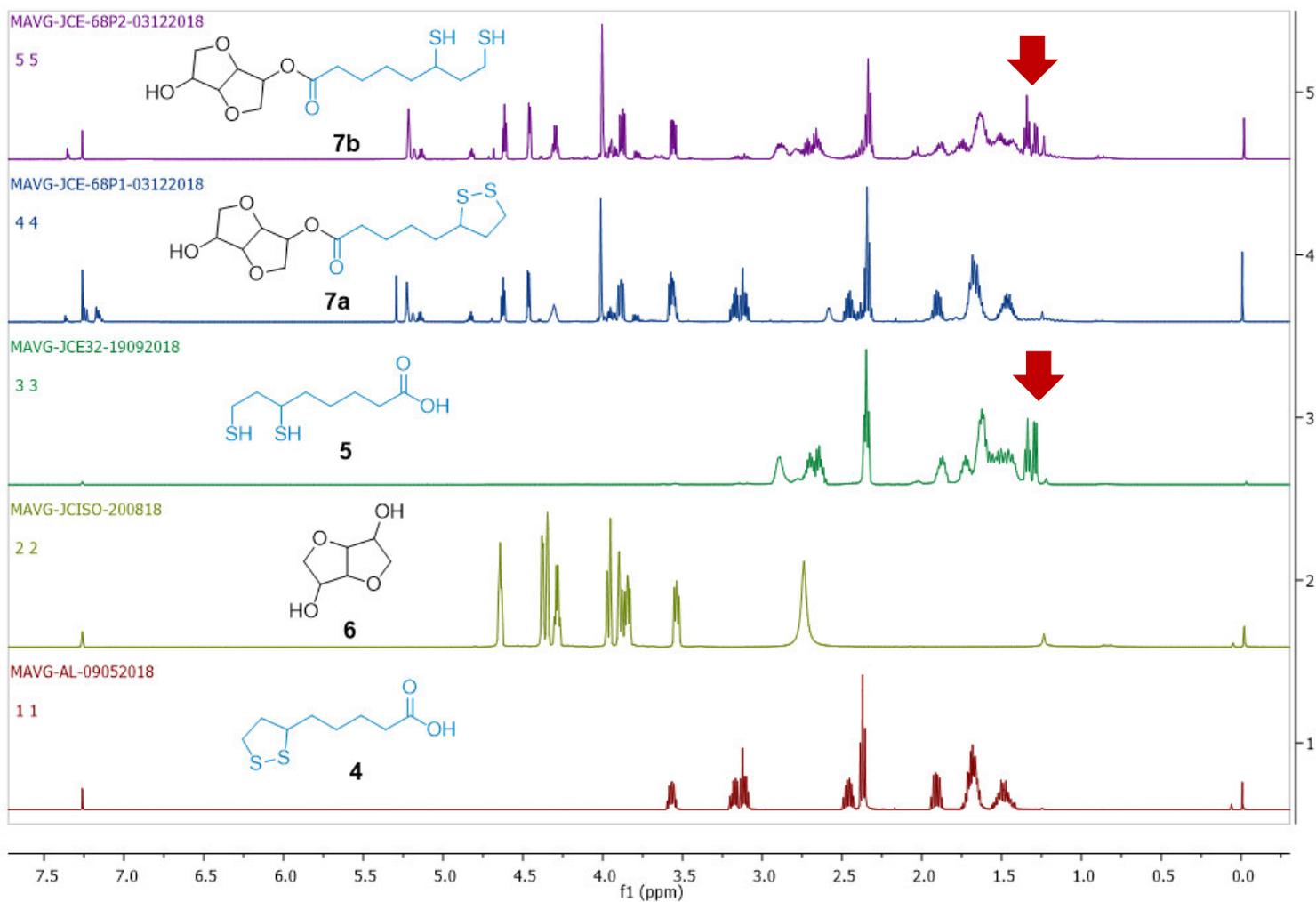


Figura 14. Comparación de espectros de RMN de ^1H 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos **7a-b** (monoéster), ácido lipoico (**4**), ácido dihidrolipoico (**5**) e isosorbide (**6**).

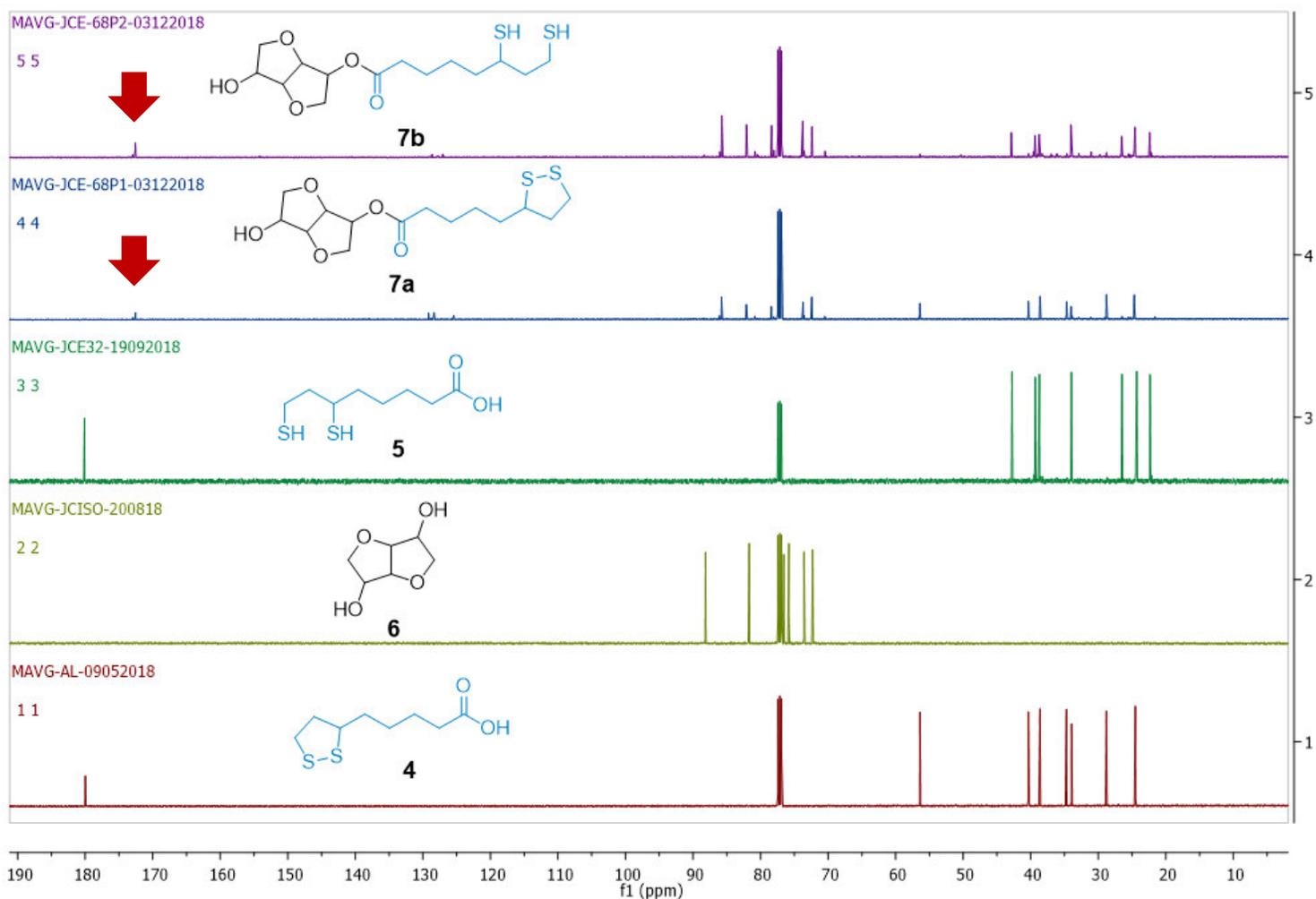


Figura 15. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C 125 MHz en CDCl_3 de los compuestos **7a-b** (monoéster), ácido lipoico (**4**), ácido dihidrolipoico (**5**) e isosorbide (**6**).

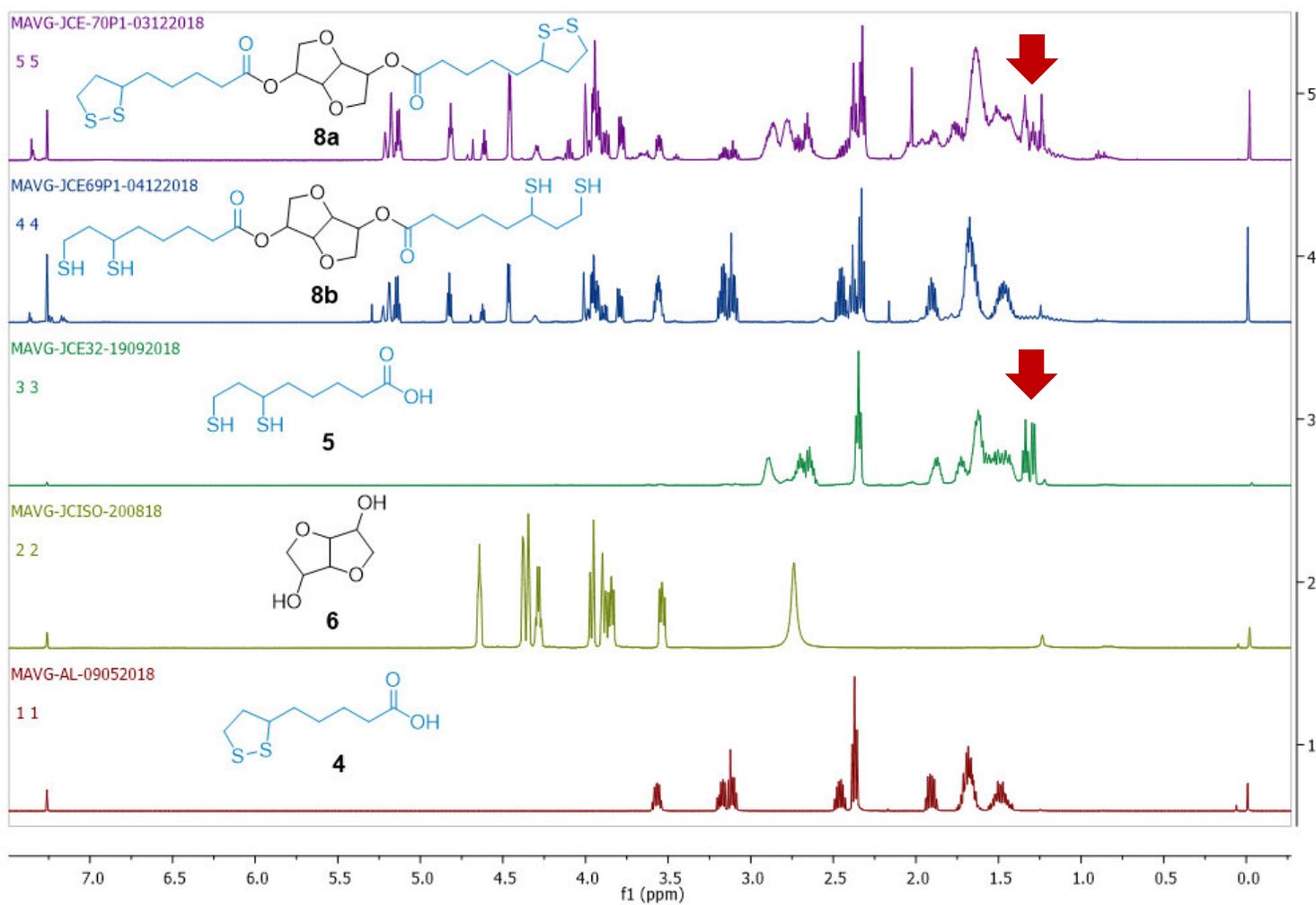


Figura 16. Comparación de espectros de RMN de ^1H 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos **8a-b** (diéster), ácido lipoico (**4**), ácido dihidrolipoico (**5**) e isosorbide (**6**).

5.3 Evaluación biológica de compuestos en modelo de intoxicación por Pb

En esta tercera etapa, se procedió a realizar la evaluación biológica en un modelo *in vivo* de intoxicación por Pb, donde las ratas fueron expuestas a 3000 ppm durante 6 semanas y 3 semanas adicionales a 2000 ppm, este esquema se seleccionó debido al bajo consumo de agua por parte de los animales al ser temporada de invierno.

5.3.1 Modelo de intoxicación por plomo en ratas Wistar

El modelo de intoxicación animal fue seleccionado debido a que el comportamiento de las moléculas *in vivo* varía con respecto a lo observado *in vitro*, dada la complejidad de los sistemas biológicos como se ha reportado en distintas investigaciones. Asimismo, este tipo de evaluaciones además de evaluar la actividad quelante, entre el metal y las moléculas de interés, permite cuantificar la concentración del metal tóxico en los distintos órganos diana, determinando la existencia de una mejor eliminación a nivel sistémico y no simplemente a nivel de torrente sanguíneo⁶⁰.

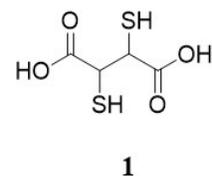
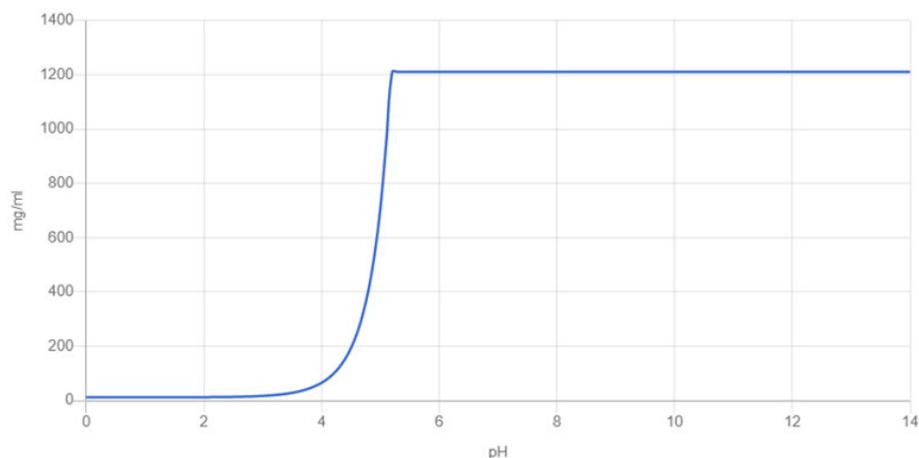
5.3.2 Diagramas de solubilidad y diagramas de distribución de especies

Los diagramas de distribución de especies (DDE), de las moléculas sintetizadas fueron calculados mediante el programa Chemicalize[®], determinando de manera teórica la solubilidad de los compuestos y la especie química predominante a distintos valores de pH. Esta información es de suma importancia al permitir comprender el grado de absorción de las moléculas y con ello, la facilidad de interacción con el agente nocivo.

La Figura 18, **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el diagrama de solubilidad del DMSA (1). En el gráfico se aprecia que la solubilidad

⁶⁰ Catsch, A.; Harmuth-Hoene, A.-E. Pharmacology and Therapeutic Applications of Agents Used in Heavy Metal Poisoning. *Pharmacol. Ther. Part A Chemother. Toxicol. Metab. Inhib.* **1976**, *1* (1), 1–118.

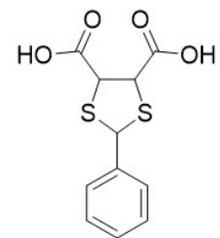
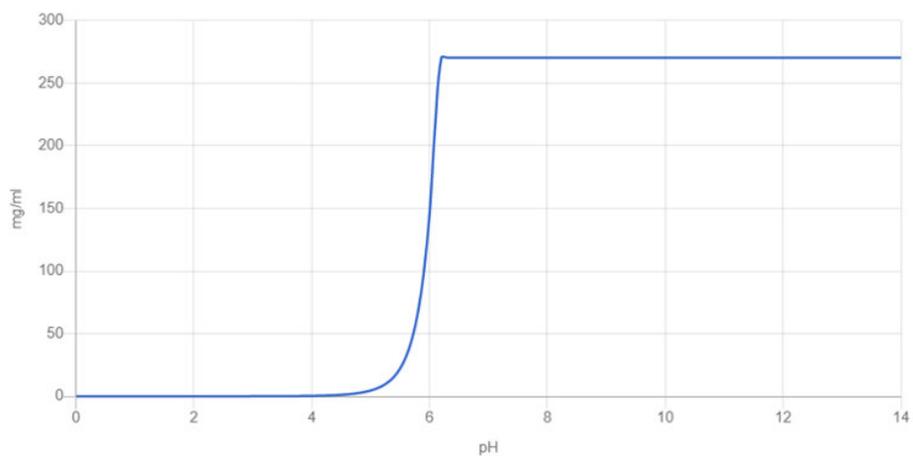
incrementa progresivamente a partir de un pH 5, hasta alcanzar un valor máximo de 1200 mg/mL en medio alcalino. Sin embargo, al intentar disolverlo en la sección experimental,



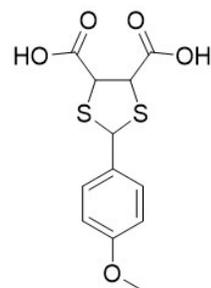
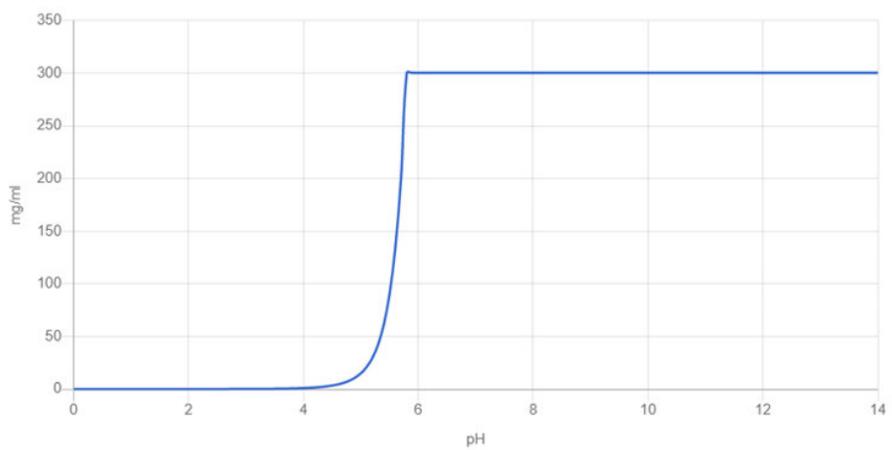
éste no se solubilizó en agua y fue administrado como suspensión.

Figura 18. Gráfico de solubilidad del DMSA, compuesto **1**.

La Figura 19, representa el diagrama de solubilidad del compuesto 1,3-ditiolano derivado del benzaldehído y el DMSA (**3a**), donde se aprecia un incremento progresivo de la solubilidad a partir de un pH 6, hasta alcanzar un valor máximo de ~270 mg/mL en un medio más alcalino. El valor reportado para esta molécula es inferior que para el DMSA. Sin embargo, a diferencia de su molécula progenitora, este compuesto se solubilizó con relativa facilidad en una solución acuosa a un pH neutro. Adicionalmente, los diagramas de solubilidad para los compuestos **3b**, **3c**, **3d** (Figura 20, Figura 21 y Figura 22 respectivamente), presentaron el mismo comportamiento tanto teórica como experimentalmente a su compuesto análogo **3a**.



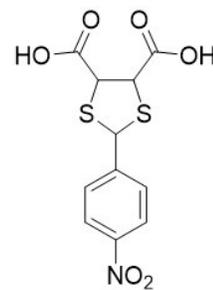
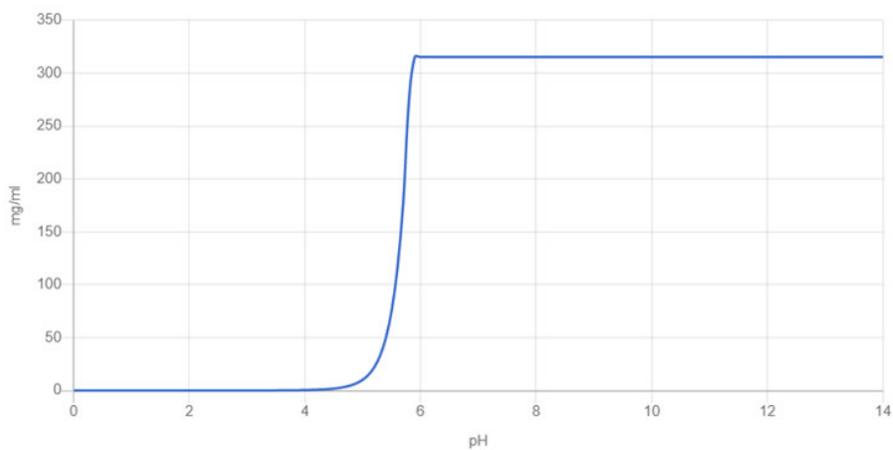
3a



3b

Figura 19. Gráfico de solubilidad del compuesto **3a**.

