



# SYNTHESIS OF THE ANTI-CANCER CARBOPLATIN OXIDIZED, AND STUDY OF ITS INTERACTIONS WITH N-BASES BY CYCLIC VOLTAMMETRY

Blas P. Puma C.\*, Carmen A. Vega O., Mayra E. Cádiz, Enrique Melendéz

Departamento de Química, Laboratorio de Electroquímica, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, PO BOX 9019, PR 00681-9019, Tel. 787-8324040 ext. 3736, USA. quimblas@hotmail.com, carmenamarilis.vega@upr.edu

**Keywords:** Oxidized-carboplatin, Nitrogenous bases, Gold electrode, Potentials, Adducts

## ABSTRACT

The anticancer drug cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylate)-trans-dihydroxyplatinum (IV) or carboplatin-oxidized was synthesized with 98% purity by oxidizing the carboplatin Pt (II) with hydrogen peroxide 30%. The elemental analysis was confirmed by Atlantic Microlab Inc. Company (Norcross-Georgia, USA). The study of the electrochemical behavior of CBDCAOX interacting with nitrogenous bases was performed in a range of -200 mV to -700 mV with a voltammetric analyzer BAS 50W model. The free CBDCAOX voltammogram showed a reduction signal in -625.4 mV and during the interaction with thymine the signal shifted to less negative potentials. This result indicates the formation of a strong bond in CBDCAOX-thymine complex. *Spanish title: Síntesis del anticanceroso carboplatino oxidado y estudios electroquímicos de sus interacciones con bases nitrogenadas por voltametría cíclica.*

\*Corresponding author: [quimblas@hotmail.com](mailto:quimblas@hotmail.com)

## RESUMEN

El fármaco anticanceroso cis-diamino-(1,1-ciclobutanodicarboxilato)-trans-dihidroxiplatino (IV) o carboplatino oxidado se sintetizó con 98% de pureza, oxidando el carboplatino Pt(II) con peróxido de hidrógeno al 30%. El análisis elemental fue confirmado por la compañía Atlantic Microlab, Inc. (Norcross-Georgia, USA). El estudio del comportamiento electroquímico del CBDCAOX interaccionando con bases nitrogenadas se realizó en un rango de -200 mV a -700 mV con un analizador voltamétrico modelo BAS 50W. El voltamograma de CBDCAOX libre mostró una señal de reducción en -625.4 mV y al interaccionar con timina la señal se desplazó hacia potenciales menos negativos. Este resultado indica la formación de un enlace fuerte en el complejo CBDCA-OX-timina.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente muchos complejos del platino que contienen Pt (II) y Pt (IV) son utilizados como agentes antitumorales. En los pacientes, estos complejos llegan al núcleo celular en donde interaccionan directamente con el DNA formando aductos DNA-Pt. Estos aductos detienen la replicación y la transcripción del DNA en células cancerosas. Otro fármaco modificado del carboplatino de tercera generación es el cis-diamino-(1,1-ciclobutanodicarboxilato)-trans-dihidroxiplatino (IV) más conocido por carboplatino-oxidado y abreviado como CBDCAOX, figura 1b. Este fármaco se sintetizó en el laboratorio por la oxidación del carboplatino con peróxido de hidrógeno al 30% [1, 2, 3]. El CBDCAOX sintetizado contiene un átomo central Pt (IV) y en sus posiciones ecuatoriales lleva dos grupos amino, un grupo dicarboxilato y en sus posiciones axiales dos grupos hidróxidos, Figura 1. La actividad anticancerosa de los complejos de platino (IV) se conocieron desde el descubrimiento de cisplatino (cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) en 1969 por Rosenberg y col., [4]. Cuando se aplicó un potencial eléctrico a un cultivo de *E. coli* a través de electrodos de platino, la replicación bacteriana fue inhibida por la presencia de iones de platino en disolución proveniente de los electrodos. Sin embargo, el cisplatino es un compuesto de platino (II) que fue seleccionado para los ensayos clínicos siendo ahora el medicamento más conocido a nivel del mundo. El cisplatino y sus derivados que contienen los iones de Pt (II) y Pt (IV) son ampliamente utilizados para el tratamiento contra el cáncer de pulmón, ovario, testículos, cabeza, cuello, vejiga y muchos otros tumores [5]. Se establece en

