

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE COMPLEJOS COBRE(II)-METFORMINA Y SU INTERACCIÓN CON HALUROS PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN DIABETES II

Mónica Alejandra Valtierra-Alvarado¹, María del Refugio González-Ponce² y José de Jesús Nezahualcóyotl Segoviano-Garfias.²

RESUMEN

La metformina es un fármaco oral de primera opción para el tratamiento de diabetes II. Esta es capaz de formar complejos de coordinación con algunos iones metálicos, especialmente con Cu(II). Este complejo puede modificar la función farmacológica de la metformina. Con el fin de evaluar in vitro, la formación y estabilidad de los complejos cobre(II)-metformina y su interacción con haluros, a través de un método espectrofotométrico, se llevó a cabo la determinación de constantes de formación de las especies generadas en disolución de metanol. En éste estudio, se obtuvieron los valores de las constantes de formación de los complejos $[\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$ con un valor de $\log\beta_{110}=4.44\pm 0.01$, $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Cl}]^{1+}$ con $\log\beta_{111}=8.88\pm 0.01$ y $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Br}]^{1+}$ con $\log\beta_{111}=9.62\pm 0.02$, observando que las especies cobre(II)-metformina-haluro son más estables.

PALABRAS CLAVE

Complejos cobre (II), Metformina, Metalofármacos.

¹Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas (Campus UAZ Siglo XXI), Carretera Guadalajara km.6 Sin No, Ejido la Escondida, Zacatecas, Zac.98160, México.

²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI), Carretera Irapuato-Silao km. 12.5, Irapuato, Gto. 36821, México. jesus.nezahualcoyotl@itesi.edu.mx

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la diabetes mellitus II o no insulino dependiente es uno de los trastornos más ampliamente difundidos y graves, siendo la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial. En México, a partir del 2000, la diabetes es considerada la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres. El número de personas que sufren de diabetes mellitus, a nivel mundial, se encuentra por encima de 300 millones y un gran porcentaje de ellos corresponde a pacientes de diabetes mellitus II.

Metformina (dimetilbiguanida) es el hipoglucemiante oral de primera opción recomendada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. Su historia puede remontarse al uso de *Galega officinalis* (rica en guanidina) como una medicina herbaria en Europa Medieval. La primera síntesis de metformina es atribuida a Werner y Bell, en 1922. Posteriormente el trabajo del profesor Stern, llevó al descubrimiento de metformina como un agente antidiabético en la década de 1950. La metformina reduce el nivel de glucosa en sangre al suprimir su producción hepática y potencializando su captación periférica, además disminuye la absorción intestinal de glucosa y reduce la resistencia insulínica.

Por otra parte, el cobre se encuentra presente en el organismo en 100 a 150mg. El 90% se encuentra en músculos, huesos e hígado. Es parte del cofactor para muchas enzimas, como la superóxidodismutasa y diversas enzimas presentes también en mitocondrias. Estudios recientes señalan que el cobre mitocondrial es secuestrado por la metformina, y que en realidad los efectos celulares son generados por la especie. Un mecanismo sugerido es que inhibe al complejo I mitocondrial, afectando la cadena respiratoria. Sin embargo, el mecanismo preciso no se ha establecido. Considerando esto, la metformina puede actuar en células, quizás como un metalofármaco. Es por lo anterior, que el presente estudio incluye un método espectrofotométrico para la determinación de formación de complejos cobre-metformina, con el objetivo de evaluar in vitro, la formación y estabilidad de los complejos formados y su interacción con haluros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Metanol grado HPLC (Fermont, México) fue utilizado como disolvente para determinar la estabilidad del complejo Cobre(II)-metformina, así como para la extracción de metformina a partir de tabletas PreDial (Silanes, México). $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, cloruro de sodio y bromuro de sodio (Fermont, México) se utilizaron para la preparación de disoluciones. Los espectros se obtuvieron utilizando un equipo UV/Vis Cary 50 a una temperatura ambiente de 25°C usando una celda de cuarzo de 1.0 cm. El intervalo de longitudes de onda medido para todos los estudios espectrofotométricos fue de 200-800nm, observando los máximos cambios entre 250 a 350nm, siendo éste último, el intervalo

estudiado para la mayoría de los experimentos. Todos los datos se procesaron en el programa HypSpec.