Figura 20. Gráfico de solubilidad del compuesto **3b**.



3c

Figura 21. Gráfico de solubilidad del compuesto **3c**.

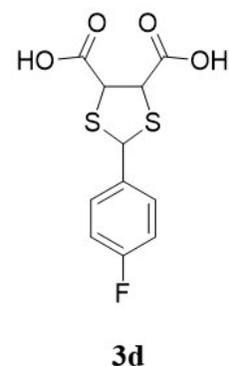
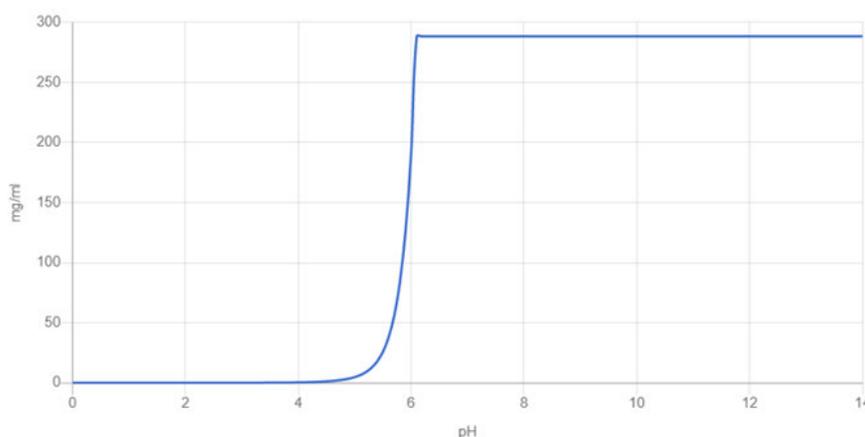


Figura 22. Gráfico de solubilidad del compuesto **3d**.

La Figura 23, representa el diagrama de solubilidad del ácido lipoico (**4**), uno de los antioxidantes más importantes de los que dispone el organismo para contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres. Este compuesto presenta mayor solubilidad a partir de un pH 7 alcanzando un valor máximo de ~205 mg/mL. No obstante, en la sección experimental se comprobó que no poseía buena solubilidad en agua, ya que, al entrar en contacto con ésta, se enturbiaba la solución y comenzaba a precipitarse. Por tal motivo, se adicionó tres veces el volumen del disolvente orgánico (etanol), para impedir este suceso. Por otro lado, su contraparte reducida (Figura 24), posee buena solubilidad teórica y se disolvió por completo en la sección experimental, sin la necesidad de adicionar mayor cantidad de etanol.

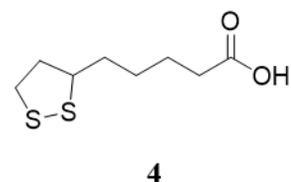
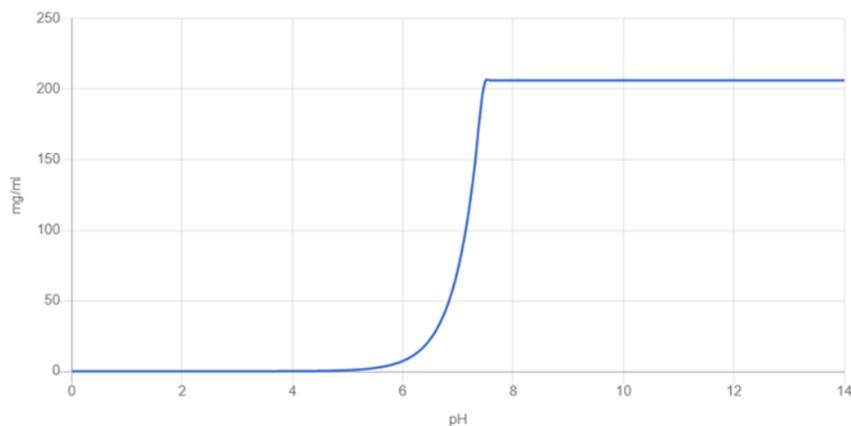


Figura 23. Gráfico de solubilidad del ácido lipoico, compuesto 4.

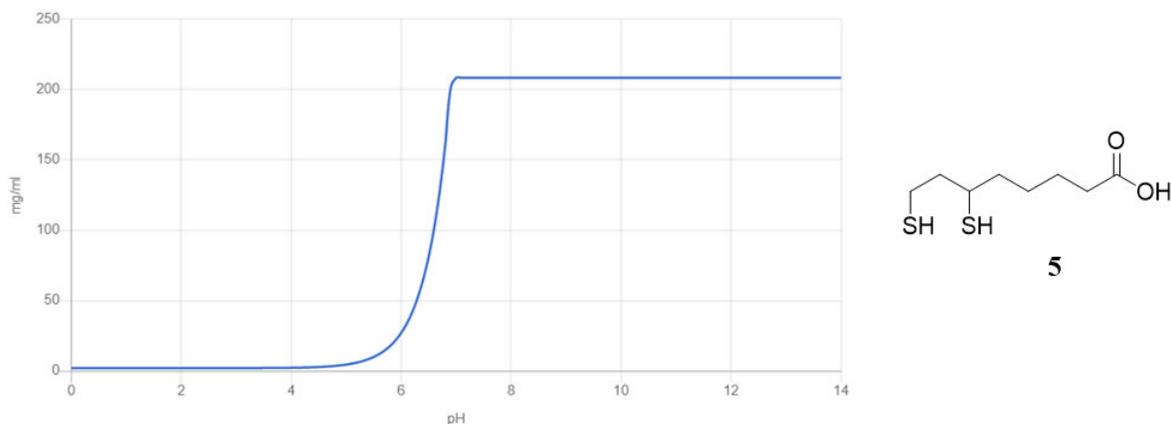


Figura 24. Gráfico de solubilidad del compuesto 5.

La Figura 25, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el diagrama de solubilidad del monoéster derivado del ácido lipoico y el isosorbide (**7a**), donde a pesar de tener un núcleo de azúcar, no mostró buena solubilidad tanto teórica como experimentalmente. En el gráfico se aprecia que la solubilidad aumenta hasta alcanzar un valor máximo de ~0.15 mg/mL a un pH 14, que no puede ser considerado en una administración oral, debido a la alta alcalinidad del medio. La solubilidad teórica mejoró bastante con la apertura del enlace disulfuro (Figura 26). Sin embargo, en la sección experimental el compuesto no se disolvió por completo a un pH neutro, donde nuevamente una administración en medio alcalino no es factible.

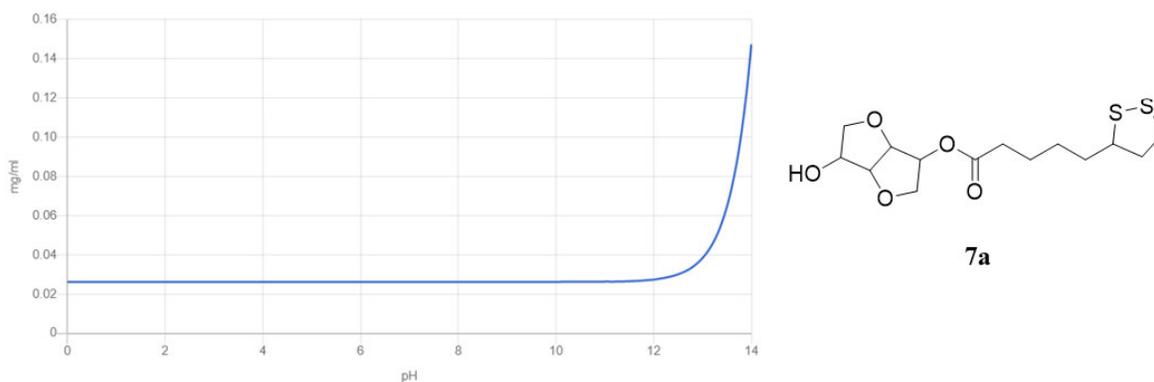


Figura 25. Gráfico de solubilidad del compuesto **7a**.

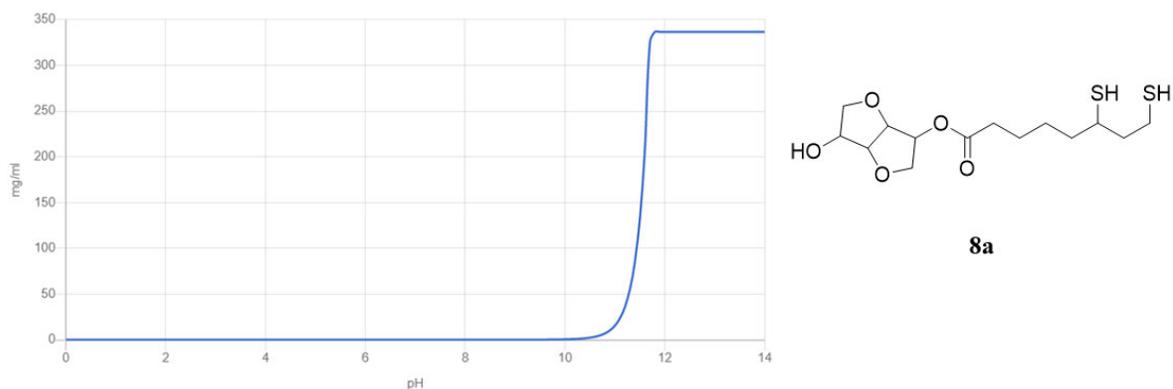
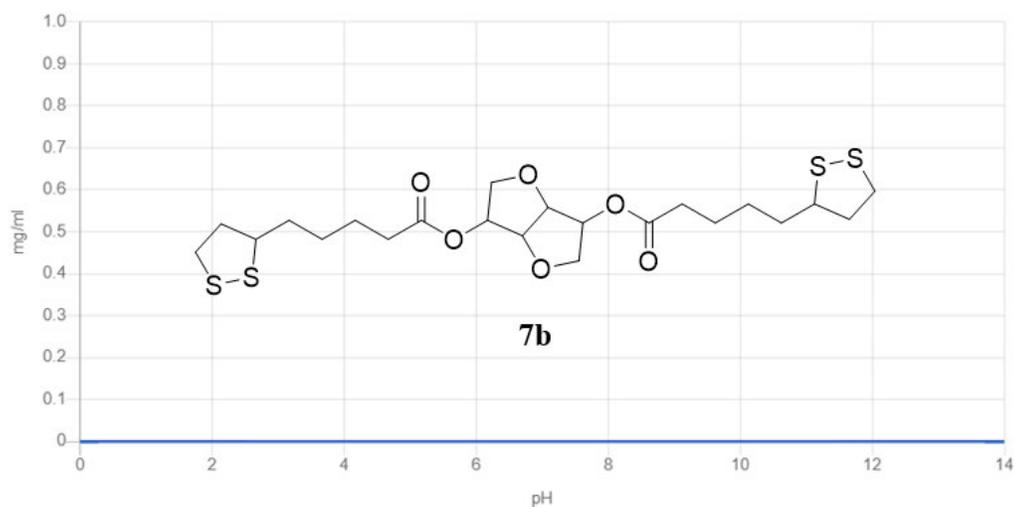


Figura 26. Gráfico de solubilidad del compuesto **8a**.

La Figura 27, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el diagrama de solubilidad del diéster derivado del ácido lipoico y el isosorbide (**7b**), donde se aprecia que no posee buena solubilidad a ningún valor de la escala de pH, donde nuevamente este comportamiento fue observado en la sección experimental. Al igual que para el caso del ácido lipoico, se adicionó una mayor cantidad de disolvente orgánico procurando emplear la menor cantidad posible para evitar una diferencia significativa con respecto al medio empleado. Nuevamente, hay una mejora en la solubilidad teórica al reducir los enlaces disulfuro como se observa en el compuesto **8b** (Figura 28), que además se reflejó en la sección experimental al disolverse en la misma concentración de etanol/

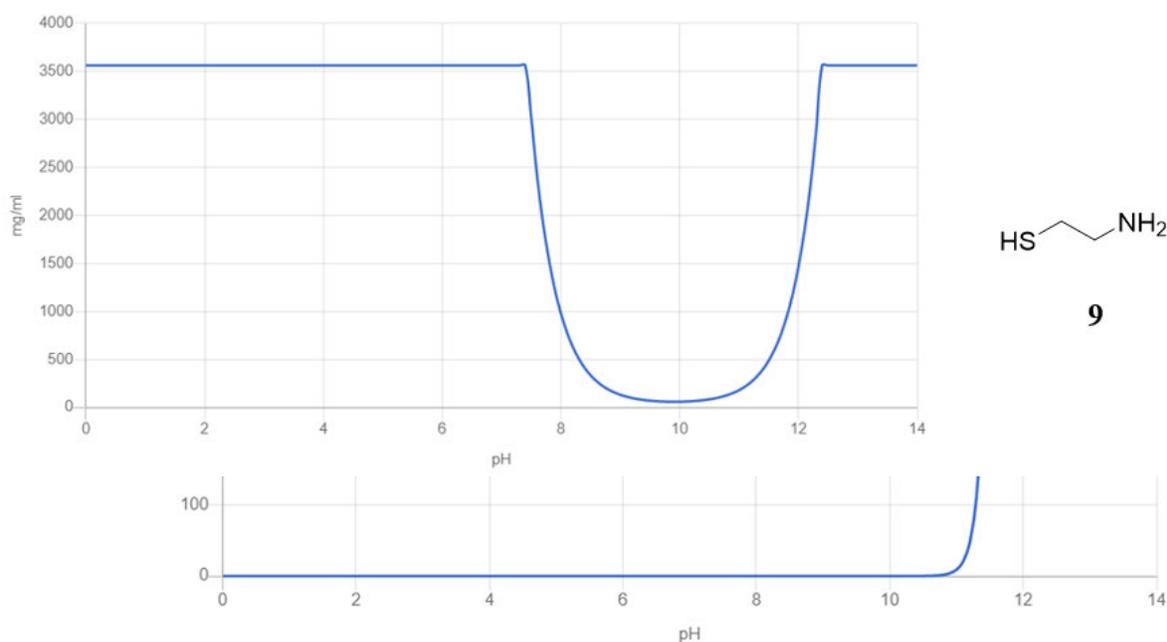


agua que el resto de las moléculas.

Figura 27. Gráfico de solubilidad del compuesto **7b**.

Figura 28. Gráfico de solubilidad del compuesto **8b**.

¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. La Figura 29, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. representa el diagrama de solubilidad del clorhidrato de cisteamina (**9**), con un valor máximo de ~3500 mg/mL a dos intervalos distintos en la escala de pH. El primero, con un pH de 0 a 7.5 y el segundo de 12.5 hasta 14. En la sección experimental, la molécula se disolvió por completo en agua a un pH 7, a pesar de que el



valor se encontraba próximo al límite inferior del rango de pH donde hay un decaimiento de la solubilidad.

Figura 29. Gráfico de solubilidad del clorhidrato de cisteamina (**9**).

La Figura 30, ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. representa el

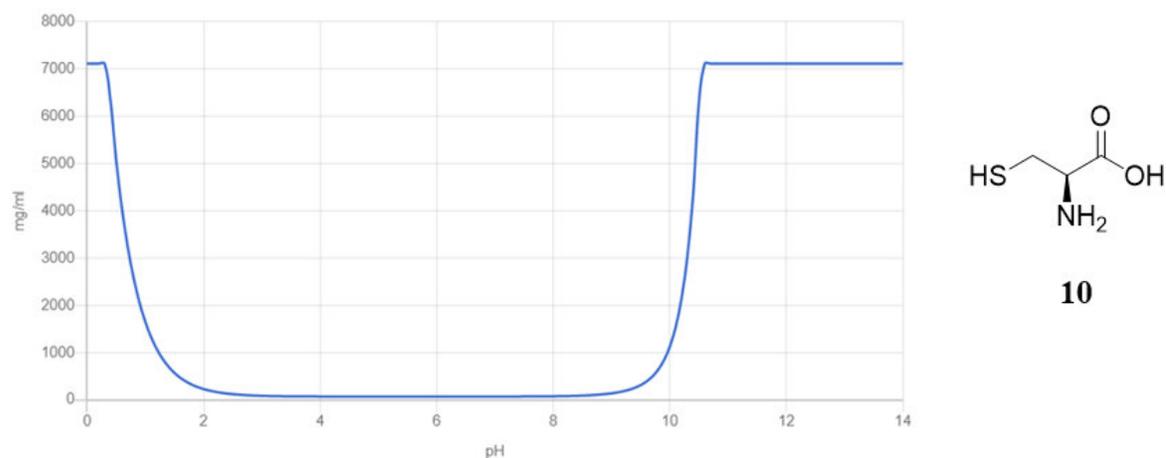


diagrama de solubilidad del aminoácido L-cisteína (**10**), que en la evaluación experimental se disolvió por completo a pesar de que en el gráfico se observara muy baja solubilidad a un pH neutro. Para este aminoácido, se aprecia un incremento a partir de un pH 10, alcanzando un valor máximo de ~7000 mg/mL. Al igual que el compuesto **9**, esta molécula no fue sintetizada en el laboratorio, pero fue sometida a evaluación para futuras investigaciones.

Figura 30. Gráfico de solubilidad de L-cisteína (**10**).

Estos gráficos son de gran utilidad para determinar el comportamiento teórico de la solubilidad de los compuestos de interés previo a su síntesis, que como se mencionó, la predicción coincidió en su mayoría con lo observado en la sección experimental. Además, es importante recordar que, la variación en los valores de solubilidad de las moléculas está influenciada por los distintos grupos funcionales presentes en su estructura química. En general, cuanto mayor sea el contenido de grupos cargados y/o polares en una molécula, menor será su solubilidad en disolventes apolares como el hexano y mayor en disolventes polares apróticos y próticos como el agua, que es considerado el disolvente biológico por excelencia. Por tal motivo, la mayoría de las moléculas orgánicas presentes en el organismo poseen uno o más grupos funcionales como el fosfato, el amino o el ácido carboxílico, que en solución acuosa tamponada a pH 7, les permitirá disolverse en el medio al poseer una carga en su estructura. Por otro lado, los azúcares a menudo carecen de grupos funcionales cargados. Sin embargo, la presencia de múltiples grupos hidroxilo en su estructura les permite generar puentes de hidrógeno con el agua, lo que permite tener una mejor disolución.

Como se mencionó, diversos grupos funcionales permiten una mayor disolución de las moléculas orgánicas dentro del organismo. No obstante, esta carga puede afectar los parámetros farmacocinéticos al disminuir la absorción del compuesto. Por ende, los diagramas de distribución de especies (DDE), en conjunto con el valor de Log P permiten comprender mejor el comportamiento de las moléculas en un organismo, así como la viabilidad de la administración oral.

En la revisión publicada por Sciascia et al. (2016), se presenta información relacionada con los rangos de acidez del sistema digestivo del cerdo, la rata y el humano⁶¹. En el presente trabajo, se consideraron los valores de pH del sistema digestivo de la rata y el humano como se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de pH del sistema digestivo de la rata y el humano

pH	Rata	Humano
Estómago	3.1-5.1	1.5-3.5
Intestino delgado	6.9-7.4	6-6.8

La Figura 31, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** representa el DDE del DMSA (1). Considerando los valores de pH del sistema digestivo de la rata, se aprecia que la especie neutra (color azul) y la especie con carga negativa (color rojo), se encontrarán aproximadamente en una proporción 1:1 en el estómago al momento de la administración y conforme avance el proceso de digestión hacia el intestino delgado, la especie predominante será la doblemente cargada (color amarillo), con lo cual se puede predecir que la absorción de este compuesto será muy baja, al igual que su actividad quelante por la baja biodisponibilidad que tendrá. En el caso de los valores de pH del sistema digestivo del humano, la especie predominante después de la administración será la neutra, hasta alcanzar el intestino delgado y pasar a una especie doblemente cargada al igual que en la rata. No obstante, la biodisponibilidad puede mejorar, ya que el estómago logra absorber cierto porcentaje de las moléculas ingeridas. En adición, se sabe que los compuestos que se absorben con mayor facilidad son los liposolubles ($\text{Log } P < 5$), o en su defecto pequeñas moléculas neutras (<500 g/mol).

