

Desarrollo de Complejos de Cobre con Actividad Antitumoral: Síntesis y Caracterización de un nuevo Complejo de Cobre-Terpiridina

Gianella Facchin^{(1)*}, Natalia Alvarez⁽¹⁾, Rossana Sapiro⁽²⁾, Marcio Péres-Araujo⁽³⁾

(1) Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. General Flores 2124, Montevideo, Uruguay (e-mail: *gfacchin@fq.edu.uy, nalvarez@fq.edu.uy).

(2) Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avda. General Flores 2125, Montevideo, Uruguay (e-mail: rsapiro@fmed.edu.uy).

(3) Departamento de Química, Centro Politécnico, Universidad Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil (e-mail: mparaujo@ufpr.br).

Recibido May. 22, 2012; Aceptado Jun. 27, 2012; Versión final recibida Jul. 16, 2012

Resumen

El objetivo de este trabajo es la síntesis y caracterización de nuevos complejos de Cobre(II) y 2,2':6'2"-terpiridina y la evaluación de su actividad antitumoral, como parte de una investigación de complejos de Cu(II) con actividad citotóxica. La estructura del nuevo complejo $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se caracterizó por espectroscopía infrarroja en estado sólido y en solución acuosa, espectroscopía electrónica, conductimetría y voltametría cíclica. Se realizaron ensayos de lipofilia y de actividad antiproliferativa en células HeLa. Se determinó que el compuesto obtenido presenta un átomo de Cobre(II) coordinado con una molécula de terpiridina y un anión sulfato. En solución acuosa, el anión sulfato es sustituido por moléculas de agua formándose el ion $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$. Los estudios de lipofilia muestran un coeficiente de reparto n-octanol/agua de 1,3, que es similar a los valores encontrados para otros compuestos con actividad biológica. El compuesto presenta actividad antiproliferativa de 25 % de inhibición a 25 μM .

Palabras clave: complejos de cobre, terpiridina, Cu(II), actividad antitumoral

Development of Copper Complexes with Antitumor Activity: Synthesis and Characterization of a new Copper-Terpyridine Complex

Abstract

The aim of this research is the synthesis and characterization of new Copper(II)-2,2':6'2"-terpyridine complexes, as well as the evaluation of their antitumor activity, as a part of a project on copper complexes with cytotoxic activity. The new complex $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was characterized by infrared spectroscopy in solid state and aqueous solution, electronic spectra, conductimetry and cyclic voltammetry. Besides, its lipophilicity and antiproliferative activity in HeLa cells cultures were assessed. The results show that there is a copper atom in the complex that is coordinated to a terpyridine molecule and a sulphate anion. Aqueous solution behavior indicates that the sulphate anion is replaced by three water molecules being $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ the resulting ion. Lipophilicity studies show a partition coefficient between n-octanol and water of 1,3, similar to other compounds presenting biological activity. The antiproliferative activity was 25 % at 25 μM .

Keywords: terpyridine, copper complexes, Cu(II), antitumor activity

INTRODUCCIÓN

La química de coordinación de la 2,2':6,2''-terpiridina (Fig. 1) y sus derivados ha sido intensamente explorada debido a las propiedades estructurales, electrónicas, luminiscentes, magnéticas y la reactividad que muestran los complejos de esta familia de ligandos (Boerner et. al, 2005, Huang et. al, 2005, Ma et. al, 2010, Indumathy et. al, 2007, Wałęsa-Chorab et. al, 2011).

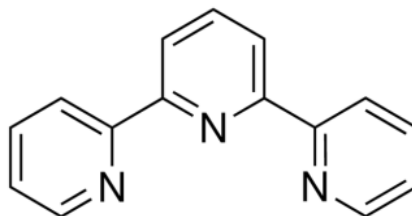


Fig. 1: Esquema de la 2,2':6,2''-terpiridina

Asimismo, este ligando es de particular interés en la búsqueda de nuevos complejos metálicos con actividad antitumoral debido a que es capaz de inhibir la topoisomerasa 1, y presenta actividad antiproliferativa frente a varias líneas de células tumorales (Zhao et. al, 2001). Con el objetivo de mejorar el perfil farmacológico de este ligando, se utilizó como estrategia la complejación del mismo con varios cationes metálicos como Pt(II) (Lo et. al, 2009), Zn(II) (Ma et. al, 2010), Cu(II) (Rajalakshmi et. al, 2011), Co(II) (Indumathy et. al, 2007) entre otros, que han mostrado también actividad antitumoral.

