



# ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF ANTI-CANCER DRUG CARBOPLATIN AND INTERACTIONS WITH NITROGENOUS BASES ON GOLD ELECTRODE

Blas P. Puma-Caparó\*<sup>1</sup>, Carmen A. Vega-Olivencia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Laboratorio de Bioquímica, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Apartado postal N° 921, Tel. 5184-224831 anexo1220, Cusco-Perú. quimblas@hotmail.com

<sup>2</sup>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. carmenamarilis.vega@upr.edu

**Keywords:** Carboplatin, Nitrogenous bases, Gold electrode, Adducts.

## ABSTRACT

The electrochemical behavior results of anticancer Carboplatin (CBDCA) and interactions with adenine, guanine, cytosine and thymine (BASES), allowed knowing the formation of strong bonds between CBDCA, adenine and guanine. These bonds stop DNA replication in cancer cells. The study was carried out by cyclic voltammetry BAS 50W model on a gold electrode at pH = 7,4 and Proton Nuclear Magnetic Resonance <sup>1</sup>H-NMR. The Free CBDCA voltammogram showed an oxidation signal on + 685,5 mV and CBDCA-BASES adducts showed a displacement and disappearance of the CBDCA oxidation signal. *Spanish title:* Comportamiento electroquímico de la droga anticancer carboplatin y sus interacciones con las bases nitrogenadas sobre el electrodo de oro en condiciones fisiológicas.

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

## RESUMEN

Los resultados del comportamiento electroquímico del anticáncer carboplatino (CBDCA) e interacciones con adenina, guanina, citosina y timina (BASES), permitieron conocer la formación de enlaces fuertes entre CBDCA, adenina y guanina. Estos enlaces detienen la replicación del DNA en células cancerosas. El estudio se llevó a cabo con voltametría cíclica modelo BAS 50W sobre el electrodo de oro a un pH=7,4 y Resonancia Magnética Nuclear de Protón, <sup>1</sup>H-NMR. El voltamograma de CBDCA libre mostró una señal de oxidación en + 685,5 mV y los aductos CBDCA-BASES mostraron desplazamiento y desaparición de la señal de oxidación del CBDCA.

## INTRODUCCION

Muchos estudios demostraron el interés en la síntesis de los medicamentos anticáncer en cuyas estructuras está presente el platino, el cisplatino, Cis-diaminodicloro platino (II), y carboplatino, Cis-diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II), abreviado como CBDCA, ambos utilizados para aliviar ciertos tipos de cáncer [1-4]. Estos medicamentos en los pacientes interaccionan con las bases nitrogenadas del ácido desoxirribonucleico (DNA) [5,6]. Después del descubrimiento de la actividad biológica de los complejos de platino por Rosenberg en 1969, se han realizado muchas investigaciones con diferentes complejos de platino para el tratamiento del cáncer [7,13]. El cisplatino es el más utilizado en el tratamiento contra el cáncer en los ovarios, testículos, seno, colon, etc. pero genera ciertas limitaciones en su actividad [7-10].

El carboplatino CBCCA ha demostrado detener el crecimiento de las células infectadas eficientemente, con menos efectos secundarios que el cisplatino [11-14]. En la célula el cisplatino se hidroliza fácilmente perdiendo sus dos iones de cloro y luego interacciona inmediatamente con el DNA. Mientras el Carboplatino demora en hidrolizarse aproximadamente 14 días para interaccionar con las bases del DNA. [13,15]. En 1982 muchos investigadores manifestaron que los complejos de platino tienen mayor preferencia de formar aductos con guanina

mediante el N-7 [2,4]. El CBCCA tiene mayor importancia porque produce menos efectos adversos, por su fácil administración por vía oral y bajo costo [2,8,15]. Un experimento *in vivo* demostró la reducción de los complejos del platino (IV) en platino (II), el cual interacciona con las bases del DNA, ya que en el análisis de plasma y orina de pacientes que estaban bajo tratamiento con los medicamentos del platino (IV) se ha encontrado pequeñas cantidades de compuestos de Platino (II) [9,10].