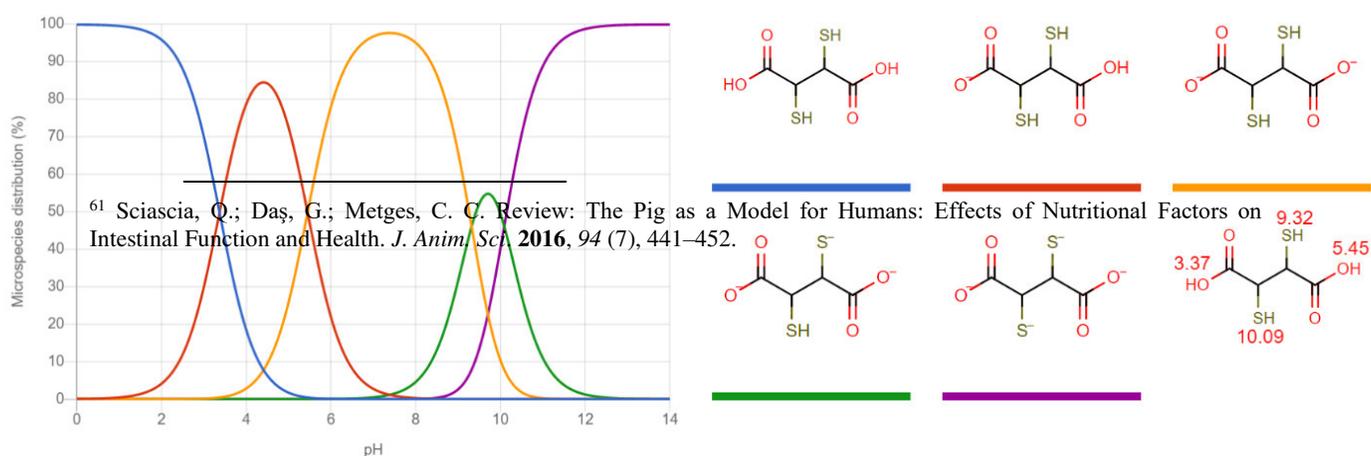


Figura 31. Diagrama de distribución de especies del DMSA, compuesto **1**.

La Figura 32, representa el DDE del 3-ditiolano derivado del benzaldehído y el DMSA (**3a**). Considerando los valores de pH del sistema digestivo de la rata, la especie predominante en el estómago posterior a la administración presentará una carga negativa (color rojo), hasta poseer doble carga negativa (color amarillo) al ingresar en el intestino. A pesar de las cargas, la absorción será buena con base en los resultados obtenidos de correr la molécula en el software SwissADME®. Al igual que el DMSA, se observa la misma tendencia para el humano, es decir, la molécula se encontrará neutra (color azul) y con el cambio de pH del intestino adquirirá doble carga negativa (color amarillo). Sin embargo, el compuesto **3a** en comparación con el DMSA únicamente posee tres especies, lo cual le confiere a la molécula una mayor robustez para su administración.

Para el resto de los compuestos de esta serie **3b**, **3c** y **3d** (Figura 33, Figura 34, y Figura 35 respectivamente), se observa el mismo comportamiento en sus diagramas de distribución de especies. A pesar de las cargas que se generan en su estructura química, únicamente el compuesto **3d** presentó un resultado favorable en su absorción, convirtiéndose en otro compuesto de especial interés.

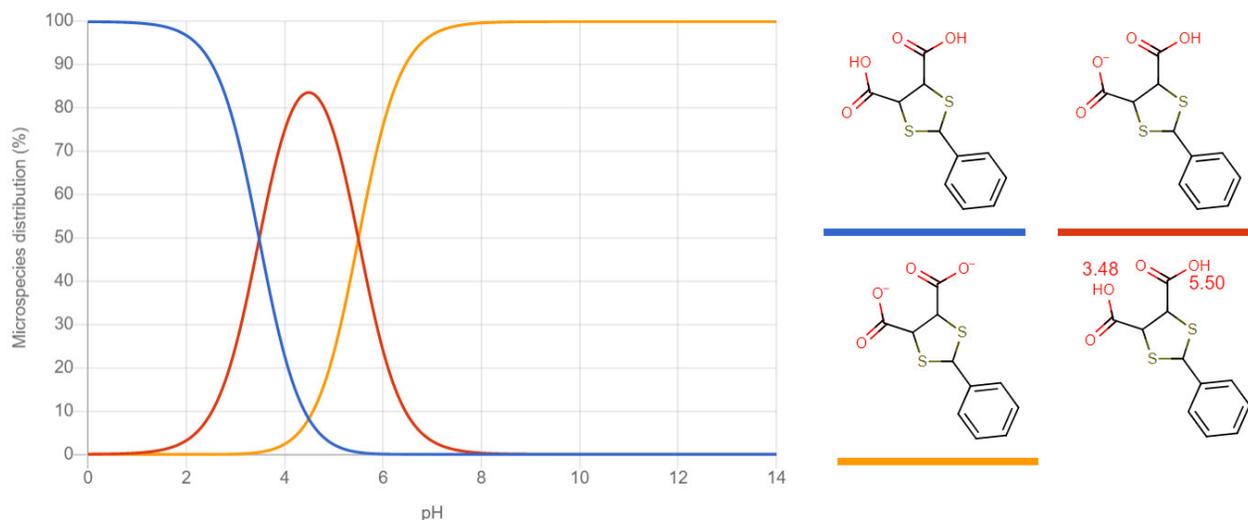


Figura 32. Diagrama de distribución de especies del compuesto **3a**.

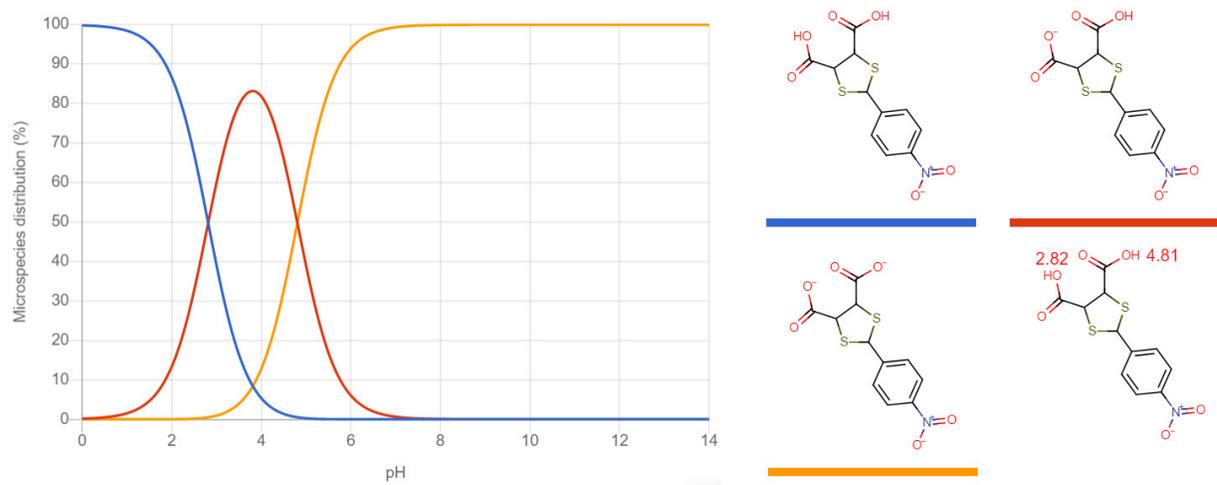
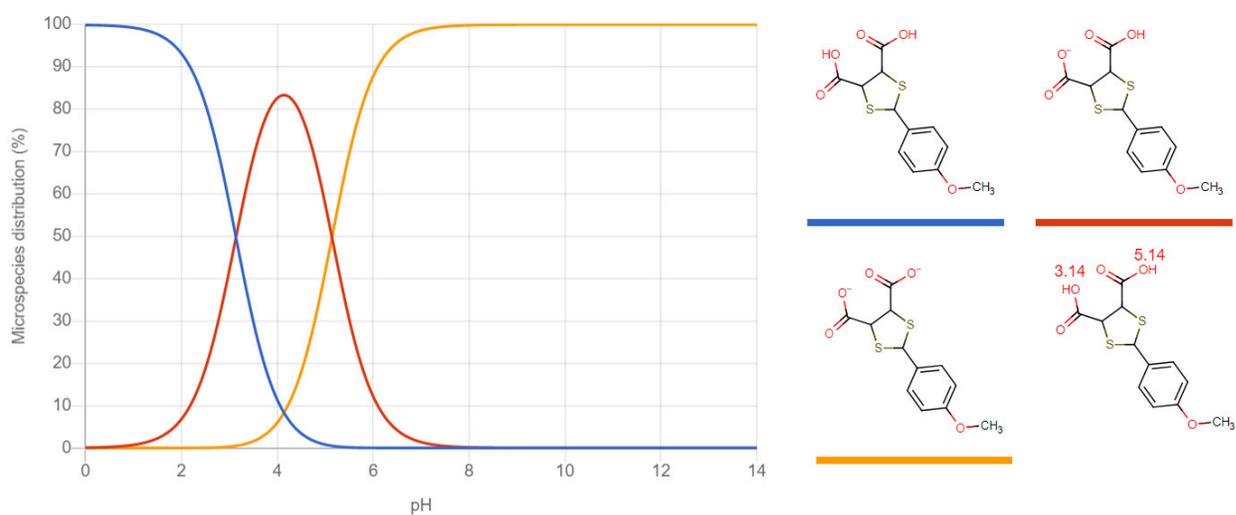


Figura 33. Diagrama de distribución de especies del compuesto **3b**

Figura 34.Diagrama de distribución de especies del compuesto **3c**.

Figura 35. Diagrama de distribución de especies del compuesto **3d**.

La Figura 36, representa el DDE del ácido lipoico (**4**). Se propone en el caso de la rata, posterior a la administración oral, coexistirán la especie neutra (color azul) y la especie con carga negativa (color rojo) a un pH 4.5 aproximadamente. Una vez en el intestino delgado, la especie cargada predominará exclusivamente, pero tendrá buena absorción. Lo mismo le puede ocurrir al antioxidante en el intestino humano, no obstante, en el estómago la molécula se encontrará 100% en su forma neutra lo que puede permitir una mayor absorción.

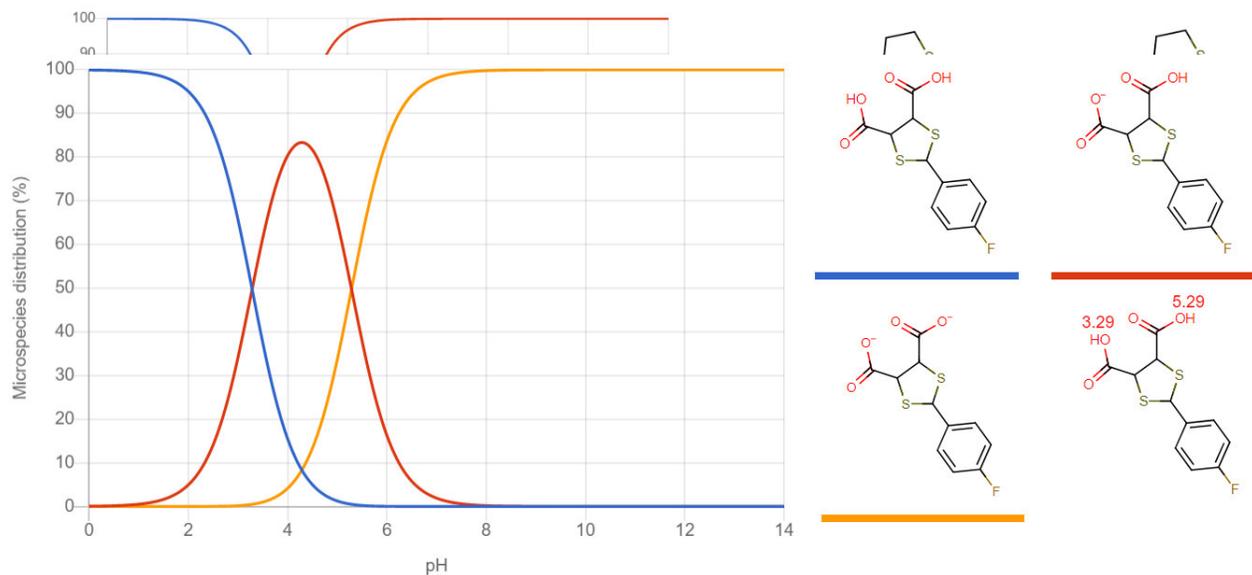
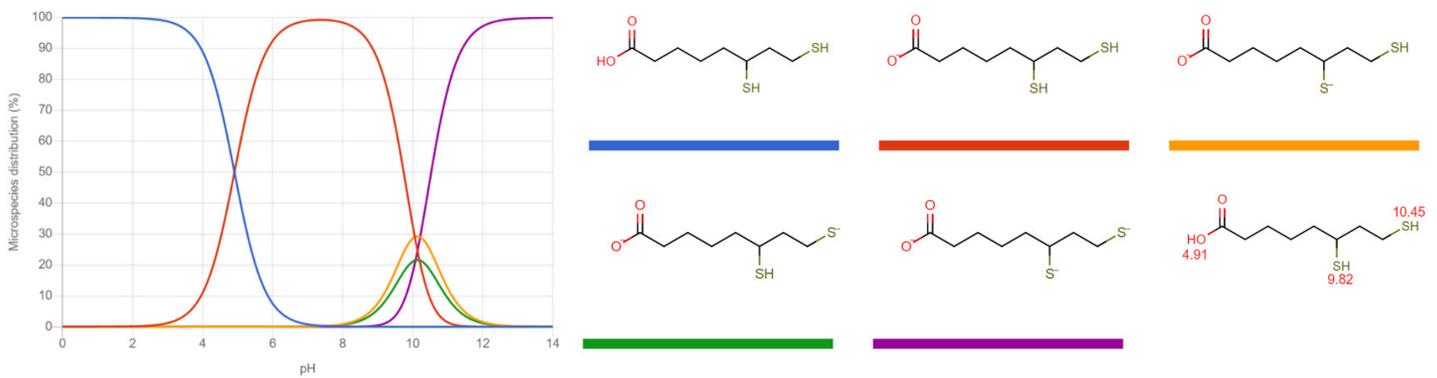


Figura 36. Diagrama de distribución de especies del ácido lipoico, compuesto **4**.

La Figura 37

Figura 37, representa el DDE del ácido lipoico reducido (**5**). Nuevamente, considerando el pH del sistema digestivo de la rata y el humano, podemos esperar que la especie neutra (color azul), será la predominante en el estómago después de la administración oral. Por otro lado, la especie con una carga negativa (color rojo), será la mayoritaria al alcanzar el intestino y tendrá buena absorción. A pesar del incremento del



número de especies en comparación con su forma oxidada, éstas se presentan a partir de un pH 9.5 aproximadamente y con un porcentaje inferior al 30%.

Figura 37. Diagrama de distribución de especies del compuesto **5**.

La Figura 38, representa el DDE del monoéster derivado del ácido lipoico y el isosorbide (**7a**). Este compuesto es muy noble, ya que únicamente posee dos especies, siendo la neutra la más abundante en un amplio rango de pH. Esto es importante, ya que los distintos valores de pH del sistema digestivo, no tendrán aparentemente efecto alguno sobre el compuesto y, por ende, tendrá una buena absorción.

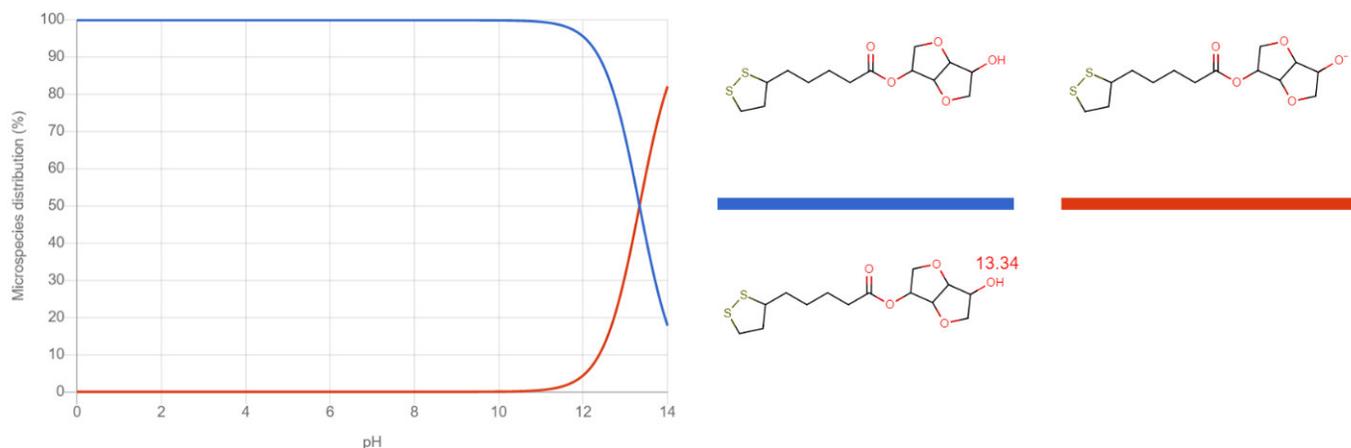


Figura 38. Diagrama de distribución de especies del compuesto **7a**.

La Figura 39, representa el DDE del monoéster con enlace disulfuro reducido (**8a**). A diferencia de su estado oxidado, hay un incremento considerable en el número de especies. Sin embargo, a pesar de que la especie neutra predomina en los rangos de interés de pH del sistema digestivo de la rata y el humano, la absorción en el intestino será baja.

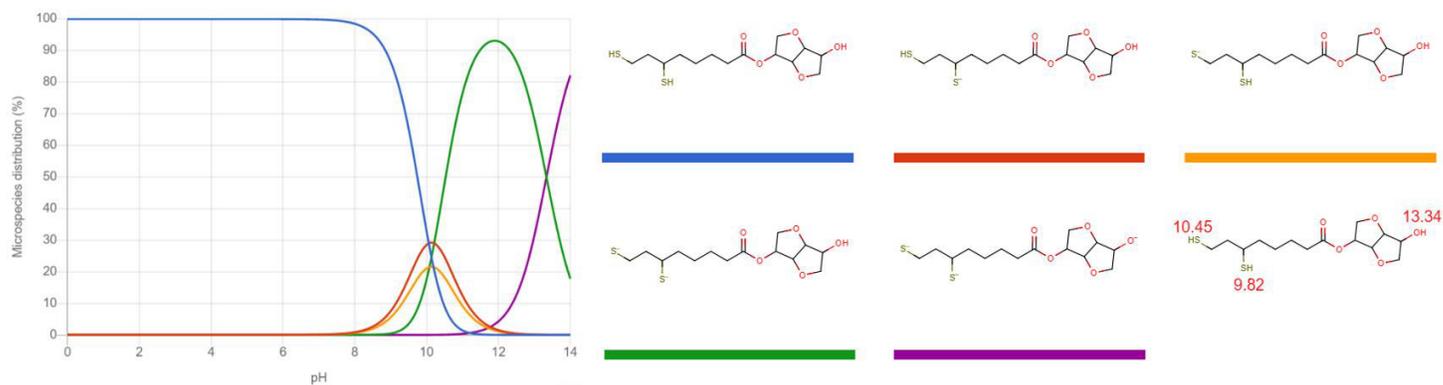


Figura 39. Diagrama de distribución de especies del compuesto **8a**.

El diéster derivado del ácido lipoico y el isosorbide (**7b**), no posee átomos ionizables en su forma oxidada, pero sí en su forma reducida (**8b**). La Figura 40, representa el DDE del compuesto (**8b**). Nuevamente existe un incremento en el número de especies de la forma reducida, pero no son tan relevantes al presentarse a un pH 10 y con una distribución inferior al 30%. Finalmente, la absorción de ambos compuestos será baja.

