

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Equipo utilizado

Equipo disponible en el laboratorio de análisis instrumental y en el laboratorio de electroquímica de la UDLA, Puebla.

- Espectrofotómetro de UV-Visible Varian Cary 100 Conc.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo FT-IR Varian Scimitar, con detector ATR.
- Aparato Fisher Johns para punto de fusión (°C).

Equipo disponible en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM.

- Difractómetro de Rayos-X de monocristal BRUKER P4 con cámara CCD.
- Espectrómetro de masas de alta resolución.

4.2 Reactivos

- Ácido meclofenámico, sal sódica.
- Cloruro de cadmio pentahemihidratado - $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.
- Nitrato de Plomo(II) – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.
- Cloruro de cromo – $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de Cobre dihidratado – $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de Cobalto hexahidratado – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Sulfato de Zinc heptahidratado – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Agua bidestilada.
- Metanol grado reactivo.
- Dimetilformamida grado reactivo.
- Acetona grado reactivo.
- Cloroformo deuterado.

Todas las sustancias y solventes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich grado analítico o reactivo y no fueron purificados posteriormente.

4.3 Procedimiento general de síntesis de complejos metal-ácido meclofenámico

En un vaso de precipitados de 50 mL seco conteniendo 25 mL de metanol y 2 mL de H₂O bidestilada se adicionaron 100 mg de la sal sódica del ácido meclofenámico (3.14×10^{-4} mol). La solución se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos y a continuación se adicionó la sal metálica a diferentes cantidades estequiométricas [1.57×10^{-4} mol para metales que trabajan con valencia (II) y 1.05×10^{-4} para los que trabajan con valencia (III)] disuelta en un volumen total de 4 mL de una mezcla metanol-agua 1:1. Lo anterior fue realizado bajo el siguiente esquema:

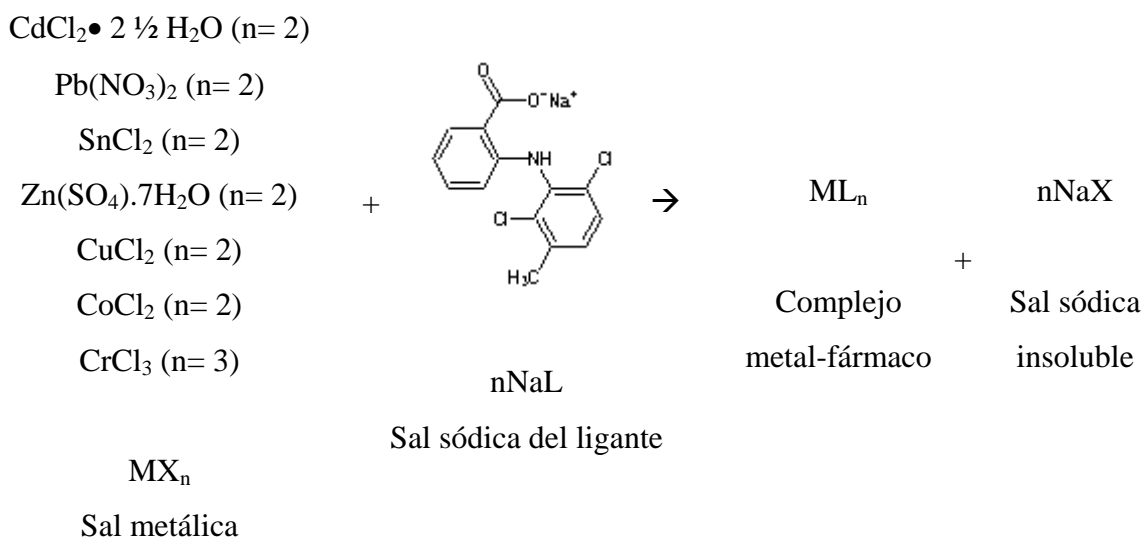


Figura 16. Reacción general de síntesis de complejos metal-ácido meclofenámico

Las mezclas para la obtención de todos los complejos se dejaron reaccionando aproximadamente 90 minutos bajo agitación constante. Posteriormente se detuvo la agitación y todas las soluciones fueron filtradas por gravedad y el solvente recuperado fue

colocado en un matraz Erlenmeyer de 50 mL para favorecer una evaporación lenta. El matraz fue cubierto con papel aluminio para evitar la entrada de luz y se dejó evaporar el solvente aproximadamente dos semanas para favorecer la formación de cristales. Después de ese tiempo, se filtraron y se dejaron secar los precipitados y/o los cristales obtenidos. En el caso de obtener microcristales y/o sólidos amorfos se recrystalizaron, de ser posible, en dimetilformamida. Finalmente, los productos obtenidos fueron colectados, pesados y almacenados para su posterior caracterización.

