



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Obtención y estudio de complejos de coordinación con biometales y ligandos con actividad biológica. Determinación de actividades biológicas

Qco. Andrés Gonzalo Restrepo Guerrero

Directora: Patricia A.M. Williams

Directora: Evelina G. Ferrer

Año: 2024

Este trabajo de tesis doctoral fue realizado en el Centro de Química Inorgánica “Dr. Pedro J. Aymonino” (CEQUINOR-CONICET-UNLP) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Área: Química, se llevó a cabo bajo la dirección de la Prof. Dra. Patricia A. M Williams y la Prof. Dra. Evelina G. Ferrer.

2024.

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directoras, la Dra. Patricia Williams, la Dra. Evelina Ferrer, y a mi Co-directora la Dra. Luciana Naso por su guía y apoyo durante todo este proceso de investigación, gracias a ellas pude aprender mucho, no solo en términos de conocimientos técnicos y científicos, sino también a cómo llevar a cabo una investigación de forma metódica y crítica. Pero especialmente les agradezco por su paciencia y por ser un modelo a seguir.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio y del CEQUINOR que han sido más que solo compañeros de trabajo. Gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido y por su amistad. Ha sido muy grato trabajar a su lado y espero seguir contando con ustedes en el futuro.

Agradezco a mis padres José G. Restrepo e Ivonne Guerrero y a mi hermano Juan David, ya que han sido mi motivación para seguir adelante día tras día.

Además, quiero agradecer a mi esposa Amanda por su apoyo, comprensión y aliento durante este proceso académico.

Igualmente, agradezco a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA) por el otorgamiento de las becas, apoyo financiero y recursos proporcionados que me permitieron desarrollar este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer a las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, la Facultad de Ciencias Exactas y del Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) por proporcionarme los medios para la realización de esta tesis.

Por último, quiero agradecer a todos aquellos que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO GENERAL

Capitulo I. Introducción.....	21
Capítulo II. Materiales y métodos.....	89
Capitulo III. Caracterización fisicoquímica.....	126
Capitulo IV. Propiedades biológicas in vitro de complejos de naringina-V(IV)	188
Capitulo V. Actividad antihipertensiva y efectos cardíacos del complejo [Zn(Olme)(H ₂ O) ₂].....	252
Conclusiones finales.....	274
Anexo: publicaciones.....	278

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Carga total de enfermedad por causa en Argentina, 1990 a 2019..	22
Figura I-2. Estrés oxidativo según la definición de Sies.....	24
Figura I-3. Fuentes endógenas comunes de radicales libres.....	28
Figura I-4. Radical óxido nítrico y sus derivados de relevancia biológica.....	33
Figura I-5. Niveles de EROs en células cancerosas y saludables, y su regulación en la terapia contra el cáncer.....	42
Figura I-6. Macrociclo SOD-símil (M40403), un candidato prometedor para el tratamiento de trastornos cardiovasculares.....	59
Figura I-7. Estructura principal de los flavonoides.....	66
Figura I-8. Estructura química de la naringina.....	67
Figura I-9. Estructuras químicas de algunos sartanes disponibles actualmente.	70
Figura I-10. Estructura química del olmesartán medoxomilo.....	71
Figura I-11. Estructura cristalina que muestra las interacciones entre el receptor AT1 y olmesartán.....	72
Figura II-1. Estructura química de la naringina.....	90
Figura II-2. Estructura química del olmesartán.....	90
Figura III-1. Espectros FTIR de naringina (negro) y de VONarg9 (rojo).....	128
Figura III-2. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro) y VONarg9 (rojo).....	130
Figura III-3. Espectro de EPR en banda X del catión $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a temperatura ambiente.....	131
Figura III-4. Espectros de EPR en banda X de VONarg9 a 120 y 298 K.....	132
Figura III-5. Curva de calentamiento del complejo VONarg9 en atmósfera de O_2	134
Figura III-6. Espectros de EPR en banda X de VONarg9 en DMSO desde 100 a 298 K.....	135

Figura III-7. Espectros de EPR de VONarg9 simulado (azul) y experimental (negro) en DMSO a 120 K.....	136
Figura III-8. Espectros de EPR experimentales (negro) y simulados (verde) de soluciones congeladas en DMSO a 250 y 120 K para VONarg9.....	138
Figura III-9. Espectros electrónicos de naringina (rojo) y VONarg9 (negro) en DMSO, pH 9 (región del visible).....	139
Figura III-10. Espectros electrónicos de naringina (2×10^{-5} M) por variación del pH.....	140
Figura III-11. Espectros electrónicos de naringina (0,02 M) con VO(IV) a diferentes relaciones L/M en DMSO a pH 9.....	142
Figura III-12. Titulación espectrofotométrica de naringina con VO(IV) en DMSO a pH 9.....	143
Figura III-13. Variación de los espectros electrónicos de VONarg9 (0,015 M) en función del tiempo (DMSO).....	143
Figura III-14. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONarg9.	145
Figura III-15. Espectros FTIR de naringina (negro), VONarg9 (rojo), 1,10-fenantrolina (azul) y VONF.Cl (rosa).....	147
Figura III-16. Espectros FTIR de naringina (negro), VONarg9 (rojo) y VONF.Cl (azul) en la zona ν V=O.....	149
Figura III-17. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro) y VONF.Cl (rojo).....	149
Figura III-18. Espectros de EPR en banda X de VONF.Cl experimental (rojo) y simulado (azul) a 120 K.....	151
Figura III-19. Curva de calentamiento del complejo VONF.Cl en atmósfera de O ₂	152
Figura III-20. Espectros electrónicos de VONF.Cl (2×10^{-3} M) en solución con DMSO y diferentes porcentajes de H ₂ O.....	154
Figura III-21. Espectros de EPR de VONF.Cl en DMSO (negro), en solución acuosa con 5 % v/v DMSO (azul) y simulado (rojo) a 120 K.....	156

Figura III-22. Variación de los espectros electrónicos de VONF.Cl (5×10^{-3} M) en DMSO (izquierda) y (2×10^{-5} M) en DMSO al 1 % v/v (derecha) durante 2 horas.....	157
Figura III-23. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONF.Cl en estado sólido.....	158
Figura III-24. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONF.Cl en solución acuosa.....	159
Figura III-25. Espectros FTIR de naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONarg12 (negro).....	160
Figura III-26. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro), VONarg9 (rojo) y VONarg12 (verde).....	163
Figura III-27. Espectros de EPR en banda X de VONarg12 experimental (rojo) y simulado (negro) a 120 K.....	164
Figura III-28. Curva de calentamiento del complejo VONarg12 en atmósfera de O_2	166
Figura III-29. Espectros electrónicos de VONarg12 (0,02 M) en tampón NaOH-KCl pH 13.....	167
Figura III-30. Espectros electrónicos de naringina con VO(IV) a diferentes relaciones L/M en solución acuosa a pH 13.....	168
Figura III-31. Titulación espectrofotométrica de naringina con VO(IV) en H_2O a pH 13.....	169
Figura III-32. Variación de los espectros electrónicos de VONarg12 (0,02 M) durante 3 horas en buffer NaOH-KCl pH 13.....	170
Figura III-33. Estructura propuesta para el complejo VONarg12 en estado sólido.....	171
Figura III-34. Estructura propuesta para el complejo VONarg12 en solución acuosa.....	172
Figura III-35. Estructura química del fármaco olmesartán.....	173
Figura III-36. Espectros FTIR de olmesartán (negro) y ZnOlme (azul).....	174

Figura III-37. Curva de calentamiento del complejo ZnOlme en atmósfera de O ₂	176
Figura III-38. Espectro de ¹ H-RMN del complejo ZnOlme (DMSO-d ₆ , 600 MHz, δ, ppm).....	177
Figura III-39. Espectro de ¹³ C-RMN del complejo ZnOlme (DMSO-d ₆ , 150 MHz, δ, ppm).....	178
Figura III-40. Espectros de emisión de soluciones de olmesartán 1 x 10 ⁻³ M en DMSO con diferentes concentraciones de Zn(II). L/M = 10, 6, 4, 2, 1, 0.5; λ _{ex} : 294 nm; λ _{em} : 363 nm.....	179
Figura III-41. Gráfico de Benesi-Hildebrand para el complejo ZnOlme asumiendo una estequiometría 1:1.....	179
Figura III-42. Intensidad de fluorescencia frente a la relación molar (ligando/metal) para el complejo ZnOlme en DMSO.....	180
Figura III-43. Variación del espectro electrónico del complejo ZnOlme 4,65 x 10 ⁻⁵ M en DMSO al 10% v/v durante 2 horas.....	181
Figura III-44. Estructura propuesta para el complejo ZnOlme.....	182
Figura IV-1. Efectos de VOCl ₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (amarillo) sobre la reducción del radical DPPH·.....	195
Figura IV-2. Efectos de VOCl ₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (amarillo) sobre la inhibición de radicales hidroxilo (HO·).....	197
Figura IV-3. Efectos de VOCl ₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (azul) en la reducción del NBT por radicales O ₂ ^{-·}	199
Figura IV-4. Descomposición de la piranina por radicales ROO· en presencia de VOCl ₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (azul).....	201
Figura IV-5. Viabilidad celular de la línea A549 tratada con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) por 24 h (0 – 100 μM).	207
Figura IV-6. Viabilidad celular de la línea HEK293 tratada con VONarg9 por 24 h (0 – 100 μM).....	208

Figura IV-7. Viabilidad celular de la línea WISH tratada con VONF.Cl por 24 h (0 – 100 μ M).....	209
Figura IV-8. Viabilidad celular de la línea HEK293 tratada con VONarg12 por 24 h (0 – 100 μ M).....	210
Figura IV-9. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μ M).....	216
Figura IV-10. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la línea A549 por el tratamiento con VONF.Cl durante 4 h (0 – 100 μ M).....	217
Figura IV-11. Cambio en los niveles de glutatión reducido (GSH) en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μ M).....	219
Figura IV-12. Cambio de la relación de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μ M).....	220
Figura IV-13. Cambio del potencial de membrana mitocondrial en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μ M).....	221
Figura IV-14. Viabilidad celular de la línea A549 tratada con VONarg12 por 24 h (0 – 100 μ M). Las células fueron pre incubadas con DIDS (ácido diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico) 100 μ M.....	224
Figura IV-15. Espectros de fluorescencia de ASB 6 μ M en solución en ausencia y presencia de: naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.Cl (C) (0 – 100 μ M). λ_{ex} = 280 nm, T = 298 K.....	230
Figura IV-16. Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$), obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.Cl (C) (0 – 100 μ M) a diferentes temperaturas 298 K (rojo), 303 K (azul) y 310 K (negro). λ_{ex} = 280 nm.....	232
Figura IV-17. Gráficos de Scatchard ($\log(F_0-F/F)$ vs $\log[Q]$) obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.Cl (C) (0 – 100	

μM) a diferentes temperaturas 298 K (rojo), 303 K (azul) y 310 K (negro). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$	233
Figura IV-18. Gráfico de Vant Hoff ($\ln(K_a)$ vs $1/T(K)$) obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (rojo), VONarg9 (azul) y VONF.Cl (verde) a diferentes temperaturas (298 K, 303 K y 310 K).....	236
Figura V-1. Efectos de ZnCl_2 (verde), olmesartán (rojo) y ZnOlme (azul) sobre la presión arterial sistólica de ratas espontáneamente hipertensas (SHR).....	257
Figura V-2. Hipertrofia cardíaca estimada a partir del índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) (A) como la relación $\text{MVI}/\text{peso corporal}$ en mg/g . (B) como la relación $\text{MVI}/\text{longitud tibial}$ en mg/cm	259
Figura V-3. Hipertrofia cardíaca estimada como el cambio en el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (GPP) (A) y el septo interventricular en diástole (SIVd) (B).....	260
Figura V-4. Hipertrofia cardíaca estimada como el cambio en el área transversal de cardiomiocitos.....	261
Figura V-5. Fibrosis cardíaca estimada a partir de la evaluación del contenido de colágeno tipo I (A) y colágeno tipo III (B).....	262
Figura V-6. Imágenes representativas del tejido cardíaco teñido con rojo de picorsirius para la determinación de colágeno tipo I y III.....	263
Figura V-7. Contenido de glutatión (GSH) en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas.....	265
Figura V-8. Producción de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas.....	266
Figura V-9. Peroxidación lipídica en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas. Medido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	267
Figura V-10. Función cardíaca evaluada mediante la fracción de acortamiento determinada al inicio y después de 8 semanas de tratamiento (valores delta).	268

Figura 0-1. Estructuras propuestas para los complejos A) VONarg9, B) VONF.Cl y C) VONarg12.....	274
Figura 0-2. Estructura propuesta para el complejo ZnOlme.....	275

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema I-1. Fuentes exógenas más comunes de radicales libres.....	29
Esquema I-2. Efectos funcionales del estrés oxidativo en sistemas y órganos reguladores en la fisiopatología de la hipertensión.....	53
Esquema I-3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).....	69
Esquema III-1. Reacciones simplificadas para la obtención del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	127
Esquema III-2. Síntesis del complejo VONF.Cl y su estructura propuesta en estado sólido.....	146
Esquema IV-1. Reacción entre un antioxidante (RH) y el radical DPPH·.....	194
Esquema IV-2. Generación de radicales hidroxilos por el sistema Fe/H ₂ O ₂ /ascorbato, y su reacción con la desoxirribosa.....	197
Esquema IV-3. Mecanismo para la generación e inhibición de radicales superóxido a través del sistema NBT/NADH/PMS.....	199
Esquema IV-4. Descomposición térmica del AAPH en radicales ROO·.....	200
Esquema IV-5. Eliminación de radicales libres por flavonoides.....	202
Esquema IV-6. Reducción del MTT a azul de formazán.....	206
Esquema IV-7. Cambios celulares y morfológicos observados durante la apoptosis.....	211
Esquema IV-8. Cambios celulares y morfológicos observados durante la autofagia.....	212
Esquema IV-9. Cambios celulares y morfológicos observados durante la necrosis.....	212
Esquema IV-10. Cambios en la morfología celular de la línea A549 por el tratamiento con VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl durante 24 h y 48 h a 100 µM.	214
Esquema IV-11. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno empleando la sonda H ₂ DCFDA.....	215

Esquema IV-12. Formación de un producto fluorescente por reacción de glutatión reducido (GSH) con o-ftalaldehído (OPT).....	218
Esquema V-1. Sistema de medición de la presión arterial en ratas de laboratorio.....	256