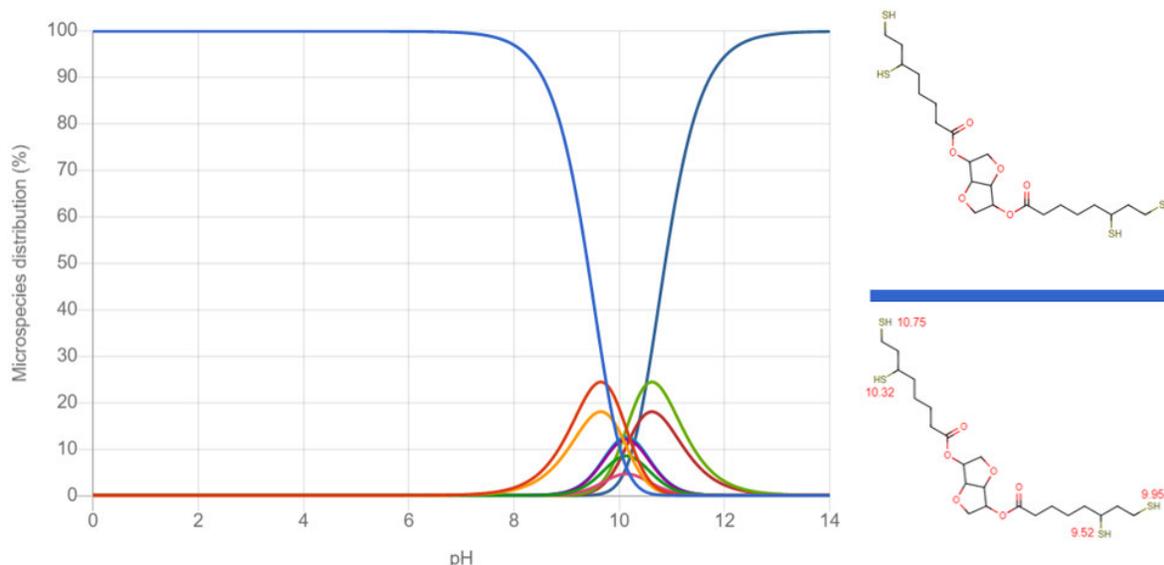


Figura 40. Diagrama de distribución de especies del compuesto **8b**.

La Figura 41, representa el DDE del clorhidrato de cisteamina (**9**). En caso de este compuesto, la especie con carga positiva (color rojo), predominará en un amplio rango de pH, observándose así el mismo comportamiento tanto en la rata como en el humano. En adición, la carga en su estructura química no afectará su absorción.

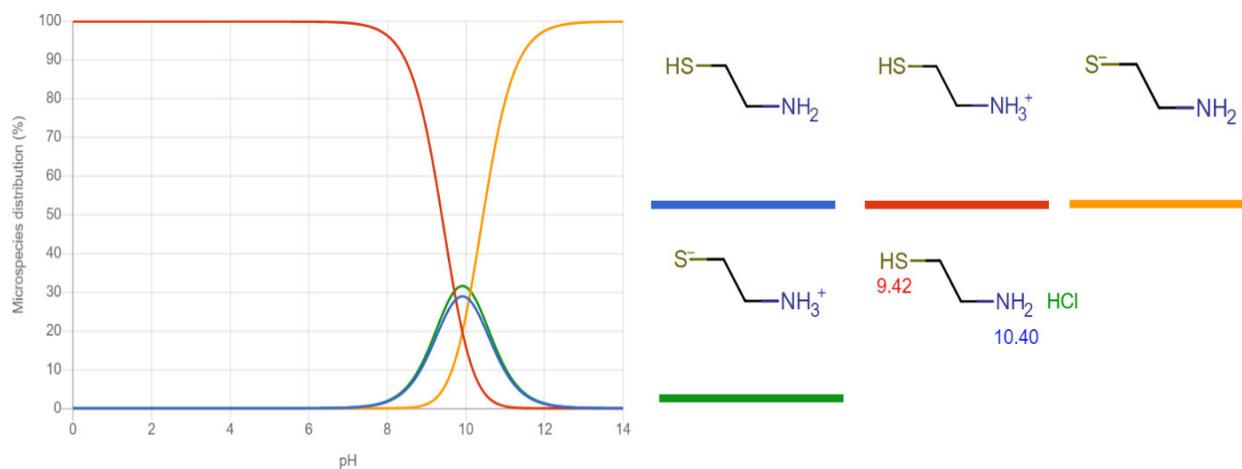


Figura 41. Diagrama de distribución de especies del compuesto **9**.

La Figura 42, representa el DDE del aminoácido L-cisteína (**10**). En caso de la rata, probablemente la especie predominante en ambos rangos de pH analizados será la zwitteriónica (color amarillo). Por otro lado, en el humano, a un pH 2.5 aproximadamente se encontrarán presentes en un 50% la especie con carga positiva (color rojo) y en un 50% el zwitterión, hasta predominar este último en el intestino delgado. El comportamiento anfótero le permite al aminoácido disolverse en agua y operar como disolución amortiguadora, pero a la par disminuirá su absorción por la doble carga en distintos átomos de su estructura.

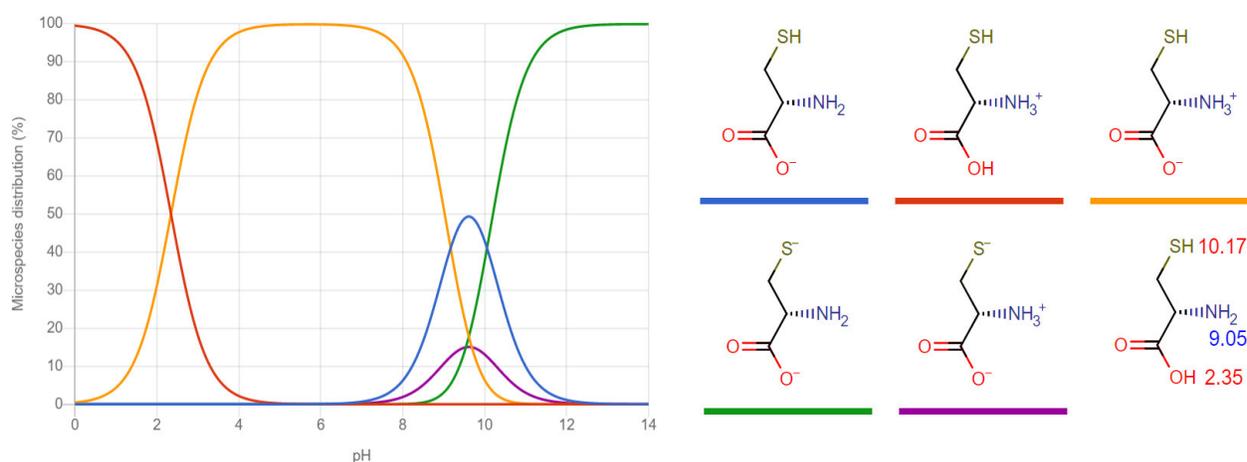


Figura 42. Diagrama de distribución de especies del compuesto **10**.

Finalmente, es importante recordar que, el pH fisiológico juega un papel importante en la formación y la estabilidad del complejo. A un pH bajo o ácido, los agentes quelantes se vuelven inestables al protonarse, perdiendo su actividad; mientras que, a un pH alto o alcalino, los iones metálicos tienden a formar hidróxidos insolubles, impidiendo así su remoción de los sitios de deposición del metal. Por lo tanto, la estabilidad del complejo es un requisito indispensable y necesario, aunque no suficiente, para que el ion metálico pueda transformarse completamente en la especie quelada y posteriormente ser excretado del organismo.

5.3.3 Administración y obtención de muestras de interés biológico

Los 1,3-ditiofanos (**3a-d**), ácido lipoico reducido (**5**) y los ésteres reducidos (**8a-b**) fueron disueltos en agua con un 10% de etanol para incrementar la solubilidad. Mientras que el DMSA (**1**), el ácido lipoico (**4**), el monoéster (**7a**) y el diéster (**7b**), requirieron de una mayor cantidad de etanol (30%), al no ser completamente solubles. Por último, la cisteamina (**9**) y cisteína (**10**) se disolvieron únicamente en agua.

La administración de las distintas moléculas se realizó por vía oral mediante el uso de una cánula metálica. Como se mencionó en la metodología, el esquema de tratamiento clínico del DMSA sirvió como referencia para los esquemas propuestos en el presente trabajo. En el caso de los ésteres (**7a-b** y **8a-b**), el ácido lipoico (**4**) y el ácido lipoico reducido (**5**), se seleccionaron las concentraciones del tratamiento por intoxicación con DMSA (30 mg/kg y 15 mg/kg), debido a la dificultad que representaba administrar un mayor volumen de un compuesto con baja solubilidad. Para el caso de los 1,3-ditiofanos (**3a-d**), que poseían mejor solubilidad experimental en comparación con el DMSA, se seleccionó una dosis de 70 mg/kg durante 7 días, seguido de 7 días de reposo y nuevamente 70 mg/kg por 7 días más. Finalmente, la cisteamina (**9**) y cisteína (**10**) a una dosis de 200 mg/kg al poseer la mejor solubilidad y no existir reporte alguno hasta el momento de evaluación a tales dosis. Estas dos últimas moléculas, no se sintetizaron en el proyecto, pero se sometieron a evaluación como referencia para el diseño y síntesis de futuras estructuras e investigaciones.

Para la evaluación de las moléculas se formaron grupos de ratas donde se incluyeron tres grupos control conformados de la siguiente manera. Un grupo control positivo (ratas expuestas a plomo sin tratamiento posterior), un grupo control negativo (ratas sin exponer a plomo) y un grupo que recibió el quelante (ratas expuestas a plomo y posterior tratamiento con DMSA). Todas las ratas de los diferentes grupos fueron expuestas a plomo *ad libitum* con las mismas concentraciones y por el mismo tiempo mencionado. No obstante, el DMSA se evaluó por separado para cada una de las dosis en los esquemas, es decir, 30 mg/kg y 15 mg/kg, 70 mg/kg y 100 mg/kg.

Finalizada la exposición al metal, a cada rata se le realizó una toma de muestra sanguínea vía retroorbital, para determinar la concentración basal del plomo y proseguir con la evaluación de las moléculas. La administración de los tratamientos se realizó por vía oral e inició 24 h después de cesar la exposición al plomo. Como se mencionó, se siguió un esquema de administración por ciclos de 7 días durante 3 semanas, siguiendo un ciclo de tratamiento y un ciclo sin tratamiento. Después del primer ciclo (con tratamiento), se realizó una segunda toma de muestra sanguínea a las 24 h, para determinar si ocurría la remoción de Pb a nivel del torrente sanguíneo y analizar de manera general el comportamiento de las moléculas *in vivo*. El segundo ciclo (sin tratamiento o de reposo), comenzó a las 24 h de haber concluido el ciclo anterior, para permitir la redistribución del plomo al torrente sanguíneo nuevamente. Posterior a las 24 h del séptimo día del segundo ciclo, se inició el tercer y último ciclo (nuevamente con tratamiento). Finalmente, la tercera muestra sanguínea fue obtenida al concluir este ciclo y para este caso, la toma de muestra se realizó por punción intracardiaca.

Todas las muestras biológicas fueron sometidas a una digestión húmeda bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 11, con la finalidad de oxidar toda la materia orgánica y recuperar el catión metálico de interés (Pb^{2+}). Para algunas muestras no se pudo realizar la cuantificación y, por consiguiente, el análisis estadístico. Este suceso fue derivado de la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2. Sin embargo, se mencionaron en la Tabla con la finalidad de informar sobre futuras investigaciones que se planean realizar.

Tabla 11. Condiciones de digestión húmeda para muestras biológicas

Muestra	HNO ₃ (μL)	H ₂ O ₂ (μL)	Aforo final (mL)
Sangre (250 μL)	500	125	5
Riñón (250 mg)		200	5
Hígado (100 mg)		250	10
Hueso (160 mg)		250	10
Cerebro (250 mg)		500	5

5.4 Cuantificación de plomo y análisis estadístico

Al concluir la preparación y adecuación de todas las muestras biológicas, se determinaron los niveles del plomo mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Los resultados obtenidos fueron ajustados con base en la cantidad de masa del tejido que se digirió y el aforo final con agua desionizada.

Posteriormente, todos los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Minitab 19 para determinar la presencia de diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron los compuestos sintetizados como tratamiento y el grupo Control (+). En adición, el Control (-) no fue considerado en el análisis estadístico, ya que habría diferencia significativa con el resto de los grupos por no haberse expuesto al tóxico. Por lo tanto, este último grupo fue empleado como control y monitoreo del proceso experimental contra la contaminación cruzada. La Tabla 12, sintetiza los resultados obtenidos de la cuantificación de las muestras de sangre digeridas a los distintos tiempos de la evaluación *in vivo*.

Tabla 12. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g/dL}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb

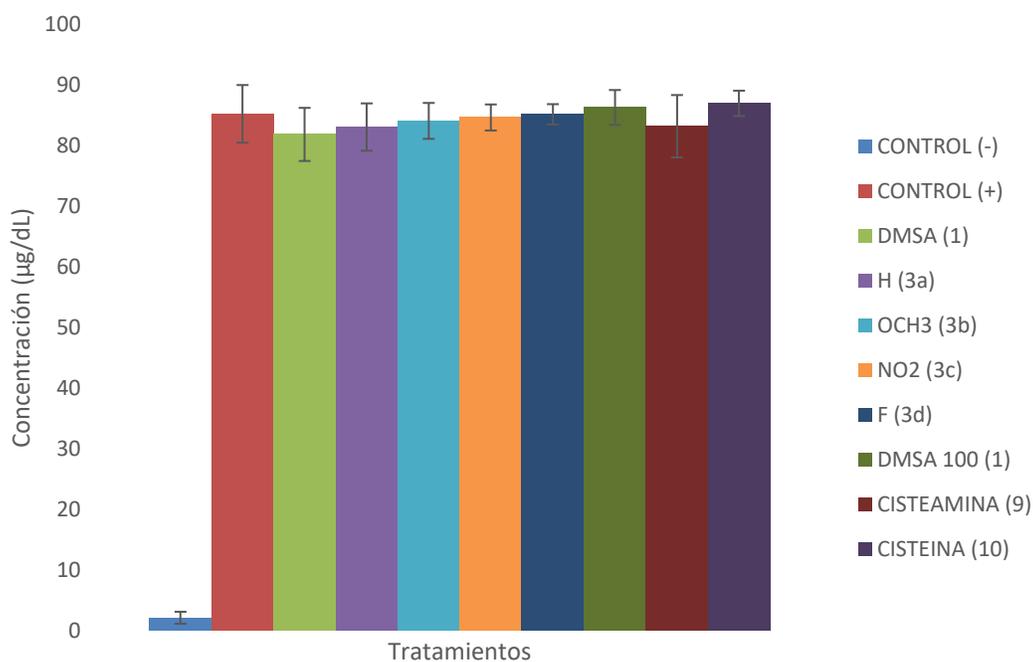
Grupo	Compuesto	Concentración basal	Concentración intermedia	Concentración final
Control (-)	-	2.12 \pm 0.99	1.62 \pm 0.78	1.11 \pm 0.16
Control (+)	-	85.25 \pm 4.76	35.19 \pm 2.87	23.53 \pm 3.09*
DMSA 70 mg/kg	1	81.86 \pm 4.38	23.02 \pm 1.68*	8.11 \pm 2.13
H	3a	83.07 \pm 3.91	38.47 \pm 3.36	21.24 \pm 3.80
OCH ₃	3b	84.09 \pm 2.96	36.85 \pm 2.93	17.41 \pm 3.74
NO ₂	3c	84.66 \pm 2.15	44.05 \pm 2.60*	23.65 \pm 3.44
F	3d	85.18 \pm 1.67	42.38 \pm 1.87*	20.22 \pm 3.23
DMSA 100 mg/kg	1	86.31 \pm 2.87	14.08 \pm 3.41*	6.62 \pm 3.16*
CISTEAMINA	9	83.21 \pm 5.14	35.08 \pm 2.38	17.90 \pm 3.63
CISTEINA	10	86.98 \pm 2.10	42.62 \pm 1.42*	25.39 \pm 2.10

Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb.

*p<0.05 comparados con el grupo control (+). n=5.

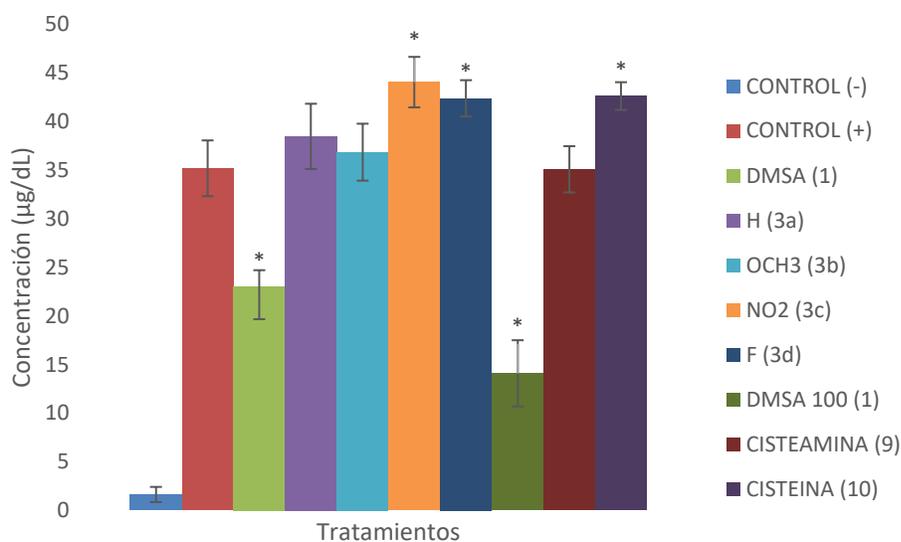
El Gráfico 1, representa los niveles basales de plomo en la sangre de los roedores, donde de manera gráfica se aprecia que no existe diferencia estadísticamente significativa por lo menos entre dos de los grupos considerados, lo cual fue corroborado adicionalmente mediante un ANOVA. Por ende, al no existir diferencia, no fue necesario realizar la prueba de comparación múltiple de Tukey. Además, se comprobó que el tiempo de exposición y la vía de administración del plomo, mediante la intoxicación *ad libitum*, alcanzó niveles del metal muy próximos entre los tratamientos, motivo por el cual no se aprecia la diferencia mencionada. Finalmente, se espera que la concentración del catión metálico en los distintos sitios de depósito del organismo presente el mismo patrón de comportamiento.

Gráfico 1. Niveles basales de plomo en sangre de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina



El Gráfico 2, representa los niveles intermedios de plomo en las ratas y corresponde a la muestra sanguínea que se obtuvo posterior a las 24 h de la última administración de los compuestos en el primer ciclo. En este segundo muestreo, se aprecia que comienza a existir diferencia estadísticamente significativa entre el Control (+) y algunos tratamientos. Como era de esperarse, el DMSA presentó una mayor disminución en la concentración del metal en el torrente sanguíneo a las dosis de 70 mg/kg y 100 mg/kg que fue evaluado en esta sección, siendo esta última la que mejor respuesta obtuvo. Por otro lado, los compuestos **3c**, **3d** y **10** presentaron un incremento en la concentración sanguínea, lo cual pudiese ser indicativo de que se está removiendo plomo de algún otro depósito corporal, recordando que este metal en particular se distribuye y deposita en el organismo con base en la siguiente tendencia de concentración, hueso > riñón > hígado > cerebro. El resto de los compuestos, no resultó ser estadísticamente significativo en esta etapa, lo cual indica que el nivel de plomo se mantuvo prácticamente igual a la semana de tratamiento en comparación con las ratas del grupo Control (+).

Gráfico 2. Niveles intermedios de plomo en sangre de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina



La Figura 43, representa la prueba de comparación múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles intermedios de plomo de la Tabla 12. Además de observarse las diferencias significativas con el Control (+), se aprecia que existe diferencia incluso entre los compuestos evaluados. Sin embargo, el DMSA en ambas concentraciones, disminuyó en mayor proporción el plomo, que al ser estadísticamente significativo con el resto de los tratamientos, indica que ningún otro compuesto logró remover el metal en la misma medida que lo hizo el DMSA. Finalmente, la mayor concentración de DMSA evaluada (100 mg/kg), es incluso significativa comparada con la menor dosis, concluyendo que el efecto quelante es dosis-dependiente.

