

PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y CITOTOXICIDAD DE COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE Re(I)

Iván Maisuls^{1,2}, Pedro M. David Gara³, Gustavo T. Ruiz², Franco M. Cabrerizo¹

¹IIB-INTECH, Universidad Nacional de San Martín, Av. Int. Marino Km 8,2, CC 164, 7130, Chascomus, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Investigaciones Físicoquímica Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Dpto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Calle 64 Diag. 113, CP (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³CIOP, Comisión de Investigaciones Científicas, C. Centenario y 508, 1897, Gonnet, Buenos Aires, Argentina.

maisulsivan@inifta.unlp.edu.ar

RESUMEN: Los complejos de Re(I) con ligando polipiridínicos han sido extensamente estudiados gracias a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos de aplicación, siendo un área de interés la utilización de los mismos en procesos de fotosensibilización. En este artículo se han estudiado las propiedades fotofísicas y la citotoxicidad (evaluada en células de adenocarcinoma alveolar humano) de nuevos complejos de coordinación de Re(I) con ligandos polipiridínicos y beta-carbolinas como ligandos. Se encontró que la emisión de los complejos depende fuertemente del solvente y que los mismos poseen un alto rendimiento cuántico de ¹O₂. La viabilidad celular disminuyó significativamente al comparar los resultados con el ligando libre, siendo además dependiente del compuesto que se encuentra ligado al metal de transición.

PALABRAS CLAVE: Re(I), Citotoxicidad, Fotofísica

Las beta-carbolinas (βCs) son un grupo de alcaloides derivados estructuralmente del 9H-pyrido[3,4-b]índol (norharmano) (figura 1). En la naturaleza, estas βCs son usualmente encontradas en plantas, algas y animales [1]. En los últimos años, se ha demostrado que estos compuestos poseen interesantes propiedades antiparasitarias, antibacterianas, antivirales y antitumorales (entre otros) [2]. Además, muchos de estos procesos pueden ser potenciados por acción de la luz (procesos fotosensibilizados). Asimismo, se ha demostrado que algunas βCs son foto-activas, participando en diferentes procesos fotobiológicos. Por ejemplo, en plantas, las βCs tendrían cierta participación en los mecanismos de defensa, mediados por acción fototóxica, contra insectos, gusanos y otros agentes invasores [3]. Cabe aclarar que, si bien ciertos derivados han sido descritos como potenciales antimicrobianos o antibacterianos, son a la vez potentes neurotóxicos, probablemente implicados en la generación de enfermedades como Alzheimer o Parkinson. En estas patologías, la metilación del nitrógeno piridínico sería un factor clave [4]. Es necesario mencionar que el norharmano puede cruzar la barrera hematocefálica y penetrar en el cerebro, en donde es convertido mediante metil-transferasas a derivados metilados los cuales son el componente que genera el daño cito y neurotóxico. Esto claramente reduce su aplicabilidad como drogas sistémicas y, por lo tanto, deja a la vista la necesidad de buscar/probar otros derivados.

Una posibilidad para disminuir la toxicidad de estos alcaloides es bloquear el nitrógeno piridínico, impidiendo la metilación del mismo. En este marco, la coordinación de estos alcaloides a metales de transición por medio del mencionado nitrógeno es una excelente opción.

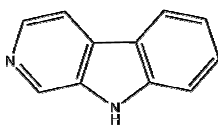


Figura 1. Estructura del norharmano

Los complejos tricarbónicos de Re(I) con ligandos polipiridínicos (XRe(CO)₃L) son una excelente opción para cumplir este objetivo y además poder evaluar los complejos para diferentes propósitos, ya que los mismos poseen una excelente estabilidad térmica y fotoquímica, pudiendo además actuar como fotosensibilizadores. Estos complejos poseen una amplia gama de aplicaciones tales como estudios de transferencia electrónica, conversión de energía solar, catálisis y pueden ser utilizados como biomarcadores. Previamente ya hemos reportado la síntesis y caracterización de dos nuevos complejos de Re(I) con βCs como ligandos, siendo los mismos Re(CO)₃(bpy)(nHo)]CF₃SO₃ (**ReBpy**) y Re[(CO)₃(phen)(nHo)]CF₃SO₃ (**RePhen**) donde bpy = 2,2' bipyridina y phen = 1,10 fenantrolina [5].

