

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA Y EFECTOS ANTIMICROBIANOS DEL COMPLEJO DE Cu(II) CON METIMAZOL Y FENANTROLINA. PERFILES DE DISOLUCIÓN Y ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN SOLUCIÓN

Nora Urquiza¹, María Alejandra Moyano¹, María Soledad Islas², Juan J. Martínez Medina³, Maximiliano Diez³, Leonor L. López Tévez³, Silvia G. Manca¹, Patricia A.M. Williams², Evelina G. Ferrer².

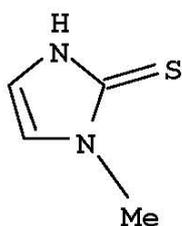
¹Cátedra de Química Analítica I, Instituto de Química Analítica, FBQyF-UNT, Ayacucho 471, 4000, San Miguel de Tucumán. Nurquiza @fbqf.unt.edu.ar

²Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, CONICET, UNLP), FCE-UNLP, C.C.962, 1900, La Plata, Argentina.

³Departamento de Química, UNCAUS, Cte. Fernández 755 (3700), Chaco, Argentina.

Introducción

Nuestro grupo de investigación viene desarrollando métodos de síntesis así como técnicas para estudiar potenciales aplicaciones biológicas de complejos derivados del fármaco antitiroideo metimazol (Figura).



Recientemente hemos preparado y caracterizado el complejo [Cu(Met)₂fen]Cl₂ (Met: metimazol, fen: fenantrolina)¹ y actualmente estudiamos sus potenciales aplicaciones biológicas. Presentaremos los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* sobre inhibición de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL), así como estudios relacionados a la actividad antimicrobiana, la estabilidad del complejo en solución y sus perfiles de disolución. La inhibición de enzimas por parte de complejos de coordinación es un reciente campo de

aplicación de los mismos y se relaciona al tratamiento de múltiples enfermedades², asimismo también son reconocidos los efectos antimicrobianos producidos por complejos de Cu(II)³.

Parte experimental

Ensayos antimicrobianos

La actividad antimicrobiana fue evaluada teniendo en cuenta la mínima concentración inhibitoria (MIC) en cinco cepas de bacterias procedentes de las colecciones de la ATCC: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12263) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Éstas se determinaron utilizando el método de dilución en agar. Los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfóxido acuoso 50% (DMSO).

Inhibición de la actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina

El método utilizado es espectrofotométrico. La reacción se inicia con el agregado del sustrato p-nitrofenilfosfato y la generación de p-nitrofenol por acción de la enzima se monitorea a 405 nm. Se trabaja en buffer (55 mM de glicina + 0.55 mM MgCl₂, pH=

10,4 y fuerza iónica KCl 1M a 37°C) y se mide el efecto inhibitorio de diferentes sustancias agregadas.

Ensayos de estabilidad

Se realiza la medida de la variación de su espectro UV-vis (agua y dimetilsulfóxido) a lo largo del tiempo monitoreando la banda de absorción electrónica d-d típica para el complejo de Cu(II).

Perfiles de disolución

Se siguió la metodología descrita en la farmacopea americana (USP 30/NF 2007). Se preparó una mezcla homogénea con 20 mg del complejo y 130 mg de Lactosa anhidra (excipiente), para llenar cápsulas de gelatina N° 3. Las cápsulas se introducen en los vasos del aparato de disolución, que contienen 900 mL de agua destilada a una temperatura de 37 °C. Se hacen girar a 100 rpm. Se extraen 10 ml de cada vaso a 5'; 10'; 20'; 30',40',50' y 60' y se filtran. A posteriori se toma 1mL de cada muestra filtrada y se diluyen a 25 ml con el medio de disolución empleado en cada caso.

Resultados y discusión

Los ensayos *in vitro* fueron hechos en comparación con las actividades presentadas por cada uno de los ligandos que forman parte del complejo, como del conocido complejo de cobre con fenantrolina así como con los complejos de cobre con metimazol y cobre con metimazol y fenantrolina. Los ensayos de estabilidad dan cuenta tanto en solución acuosa como en DMSO que el complejo es estable en ambos medios.