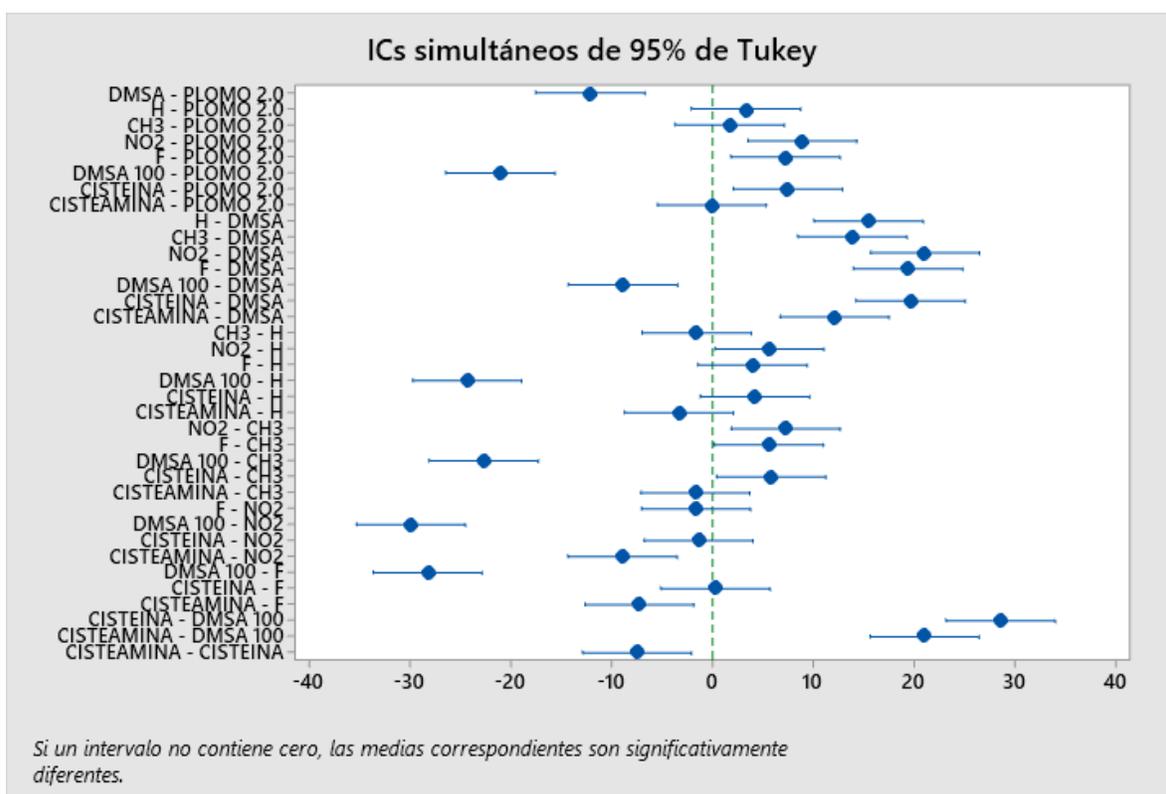
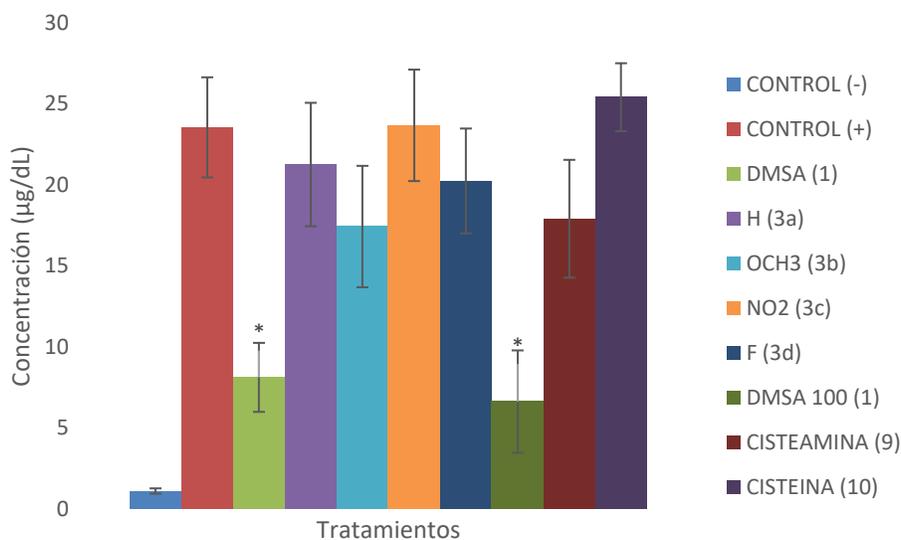


Figura 43. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 2.

El Gráfico 3, representa los niveles finales de plomo en las ratas y corresponde a la muestra sanguínea que se obtuvo por punción intracardiaca posterior a las 24 h de la última administración de los compuestos. En este muestreo final, se aprecia que una vez más el DMSA es estadísticamente significativo comparado con el Control (+) e incluso continuó disminuyendo los niveles sanguíneos del tóxico con base en los resultados obtenidos de la Tabla 12. Por otro lado, posterior al esquema de tratamiento de 3 semanas y comparado con los resultados del Gráfico 2, se observa que ningún grupo es estadísticamente significativo (a excepción del DMSA), lo cual favorece la hipótesis de que los niveles de plomo incrementaron en el torrente sanguíneo por la redistribución del tóxico derivada de la eliminación del mismo. Finalmente, a pesar de haberse evaluado “dosis altas” para los compuestos **9** y **10** (cisteamina y cisteína respectivamente), no se observó diferencia alguna comparada con el Control (+), indicando que probablemente no estén removiendo el plomo del organismo. Sin embargo, es crucial el análisis y la discusión de los resultados obtenidos en las cuantificaciones de los órganos para soportar este hallazgo.

Gráfico 3. Niveles finales de plomo en sangre de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina



La Figura 44, representa la prueba de comparación múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles finales de plomo de la Tabla 12. Nuevamente el DMSA es el único grupo estadísticamente significativo comparado con el resto de los compuestos y control evaluados. No obstante, concluido el esquema completo de tratamiento, ambas dosis alcanzaron la misma concentración de plomo en el torrente sanguíneo y dejaron de ser estadísticamente significativos. Por lo tanto, el análisis en los diversos órganos diana del tóxico, permitirá comprobar si en efecto la dosis más alta, remueve en mayor medida el plomo que la concentración menor. Conjuntamente y comparado con los resultados intermedios de la Figura 43, se observa una tendencia similar entre los grupos que presentaron diferencia significativa, pero en esta ocasión disminuyó el número de grupos con diferencia significativa.

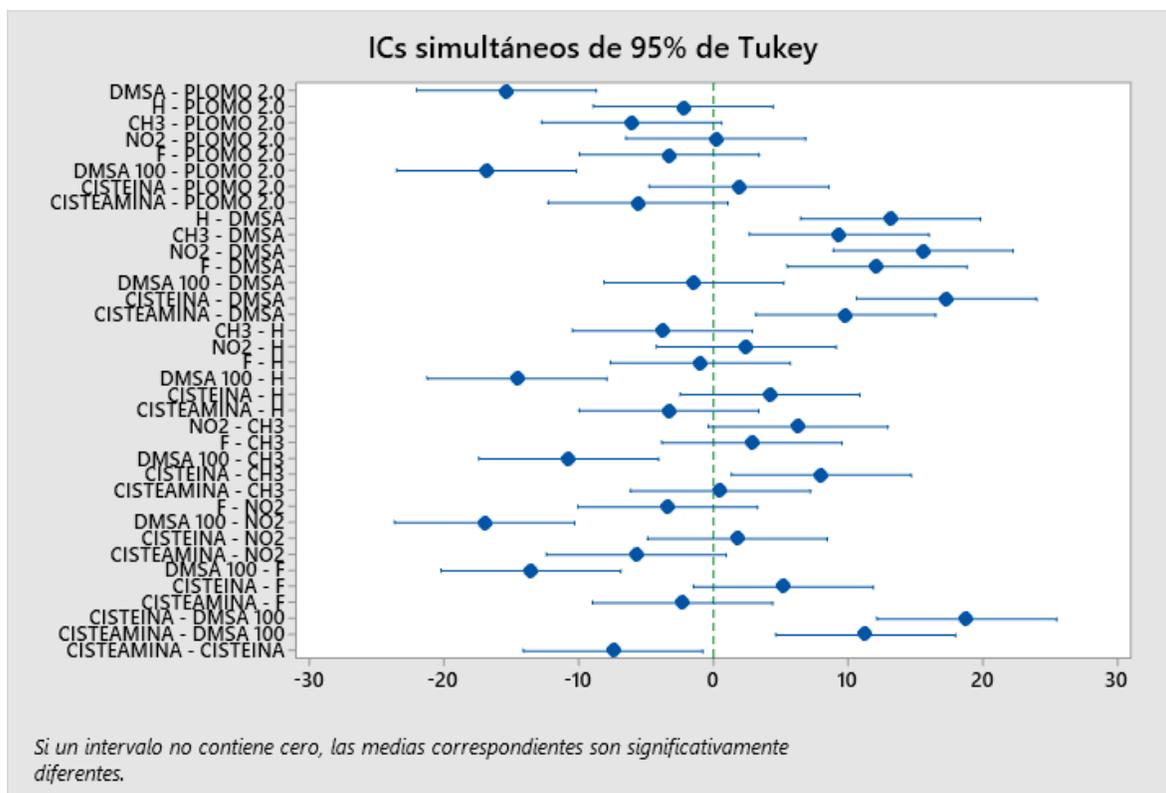


Figura 44. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 3.

La Tabla 13, sintetiza los resultados obtenidos de la cuantificación de plomo de las muestras de los distintos tejidos biológicos recuperados y analizados de las ratas, que siguieron el mismo esquema de tratamiento. Sin embargo, las muestras se recolectaron hasta el sacrificio al concluirse el tercer ciclo. De la misma manera que para el análisis de la concentración sanguínea de plomo a los distintos tiempos, en el análisis estadístico de los tejidos no se consideró el Control (-), al no haber sido expuestos los animales al tóxico y nuevamente se emplearon estas muestras para monitoreo de la contaminación cruzada de la técnica empleada para la digestión de éstos.

De manera general se aprecia que hubo diferencias estadísticamente significativas comparadas con el Control (+), lo cual le da un mayor soporte a nuestra hipótesis de que la baja quelación a nivel de torrente sanguíneo fue debida a que el compuesto se encontraba quelando el plomo depositado en los tejidos y al mismo tiempo, redistribuyéndolo a la sangre, incrementando así la concentración y no apreciándose una diferencia significativa en comparación con el Control (+) y con el DMSA. En algunos casos, no se pudo realizar la evaluación de la actividad quelante en el testículo debido a la escases de ratas macho.

Tabla 13. Niveles de Pb en órganos ($\mu\text{g/g}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb

Grupo	Compuesto	Concentración en testículo	Concentración en hígado	Concentración en riñón
Control (-)	-	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.03	0.06 \pm 0.04
Control (+)	-	0.30 \pm 0.02	0.76 \pm 0.07	21.50 \pm 2.16
DMSA 70 mg/kg	1	-	0.41 \pm 0.05*	6.55 \pm 2.86*
H	3a	0.18 \pm 0.02*	0.47 \pm 0.07*	11.14 \pm 2.07*
OCH ₃	3b	0.19 \pm 0.01*	0.53 \pm 0.07*	12.53 \pm 2.17*
NO ₂	3c	0.17 \pm 0.01*	0.64 \pm 0.06	10.57 \pm 1.84*
F	3d	-	0.69 \pm 0.03	16.41 \pm 1.29*
DMSA 100 mg/kg	1	0.12 \pm 0.02*	0.19 \pm 0.03*	3.16 \pm 0.64*
CISTEAMINA	9	-	0.78 \pm 0.08	23.52 \pm 2.27
CISTEINA	10	0.10 \pm 0.02*	0.61 \pm 0.10*	18.77 \pm 1.03

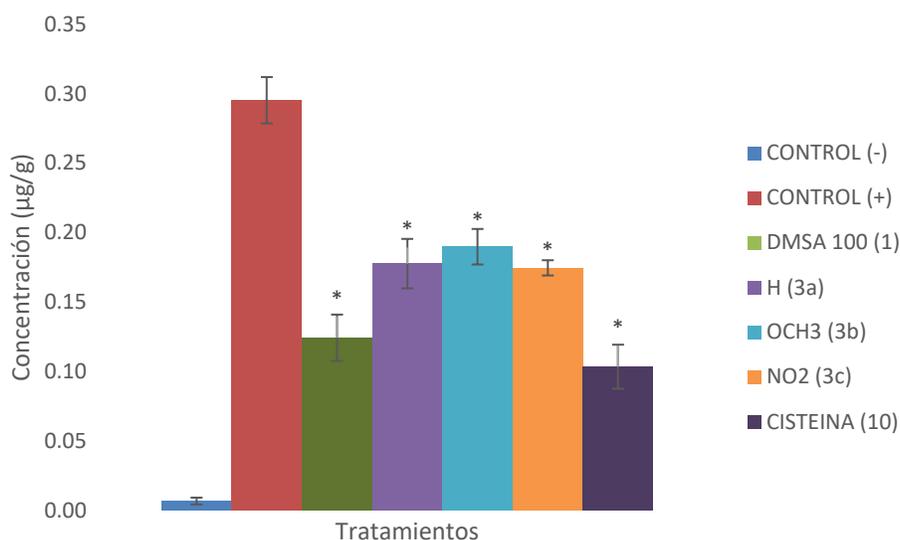
Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb.

*p<0.05 comparados con el grupo control (+). n=5.

El Gráfico 4, representa la concentración de plomo presente en el testículo de las ratas macho tratadas con los derivados del DMSA y la cisteína. En este gráfico se aprecia que todos los grupos son estadísticamente significativos con respecto al Control (+), debido a que los niveles de plomo en el tejido disminuyeron considerablemente, indicando así que los compuestos removieron el metal del sitio de deposición mediante quelación.

Analizando con más detalle el gráfico, una vez más se aprecia que el DMSA fue el mejor compuesto para disminuir la carga de plomo en el testículo. Por ende, los tratamientos seleccionados para el análisis de testículo en estos grupos de ratas fueron los derivados del DMSA, que en adición presentaron los mejores resultados de la regla de cinco de Lipinski y un buen perfil de solubilidad teórico y experimental. Adicionalmente, se sometió a la evaluación a la cisteína al poseer tres elementos de interés en la quelación de metales, es decir, el oxígeno (O), el nitrógeno (N) y el azufre (S).

Gráfico 4. Niveles de plomo en testículo de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina.



Al establecer la diferencia estadísticamente significativa mediante el ANOVA, se procedió a realizar la prueba de Tukey como se aprecia en la Figura 45. En esta ocasión, todos los compuestos evaluados mostraron diferencia con respecto al Control (+), lo cual indica que las ratas sometidas a tratamiento mostraron una disminución considerable en el nivel de plomo en testículo. Lo anterior comprueba que efectivamente las moléculas están alcanzando los sitios de depósitos del plomo. Ahora bien, a pesar de que no se evaluó la dosis de DMSA (1) de 70 mg/kg, sí se pudo evaluar la dosis alta de 100 mg/kg, donde en comparación con las moléculas sintetizadas (3a, 3b, 3c) y evaluadas a una concentración de 70 mg/kg se encontró que poseen diferencia significativa. Además, el DMSA siguió siendo el quelante que disminuyó mejor la concentración de plomo, corroborando que la actividad quelante es dosis-dependiente. No obstante, se observó que el DMSA no posee diferencia significativa en comparación con la cisteína evaluada a 200 mg/kg, con lo cual se podría sospechar que la cisteína posee un comportamiento similar a las moléculas, es decir, incrementa la concentración de plomo en sangre debido a la quelación en otros sitios.

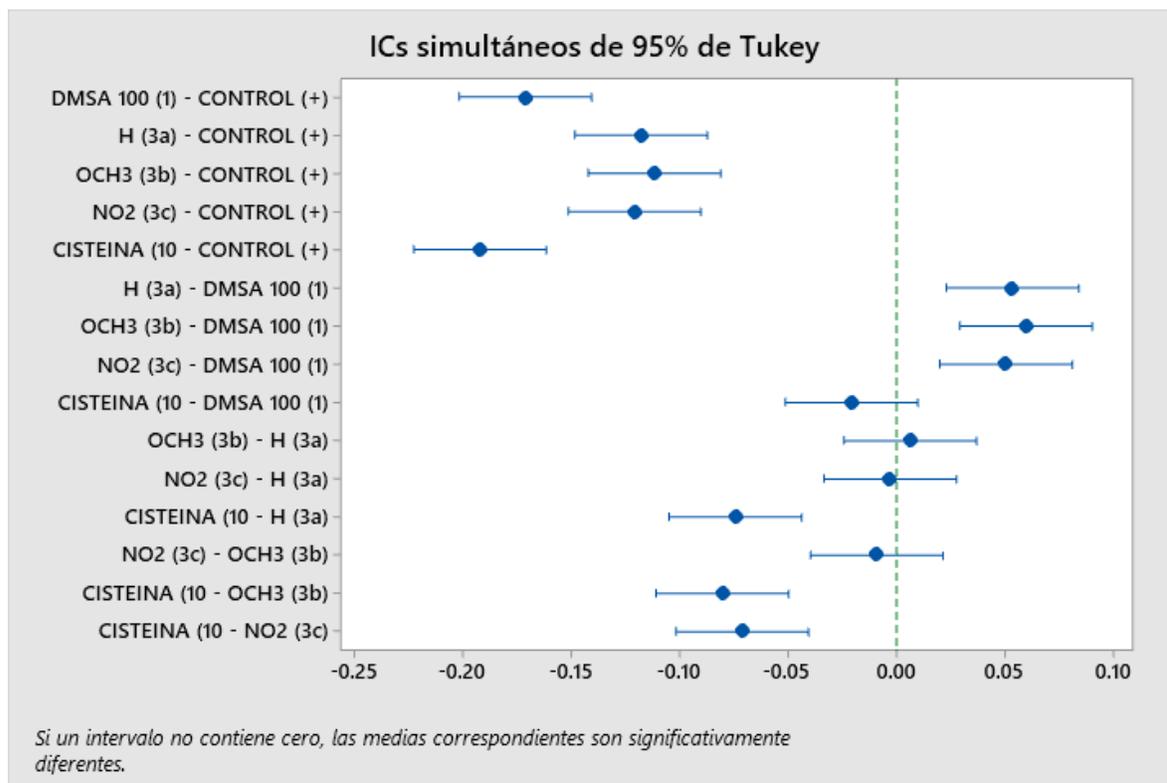
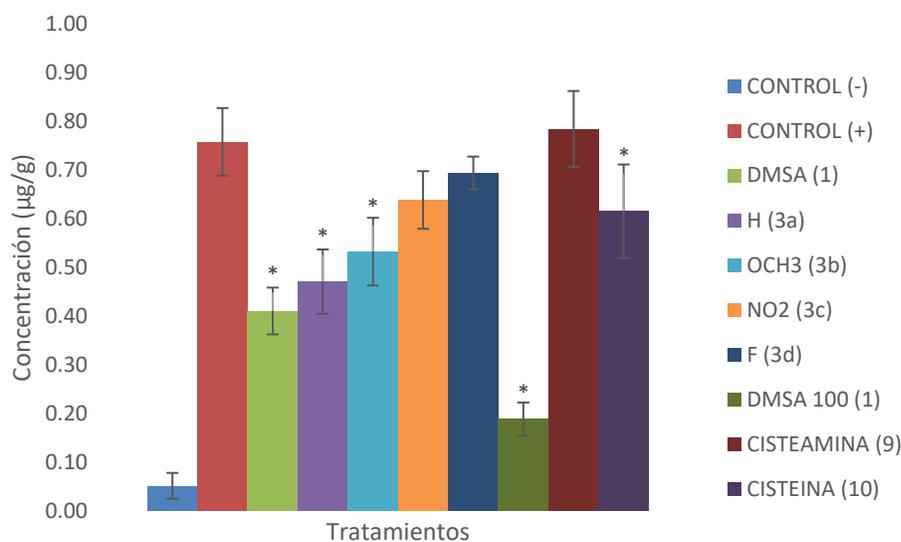


Figura 45. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 4.

El Gráfico 5, representa la concentración de plomo presente en el hígado de las ratas tratadas con los derivados del DMSA, la cisteamina y la cisteína. En este gráfico se aprecia que algunos compuestos presentaron mejor actividad quelante que otros, es decir, algunos fueron estadísticamente significativos con respecto al Control (+) y una vez más se observa que para el caso de la cisteamina no hubo diferencia alguna, caso opuesto para la cisteína, donde se aprecia que a la dosis evaluada hubo una respuesta favorable.