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I-1. Especies reactivas de oxígeno.....	31
Tabla I-2. Especies reactivas de nitrógeno.....	33
Tabla I-3. Características de algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	35
Tabla I-4. Función principal de algunas defensas antioxidantes enzimáticas...39	
Tabla I-5. Mecanismos de acción de los antioxidantes no enzimáticos.....	41
Tabla I-6. Características del cáncer.....	45
Tabla I-7. Algunos elementos esenciales y sus funciones biológicas de mayor relevancia.....	55
Tabla I-8. Clasificación de agentes quimioterapéuticos según su mecanismo de acción.....	58
Tabla III-1. Asignación de los espectros FTIR de naringina y de VONarg9 (posiciones de las bandas en cm^{-1}).....	129
Tabla III-2. Contenido porcentual de C, H y V para el complejo VONarg9.....	134
Tabla III-3. Parámetros del Hamiltoniano de espín obtenidos a partir de simulaciones para VONarg9.....	136
Tabla III-4. Máximos de absorción para las bandas I y II de naringina en función del pH.....	141
Tabla III-5. Asignación de los espectros FTIR de naringina, VONarg9 y VONF.Cl (posiciones de las bandas en cm^{-1}).....	148
Tabla III-6. Asignación de las transiciones electrónicas en los espectros de UV-Vis DRS para Naringina, VONarg9 y VONF.Cl.....	150
Tabla III-7. Contenido porcentual de C, H, N y V para el complejo VONF.Cl.	152
Tabla III-8. Conductividad molar del complejo VONF.Cl (1×10^{-3} M) en DMSO y en solución acuosa con diferentes porcentajes de DMSO.....	155
Tabla III-9. Parámetros del Hamiltoniano de espín obtenidos a partir de VONF.Cl en solución con DMSO y en estado sólido a 120 K.....	155

Tabla III-10. Asignación de los espectros FTIR de naringina, VONarg9 y VONarg12 (posiciones de las bandas en cm^{-1}).....	162
Tabla III-11. Asignación de las transiciones electrónicas en los espectros de UV-Vis DRS para Naringina, VONarg9 y VONarg12.....	164
Tabla III-12. Contenido porcentual de C, H, V y K para el complejo VONarg12.	166
Tabla III-13. Conductividad molar del complejo VONarg12 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$).....	169
Tabla III-14. Asignación de los espectros FTIR de olmesartán y ZnOlme (posiciones de las bandas en cm^{-1}).....	175
Tabla III-15. Contenido porcentual de C, H, N y Zn para el complejo ZnOlme.	176
Tabla IV-1. Inhibición de radicales libres por acción de VOCl_2 , naringina, VONarg9 y VONF.Cl.....	202
Tabla IV-2. Contenido de vanadio intracelular (nmol V/mg proteína) de células A549 por el tratamiento con VONarg9, VONF.Cl y VONarg12 durante 24 h a $100 \mu\text{M}$	223
Tabla IV-3. Valores de viabilidad celular a $100 \mu\text{M}$ para los compuestos VOCl_2 , naringina, cloruro de fenantrolina, VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl.....	225
Tabla IV-4. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constantes de desactivación bimolecular (K_q), constante de unión (K_a) y sitios de unión (n), obtenidos gráficamente para la interacción entre naringina, VONarg9 y VONF.Cl con ASB a diferentes temperaturas.....	234
Tabla IV-5. Parámetros termodinámicos de los sistemas naringina-ASB, VONarg-ASB y VONF.Cl-ASB.....	237

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un estudio multidisciplinar que apunte a generar y caracterizar en fase sólida y en solución nuevos complejos de coordinación (química inorgánica) usando familias de compuestos con actividad biológica y/o farmacológica (química bioinorgánica) y realizar estudios de modificación de la actividad (farmacoquímica) para su aplicación como drogas alternativas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la hipertensión.

Objetivos específicos

- Sintetizar complejos de coordinación de biometales (principalmente vanadio y zinc) con fármacos sintéticos con propiedades antihipertensivas y de sustancias antioxidantes naturales.
- Determinar la estructura de los nuevos complejos por análisis elemental, estudios de descomposición térmica y a través de espectroscopías FTIR, Raman, UV-vis, RMN, reflectancia difusa y resonancia paramagnética de espín (EPR) en fase sólida.
- Determinar el comportamiento de los complejos en solución fundamentalmente en condiciones fisiológicas (formación, disociación, estabilidad). Estudio estructural de los mismos en solución por espectroscopías UV-vis, fluorescencia, y EPR.
- Medir la interacción con albúmina sérica bovina mediante técnicas espectroscópicas (biodisponibilidad).
- Evaluar la actividad antioxidante de los complejos y estudiar las capacidades antitumorales (viabilidad de células tumorales y normales en cultivo). Mecanismos de acción. Generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en líneas celulares y determinación de niveles de antioxidantes naturales (glutación), para evaluar el daño celular. Para algunos complejos determinar los efectos antihipertensivos *in vivo*.

Capítulo I

Introducción

Tabla de contenidos

1. Enfermedades crónicas y estrés oxidativo	21
2. Estrés oxidativo	23
2.1. Especies reactivas y radicales libres.....	25
2.1.1. Especies reactivas de oxígeno	27
2.1.2. Especies reactivas de nitrógeno	31
2.2. Características y comportamiento de EROs.....	34
2.3. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.....	37
2.3.1. Antioxidantes enzimáticos	38
2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	40
3. Relación del estrés oxidativo con el cáncer: efecto promotor y supresor..	41
3.1. Funciones promotoras de tumores de las EROs.....	43
3.2. Funciones supresoras de tumores de las EROs	46
4. Relación del estrés oxidativo con la hipertensión.....	48
4.1. Disfunción endotelial	48
4.2. Disfunción mitocondrial	49
4.3. Remodelación vascular	50
4.4. Inflamación y fibrosis.....	51
4.5. Efectos renales	51
4.6. Activación del sistema nervioso simpático	52
5. Química Bioinorgánica	53
6. Metales en medicina	54
6.1. Vanadio	60
6.2. Zinc	62
7. Ligandos bioactivos.....	64
7.1. Flavonoides.....	65
7.1.1. Naringina	67

7.2. Bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRAs).....	68
7.2.1. Olmesartan	71
Referencias bibliográficas	73

Capítulo I. Introducción

1. Enfermedades crónicas y estrés oxidativo

Las enfermedades crónicas son de larga duración, afectan la cotidianidad de quien las padece y requieren un tratamiento continuo ¹. Estos padecimientos incluyen diversas condiciones como enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, cáncer, obesidad, diabetes, enfermedades renales o hepáticas, pero también podrían implicar infecciones prolongadas como el VIH, o inflamación persistente, como se manifiesta en las enfermedades inflamatorias intestinales (como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa) ². Estas enfermedades generan una gran carga sobre los individuos, las familias, la sociedad y sobre los sistemas de atención sanitaria ³.

Dependiendo de la fuente consultada, la definición de enfermedad crónica puede variar significativamente ⁴. Es por esta razón, que en algunas ocasiones se las denomina indistintamente como enfermedades no transmisibles (ENT) ^{5,6}, excluyendo así, a aquellas enfermedades de carácter infeccioso de larga duración.

La mayoría de los países industrializados y muchos en vías de desarrollo tienen como principal causa de muerte a estas afecciones ⁶. La Figura I-1 muestra la carga total de enfermedades por causa en Argentina. Se ha encontrado una correlación directa entre el estatus socioeconómico y el estado de salud, ya que la mortalidad por ENT es más alta en naciones de ingresos bajos y medios. Incluso en países de ingresos altos, estas enfermedades tienen mayor incidencia sobre personas con menor estatus socioeconómico ⁵. Las enfermedades no transmisibles representan aproximadamente siete de cada diez muertes a nivel mundial ⁷. Dos tercios de la mortalidad mundial en 2016 fueron atribuibles a las enfermedades crónicas y el riesgo de morir prematuramente (con menos de 70 años) a causa de una de estas enfermedades en los países de ingresos bajos y medios es del doble que en los países ricos ⁸.

Estas enfermedades se han convertido en un problema de salud pública alrededor del mundo que está aumentando rápidamente con una población creciente y que envejece ², y se relacionan directamente con factores de riesgo

asociados al consumo de alimentos con alto contenido de grasas saturadas, sal y azúcares, un bajo consumo de frutas, verduras, fibra y ácidos grasos omega-3; un estilo de vida sedentario, además del consumo de tabaco y alcohol no moderado ^{9,10}.

Si bien, las enfermedades crónicas se producen por diversas causas, relacionadas principalmente con el estilo de vida, la herencia genética o la edad, existe una falta de comprensión acerca de la progresión de estos padecimientos a lo largo de la vida de una persona. No obstante, un factor común implicado en la mayoría de estos es el estrés oxidativo ^{11,12}.

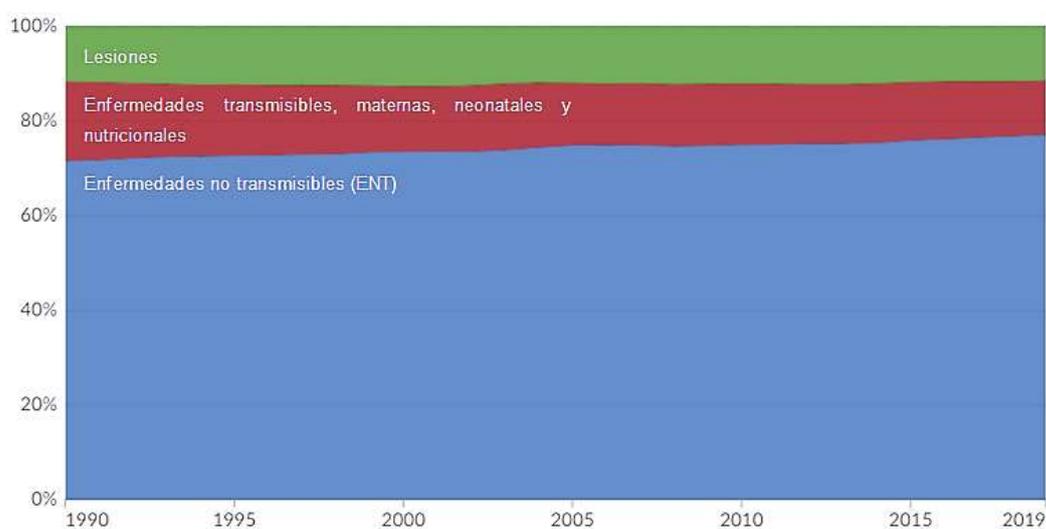


Figura I-1. Carga total de enfermedad por causa en Argentina, 1990 a 2019. Adaptado de *Burden of Disease*. Roser et al., 2021 ¹³.

El envejecimiento es un factor de riesgo común e inmodificable en la mayoría de las enfermedades crónicas, este se caracteriza por la disfunción progresiva de tejidos y órganos. La teoría del estrés oxidativo sugiere que el deterioro funcional relacionado con el envejecimiento es resultado de la acumulación de daños causados por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERONs), es por esto que además, las enfermedades crónicas se relacionan con la inflamación crónica y la disfunción mitocondrial ¹⁴.

Por ejemplo, en la diabetes tipo 2 (DT2), se cree que el estrés oxidativo estimula respuestas protrombóticas, lo que provoca complicaciones cardiovasculares ¹⁴⁻¹⁶. Asimismo, la aterosclerosis, que está estrechamente relacionada con la enfermedad cardiovascular, se asocia con el estrés oxidativo

como mecanismo etiopatológico ^{14,17}. Igualmente, se cree que el estrés oxidativo desempeña un papel esencial en el progreso de la enfermedad renal crónica (ERC), a través del daño glomerular y la isquemia renal e, indirectamente, a través de los efectos de la hipertensión, la inflamación y la disfunción endotelial ^{14,18}. Además, se cree que el estrés oxidativo, relacionado con la inflamación, desempeña un papel considerable en la patogénesis del cáncer, ya que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, junto con las citoquinas proinflamatorias, activan la expresión de genes implicados en la proliferación celular. Esto conduce a la división celular descontrolada y a la pérdida de la apoptosis de células cancerosas ^{14,19}. Sumado a ello, la inflamación crónica también está asociada con la angiogénesis, la cual se vincula estrechamente con el cáncer ^{14,20,21}. También se ha demostrado que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la fisiopatología del sistema nervioso central, lo que conduce a trastornos neurológicos como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, así como a la demencia vascular que se presenta clínicamente como la pérdida progresiva de la memoria y alteraciones del movimiento ^{14,22-24}.

Así pues, dada la estrecha relación entre el envejecimiento, la inflamación y el estrés oxidativo, se ha propuesto la idea de que el envejecimiento se relaciona con la pérdida de homeostasis, la cual es desencadenada por el estrés oxidativo sostenido ocasionando la acumulación de daños inducidos por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, estos daños, afectan especialmente a los sistemas regulatorios, como el nervioso, endócrino e inmune. La activación del sistema inmunológico induce un estado inflamatorio que crea un círculo vicioso en el que el estrés oxidativo crónico y la inflamación se favorecen mutuamente, y consecuentemente, aumentan la morbilidad y mortalidad de las enfermedades vinculadas directamente al envejecimiento, como las enfermedades crónicas, o no transmisibles, mencionadas anteriormente ¹⁷.

2. Estrés oxidativo

El concepto de “estrés oxidativo” fue introducido en 1985 por Helmut Sies, y fue definido como “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los

oxidantes, lo que conduce a la alteración de la señalización y el control redox y/o daño molecular” (figura I-2) ²⁵. Desde entonces, ha supuesto un importante campo de investigación que abarca desde la bioquímica y la biología celular hasta las ciencias nutricionales, la medicina ambiental y la medicina redox basada en el conocimiento molecular ²⁶. El estudio de la biología redox se ha desarrollado ampliamente, pues en un principio se centraba en la correlación entre el estrés oxidativo y diferentes patologías. Sin embargo, con el tiempo se ha comprendido la importancia de las reacciones redox en la homeostasis celular, la regulación de funciones biológicas y su participación en diferentes procesos fisiológicos ²⁷⁻²⁹.



Figura I-2. Estrés oxidativo según la definición de Sies ²⁵. Creado con BioRender.com ³⁰.

