

Estudio electroquímico del compuesto $[Zn(1,10\text{-fen})_3]^{2+}$ y su interacción con insulina humana

Marisela Cruz Ramírez¹, Luis Javier Salomón Victoriano², Estefani Alonso Callejas³,
Francisco J. Tenorio Rangel⁴ y Luis Ortiz Frade⁵

⁵lortiz@cideteq.mx

^{1,2,3 y 5} Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C.,
Sanfandila, Pedro de Escobedo, Querétaro, México.

⁴ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Lagos.

Departamento de Ciencias Exactas y Tecnologías, Lagos de Moreno, Jalisco, México.

Resumen

En el presente trabajo se sintetizó y caracterizó un compuesto tris quelato de Zn(II) con el ligante 1,10-fenantrolina con la finalidad de estudiar su comportamiento electroquímico y proponer sus procesos redox soportado con cálculos de DFT. Se estudia también la interacción de este compuesto con insulina humana usando dicroísmo circular. Los resultados de este trabajo tienen la finalidad de contribuir en el diseño de nuevos metalo-fármacos con metales esenciales tales como Zn(II).

Palabras clave: Compuestos de coordinación, electroquímica, DFT, Dicroísmo Circular

Abstract

In the present work Zn (II) tris chelate coordination compound with the ligand 1,10-phenanthroline was synthesized and characterized to study its electrochemical behavior in order to propose their redox processes supported by DFT calculations. Furthermore, it was studied its interaction with human insulin using circular dichroism. The results of this work are intended to contribute to the design of new metallodrugs with essential metals such as Zn (II).

Keywords: Coordination compounds, electrochemistry, DFT, circular dichroism

Artículo arbitrado

Recibido:
22 de abril de 2019

Aceptado:
31 de julio de 2019

Introducción

Una amplia gama de compuestos base metálica han sido probados como antiinflamatorios, antibacterianos y antitumorales. Recientemente, se han centrado en el uso de complejos con metales de baja toxicidad que se encuentran naturalmente en el cuerpo y cumplen funciones específicas. En la literatura se han estudiado ampliamente los metales como Co(II), Ni(II), Mn(II), Fe(II) y Cu(II) (Hernández-Ayala et al., 2018; Sadeek & El-Hamid, 2016; Tabrizi, McArdle, Ektefan, & Chiniforoshan, 2016). De igual importancia se encuentra el Zn(II) ya que realiza aproximadamente más de 50 reacciones bioquímicas, es esencial en los procesos biológicos y es un cofactor de muchas enzimas y proteínas reguladoras (Abu Ali et al., 2014; Jabali & Abu Ali, 2016). Además, la interacción del Zn(II) con compuestos orgánicos antibacterianos aumenta la actividad biológica (Dos Santos, Ely, Dumas, & Moura, 2015). La mayoría de los complejos de Zn(II), especialmente con ligantes mixtos donadores N,N', han mostrado unión al ADN y albúmina, así como una elevada actividad antioxidante (Lazou et al., 2019). Se ha informado que uno de los ligantes que modulan las propiedades biológicas de los complejos quelatos son los derivados de la 1,10-fenantrolina, en tanto que mejoran su actividad antifúngica, antiviral y antineoplásica (Chai, Hu et al., 2018).

Se ha demostrado también que la adición de zinc retarda la absorción subcutánea de la insulina, lo cual prolonga la duración de su acción y disminuye el número de dosis requeridas en hiperglicemia. La deficiencia de zinc reduce la actividad del páncreas, lo que se traduce en una menor producción de insulina y, por lo tanto, en altos niveles de glucosa en la sangre (Marie, M. et al 2015). Este hecho ha despertado el interés por reportar una amplia variedad de complejos de zinc(II) con potencial actividad para el tratamiento de diabetes. No obstante, una prueba interesante que puede ayudar al desarrollo de este tipo de fármacos es su interacción con insulina.

Lo antes expuesto nos motiva a sintetizar y caracterizar un compuesto modelo de Zn(II) con el ligante 1,10-fenantrolina para realizar un estudio

electroquímico, que indique sus procesos de transferencia de carga soportado con cálculos de DFT, así como evidenciar su interacción con insulina. Ambos estudios tienen la finalidad de contribuir al diseño de nuevos metalo-fármacos con metales esenciales para enfermedades crónico-degenerativas.