general que el DNA es el principal y primordial blanco de los medicamentos del platino contra el cáncer. Muchos científicos han investigado la actividad de los compuestos de Pt (IV) como agentes antitumorales para descubrir si son fármacos reales o pro-fármacos, es decir que se reducen a Pt (II) antes de interactuar con el DNA [6,12]. Un pro-fármaco es un compuesto que dentro del cuerpo se convierte en su forma activa. Se utiliza cuando el fármaco activo es demasiado tóxico para la administración directa, o se descompone antes de encontrar su objetivo. Los fármacos de Pt (IV) tienen una serie de ventajas sobre los de Pt (II). Son cinéticamente más inertes que Pt (II), es decir son más estables en un medio ácido como en el estómago. Se pueden administrar por vía oral para combatir tumores resistentes al cisplatino. Los fármacos de Pt (IV) por un mecanismo de acción diferente de Pt (II) pueden llegar al núcleo celular donde interactúan directamente con el DNA formando aductos DNA-Pt (IV) [4,5]. Otras investigaciones señalaron que la reducción de los complejos de platino  $[Pt(en)Cl_4]$  y  $[Pt(en)Cl_2(OH)_2]$  en Pt (II) ocurrió en - 650 mV; también indicaron que el platino (IV) interactúa con el DNA con un solo enlace, como se puede ver en la figura 1c. Estos resultados se confirmaron por difracción de rayos X [7]. Un experimento *in vivo* demostró la reducción de los complejos del platino (IV) en platino (II) y la interacción del Pt (II) con el DNA. Estos resultados han confirmado, analizando el plasma y orina de pacientes tratados con fármacos de Pt (IV), que aún contenían pequeñas cantidades de Pt (II) [7, 8]. El objetivo de este trabajo es sintetizar el carboplatino-oxidado y estudiar su comportamiento electroquímico interactuando con bases nitrogenadas sobre electrodo de oro en condiciones fisiológicas de pH 7,4 utilizando el analizador voltamétrico modelo BAS 50W [1, 2, 6, 10, 11].

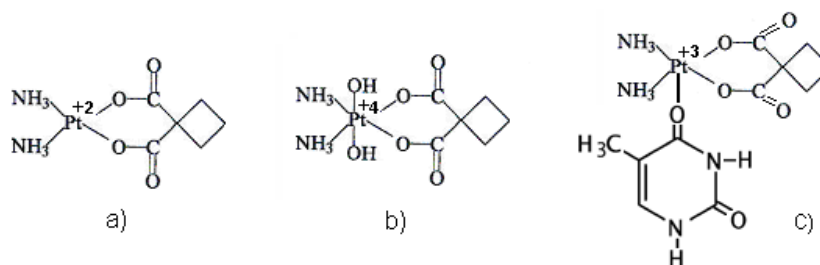


Figura 1. Estructuras de a) Carboplatino (CBDCA) b) Carboplatino oxidado (CBDCAOX) y c) Complejo carboplatino oxidado-Timina (CBDCAOX-Timina)

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Resultados de la síntesis de CBDCAOX.

La síntesis de CBDCAOX se llevó a cabo con un rendimiento de 98 %. La tabla 1 muestra los resultados del análisis elemental para el CBDCAOX sintetizado que coincide con los resultados reportados en otras investigaciones [1, 2, 3].