A los niveles fisiológicos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERONs) se los denomina “estrés oxidativo” o “estrés bueno” y se caracteriza por niveles bajos a moderados de oxidantes que participan de manera controlada en diversas vías de señalización y procesos bioquímicos. Por el contrario, niveles elevados de ERONs, generados a partir de fuentes endógenas y/o exógenas dan como resultado una condición perjudicial denominada como estrés oxidativo “estrés malo”, que ocasiona respuestas celulares desreguladas y daño a componentes celulares importantes ³¹.

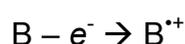
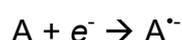
Las especies reactivas de oxígeno son actores importantes en la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y necrosis celular por lo que se necesitan niveles bajos a intermedios de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para el mantenimiento de muchas funciones fisiológicas importantes, la homeostasis redox y la regulación de factores de transcripción clave ^{17,31}.

El cuerpo humano mantiene un delicado equilibrio redox al regular la concentración de ERONs, a través de mecanismos antioxidantes que involucran proteínas y enzimas, como el glutatión, las tioredoxinas o la superóxido dismutasa, entre otros ³². Sin embargo, si el sistema antioxidante no puede neutralizar dichas especies reactivas o radicales libres ³³, pueden desencadenarse una serie de reacciones caracterizadas por la oxidación y daño a macromoléculas tales como, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos ³⁴, lo que puede resultar en la destrucción de la membrana celular, la inhibición de la acción de enzimas clave, la interrupción de procesos celulares esenciales para el correcto funcionamiento del cuerpo, la alteración del ciclo y la división celular, y la obstrucción en la generación de energía ³⁵.

2.1. Especies reactivas y radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son radicales libres y moléculas reactivas derivadas de especies moleculares de oxígeno y nitrógeno. Los que se generan con mayor frecuencia son los radicales hidroxilo (HO·), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO·), peróxidos (O₂²⁻), peroxinitrito (ONOO⁻), oxígeno singlete (¹O₂) y superóxido (O₂⁻) ³⁶. Las ERONs son altamente reactivas debido a la presencia de electrones desapareados en la capa de valencia o enlaces no estáticos ³⁷.

Los radicales libres se pueden describir como cualquier átomo, molécula o fragmento de los mismos, que posea al menos un electrón desapareado y presente, en cierta medida, una existencia autónoma ³⁸. Los radicales libres pueden poseer carga positiva, negativa o no tener (radicales neutros). Pueden generarse por la adición de un electrón a un átomo o molécula neutra, o por la pérdida de un electrón de un átomo o molécula neutra ³⁹:



También pueden generarse por la homólisis (también conocida como fisión homolítica o fisión radical) de enlaces covalentes, que pueden dar lugar a la formación de subproductos reactivos intermedios. Esta ruptura homolítica

(produce dos radicales libres) requiere energía como calor, luz ultravioleta o radiación ionizante ³⁹.

Los radicales libres son especies extremadamente reactivas, y en consecuencia, de vida corta. Su gran reactividad química se asocia con la energía de combinación disponible del electrón impar, y sus reacciones, siempre que sea posible, resultan en la formación completa de pares electrónicos ⁴⁰. Es por esto, que los radicales libres intentan unirse con otras moléculas, átomos o incluso electrones individuales, para generar un compuesto estable, para ello pueden donar o aceptar un electrón de otras moléculas, comportándose como agentes oxidantes o reductores ⁴¹. Poseen la tendencia natural a dar inicio y participar de procesos oxidativos que ocurren durante reacciones en cadena que involucran varias etapas ^{37,39}.

- **Iniciación:** creación inicial de los radicales libres. Por lo general, se trata de una escisión hemolítica (produce un radical libre y un ion) con la ayuda de calor, rayos UV o catalizadores metálicos.
- **Propagación:** los radicales libres se generan y regeneran repetidamente como resultado de la reacción en cadena.
- **Terminación:** dos radicales libres reaccionan entre sí para formar un producto estable y no radical.

Ya que los radicales libres contienen un electrón desapareado, son electrófilos y atacan sitios de mayor densidad electrónica, que suelen estar presentes en compuestos con átomos de nitrógeno, como proteínas o ácidos nucleicos; y en enlaces dobles carbono-carbono, como en fosfolípidos o ácidos grasos poliinsaturados ^{39,42}.

Las especies reactivas más relevantes en términos biológicos son aquellas centradas en oxígeno, denominados como especies reactivas de oxígeno (EROs), y las moléculas centradas en nitrógeno, designadas como especies reactivas de nitrógeno (ERNs), ya mencionadas ^{39,43}. Estas especies pueden ser a su vez clasificadas en dos grupos de compuestos, radicales y no radicales. Las especies no radicales se agrupan dentro de las ERONs ya que pueden conducir fácilmente a reacciones oxidativas en los sistemas vivos o

conducir a la formación de radicales libres ⁴⁴, esta distinción entre especies radicales y no radicales ayuda a comprender su comportamiento químico y su impacto en los sistemas biológicos.

2.1.1. Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es un elemento esencial para la vida en la tierra, su participación en la oxidación controlada de moléculas que contienen carbono es fundamental para la generación de energía, un proceso vital para la supervivencia de los sistemas aeróbicos. Sin embargo, la naturaleza oxidativa del oxígeno representa una paradoja: a la vez que es indispensable para la vida, puede ser responsable del daño celular a través de eventos oxidativos ³⁹.

Las especies reactivas de oxígeno son una variedad de compuestos químicos, derivados principalmente del oxígeno molecular (O_2), que se produce y consume por múltiples procesos bioquímicos. El oxígeno molecular es una molécula birradical porque tiene dos electrones desapareados en su capa de valencia. Cuando uno de los electrones desapareados gana más energía, el electrón se excita y cambia su espín; este proceso resulta en la formación de un potente dioxígeno reactivo llamado oxígeno singlete (1O_2). Los sistemas biológicos producen aniones superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), los cuales se producen por la acción de varias oxidasas al reducir un electrón del oxígeno molecular. El radical $O_2^{\cdot-}$ es un anión pequeño, altamente soluble en agua, central en la biología redox celular y se considera el precursor principal de la mayoría de las EROs ⁴⁵.

Las EROs como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se generan de manera natural en las células como subproductos del metabolismo celular, como en los complejos I y III en la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias o en las NADPH oxidasas (NOX) en las membranas celulares, también en las oxidasas centradas en flavina en los peroxisomas y el retículo endoplásmico, o en la β -oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas ^{46,47} (Figura I-3).

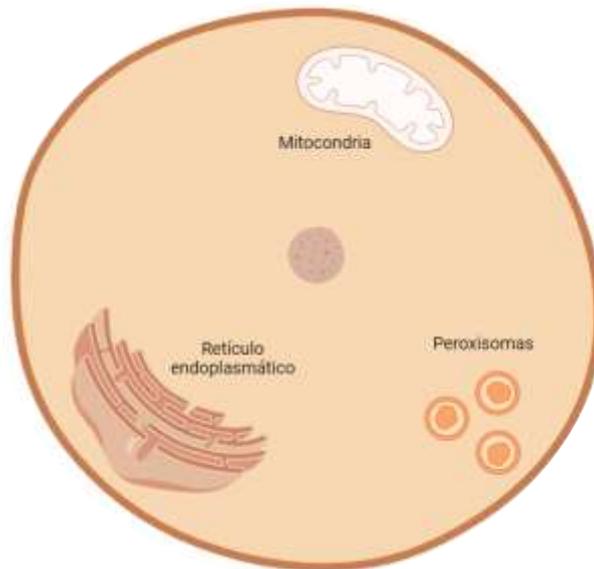


Figura I-3. Fuentes endógenas comunes de radicales libres ³⁹. Creado con BioRender.com ³⁰.

Las principales fuentes de EROs en las células incluyen ^{46,47}:

- **Mitocondrias:** Las mitocondrias son una fuente importante de producción de EROs, particularmente durante el proceso de fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones.
- **NADPH oxidasas (NOX):** Estas enzimas están especializadas en generar EROs como parte de su función normal, desempeñando un papel en la señalización celular y los mecanismos de defensa frente a microorganismos.
- **Retículo endoplásmico (RE):** el RE también es una fuente importante de EROs, particularmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se produce durante los procesos de plegamiento oxidativo.
- **Peroxisomas:** estos orgánulos participan en diversos procesos metabólicos, incluida la degradación de ácidos grasos, que pueden conducir a la producción de EROs.
- **Fagocitos:** las células inmunes como los neutrófilos y los macrófagos producen EROs como parte de sus mecanismos de defensa contra patógenos.

- Xantina oxidasa: esta enzima genera EROs como subproducto del metabolismo de las purinas.

Además, la generación de EROs puede desencadenarse por factores externos, pudiendo ser físicos o químicos, dentro de los factores físicos se encuentra la radiación ionizante y las altas temperaturas; los factores químicos comprenden algunos agentes farmacológicos, toxinas, humo de cigarrillo y metales pesados ⁴⁸. Un buen ejemplo de factor ambiental que genera EROs es la exposición a la radiación de alta energía, que causa la ionización de partículas y, por lo tanto, es capaz de producir efectos tanto térmicos, como no térmicos (genéticos) (como la radiación ultravioleta) ⁴⁹. Adicionalmente, algunas EROs como el H₂O₂ pueden producirse en respuesta a señales externas como hormonas y factores de crecimiento (Esquema I-1) ⁵⁰.



Esquema I-1. Fuentes exógenas más comunes de radicales libres ³⁹.

Las mitocondrias son la fuente principal de EROs en las células de los mamíferos. La producción de EROs dentro de las mitocondrias puede ocurrir en la membrana externa, en la membrana interna o dentro de la matriz. Las

mitocondrias aisladas producen peróxido de hidrógeno, que se forma por la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ dentro de estas ³⁶.

Las EROs actúan como moléculas de señalización celular y regulan diversos procesos fisiológicos, lo que las convierte en actores críticos en el mantenimiento de la homeostasis celular y la respuesta a diferentes estímulos ^{51,52}.

El peróxido de hidrogeno en concentraciones fisiológicas (10^{-9} M) actúa como una molécula de señalización redox esencial en las células. La señalización a través del H_2O_2 está vinculada a procesos celulares como la activación o represión de factores de transcripción y expresión génica, la muerte celular programada, la regulación de cascadas de fosforilación, la regulación del ciclo celular, la diferenciación, la proliferación, migración y adhesión celular, el metabolismo energético, el desarrollo embrionario, las reorganizaciones del citoesqueleto y la función inmunológica ^{53,54}.

Las EROs pueden activar diversas vías de señalización como cascadas de quinasas: MAPK, PI3K y ASK1 que desempeñan funciones cruciales en diversos procesos celulares, incluido el crecimiento celular, la supervivencia, la proliferación y la apoptosis; factores de transcripción como Nrf2, HIF-1 α , AP-1, NF- κ B y CEBPD que están involucrados en la regulación fina de la expresión génica en respuesta a señales ambientales y celulares, contribuyendo a la homeostasis y adaptación celular; las EROs también pueden activar enzimas como SIRT1 que regula los factores de transcripción FoxO y p53 involucrados en la regulación de la expresión de genes que controlan la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta al estrés oxidativo y la longevidad ⁴⁶. La señalización redox a través del H_2O_2 ocurre principalmente mediante la oxidación reversible de los residuos tiol de cisteína de las proteínas (RS-) para formar ácidos sulfénicos (RSOH) ^{55,56}.

Los grupos tiol de los residuos de cisteína de proteínas reguladoras específicas han sido implicados en la señalización redox para aumentar la expresión de genes que codifican componentes del sistema de defensa. Tales sistemas se han encontrado en bacterias, hongos, plantas y animales. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generalmente oxidan de manera reversible los

grupos tiol en varios pasos, debido a los múltiples estados de oxidación del azufre, que van desde -2 hasta +6 ⁵⁷.

Habitualmente en los laboratorios se miden los grupos carbonilo formados en la oxidación de proteínas como indicativo de las modificaciones inducidas por las EROs, junto con los derivados oxidados de lípidos y ácidos nucleicos ⁵⁷.

Como ya fue mencionado, un exceso de EROs no sólo causa mutaciones genómicas sino que también induce una modificación oxidativa irreversible de proteínas (oxidación y peroxidación de proteínas), lípidos y glicanos (productos finales de lipoxidación y glicación avanzada), perjudicando su función, y promoviendo enfermedades o la muerte celular ⁵⁸. En la Tabla I-1 se muestran las especies reactivas de oxígeno generadas en los procesos bioquímicos.

Tabla I-1. Especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Tvrda y Benko., 2020 ³⁹.

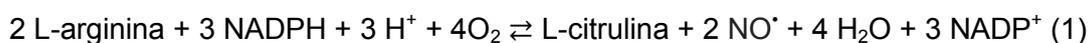
Especies radicales		Especies no radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\cdot}	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Radical peroxilo	ROO^{\cdot}	Ácido hipobromoso	$HOBr$
Radical alcoxilo	RO^{\cdot}	Ozono	O_3
Radical hidroperoxilo	HO_2^{\cdot}	Oxigeno singlete	1O_2
Radical lipídico peroxilo	LOO^{\cdot}	Peróxido lipídico	$LOOH$

2.1.2. Especies reactivas de nitrógeno

De manera similar a las EROS, el término especies reactivas de nitrógeno (ERNs) se ha acuñado para incluir el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el peroxinitrito, el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y otros óxidos de nitrógeno o especies reactivas que contienen nitrógeno. Debido a que las ERNs son especies que contienen casi exclusivamente oxígeno, por definición también pueden clasificarse como EROs ⁵⁷. Por esta razón, en diversas fuentes se utiliza la expresión “especies reactivas de oxígeno” (EROs) para referirse tanto a aquellas centradas en oxígeno como en nitrógeno.

La principal molécula radical centrada en nitrógeno (ERN) es el radical óxido nítrico (NO^{\cdot}), el cual se genera mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina en presencia de O_2 (ecuación 1). Esta reacción es catalizada por una

familia de enzimas que contienen hierro llamadas óxido nítrico sintetasas u óxido nítrico sintetetasas (ONS) ⁴⁵. El radical NO[•] también puede ser generado por la reducción de nitritos por acción de diversas reductasas ⁵⁷.



El radical óxido nítrico es una molécula lipofílica no cargada que contiene un solo electrón desapareado, lo que la hace reactiva con otras moléculas como el oxígeno, los radicales superóxido y el glutatión. Aunque el NO[•] no es un radical muy reactivo, puede formar otros intermediarios reactivos ³⁷.