Ensayos antimicrobianos

Los resultados obtenidos para los ensayos MICs son los que se muestran en la tabla siguiente:

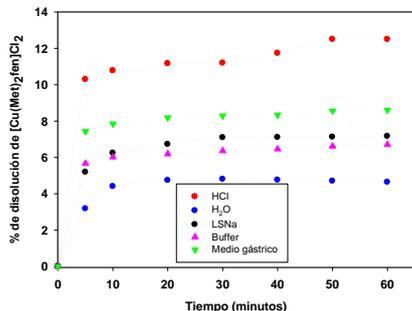
Tabla. Valores de MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para $[\text{Cu}(\text{fen})_2\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{Met})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$, metimazol, fenantrolina y CuCl_2 .

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
CuCl_2	375	375	375	375	375
Fen	12	375	24	12	94
Metimazol	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
$[\text{Cu}(\text{fen})_2\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	47	187	24	24	12
$[\text{Cu}(\text{Met})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	750	750	750	750	750
$[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$	375	375	94	94	47

Tanto el CuCl_2 como la fenantrolina se comportan según datos reportados anteriormente. Para $[\text{Cu}(\text{fen})_2\text{Cl}]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ existe una potenciación de la efectividad sobre *P. aeruginosa* y *E. faecalis* por formación del complejo. Metimazol carece de actividad y el complejo $[\text{Cu}(\text{Met})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ mejora la actividad por complejación. Para $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$ también se observa este efecto superando incluso al presentado por fenantrolina para el caso de *E. faecalis*.

Perfiles de disolución

En la figura se muestran los perfiles de disolución para el complejo $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$ en los diferentes medios utilizados.



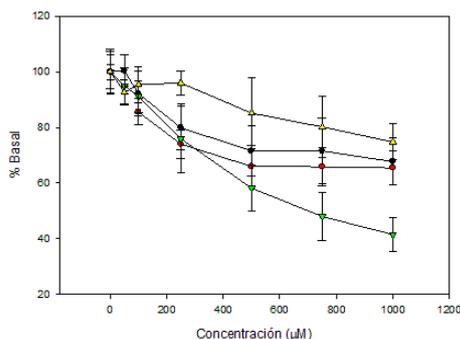
A 100 rpm, con todos los disolventes empleados el % de disolución se incrementa con el tiempo hasta alcanzar una asíntota donde dicho % se mantiene constante (equilibrio termodinámico).

El mayor % de disolución de este complejo se alcanza empleando como disolvente HCl, produciéndose el equilibrio termodinámico entre los 40 y 60 minutos.

Se puede observar en la gráfica, que la solubilidad del complejo ternario estudiado es prácticamente similar cuando se utiliza Laurilsulfato de sodio y solución buffer; y que el menor % de disolución se produce en un medio acuoso.

Inhibición de la actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina

La Figura muestra los efectos sobre la enzima producidos por los compuestos estudiados. Los mayores efectos inhibitorios se presentan a la mayor concentración estudiada. El efecto de la fenantrolina es conocido y es debido a la complejación del Zn del sitio activo de la enzima. Ningún complejo inhibe en un 50% la acción de enzima, sin embargo se observa para $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$ un efecto similar al $[\text{Cu}(\text{fen})_2\text{Cl}]\text{ClH}_2\text{O}$.



Inhibición de FAL.

- ▲ CuCl₂
- $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$
- $[\text{Cu}(\text{fen})_2\text{Cl}]\text{ClH}_2\text{O}$
- ▼ Fen

Conclusiones

Se puede concluir que el complejo $[\text{Cu}(\text{Met})_2\text{fen}]\text{Cl}_2$ es estable tanto en solución acuosa como en DMSO, y su perfil de disolución indica que el mejor medio es el HCl; presenta actividad antimicrobiana especialmente frente a *E. faecalis* en el que posee mayor actividad que los ligandos y el metal por separado y produce inhibición sobre FAL.

Referencias

- ¹ XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal, N. M. Urquiza, S. G. Manca, L. Lezama, T. Rojo, E.G. FerrerLanús, 13-16 septiembre 2010.
- ² A.Y. Louie, T.J. Meade, Chem. Rev. 99 (1999) 2711-2734.
- ³ O. Podunavac-Kuzmanović, S. L. Markov, L. S. Vojinovi, APTEFF (2004) 35:247-254