Tabla 1. Resultados de análisis elemental para CBDCAOX sintetizado en el laboratorio

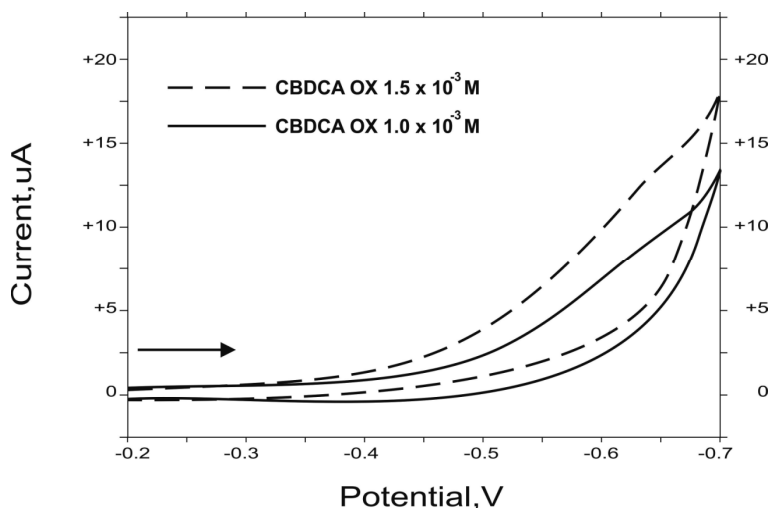
Elemento	Valor teórico (%)	Valor experimental (%)
Carbono	17,77	17,21
Hidrógeno	3,46	3,62
Nitrógeno	6,91	6,90
Oxígeno	23,69	23,60

### Resultados de voltametría cíclica

#### Confirmación del CBDCA-OX

Los voltamogramas de CBDCAOX  $1,0 \times 10^{-3}$  M disueltos en solución amortiguadora, al aplicar potenciales negativos sobre el electrodo de oro y en condiciones fisiológicas de pH 7,4 mostraron una señal de reducción ( $E_{pc}$ ) en - 625,4( $\pm$ 0,0) mV con corriente catódica ( $I_{pc}$ ) de +9,1 ( $\pm$ 0,25)  $\mu$ A. La identidad de esta señal se confirmó aumentando la concentración de CBDCAOX a  $1,5 \times 10^{-3}$  M y el tamaño de la señal aumentó significativamente, figura 2. Este

resultado reafirma que la señal en  $-625,4$  mV verdaderamente corresponde al CBDCAOX que gana un electrón del electrodo de oro [1, 2].



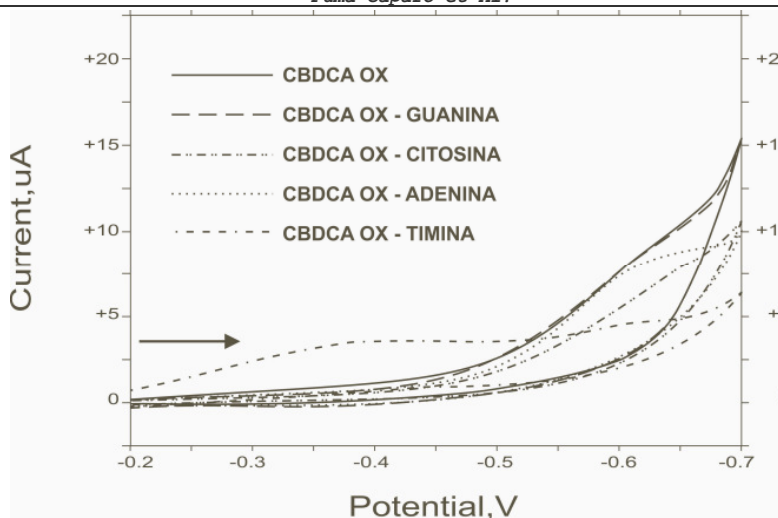
**Figura 2.** Voltamograma Cíclica de CBDCAOX a  $1,0 \times 10^{-3}$  M y  $1,5 \times 10^{-3}$  M. BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument

#### Interacciones de CBDCA-OX con bases nitrogenadas en una razón de 1:1

Como se muestra los resultados en la tabla 2 y los voltamogramas en la figura 3, la interacción de CBDCAOX con timina muestra un cambio en potencial ( $\Delta E_{pc}$ ) de 235,1 mV y en corriente ( $\Delta I_{pc}$ ) de 5,4  $\mu$ A comparado con CBDCAOX libre. Estos cambios muy significativos indican la formación del aducto CBDCAOX-timina estable. En esta interacción la transferencia de electrones ocurrió en una mezcla homogénea entre el CBDCAOX y timina. La interacción de CBDCAOX con adenina muestra un cambio en potencial de 14 mV y en corriente de 0,6  $\mu$ A, los cuales indican que existe una interacción muy débil, [1, 2, 10]. La interacción con citosina no muestra un cambio en potencial y en corriente de 2,2  $\mu$ A, y con guanina un cambio en potencial de 0,3 mV y en corriente de 0,2  $\mu$ A estos resultados indican que no hubo interacción con estas bases. El porcentaje de interacción en potencial confirma que la interacción de CBDCAOX con timina fue de 37,6%, con guanina 0,05%, con citosina 0,0% y con adenina 2,2%. Estos resultados indican que el fármaco sintetizado tiene mayor afinidad solamente por timina. Para medir la magnitud de la interacción entre el CBDCAOX y BASES se consideraron la forma y el desplazamiento de las señales de reducción de los aductos [1, 2, 10, 11].

**Tabla 2.** (a) Cambio en corriente catódico y (b) cambio en potencial catódico para las interacciones de CBDCAOX con bases nitrogenadas en una razón de 1:1

(a) corriente	$I_{pc}(\mu A)$	$\Delta I_{pc}(\mu A)$	% interacción
CBDCAOX	+ 9,1( $\pm 0,25$ )	-	-
CBDCAOX - GUANINA	+ 9,3( $\pm 0,40$ )	0,20	2,2
CBDCAOX - CITOSINA	+ 6,9( $\pm 0,00$ )	2,20	24,2
CBDCAOX - ADENINA	+ 8,5( $\pm 0,00$ )	0,60	6,6
CBDCAOX - TIMINA	+ 3,7( $\pm 0,17$ )	5,40	59,3
(b) Potencial	$E_{pc}(mV)$	$\Delta E_{pc}(mV)$	
CBDCAOX	- 625,4( $\pm 0,0$ )	-	-
CBDCAOX - GUANINA	-625,1( $\pm 0,5$ )	0,30	0,05
CBDCAOX - CITOSINA	-625,4( $\pm 0,5$ )	0,00	0,00
CBDCAOX - ADENINA	-639,4( $\pm 0,6$ )	14,00	2,20
CBDCAOX - TIMINA	-390,3( $\pm 0,6$ )	235,10	37,60



**Figura 3.** Voltamograma Cíclica de CBDCAOX y sus interacciones con guanina, citosina, adenina, y Timina en una razón de 1:1. BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument.

*Interacciones de CBDCAOX y bases nitrogenadas en una razón de 2:1*

Como se muestran los resultados en la tabla 3 y en los voltamogramas de la figura 4. La interacción entre CBDCAOX  $4,0 \times 10^{-3}$  M con guanina, citosina, adenina y timina en una concentración de  $2,0 \times 10^{-3}$  M no muestran un cambio en potencial pero sí en corriente debido a la presencia del un exceso de CBDCAOX libre sin reaccionar. Estos resultados indican que el exceso de CBDCAOX libre sin interaccionar con las bases nitrogenadas no permite observar las interacciones [1, 2, 10, 11].