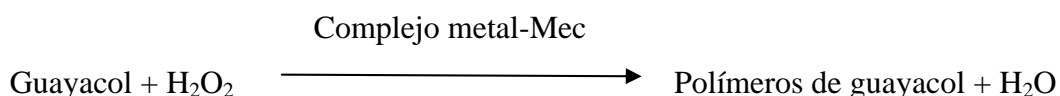
Para el caso de la reacción de obtención del complejo meclofenamato de cobre monometálico, el sólido amorfo obtenido en el procedimiento de síntesis anterior, fue resuspendido en aproximadamente 20 mL de metanol. Posteriormente se adicionó la cantidad necesaria de piridina para solubilizar totalmente el sólido suspendido, y la suspensión se mantuvo en agitación hasta la solubilización total del compuesto. Es importante mencionar, que el producto obtenido de la reacción directa del CuCl_2 con el meclofenamato sódico fue recrystalizado por evaporación lenta del solvente en 3 mL de dimetilformamida.

4.4 Caracterización de los productos

Los productos obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja (IR, $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) y por espectroscopia ultravioleta visible. En el caso de los productos obtenidos de la reacción del meclofenamato sódico con CdCl_2 , CuCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y ZnSO_4 , éstos fueron caracterizados por difracción de rayos X, y los productos de la reacción con CdCl_2 y CuCl_2 fueron caracterizados por espectrometría de masas. Los puntos de fusión fueron obtenidos en un aparato Fisher Johns ($^{\circ}\text{C}$) y no fueron corregidos.

4.5 Estudio cinético de los complejos metal-ácido meclofenámico

Se determinó la actividad peroxidasa de los siete complejos obtenidos en presencia de peróxido de hidrógeno, guayacol y acetona como solvente. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS a $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ según la metodología empleada por Sánchez-Gaytán [2005], de acuerdo a la siguiente reacción:



La determinación de dicha actividad se logró mediante la detección del producto de la polimerización oxidativa del guayacol, del cual el tetraguayacol de color anaranjado es el primer producto colorimétricamente identificable. Inicialmente, todos los complejos fueron disueltos en cantidades estequiométricas equivalentes a 7 mg de las sales metálicas parentales en 1 mL de acetona (tabla 1), y posteriormente fueron adicionados a la solución de 7 mL de acetona conteniendo disueltos 25 μL de guayacol y 100 μL de peróxido de hidrógeno. Posteriormente fue elaborada y analizada una fracción de esa mezcla en un espectrofotómetro UV-VIS Varian Cary 100 Conc., para detectar la formación del polímero de guayacol, que fue observada en un rango comprendido entre 316 y 340 nm.

Tabla 1. Cantidades de complejo empleadas para la determinación de la formación del polímero de guayacol

Complejo	Fórmula	Cantidad empleada (mg)	Moles de compuesto
Meclofenamato de Cadmio	$[\text{Cd}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet (\text{MeOH})]_2$	63	3.86×10^{-5}
Meclofenamato de Plomo	$[\text{Pb}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]_n$	16.8	2.06×10^{-5}
Meclofenamato de Cobalto	$[\text{Co}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]$	19.6	2.86×10^{-5}
Meclofenamato de Cromo	$[\text{Cr}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_3]$	24.5	2.61×10^{-5}
Meclofenamato de zinc	$[\text{Zn}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]$	16.8	2.43×10^{-5}
Meclofenamato de cobre bimetálico	$[\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2]$	53.2	3.80×10^{-5}

Uno de los primeros parámetros a analizar fue la concentración de los complejos más adecuada para realizar el análisis cinético. Esto se hizo mediante un estudio en el que se varió la concentración de uno de los reactivos (guayacol o los complejos) y manteniendo constantes las concentraciones de los otros dos.