En este trabajo se estudió el comportamiento electroquímico del carboplatino e interacciones con bases nitrogenadas sobre electrodo de oro en condiciones fisiológicas a pH 7.4, utilizando voltametría cíclica modelo BAS 50W y  $^1\text{H NMR}$  [3,7,9,13]. Ver Figura 1.

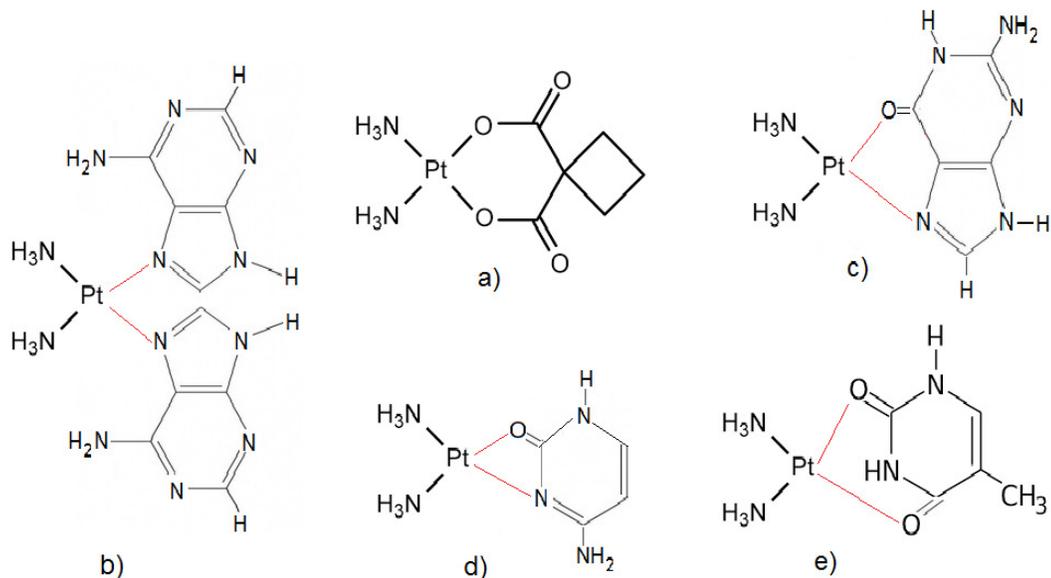


Figura 1. Estructuras de los complejos: a) CBDCA libre b) CBDCA-adenina c) CBDCA-guanina d) CBDCA-citosina y e) CBDCA-timina.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Resultados de voltametría cíclica

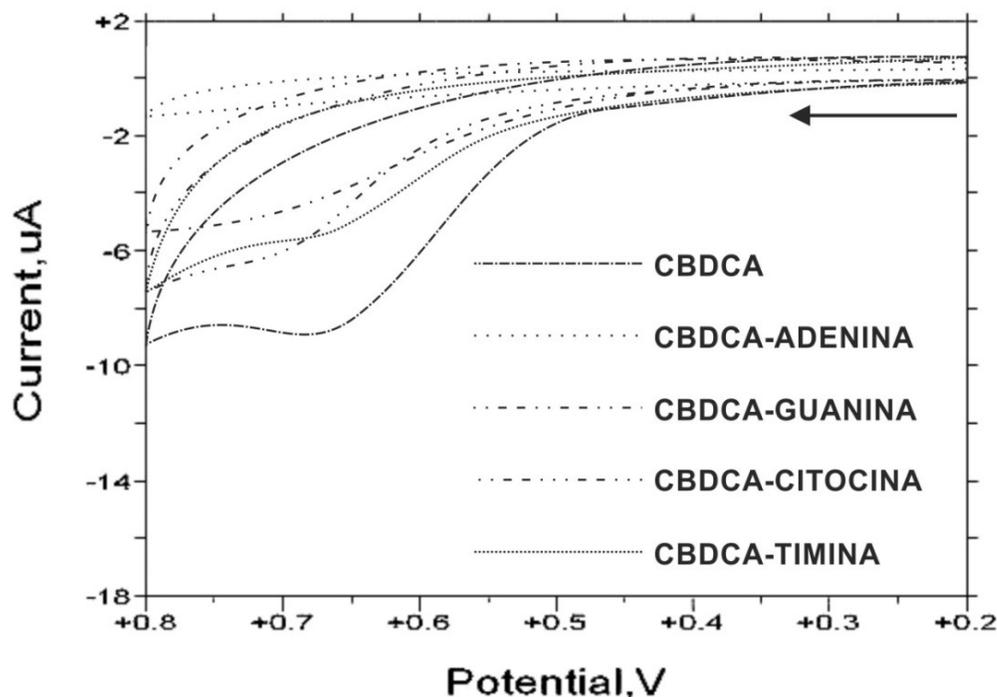
Los resultados de voltametría cíclica para la solución de CBDCA en solución amortiguadora muestran una señal de oxidación en 685,5 ( $\pm 2,5$ ) mV, con una corriente de 8,94 ( $\pm 0,06$ )  $\mu\text{A}$ . Los resultados de los aductos CBDCA-BASES muestran diferentes señales de oxidación ( $E_{pa}$ ) e intensidades de corriente ( $I_{pa}$ ). Para medir la magnitud de la interacción entre el CBDCA y BASES se consideraron la forma y el desplazamiento de las señales de oxidación de los aductos.