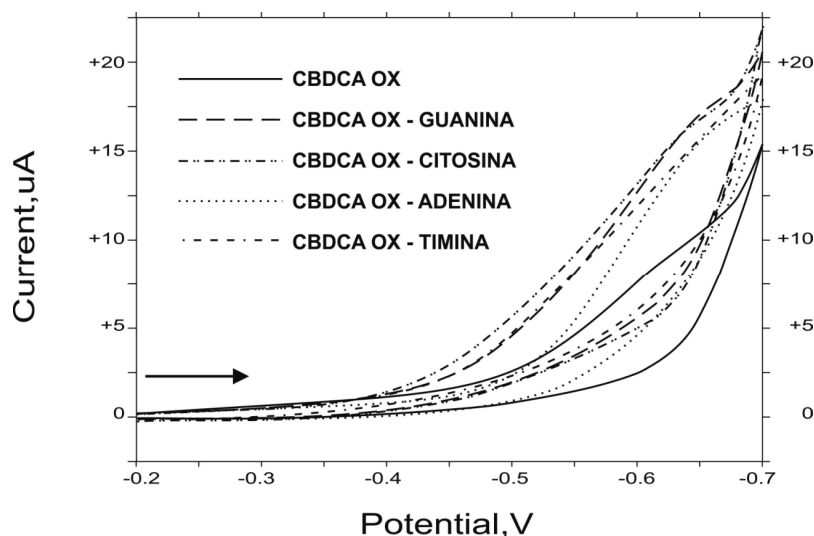
**Tabla 3.** (a) Cambio en corriente catódico y (b) cambio en potencial catódico para las interacciones de CBDCAOX con bases nitrogenadas en una razón de 2:1.

(a) corriente	$I_{pc}(\mu A)$	$\Delta I_{pc}(\mu A)$	% interacción
CBDCA-OX	+ 20,3( $\pm$ 0,25)	-	-
CBDCAOX - GUANINA	+ 14,7( $\pm$ 1,04)	5,4	27,6
CBDCAOX - CITOSINA	+ 15,8( $\pm$ 0,46)	4,5	22,2
CBDCAOX - ADENINA	+ 13,7( $\pm$ 0,40)	6,6	32,5
CBDCAOX - TIMINA	+ 14,1( $\pm$ 0,10)	6,2	30,5
(b) Potencial	$E_{pc}(mV)$	$\Delta E_{pc}(mV)$	
CBDCA	- 625,4( $\pm$ 0,0)	-	-
CBDCAOX - GUANINA	-625,4( $\pm$ 0,0)	0,0	0,0
CBDCAOX - CITOSINA	-625,1( $\pm$ 0,0)	0,3	0,0
CBDCAOX - ADENINA	-625,4( $\pm$ 0,0)	0,0	0,0
CBDCAOX - TIMINA	-625,4( $\pm$ 0,0)	0,0	0,0

*Interacciones de CBDCAOX y bases nitrogenadas en una razón de 1:2*

Como se exhiben los resultados en la tabla 4 y en los voltamogramas de la figura 5. Los voltamogramas de la interacción de CBDCAOX  $2,0 \times 10^{-3}$  M con timina  $4,0 \times 10^{-3}$  M mostraron un cambio en potencial de 155.7 mV y corriente de 3,4 comparando con la señal de reducción de CBDCAOX libre. Este resultado indica que el CBDCAOX ha reaccionado fuertemente con dos moléculas de timina ya que para romper el enlace que los une se ha necesitado mayor potencial. La interacción de CBDCAOX con adenina muestra un cambio en potencial en 35,5 mV

y 0,3  $\mu\text{A}$  de corriente. Estos cambios señalaron que los aductos formados son muy inestables. Pero con guanina y citosina no se formaron los aductos [1, 2, 10, 11].



**Figura 4.** Voltamograma Cíclica de CBDCAOX y sus interacciones con guanina, citosina, adenina y timina en una razón de 2:1. BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument.

**Tabla 4.** (a) Cambio en corriente catódico y (b) cambio en potencial catódico para las interacciones de CBDCAOX con bases nitrogenadas en una razón de 1:2.