Al detectar la formación del polímero de guayacol en el caso de los complejos de cobre bimetálico, cromo y cobalto en el espectrofotómetro UV-Visible, en un rango comprendido entre 316 y 340 nm (en la sección de resultados y discusión se explicará por qué se emplearon estos complejos), se ajustaron las concentraciones de cada complejo a 28 mg/mL (4.09×10^{-5} mol) en el caso del complejo de cobalto, 35 mg/mL en el caso del complejo de cromo (3.73×10^{-5} mol) y 4 mg en el caso del complejo de cobre bimetálico (5.78×10^{-6} mol), que fue aplicado sin ser solubilizado. Los complejos solubilizados de cobalto y cromo fueron aplicados en cantidades de 75 y 100 μ L a una solución de 7 mL de acetona conteniendo 25 μ L de guayacol y 100 μ L de peróxido de hidrógeno y la reacción fue monitoreada cada 10 segundos durante tres minutos en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D.

Los datos obtenidos del espectrofotómetro (en valores de % de transmitancia o %T) fueron convertidos a absorbancia por medio de la relación $A = -\log(\%T)$; debido a que se deseó determinar el orden de la reacción de cada uno de los complejos como catalizadores, se ajustaron los datos a las ecuaciones de velocidad de reacción para primero y segundo orden [Mathews, Van Holde y Ahern, 2002].

4.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de complejos metal-ácido meclofenámico

La actividad antimicrobiana se determinó empleando cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), mediante un sistema de diluciones de los compuestos sintetizados, el fármaco y las sales metálicas empleadas. Se disolvieron 10 mg de cada una de las sales metálicas parentales (CdCl_2 , CrCl_3 , CoCl_2 , CuCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, SnCl_2 , ZnSO_4) y del meclofenamato sódico en 1 mL de agua y se hicieron diluciones hasta 10^{-4} de las sales disueltas. Después se aplicaron 20 μ L de todas las soluciones a 8 discos de papel filtro

Whatman No. 5. Los discos se dejaron secar y posteriormente fueron esterilizados en autoclave. Se realizó el mismo procedimiento con los complejos, sin embargo, éstos fueron disueltos en 1 mL de acetona y la cantidad disuelta fue el equivalente estequiométrico de la cantidad de metal contenida en las sales metálicas parentales (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades empleadas para la determinación de la actividad antimicrobiana

Complejo	Fórmula	Cantidad empleada (mg/mL)	Moles de compuesto
Meclofenamato de Cadmio	$[\text{Cd}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 (\text{MeOH})]_2$	90	5.53×10^{-5}
Meclofenamato de Plomo	$[\text{Pb}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})]_n$	24	2.94×10^{-5}
Meclofenamato de Cobalto	$[\text{Co}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$	28	4.09×10^{-5}
Meclofenamato de Cromo	$[\text{Cr}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_3]$	35	3.73×10^{-5}
Meclofenamato de zinc	$[\text{Zn}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$	24	3.47×10^{-5}
Meclofenamato de cobre bimetálico	$[\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2]_2$	76	5.42×10^{-5}

Posteriormente, dos de los discos impregnados con las soluciones de sales metálicas, de meclofenamato sódico y de los complejos, fueron colocados en placas de agar Mueller-Himton de acuerdo a la dilución (figura 17). Las placas fueron sembradas previamente con las cepas antes mencionadas de acuerdo a la técnica empleada para la determinación de sensibilidad a antibióticos por difusión con discos propuesta por Bauer-Kirby ajustando la cantidad de inóculo al estándar 0.5 McFarland (Ver apéndice E) [Koneman *et al*, 1999].