Extracción y cristalización de metformina

Tabletas de metformina se trituran en mortero, y se homogeneizan en metanol. La disolución se filtra al vacío y el filtrado se almacena en refrigeración hasta la obtención de los cristales, los cuales se extraen con filtración al vacío.

Determinación de Coeficiente de extinción molar de la Metformina

Para el experimento se prepara una disolución stock de metformina de 0.00009M. Las concentraciones de metformina son variadas de 1×10^{-5} M a 9×10^{-5} M. Un total de 10 puntos se utilizan para la obtención del coeficiente de extinción.

Estudio de estabilidad de complejo Cobre II- Metformina

El experimento se realiza utilizando dos diferentes soluciones stock de metformina (0.00371M y 0.00457M). Las concentraciones de metformina son variadas de 0.00004M a 0.00074M y 0.00006M a 0.00124M respectivamente, en cada experimento. Se utilizan dos soluciones stock de $\text{Cu}(\text{NO})_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ de 0.00210M y 0.00348M. La concentración final de $\text{Cu}(\text{NO})_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ se mantiene constante de 0.00021M y 0.00035M para cada experimento. Un total de 39 espectros se utilizan para el refinamiento en HypSpec.

Estudio de estabilidad de complejo Cobre II- Metformina-Cloro y Cobre II- Metformina-Bromo

Para este sistema dos soluciones stock de metformina (0.00223M y 0.00372M), $\text{Cu}(\text{NO})_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (0.00206M y 0.00344M) y cloruro de sodio o bromuro de sodio (0.00125M y 0.00202M) se preparan. Para ambos experimentos la concentración final de cobre se mantiene constante de 0.00021M y 0.00034M y la de metformina de 0.00022M y 0.00037M, respectivamente. Las concentraciones de cloruro y bromuro se varían de 0.00001M a 0.00025M y 0.00002M a 0.00044M, respectivamente para cada experimento. Un total de 39 espectros se utilizan para el refinamiento en HypSpec.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las determinaciones de equilibrio de este estudio, es necesario evitar la fuerza iónica, porque a medida que aumenta la fuerza iónica, se produce la precipitación de los complejos cobre.

Determinación de Coeficiente de extinción molar de la Metformina

La absorción máxima de metformina fue detectada a 236nm y el coeficiente de extinción (ϵ) del fármaco fue determinado usando la Ley de Beer-Lambert. El coeficiente de extinción de metformina a 236nm es de 11493 L·mol⁻¹·cm⁻¹ con una R² de 0.998.

Constante de formación de los complejos cobre (II)-metformina y cobre (II)-metformina-halógeno

Hasta donde sabemos, no existen otros estudios reportados acerca de determinaciones de equilibrio para este sistema en metanol u otros disolventes, por lo que no pueden ser comparados con valores de la literatura. Los espectros de absorción de soluciones en metanol de cobre (II)-metformina son presentados en la Fig.1a, en el cual para este sistema, se observa que al incrementar la concentración de metformina aparece un efecto hipercrómico. La determinación de la constante de formación β_{110} , correspondiente al equilibrio entre Cu²⁺ y metformina, se realizó mediante el procesamiento de todos los espectros obtenidos de los dos experimentos a dos concentraciones diferentes de forma simultánea. Los resultados obtenidos muestran solamente la formación de un complejo *mono*, el [Cu(metf)]²⁺, a diferencia de otros estudios que reportan la formación de un complejo *bis* en soluciones acuosas. La existencia solamente del complejo *mono* posiblemente se pueda explicar por el carácter nucleófilo del metanol, debido a que la metformina tendría que competir con las moléculas del disolvente unidas fuertemente al ion metálico, además, se ha reportado que en general para complejos de cobre, las constantes de estabilidad son más altas en sistemas acuosos que en metanol puro. Quizás también, el metanol aumenta la participación en el enlace de más de dos nitrógenos del ligante, aumentando la estabilidad de la especie *mono*. De acuerdo al espectro de absorbancia molar presentado en la Fig.1d el complejo [Cu(metf)]²⁺ muestra una máxima absorbancia a 270nm con $\epsilon=2627.8$ L·mol⁻¹·cm⁻¹. El valor logarítmico de la constante de formación global reportado en la Tabla 1, para este complejo es de 4.44 ± 0.01.