(a) corriente	$I_{pc}(\mu\text{A})$	$\Delta I_{pc}(\mu\text{A})$	% interacción
CBDCAOX	+ 9,1( $\pm 0,25$ )	-	-
CBDCAOX - ADENINA	+ 8,8( $\pm 0,00$ )	0,3	3,3
CBDCAOX - TIMINA	+ 5,7( $\pm 0,10$ )	3,4	37,4
(b) Potencial	$E_{pc}(\text{mV})$	$\Delta E_{pc}(\text{mV})$	
CBDCA-OX	-625,4( $\pm 0,0$ )	-	-
CBDCAOX - ADENINA	-660,9( $\pm 0,0$ )	35,5	5,7
CBDCAOX - TIMINA	-469,7( $\pm 0,0$ )	155,7	24,9

## CONCLUSIONES

Experimentalmente se ha logrado sintetizar la droga anticancerosa carboplatino-oxidado, haciendo reaccionar el carboplatino con el peróxido de hidrógeno al 30%.

El comportamiento electroquímico del CBDCAOX al aplicar potenciales negativos sobre el electrodo de oro mostró una señal de reducción en -625,4 ( $\pm 0,0$ ) mV y una corriente de + 9,1 ( $\pm 0,25$ )  $\mu\text{A}$ .

La señal de reducción del CBDCAOX ocurrió por transferencia de un electrón desde el electrodo de oro hacia la droga anticancerosa.

La interacción del CBDCAOX con bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y timina en proporciones 1:1 y 1:2 demostraron claramente la mayor afinidad del CBDCAOX por timina y muy poca afinidad por adenina, guanina y citosina.

Los aductos CBDCAOX-timina en proporciones 1:1 y 1:2 mostraron un cambio significativo en potencial y corriente respecto al CBDCAOX libre, los cuales indican una interacción muy fuerte ya que el potencial aplicado para romper el enlace que los une fue mayor.

## EXPERIMENTAL

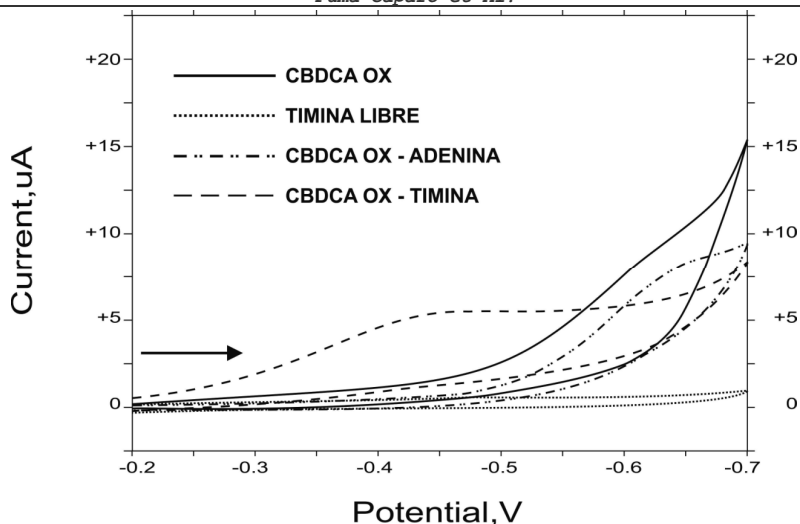


Figura 5. Voltamograma Cíclica de CBDCAOX y su interacción con adenina y timina en una razón de 1:2. BAS CV- 50W C-2 Cell Stand Instrument

#### Reactivos, materiales e instrumentos

Para la síntesis del carboplatino-oxidado (CBDCAOX) el reactivo carboplatino (CBDCA) se ha adquirido de la industria farmacéutica Bristol-Myers Squibb de Puerto Rico y el peróxido de hidrógeno al 30% de la compañía Sigma Aldrich, USA. Para investigar el comportamiento electroquímico del CBDCAOX recientemente sintetizado interaccionando con bases nitrogenadas la guanina, citosina, adenina timina y el Tris-(hidroximetil) aminometanohidroclorhídrico (Tris-HCl) fueron comprados de la Compañía Sigma Aldrich, USA y el cloruro de sodio de alta pureza (NaCl) de la Compañía EM Science, USA. El comportamiento electroquímico del CBDCA-OX libre y sus interacciones con bases nitrogenadas se han estudiado con el analizador voltamétrico, modelo BAS 50W de Bioanalytical Systems, Inc. con una celda que contiene tres electrodos, el electrodo de trabajo (oro), referencia Ag/AgCl/NaCl (3M), y auxiliar (alambre de platino). Todos los potenciales negativos aplicados para la reducción del platino (IV) han sido comparados con el electrodo de referencia Ag/AgCl [1, 2, 10, 11].