Cuando el radical NO[•] reacciona con el radical O₂^{•-} a baja presión de oxígeno resulta en la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), la forma más reactiva de ERN. Además, cuando el H₂O₂ interactúa con el radical NO[•], resulta en la formación de HO[•] ^{45,57}.

El radical óxido nítrico (NO[•]) modifica directamente al ADN e inactiva las enzimas que lo reparan. El NO[•] es una molécula señalizadora muy reactiva y es un regulador importante de las funciones celulares ³⁷.

A pH fisiológico, el peroxinitrito (ONOO⁻) es un oxidante más fuerte que el O₂^{•-} o el NO[•], y oxida lípidos, proteínas, aminoácidos nitrados y el ADN ^{59,60}. El peroxinitrito es citotóxico y provoca lesiones en los tejidos, oxidando las lipoproteínas de baja densidad. La importancia del ONOO⁻ como oxidante biológico radica en su alta difusibilidad a través de las membranas celulares. Esta molécula puede causar oxidación directa de proteínas y oxidación/modificación de las bases nitrogenadas del ADN, actuando como un oxidante hidroxilo-símil ³⁷.

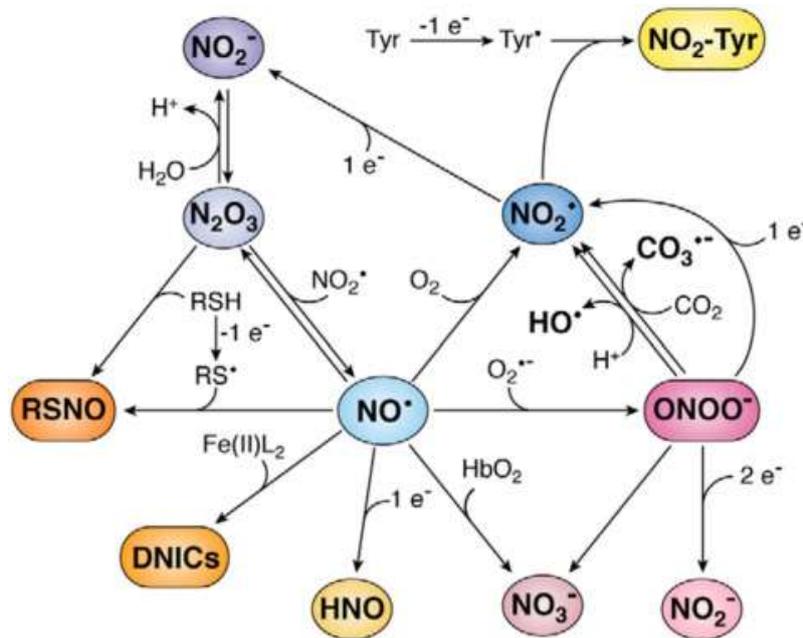
Por otro lado, el dióxido de nitrógeno (NO₂[•]) se forma a partir de la reacción del radical peroxilo (ROO[•]) y NO[•]. El radical NO₂[•] inicia la peroxidación de lípidos para la producción de radicales libres y también oxida el ácido ascórbico ^{37,61}.

El metabolismo bioquímico y la formación de ERNs también se logra por la acción de otras enzimas, incluyendo la xantina oxidorreductasa (XOR) y la lactoperoxidasa LPO ^{45,57}. En la Tabla I-2 se resumen las especies reactivas de nitrógeno generadas en los procesos bioquímicos.

Tabla I-2. Especies reactivas de nitrógeno. Adaptado de Tvrda y Benko., 2020 ³⁹.

Especies radicales		Especies no radicales	
Nombre	Formula	Nombre	Formula
Óxido nítrico	NO [•]	Ácido nitroso	HNO ₂
Dióxido de nitrógeno	NO ₂ [•]	Catión nitrosilo	NO ⁺
		Anión nitroxilo	NO ⁻
		Tetróxido de dinitrógeno	N ₂ O ₄
		Trióxido de dinitrógeno	N ₂ O ₃
		Peroxinitrito	ONOO ⁻
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Catión nitronio (nitrilo)	NO ₂ ⁺
		Cloruro de nitrilo	NO ₂ Cl
		Peroxinitrito de alquilo	ROONO

El radical óxido nítrico (NO[•]) ejerce efectos biológicos a través de la interacción directa y reversible con blancos específicos o mediante la generación de especies secundarias, muchas de las cuales pueden oxidar, nitrosar o nitratar biomoléculas (Figura I-4) ⁶².



Abreviaturas: (O₂^{•-}) = superóxido; (ONOO⁻) = peroxinitrito; (HbO₂) = oxihemoglobina; (NO₃⁻) = nitrato; (O₂) = oxígeno; (NO₂[•]) = dióxido de nitrógeno; (HNO) = nitroxilo; (Fe(II)L₂) = hierro(II) ligado; (DNICs) = complejos de hierro dinitrosilo; (RS[•]) = radical tiilo; (RSNO) = S-nitrosotiol; (N₂O₃) = trióxido de dinitrógeno; (Tyr[•]) = radicales tirosilo; (NO₂-Tyr) = 3-nitrotirosina.

Figura I-4. Radical óxido nítrico y sus derivados de relevancia biológica. Tomado de Möller *et al.*, 2019 ⁶².

La formación de agentes oxidantes derivados del radical NO^\bullet está relacionada con la inflamación, en la que el incremento de NO^\bullet confluye con la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y otros oxidantes. La alta reactividad de las especies generadas por esta confluencia, por ejemplo HO^\bullet y ONOO^- , las convierte en un recurso fundamental de las células inmunitarias para hacer frente a los microorganismos^{62,63}.

Las ERNs interactúan con grupos tiol de proteínas o cisteína libre, o compuestos de masa molecular baja como el tripéptido glutatión. Tales interacciones se denominan nitrosilación-S. Si las proteínas están sujetas a este proceso, pueden perder su actividad funcional, especialmente si los grupos tiol modificados se encuentran en sus sitios activos o alostéricos. Sin embargo, la nitrosilación-S, al ser un proceso reversible, puede ser beneficiosa porque puede proteger los grupos tiol de las proteínas durante eventos oxidativos. Cuando la célula vuelve a condiciones normales, la eliminación del óxido nítrico puede llevar a la restauración de la actividad funcional de los objetivos modificados⁵⁷.

Los derivados S-nitroso de proteínas y otros compuestos tiol, como el glutatión, son firmas comúnmente utilizadas de la presencia de óxido nítrico (NO^\bullet) en sistemas biológicos. El peroxinitrito (ONOO^-), es un oxidante cuya presencia se registra con frecuencia mediante la medición del contenido de nitrotirosina y ditirosina (biomarcadores)⁵⁷.

2.2. Características y comportamiento de ERONs

Las ERONs ocasionan efectos específicos y no específicos en sistemas biológicos. En muchas ocasiones, se podría pensar que el efecto depende de la concentración, sin embargo, esto es incorrecto. Los resultados de la interacción de las ERONs con los objetivos celulares dependen de su naturaleza, los objetivos en sí mismos y el microentorno. Sin embargo, casi todos los compuestos celulares pueden ser atacados por el radical hidroxilo (HO^\bullet)⁵⁷. A continuación, en la Tabla I-3, se muestran algunas características de los radicales libres más comunes³⁹:

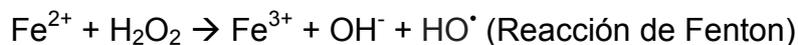
Tabla I-3. Características de algunas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Radical	Características
Superóxido (O₂^{•-})	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Generado a través de procesos enzimáticos, auto oxidación o transferencias de electrones no enzimáticas. ▪ Producido principalmente dentro de las mitocondrias por varias enzimas. ▪ La reactividad con moléculas no radicales depende del pH.
Hidroxilo (HO[•])	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Uno de los radicales libres más reactivos y dañinos. ▪ Puede reaccionar con una amplia gama de biomoléculas, provocando daño oxidativo.
Óxido nítrico (NO[•])	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Desempeña un papel en la transducción de señales y la comunicación intercelular ▪ Implicado en la regulación del tono vascular y la adhesión plaquetaria.
Peroxinitrito (ONOO⁻)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formado por la reacción entre superóxido y óxido nítrico. ▪ Implicado en daño oxidativo y lesión celular.
Radical lipídico peroxilo (LOO[•])	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Generado durante los procesos de peroxidación lipídica. ▪ Puede iniciar reacciones en cadena que conducen a daño celular

El radical superóxido O₂^{•-} se genera mediante la reducción incompleta de oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial o como producto específico de reacciones enzimáticas. Posee carga negativa y, por tanto, es relativamente impermeable a las membranas celulares. Tiene una vida media comparativamente larga (1 μs), lo que permite su difusión dentro de las células y la interacción con varios objetivos celulares. Estudios en células endoteliales indican que la concentración celular en estado estacionario de O₂^{•-} se encuentra en el rango de picomolar a nanomolar. La dismutación de O₂^{•-}, tanto espontánea como catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), constituye la principal fuente de H₂O₂ en las células musculares (2 O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂). El H₂O₂ es permeable a las células y relativamente estable con una vida media de segundos a minutos. En comparación con otras EROs, el H₂O₂ es un agente oxidante relativamente débil, pero en presencia de hierro(III) puede convertirse en el radical hidroxilo (HO[•]), altamente reactivo y citotóxico⁶⁴.

En una sucesión de reacciones llamadas Haber-Weiss y Fenton, los radicales hidroxilo son generados a partir de peróxido de hidrógeno en presencia de

cationes como Fe(III) o Cu(II), los que son reducidos previamente por el anión superóxido ⁶⁵:



Para desarrollar efectos nocivos, una especie reactiva primaria, como el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, reacciona con otra o con un metal de transición, produciendo especies secundarias altamente reactivas, como ONOO^- o HO^{\cdot} . Las ERONs secundarias son catalíticamente muy activas, no están estrictamente controlados y en consecuencia, no pueden actuar como transductores de señales. Por el contrario, las ERONs primarias están bien controladas, sus reacciones con los objetivos son reversibles y no dañan las moléculas objetivo, esto las hace ideales para procesos de señalización intracelular ⁶⁶.

El radical hidroxilo (HO^{\cdot}) es una ERO secundaria, el oxidante más potente y uno de los radicales libres naturales más reactivos conocido. Tiene una vida media muy corta y, por lo tanto, reacciona con moléculas en el lugar de su formación ⁶⁷. Su velocidad de reacción con otras moléculas es alta, aproximadamente de 10^9 a $10^{10} \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ^{68,69}.

La exposición de los ácidos nucleicos al radical hidroxilo (HO^{\cdot}) produce una amplia variedad de productos. Debido a su carácter electrofílico, el radical HO^{\cdot} se adhiere preferentemente a los sitios con mayor densidad electrónica, como las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas). La desoxirribosa y la ribosa también pueden ser afectadas por este radical, lo que puede llevar a roturas en las hebras del ADN ^{69,70}.

Igualmente, la peroxidación lipídica puede iniciarse por la adición del radical HO^{\cdot} a un doble enlace o mediante la extracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno en un ácido graso poliinsaturado. Como resultado se forma un radical lipídico (L^{\cdot}), posteriormente se da la formación del radical peroxilo lipídico (LOO^{\cdot}), este a su vez puede reaccionar con un ácido graso adyacente para producir peróxido lipídico (LOOH) y un segundo radical lipídico (L^{\cdot}). El LOOH puede reaccionar con metales de transición para generar radical alcoxilo lipídico (LO^{\cdot}). Los radicales alcoxilo y peroxilo estimulan las reacciones en

cadena características de la peroxidación lipídica ^{69,71,72}. Este proceso reduce la fluidez de la membrana, aumentando su "permeabilidad" por sustancias que normalmente no la atraviesan, provocando una pérdida adicional en su integridad ^{69,71,73}.

El radical HO[•] también puede interactuar con diversas proteínas. El daño oxidativo a las proteínas es complejo y puede afectar el funcionamiento de receptores, anticuerpos, transducción de señales, proteínas de transporte y enzimas, por ejemplo, el aminoácido metionina puede oxidarse a sulfóxido de metionina, y posteriormente a sulfona. Las cadenas polipeptídicas pueden sufrir la abstracción de hidrogeno, formación de radicales de carbono, y el enlace peptídico puede verse comprometido; estos eventos pueden verse amplificados por la presencia de metales de transición, además, la lisina puede reaccionar con los productos de la peroxidación lipídica u oxidación de azúcares ⁶⁹.

Las ERONs ejercen efectos específicos al interactuar con grupos reactivos en proteínas sensoras o sensibles, lo que a su vez modula la respuesta celular al estrés oxidativo. Los grupos tiol de la cisteína y los centros [Fe-S] son blancos relevantes para las ERONs y participan en la regulación de dicha respuesta ⁵⁷.

Como ya fue mencionado, los efectos de las ERONs son variados y dependen mayormente de las condiciones dadas en cada reacción. Sin embargo, es correcto afirmar que las ERONs ejercen un efecto dual en el metabolismo celular, ya que a niveles bajos/moderados participan en muchas actividades de control redox a favor de la homeostasis celular. Por el contrario, niveles elevados causan daño a proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, membranas y orgánulos, que puede conllevar a efectos nocivos a nivel celular o incluso a nivel sistémico ^{74,75}.

2.3. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

El oxígeno es indispensable para el metabolismo y la producción de energía en casi todas las formas de vida. Muchos procesos biológicos naturales de nuestro cuerpo, como respirar, digerir alimentos, metabolizar el alcohol y convertir las grasas en energía, producen radicales libres. Sin embargo, estas especies reactivas pueden causar daños a células, tejidos y órganos. En respuesta a esta amenaza, los organismos utilizan diversos tipos de defensas

antioxidantes, como enzimas junto con sus sistemas de respaldo y antioxidantes de baja masa molecular; sistemas de eliminación de daños y sistemas de reparación o reemplazo para disfrutar de la vida en un ambiente rico en oxígeno ^{35,76,77}.

Un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo a una molécula objetivo ^{77,78}. Estos controlan la autooxidación interrumpiendo la propagación de radicales libres o inhibiendo la formación de radicales libres mediante diferentes mecanismos. Los antioxidantes más eficaces son aquellos que poseen la capacidad de interferir con las reacciones en cadena de los radicales libres. Pueden contener anillos fenólicos o aromáticos que permiten a estos antioxidantes donar H[•] a los radicales libres formados durante la oxidación. Luego, el radical intermedio se estabiliza mediante la deslocalización por resonancia del electrón dentro del anillo aromático ⁷⁹.