Método

Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo se adquirieron de distintos proveedores y se usaron sin una posterior purificación; Tetrafluoroborato de hexaacuozinc(II) $[Zn(H_2O)_6](BF_4)_2$ (Strem Chemicals), 1,10-fenantrolina monohidrato (Aldrich), KBr (Acros Organics), Metanol HPLC, 99.8 % (J.T. Baker), Dimetilformamida- d_7 99.5 atom. %d con TMS (Aldrich), éter etílico, 99. % (J.T. Baker), ferroceno, 98 % (Aldrich), Hexafluorofosfato de Tetrabutilamonio 98 % (Aldrich), Dimetilsulfóxido (J.T. Baker), agua inyectable destilada y esterilizada (PiSA), insulina humana 100 UI/mL (Pisa)

Técnicas de caracterización

El análisis elemental se llevó a cabo con un equipo marca Fissons Instruments Analyzer modelo EA 1108. Los espectros IR se obtuvieron en un intervalo de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} en pastillas de KBr en un equipo FTIR NexusThermo-Nicolet. Los experimentos de RMN fueron adquiridos con un espectrómetro Anasazi EFT-60, con una frecuencia 60 MHz.

Estudios electroquímicos

Los experimentos electroquímicos se realizaron con un potencióstato-galvanostato EG&G PAR modelo 263A. Se utilizó como electrolito soporte hexafluorofosfato de tetrabutilamonio $TBAPF_6$ 0.1 M disuelto en DMSO. En todas las mediciones electroquímicas se utilizó un arreglo de tres electrodos: como electrodo de trabajo se empleó un electrodo comercial de platino con diámetro de 2mm, como electrodo auxiliar se usó un alambre de platino y como pseudo-referencia se utilizó un

alambre de plata. Antes de cada medición las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno por 5 minutos. La limpieza del electrodo de trabajo se realizó mediante un pulido manual con α Alúmina ($0.3 \mu\text{m}$), para posteriormente enjuagarlo con agua y colocarlo en un baño ultrasónico por un minuto. Los experimentos se realizaron en presencia de ferroceno 1 mM como estándar interno. Todos los potenciales se reportan con respecto al par ferricinio-ferroceno (Fc^+/Fc).

Síntesis de los compuestos de coordinación

$[\text{Zn}(1,10\text{-fen})_3](\text{BF}_4)_2$

1 mmol de la sal $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{BF}_4)_2$ se disuelven en 50 ml de metanol anhidro para posteriormente adicionar gota a gota una disolución de 3 mmol del ligante 1,10-fenantrolina disuelto en 25 ml de metanol. La reacción se deja en agitación durante dos horas. Al término de este tiempo se procedió a separar el metanol con un rotavapor, hasta obtener un precipitado. Se filtra el producto y se lava con éter etílico.

$[\text{Zn}(1,10\text{-fen})_3](\text{BF}_4)_2$. $\text{ZnC}_{36}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{B}_2\text{F}_8$ Análisis elemental; Encontrado %C, 55.32, %H, 3.06, %N, 10.90. Calculado %C, 55.46, %H 3.10, %N, 10.77. FT-IR (cm^{-1} KBr); ν ($=\text{C}-\text{H}$) 3053, ν ($\text{C}=\text{C}$) + ν ($\text{C}=\text{N}$) 1627, 1519, 1582 y 1423; δ ($\text{C}-\text{H}$) 840, 763, y 721 patrón de sustitución. 1924 y 1808 y BF_4^- iónico 1058. NMR (60 MHz, DMF- d_7); $\delta(\text{H}_1) = 7.89$ ppm (2) dd $\delta(\text{H}_3) = 8.63$ ppm (2) dd $\delta(\text{H}_2) = 7.25$ ppm (2) dd, $\delta(\text{H}_4) = 8.40$ ppm (1) s, $J_{1-2} = 8.1$ Hz $J_{1-3} = 1.8$ Hz $J_{2-3} = 4.3$ Hz.

