

**UNIVERSIDAD:** Universidad Nacional de La Plata.

**NÚCLEO DISCIPLINAR:** Química Fina.

**TÍTULO DEL TRABAJO: MODIFICACIÓN DE LA ACCIÓN BIOLÓGICA DEL FLAVONOIDE QUERCETINA POR COMPLEJACIÓN CON EL CATIÓN VANADIL(IV). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y BIOLÓGICA.**

**AUTOR/ES:** Salinas María V. , Correa María J., Naso Luciana, Ferrer Evelina, Williams Patricia.

**E-MAIL DE LOS AUTORES:** salinasvicky@hotmail.com, jimecorrea@hotmail.com, luciananaso504@hotmail.com, evelina@quimica.unlp.edu.ar, williams@quimica.unlp.edu.ar

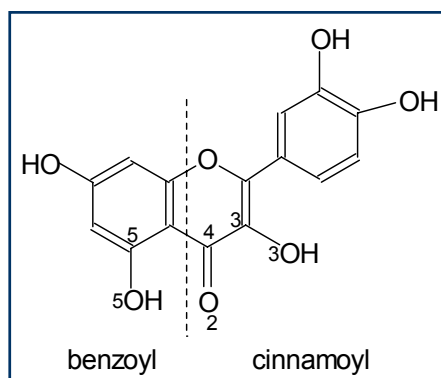
**PALABRAS CLAVES:** Flavonoides. Complejos de vanadio.

**PALAVRAS CHAVES:** Flavonoides. Complexos de vanádio.

## INTRODUCCIÓN

La Quercetina es el flavonoide natural más abundante en vegetales y frutas (esquema). El estudio y la caracterización de las propiedades de este ligando así como el interés reciente en la preparación de complejos con metales de transición, se fundamenta en el gran número de propiedades tanto biológicas como farmacológicas que este presenta (antibacteriales, antioxidantes, anticancerígenas, etc) (1). Por otra parte, es un compuesto fenólico, con una coordinación bidentada de oxígenos del tipo de las quinonas o semiquinonas (sustancias de gran interés en la rama de la biología) que puede actuar como agente quelante de metales de transición cumpliendo eventualmente un papel relevante en la biodisponibilidad (captación y transporte) y en la respuesta tóxica de algunos elementos(2).

El interés en estudiar la interacción del mismo con oxovanadio(IV) radica principalmente en las características también anticancerígenas e insulino similares demostradas para este elemento(3). Sus efectos fisiológicos responden a la capacidad del metal para formar complejos de coordinación y la similitud química entre el fosfato, el vanadato y el catión vanadilo(IV) pentacoordinado.



## OBJETIVOS

- Síntesis de complejos con biometales y ligandos de relevancia biológica y/o farmacológica.
- Generación de sistemas análogos a los existentes en la naturaleza.
- Realización de ensayos de actividades biológicas *in vitro*.
- Correlación de simetría y/o entorno del centro metálico con sus potenciales actividades biológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La quercetina dihidrato (Sigma) y el  $\text{VOCl}_2$  (solución al 50%, Carlo Erba), se usaron como fueron suministrados. Todas las sustancias usadas fueron de calidad analítica.

Los espectros UV-vis fueron registrados en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453. Los espectros de IR, en un espectrofotómetro FTIR Bruker IFS 66. Los análisis elementales de H y C se realizaron con un analizador Carlo Erba EA 1108 y el contenido de vanadio se determinó por el método del ácido tungstosfosvanádico. Los espectros de EPR se midieron con un espectrómetro Bruker ESP300 que opera en las bandas X y Q, equipado con un accesorio Oxford standard de bajas temperaturas. El campo magnético H se calibró usando una muestra de estado sólido DPPH como marcador del campo ( $g\text{DPPH} = 2.0036$ ). Las simulaciones computacionales se llevaron a cabo usando el programa SimFonia (WINEPR SimFonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik, GMBH, 1996).

Los ensayos de fofatasa alcalina se determinaron espectrofotométricamente, iniciando la reacción por agregado del sustrato para-nitrofenilfosfato, p-NPP, generando p-nitrofenol, a  $\text{pH} = 10.5$ . Los cambios espectrales se observaron en 405 nm. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  el error standard de la media (ESM).