En este trabajo se presenta la caracterización fotofísica de tres complejos de Re(I) y su citotoxicidad en células de adenocarcinoma alveolar humano (línea A549). Los estudios se realizaron utilizando los complejos ReBpy, RePhen y un nuevo complejo, Re[(CO)₃(dppz)(nHo)]CF₃SO₃, donde dppz = dipirido [3,2-a:2',3'-c]fenazina (**ReDppz**).

La síntesis de ReBpy y RePhen fue realizada siguiendo el protocolo previamente publicado. La obtención de ReDppz se realizó mediante un protocolo similar, utilizando dppz como ligando bipyridínico.

Se realizaron medidas de espectroscopia de absorción UV-vis utilizando metanol (MeOH) como solvente. Los espectros de emisión (λ_{exc}=350 nm) fueron realizados en solventes de polaridad creciente [Acetonitrilo (ACN), Diclorometano (CH₂Cl₂) y MeOH], bajo atmósfera de N₂. Para la determinación del rendimiento cuántico de oxígeno singlete (¹O₂) se utilizó un laser Nd-YAG (λ=355 nm) variando la fluencia del mismo, utilizando ACN como solvente. Para las medidas de citotoxicidad, se realizó un estudio MTT utilizando diferentes concentraciones de complejos. El mismo se realizó por triplicado y los resultados fueron analizados mediante el test de ANOVA para descartar datos anómalos.

En los espectros de absorción UV-vis de los complejos estudiados, se pudieron observar bandas de absorción asignadas a transiciones $\pi-\pi^*$ intra-ligando del nHo (IL_{nHo}), como así también bandas de transferencia de carga metal a ligando (MLCT) en la región visible (figura 2). Estas asignaciones han sido confirmadas mediante cálculos utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT).

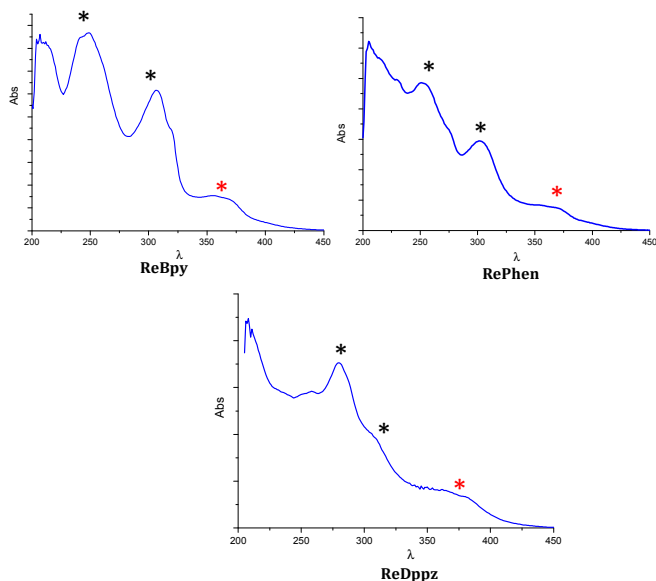


Figura 2: Espectros de absorción UV-Vis de los complejos mencionados. Los * indican las bandas $\pi-\pi^*$ asignadas IL_{nHo} y los * indican las bandas asignadas de MLCT.

Los espectros de emisión de los complejos muestran una fuerte dependencia con el solvente. Al observar los espectros de emisión del ReBpy (figura 3) se puede observar una banda de emisión en el rango de 500-600 nm (asignada previamente a la emisión de una transferencia $MLCT_{Re \rightarrow bpy}$). Se evidencia que tanto en MeOH como en ACN, esta banda posee su máximo en $\lambda \approx 575$ nm. En cambio, en un solvente menos polar como el CH_2Cl_2 , se observa que dicha banda posee su máximo en $\lambda \approx 545$ nm.