### Interacciones de CBDCA y las bases nitrogenadas a una razón de 1:1

Como se muestra los resultados en la tabla 1 y los voltamogramas en la figura 2, la interacción de CBDCA con adenina muestra un cambio en potencial de 110,7 mV y en corriente de 7,51  $\mu\text{A}$  comparando con CBDCA libre, estos cambios son muy significativos e indican una interacción muy fuerte. En este proceso el CBDCA ha perdido sus electrones en una solución homogénea de manera que no le quedan más electrones para ceder al electrodo. La interacción de CBDCA con guanina muestra un cambio en potencial de 62,8 mV y en corriente de 3,97  $\mu\text{A}$ , los cuales indican que existe una interacción fuerte, transfiriéndose los electrones en una solución heterogénea [3, 8, 14]. La interacción con citosina muestra un cambio en potencial de 35,7 mV y en corriente de 2,45  $\mu\text{A}$ , y con timina un cambio en potencial de 4,5 mV y en corriente de 3,41  $\mu\text{A}$  estos resultados indican una interacción muy débil o no se forma nada. El porcentaje de interacción confirma que la interacción de CBDCA-ADENINA fue de 16% es decir 1,77 veces más fuerte que guanina, 3,2 veces más fuerte que citosina y 22,8 veces más fuerte que timina lo que indica que la droga tiene mayor afinidad por la adenina seguida de guanina [3, 8, 14].

**Tabla 1.** Cambio en potencial y corriente para las interacciones de CBDCA y bases nitrogenadas a razón de 1:1

(a) corriente	$I_{pa}$ ( $\mu$ A)	$\Delta I_{pa}$ ( $\mu$ A)	% interacción
CBDCA	- 8,94( $\pm$ 0,06)	-	-
CBDCA + Adenina	- 1,43( $\pm$ 0,06)	7,51	84
CBDCA + guanina	- 4,97( $\pm$ 0,12)	3,97	44
CBDCA + citosina	- 645( $\pm$ 0,07)	2,45	28
CBDCA + timina	- 5,53( $\pm$ 0,05)	3,41	38
(b) Potencial	$E_{pa}$ (mV)	$\Delta E_{pa}$ (mV)	
CBDCA	685,5( $\pm$ 2,5)	-	-
CBDCA + Adenina	796,3( $\pm$ 0,3)	110,7	16
CBDCA + guanina	748,3( $\pm$ 1,32)	62,8	9
CBDCA + citosina	721,2( $\pm$ 2,3)	35,7	5
CBDCA + timina	690,0( $\pm$ 11,7)	4,5	0,7