*Preparación del complejo  $[\text{VO}(\text{Quer})_2 \cdot \text{EtOH}]_n$ :* Se preparan 30 ml de una solución etanólica mediante el agregado de 1 mmol de quercetina sólida y 0.5 mmoles de solución de  $\text{VOCl}_2$ . La solución resultante se calienta a reflujo durante 3 hs. El pH de la misma se mantiene en 4 mediante el agregado de gotas de NaOH 1M. El precipitado obtenido se filtra en caliente y lava tres veces con etanol frío. Se seca al aire. *Anal. Calc. para  $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{O}_{16}\text{V}$ :* C, 53.71; H, 3.36; V, 7.13. *Exp.:* C, 53.70; H, 3.30; V, 7.09%.

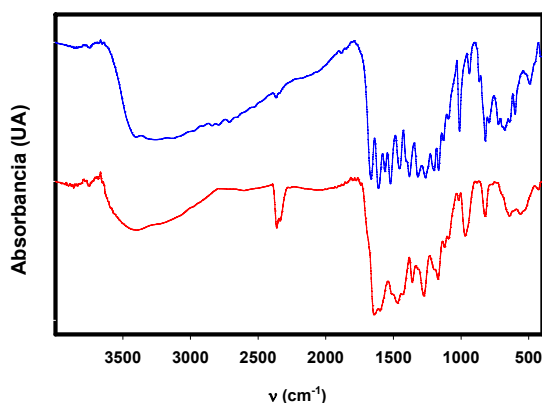
*Espectro UV-Vis:* VO/quer 0.5/1 metanol, 580 (57.6); 650 (h) (53.6); 782 (64)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Caracterización del complejo*

#### *a) Espectroscopía infrarroja*

Los espectros de infrarrojo se muestran en la Figura 1:



**Figura 1:** Espectros de IR de quercetina dihidrato (---) y  $[\text{VO}(\text{Quer})_2 \cdot \text{EtOH}]_n$  (---) en pastillas de KBr. UA: unidades arbitrarias

Los cambios observados en los espectros son similares; las bandas principales y las asignaciones tentativas se presentan en la tabla siguiente:

Asignaciones	Quercetina	[VO(Quer) <sub>2</sub> .EtOH] <sub>n</sub>
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1666 f	1635 mf
$\nu_{\text{anillo}}(\text{C}=\text{C})$	1610 mf, 1562f	1602 mf
$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{as}}$		1511 m
$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{s}}$		1435 f
$\nu(\text{C}-\text{OH})$	1381 f	1362 m
$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	1264 f	1280 mf
$\nu(\text{VO})$		977 m
$\nu(\text{V}-\text{O})_{\text{fenolato}}$		423 d

f= fuerte, mf=muy fuerte, m=mediana, d=débil

De la comparación del espectro vibracional del ligando con el complejo, se puede obtener la siguiente información:

- La frecuencia característica correspondiente al modo vibracional de estiramiento del grupo carbonilo del ligando,  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , decrece  $31 \text{ cm}^{-1}$ , sugiriendo que la coordinación del VO(IV) se produce a través del átomo de O del carbonilo y los grupos 3-OH o 5-OH del ligando, luego de la desprotonación (4,5). En el complejo, el incremento del orden de enlace  $\text{C}4=\text{O}2$  conectado al incremento de  $\text{C}3-\text{O}3$  conduce a un acoplamiento de las vibraciones de estos dos enlaces. Las bandas nuevas en  $1511 \text{ cm}^{-1}$  y  $1435 \text{ cm}^{-1}$  pueden considerarse asociadas con los modos de estiramiento antisimétrico y simétrico, respectivamente, del grupo C-O en el sitio quelante.