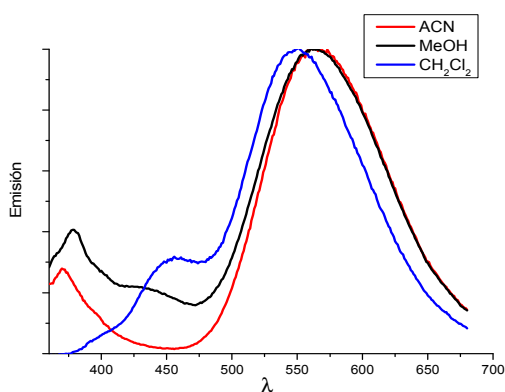


Figura 3: Espectro de emisión del $Re[(CO)_3(bpy)(nHo)]CF_3SO_3$ en ACN, CH_2Cl_2 y MeOH.

En el espectro también se evidencian diversas bandas de emisión en el rango de 380-450 nm. Como se puede observar, la presencia de estas bandas depende fuertemente del solvente con el cual se trabaja. En ACN se observa una sola banda en $\lambda \approx 375$ nm, asignada previamente a una emisión del tipo IL_{nHo} . En cambio en MeOH es posible observar una pequeña banda adicional en $\lambda \approx 430$ nm. Dado que esta banda aparece en el espectro de emisión del nHo libre cuando el mismo se encuentra

protonado ($nHoH^+$), es posible asignarla a una emisión en el complejo de tipo IL_{nHo} . Finalmente, en CH_2Cl_2 se observa una banda de emisión con corrimiento batocrómico respecto a aquella observada en MeOH a $\lambda \approx 450$ nm.

Esta diferencia en los espectros de emisión podría deberse a que la estabilidad de los estados excitados emisores identificados en el complejo puede modificarse con la polaridad del solvente. En el rango de λ comprendido entre 375 y 450 nm, el espectro de emisión en un solvente de baja polaridad, muestra una única banda de emisión, sugiriendo la estabilización de un estado excitado IL_{nHo} de más baja energía, desactivando los estados de energía más alta. Este resultado sugiere que la coordinación del nHo al Re(I) puede generar una redistribución de carga sobre el ligando, similar a la encontrada en el $nHoH^+$ (IL_{nHoH^+}). Esta redistribución de carga podría verse favorecida en medios de baja polaridad. Al estudiar los espectros de emisión del RePhen como del ReDppz, se observaron resultados similares a los obtenidos para el ReBpy.

La determinación del rendimiento cuántico de 1O_2 se detalla en la tabla 1.

Tabla 1: Rendimiento cuántico de formación 1O_2 de los complejos utilizando como referencia la fenalenona; ($^1O_2 = 0.975$)

Complejo	Rendimiento de 1O_2
ReBpy	0.28 ± 0.03
RePhen	0.308 ± 0.06
ReDppz	0.360 ± 0.05

Dado que estos complejos poseen una potencial aplicación biológica, se midió la citotoxicidad de los mismos mediante el ensayo de MTT. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. IC_{50} de los complejos evaluados y del norharmano libre.

Complejo	IC_{50}
$Re[(CO)_3(bpy)(nHo)]CF_3SO_3$	$81.2 \pm 1.4 \mu M$
$Re[(CO)_3(phen)(nHo)]CF_3SO_3$	$70.4 \pm 1.2 \mu M$
$Re[(CO)_3(dppz)(nHo)]CF_3SO_3$	$8.3 \pm 0.7 \mu M$
nHo	$>250 \mu M$

Es posible observar que los valores de IC_{50} para el ReBpy y RePhen son similares, siendo aproximadamente 4 veces más bajos que la IC_{50} del norharmano libre. Sin embargo, la IC_{50} del ReDppz posee un orden de magnitud menor, probablemente debido a la actividad intercalante que posee el ligando dppz en el ADN, resultado que ya se ha visto previamente en otros complejos de Re(I) con dppz como ligando [6].