Desde el punto de vista químico, un aspecto a destacar de este ligando es que forma complejos de alta estabilidad, sin ocupar todas las posiciones de coordinación propias del metal (Wałęsa-Chorab et. al, 2011). Esto permite que el ADN interactúe no sólo directamente con el ligando, sino además que pueda coordinar con el centro metálico. Por ejemplo se ha probado que los complejos de Cu(II) con derivados de terpiridina interactúan con el ADN mediante hidrólisis, clivaje electrofórico, clivaje fotofórico, intercalación y daño oxidativo (Zhao et. al, 2001, Uma et. al, 2005, Roy et. al, 2005).

Como parte de nuestros estudios sobre complejos de Cu(II) con actividad antitumoral, en este trabajo se presenta la síntesis y caracterización estructural de un nuevo complejo de Cu(II)-terpiridina. Asimismo, se determinó la lipofilia del complejo y la actividad antiproliferativa en cultivos de células HeLa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis

A una solución 25 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, 99%) se le agrega una solución etanólica de 2,2':6,2''-terpiridina (Sigma, 98%) 50 mM con agitación (%calc/%exp $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{CuN}_3\text{O}_7\text{S}$: %C 9,60/9,64, %N 41,14/41,37, %H 3,37/3,67).

Caracterización estructural

Espectroscopía infrarroja (FT-IR): Shimadzu IRPrestige-21, en pastillas de KBr (sólido) y en celdas de CaF_2 (solución acuosa). Espectroscopía UV-visible: Shimadzu modelo UV-1603. Voltametría cíclica: AUTOLAB PGSTAT30, electrodo de trabajo y auxiliar de platino, electrodo de referencia un electrodo Ag en un capilar de Luggin en contacto con el electrolito, atmósfera inerte de N_2 , velocidad de barrido 0,1 V/s (medición por triplicado a 298 K), electrolito soporte LiClO_4 0,1 M en agua miliQ. Conductividad: soluciones 1mM de complejo y de sulfato de cobre en un conductímetro Jenway Conductivity Meter 4310 a 22°C.

Lipofilia y actividad antiproliferativa

Lipofilia: P, coeficiente de reparto 1-octanol/agua (determinación de Cu: absorción atómica, AAnalyst 200 Perkin Elmer). Actividad antiproliferativa: cultivos de células HeLa (línea celular de cáncer cervical humano), medio DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%v/v, en presencia de antibióticos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, 95% aire, 24 horas de incubación con el complejo. El porcentaje de inhibición de proliferación fue calculado utilizando el método estándar de la sulforodamina B (SRB) (Suresh et. al, 2008, Dragonetti et. al, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN*Caracterización por espectroscopía infrarroja*

La Figura 2 presenta el espectro del complejo en estado sólido y en solución, y en la Tabla 1 se presentan las principales bandas y sus asignaciones tentativas. Las bandas correspondientes a las vibraciones $\delta(\text{C-C-C})$ y $\delta(\text{C-C-N})$ de la terpiridina aparecen en el rango de 620-770 cm⁻¹ en el espectro del ligando libre, sufriendo un corrimiento a 900-990 cm⁻¹ al formarse el complejo, evidenciando la coordinación a través del N-heterocíclico. También se distinguen las bandas a 509 cm⁻¹ y 437 cm⁻¹ correspondientes a los estiramientos $\nu(\text{Cu-N})$ y $\nu(\text{Cu-O})$, respectivamente, poniendo de manifiesto la coordinación del metal a la terpiridina a través de los N heterocíclicos y los átomos de O del grupo sulfato. Se observa también la presencia de dos bandas, a 1107 cm⁻¹ y 1033 cm⁻¹, provenientes de las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo sulfato, respectivamente. La asimetría es consecuencia directa de la coordinación de dicho grupo a través de uno de los átomos de O, ya que en la forma iónica del mismo no se observa debido a que los cuatro O del sulfato serían indistinguibles. Hasta la fecha no se ha reportado un complejo heteroléptico similar donde el Cu(II) coordine con el anión sulfato y con la terpiridina.