El DMSA presentó mejores resultados a la dosis de 100 mg/kg. No obstante, la concentración de 70 mg/kg, ocupó la segunda posición en la disminución del catión metálico, donde gráficamente se observa que no hay diferencia significativa con respecto a los compuestos **3a** y **3b**, estos resultados podrían ser una primera evidencia de que, si las moléculas fuesen evaluadas a una mayor dosis, se podría observar el mismo efecto quelante dosis-dependiente que para el DMSA. Por ende, la comparación múltiple de medias permitirá determinar si los compuestos evaluados son estadísticamente significativos con respecto a la concentración de 70 mg/kg del DMSA.

Gráfico 5. Niveles de plomo en hígado de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina.



La Figura 46, representa la prueba de comparación múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles de plomo de la Tabla 13. Como se mencionó y confirma con esta prueba, la dosis de DMSA de 100 mg/kg presentó los mejores resultados y es estadísticamente significativa con respecto al resto de los compuestos evaluados, ya que ningún otro compuesto disminuyó la carga de plomo en hígado como lo hizo este quelante. Adicionalmente, es importante mencionar que a pesar de haberse empleado una dosis mayor para la cisteamina y cisteína (200 mg/kg), no hubo mejor respuesta.

Sin embargo, al realizar la comparativa entre la dosis del DMSA de 70 mg/kg con los compuestos **3a** y **3b**, no hay diferencia significativa y, como consecuencia, presentan el mismo comportamiento que el DMSA, es decir, logran remover el catión metálico en la misma proporción en el hígado. Este hallazgo es sumamente importante, ya que el hígado es el tercer órgano con mayor concentración de plomo y el principal productor de glutatión, antioxidante endógeno que contrarresta efectos de radicales libres generados por plomo.

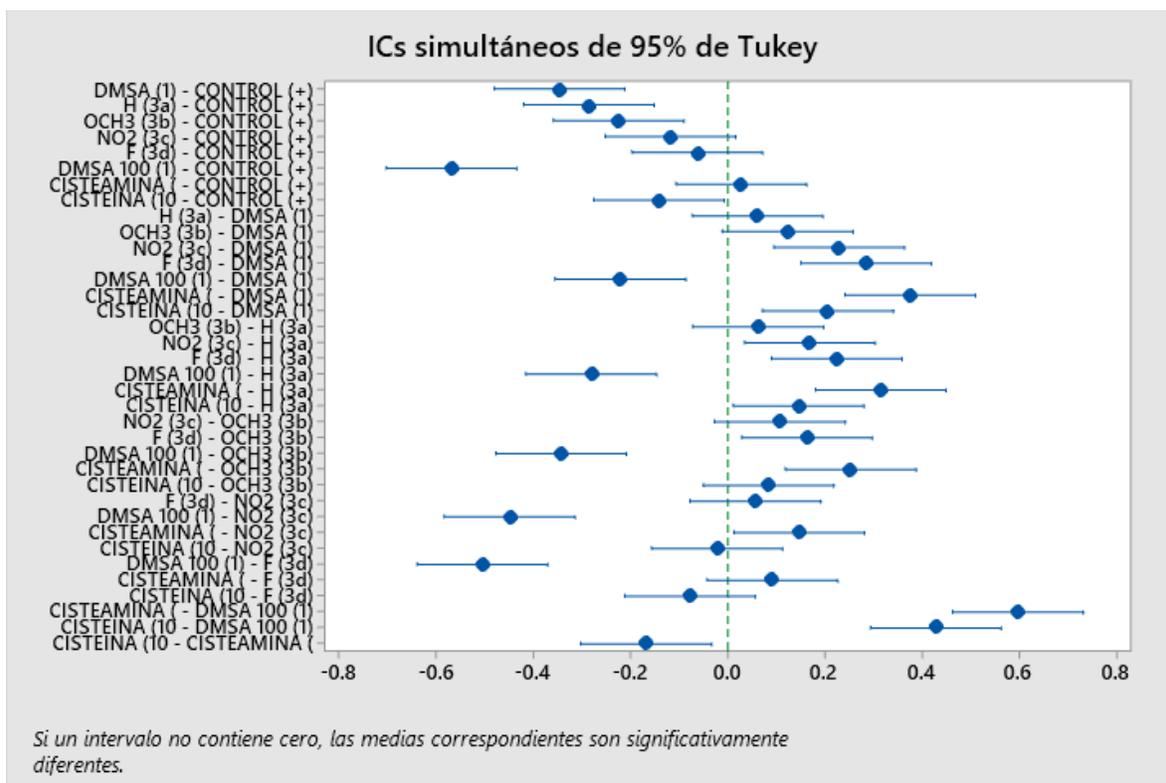
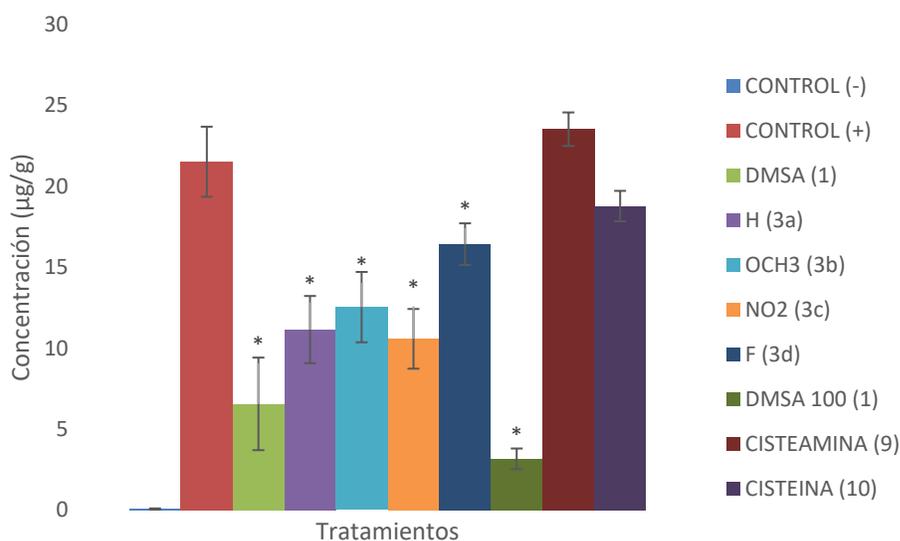


Figura 46. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 5.

El Gráfico 6, representa la concentración de plomo presente en el riñón de las ratas tratadas con los derivados del DMSA, la cisteamina y la cisteína. En este gráfico se aprecia que tanto el DMSA como sus derivados sintetizados lograron disminuir la concentración presente en este órgano en comparación con el Control (+), a diferencia de la cisteamina y cisteína que no fueron estadísticamente significativas. Con respecto a estos dos últimos compuestos, se comprueba que únicamente la cisteína posee buena actividad para remover el plomo, pero únicamente en ciertos órganos (testículo e hígado), como se analizó anteriormente. Si bien, la cisteína por sí sola no permite disminuir los niveles del catión en el organismo, resultaría interesante evaluar su comportamiento en combinación con otros compuestos. Asimismo, no es conveniente la administración de la cisteamina como tratamiento contra la intoxicación por plomo, debido a que incrementa la concentración de este en el riñón, incluso aún más que el Control (+), lo cual podría afectar en mayor proporción al órgano.

Gráfico 6. Niveles de plomo en riñón de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los compuestos 1,3- ditiolanos, cisteína y cisteamina.



La Figura 47, representa la prueba múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles de plomo de la Tabla 13. En esta ocasión, únicamente el compuesto **3c**, no mostró diferencia significativa con respecto a la dosis de 70 mg/kg de DMSA, y ésta a su vez, no fue diferente con respecto a la dosis de 100 mg/kg de DMSA, reiterando que el incremento en la dosis de algunos compuestos podría incrementar su actividad quelante. Estos resultados confirman que a pesar de que los derivados del DMSA no presentan diferencia estadísticamente significativa en la evaluación final en sangre, es debido a que facilitaron la redistribución del plomo al torrente sanguíneo al disminuir significativamente los niveles en otros órganos, principalmente en el riñón e hígado, que ocupan el segundo y tercer lugar con mayor concentración del catión. La eliminación de plomo del organismo es indispensable para detener el progreso de los efectos nocivos, contrarrestar los mismos y permitir al organismo regresar a un estado de equilibrio. Finalmente, el análisis en hueso, terminará por corroborar este comportamiento favorable de los compuestos en otros órganos de interés, al ser el órgano con mayor acumulación de Pb.

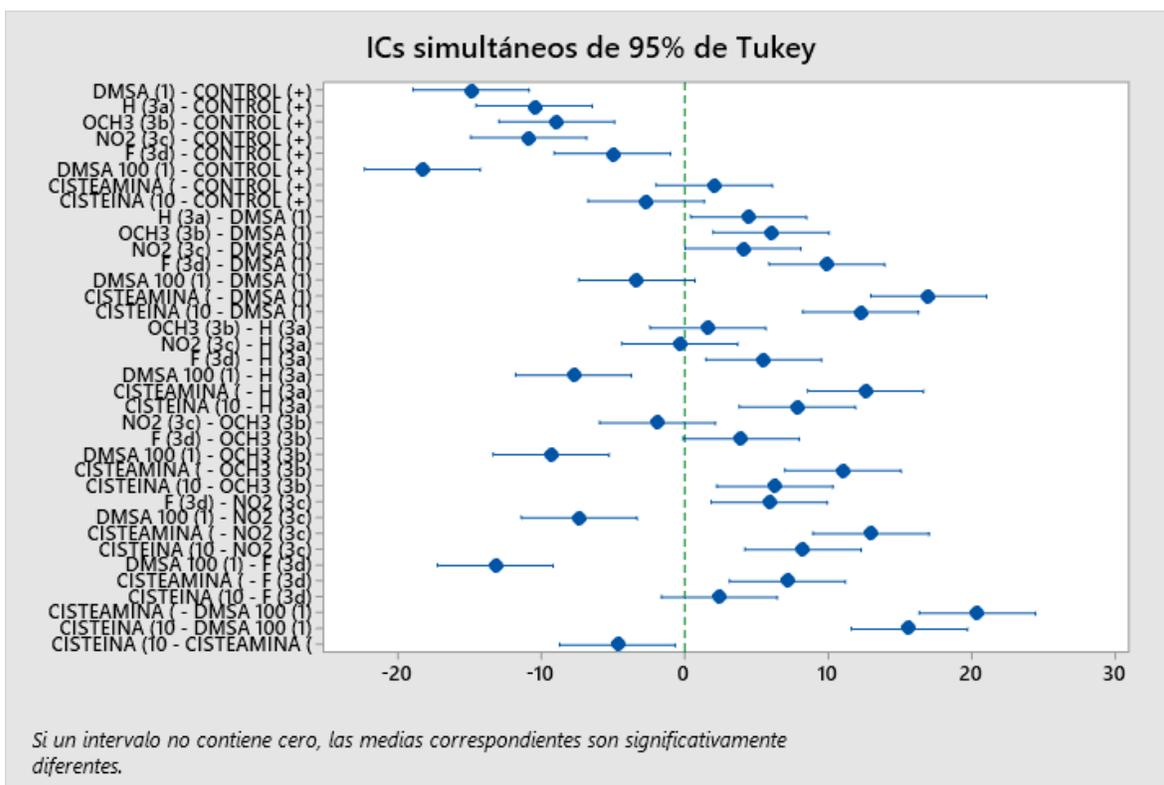


Figura 47. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 6.

Por último, y con base en los resultados obtenidos, la investigación de las combinaciones de los 1,3-ditiofanos entre sí, permitirá establecer si las moléculas presentan un sinergismo que disminuya los niveles de plomo en todo el organismo, debido a que algunos presentaron mejor respuesta sobre un órgano en particular.

Por otro lado, la Tabla 14, sintetiza los resultados obtenidos de la cuantificación de las muestras de sangre de la evaluación *in vivo* para los compuestos derivados del ácido lipoico e isosorbide. Esta evaluación representó un gran reto, debido a la baja solubilidad de los compuestos, que en la mayoría de los casos correspondió con el comportamiento teórico predicho. Por tal motivo, se determinó realizar la evaluación siguiendo el esquema de tratamiento en intoxicación por plomo que se emplea para el DMSA, es decir, un ciclo de 7 días a una dosis de 30 mg/kg, seguido por un ciclo de 7 días de reposo y finalizando con otro ciclo de tratamiento a una dosis de 15 mg/kg. El DMSA se empleó como control a las mismas concentraciones de 30 mg/kg y 15 mg/kg para comparar la actividad quelante. Finalmente, en este grupo no se realizó la obtención de la segunda muestra sanguínea para impedir un mayor estrés en el animal, al existir evidencia de que ambos compuestos (ácido lipoico e isosorbide), no presentan actividad quelante por sí solos.

Tabla 14. Niveles de Pb en sangre ($\mu\text{g/dL}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb

Grupo	Compuesto	Concentración basal	Concentración final
Control (-)	-	1.83 \pm 0.94	1.55 \pm 0.62
Control (+)	-	60.87 \pm 4.23	30.12 \pm 6.00
DMSA 30 mg/kg	1	58.92 \pm 3.78	9.72 \pm 2.51*
AL	4	61.76 \pm 2.12	23.27 \pm 6.94
ALRED	5	61.34 \pm 2.78	22.78 \pm 5.41
ALISO 1:1	7a	62.27 \pm 3.44	26.69 \pm 5.74
ALREDISO 1:1	8a	59.10 \pm 2.18	23.03 \pm 3.60
ALISO 2:1	7b	60.69 \pm 2.09	25.05 \pm 6.27
ALREDISO 2:1	8b	60.47 \pm 2.79	24.57 \pm 4.46

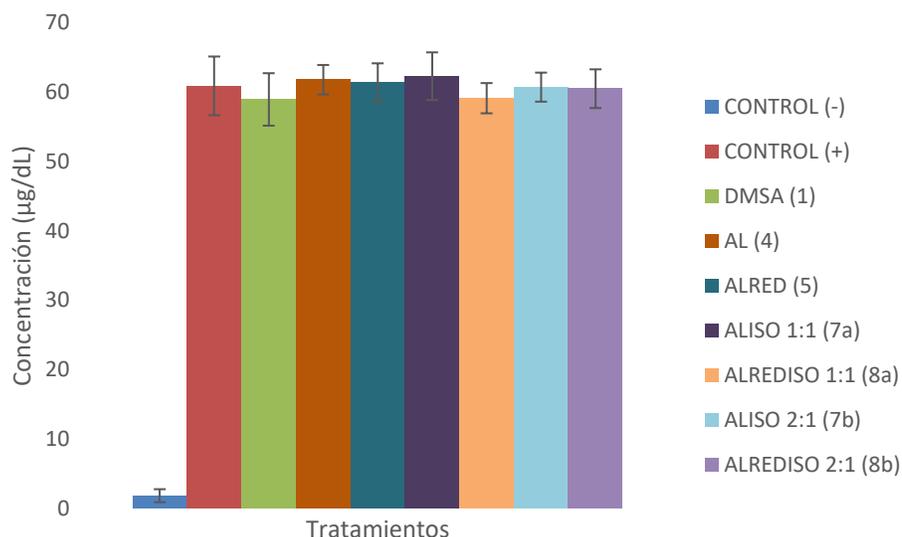
Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb.

* $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n=5$.

El Gráfico 7, representa la concentración basal de plomo en la sangre de las ratas tratadas con los ésteres sintetizados a partir del ácido lipoico e isosorbide. En este gráfico se aprecia que no hubo diferencia significativa con respecto al Control (+), debido a que todos los grupos presentaron concentraciones muy similares de plomo en torrente sanguíneo. Los niveles de plomo obtenidos en sangre para este grupo de compuestos fueron más bajos en comparación con los reportados para el grupo de los derivados del DMSA (1,3-ditiolanos), debido a que las ratas de este grupo no se sometieron a exposición adicional de 3 semanas a 2000 ppm del catión metálico, únicamente fueron 6 semanas a 3000 ppm *ad libitum*.

Las dos primeras muestras de sangre, al igual que para el grupo de 1,3-ditiolanos, fueron recolectadas por punción intraocular y recolectadas en el tubo correspondiente para su posterior análisis en el laboratorio bajo la misma metodología empleada que para el resto de las muestras, es decir, digestión húmeda.

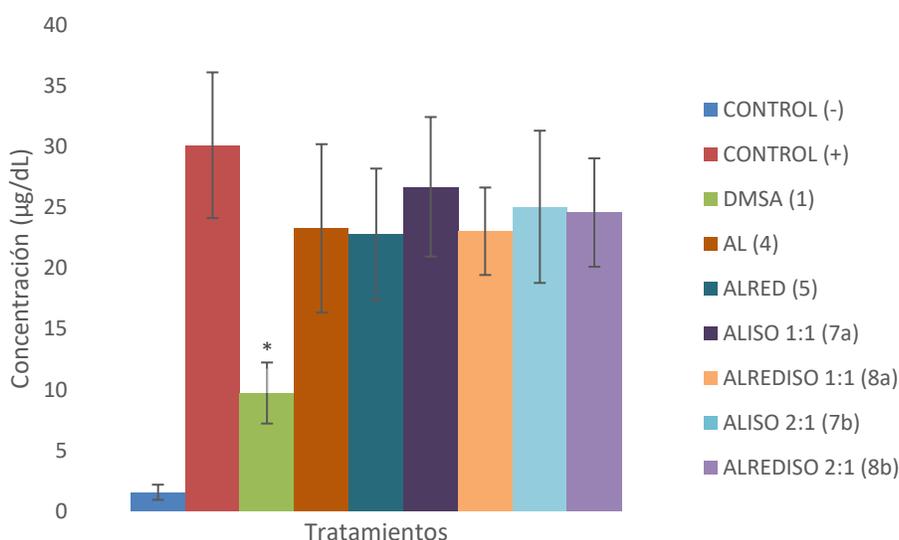
Gráfico 7. Niveles basales de plomo en sangre de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los ésteres, ácido lipoico y ácido lipoico reducido



El Gráfico 8, representa la concentración final de plomo en la sangre de las ratas tratadas con los ésteres sintetizados a partir del ácido lipoico e isosorbide. En este gráfico se aprecia que el único compuesto que presentó diferencia significativa con respecto al Control (+), una vez concluido el tratamiento fue el DMSA, a pesar de ser evaluado a una dosis menor que para el caso de los 1,3-ditiofanos. No obstante, al igual que para los derivados del DMSA, el análisis de otros órganos permitirá establecer si la inexistencia de la diferencia es consecuencia de la redistribución del metal de sus sitios de depósito al torrente sanguíneo o si en definitiva los compuestos no presentaron la actividad quelante por las bajas dosis a los que fueron evaluados. Además, otro factor que debe tomarse en consideración es la baja solubilidad de los compuestos en agua y la manera en cómo repercutirá esto directamente sobre la dosis que se estuvo administrando y evaluando.

De manera general del Gráfico 8, se aprecia que la apertura del enlace disulfuro en el ácido lipoico reducido y en los ésteres correspondientes (**8a** y **8b**), no incrementa la actividad quelante deseada al menos en sangre, al no disminuir los niveles de plomo o en su defecto, la administración de una dosis mayor para corroborar la actividad deseada es necesaria para llegar a mejores conclusiones sobre estos compuestos.

Gráfico 8. Niveles finales de plomo en sangre de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los ésteres, ácido lipoico y ácido lipoico reducido



La Figura 48, representa la prueba múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles de plomo de la Tabla 14, comprobando que el DMSA además de ser estadísticamente significativo con respecto al Control (+), también lo es en comparación con el resto de los compuestos evaluados. No obstante, ningún compuesto incrementó los niveles del metal en sangre por encima de los obtenidos en el Control (+), lo cual podría indicar un comportamiento de redistribución que se corroboró analizando la concentración en otros órganos.

El análisis de la concentración de plomo en otros órganos, además de permitir determinar un proceso de redistribución del metal o la actividad de quelación de los compuestos, proveerá la información necesaria para determinar si el diéster posee mejor actividad en comparación con el monoéster y si la reducción del enlace disulfuro previo a la administración en ratas incrementa el efecto quelante.