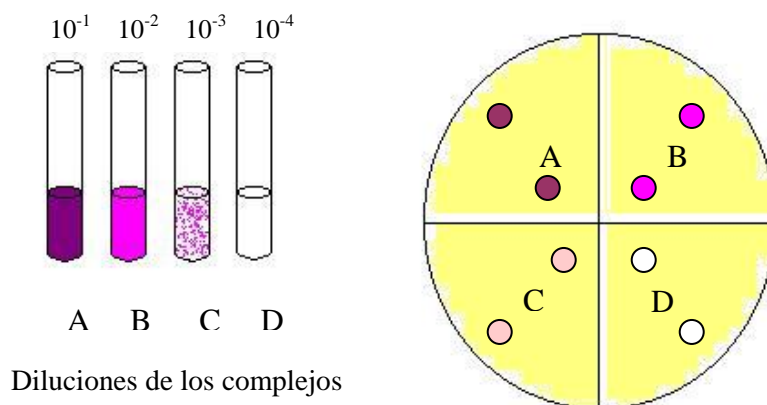


Figura 17. Esquema general de la realización de la prueba de sensibilidad por difusión con discos [Koneman *et al*, 1999]

Finalmente, se realizó una prueba de macrodilución en caldo preparando suspensiones bacterianas en 5 mL de caldo nutritivo con las mismas cepas empleadas anteriormente y que resultaron positivas a la prueba de inhibición de crecimiento con discos. Dichas cepas fueron ajustadas al estándar 1 McFarland. Se disolvieron las mismas cantidades de sales metálicas, meclofenamato sódico y complejos metal-fármaco en 1 mL de agua y acetona (sólo complejos) a excepción del meclofenamato de cobre bimetálico, del cual se disolvieron 30 mg del compuesto en 1 mL de acetona. Además, se aplicaron diferentes cantidades en microlitros de acetona a las suspensiones bacterianas (Tabla 3) para evaluar la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de dichas cepas (técnica CMI) y de esta forma la actividad antimicrobiana. Es importante mencionar que en el caso de las sales metálicas de CdCl_2 y CrCl_3 se agregaron las cantidades de la solución preparada desde 200 hasta de 900 μL ya que en un sondeo inicial las cantidades en microlitros de las soluciones con dichas sales que se aplicaron a las bacterias que mostraron sensibilidad fueron las mismas que las empleadas en el caso de los complejos metal-fármaco y no provocaron inhibición de crecimiento, por esa razón la cantidad en microlitros empleada debía ser mayor a 200 μL .

Es importante mencionar que se elaboró un experimento control con todas las cepas de microorganismos empleados en el estudio aplicando cantidades de acetona desde 500 hasta 3.25 μL para descartar la posible actividad tóxica de dicho solvente sobre las mismas.

La actividad antimicrobiana se determinó observando y midiendo el tamaño del halo de inhibición de crecimiento, además de la determinación de la CMI, observando el tubo en el que el crecimiento bacteriano fuera totalmente inhibido por el compuesto aplicado [Koneman *et al*, 1999].

Tabla 3. Cantidades de los compuestos disueltas en acetona

	300 μ L	200 μ L	100 μ L	50 μ L	25 μ L	12.5 μ L	6.5 μ L	3.2 μ L
Meclofenamato de	27 mg	18 mg	9 mg	4.50 mg	2.25 mg	1.13 mg	0.59 mg	0.29 mg
Cadmio	(1.65 x	(1.11 x	(5.52 x	(2.76 x	(1.38 x	(6.94 x	(3.62 x	(1.78 x
[Cd(C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂) ₂	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
(MeOH)] ₂	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)
Meclofenamato de	7.20 mg	4.80 mg	2.40 mg	1.20 mg	0.60 mg	0.30 mg	0.16 mg	0.08 mg
Plomo	(8.83 x	(5.88 x	(2.94 x	(1.47 x	(7.35 x	(3.67 x	(1.96 x	(9.81 x
[Pb(C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂) ₂ •	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
H ₂ O] _n	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)
Meclofenamato de	8.40 mg	5.60 mg	2.80 mg	1.40 mg	0.70 mg	0.35 mg	0.18 mg	0.09 mg
Cobalto	(1.22 x	(8.17 x	(4.09 x	(2.04 x	(1.02 x	(5.11 x	(2.62 x	(1.31 x
[Co(C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂) ₂	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
•2H ₂ O]	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)
Meclofenamato de	7.20 mg	4.80 mg	2.40 mg	1.20 mg	0.60 mg	0.30 mg	0.16 mg	0.08 mg
zinc	(1.04 x	(6.94 x	(3.47 x	(1.74 x	(8.67 x	(4.33 x	(2.31 x	1.16 x
[Zn(C ₁₄ H ₁₀ NO ₂ Cl ₂) ₂	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
•2H ₂ O]	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)
Meclofenamato de	9.00 mg	6.00 mg	3.00 mg	1.50 mg	0.75 mg	0.38 mg	0.20 mg	0.10 mg
cobre bimetálico	(6.42 x	(4.28 x	(2.14 x	(1.07 x	(5.35 x	(2.71 x	(1.42 x	(7.14 x
[Cu(C ₁₄ NO ₂	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Cl ₂) ₂]	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)	moles)