El espectro IR en solución muestra la pérdida de dicha asimetría, a través de la desaparición de la banda a 1033 cm⁻¹, evidenciando la liberación del sulfato en su forma iónica. Asimismo se observa que las bandas correspondientes a las vibraciones $\delta(\text{C-C-C})$, $\delta(\text{C-C-N})$ del complejo en estado sólido se mantienen en solución, lo que confirma que el ligando terpiridina se mantiene coordinado (Fig. 2).

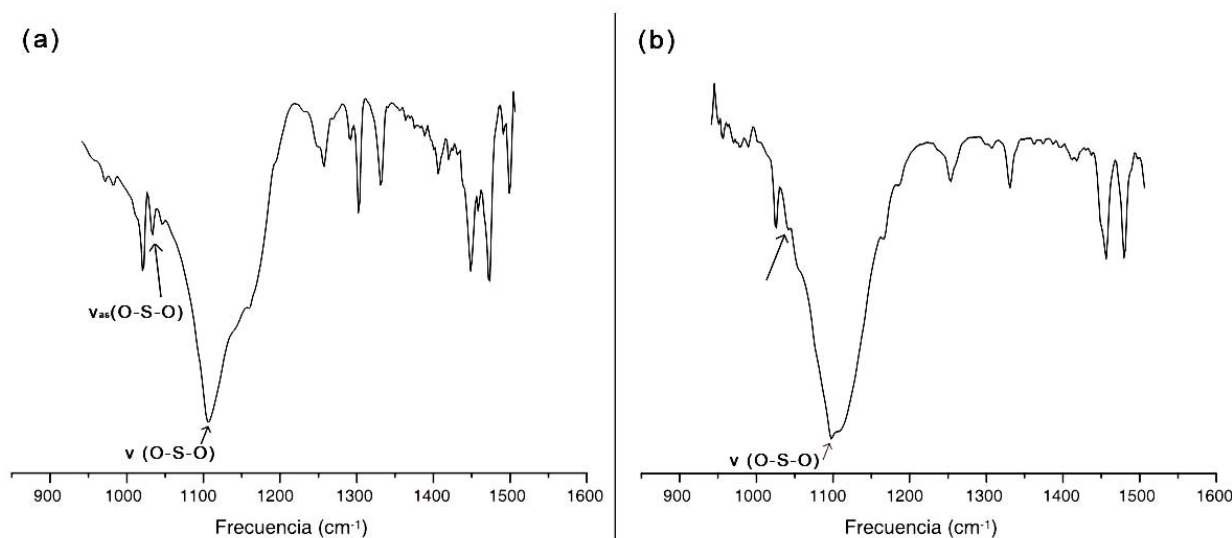


Fig. 2: Espectro IR del complejo en estado sólido (a) y en solución acuosa (b).

Caracterización en solución acuosa: espectroscopía electrónica, conductimetría y voltametría

El espectro electrónico del complejo en solución acuosa presenta una banda a 675 nm ($\epsilon_M = 83 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) propia de las transferencias d-d y compatible con una coordinación octaédrica. De acuerdo a esta interpretación, y a los datos obtenidos del espectro IR, se postula que en solución

acuosa el complejo, al disolverse, pierde la molécula de sulfato coordinada la cual es sustituida por una molécula de agua. Las demás posiciones de coordinación que completan el octaedro también son ocupadas por moléculas de agua, formando una especie $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$. La conductividad del complejo en solución acuosa 1mM fue 202 μS , valor similar al obtenido con una solución acuosa de CuSO_4 1mM (213 μS), mostrando la existencia de dos iones en solución.

Tabla 1: Principales Bandas observadas en el espectro IR y su asignación tentativa a diferentes vibraciones moleculares.