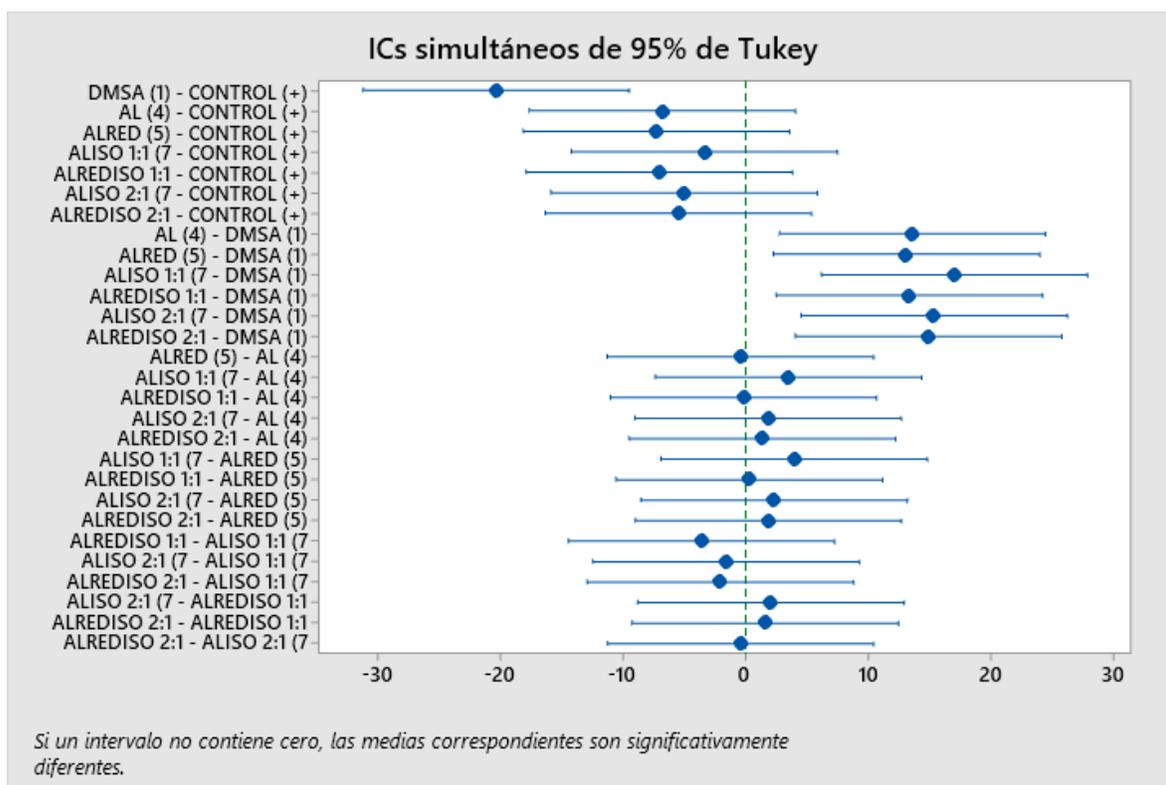


Figura 48. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 8.

La Tabla 15, sintetiza los resultados obtenidos de la cuantificación de plomo en muestras de riñón e hígado recuperados de las ratas intoxicadas y tratadas con los derivados del ácido lipicio y el isosorbide. Como se mencionó anteriormente, debido a la baja disponibilidad de ratas macho no fue posible realizar la evaluación en testículo, pero el análisis de estos dos órganos que ocupan el segundo y tercer lugar respectivamente en la acumulación de plomo, nos proporcionarán un panorama general sobre la actividad quelante de los compuestos.

Analizando la Tabla 15, se determina que para el caso del hígado dos compuestos presentaron diferencia estadísticamente significativa. El DMSA (**1**) disminuyendo la concentración del metal en el órgano y el ácido lipoico reducido (**4**), incrementando la concentración en comparación con el Control (+). Mientras tanto, para el caso del riñón, únicamente el DMSA (**1**), disminuyó los niveles del catión metálico.

Tabla 15. Niveles de Pb en órganos ($\mu\text{g/g}$) en ratas Wistar intoxicadas por Pb

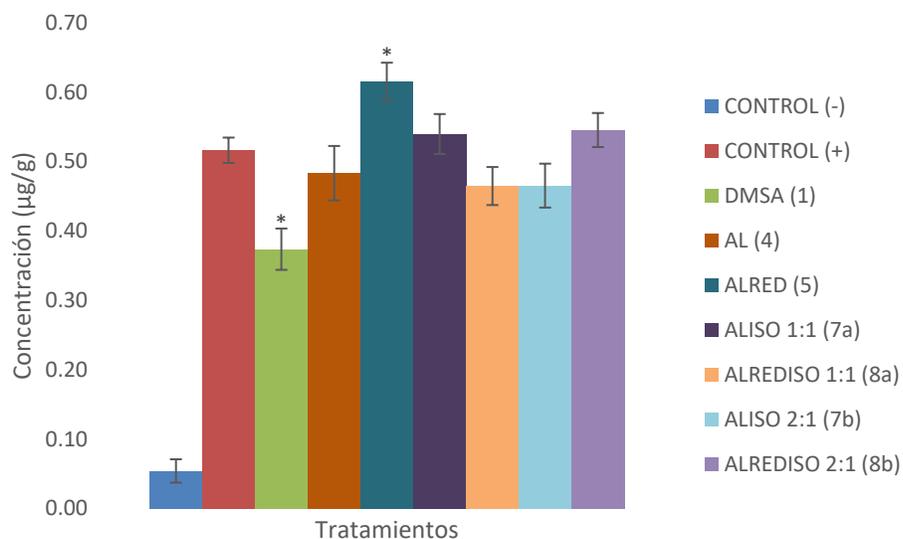
Grupo	Compuesto	Concentración en hígado	Concentración en riñón
Control (-)	-	0.05 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01
Control (+)	-	0.52 \pm 0.02	12.39 \pm 2.21
DMSA	1	0.37 \pm 0.03*	5.02 \pm 1.24*
AL	4	0.48 \pm 0.04	11.12 \pm 1.44
ALRED	5	0.61 \pm 0.03*	10.33 \pm 1.71
ALISO 1:1	7a	0.54 \pm 0.03	13.97 \pm 2.71
ALREDISO 1:1	8a	0.46 \pm 0.03	12.47 \pm 1.92
ALISO 2:1	7b	0.47 \pm 0.03	13.02 \pm 2.47
ALREDISO 2:1	8b	0.55 \pm 0.02	10.74 \pm 1.46

Valores promedio y desviación estándar de la concentración de Pb.

* $p < 0.05$ comparados con el grupo control (+). $n=5$.

El Gráfico 9, representa la concentración de plomo presente en el hígado de las ratas tratadas con los derivados del ácido lipoico y el isosorbide. En este gráfico se aprecia que el ácido lipoico reducido (5) presentó diferencia estadísticamente significativa al incrementar la concentración de plomo incluso por encima del valor reportado para el Control (+), lo que se traduciría en un mayor daño para este órgano y, por ende, el descarte de este compuesto como agente quelante. Contrario a este resultado, el DMSA (1), posee el mismo patrón de comportamiento que en el grupo de los 1,3-ditiolanos, es decir, posee buena actividad quelante a las dosis evaluadas para este grupo al disminuir los niveles del metal tanto en sangre como en hígado. Adicionalmente, se observa que la concentración final de plomo para este grupo y el de los derivados del DMSA, es muy similar, esto debido a que la exposición al metal para este segundo grupo tuvo una menor duración. Por último, se establece que ninguno de los compuestos evaluados, presentó diferencia significativa en comparación con el Control (+), revelando que al menos para sangre e hígado no se detecta la actividad quelante.

Gráfico 9. Niveles de plomo en hígado de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los ésteres, ácido lipoico y ácido lipoico reducido



La Figura 49, representa la prueba múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles de plomo de la Tabla 15. Analizando esta prueba para las concentraciones de plomo en hígado, se determina que ningún otro compuesto evaluado en este grupo logró disminuir la concentración del metal al igual que el DMSA (1), ya que presentaron diferencia significativa con respecto a este quelante. Ahora bien, comparando los resultados obtenidos entre el monoéster (7a), el diéster (7b), el monoéster reducido (8a) y el diéster reducido (8b), todos los resultados son estadísticamente significativos entre sí a diferencia del monoéster (7a) comparado con el diéster reducido (8b) y el monoéster reducido (8a) con el diéster (7b) que no presentaron diferencia. Sin embargo, los resultados no son favorables, ya que con respecto al Control (+), no hubo diferencia alguna, indicando que la administración del compuesto no tendría ningún beneficio aparente sobre los niveles de plomo.

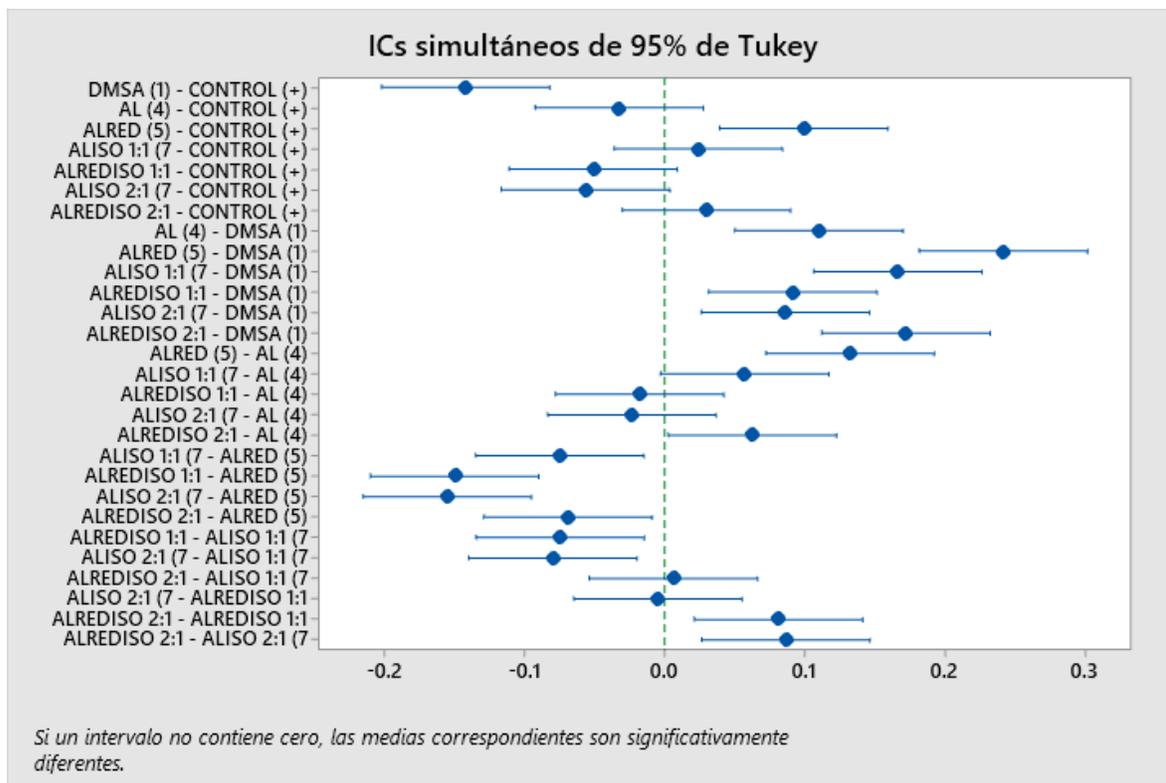
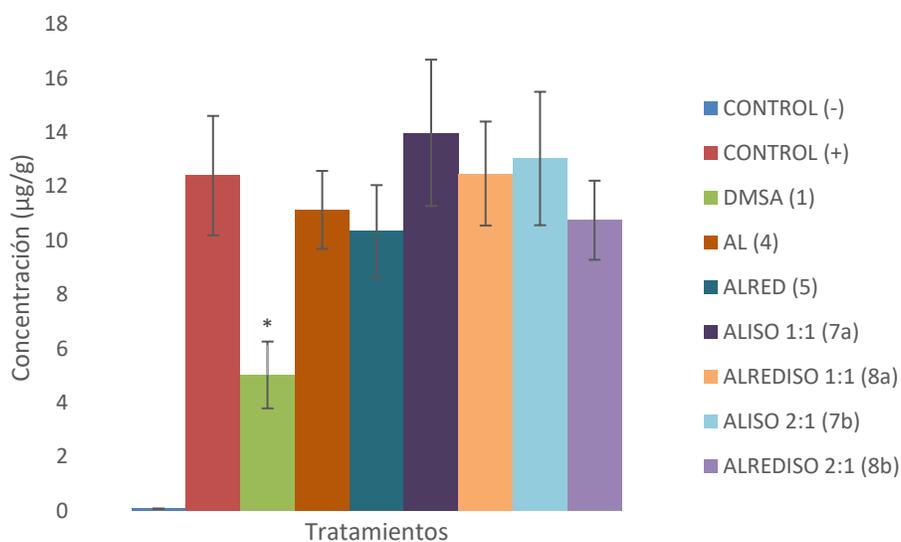


Figura 49. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 9.

El Gráfico 10, representa la concentración de plomo presente en el riñón de las ratas tratadas con los ésteres derivados del ácido lipoico y el isosorbide. Una vez más, se determina que este grupo de compuestos no presentó diferencia significativa con respecto al Control (+), comprobando así, que los compuestos no poseyeron la actividad quelante al menos en sangre, hígado y riñón. No obstante, la cuantificación de plomo en otros órganos, podría determinar si en definitivo no poseen la actividad o si en su defecto, no actúan en los órganos reportados en este trabajo. Por otro lado, el ácido lipoico reducido (5), tampoco tuvo actividad quelante en sangre y riñón, pero no incrementó la concentración del metal como en el caso del hígado. Asimismo, se observó que el DMSA (1), fue estadísticamente significativo con respecto al Control (+), en todas y cada una de las evaluaciones realizadas tanto en este grupo de compuestos como en los 1,3-ditiolanos, es decir, a las dosis empleadas logró remover el plomo del organismo.

Gráfico 10. Niveles de plomo en riñón de las ratas intoxicadas con plomo y tratadas con los ésteres, ácido lipoico y ácido lipoico reducido



La Figura 50, representa la prueba múltiple de Tukey para los resultados obtenidos en los niveles de plomo de la Tabla 15. Por un lado y como era de esperarse, el DMSA (1) presentó diferencia significativa con respecto al Control (+) y al resto de los compuestos evaluados al disminuir la concentración del plomo en el riñón con el esquema de tratamiento de 30 mg/kg en la primera semana y 15 mg/kg en la tercera semana. Por el otro lado, ningún otro compuesto de este grupo presentó diferencia estadísticamente significativa, lo cual indica que el organismo por sí mismo eliminará poco a poco el xenobiótico tóxico y que la presencia de los ésteres, al menos en la dosis empleada para esta evaluación no representa beneficio alguno. Por ende, es indispensable estudiar el comportamiento de esta serie de compuestos a dosis mayores, empleando otra proporción o mezcla de disolventes además de agua y etanol, para comprobar si no poseen la actividad.

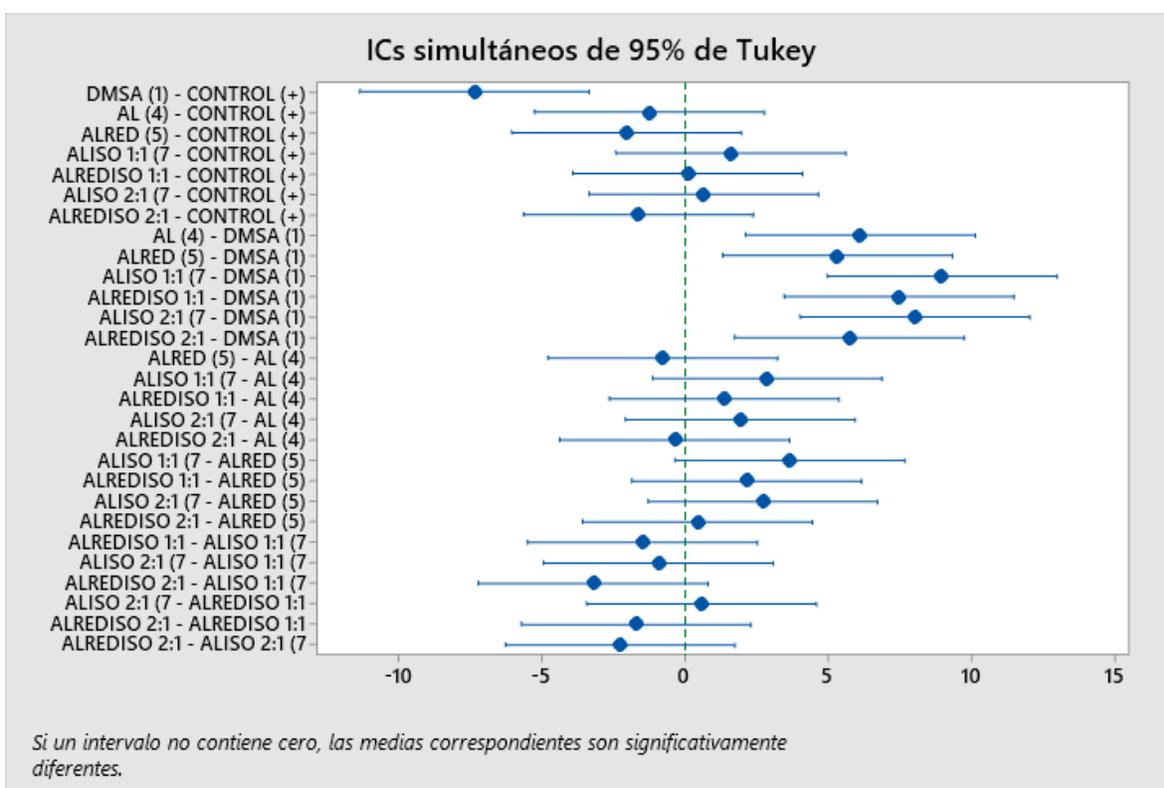


Figura 50. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los resultados obtenidos del Gráfico 10.

Capítulo 6 Conclusiones

Se sintetizaron nuevos compuestos derivados del DMSA, el ácido lipoico y el isosorbide que fueron evaluados como agentes quelantes en un modelo de intoxicación *in vivo* por plomo, determinando que los 1,3-ditiolanos (derivados del DMSA y aldehídos aromáticos), no disminuyeron la concentración de metal tóxico en torrente sanguíneo en comparación con el Control (+), pero sí lograron disminuir la concentración en el riñón e hígado en la misma proporción que el DMSA a las dosis evaluadas. Estos órganos son sumamente importantes para la recuperación del equilibrio del organismo que ha sido afectado por los efectos nocivos del plomo, por lo que este hallazgo resulta muy prometedor para futuras investigaciones.

En adición, se estableció que la ausencia del efecto quelante en los ésteres se atribuyó al hecho de su baja solubilidad en agua que conllevó a una baja concentración en el organismo que permitiera observar el efecto deseado. Además, se encontró que, de las moléculas adicionales estudiadas de cisteamina y cisteína, únicamente la segunda logró disminuir los niveles de plomo en el hígado y por ende, sería buen candidato para la síntesis de futuros compuestos.

Finalmente, se determinó que la actividad quelante del DMSA es dosis-dependiente, por lo que evaluar los derivados sintetizados de este compuesto a distintas dosis, proporcionará más información sobre su actividad quelante.

Perspectivas

- Determinar si los compuestos de interés poseen efecto quelante sobre metales esenciales;
- Determinar si los compuestos logran remover el plomo depositado en hueso que es el órgano con mayor concentración del catión tóxico;
- Establecer si el efecto quelante de los 1,3-ditiolanos es dependiente de la dosis y;
- Sintetizar y evaluar nuevos derivados del DMSA en combinación con el ácido lipoico y la cisteína;

Sección experimental

6.1 Material y equipo de laboratorio

6.1.1 Biológico

Ratas Wistar hembra y macho de 10-12 semanas de madurez con un peso mínimo de 200 ± 20 g, bajo condiciones estándar de laboratorio, ciclos luz-oscuridad de 12 h y una temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ aproximadamente.

