

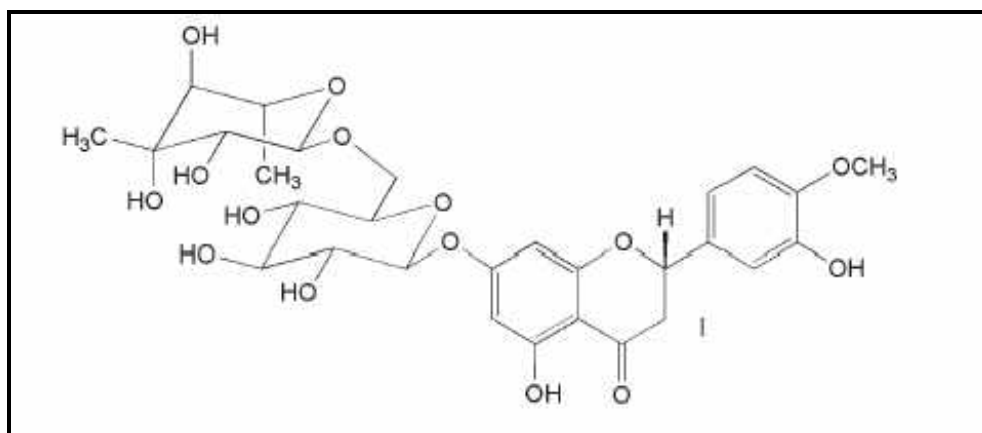
Universidad Nacional de La Plata/ Facultad de Ciencias Exactas/ CEQUINOR  
**POTENCIACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FLAVONOIDE NATURAL  
POR COMPLEJACIÓN CON VANADIO**

María V. Salinas, Luciana Naso, Natalia Baeza, Evelina Ferrer, Patricia Williams.  
[salinasvicky@hotmail.com](mailto:salinasvicky@hotmail.com), [luciananaso504@hotmail.com](mailto:luciananaso504@hotmail.com), [nbz20@hotmail.com](mailto:nbz20@hotmail.com)

Palabras-clave: Flavonoides. Vanadio. Propiedades biológicas.  
Productos Naturales y Bioactivos y sus aplicaciones

### Introducción

El flavonoide Hesperidina está compuesto por la flavanona hesperitina y el disacárido rutinosa (compuesto por rannnosa, 6-desoxi-L-manosa, y glucosa). También se lo designa como (S)-7-[[6-O-(6-desoxi- $\alpha$ -L-manopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil]oxi]-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona. Está presente en limones y naranjas. Posee propiedades antioxidantes, anti inflamatorias, anti alérgicas, hipolípídicas, vasoprotectivas y acciones anticarcinogénicas. Se considera que muchas de estos efectos se deban probablemente a la acción de su aglicón hesperitina (I) el que se muestra en el siguiente esquema:



El vanadio es un elemento traza importante en diferentes organismos. Presenta propiedades insulino miméticas y anti carcinogénicas en varios estados de oxidación. Para el ión VO(IV), sus efectos fisiológicos se potencian por complejación y por similitud química entre fosfato y complejos de vanadilo(IV) pentacoordinados. Está demostrado que los animales diabéticos tratados con compuestos que contienen vanadio producen disminución de sus niveles de glucosa. Los complejos de vanadilo(IV) ejercen inhibición sobre las fosfatasa, y esta

actividad está ligada a la actividad insulino símil, entre otras, porque de otro modo se restringiría o revertiría la acción de la insulina a través de la desfosforilación de su receptor.

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.*, dímero que contiene 3 uniones metálicas no equivalentes en cada subunidad, dos de ellas ocupadas por iones zinc, uno con actividad catalítica y otro con función estructural. El tercer metal es el Mg que también cumple una función estructural (Figura 1).