Las defensas antioxidantes se clasifican según su actividad como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos funcionan al convertir los productos metabólicos oxidados en sustancias inofensivas a través de varios pasos que involucran cofactores como hierro, zinc, cobre y manganeso. Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos interceptan y terminan las reacciones en cadena de los radicales libres ⁸⁰.

2.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Los principales antioxidantes enzimáticos son las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Además de estas enzimas principales, otros antioxidantes incluyen la hemo oxigenasa-1 y proteínas redox, como las tioredoxinas, peroxiredoxinas y glutarredoxinas (Tabla I-4). Dado que el radical superóxido es la principal especie reactiva de oxígeno producida desde diversas fuentes, su dismutación por la SOD es de importancia primordial para cada célula. La SOD posee cuatro formas: CuZn-SOD, Mn-SOD, Ni-SOD y Fe-SOD ⁶⁵.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), generado por la actividad de las SOD o mediante la acción de enzimas como la xantina oxidasa, experimenta su

reducción a agua gracias a la intervención de la catalasa y la GSH-Px. Esta última es una de las enzimas responsable por la reducción de los hidroperóxidos lipídicos en alcoholes lipídicos no tóxicos, generados como consecuencia de la peroxidación lipídica en las membranas celulares ^{65,81}.

El control de los niveles de H₂O₂ está estrechamente asociado con varias enzimas que contienen tioles como, peroxirredoxinas (PRXs), glutarredoxinas y sus sistemas de respaldo como las glutatión peroxidasa, tiorredoxina reductasas (TRX1 y TRX2), así como por la catalasa ^{65,82}.

Común a estos antioxidantes es la necesidad de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como equivalente reductor. La NADPH sirve como cofactor para las enzimas antioxidantes, las parejas NADP⁺/NADPH y NAD⁺/NADH son esenciales para mantener una gran variedad de procesos biológicos, incluido el estado redox celular, el metabolismo energético y la función mitocondrial, ya que mantiene la catalasa en su forma activa y es utilizado como cofactor por TRXs y la reductasa de GSH ^{65,83}.

Tabla I-4. Función principal de algunas defensas antioxidantes enzimáticas.

Enzima	Símbolo	Función Principal
Catalasa	CAT	Descompone peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
Superóxido dismutasa	SOD	Convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno.
Glutatión peroxidasa	GSH-Px	Detoxificación de peróxidos utilizando glutatión.
Glutatión reductasa	GR	Cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido, esencial para la actividad de la GPx.
Peroxirredoxinas	Prx	Reducen peróxidos orgánicos utilizando tioles.
Glutation-S-transferasas	GST	Participan en la conjugación de glutatión con compuestos tóxicos, facilitando su excreción.

Por otra parte, las glutatión S-transferasas (GST), otra familia de enzimas antioxidantes han sido consideradas como parte de la defensa celular contra numerosas sustancias químicas nocivas producidas endógenamente o en el medio ambiente, ya que inactivan metabolitos secundarios como aldehídos insaturados, epóxidos e hidroperóxidos, estas enzimas ejercen su función mediante la adición de glutatión (GSH) a electrófilos ^{65,84}.

2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los sistemas de defensa antioxidantes no enzimáticos consisten en compuestos de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico (vitamina C) y el glutatión (GSH), que son activos en fase acuosa, y son encontrados principalmente en compartimentos citosólicos, mitocondriales y nucleares, mientras que los antioxidantes lipófilos (como el α -tocoferol y el β -caroteno) se hallan en las membranas celulares, donde inhiben las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica ^{85,86}.

Estos agentes antioxidantes son secuestrantes o captadores (*scavengers*) y cumplen la función tanto de trampas químicas para radicales libres oxidantes y especies activadas de oxígeno, como de extintores (*quencher*s) físicos para especies excitadas. Los productos resultantes de la interacción de estos agentes captadores con los radicales libres pueden descomponerse mediante dismutación, recombinación o reducción por medio de captadores secundarios. Por ende, ya no actuarían como iniciadores de reacciones en cadena descontroladas. Debido a esto, los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como minerales, vitaminas, carotenoides, cofactores, glutatión y polifenoles resultan cruciales para los mecanismos de defensa antioxidantes de las células y los organismos ^{79,86}.

Los antioxidantes no enzimáticos pueden clasificarse en dos categorías principales ⁸⁰:

- **Antioxidantes exógenos:** Estos son antioxidantes naturales derivados de fuentes externas como plantas y alimentos. Ejemplos incluyen la vitamina E, A, C, flavonoides, carotenoides y polifenoles.
- **Antioxidantes endógenos:** Estos son antioxidantes fisiológicos producidos dentro del cuerpo para combatir el estrés oxidativo. Ejemplos incluyen el glutatión, el ácido úrico, la melatonina y la bilirrubina.

Los antioxidantes no enzimáticos actúan a través de varios mecanismos para neutralizar los radicales libres y combatir el estrés oxidativo. Algunos de sus mecanismos de acción clave incluyen interceptación de radicales libres, terminación de reacciones en cadena, captación de especies reactivas de

oxígeno (EROs), regeneración de otros antioxidantes, quelación de iones metálicos (Tabla I-5) ⁸⁰:

Tabla I-5. Mecanismos de acción de los antioxidantes no enzimáticos.

Intercepción de radicales libres	Los antioxidantes no enzimáticos interceptan los radicales libres donando electrones o átomos de hidrógeno para estabilizar y neutralizar la especie reactiva.
Terminación de reacciones en cadena	Los antioxidantes pueden terminar las reacciones en cadena de los radicales libres al romper la cadena de reacciones de oxidación y prevenir daños adicionales a los componentes celulares.
Captación de especies reactivas de oxígeno (EROs)	Los antioxidantes no enzimáticos capturan especies reactivas de oxígeno, como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el radical peroxilo lipídico (LOO^{\cdot}), para prevenir el daño oxidativo.
Regeneración de otros antioxidantes	Algunos antioxidantes tienen la capacidad de regenerar otros antioxidantes, como la vitamina C regenerando la vitamina E, para mejorar el sistema global de defensa antioxidante.
Quelación de iones metálicos	Ciertos antioxidantes pueden quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, que están involucrados en la generación de especies reactivas de oxígeno, reduciendo así el estrés oxidativo.

Considerando el enfoque de este trabajo de tesis, las dos siguientes secciones tratarán de la relación que guarda el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno con el cáncer y la hipertensión.

3. Relación del estrés oxidativo con el cáncer: efecto promotor y supresor.

Anteriormente, se indicó la relación existente entre el estrés oxidativo y diferentes padecimientos crónicos, así mismo, se mencionó el rol dual de las especies reactivas de oxígeno en el metabolismo celular, actuando como compuestos de control redox, pero también como agentes nocivos. Dado el enfoque de este trabajo de tesis, es preciso profundizar en cómo el estrés oxidativo y las EROs se relacionan con el desarrollo del cáncer, pero también,

cómo el estrés oxidativo (compuestos que lo generen) puede emplearse como una estrategia terapéutica frente a éste.

El estrés oxidativo está relacionado con el cáncer de una manera compleja. Como ya fue comentado, por un lado, niveles anormales de EROs pueden causar daño al ADN, proteínas y lípidos, lo que puede conllevar a la iniciación y evolución del cáncer. Además, las células cancerosas exhiben mecanismos antioxidantes regulados al alza, lo que les permite desarrollarse en un ambiente con niveles intermedios de EROs, conduciendo a procesos que interactúan de manera compleja y contribuyen al desarrollo de cáncer. Sin embargo, cuando los niveles de EROs aumentan por encima de cierto umbral, las células cancerosas ya no pueden lidiar con el estrés oxidativo y las funciones antitumorales de las EROs son evidenciadas, dándose su muerte. Por lo tanto, el uso de agentes anticancerígenos inductores de estrés oxidativo es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer ⁸⁷. En la Figura I-5 se muestra la relación entre el aumento de los niveles de EROs en células normales y tumorales, y las terapias aplicadas para regularlos.

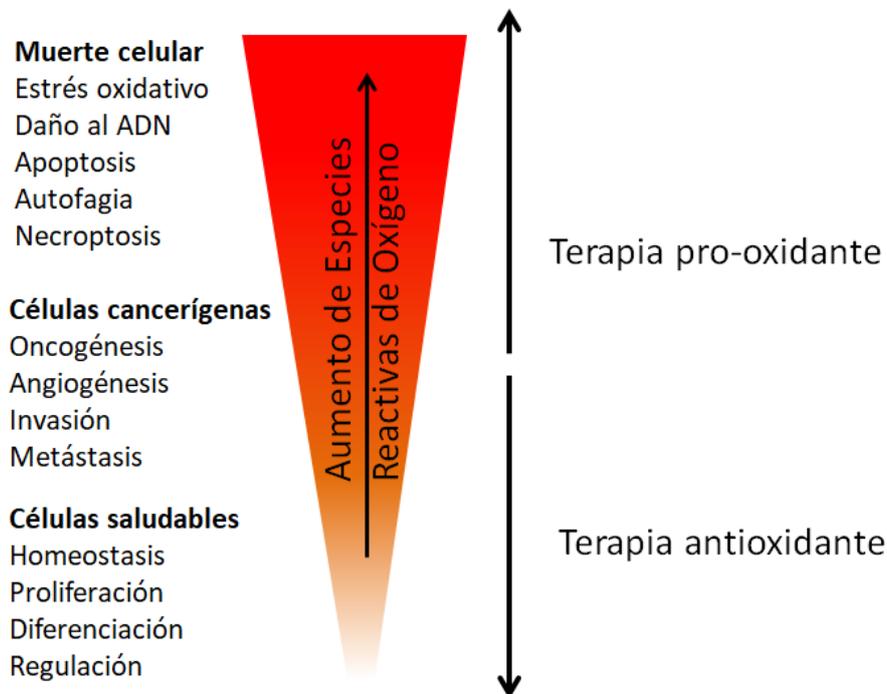


Figura I-5. Niveles de EROs en células cancerosas y saludables, y su regulación en la terapia contra el cáncer. Adaptado de Azmanova y Pitto-Barry., 2022 ⁸⁷.

3.1. Funciones promotoras de tumores de las EROs

Las EROs pueden activar varios factores de transcripción y controlar la expresión de proteínas que influyen en la inflamación, la transformación celular y la progresión tumoral a través de varios mecanismos como la modificación oxidativa de las moléculas de señalización y la regulación de estas vías, la activación de factores de transcripción susceptibles a cambios redox, la inducción de daño al ADN e inestabilidad genómica, y comunicación cruzada con vías inflamatorias⁸⁸.

Las EROs pueden oxidar y modificar directamente moléculas de señalización como proteínas quinasas, fosfatasas y factores de transcripción, como PI3K/Akt, MAPK y Wnt/ β -catenina, que son fundamentales para la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Esta modificación oxidativa puede alterar la actividad y función de estas moléculas, provocando cambios en la expresión genética y las respuestas celulares que impulsan la inflamación, la transformación celular y la progresión tumoral⁸⁸⁻⁹⁰.

Así mismo, las EROs pueden activar factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, HIF-1 α y STAT3 modulando su estado redox. La oxidación inducida por EROs de residuos de cisteína específicos en estos factores de transcripción puede promover su activación y translocación nuclear, lo que resulta en la transcripción de genes involucrados en la inflamación, la supervivencia celular y la progresión tumoral a través de la proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis celular^{88,91}.

Por ejemplo, las EROs pueden interactuar con vías inflamatorias, como la vía de señalización de NF- κ B (el factor nuclear kappa B, son un grupo de proteínas estrechamente relacionadas con el crecimiento y la supervivencia celular, así como en la regulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias), para promover la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Este microambiente inflamatorio puede promover el crecimiento, la invasión y la metástasis de tumores al formar un entorno favorable para las células cancerosas^{88,92}.

También, se sabe que el daño oxidativo que ocasionan los EROs al ADN puede conllevar a mutaciones en genes supresores de tumores como p53, Rb y PTEN. Esta inestabilidad genómica puede impulsar la adquisición de propiedades malignas por parte de las células normales y a la tumorigénesis al alterar la expresión de proteínas clave involucradas en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN influyendo en el desarrollo y la progresión del tumor ^{88,93,94}.

Al mismo tiempo, niveles elevados de EROs pueden promover la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), lo que proporcionaría oxígeno y nutrientes a las células tumorales ^{95,96}. También, el estrés oxidativo puede aumentar el potencial invasivo y metastásico de las células cancerosas al promover la transición epitelial a mesenquimal (EMT) y facilitar la propagación de las células cancerosas a sitios distantes ⁹⁷.

Los biólogos Douglas Hanahan y Robert Weinberg en el año 2000 publicaron un artículo de revisión, en el que expusieron un conjunto de capacidades funcionales adquiridas por las células humanas a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico, dichas capacidades están estrechamente relacionadas con el estrés oxidativo. Estas características distintivas de las células cancerosas facilitan su crecimiento, progresión y la metástasis del tumor ⁹⁸. Posteriormente, en el 2022, Hanahan publicó una actualización de dicha conceptualización, la cual se resume a continuación (Tabla I-6) ⁹⁹:

Tabla I-6. Características del cáncer. Adaptado de *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Hanahan., 2022 ⁹⁹.

Característica del cáncer	Descripción
Mantener la señalización proliferativa	Las células cancerosas tienen la capacidad de activar continuamente vías de señalización que promueven el crecimiento y la división celular, permitiéndoles proliferar de manera incontrolada.
Evadir los inhibidores del crecimiento	Las células cancerosas pueden eludir los mecanismos que normalmente inhiben el crecimiento celular, lo que les permite evadir señales que detendrían típicamente su proliferación
Resistir la muerte celular	Las células cancerosas pueden evitar la muerte celular programada (apoptosis), lo que les permite sobrevivir y acumular alteraciones genéticas que contribuyen al crecimiento tumoral
Posibilitar la inmortalidad replicativa	Las células cancerosas pueden mantener sus telómeros, las tapas protectoras en los extremos de los cromosomas, lo que les permite dividirse indefinidamente sin experimentar senescencia o muerte celular.
Inducir/acceder a la vascularización	Las células cancerosas pueden estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para asegurar un suministro de sangre que respalde el crecimiento y la metástasis del tumor.
Activar la invasión y la metástasis	Las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir tejidos circundantes y diseminarse a sitios distantes en el cuerpo, formando tumores secundarios mediante el proceso de metástasis.
Reprogramar el metabolismo celular	Las células cancerosas alteran su metabolismo para respaldar su crecimiento y proliferación rápidos, a menudo favoreciendo la glucólisis (efecto Warburg) incluso en presencia de oxígeno.
Evitar la destrucción inmune	Las células cancerosas pueden eludir la detección y destrucción por parte del sistema inmunológico, permitiéndoles escapar de la vigilancia inmune y seguir creciendo sin restricciones.