Con la finalidad de estudiar el sistema ternario de cobre(II)-metformina-halógeno se empleó una concentración equimolar de cobre:metformina, y es variada solamente la concentración de cloruro o bromuro en cada experimento, obteniendo únicamente la formación del complejo [Cu(metf)Cl]¹⁺ y [Cu(metf)Br]¹⁺, respectivamente. La formación del complejo mono es debida probablemente al impedimento estérico generado por la metformina unida al ion metálico y al carácter nucleófilico del metanol. En la Fig.1b son presentados los espectros de absorción del complejo cobre (II)-metformina-cloro en metanol. Se observa que al incrementar las concentración de cloruros se presenta un efecto hipercrómico en comparación con el espectro de complejo cobre(II)-metformina, lo que indica un aumento en la formación del complejo con cloruro.

Tabla 1. Resumen de parámetros experimentales de sistema: complejos cobre(II)–metformina, cobre(II)–metformina–cloro y cobre(II)–metformina–bromo en metanol.

Composición de Solución	[T _L] rango de 0.00004 a 0.00074M y 0.00006 a 0.00124M		
	[T _M] constante de 0.00021M y 0.00035M.		
	Fuerza iónica		
	Rango de pH		No usada
			No usado
Método experimental	Espectrofotométrico		
Temperatura	25°C		
Número total de puntos de datos	39		
Método de cálculo	HypSpec		
Especie	Equilibrio	Log β	σ
Cu(metf)	$\text{Cu}^{2+} + \text{metf} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$	$\log \beta_{110} = 4.44 \pm 0.01$	0.0131
Composición de Solución	[T _{L1}] constante de 0.00022M y 0.00037M		
	[T _X] rango de 0.00001 a 0.00025M y 0.00002 a 0.00044M		
	[T _M] constante de 0.00021M a 0.00034M.		
	Fuerza iónica		
	Rango de pH		No usada
			No usado
Método experimental	Espectrofotométrico		
Temperatura	25°C		
Número total de puntos de datos	39		
Método de cálculo	HypSpec		
Especie	Equilibrio	Log β	σ
Cu(metf)Cl	$\text{Cu}^{2+} + \text{metf} + \text{Cl}^- \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{metf})\text{Cl}]^{1+}$	$\log \beta_{111} = 8.88 \pm 0.01$	0.0025

Cu(metf)Br	$\text{Cu}^{2+} + \text{metf} + \text{Br} \rightleftharpoons$	$[\text{Cu(metf)Br}]^{1+}$	$\log \beta_{111} = 9.62 \pm 0.02$	0.0076
---------------------	---------------------------------------------------------------	----------------------------	------------------------------------	--------

Los espectros de absorción del complejo cobre (II)-metformina-bromo en solución de metanol, se muestran en la Fig.1c. Se aprecia que al aumentar la concentración de bromuro, se presenta un efecto hipercrómico y un efecto batocrómico, en comparación con el espectro de complejo cobre(II)-metformina, debido a que se observó un desplazamiento de absorción hacia longitudes de onda mayores. Este cambio de absorción entre complejos puede estar relacionado con un ligero cambio en la geometría del complejo.

Los espectros de absorbancia molar de los complejos cobre(II)-metformina-halógeno (Fig.1d.) muestran que la máxima absorción de $[\text{Cu(metf)Cl}]^{1+}$ se presenta a 270nm con $\epsilon = 3176.9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y en el complejo $[\text{Cu(metf)Br}]^{1+}$ a 296nm con $\epsilon = 1583.6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ mostrando el segundo pico generado en el espectro. También es posible observar, que en el complejo cobre (II)-metformina-halógeno, absorben más que en la ausencia del halógeno, lo que indica que el halógeno incrementa la transferencia de carga en el centro metálico.