Terpiridina	Complejo [Cu(terpy)(H ₂ O)(SO ₄)]·2H ₂ O (en estado sólido)	Complejo [Cu(terpy)(H ₂ O)(SO ₄)]·2H ₂ O (en solución acuosa)	Asignación
No se observa	1595, 1576, 1561	No se observa	$\delta(\text{H-O-H})$
1468, 1453	1472, 1440	1480, 1455	$\nu(\text{C-N}), \nu(\text{C-C})$
No se observa	1107	1110	$\nu_s(\text{O-S-O})$
No se observa	1033	No se observa	$\nu_{as}(\text{O-S-O})$
763, 655, 630, 620	982, 964, 910	989, 979, 969	$\delta(\text{C-C-C}), \delta(\text{C-C-N})$
1150, 1076, 988	778, 730, 667, 652	fuera de la ventana o región en estudio	$\rho(\text{C-H})$
No se observa	509		$\nu(\text{Cu-N})$
No se observa	437		$\nu(\text{Cu-O})$

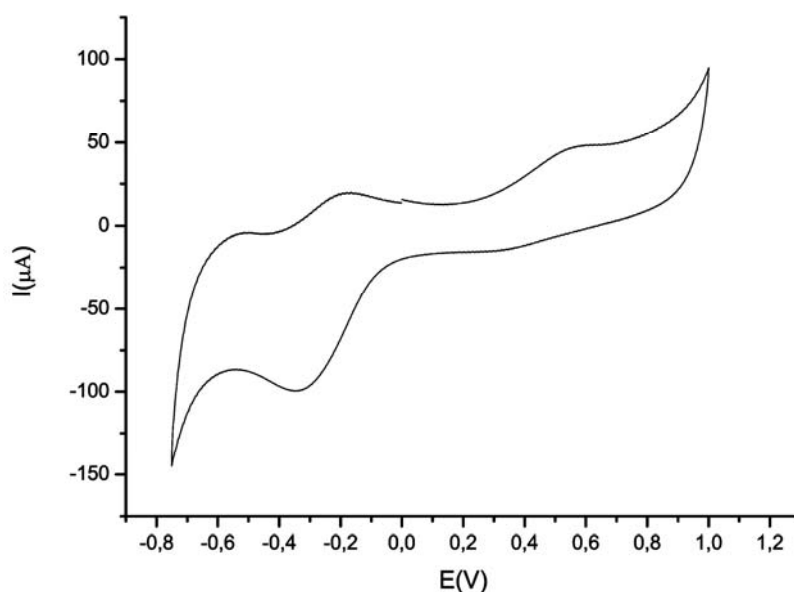


Fig. 3: Voltamperograma de $[\text{Cu}(\text{terpy})]^{2+}$, en solución acuosa.

El voltamperograma presentado para el compuesto $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en solución acuosa muestra un cambio electroquímico quasireversible (Fig. 3). El E° correspondiente al par iónico $[\text{Cu}(\text{terpy})]^{2+}/[\text{Cu}(\text{terpy})]^{1+}$ es de 98 mV (calculado a partir del gráfico y corregido con el patrón $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ medido en las mismas condiciones de trabajo) observándose una disminución importante respecto al par $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ (153 mV) como consecuencia de la coordinación de la terpiridina (Bard et. al, 1985).

Lipofilia y estudio de actividad antiproliferativa

Se determinó el coeficiente de reparto octanol/agua (P) obteniéndose un valor de 1,3. Este valor, cercano a 1, está dentro de los considerados adecuados para traspasar membranas biológicas (Gennaro et. al, 2003).

Los porcentajes de inhibición de la proliferación obtenidos son: 22 ± 2 (5 μM) y 25 ± 7 (25 μM), indicando que el complejo presenta actividad antiproliferativa en células HeLa. Estos resultados sugieren que ocurre una "saturación" de los receptores o vías por la que este fármaco ejerce su efecto, ya que aumentar cinco veces la dosis prácticamente no aumenta el porcentaje de inhibición. Dicha actividad es menor que la del Cisplatino ($\text{IC}_{50} = 8\mu\text{M}$) (Ray et. al, 2007).

CONCLUSIONES

El nuevo complejo caracterizado, $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sufre sustitución del anión sulfato en solución acuosa, para dar la especie $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$.