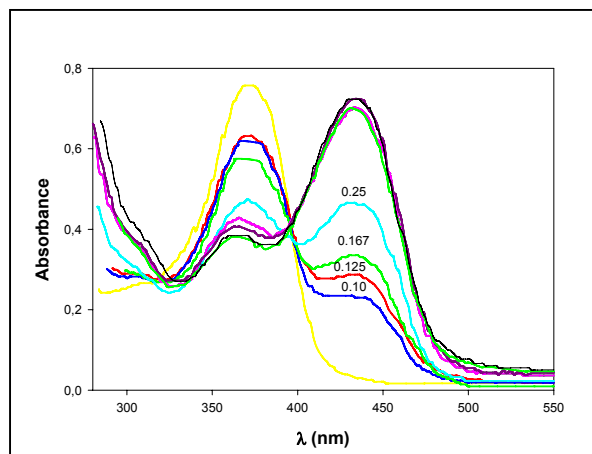
- La banda relacionada al modo  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$   $1264 \text{ cm}^{-1}$  se desplaza ligeramente por formación del complejo, indicando que el átomo de O del anillo no forma parte del enlace con el metal, sólo se altera la estructura del anillo (1,2).

- Las bandas de  $1610$  y  $1562 \text{ cm}^{-1}$  se deben a modos del anillo fenilo. La modificación de las mismas sugiere que la estructura de los 2 anillos se altera por la quelación a través de los átomos de O unidos al anillo (3,4).

- La posición de la banda correspondiente al estiramiento  $\text{V}=\text{O}$  es la característica para un entorno oxigenado de vanadio (6).

#### *b) Titulaciones espectrofotométricas*

Con el fin de tener mayor información con respecto a las estequiometría del sistema VO/Quer en solución, se realizaron una serie de titulaciones espectrofotométricas. En la Figura 2 se muestran tanto el espectro UV-vis de quercetina ( $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) como las titulaciones de quercetina ( $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) con diferentes concentraciones de  $\text{VOCl}_2$  (relaciones ligando: metal desde 2 a 0.1) en metanol.



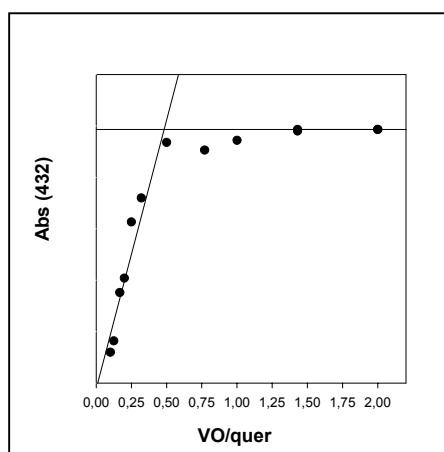
**Figura 2:** Espectro de absorción electrónica de quercetina en ausencia y presencia de catión vanadilo(IV), a diferentes relaciones ligando:metal.

El UV-vis de quercetina presenta las siguientes características:

a) Banda I, relacionada con el resto cinnamoyl, en 370 nm no se corre por complejación pero decrece cuando se agrega vanadilo(IV).

b) Banda II, relacionada con el resto benzoyl, en 258 nm no se corre pero crece con el metal.

Se monitorea los cambios relacionados a la banda que aparece en 432 nm ante la formación de complejo (Figura 2). Esta corresponde al grupo M-3-OH- de quercetina el que genera una redistribución electrónica entre el ligando y el catión vanadilo(IV) generando un sistema  $\pi$  extendido. La transición electrónica  $n\pi^*$  de quercetina cambia a  $\pi-\pi^*$  y la energía es menor, entonces aparece una nueva banda a mayor longitud de onda (se desplaza al rojo)(7). Como puede observarse en la Figura 3, el punto de inflexión se presenta para una relación 2:1 ligando:metal.

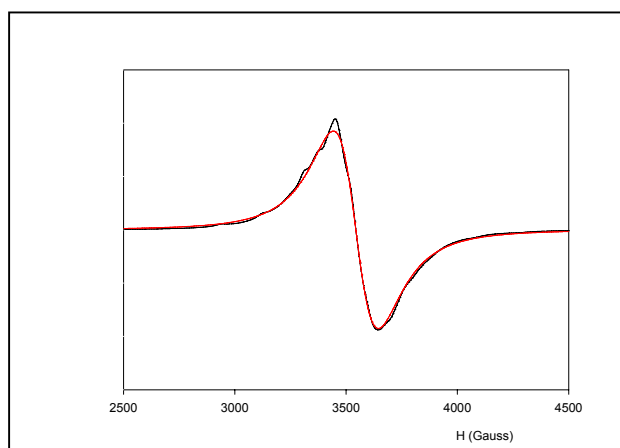


**Figura 3:** Absorbancia vs. relación VO/Quer

c) *Espectroscopía de Resonancia Paramagnética*

Los espectros fueron registrados sobre muestras policristalinas en banda X a temperatura ambiente. En la Figura 4 se presentan los espectros experimentales y simulados para el complejo  $[\text{VO}(\text{Quer})_2\cdot\text{EtOH}]_n$  respectivamente. En la tabla se muestran los valores de los principales parámetros para el Hamiltoniano de Spin, obtenidos mediante la simulación de los espectros con el programa WINEPR SimFonia.