#### Voltametría Cíclica

El comportamiento electroquímico del complejo CBDCAOX libre, la solución amortiguadora, bases nitrogenadas libres y los aductos [CBDCAOX-BASES] se realizaron por voltametría cíclica sobre el electrodo de oro, en condiciones fisiológicas de pH 7,4. El intervalo de potenciales fue de -200 mV hasta -700 mV y la velocidad de barrido de 100 mV/s. Para cada corrida el electrodo de oro ha sido limpiado y pulido con pasta de alúmina tamaño 0,05  $\mu\text{m}$  por un tiempo de 1-2 minutos y luego enjuagado con agua desionizada. Antes de aplicar los potenciales, las soluciones en estudio se han purgado con nitrógeno gaseoso de alta pureza (99,99%) por 120 segundos para eliminar el oxígeno presente en la solución. Los experimentos en blanco se llevaron a cabo con soluciones amortiguadoras los mismos han demostrado su inactividad en los parámetros indicados permitiendo determinar la señal de reducción del CBDCAOX.

La interacción del CBDCAOX con las bases nitrogenadas se investigó de la siguiente forma. 1) 4,00 mL de solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M. 2) mezcla de 2,00 mL de solución CBDCAOX libre  $2,0 \times 10^{-3}$  M con 2,00 mL de la solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M. 3) mezcla de 2,00 mL de soluciones bases nitrogenadas  $2,0 \times 10^{-3}$  M con 2,00 mL de solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M. 4) CBDCAOX interaccionado con las bases nitrogenadas [CBDCAOX-BASES] en diferentes proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 [1, 2, 10, 11].

#### REFERENCIAS

1. B.P. Puma C. "Estudios Electroquímicos y Espectroscópicos de las Interacciones de los Complejos de Carboplatino (CBDCA) y Carboplatino-oxidado (CBDCAOX) con bases nitrogenadas" sobre Electrodo de Oro". 2004, Tesis para optar el Grado de Magister en Química, Universidad de Puerto Rico-Recinto Universitario de Mayagüez..



2. N. Chevere, "Estudios Electroquímicos de la interacción del Complejo cis- diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato)-trans-dihidroxoplatino (IV) (CBDCAOX) con Bases Nitrogenadas sobre Electrodo de Platino". **2001**, Tesis para optar el título de Magister en Química, Universidad de Puerto Rico-Recinto Universitario de Mayagüez..
3. M.D. Hall, R.C. Dolman and T.W. Hambley. "Platinum (IV) Anticancer Complexes". Centre for Heavy Metals Research, School of Chemistry, University of Sydney. Sydney NSW, Australia, **2006**.
4. B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Troscio and V. H. Mansour. **1969**, *Nature*, 222, 385.
5. K. R. Harrap. **1984**, *Platinum Metals Rev.*, 28, 14.
6. E.G. Talman, Y. Kidani, L. Morhmann and J. Reedijk. **1988**, *Inorg. Chim. Acta*, 283, 251.
7. L.T. Ellis, H.M. Erhui and T.W. Hambley. **1995**, *Aust. J. Chem.*, 48, 793.
8. S.K. Carter. **1984**, *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, 17, 359.
9. J. F. Hartwing, S. J. Lippard, **1992**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5646.
10. A.J. Bard, L. R. Faulkner. "Electrochemical Methods Fundamentals and Applications". Second Edition. John Willey & Sons, New York, USA, **2001**.
11. Puma Caparó, B.P., Vega Olivencia C.A. **2015**, *Rev. Bol. Quim.*, 32, 30.
12. S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Legasse, A. J. Whitworth et.al. **1998**, *Inorg. Chem.*, 37, 2500.