Cálculos DFT

Se realizaron cálculos según la teoría de funcionales de la densidad con el programa Gaussian 09. Se realizó una optimización de la geometría completa sin restricciones de simetría utilizando el funcional de la densidad B3LYP y el conjunto de base 6-311+G(d,p). La optimización de las geometrías y los mínimos locales fueron verificadas con el número de frecuencias imaginarias (cero). Se usan funcionales híbridos que incluyen en parte la energía de

intercambio de Hartree-Fock, consistentes con los obtenidos utilizando la teoría de perturbaciones Möller-Plesset de segundo orden y conjuntos base, tales como 6-31G (d, p), y cc-pVDZ.

Estudios de interacción complejo-Insulina

Se preparó solución de insulina 0.5M en agua inyectable. Por separado se preparó una disolución del complejo de zinc $[\text{Zn}(1,10\text{-fen})_3]^{2+}$ 1.0×10^{-4} M en agua destilada. La celda utilizada fue de 0.1cm de paso óptico donde se realizaron adiciones de 20 μL de complejo a la solución con proteína. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro de Dicroísmo Circular MOS-500 Biologic en un intervalo de 205-260nm. Todas las mediciones se realizaron a una temperatura controlada de 30°C, donde se mantiene la integridad de la hormona.

Resultados y discusión

Caracterización de los compuestos de coordinación

El espectro IR del compuesto $[\text{Zn}(1,10\text{-fen})_3](\text{BF}_4)_2$ presenta frecuencias típicas de las vibraciones ν ($=\text{C}-\text{H}$), ν ($\text{C}=\text{C}$) + ν ($\text{C}=\text{N}$), flexión fuera del plano δ ($\text{C}-\text{H}$), así como las vibraciones relacionadas al ion BF_4^- . Un análisis de los valores revela un cambio en las frecuencias de vibración ν ($\text{C}=\text{C}$) + ν ($\text{C}=\text{N}$) con respecto al ligante libre, confirmando así la coordinación del Zn (II). En el espectro de ^1H -RMN del complejo $[\text{Zn}(1,10\text{-fen})_3](\text{BF}_4)_2$, se pueden apreciar las señales características de los protones del ligante 1,10-fenantrolina, ver Figura 1. El acoplamiento de cada protón y la asignación se confirmó mediante un experimento de correlación homonuclear H-H COSY, ver Figura 2. Los valores de desplazamiento químico en este compuesto en comparación con el ligante libre presentan cambios debido a la coordinación del Zn (II).

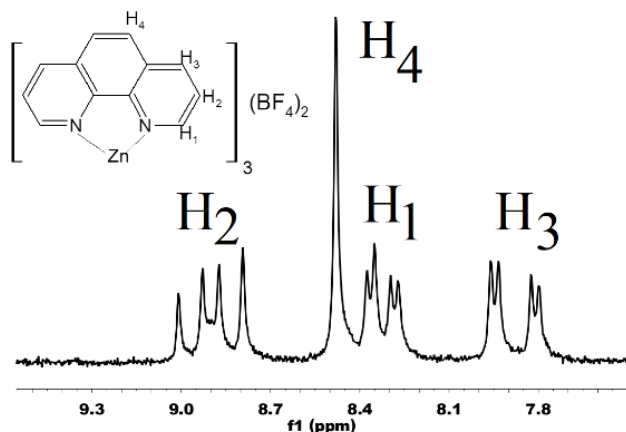


Figura 1. RMN- 1H del complejo $[Zn(1,10-fen)_3](BF_4)_2$ en $DMF-d_7$, TMS como referencia. Fuente: elaboración propia.

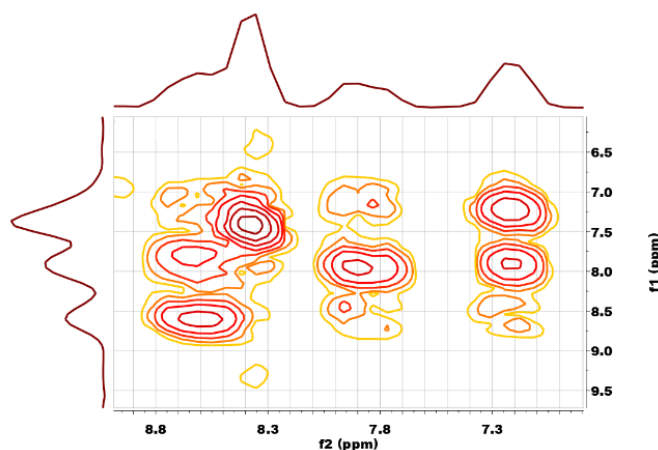


Figura 2. Experimento COSY del complejo $[Zn(1,10-fen)_3](BF_4)_2$ en $DMF-d_7$, TMS como referencia. Fuente: elaboración propia.