El espectro EPR del complejo muestra la característica banda ancha observada para complejos de vanadilo(IV), con relativamente poca detectable estructura hiperfina (8-12). Estas estructuras se asocian a la presencia de pequeñas cantidades de impurezas de la especie paramagnética monomérica. Las características del espectro se asocian a la presencia de una especie polimérica.



**Figura 4:** Espectro experimental (---) y simulado (---) de EPR de una muestra policristalina de  $[\text{VO}(\text{Quer})_2\cdot\text{EtOH}]_n$  en banda X a 290K.

Los valores obtenidos para los tensores g están de acuerdo con la típica simetría axial para complejos de vanadio(IV)

	g(x)	g(y)	g(z) ó g <sub>  </sub>	g <sub>iso</sub>
$[\text{VO}(\text{Quer})_2\cdot\text{EtOH}]_n$	1.98	1.98	1.96	1.973

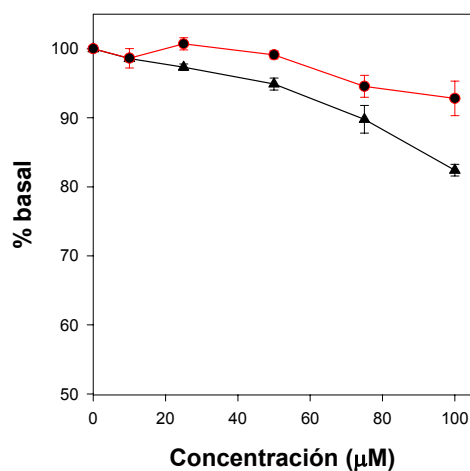
La componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino es sensible a los átomos donores sobre la esfera de coordinación ecuatorial (10), el valor obtenido para el complejo (I) concuerda con lo observado para otros complejos de vanadio(IV) dos ligandos coordinados en el plano ecuatorial a través de grupos C=O y O- (“tipo maltol”) (11). Estos donores fuertes forman en general una estereoisomería trans alrededor del grupo V=O (12). Con lo cual se propone para este complejo una estructura de pirámide con base cuadrada en la cual los ligandos oxigenados ocupan la posición axial, con los dos ligandos en posición trans.

#### d) Actividad de fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de monoésteres fosfato. La más ampliamente caracterizada es una enzima de PM 80.000 de *Escherichia coli*. La estructura de rayos-X muestra que es un dímero que contiene 3 uniones metálicas no equivalentes en cada subunidad. Dos de ellas están ocupadas por iones Zn, uno con actividad catalítica y otro con función estructural. El tercer metal es el catión Mg que también cumple un rol estructural. El efecto del flavonoide y del complejo con VO(IV) se determinó espectrofotométricamente. La reacción se inicia con el agregado del sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) y la generación de p-nitrofenol (p-NP) se monitorea a 405 nm. Se trabaja en buffer (55mM de glicina + 0.55mM MgCl<sub>2</sub>, pH= 10.5) y fuerza iónica (KCl) 1 M. El efecto del complejo se determina por el agregado de distintas concentraciones del mismo a

la mezcla de reacción preincubada a 37°C, en tres experimentos independientes. La velocidad inicial en ausencia de los compuestos ( $V_0$ ) fue calculada con la velocidad de hidrólisis de p-NPP a 37°C y pH= 10.5. Los valores  $V_i$  se determinaron de igual modo que  $V_0$  pero en presencia de diferentes concentraciones de cada sistema investigado. Los datos fueron expresados como el promedio  $\pm$  ESM.