Por otra parte, las células cancerosas han desarrollado diversos mecanismos para contrarrestar los altos niveles de EROs y mantener la homeostasis redox. Algunos mecanismos clave incluyen ¹⁰⁰:

- Sistemas de defensa antioxidante elevados: a menudo exhiben una mayor expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa para neutralizar EROs y prevenir el daño oxidativo.
- Activación de la vía Nrf2: El factor de transcripción Nrf2 juega un papel crucial en la regulación de la expresión de genes antioxidantes, es decir que pueden activar la vía Nrf2 para potenciar la producción de proteínas antioxidantes y hacer frente al estrés oxidativo.
- Aumento de los niveles de glutatión (GSH): frecuentemente aumentan la síntesis de glutatión, un antioxidante celular importante, para mantener el equilibrio redox y protegerse contra el daño inducido por EROs.
- Mecanismos mejorados de reparación del ADN: pueden contar con sistemas de reparación del ADN más eficientes para contrarrestar el daño y las mutaciones inducidas por EROs, permitiéndoles sobrevivir y proliferar a pesar del estrés oxidativo.
- Alteración de las vías metabólicas: exhiben reprogramación metabólica, como el efecto Warburg, que puede influir en la producción de EROs y en las respuestas antioxidantes para respaldar su supervivencia y crecimiento.

3.2. Funciones supresoras de tumores de las EROs

Las células cancerosas han desarrollado un sistema de desintoxicación de EROs confiable. Como resultado, la dependencia de estas células por este sistema antioxidante representa una vulnerabilidad que puede ser aprovechada para ocasionar la muerte celular a través de terapias específicas. Esto se puede lograr elevando el nivel de EROs por encima del umbral de toxicidad, sin afectar a las células normales, que se caracterizan por niveles más bajos de EROs intracelulares ¹⁰¹⁻¹⁰³.

Cuando los niveles de EROs superan cierto umbral, las células de cáncer no puedan hacer frente al estrés oxidativo y se evidencia el potencial anticancerígeno de estas, ya que son capaces de inducir la muerte celular que se manifiesta a través de procesos como la apoptosis, autofagia o necroptosis, debido a la disfunción mitocondrial, activación de vías apoptóticas, modulación de vías de señalización celular, y sensibilización a la quimioterapia^{87,101}.

Las EROs activan la apoptosis extrínseca a través de receptores de muerte, desencadenando una cascada de eventos que culminan en la muerte celular. Por otro lado, la apoptosis intrínseca puede ser provocada por el daño inducido por las EROs sobre la función mitocondrial, lo que conduce a la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c y la activación de caspasas, que son mediadores clave de la apoptosis^{101,104,105}.

Además, las EROs como el H₂O₂, pueden inhibir la actividad de la enzima mTOR, lo que induce la autofagia, también promueve la lipidación de la proteína LC3, aumentando la formación de autofagosomas. Del mismo modo, las EROs pueden regular positivamente la expresión de beclin-1, una proteína esencial para iniciar la autofagia^{101,106,107}.

Por otra parte las EROs pueden activar receptores de muerte como FasR y TNFR1, modulando moléculas de señalización clave como RIPK1 y RIPK3, induciendo la disfunción mitocondrial y la liberación de EROs mitocondriales, promoviendo el daño celular inducido por el estrés oxidativo, contribuyendo colectivamente a la iniciación y ejecución de la muerte celular por necroptosis^{101,108,109}.

Existen diversos medicamentos anticancerígenos clínicamente aprobados que tienen como uno de sus mecanismos de acción el aumento del estrés oxidativo, entre estos se incluyen⁸⁷:

- **Taxanos (paclitaxel, docetaxel):** estos medicamentos inducen estrés oxidativo en las células cancerosas, lo que conduce a la muerte celular.
- **Alcaloides de la vincristina (vinblastina, vinorelbina):** similar a los taxanos, los alcaloides de la vincristina promueven la liberación de

citocromo c desde las mitocondrias, provocando la muerte celular a través del estrés oxidativo.

- **Antraciclinas (doxorrubicina, epirubicina, daunorrubicina):** por ejemplo, la doxorrubicina, genera cantidades excesivas de EROs, provocando daño en el ADN, disfunción mitocondrial y, en última instancia, la muerte celular.

4. Relación del estrés oxidativo con la hipertensión.

Los factores determinantes de la hipertensión implican una intrincada interacción entre aspectos genéticos, ambientales y fisiopatológicos que afectan a diversos sistemas reguladores. Como ya fue explicado, el estrés oxidativo juega un rol crucial en la etiología de diversas condiciones crónicas, entre estas, la hipertensión y demás afecciones cardíacas, ya que perturba la señalización y el control redox, resultando en daño molecular. Este desequilibrio redox contribuye a la hipertensión a través de procesos como la disfunción endotelial, disfunción mitocondrial, inflamación y fibrosis, resultando en disfunción en los vasos sanguíneos, cambios en la estructura del sistema cardiovascular (remodelación vascular), problemas en la función renal y estimulación del sistema nervioso simpático. Además, el sistema inmunológico también se encuentra estrechamente relacionado con la hipertensión, ya que las células inmunológicas activadas migran hacia los tejidos, promoviendo su inflamación, fibrosis y daño ^{110,111}.

4.1. Disfunción endotelial

El estrés oxidativo afecta la función endotelial al reducir la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), un vasodilatador crucial. Los niveles elevados de EROs, como el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), pueden reaccionar con el NO, dando lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$). Este último puede inactivar aún más el NO, disminuyendo su biodisponibilidad. Esta reducción en los niveles de NO compromete la vasodilatación y promueve la vasoconstricción, contribuyendo así a la disfunción endotelial ¹¹². Como resultado, aumenta la resistencia vascular y la presión arterial. Además, el estrés oxidativo puede dañar directamente las células endoteliales al provocar modificaciones oxidativas. Este daño disruptivo afecta las funciones celulares normales y las

vías de señalización, generando disfunción endotelial ¹¹³. Por otro lado, las EROs pueden activar vías proinflamatorias en las células endoteliales, exacerbando aún más la disfunción al promover la adhesión de células inmunitarias y contribuir al desarrollo de un estado proinflamatorio en las paredes vasculares. Esta inflamación crónica en el endotelio puede deteriorar la función vascular y fomentar la aterosclerosis, un contribuyente clave a enfermedades cardiovasculares como la hipertensión ¹¹⁴. También, el estrés oxidativo puede interferir con la capacidad de las células endoteliales para repararse y regenerarse, perturbando las funciones de las células progenitoras endoteliales encargadas de este proceso. Esta interferencia en los mecanismos de reparación puede agravar aún más la disfunción endotelial y contribuir al daño vascular ¹¹⁵.

4.2. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial desempeña un papel crucial en la promoción de la hipertensión a través de diversos mecanismos interconectados. La inducción de estrés oxidativo perturba el delicado equilibrio entre la producción de EROs y las defensas antioxidantes, resultando en daño oxidativo a los componentes mitocondriales. En condiciones patológicas como la hipertensión, la función mitocondrial deteriorada conduce a una fuga de electrones incrementada a lo largo de la cadena de transporte de electrones, generando superóxido dentro de las mitocondrias y contribuyendo al estrés oxidativo. Este estrés oxidativo mitocondrial, ya sea originado en fuentes mitocondriales u otros sistemas celulares generadores de EROs, macromoléculas mitocondriales, interrumpiendo la función normal y perpetuando un ciclo vicioso de daño oxidativo ^{116,117}. La interacción entre el estrés oxidativo inducido por EROs de las NADPH oxidasas (NOX) y las mitocondrias a través de las vías de señalización EROs/NO amplifica la producción de EROs, contribuyendo aún más a la disfunción mitocondrial y la hipertensión. Destacadamente, NOX2 desempeña un papel crucial en la promoción de la disfunción mitocondrial en la hipertensión ^{110,118,119}.

4.3. Remodelación vascular

La remodelación vascular, que implica cambios estructurales en los vasos sanguíneos, como el engrosamiento de las paredes vasculares y alteraciones en la arquitectura vascular, puede explicarse a través de diversos mecanismos influenciados por el estrés oxidativo ^{120,121}.

En primer lugar, el estrés oxidativo puede estimular la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares (CMLVs), componentes celulares clave de las paredes vasculares. La producción excesiva de EROs activa vías de señalización que fomentan la proliferación y migración de las CMLVs, contribuyendo al engrosamiento de las paredes vasculares y a la remodelación vascular ^{122,123}. Además, el estrés oxidativo puede influir en la producción y degradación de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina, que proporcionan soporte estructural a los vasos sanguíneos. Esta alteración en el equilibrio entre síntesis y degradación de la matriz extracelular lleva a la deposición anormal de proteínas de la matriz y cambios en la rigidez de los vasos, contribuyendo así a la remodelación vascular ^{124,125}. Asimismo, el estrés oxidativo desencadena respuestas inflamatorias en las paredes vasculares, reclutando células inmunitarias y produciendo citocinas proinflamatorias. La inflamación crónica resultante puede promover cambios fibróticos, caracterizados por la acumulación de colágeno y otras proteínas de la matriz, resultando en el endurecimiento de las paredes vasculares, la disminución de la complacencia vascular contribuyendo a la remodelación vascular ^{126,127}. También, la disfunción endotelial inducida por el estrés oxidativo, ya mencionada, asociada a una menor biodisponibilidad de NO y aumento de la vasoconstricción, puede perturbar el equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción, lo que lleva a cambios en los patrones de flujo sanguíneo y esfuerzo de cizallamiento en los vasos, desencadenando así procesos de remodelación vascular, como la hipertrofia e hiperplasia de las CMLVs. Del mismo modo, la disfunción mitocondrial puede agravar aún más el estrés oxidativo en la vasculatura y promover cambios estructurales en los vasos sanguíneos. ^{110,128}.

4.4. Inflamación y fibrosis

Las EROs desempeñan un papel fundamental en desencadenar la inflamación y la fibrosis a través de diversos mecanismos interconectados. Tal como se discutió con anterioridad, las EROs pueden iniciar vías de señalización proinflamatorias dentro de las células, activando factores como NF- κ B y AP-1, conduciendo a la expresión de citocinas inflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión¹²⁹. Esta cascada inflamatoria atrae células inmunitarias al sitio afectado, intensificando la respuesta inflamatoria. La disfunción endotelial inducida por el estrés oxidativo contribuye aún más al aumentar la expresión de moléculas de adhesión, facilitando la adhesión y transmigración de células inmunitarias a las paredes vasculares. Una vez en el tejido, estas células inmunitarias liberan mediadores inflamatorios adicionales, perpetuando la inflamación y contribuyendo al daño tisular y la fibrosis^{130–132}. Además, las EROs estimulan los fibroblastos, promoviendo la producción excesiva de matriz extracelular y la diferenciación de estos en miofibroblastos, cruciales para la reparación tisular y la fibrosis^{133,134}. Las modificaciones inducidas por el estrés oxidativo en las proteínas desregulan aún más las vías de señalización implicadas en la inflamación y la fibrosis. La activación del inflamasoma NLRP3 por los EROs amplifica la respuesta inflamatoria, liberando citocinas proinflamatorias y contribuyendo a la inflamación tisular, la fibrosis y la remodelación¹³⁵.

4.5. Efectos renales

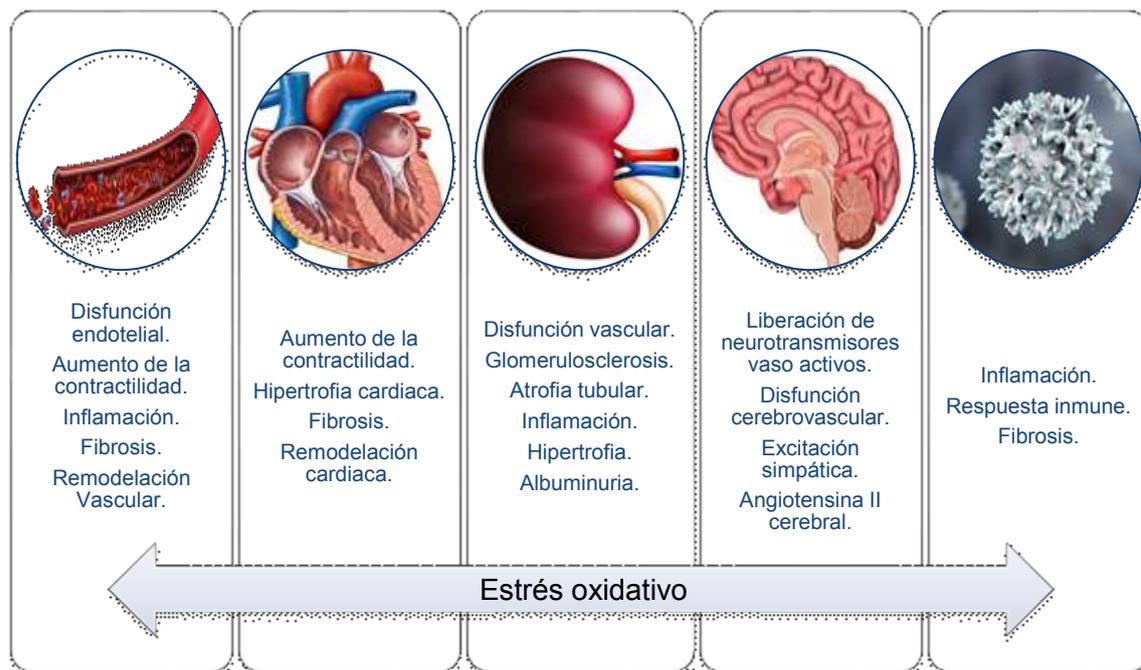
El estrés oxidativo ejerce múltiples efectos en los riñones, contribuyendo a la inducción de la hipertensión a través de varios mecanismos. En primer lugar, estimula la liberación de renina, una enzima crucial para la regulación de la presión arterial, lo que lleva a la subsiguiente activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Esta cascada hormonal induce vasoconstricción y retención de sodio, contribuyendo a la hipertensión¹³⁶. Además, el estrés oxidativo activa los nervios aferentes renales, aumentando la actividad del sistema nervioso simpático, resultando en vasoconstricción, aumento de la frecuencia cardíaca e hipertensión sostenida^{110,137}. El estrés oxidativo también puede causar disfunción glomerular, lo que perturba el proceso de filtración, llevando a la retención de sodio y agua, que contribuye a

la expansión del volumen (volumen sanguíneo o al volumen de líquido extracelular en el cuerpo) y a la hipertensión ¹³⁸. Así mismo, la producción de superóxido en segmentos específicos de nefrona/nefrón (unidad estructural y funcional básica del riñón, responsable de la purificación de la sangre) aumenta la reactividad a angiotensina II (causa vasoconstricción) ¹¹⁰. Además, el estrés oxidativo puede llevar a la disfunción de los receptores renales de dopamina (D1-D5R), que regulan el estado redox al disminuir la generación de EROs. La disfunción de estos receptores promueve el estrés oxidativo y la hipertensión ^{139,140}. En general, el estrés oxidativo en el riñón promueve la liberación de renina, activa los nervios aferentes renales, causa disfunción de las células glomerulares y altera la homeostasis del Na⁺ y del agua, procesos que contribuyen al desarrollo de la hipertensión ^{110,137,141}.