Estudio electroquímico de la sal precursora $[Zn(H_2O)_6](BF_4)_2$

La figura 3 muestra un voltamperograma típico para una disolución de $[Zn(H_2O)_6](BF_4)_2$ 1×10^{-3} M en DMSO y en presencia de TBAPF₆ 0.1M a diferentes velocidades de barrido iniciando de potencial de circuito abierto en dirección negativa. Se observa una señal de reducción I_c y una señal de oxidación II_a . A partir de esta gráfica se obtiene una correlación lineal de la corriente del pico (I_c) vs $v^{1/2}$, $I_{pc}(\mu A) = 8.55 + 0.02 v^{1/2}$, $r = 0.997$. A partir de este hecho y de la independencia de los valores $E_{pc}(I_c)$ con $\log(v)$, se puede proponer un proceso controlado por difusión.

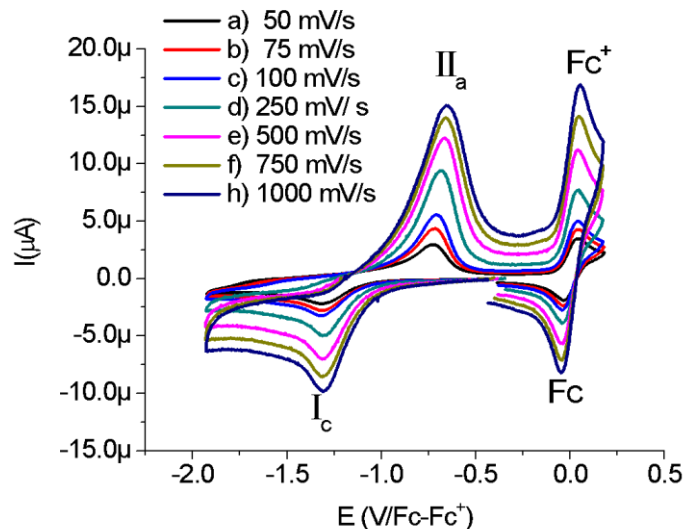
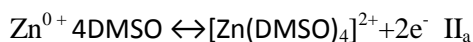
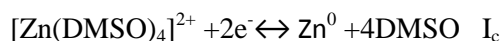


Figura 3. Voltamperograma cíclico de la sal $[Zn(H_2O)_6](BF_4)_2$ a diferentes velocidades de barrido en presencia de TBAPF₆ 0.1M en DMSO. ET Pt. Fuente: elaboración propia.

En el caso de la señal II_a , su forma es indicativa de un proceso de redisolución de un metal sobre un electrodo. A una velocidad de barrido de 100 mV/s se reportan valores $E_{pc}(I_c) = -1.308$ V/Fc-Fc⁺ y $E_{pa}(II_a) = -0.72$ V/Fc-Fc⁺. Considerando lo antes descrito y basado en las propiedades coordinantes del DMSO nos permite proponer las siguientes reacciones electroquímicas para la sal precursora $[Zn(H_2O)_6](BF_4)_2$.