Los estudios fotofísicos realizados han demostrado que estos complejos poseen interesantes propiedades que pueden ser exploradas en diferentes áreas de investigación. El alto rendimiento de 1O_2 observado permite evaluar a estos complejos como potenciales candidatos en diferentes tipos de terapias fotodinámicas. Esta última está basada en la administración de un agente fotosensibilizante, y en la posterior estimulación de la zona a tratar mediante luz de la longitud de onda adecuada, induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Los resultados del ensayo de citotoxicidad, demostraron que dos de los complejos poseen una IC_{50} 4 veces menor que la del ligando libre, lo cual

es interesante desde el punto de vista de su utilización en diferentes áreas biológicas. El complejo que posee dppz como ligando, mostro una IC₅₀ del orden de 8,3 μM. Este dato es de sumo interés para la evaluación de este compuesto en terapia anticancerígena (además de todas las otras potenciales aplicaciones). A modo de ejemplo, la IC₅₀ del cisplatino (complejo utilizado en el tratamiento del Cáncer) en la misma línea celular es 8.00 ± 0.5 μM [7].

En conclusión, se han caracterizado fotofísicamente tres nuevos complejos de coordinación que poseen diferentes ligandos polipiridínicos, además del norharmano. En forma complementaria se estudió su citotoxicidad. Estos primeros datos sobre la viabilidad celular, junto a las propiedades fotofísicas, abren un amplio espectro de potencial aplicación de los mismos, principalmente en el área del tratamiento de enfermedades como el Cáncer mediante terapias no convencionales. Sin embargo aun es necesario llevar a cabo una gran cantidad de estudios de viabilidad, proliferación celular, daño genético y aplicabilidad, los cuales ya se están llevando a cabo por los autores.

REFERENCIAS

[1] R.F. Allen, B.R. Holmstedt, "The simple β-carboline alkaloids", *Phytochem.* 19, **1980**, 1573 - 1582.

[2] R. Cao, W. Fan, L. Guo, Q. Mac, G. Zhang, J. Li, X. Chen, Z. Ren, L. Qiu, "Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents." *Eur. J. Med. Chem.* 60, **2013**, 135 - 143.

[3] C. de Meester, "Genotoxic potential of beta-carbolines: a review", *Mut. Res.* 339, **1995**, 139-153.

[4] J. Hamann, H. Rommelspacher, A. Storch, H. Reichmann, G. Gille, "Neurotoxic mechanisms of 2,9-dimethyl-β-carbolinium ion in primary dopaminergic culture" *J. Neurochem.* 98 (4), **2006**, 1185-1199.

[5] I. Maisuls, E. Wolcan, O.E. Piro, G.A. Etcheverria, G. Petroselli, R. Erra-Balsells, F.M. Cabrerizo, G.T. Ruiz "Norharmane rhenium(I) polypyridyl complexes: synthesis, structural and spectroscopic characterization". *Dalton Trans.* 44, **2015**, 17064-17074.

[6] G.T. Ruiz, M.P. Juliarena, R.O. Lezna, E. Wolcan, M.R. Feliz, G. Ferraudi, "Intercalation of fac-[(4,4'-bpy)ReI(CO)3(dppz)]⁺, dppz = dipyriddy[3,2-a:2,3'-c]phenazine, in polynucleotides. On the UV-vis photophysics of the Re(I) intercalator and the redox reactions with pulse radiolysis-generated radicals". *Dalton Trans.* 20, **2007**, 2020-2029.

[7] R. Ahmad Khan, K. Al-Farhan, A. de Almeida, A. Alsalmeh, A. Casini, M. Ghazzali, J. Reedijk, "Light-stable bis(norharmane)silver(I) compounds: Synthesis, characterization and antiproliferative effects in cancer cells" *J. Inorg. Biochem.* 140, **2014**, 1-5.