4.6. Activación del sistema nervioso simpático

El sistema nervioso simpático (SNS) prepara el cuerpo para situaciones de estrés, emergencia o actividad intensa, y mantiene la homeostasis durante las actividades diarias como el ejercicio, la ingesta de alimentos o la regulación de la temperatura corporal ¹⁴². La activación del SNS y la promoción de la hipertensión, inducidas por el estrés oxidativo, ocurren a través de diversos mecanismos relacionados entre sí.

Se ha demostrado que las EROs pueden aumentar la actividad del SNS y elevar la presión arterial. Esta activación puede darse a través de una disminución de la producción/disponibilidad de NO e IL-1 β , dos moduladores conocidos de la actividad del SNS ¹⁴³. Así mismo, la lesión renal producto del estrés oxidativo, puede activar vías aferentes que conectan con regiones del cerebro involucradas en el control noradrenérgico de la presión arterial ¹⁴⁴. Asimismo, en un modelo de hipertensión en roedores, se demostró la relación existente entre la activación del SNS, la respuesta inmune y la inflamación, ya que la excitación del SNS activa los linfocitos T esplénicos a través de señales redox, lo que lleva a la producción de citocinas proinflamatorias y al desarrollo de la hipertensión ¹⁴⁵. En el esquema I-2 se resume la relación del aumento de EROs con la hipertensión.



Esquema I-2. Efectos funcionales del estrés oxidativo en sistemas y órganos reguladores en la fisiopatología de la hipertensión. Adaptado de Griendling et al., 2021 ¹¹⁰.

5. Química Bioinorgánica

La química bioinorgánica, concebida fundamentalmente como la intersección entre la bioquímica y la química inorgánica, en general se encarga de estudiar la interacción de los metales con los sistemas vivos ¹⁴⁶. En un principio, se trató de una subdisciplina enfocada en el uso de complejos de iones metálicos como agentes terapéuticos o agentes diagnósticos ¹⁴⁷. Sin embargo, evolucionó en un campo de estudio altamente interdisciplinar en el que se busca entender el rol de los elementos metálicos y sus derivados en los sistemas vivos y las moléculas propias de estos, afectando procesos fisiológicos y reacciones bioquímicas fundamentales, aunque aún se encarga del estudio de complejos metálicos como agentes terapéuticos y diagnósticos ¹⁴⁸. En este sentido, uno de los grandes logros iniciales de dicha especialidad, fue el desarrollo del primer fármaco eficaz contra la sífilis, una mezcla de compuestos que contienen arsénico llamado arsfenamina o salvarsán ^{149,150}. Así mismo, el posterior descubrimiento del compuesto quimioterapéutico cisplatino derivó en un creciente interés por esta rama del conocimiento, que desde entonces, condujo al desarrollo de nuevos compuestos derivados de platino y otros metales para el tratamiento del cáncer y demás enfermedades ^{151,152}.

Este trabajo de tesis doctoral se desarrolló en el marco de la química bioinorgánica, y tuvo como objetivo principal el estudio de nuevos complejos de coordinación con potencial anticancerígeno y antihipertensivo a través de la modulación del estado redox celular, por lo que a continuación se hará una breve descripción de la importancia de los metales en medicina.

6. Metales en medicina

Los metales desempeñan funciones vitales como nutrientes o medicamentos, y proporcionan funcionalidades químicas que no son accesibles a los compuestos puramente orgánicos. Al menos 10 metales son esenciales para la vida humana y alrededor de otros 46 metales no esenciales son utilizados en terapias farmacológicas o como agentes de diagnóstico ¹⁵³.

Los metales esenciales son un grupo de elementos metálicos que los organismos vivos necesitan para sus funciones fisiológicas y procesos biológicos normales. Se denominan de esta manera porque el cuerpo humano no puede sintetizarlos y debe obtenerlos a partir de la dieta para mantener una adecuada salud y bienestar. Son necesarios en diversos procesos biológicos, como la catálisis enzimática (cofactores como Fe, Zn, Cu y Mn), la señalización celular, la regulación de la expresión genética, la modulación de procesos fisiológicos y el soporte estructural (Ca, Mg). El equilibrio de algunos iones dentro de las células y tejidos asegura el adecuado funcionamiento de los sistemas biológicos, como aquellos regulados por Na y K ¹⁵⁴. Mantener niveles adecuados de estos metales, es necesario para conservar un buen estado de salud, pues su deficiencia o exceso puede conducir a diversos problemas de salud ¹⁵⁵.

Los elementos esenciales comunes para los humanos incluyen hierro, calcio, zinc, magnesio, cobre, manganeso, selenio, yodo, cromo y molibdeno. Estos bioelementos son cruciales para funciones como el transporte de oxígeno, la salud ósea, la función inmune, la defensa antioxidante y el metabolismo (Tabla I-7) ¹⁵⁶.

Tabla I-7. Algunos elementos esenciales y sus funciones biológicas de mayor relevancia.

Metal esencial	Función biológica
Fe	Esencial para el transporte de oxígeno en la sangre (como parte de la hemoglobina) y para el metabolismo energético.
Ca	Importante para la formación de huesos y dientes, la función muscular, la transmisión nerviosa y la coagulación sanguínea.
Zn	Desempeña un papel en la función inmune, la cicatrización de heridas, la expresión genética y la actividad antioxidante.
Mg	Esencial para la función muscular y nerviosa, la producción de energía y la salud ósea.
Cu	Requerido para la formación de glóbulos rojos, la absorción de hierro y la defensa antioxidante.
Mn	Interviene en la formación ósea, el metabolismo y la defensa antioxidante.
Se	Actúa como antioxidante, apoya la función tiroidea y desempeña un papel en la respuesta inmune.
I	Esencial para la producción de hormona tiroidea y la regulación del metabolismo.
Cr	Ayuda a regular los niveles de azúcar en sangre y el metabolismo.
Mo	Requerido para el funcionamiento de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo.

Del mismo modo, los elementos metálicos son de gran relevancia médica ya que han sido empleados y/o estudiados para el tratamiento de diversas afecciones, tales como el cáncer, trastornos gastrointestinales, infecciones microbianas y parasitarias, artritis, diabetes, infecciones virales, trastornos cardiovasculares y trastornos de la salud mental ¹⁵⁷.

Así mismo, algunos metales han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico por imágenes en forma de radiofármacos y agentes de contraste, algunos de los metales comúnmente empleados para tal fin incluyen al isótopo radiactivo tecnecio-99m (^{99m}Tc), galio (Ga), gadolinio (Gd), indio (In) y talio (Tl), usados particularmente en exploraciones por tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y como agentes de contraste en imágenes por resonancia magnética (MRI) ¹⁵⁷.

Por otra parte, también se diseñan medicamentos/suplementos para el tratamiento de condiciones que resultan de concentraciones insuficientes de

metales esenciales en el cuerpo, como trastornos metabólicos genéticos (acrodermatitis enteropática, enfermedad de Menkes) o por complicaciones en casos de atrofia gástrica o enfermedad renal crónica ¹⁵⁷.

Los compuestos basados en metales empleados con fines medicinales, o metalofármacos, se distinguen de los compuestos puramente orgánicos por sus mecanismos de activación. En este sentido, se consideran profármacos, pues pueden sufrir cambios estructurales en el camino hacia el sitio objetivo o en él. Este proceso puede involucrar sustitución de ligandos, reacciones redox, o apertura de anillos quelatos. Además, poseen mecanismos de acción únicos debido a sus propiedades electrónicas y estructurales versátiles, como diferentes estados de oxidación, geometrías de coordinación y tipos de ligandos. Por otro lado, los metalofármacos también se caracterizan por interactuar con varios objetivos biológicos simultáneamente. A su vez, los metalofármacos pueden activarse selectivamente en el sitio objetivo mediante estímulos externos como luz, radiación, sonido o calor, proporcionando posibilidades de control y especificidad poco común en compuestos orgánicos ¹⁵³.

Los metalofármacos ejercen sus efectos a través de diferentes mecanismos de acción como daño a los sistemas enzimáticos de la membrana celular de los microorganismos, provocando la muerte celular; unión covalente a biomoléculas, facilitada por la facilidad de intercambio de ligandos; interacción con objetivos proteicos específicos, interfiriendo con su función; inducción de procesos proteómicos, transcriptómicos y metabolómicos; o mejora de la respuesta inmune, potencialmente mediante la generación de especies reactivas de oxígeno ¹⁵⁸.

La química bioinorgánica y la química inorgánica medicinal tienen una participación clave en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer gracias al estudio de nuevos metalofármacos (diseño, síntesis, caracterización, evaluación preclínica y mecanismo de acción). Sus mecanismos de acción en el tratamiento del cáncer comúnmente incluyen la coordinación del metal con biomoléculas (ADN o enzimas específicas), la actividad redox y la producción de EROs. Estos mecanismos permiten que los metalofármacos interactúen con

objetivos específicos e inhiban vías de señalización claves relacionadas con la progresión del cáncer ^{159,160}.

Uno de los compuestos quimioterapéuticos más estudiado basado en un metal de transición es el *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (cis-diaminodicloroplatino(II) o cisplatino). Este compuesto actúa principalmente uniéndose al ADN mediante la formación de enlaces cruzados intra e intercadena, alterando su estructura y causándole daños. Éstos pueden detener el ciclo celular e inducir la apoptosis en las células tumorales de rápida proliferación. Se han descrito otros mecanismos de acción para el cisplatino, como la acidificación del citoplasma, estrés del receptor de estrógeno, interrupción de la transcripción del ARN, inhibición de proteínas oncogénicas clave, disminución de la plasticidad metabólica de las células cancerosas y cambios en su mecanobiología, así como la generación de estrés oxidativo. Sin embargo, el cisplatino y otros derivados del platino, han visto limitada su aplicabilidad clínica debido a la aparición de efectos secundarios graves (nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad periférica, etc), y por la capacidad que poseen las células cancerosas para limitar su acumulación ^{161,162}, por lo que se han buscado diversas alternativas a su uso.

Los agentes quimioterapéuticos actúan mediante diversos mecanismos de acción, aunque en términos generales, interfieren con el proceso de división celular o síntesis del ADN. Dependiendo de su mecanismo de acción, pueden clasificarse como agentes alquilantes, anti metabolitos, antraciclinas, inhibidores de topoisomerasa o alcaloides vegetales ¹⁶³ (Tabla I-8).

Tabla I-8. Clasificación de agentes quimioterapéuticos según su mecanismo de acción.

Clasificación	Descripción
Agentes alquilantes	Estos agentes funcionan agregando un grupo alquilo al ADN, lo que interfiere con la replicación y la transcripción del ADN, lo que finalmente conduce a la muerte celular.
Anti-metabolitos	Estos agentes son estructuralmente similares a los metabolitos que ocurren naturalmente e interfieren con la síntesis y reparación del ADN al inhibir enzimas involucradas en estos procesos.
Antraciclinas	Estos agentes se intercalan en el ADN e inhiben la topoisomerasa II, una enzima involucrada en la replicación y transcripción del ADN, lo que conduce a daños en el ADN y la muerte celular.
Inhibidores de topoisomerasa	Estos agentes inhiben la topoisomerasa I o II, enzimas involucradas en la replicación y transcripción del ADN, lo que provoca daño en el ADN y la muerte celular.
Alcaloides vegetales	Estos agentes derivan de plantas y funcionan al inhibir la formación de microtúbulos, necesarios para la división y proliferación celular, lo que finalmente conduce a la muerte celular.

Por otra parte, la utilización de metalofármacos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares no se encuentra tan ampliamente discutida en la literatura como la referente al tratamiento del cáncer, sin embargo, esto representa una gran oportunidad de estudio en el campo de la química bioinorgánica medicinal.

Los metalofármacos empleados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares ejercen sus efectos terapéuticos a través de la regulación de NO y O₂ en los vasos sanguíneos, y a través de la disminución en el estrés oxidativo ¹⁵⁷.

Como fue mencionado en secciones anteriores, el NO se encarga de regular la vasodilatación, por lo que puede utilizarse de manera terapéutica para tal fin. El nitroprusiato de sodio, Na₂[Fe(CN)₅NO]·2H₂O disminuye rápidamente la presión arterial y la resistencia periférica total. Sin embargo, libera cianuro (CN⁻) en el torrente sanguíneo, razón por la que se han desarrollado nuevos

complejos de coordinación de rutenio y complejos fotoactivos de hierro que podrían eventualmente superar este efecto secundario. Por el contrario, en algunas afecciones médicas, como el síndrome de shock tóxico, la presión arterial es extremadamente baja y es necesario elevarla rápidamente para estabilizar al paciente. En este caso, podrían resultar útiles los complejos metálicos que absorben el exceso de NO de forma rápida ¹⁵⁷.