La Figura 5 muestra los efectos del complejo y del ligando sobre la actividad de la fosfatasa alcalina. La quercetina no provoca inhibición hasta una concentración 50  $\mu$ M; a partir de esa concentración el ligando produce efecto inhibitorio escaso llegando a inhibir 5% de la actividad en concentraciones 100  $\mu$ M. Por otro lado, el complejo quercetina/VO produce una inhibición dosis-respuesta, en mayor grado que el ligando. En concentraciones 100  $\mu$ M la inhibición producida es de aproximadamente un 20% del total.



**Figura 5:** Efecto de la quercetina (●) y VO /quercetina (▲) en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de mucosa bovina intestinal. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  ESM (n = 9).

El efecto inhibitorio de compuestos de vanadio en la actividad de enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato puede ser atribuida a la formación de estados de transición análogos a bipirámides trigonales. La estructura de los compuestos de vanadio es más parecida a dicho estado de transición que las de los grupos fosfato, y probablemente interaccionen más fuertemente con el sitio activo de la enzima, provocando la inhibición de la reacción enzimática.

## CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica del complejo permite proponer una estructura con dos ligandos coordinados en el plano ecuatorial a través de grupos C=O y O- (“tipo maltol”) (11). Estos donores fuertes forman en general una estereoisomería trans alrededor del grupo V=O (12). Con lo cual se propone para este complejo una estructura de pirámide con base cuadrada en la cual los ligandos oxigenados ocupan la posición axial, con los dos ligandos en posición *trans*. La coordinación de la quercetina al catión vanadilo(IV) produce una potenciación de la inhibición enzimática de la fosfatasa alcalina, infiriéndose una mayor actividad biológica del complejo metálico que del flavonoide.

## REFERENCIAS

- (1) Metal complexes of flavonoid quercetin: antibacterial properties, A.Bravo,J.R.Anacona, *Trans.Metal Chem.* 26 (2001) 20-23.
- (2) Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III), J.P.Cornard,J.C.Merlín, *J.Inorg.Biochem* 92 (2002) 19-27.
- (3) "Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress",M. S. Molinuevo · D. A. Barrio · A. M. Cortizo · S. B. Etcheverry, *Cancer Chemother. and Pharmacol.* 53 (2004) 163-172.
- (4) Antioxidative and antitumor activities of solid quercetin metal(II) complexes, J.Zhou,L.Wang, J.Wang, N.Tang, *Trans.Metal.Chem.*, 26 (2001) 57-63.
- (5) Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth (III) complexes, J.Zhou,L.Wang, J.Wang, N.Tang, *J. Inorg. Biochem.* 83 (2001) 41-48
- (6) Oxovanadium(IV) complexes of quinic acid. Synthesis, characterization and potentiometric study, Y. Allegretti, E. G. Ferrer, A. C. González Baró and P. A. M. Williams, *Polyhedron* 19 (2000) 2613-2619.
- (7) Electrochemical investigation on interaction between DNA with quercetin and Eu–Qu<sub>3</sub> complex, J. Kang \*, L. Zhuo, X. Lu \*, H. Liu, M. Zhang, H. Wu, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 79–86.
- (8) Mono and dinuclear oxovanadium (IV) compounds containing VO(ONS) basic core: synthesis, structure and spectroscopic properties, S.F.Dutta, E.R.T.Tiekink, M. Chaudhury, *Polyhedron* 16 (1997) 1863-1871.
- (9) Magneto-structural correlation studies of ferromagnetically coupled dinuclear vanadium (IV) complex. Single-crystal EPR study, M. Velayutham, B. Varghese, S. Subramanian, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1336-1340.
- (10) N.D.Chasteen, Vanadyl (IV) spin probes, inorganic and biochemical aspects, in L.J.Berliner, J. Reuben (Eds), *Biological Magnetic Resonance*, vol(3), Plenum, New York 1981.
- (11) L-Mimosine, an amino acid with maltol-type binding properties toward copper (II), oxovanadium (IV) and other metals ions, E.Chruscinska, E.Garriba, G.Micera, A. Panzanelli, *J.Inorg.Biochem* 75 (1999) 225-232.
- (12) Speciation and NMR relaxation studies of VO(IV) complexes con several O-donor containing ligands: oxalate, malonate, maltolate and kojate, P. Buglyó, E.Kiss, I. Fábíán, T.kiss, D.Sanna, E.Garrriba, G. Micera, *Inorg. Chim. Acta.* 306 (2000)174-183.