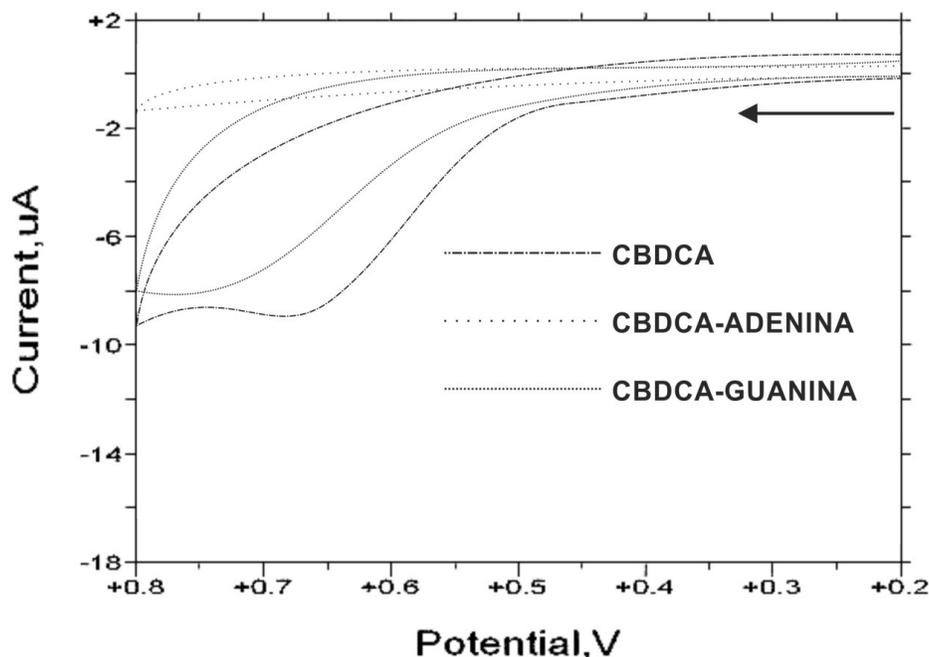
**Figura 2.** Voltamograma Cíclica de CBDCA y sus interacciones con Adenina, Guanina, Citosina y Timina a una razón de 1:1, BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument.

#### Interacciones de CBDCA y bases nitrogenadas a una razón de 2:1

Según los resultados en la tabla 2 y los voltamogramas de la figura 3, la interacción entre CBDCA  $4,0 \times 10^{-3}$  M y adenina  $2,0 \times 10^{-3}$  M muestra un cambio en potencial en 73,5 mV y en corriente de 7.88  $\mu$ A, lo que indica la formación de un enlace muy fuerte entre CBDCA y ADENINA. En la interacción con guanina también se manifiesta un cambio en potencial en 77,1 mV y en corriente de 0,66  $\mu$ A los cuales revelan la formación de un enlace fuerte.

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

(a) Corriente	$I_{pa}(\mu A)$	$\Delta I_{pa}(\mu A)$	% interacción
CBDCA	- 8,94( $\pm$ 0,06)		
CBDCA + Adenina	- 1,12( $\pm$ 0,09)	7,8	87,24
CBDCA + guanina	- 8,28( $\pm$ 0,09)	0,66	7,38
(b) Potencial	$E_{pa}(mV)$	$\Delta E_{pa}(mV)$	% interacción
CBDCA	685,5( $\pm$ 2,5)		
CBDCA + adenina	759,0( $\pm$ 4,25)	73,5	10,7
CBDCA + guanina	762,6( $\pm$ 2,07)	77,1	11,2