Estudio electroquímico del complejo $[Zn(1,10-fen)_3](BF_4)_2$

La Figura 4 muestra una serie de voltamperogramas cíclicos del compuesto $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$ en concentración 1×10^{-3} M en DMSO + TBAPF₆ 0.1 M. Cuando el barrido se inicia desde circuito abierto en dirección negativa a una velocidad de barrido de 100 mV/s (Figura 4a), se observa dos señales de reducción I_c y II_c y una señal de oxidación I_a^* con valores de potenciales de pico $E_{pc}(I_c) = -1.74$ V/Fc-Fc⁺ y $E_{pc}(II_c) = -1.84$ V/Fc-Fc⁺ y $E_{pa}(I_a^*) = -0.72$

V/Fc-Fc⁺. La ausencia de las señales de oxidación de los procesos I_c y II_c, al invertir el barrido de potencial al aumentar la velocidad de barrido, sugieren un mecanismo EC_i. Un aspecto que resaltar es el cambio de forma de la señal I_a^{*}, debido a la competencia del mecanismo de una reacción electroquímica seguida de una reacción química acoplada irreversible (EC_i) y la redisolución de un posible depósito metálico (Cruz-Ramírez et al, 2019).

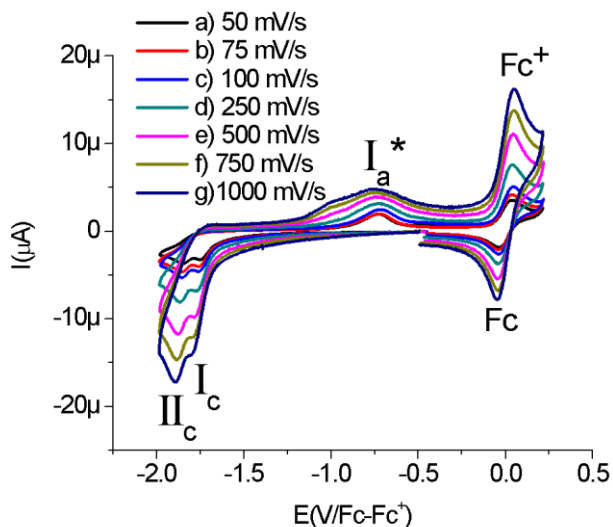
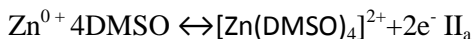
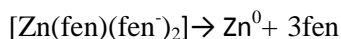
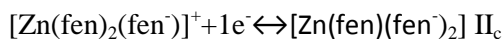
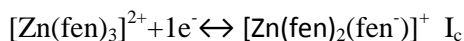


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos del compuesto [Zn(1,10-fen)₃](BF₄)₂ 1x10⁻³ M en DMSO en presencia de TBAPF₆ 0.1M, a diferentes velocidades de barrido. Et Pt. Fuente: elaboración propia.

Con base en esta evidencia y considerando la capacidad de los ligantes diiminicos como la 1,10-fenantrolina (fen) para aceptar electrones, es posible proponer el siguiente mecanismo electroquímico:



A manera de comparación en la Figura 5 se presentan los voltamperogramas de la sal precursora [Zn(H₂O)₆](BF₄)₂ y del complejo [Zn(1,10-

fen)₃](BF₄)₂, de donde se puede inferir que la coordinación de los ligantes diiminicos desplaza los potenciales hacia valores más negativos en los procesos de reducción. También es posible concluir que el complejo con el ligante 1,10-fenantrolina presenta una mayor estabilidad, debido a que este presenta al valor más negativo en su proceso de reducción (Rebolledo et al, 2017).

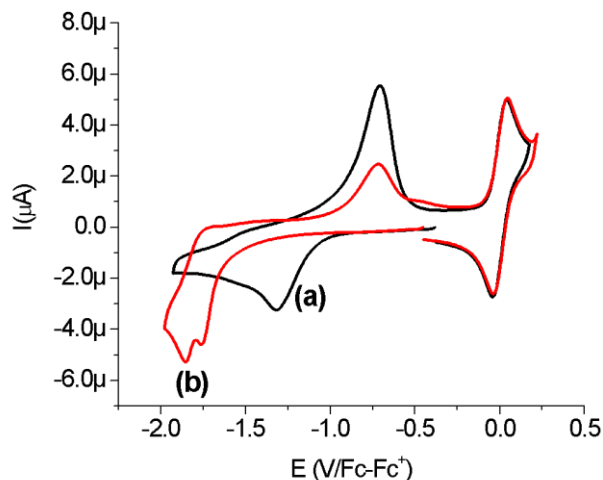


Figura 5. Voltamperograma cíclico de la sal precursora (a) [Zn(H₂O)₆](BF₄)₂ de los complejos (b) [Zn(1,10-fen)₃](BF₄) en concentración 1x10⁻³ M en DMSO + TBAPF₆ 0.1M, vel= 50 mV/s. ET=Pt. Fuente: elaboración propia.