El valor logarítmico de la constante de formación global ($\log \beta$) del complejo $[\text{Cu(metf)Cl}]^{1+}$ es de 8.88 ± 0.01 , mientras que el de $[\text{Cu(metf)Br}]^{1+}$ es de 9.62 ± 0.02 (Tabla 1), el cual es un valor aproximadamente veinte mil y cien mil veces mayor que la del complejo $[\text{Cu(metf)}]^{2+}$, respectivamente; lo anterior podría explicarse considerando que al existir una transferencia de carga de la metformina al ion metálico (Cu^{2+}) haciéndolo más rico en electrones (ácido blando), favorece la unión con una base blanda (principio de Pearson) como lo es el halogenuro, y/o que el halogenuro actuó como un estabilizador de la geometría del complejo, respecto al mayor valor presentado por el complejo $[\text{Cu(metf)Br}]^{1+}$ esto puede explicarse con el hecho de que el bromuro al tener un mayor tamaño que el cloruro tenga mayor carácter de base blanda y por tanto su afinidad con el metal sea mayor.

Curvas de distribución de los complejos cobre(II)-metformina y cobre(II)-metformina-halógeno.

Los diagramas de distribución de especies de cobre(II)-metformina, cobre(II)-metformina-cloro y cobre(II)-metformina-bromo son mostrados en la Fig. 2a, b y c respectivamente. En el experimento con concentración constante de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 0.00035M y concentraciones de metformina de 0.00006M a 0.00124M se obtiene aproximadamente un 95.65% de formación del complejo $[\text{Cu(metf)}]^{2+}$ y menos del 5% corresponde a cobre (3.8%) y metformina libre al considerar la última solución de 0.00124M de metformina.