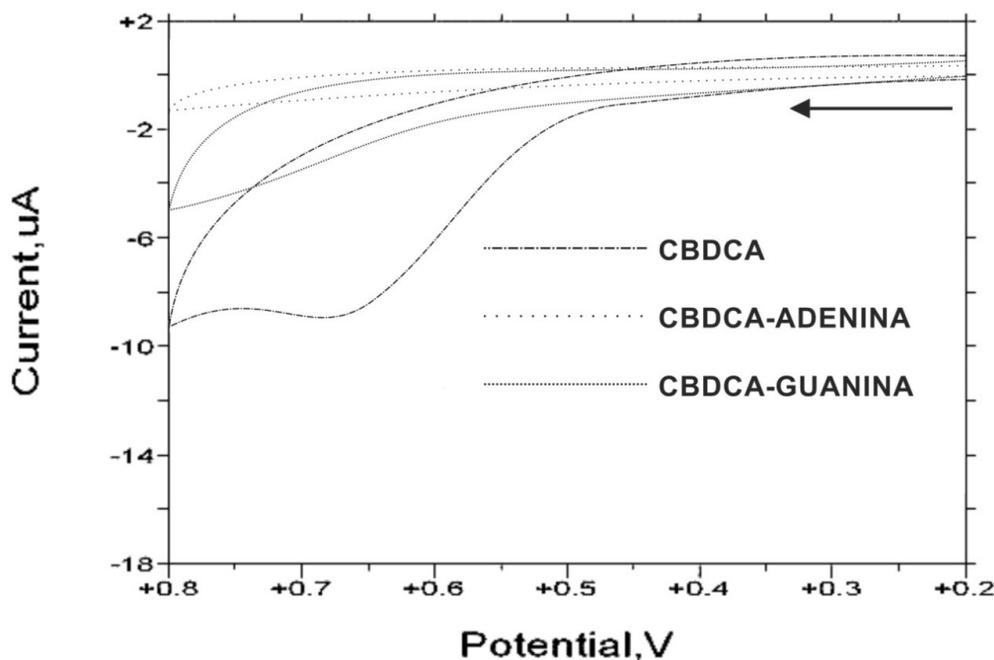
**Figura 3.** Voltamograma Cíclica de CBDCA y sus interacciones con Adenina y guanina en una razón de 2:1. BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument.

#### Interacciones de CBDCA y bases nitrogenadas a una razón de 1:2

Los resultados de estas interacciones se muestran en la tabla 3 y en la figura 4. Los voltamogramas de la interacción de CBDCA  $2,0 \times 10^{-3}$  M con adenina  $4,0 \times 10^{-3}$  M exhiben un incremento de potencial en 65,2 mV en dirección de oxidación y una disminución en corriente en 7,8  $\mu A$ . Igualmente, la interacción de CBDCA con guanina muestra un cambio en potencial en 73,1 mV y 4,4  $\mu A$  de corriente comparando con la señal de oxidación de CBDCA libre. Estos cambios indican que estas especies forman aductos bien estables que dificultan la oxidación del platino del complejo.

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

(a) Current	$I_{pa}(\mu A)$	$\Delta I_{pa}(\mu A)$	% interacción
CBDCA	- 8,94( $\pm$ 0,06)	-	-
CBDCA + Adenine	- 1,14( $\pm$ 0,01)	7,8	87,25
CBDCA + guanine	- 4,56( $\pm$ 0,17)	4,4	49,21
$E_{pa}(mV)$	$\Delta E_{pa}(mV)$	$E_{pa}(mV)$	$\Delta E_{pa}(mV)$
CBDCA	685,5( $\pm$ 2,5)	-	-
CBDCA + adenine	750,7( $\pm$ 5,08)	65,2	9,5
CBDCA + guanine	758,6( $\pm$ 1,44)	73,1	10,7



**Figura 4.** Voltamograma Cíclica de CBDCA y su interacción Adenina y Guanina en una razón de 1:2. BAS CV-50W C-2 Cell Stand Instrument.

#### Resultados de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H-NMR}$ ).

Los resultados de la Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H NMR}$ ) confirmaron las interacciones de CBDCA-Adenina, CBDCA-guanina, CBDCA-citosina, y CBDCA-timina [3, 5, 13]

Al comparar los espectros de adenina libre  $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$  con el aducto CBDCA-adenina  $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$  se observaron desplazamientos químicos de protón hacia campos altos de H(8) y H(2) en  $\Delta\delta = 0,3836$  y  $0,3710$  ppm respectivamente. Estos desplazamientos indican una hay una interacción muy fuerte entre el CBDCA y adenina.

El espectro de CBDCA-guanina  $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$  mostró un desplazamiento químico para el H(8) en  $\Delta\delta = 0,3276$  ppm con respecto a guanina libre  $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$  lo cual significa una interacción fuerte entre estas especies.

Finalmente, los espectros CBDCA-citosina y CBDCA-timina comparados con espectros de citosina y timina respectivamente no mostraron ningún desplazamiento, lo que indica que la interacción entre estas especies es débil o no existe.

**Tabla 4.** Resultados de  $^1\text{H-NMR}$  de Adenina y Guanina libres e interacciones con CBDCA  $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$  a una razón de 1:1 a pH fisiológico.