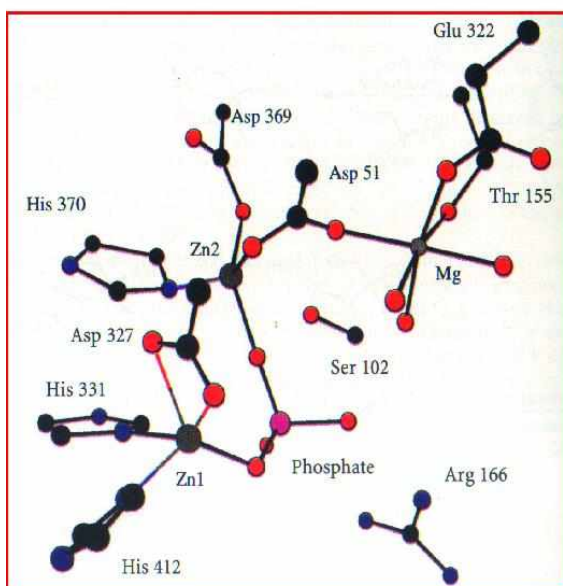


Figura 1: esquema del sitio activo de la enzima fosfatasa alcalina.

En esta comunicación se describe la obtención de un complejo del catión  $VO^{2+}$  con el flavonoide Hesperidina, su caracterización y la determinación de su efecto inhibitorio sobre la enzima fosfatasa alcalina.

## Desarrollo

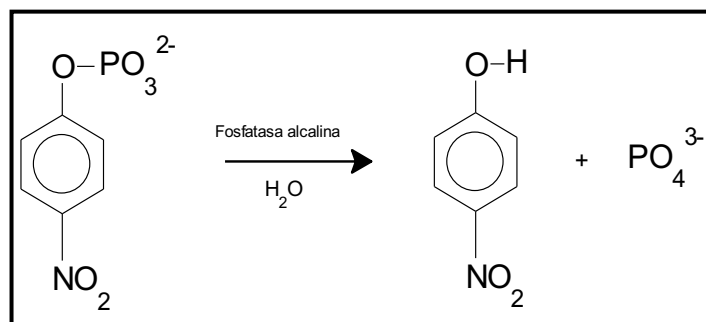
### Metodología

**Materiales y métodos:** La Hesperidina (Sigma) y el  $VOCl_2$  (solución al 50%, Carlo Erba), ambas de calidad analítica se emplearon de acuerdo a recomendaciones del fabricante. Los espectros UV-vis fueron registrados en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453. Los espectros de IR, en un espectrofotómetro FTIR Bruker IFS 66. Para el análisis de los modos vibracionales de los azúcares se divide el espectro en regiones:  $1500-1150\text{ cm}^{-1}$ : vibraciones

HCH, CH<sub>2</sub>OH; 1150-950 cm<sup>-1</sup>: región del estiramiento CO; 950-700 cm<sup>-1</sup>: región de deformación de grupos laterales (COH, CCH, OCH) o región anomérica [1]. Los análisis elementales de H y C se realizaron con un analizador Carlo Erba EA 1108, el contenido de vanadio se determinó por el método del ácido tunstosfosfovanádico, y el sodio por fotometría de llama.

**Preparación del complejo [VO(Hesp)]Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O** Se preparan 5 ml de una solución acuosa mediante el agregado de 1 mmol de Hesperidina sólida, agregando NaOH concentrado hasta pH 12. A esa solución se le agregan 0,5 mmol VOCl<sub>2</sub> (solución acuosa al 50%), con agitación. El pH de la solución disminuye, y se produce un precipitado verde el que se redisuelve por agregado de gotas de NaOH 1M, nuevamente hasta pH 12. Finalmente, se obtiene un precipitado verde por agregado de etanol absoluto, el que se filtra y lava varias veces con etanol absoluto frío. Se seca al aire. Anal. Calc. para C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>18</sub>VNa<sub>2</sub>: C, 44.5; H, 4.50; V, 6.75; Na, 6.09. Exp.: C, 44.70; H, 4.57; V, 6.78%; Na, 6.59. Espectro UV-Vis: 720nm. Análisis Termogravimétrico (TGA) (atmósfera de O<sub>2</sub>, velocidad de flujo: 50 ml/min): se observa: (i) un primer paso (20-100 °C) relacionado a la pérdida de 2 moléculas de H<sub>2</sub>O (5.56%), (ii) la generación de NaVO<sub>3</sub> como residuo final (20%) que se confirma por espectroscopía IR.

**Inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina:** El efecto del ligando Hesperidina y de su complejo con el catión vanadilo(IV) sobre la acción de la fosfatasa alcalina se determinó espectrofotométricamente. La reacción se inicia con el agregado del sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Figura 2) y la generación de p-nitrofenol se monitorea a 405 nm. Se trabaja en buffer (55 mM de glicina + 0.55 mM MgCl<sub>2</sub>, pH= 10,5 y fuerza iónica KCl 1M). 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<sub>0</sub>) fue calculada con la velocidad de hidrólisis de p-NPP a 37°C y pH= 10.5. Los valores V<sub>i</sub> se determinaron de igual modo que V<sub>0</sub> pero en presencia de diferentes concentraciones de cada sistema investigado. Los datos fueron expresados como el promedio ± ESM.



**Paranitrofenilfosfato(p-NPP)      paranitrofenol(p-NP)**

Figura 2: Esquema de la acción de desfosforilación producida por la enzima fosfatasa alcalina.

## Resultados

### Espectros de IR

La hesperidina está compuesta por la fracción Hesperitina y el azúcar rutinosa. Puede verse que en las zonas donde se involucran los estiramientos y deformaciones OH se observan los mayores cambios de intensidad y corrimiento de las bandas debido a desprotonación y/o coordinación de los grupos OH del azúcar en el medio alcalino fuerte. Por el estiramiento en  $878\text{ cm}^{-1}$  se determina que el residuo glucosa se une a la hesperitina como el anómero  $\beta$  y la de  $818\text{ cm}^{-1}$ , da cuenta de que el residuo de desoximánosa está presente como anómero  $\alpha$  (ver Tabla 1). La vibración  $\text{V}=\text{O}$  en  $931\text{ cm}^{-1}$  indica que el catión forma un quelato con pares de grupos OH desprotonados en posición cis, lo que se observa en la interacción de  $\text{V}=\text{O}$  con diferentes azúcares [2-5]. Por el estiramiento en  $878\text{ cm}^{-1}$  se determina que el residuo glucosa se une a la hesperitina como el anómero  $\beta$  y la de  $818\text{ cm}^{-1}$ , da cuenta de que el residuo de desoximánosa está presente como anómero  $\alpha$ .

El estiramiento  $\text{C}(4)=\text{O}$  no sufre modificación en la posición y sólo disminuye su intensidad, por lo que se descarta la coordinación del metal a través de ese residuo. La aparición de un pico nuevo en  $1582\text{ cm}^{-1}$  puede deberse a la probable desprotonación del grupo OH unido al  $\text{C}(5)$  de la Hesperitina dando lugar a la deslocalización electrónica entre ambos grupos, con el consiguiente acoplamiento de las vibraciones de estos 2 enlaces.

Hesperidina	VO/Hesperidina	Asignaciones
1647 mf	1644 h	$\nu$ (C=O)
1609 f	1612 mf	$\nu$ (C=C), anillo
	1582 h	
1516 f	1539 m / 1515 h	
1447 m	1432 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1361 m	1382 d / 1370 h	$\delta$ (COH)
1285 f	1273 m	$\delta$ (COH), $\nu$ (C-O-C)
1196 f	1207 m / 1176 m	$\delta$ (CH <sub>2</sub> )
1129 f	1132 m	
1090 h	1095 h	$\nu$ (C-O) <sub>endo</sub>
1072 mf	1072 mf	$\nu$ (C-O) <sub>exo</sub>
1030 h	1030 h	
975 m	971 m	
	931 h	$\nu$ (V=O)
878 h	878 md	$\delta$ (C1H), $\beta$ glucosa
818 d	828 h / 814 d	$\delta$ (C1H), $\alpha$ desoximanosa
743 d	767 h / 732 h	
671 d	679 d	

Tabla 1: Asignaciones del espectro FTIR de Hesperidina y VO/Hesperidina (posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

f, fuerte; mf, muy fuerte; d, débil; m, mediana; h, hombro; md, muy débil

### Inhibición de la actividad de fosfatasa alcalina

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 las bipirámides trigonales. La estructura de los compuestos de vanadio es más parecida a dicho estado de transición que la de los grupos fosfato, y probablemente interaccionen más fuertemente con el sitio activo de la enzima, provocando la inhibición de la reacción enzimática. La Figura 3 muestra el mecanismo de acción propuesto:

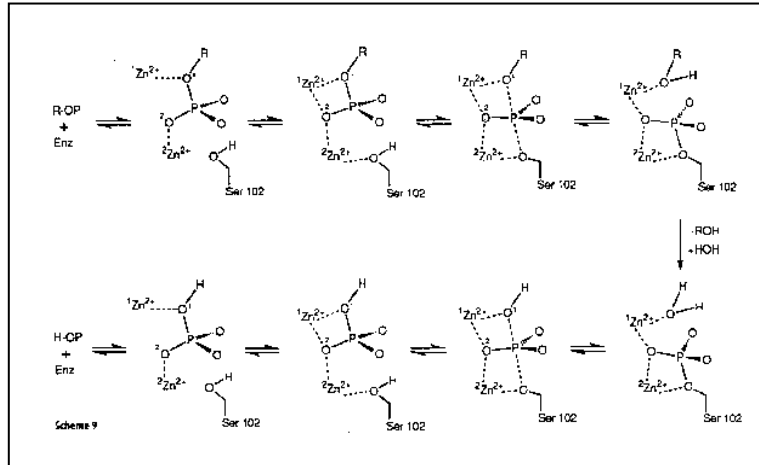


Figura 3: mecanismo de acción propuesto para la enzima fosfatasa alcalina.

La Figura 4 muestra los efectos del complejo y del ligando sobre la actividad de la fosfatasa alcalina. La hesperidina no provoca inhibición hasta una concentración 50  $\mu\text{M}$ ; a partir de esa concentración el ligando produjo efecto inhibitorio escaso llegando a inhibir 15% de la actividad en concentraciones 100  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, el complejo Hesperidina/VO produjo una inhibición dosis-respuesta, en mayor grado que el ligando y que el VO(IV) sin complejar. En concentraciones 100  $\mu\text{M}$  la inhibición producida es de aproximadamente un 50% del total.

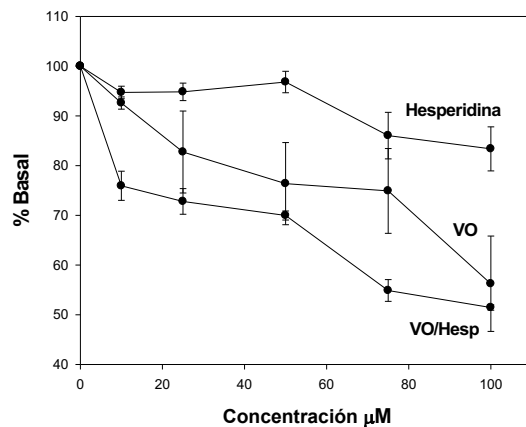


Figura 4: Efecto de Hesperidina,  $[\text{VO}(\text{Hesp})]\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y VO(IV) sobre la actividad de fosfatasa alcalina de la mucosa bovina intestinal. La velocidad inicial se determinó por incubación de la enzima a  $37^\circ\text{C}$  por 10 min en ausencia y presencia de concentraciones variables de los inhibidores. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  la media del error standard ( $n=9$ ).

## **Conclusión**

La caracterización fisicoquímica del complejo permite proponer que para la formación del mismo la interacción del ligando se produce vía los grupos O- desprotonados. Estos donores generan en general un campo fuerte alrededor del grupo V=O. La coordinación de la hesperidina 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]. Yang L., Weng S., Ferraro J.R., Wu J. Far Infrared study of some mono- and disaccharides. *Vibrational Spectroscopy* 25 57-62 (2001).
- [2] Etcheverry S. B., Williams P. A. M., Baran E. J., Synthesis and Characterization of Vanadyl(IV) Complexes with Saccharides, *Carbohydr. Res.* 302 131-138 (1997).
- [3] Williams P. A. M., Etcheverry S. B., Baran E. J., Characterization of New Oxovanadium(IV) Complexes of Saccharides, *Carbohydr. Res.* 329 (2000) 41-47.
- [4] Etcheverry S. B., Barrio D. A., Williams P. A. M., Baran E. J., On the interaction of the vanadyl(IV) cation with lactose. Inhibition effects of vanadyl(IV)/mono- and disaccharide complexes upon alkaline phosphatase activity, *Biol. Trace Elem. Res.* 84 (2001) 227-238.
- [5] Barrio D.A., Williams P.A.M., Cortizo A.M, Etcheverry S.B, Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO). Insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture, *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 459-468 (2003).