4.7 Determinación de la actividad hemolítica de complejos metal-ácido meclofenámico

Se determinó la actividad hemolítica de los compuestos sintetizados mediante la exposición de eritrocitos en gelosa sangre a soluciones con los complejos a diferentes concentraciones. El procedimiento fue similar al empleado en las pruebas de sensibilidad con discos, pero se solubilizaron 5 mg de las sales metálicas y del meclofenamato sódico en 1 mL de agua. Las cantidades solubilizadas en 1 mL de acetona (equivalentes estequiométricos) de los complejos metal-fármaco sintetizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de complejo empleada en la evaluación de actividad hemolítica *in vitro*

Complejo	Fórmula	Cantidad empleada (mg/mL)	Moles de compuesto
Meclofenamato de Cadmio	$[\text{Cd}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet (\text{MeOH})]_2$	45.0	2.76×10^{-5}
Meclofenamato de Plomo	$[\text{Pb}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]_n$	12.0	1.47×10^{-5}
Meclofenamato de Cobalto	$[\text{Co}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]$	14.0	2.04×10^{-5}
Meclofenamato de Cromo	$[\text{Cr}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_3]$	17.5	1.86×10^{-5}
Meclofenamato de zinc	$[\text{Zn}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}]$	12.0	1.73×10^{-5}
Meclofenamato de cobre bimetálico	$[\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}_2)_2]_2$	38.0	2.71×10^{-5}

En el caso del complejo de cobre monometálico, se aplicaron 23.5 mg de éste (equivalente estequiométrico a 5 mg de cloruro de cobre) sobre la superficie de la placa.

En otro experimento se elaboró una curva de calibración para actividad hemolítica variando las cantidades de eritrocitos lavados, de solución salina isotónica (SSI) y de agua. Los datos de absorbancia y los porcentajes de hemólisis son representados en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentajes estándar de hemólisis (valores para curva de calibración)

Suspensión de eritrocitos	Absorbancia (nm)	Porcentaje de hemólisis
0.25 mL de eritrocitos lavados + 4.75 mL de SSI	0.282	0%
0.025 mL de eritrocitos lavados + 4.975 mL de agua	0.288	10%
0.0625 mL de eritrocitos lavados + 4.9375 mL de agua	0.305	25%
0.125 mL de eritrocitos lavados + 4.875 mL de agua	0.319	50%
0.25 mL de eritrocitos lavados + 4.75 mL de agua	0.382	100%

Además de lo anterior, se aplicaron 10 μL de las sales metálicas disueltas en agua de acuerdo a las cantidades disueltas en 1 mL como se muestra en la tabla 4. Se hizo lo mismo con los complejos, pero con 10 μL de acetona. Cada uno de los compuestos empleados fue aplicado a 0.25 mL de sangre previamente lavada y suspendida en 4.75 mL de SSI. La mezcla resultante fue incubada durante 24 horas y posteriormente fue centrifugada y el sobrenadante observado en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D, para determinar el porcentaje de hemólisis de acuerdo a la curva de calibración previamente descrita. Para descartar el posible efecto hemolítico de la acetona sobre la suspensión de

eritrocitos, se probó un control únicamente con 10 μ L de acetona que fueron aplicados sobre la misma.

Posteriormente se realizó otro experimento en el que se aplicaron las mismas cantidades de sales y de compuestos (solubilizadas y suspendidas en SSI, respectivamente) listadas en la tabla 4, a una suspensión de eritrocitos lavados en SSI y de eritrocitos sin lavar mantenida con anticoagulante (en este caso EDTA). La suspensión resultante se dejó en incubación durante 24 horas y posteriormente se centrifugó y el sobrenadante fue extraído para su análisis en el espectrofotómetro.