6.1.2 Reactivos

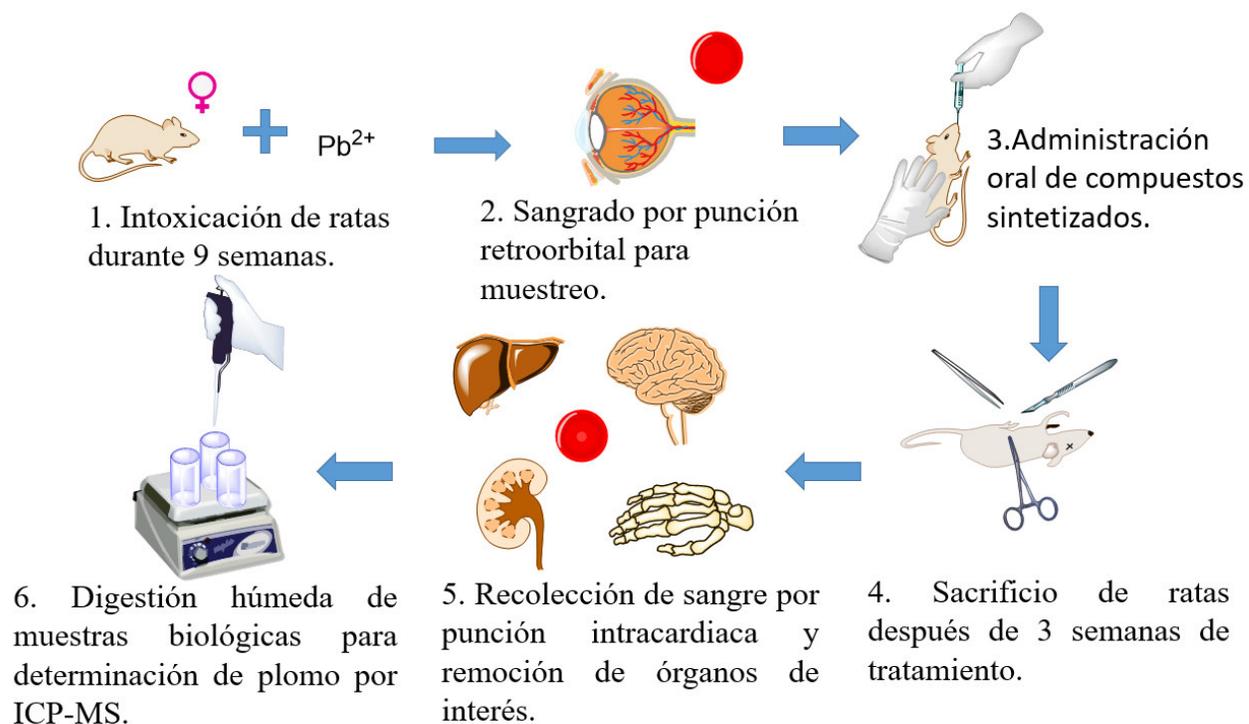
La mayoría de los reactivos empleados en el presente proyecto fueron adquiridos de la casa comercial Aldrich en caso contrario, se menciona la casa comercial correspondiente. Isosorbide, ácido lipoico, CDI, , DCC, DMAP, NaBH_4 , DMSA, H_2SO_4 , THF, CH_2Cl_2 , AcOEt (acetato de etilo), acetona, etanol, tolueno, bicarbonato de sodio, bisulfato de potasio, éter de petróleo, formaldehído, fosfato de sodio, carbonato de potasio, sulfato de sodio, H_2O destilada, cloruro de calcio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, DMSO deuterado (DMSO-d_6), cloroformo deuterado (CDCl_3), acetato de plomo trihidratado adquirido de casa comercial Merck, benzaldehído, 4-metoxibenzaldehído, 4-nitrobenzaldehído, 4-fluorobenzaldehído, L-cisteína, clorhidrato de cisteamina, pentobarbital, ácido nítrico ultrapuro, agua tipo I con resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ adquirida de un desionizador de agua de la casa comercial Merck, estándar de metales pesados en sangre, estándares y multielement para equipo de ICP-MS de la casa comercial Agilent, N_2 (gas) y Ar de ultra alta pureza adquirido de Infra.

6.1.3 Análisis estructural de las moléculas sintetizadas

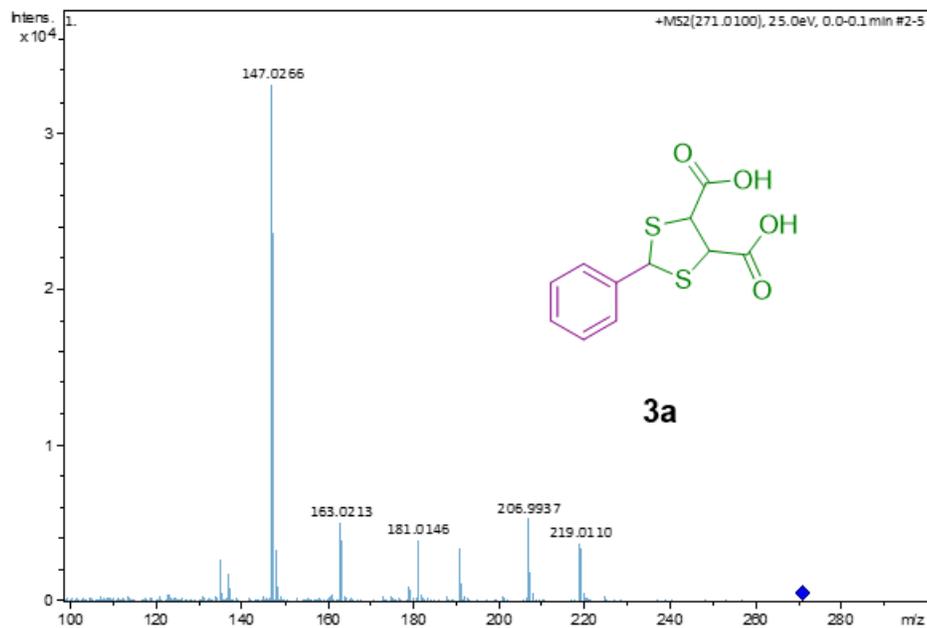
Para el análisis de RMN, las muestras se disolvieron en CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$ según sea el caso, los espectros fueron obtenidos empleando un espectrómetro modelo Bruker Avance III HD con un magneto Bruker Ultrashield de 500 MHz. Los desplazamientos químicos de protón fueron reportados en ppm a partir de tetrametilsilano.

Los estudios de masas se realizaron usando un espectrómetro Bruker-ESI-QTOF-MS, las muestras se analizaron en presencia de estearato de metilo como estándar interno.

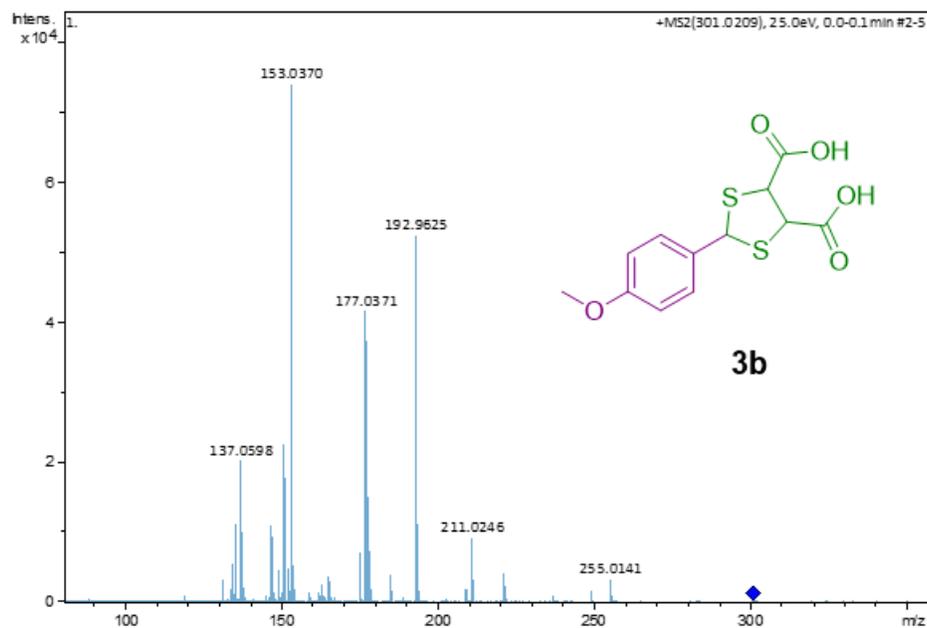
6.1.4 Procedimiento general de evaluación biológica



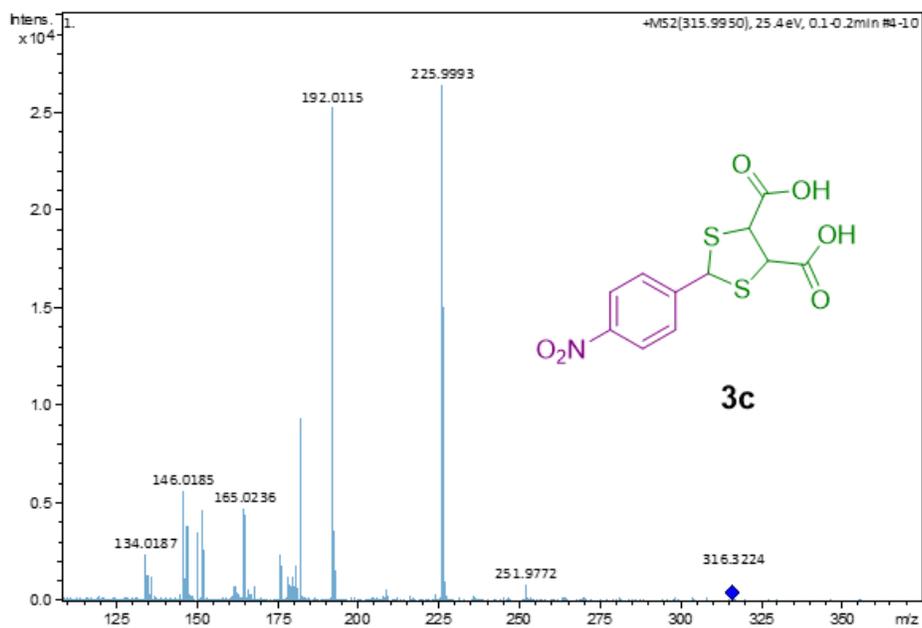
Anexos



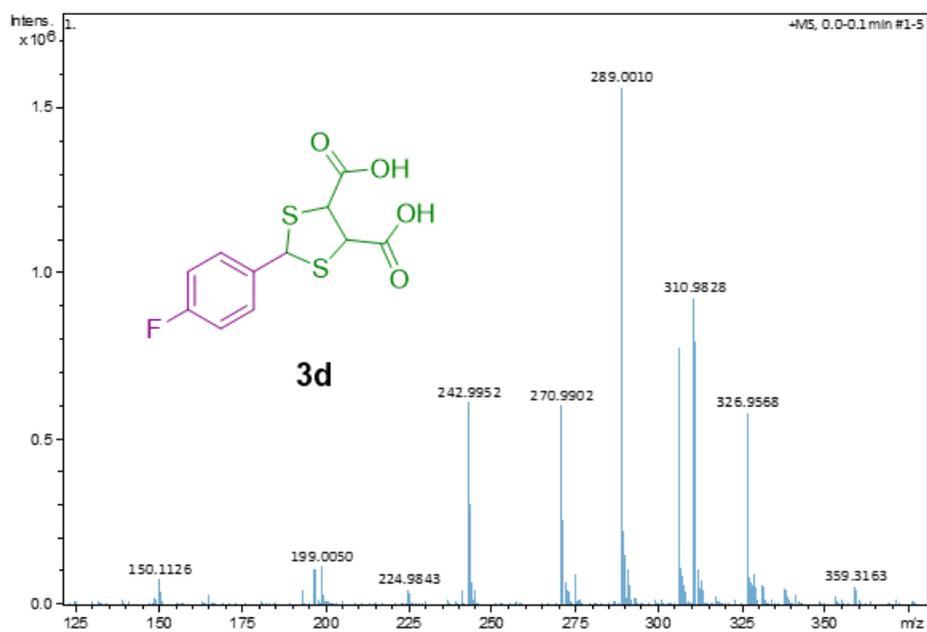
Cromatograma de ESI-MS 1. Compuesto **3a**, masa exacta 270.0021 g/mol.



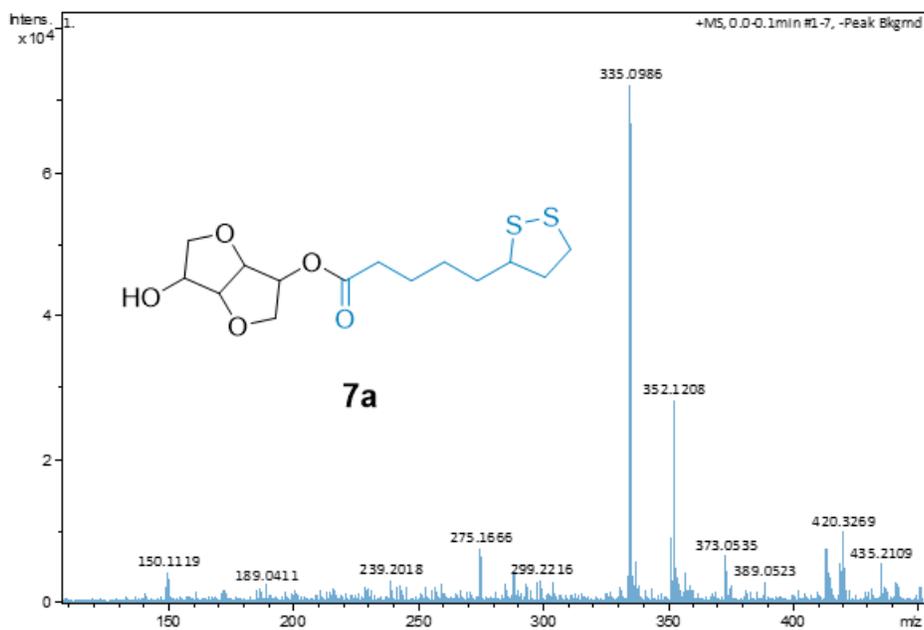
Cromatograma de ESI-MS 2. Compuesto **3b**, masa exacta 300.0126 g/mol.



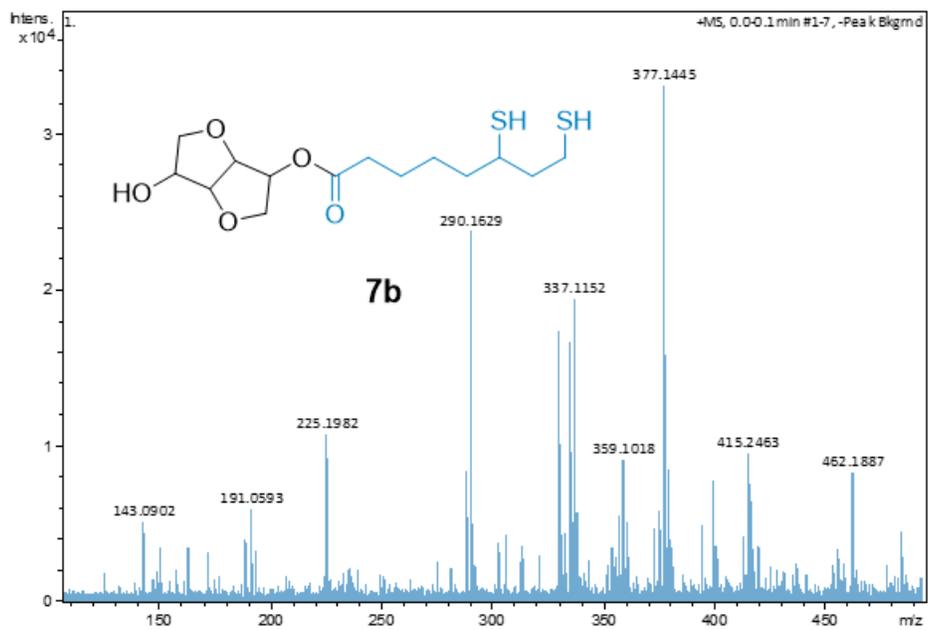
Cromatograma de ESI-MS 3. Compuesto **3c**, masa exacta 314.9871 g/mol.



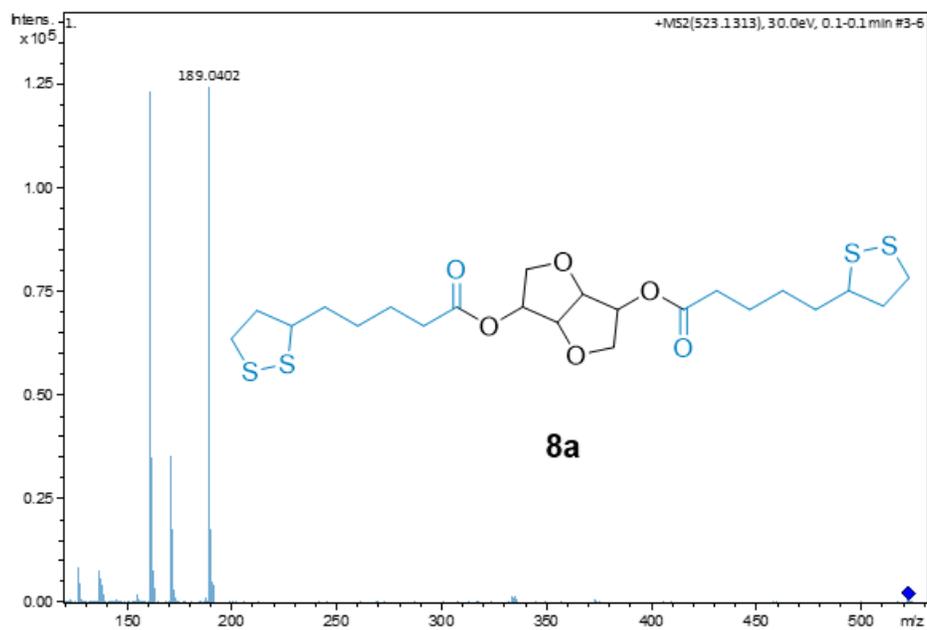
Cromatograma de ESI-MS 4. Compuesto **3d**, masa exacta 287.9926 g/mol.



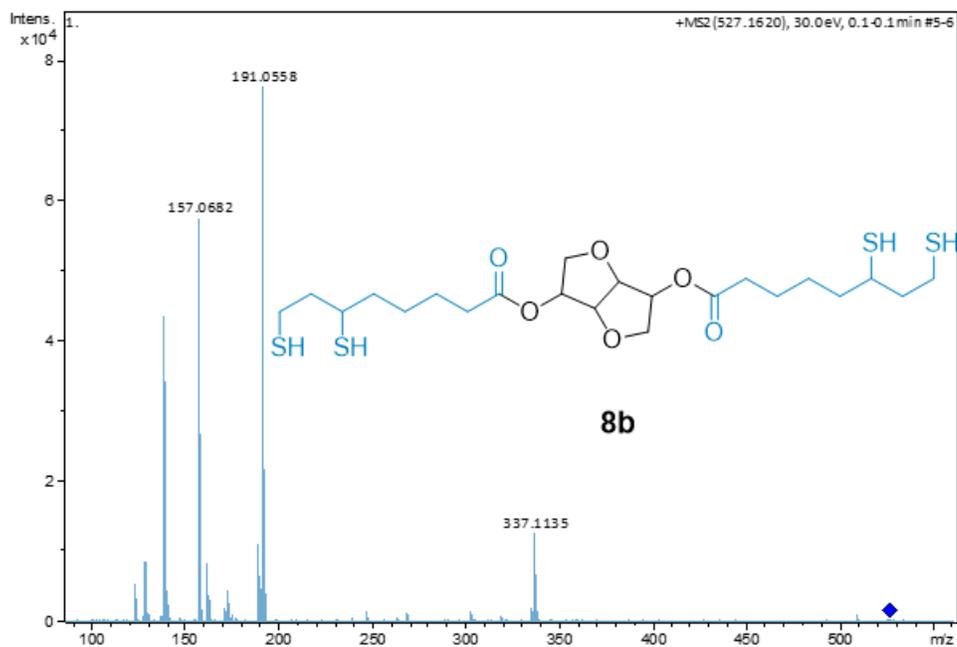
Cromatograma de ESI-MS 5. Compuesto **7a**, masa exacta 334.0909 g/mol.



Cromatograma de ESI-MS 6. Compuesto **7b**, masa exacta 336.1065 g/mol.



Cromatograma de ESI-MS 7. Compuesto **8a**, masa exacta 522.1238 g/mol.



Cromatograma de ESI-MS 8. Compuesto **8b**, masa exacta 526.1551 g/mol.