Complejo	$\delta$ H(8) ppm	$\delta$ H(2) ppm
Adenina libre	8,6033	8,5472
Adenina-CBDCA	8,2192	8,1762
$\Delta\delta$	0,3836	0,3710
<b><math>\delta</math> H(8) ppm</b>		
Guanina libre	8,7881	---
Guanina-CBDCA	8,4605	---
$\Delta\delta$	0,3276	---

## EXPERIMENTAL



El carboplatino (CBDCA) fue adquirido de la industria farmacéutica Bristol-Myers Squibb, en Puerto Rico. Las bases nitrogenadas y el Tris-(hidroximetil) aminometanohidroclorehídrico (Tris-HCl) fueron comprados de Sigma Aldrich Co. El cloruro de sodio (NaCl) de la compañía EM Science. El instrumento utilizado para este estudio fue analizador voltamétrico, modelo BAS 50W de Bioanalytical Systems, Inc. con una celda que contiene tres electrodos: electrodo de trabajo (oro), referencia Ag/AgCl/NaCl (3M), y auxiliar alambre de platino. Todos los potenciales han sido comparados versus Ag/AgCl. El electrodo de trabajo fue pulido con pasta de alúmina 0,05  $\mu\text{m}$  por 1-2 minutos y enjuagado con agua desionizada antes de cada experimento [3, 8, 9, 14]. El barrido de potenciales para la oxidación del CBDCA fue de +200 mV a +800 mV. Los experimentos en blanco fueron llevados a cabo con soluciones buffer recientemente preparadas los mismos han demostrado su inactividad en esos intervalos de potenciales permitiendo detectar el comportamiento redox del CBDCA. Para experimentos de Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $^1\text{H-NMR}$ ) se ha utilizado el espectrómetro modelo Bruker Advance DRX 500 MHz. Las muestras se disolvieron en solución amortiguadora NaCl 10 mM y Tris-HCl 100 mM a pH de 7,4 (ajustadas con NaOH de 3 M) y las medidas se llevaron a cabo por tres veces [6, 7, 15].

### *Voltametría Cíclica*

El comportamiento electroquímico de la solución amortiguadora, bases nitrogenadas, CBDCA libre y complejos CBDCA-BASES se realizaron por voltametría cíclica sobre el electrodo de oro, en condiciones fisiológicas, en un intervalo de potenciales de + 200 mV hasta + 800 mV y a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Antes de aplicar potenciales, las soluciones se han purgado con nitrógeno gaseoso de alta pureza (99,99%) por 120 segundos para eliminar el oxígeno presente en la solución. El comportamiento electroquímico de las sustancias se estudiaron en el siguiente orden: Primero, 4,00 mL de la solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M a pH fisiológico. Segundo, mezclando 2,00 mL de la solución CBDCA libre  $2,0 \times 10^{-3}$  M con 2,00 mL de la solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M, resultando una solución de concentración final de  $2,0 \times 10^{-3}$  M de CBDCA. Tercero, mezclando 2,00 mL de la soluciones bases nitrogenadas  $2,0 \times 10^{-3}$  M con 2,00 mL de la solución amortiguadora  $2,0 \times 10^{-3}$  M. Cuarto, CBDCA interaccionado con las bases nitrogenadas en diferentes proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 CBDCA-BASES.

### *Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H RMN}$ )*

#### *Análisis de la solución amortiguadora, carboplatino y las bases nitrogenadas sin interaccionar.*

Los resultados electroquímicos de las interacciones del CBDCA y bases nitrogenadas se han confirmado por Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H NMR}$ ) modelo Bruker Advance-500 MHz (DRX). Para esta confirmación todas las soluciones se han preparado en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se procedió de la siguiente manera: Primero, en un tubo de resonancia se colocó 0,60 mL de la solución amortiguadora a pH 7,4. Segundo, en otro tubo se colocó 0,60 mL de la solución carboplatino  $1,0 \times 10^{-2}$  M. Tercero, en cuatro tubos se colocaron 0,60 mL de cada una de las soluciones de bases nitrogenadas.