Cálculos teóricos y su correlación con los procesos redox

Con la finalidad de confirmar los sitios de reducción del complejo tris quelato de Zn (II), se presentan las gráficas típicas de los orbitales HOMO y LUMO del catión complejo [Zn(1,10-fen)₃]²⁺. En la Figura 6 se observa el orbital molecular ocupado de más energía (HOMO) sobre los anillos aromáticos y el Zn (II). Por otro parte, en la Figura 7 se aprecia el orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) electrónica sobre los átomos de nitrógeno y la deslocalización electrónica sobre los anillos aromáticos. Los valores calculados de energía HOMO y LUMO son -11.92 y -7.43 (eV) respectivamente.

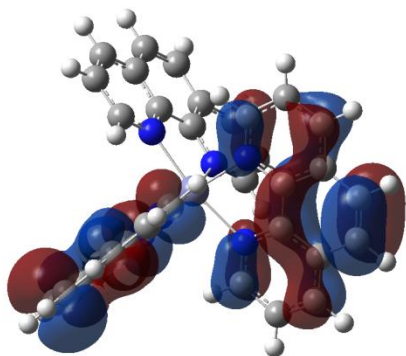


Figura 6. HOMO del catión complejo $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$. Fuente: elaboración propia.

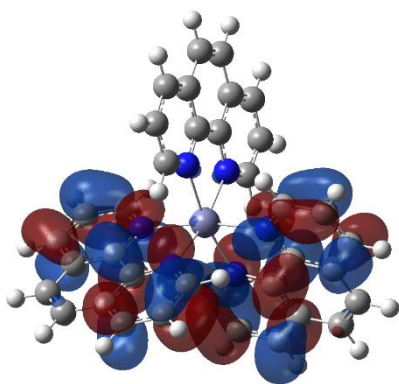


Figura 7. LUMO del catión complejo $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$. Fuente: elaboración propia.

Estudios de interacción complejo-Insulina

Posteriormente se estudió la interacción de insulina con el compuesto de Zn(II) descrito anteriormente. A una disolución de insulina 0.5mM se le agregan distintas alícuotas del compuesto $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$ $1 \times 10^{-4}M$ (20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L). Se puede observar cambios en las bandas de 208 y 220 nm asociadas a la estructura secundaria de la insulina, indicativo de una desnaturalización de la proteína por el compuesto del Zn(II), ver Figura 8. Sin embargo, la absorción de los complejos puede ser un factor que interfiera en la respuesta de dicroísmo y que debe ser considerado (Gang Wu et al, 2019).

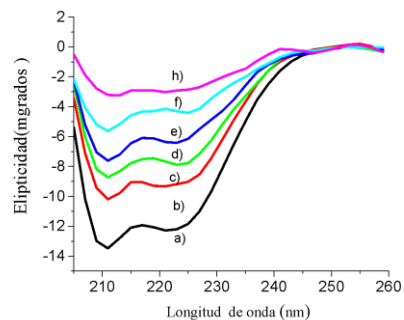


Figura 8. Espectro DC de insulina 0.5 M con alícuotas de $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$ $1 \times 10^{-4}M$ a 30°C a) 0 μ L, b) 20 μ L, c) 40 μ L, d) 60 μ L, e) 80 μ L y f) 100 μ L. Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran dos procesos de reducción para $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$ centrados sobre los ligandos diimínicos con valores más negativos en comparación con el Zn(II) libre, sugiriendo su participación en procesos redox biológicos. Por otro lado se pone en evidencia un cambio en la estructura de la insulina por la presencia del catión $[Zn(1,10-fen)_3]^{2+}$, hecho que indica una inactividad de la proteína, sugiriendo que los mecanismos de acción biológica puede involucrar un una ruta que no implique su interacción con insulina.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los fondos CONACyT-Apoyo a la Infraestructura 2016 (269102), CONACyT-SEP-Ciencia Básica 2016 (288069). MCR agradece también a CONACyT por la beca para la realización de estudios de posgrado.