El catión complejo $[\text{Cu}(\text{terpy})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ presenta débil actividad antiproliferativa, volviendo interesante la introducción de modificaciones en el complejo, por ejemplo la formación de compuestos de ligandos mixtos, para encontrar complejos con buena actividad antiproliferativa.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto CAPES/Udelar "Compostos de metais de transição aplicados como metalodrogas" por el apoyo económico. A la Dra. María H. Torre y al Q.F. Sebastián Iglesias (Facultad de Química, Udelar) por sus contribuciones a este trabajo.

REFERENCIAS

- Bard, A. J., Parsons, R., y Jordan, J., *Standard Potentials in Aqueous Solutions*, Marcel Dekker, New York (1985).
- Boerner, L., Zaleski J., *Metal complex–DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage*, Current Opinion in Chemical Biology, ISSN: 1367-5931 (en línea), 9, 135-144 (2005).
- Dragonetti, M. A., Gris, J. H., Moglioni, A. G., Fernández, B. M., *Estudio Teórico Preliminar de Fármacos Anti-VIH, Inhibidores No Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa*, Información Tecnológica, ISSN: 0718-0764, 19(2), 23-32 (2008).
- Gennaro, A. R., *Remington Farmacia*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires (2003).
- Huang, R., Wallqvist A., Covell, D., *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*, Biochemical Pharmacology, ISSN: 0006-2952, 69, 1009-1039 (2005).
- Indumathy, R., Radhika, S., Kanthimathi, M., Weyermüller, T., Nair, B., *Cobalt complexes of terpyridine ligand: Crystal structure and photocleavage of DNA*, Journal of Inorganic Biochemistry, ISSN: 0162-0134, 101, 434-443 (2007).
- Lo, Y., Ko, T., Su, W., Su, T., Wang, A., *Terpyridine–platinum(II) complexes are effective inhibitors of mammalian topoisomerases and human thioredoxin reductase 1*, Journal of Inorganic Biochemistry, ISSN: 0162-0134, 104, 1082-1092 (2009).
- Ma, Z., Ca, Y., Li, Q., Guedes da Silva, M., Fraústo da Silva, J., Pombeiro, A., *Synthesis, characterization, solid-state photo-luminescence and anti-tumor activity of zinc(II) 4'-phenyl-terpyridine compounds*, Journal of Inorganic Biochemistry, ISSN: 0162-0134, 104, 704-711 (2010).

Rajalakshmi, S., Weyhermüller, T., Freddy, A., Vasanthi, H., Nair, B., *Anomalous behavior of pentacoordinate copper complexes of dimethylphenanthroline and derivatives of terpyridine ligands: Studies on DNA binding, cleavage and apoptotic activity*, European Journal of Medicinal Chemistry, ISSN: 0223-5234, 46, 608-617 (2011).

Ray, S., y otros seis autores, *Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes*, Journal of the American Chemical Society, ISSN 0002-7863, 129, 15042-15053 (2007).

Roy, S., Saha, S., Majumdar, R., Digue, R., Chakravarty, A., *DNA photocleavage and anticancer activity of terpyridine copper(II) complexes having phenanthroline bases*, Polyhedron, ISSN: 0277-5387, 29, 2787-2794 (2007).

Suresh, D., Blakrishna, M.S., Rathinasamy, K., Panda, D., Maguec, J. T., *Large-bite bis(phosphite) ligand containing mesocyclic thioether moieties: synthesis, reactivity, group 11 (Cu, Au) metal complexes and anticancer activity studies on a human cervical cancer (HeLa) cell line*, Dalton Transactions, ISSN: 1364-5447, 2285-2292 (2008).

Uma, V., Kanthimathi, M., Weyhermüller, T., Nair, B., *Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies*, Journal of Inorganic Biochemistry, ISSN: 1364-5447, 99, 2599-2307 (2005).

Wałęsa-Chorab, M. y otros seis autores, *Structural, spectroscopic and magnetic properties of new copper(II) complexes with a terpyridine ligand*, Polyhedron, ISSN: 0277-5387, 30, 233-240 (2011).

Zhao, L. y otros once autores, *Synthesis, topoisomerase I inhibition and antitumor cytotoxicity of 2,2':6',2"-, 2,2':6',3"- and 2,2':6',4"-Terpyridine derivatives*, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, ISSN: 0960-894X, 11, 2659-2662 (2001).