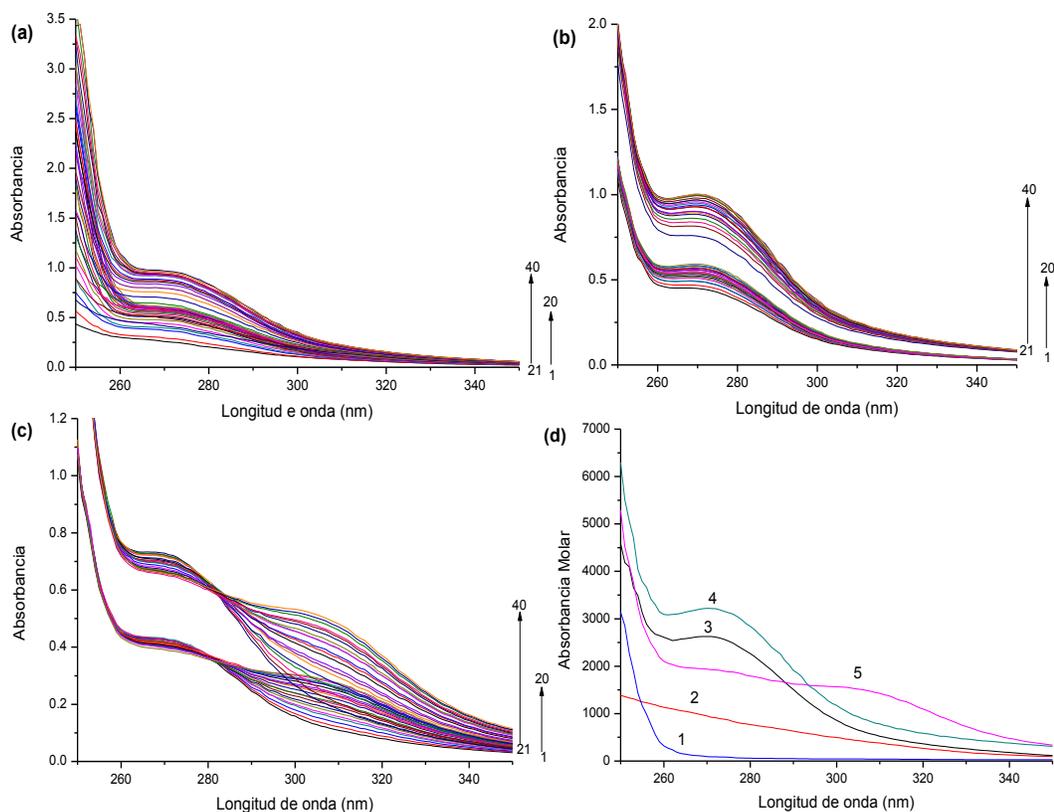


Fig. 1 (a). Espectro de absorción de complejo cobre (II)-metformina en solución de metanol: para espectros 1-20, $[Cu(II)] = 0.00021M$ y concentración de metformina (M): (1) 0.00004; (2) 0.00007; (3) 0.00011; (4) 0.00015; (5) 0.00019; (6) 0.00022; (7) 0.00026; (8) 0.00030; (9) 0.00033; (10) 0.00037; (11) 0.00041; (12) 0.00044; (13) 0.00048; (14) 0.00052; (15) 0.00056; (16) 0.00059; (17) 0.00063; (18) 0.00067; (19) 0.0007; (20) 0.00074. Para los espectros de 21-40, $[Cu(II)] = 0.00035M$ y concentración de metformina (M): (21) 0.00006; (22) 0.00012; (23) 0.00019; (24) 0.00025; (25) 0.00031; (26) 0.00037; (27) 0.00043; (28) 0.0005; (29) 0.00056; (30) 0.00062; (31) 0.00068; (32) 0.00074; (33) 0.00081; (34) 0.00087; (35) 0.00093; (36) 0.00099; (37) 0.00105; (38) 0.00112; (39) 0.00118; (40) 0.00124. (b) y (c). Espectro de absorción de complejo cobre (II)-metformina-cloro y complejo cobre (II)-metformina-bromo en solución de metanol, respectivamente para cada experimento: para espectros 1-20, $[Cu(II)] = 0.00021M$, $[metformina] = 0.00022M$ y concentración de cloruro o bromuro (M): (1) 0.00001; (2) 0.00003; (3) 0.00004; (4) 0.00005; (5) 0.00006; (6) 0.00008; (7) 0.00009; (8) 0.0001; (9) 0.00011; (10) 0.00013; (11) 0.00014; (12) 0.00015; (13) 0.00016; (14) 0.00018; (15) 0.00019; (16) 0.0002; (17) 0.00021; (18) 0.00023; (19) 0.00024; (20) 0.00025. Para los espectros de 21-40, $[Cu(II)] = 0.00034M$, $[metformina] = 0.00037M$ y concentración de cloruro o bromuro (M): (21) 0.00002; (22) 0.00004; (23) 0.00007; (24) 0.00009; (25) 0.00011; (26) 0.00013; (27) 0.00015; (28) 0.00018; (29) 0.0002; (30) 0.00022; (31) 0.00024; (32) 0.00026; (33) 0.00029; (34) 0.00031.

Para el sistema con concentración constante de $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5H_2O$ a 0.00034M y de metformina 0.00037M, con concentraciones de cloruro de 0.00002M a 0.00044M, se obtiene aproximadamente

72.28% de formación del complejo $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Cl}]^{1+}$, 10.6% de cobre libre y 17.12% $[\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$, considerando la solución de mayor concentración de NaCl (0.00044M). En el caso del sistema con concentración constante de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ a 0.00034M y de metformina 0.00037M, con concentraciones de bromuro de 0.00002M a 0.00044M, aproximadamente 90.76% corresponde a la formación del complejo $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Br}]^{1+}$, 4.08% de cobre libre y 4.89% $[\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$, considerando la solución de mayor concentración de NaBr (0.00044M).

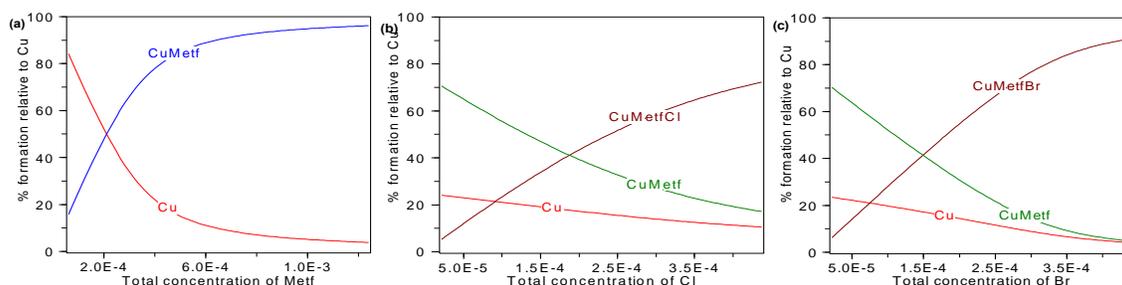


Fig. 2 (a) Curvas de formación de complejos $[\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$ en metanol, $[\text{Cu}^{2+}] = 0.00035\text{M}$ y concentraciones variadas de metformina de 0.00006M a 0.00124M. (b) Curvas de formación de complejos $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Cl}]^{1+}$ en metanol, $[\text{Cu}^{2+}] = 0.00034\text{M}$, metformina = 0.00037M y