Referencias

- Abu Ali, H., Fares, H., Darawsheh, M., Rappocciolo, E., Akkawi, M., & Jaber, S. (2014). Synthesis, characterization and biological activity of new mixed ligand complexes of Zn(II) naproxen with nitrogen based ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, pp. 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.032>
- Chai, L. Q., Hu, Q., Zhang, K. Y., Zhou, L., & Huang, J. J. (2018). Synthesis, structural characterization, spectroscopic, and DFT studies of two penta-coordinated zinc(II) complexes containing quinazoline and 1,10-phenanthroline as mixed ligands. *Journal of Luminescence*, 203 (June), pp. 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.06.058>
- Dos Santos, P. R., Ely, M. R., Dumas, F., & Moura, S. (2015). Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn(II) complex containing 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine with valproic acid. *Polyhedron*, 90, pp. 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.02.012>
- Hernández-Ayala, L. F., Flores-Álamo, M., Escalante-Tovar, S., Galindo-Murillo, R., García-Ramos, J. C., García-Valdés, J., Ruiz-Azuara, L. (2018). Synthesis, characterization, theoretical studies and biological activity of coordination compounds with essential metals containing N4-donor ligand 2,9-di(ethylaminomethyl)-1,10-phenanthroline. *Inorganica Chimica Acta*, 470, pp. 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.06.040>
- Jabali, B., & Abu Ali, H. (2016). New zinc (II) complexes of the Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug (indomethacin) and various nitrogen donor ligands. Synthesis, characterization and biological activity. *Polyhedron*, 117, pp. 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.06.003>
- Lazou, M., Hatzidimitriou, A. G., Papadopoulos, A. N., & Psomas, G. (2019). Zinc-oxaprozin compounds: Synthesis, structure and biological activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195 (February), pp. 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.016>
- Marie, M., Mandal, S., Manasreh, O., (2015). An electrochemical glucose sensor based on zinc oxide nanorods. *Sensors* 15, pp. 18714–18723. <https://doi.org/10.3390/s150818714>.
- Sadeek, S. A., & El-Hamid, S. M. A. (2016). Preparation, characterization and cytotoxicity studies of some transition metal complexes with ofloxacin and 1,10-phenanthroline mixed ligand. *Journal of Molecular Structure*, 1122(3), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.05.101>
- Tabrizi, L., McArdle, P., Ektefan, M., & Chiniforoshan, H. (2016). Synthesis, crystal structure, spectroscopic and biological properties of mixed ligand complexes of cadmium(II), cobalt(II) and manganese(II) valproate with 1,10-phenanthroline and imidazole. *Inorganica Chimica Acta*, 439, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.10.015>
- Cruz-Ramírez M., Ramírez-Delgado V., Rebolledo-Chavez J.P., Mendoza-Martínez A., Reyes-Vidal Y., Tenorio F.J., Ruiz-Azuara L., Ortiz-Frade L., Revisiting the role of π acceptor character of polypyridinic ligands in the redox behavior of tris and bis Fe(II) complexes and in the electron transfer with glucose oxidase. *Inorganica Chimica Acta*. 459, 119015 <https://doi.org/10.1016/j.ica.119015>
- Zhu, Y., Xiong, X., Suo, Z., Tang, P., Sun, Q., Ding, X., & Li, H. (2019). Synthesis, structure, and DNA-binding study of a novel Zn (II) complex with fleroxacin and 1,10-phenanthroline monohydrate. *Inorganic Chemistry Communications*, 103(February), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.02.039>
- Gang Wu, Chang Li, Xiaoyu Liua, Juan Lv, Yuxun Ding, Yong Liu, Ying Liu, Fan Huang, Linqi Shia, Yingli An, Rujiang Ma (2019). Glucose-responsive complex micelles for self-regulated delivery of insulin with effective protection of insulin and enhanced hypoglycemic activity in vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 180, pp. 376–383.
- Rebolledo-Chávez J.P., Cruz-Ramírez M., Patakalvi R., Tenorio F.J., Ortiz-Frade L., (2017). Insight on the mechanism of molecular catalysis of CO₂ reduction with Fe (II)-polypyridine complexes. *Electrochimica acta* 247, pp. 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.07.003>