#### *Análisis de las interacciones de carboplatino con las bases nitrogenadas CBDCA-BASES*

Las mezclas de 0,60 mL de carboplatino  $1,0 \times 10^{-2}$  M con 0,60 mL de cada base nitrogenada  $1,0 \times 10^{-2}$  M se han hecho interaccionar por 24 horas. Luego se colocaron en el campo magnético del  $^1\text{H NMR}$  para irradiar con ondas de radiofrecuencia (RF) de 500 MHz por un segundo.

## CONCLUSIONES

Para el Carboplatino libre (CBDCA) se determinó una señal de oxidación en + 685,5 ( $\pm 2,5$ ) mV y una corriente de 8,94 ( $\pm 0,06$ )  $\mu\text{A}$

Al aplicar potenciales positivos a los aductos CBDCA-ADENINA en diferentes proporciones 1:1, 2:1, 1:2, éstos mostraron un cambio significativo en el potencial y corriente con respecto al CBDCA libre, los cuales indican una interacción muy fuerte entre el CBDCA y dos moléculas de adenina ya que el potencial aplicado fue insuficiente para romper.

Los aductos CBDCA-GUANINA en proporciones 1:1, 2:1 y 1:2 mostraron un cambio en la señal de oxidación y corriente indicando una interacción fuerte entre CBDCA y una molécula de guanina. Los aductos CBDCA-



CITOSINA y CBDCA-TIMINA mostraron un cambio no significativo en potencial y corriente lo cual indica una interacción muy débil.

Los resultados de voltametría cíclica se comprobaron con  $^1\text{H}$  NMR el cual demostró desplazamiento químico hacia los campos altos solo para H(8),  $\Delta\delta = 0,38$  ppm y H(2),  $\Delta\delta = 0,37$  ppm para CBDCA-ADENINA y H(8),  $\Delta\delta = 0,33$  ppm para CBDCA-GUANINA.

## REFERENCIAS

1. P. Pil, S. J. Lippard, In Encyclopedia of Cancer, Ed. Academic Press: San Diego, CA. **1997**, 1, 392.
2. J. F. Hartwing, S. J. Lippard, J. Am. Chem. Soc. **1992**, 114, 5646.
3. V. López, C. A. Vega, M. Cádiz, E. Meléndez, Journal of Electroanalytical Chemistry, **2004**, 565, 77.
4. B. R. Martin, Acc. Chem. Res., **1985**, 18, 32.
5. O. Vrana, V. Brabec, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, **1988**, 19, 145.
6. L.T. Ellis, M. Erhui, T.W. Hambley, Aust. J. Chem., **1995**, 48, 793.
7. A. J. Rodríguez, Estudios Electroquímicos de la interacción del Complejo cis- diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) con Bases Nitrogenadas. Tesis para optar el título de Magíster en química, Universidad de Puerto Rico- Recinto Universitario de Mayagüez, 2001.
8. A.J. Bard, L.R. Faulkner. "Electrochemical Methods Fundamentals and Applications". Second Edition. John Wiley & Sons, New York, USA, 2001.
9. S.K. Carter. Cisplatin past, present and future. Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, **1984**, 17, 359.
10. N. Goswami, L.L. Bennett- Slavin, N. Rathindra. Journal of the Chemical Society, Chemical Engineering Communication. **1989**, 7, 432.
11. G. M. Schmidt, D.R. Atherton, Anal. Chem. **1986**, 58, 1956.
12. J. Reedijk, Why Does Cisplatin Reach Guanine-N7 with Completing S-Donor Ligands Available in the Cell? Chem. Rev. **1999**, 2499.
13. N. Chevere, "Estudios Electroquímicos de la interacción del Complejo cis- diamino (1,1-ciclobutanodicarboxilato)-trans-dihidroxoplatino (IV) (CBDCA-OX) con Bases Nitrogenadas". Tesis para optar el título de Magister en Química, Universidad de Puerto Rico-Recinto Universitario de Mayagüez. 2001.
14. S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Legasse, A. J. Whitworth et.al. Inorg. Chem. **1998**, 37, 2500.
15. M. Becker, R. E. Port, H. J. Zabel, W.J. Zeller, P. Bachert, J. of Magnetic Resonance. **1998**, 133, 115.