CONCLUSIONES

Debido a que en estos sistemas no se utilizó la fuerza iónica, las constantes de formación determinadas deben utilizarse de forma comparativa con sistemas medidos en condiciones similares, y por tanto los valores obtenidos, no deberían ser considerados como constantes de estabilidad termodinámicas.

La determinación de las constantes de formación de las especies cobre(II)-metformina y cobre(II)-metformina-halógeno, es importante para la determinación de las especies químicas generadas en metanol, observando solo la generación de $[\text{Cu}(\text{metf})]^{2+}$ y no el complejo *bis* reportado en disolventes acuosos. En el caso de la interacción con halogenuros, el único complejo formado fue el $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Cl}]^{1+}$ y $[\text{Cu}(\text{metf})\text{Br}]^{1+}$ en cada experimento, lo que quizá puede explicarse debido al carácter nucleófilo del metanol, que conduce a que los ligantes tengan que competir con moléculas de disolvente unidas al ion metálico. Es probable que la especie cobre-metformina posea un sitio blanco que permita tener una afinidad con bases blandas. En general, la constante de formación obtenida por la interacción con haluros, es mayor que la obtenida en el complejo cobre(II)-

metformina, y en el caso de bromuros es aproximadamente cien mil veces mayor, incluso mayor en comparación con cloruro, es quizás debido a la afinidad del bromuro al cobre(II). Es necesario realizar más estudios con el fin de entender los cambios del complejo cuando se coordina con diferentes bases blandas. Además, se espera que todos estos datos pueden ser utilizados para establecer una correlación del complejo formado in vitro, con la posible coordinación de metformina con cobre. Así también, considerando la concentración de cloruros en mitocondrias, el efecto farmacológico puede tener la especie de cobre-metformina-cloruro que podría estar presente en las mitocondrias.

REFERENCIAS

- AL-SAIF, F. Y REFAT, M. (2013). "Synthesis, spectroscopic, and thermal investigation of transition and non-transition complexes of metformin as potential insulin-mimetic agents" en *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol.111, Marzo, [pp. 2079-2096].
- BAILEY, C. J. AND DAY, C. (2004). "Metformin: its botanical background" en *Practical Diabetes International*, Vol. 21(3), Abril, [pp.115-117].
- DOSA, M. D., ADUMITRESI C. R., HANGAN L., NECHIFOR M. (2013). "Copper, Zinc and Magnesium in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Treated with Metformin" en Oguntibeju O. *Diabetes Mellitus- Insights and Perspectives*, Croacia: InTech, [pp. 209-228].
- GUERRERO, D. B. Y DE LUIS ROMÁN, D.A. (2006). *Manual de nutrición y metabolismo*, España: Díaz de Santos Editorial.
- MARIC', A. (2010). "Metformin - more than 'gold standard' in the treatment of type 2 diabetes mellitus" en *Diabetologia Croatica*, Vol.39 (3), Agosto, [pp. 95-104].
- OLAIZ, G., ROJAS, R., AGUILAR, C.A., RAUDA, J., VILLALPANDO, S. (2007). "Diabetes mellitus en adultos mexicanos: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000" en *Salud Pública de Méx*, Vol. 49, [pp. s331-s337].
- RENA, G., PEARSON, E.R., SAKAMOTO, K. (2013). "Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?" en *Diabetologia*, Vol.56, Julio, [pp. 1898-1906].
- REPISCAK, P., ERHARDT, S., RENA, G. Y PATERSON, M.J. (2014). "Biomolecular Mode of Action of Metformin in Relation to Its Copper Binding Properties" en *Biochemistry*, Vol.53, Junio, [pp. 787-795].
- SHILS, M. E. Y SHIKE M. (2006). *Modern Nutrition in Health and Disease*, Estados Unidos de America: Lippincott Williams & Wilkins Editorial.