Por otra parte, también existen compuestos metálicos con capacidad similar a la superóxido dismutasa (SOD-símil). Macrocielos de porfirinas, ftalocianinas, porfirizinas, así como poliaminas cíclicas y N,N'-bis(salicilideno)etilendiamina (salen) coordinados con hierro (II), cobre (II) y manganeso (II) se han estudiado ampliamente como SOD-símiles. El compuesto denominado como M40403, un macrociclo de manganeso(II) (pentaaza) SOD-símil (Figura I-6), puede extinguir (*quench*) radicales aniones superóxido, sin tener ningún efecto sobre NO, H₂O₂, o hipoclorito, lo cual es importante en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, pues no suprime el efecto vasodilatador ejercido por el NO, a la vez que disminuye el estrés oxidativo resultado de la producción exagerada de O₂⁻ en la pared vascular, que ha sido observada en diferentes modelos animales de hipertensión ^{157,164}.

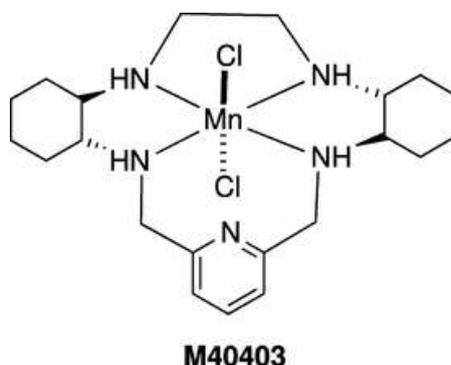


Figura I-6. Macrocielo SOD-símil (M40403), un candidato prometedor para el tratamiento de trastornos cardiovasculares. Tomado de Mjos y Orvig., 2014 ¹⁵⁷.

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se estudiaron diferentes compuestos de coordinación obtenidos a partir de bloqueadores del receptor de angiotensina II (receptor AT1) y Zn(II). Los resultados demostraron una mejora en la capacidad antihipertensiva producto de la complejación. Dicha mejora se explicó a través de diferentes mecanismos como la disminución en la liberación

de calcio intracelular inducida por Ang II, una mayor afinidad por el receptor AT1, y la disminución del estrés oxidativo. Además, uno de dichos complejos, obtenido a partir del fármaco antihipertensivo telmisartán (ZnTelm), demostró en un modelo de hipertensión inducida por L-NAME en ratas Wistar, un efecto hipotensor superior al ejercido por el fármaco comercial, la mejora en la progresión de la fibrosis vascular, y la disminución de la rigidez arterial por la reducción de fibras de colágeno ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

En este trabajo se emplearon los cationes $[V^{IV}O]^{2+}$ y Zn^{2+} para la obtención de los complejos metálicos estudiados, de manera que las secciones subsiguientes mencionaran algunos aspectos relevantes de los mismos en el marco de la química bioinorgánica medicinal, sin embargo, algunos de estos temas también serán mencionadas en los capítulos IV y V.

6.1. Vanadio

El vanadio se ubica en el cuarto período de la tabla periódica y posee un número atómico de 23, es un metal de transición que presenta diversas características químicas que lo hacen notable en diversos campos. Puede adoptar múltiples estados de oxidación, como +2, +3, +4 y +5, y exhibe una química versátil, siendo los estados +4 y +5 los más comunes en compuestos inorgánicos. Esta versatilidad contribuye a la formación de una amplia gama de complejos de coordinación debido a sus estados de oxidación y números de coordinación variables. Además, el vanadio desempeña funciones esenciales en sistemas biológicos, participando en reacciones enzimáticas y procesos metabólicos, suscitando interés en estudios sobre sus funciones biológicas y sus potenciales aplicaciones terapéuticas ¹⁶⁸. La esencialidad del vanadio no está clara en el ser humano, pero se conoce que es esencial en ascidias y otros animales acuáticos (tunicados) que acumulan vanadio en células especiales conocidas como vanadocitos. El vanadio en la sangre de estos organismos es superior a 10 mM, mientras que en las grandes masas de agua es de aproximadamente 35 mM ^{169,170}. Asimismo, el vanadio se encuentra en algas rojas y marrones formando parte de la enzima bromoperoxidasa, que cataliza la adición de bromo a moléculas orgánicas formando enlaces C-Br estables y también pueden oxidar al yodo ¹⁷¹.

En aplicaciones industriales, los compuestos de vanadio, como el V_2O_5 , actúan como catalizadores eficaces, por ejemplo, en la producción de ácido sulfúrico y en procesos de reducción catalítica selectiva. Comprender la especiación de estos compuestos en diferentes entornos es de gran relevancia para comprender sus mecanismos de reacción y transporte ¹⁶⁸.

Las principales contribuciones humanas al ciclo biogeoquímico del vanadio se atribuyen principalmente a dos fuentes. En primer lugar, las actividades mineras relacionadas con la extracción de minerales que movilizan alrededor de 130×10^9 gramos de vanadio anualmente, desempeñando un papel significativo en el aporte total al ciclo. En segundo lugar, la extracción y uso de combustibles fósiles que libera aproximadamente 600×10^9 gramos de vanadio al medio ambiente cada año y representa otra fuente destacada de flujos de vanadio inducidos por la actividad humana ¹⁷².

Se han propuesto varios compuestos de vanadio con potencial terapéutico para tratar diferentes tipos de enfermedades. Los compuestos de vanadio tienen propiedades antihiper glucémicas actuando como análogos de la insulina y también tienen un efecto positivo en la osteogénesis. Asimismo, tienen propiedades anticancerígenas, ya que compuestos como el dicloruro de vanadoceno y algunos peroxovanadatos(V) muestran efectos antitumorales. También presentan actividades antiparasitarias y antimicrobianas, por ejemplo para el tratamiento de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*; antivirales y antifúngicas, y se ha propuesto que tienen un efecto cardioprotector. Sin embargo, algunos compuestos de vanadio son tóxicos para los humanos, lo cual depende de la forma en que se encuentren, duración de la exposición y la ruta de administración ^{168,173,174}.

Dentro de las funciones importantes que el vanadio desempeña en los procesos biológicos se destacan el metabolismo de la glucosa y los lípidos, ya que diversos complejos de vanadio muestran propiedades análogas a la insulina, facilitando la absorción de glucosa por las células, especialmente en presencia de insulina, y exhibiendo efectos antilipémicos que afectan el metabolismo lipídico, y actúan como potenciales agentes antioxidantes en condiciones de la enfermedad de diabetes. En el metabolismo del hierro, el

vanadio compite con el hierro por la transferrina, una proteína crucial en el transporte de hierro. Además, su omnipresencia en los alimentos y el agua potable, así como su similitud con los iones de fosfato y magnesio, sugieren que el vanadio también desempeña un papel importante en la vida al influir en los procesos metabólicos ¹⁶⁹.

6.2. Zinc

El zinc desempeña un papel crucial en diversas funciones biológicas del cuerpo. En primer lugar, actúa como un cofactor esencial para más de 300 enzimas, participando directamente en procesos celulares fundamentales como la síntesis de ADN, el crecimiento normal, el desarrollo cerebral, la reproducción y la cicatrización de heridas. Además, el zinc desempeña un papel estructural y funcional en varias proteínas del cuerpo. En su función reguladora, el zinc modula la actividad enzimática y la estabilidad de las proteínas, actuando como ion activador o inhibidor. También ejerce influencia en la transducción de señales celulares y actúa como modulador de la neurotransmisión sináptica en ciertas neuronas. En el ámbito inmunológico, el zinc participa en respuestas clave, incluida la respuesta de los linfocitos T, la agregación plaquetaria y el mantenimiento del número de células T. Asimismo, desempeña un papel como antioxidante al proteger las estructuras biológicas del daño causado por radicales libres. Por otra parte, el zinc interviene en la regulación de la apoptosis y es de gran relevancia en los procesos de envejecimiento, ya que su deficiencia puede ocasionar retraso en el crecimiento, maduración sexual tardía y alteraciones del gusto ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Algunas de las propiedades más destacadas de los compuestos donde participa el zinc comprenden la defensa contra especies reactivas de oxígeno (EROs) y toxinas bacterianas mediante diversos mecanismos. Sus propiedades antioxidantes se manifiestan al eliminar radicales libres y prevenir el daño oxidativo, preservando la integridad de membranas celulares y el ADN. Asimismo, el zinc exhibe propiedades citoprotectoras al resguardar a las células de los efectos perjudiciales de las EROs y toxinas, permitiendo un óptimo funcionamiento celular. Por otro lado, la capacidad del zinc para inhibir la formación de óxido nítrico, un mediador inflamatorio, contribuye a modular

respuestas inflamatorias y reducir daño tisular. Asimismo, previene la oxidación de grupos sulfhidrilo cruciales para la estructura proteica. Además, sus propiedades antimicrobianas leves inhiben el crecimiento bacteriano, evitando infecciones ^{178,179}.

Algunas de las propiedades observadas en el zinc pueden atribuirse a su interacción con blancos moleculares. Los iones de zinc se unen de manera reversible en proteínas mediante interacciones con residuos específicos de aminoácidos que actúan como ligandos, como histidina, glutamato/aspartato y cisteína. Estos ligandos coordinan con el ion de zinc, formando complejos estables. La unión reversible de iones de zinc en proteínas permite flexibilidad en los entornos de coordinación, lo que les permite regular la unión de zinc según los requisitos fisiológicos ¹⁸⁰.

Los roles de los iones de zinc en la regulación, transporte y señalización son cruciales para diversas funciones celulares. En términos de regulación, los iones de zinc actúan como cofactores para enzimas, influyendo en su actividad y especificidad. Al unirse a proteínas reguladoras y factores de transcripción, los iones de zinc pueden modular la expresión génica y los procesos celulares, siendo esenciales para mantener la homeostasis celular y responder a estímulos ¹⁸⁰⁻¹⁸².

Por otra parte, los iones de zinc son transportados a través de membranas celulares por transportadores especializados, asegurando una distribución adecuada dentro de las células y regulando los niveles intracelulares. Esto permite que los iones de zinc alcancen compartimentos celulares específicos donde son necesarios para reacciones enzimáticas, vías de señalización y funciones estructurales ^{180,183,184}.

Así mismo, los cambios en la concentración libre de zinc pueden actuar como señales en procesos celulares a través de varios mecanismos. La señalización dependiente de procesos redox implica la liberación de zinc de enlaces S-Zn, como los presentes en la metalotioneína, durante la oxidación de grupos tiol, convirtiendo así una señal redox en una señal de zinc. Los aumentos temporales en la concentración libre de zinc son conocidos como "ondas de zinc" o "flujo de zinc" y funcionan como segundos mensajeros en la

señalización celular. Los iones de zinc participan en vías de señalización celular al modular la actividad de proteínas de señalización, receptores y canales iónicos, influyendo en procesos como la neurotransmisión, respuesta inmune y proliferación celular. La capacidad de los iones de zinc para actuar como moléculas señalizadoras contribuye a la coordinación de respuestas celulares y la regulación de funciones fisiológicas ¹⁸⁵.

Considerando la importancia del Zn en la regulación del metabolismo celular y como los desequilibrios en su homeostasis y su biodisponibilidad (debido a factores como la desnutrición o la expresión alterada de transportadores de Zn), están relacionados con la fisiopatología de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes, la depresión, la enfermedad de Wilson, la enfermedad de Alzheimer y demás enfermedades relacionadas con la edad. Estudiar estrategias de suplementación con este metal, como el uso de complejos de coordinación con ligandos bioactivos para el tratamiento de diferentes padecimientos es un tema relevante para la investigación en química bioinorgánica medicinal ¹⁸⁶.

A continuación, se hará una descripción de los ligandos bioactivos empleados en este trabajo de tesis doctoral, los cuales comprenden a la naringina, un flavonoide glicosilado con un gran potencial terapéutico, y al bloqueador del receptor de angiotensina II olmesartán, utilizado para el tratamiento de la hipertensión.

7. Ligandos bioactivos

De manera formal, un ligando es un ion o molécula que dona un par electrónico (base de Lewis) a un átomo o ion metálico (ácido de Lewis) para formar un enlace coordinado, dando lugar a un complejo de coordinación ¹⁸⁷.

Los ligandos suelen ser compuestos orgánicos y modifican las propiedades físicas y químicas del centro metálico. Los ligandos pueden introducirse en un sistema para limitar los efectos adversos de la sobrecarga de iones metálicos, inhibir metaloenzimas seleccionadas o facilitar la redistribución de iones metálicos. Algunos de los efectos mencionados anteriormente incluyen la

modificación de la reactividad y lipofilicidad y la estabilización de estados de oxidación específicos ¹⁸⁸.

Algunos compuestos bioactivos con la capacidad de formar enlaces coordinados desempeñan un papel crucial en el diseño de complejos de coordinación para la administración de fármacos. Estos compuestos pueden interactuar con enzimas, proteínas u objetivos biológicos específicos, lo que lleva a la disociación del complejo (profármaco) y la liberación de la molécula activa. Al incorporar ligandos bioactivos en complejos metálicos, se puede lograr la liberación selectiva de fármacos, mejorar la solubilidad, mejorar la absorción celular o aumentar la potencia a través de múltiples modos de acción. Por otra parte, el diseño de complejos de coordinación con ligandos bioactivos permite el desarrollo de sistemas que responden a estímulos como cambios en el pH, el estado redox o la exposición a la luz, para la liberación controlada de fármacos ¹⁸⁹.

7.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias naturales caracterizados por poseer estructuras fenólicas y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Pueden ser encontrados en varios alimentos, como frutas, verduras, granos, cortezas, raíces, tallos, flores, té y vino. Son una clase de metabolitos secundarios que desempeñan roles esenciales en el crecimiento, la defensa contra el estrés y diversas funciones fisiológicas de las plantas. Estas sustancias poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, entre otras, lo que las convierte en compuestos de interés con diversas aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas ¹⁹⁰.

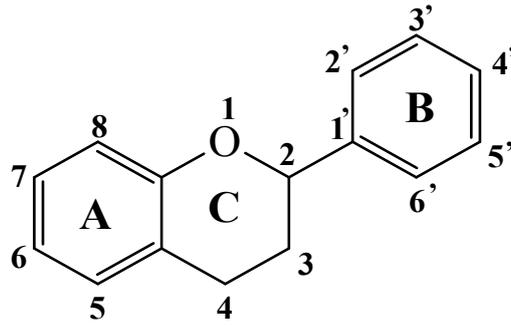


Figura I-7. Estructura principal de los flavonoides.

Los flavonoides poseen un estructura principal de 15 carbonos, con dos anillos de benceno (A y B) unidos por un anillo de pirano de tres carbonos (C) (Figura I-7). Algunas de las características estructurales que pueden influir sobre su capacidad antioxidante, muy ampliamente discutidas, comprenden la posición del anillo B en el anillo C de pirano, la cantidad y posición de grupos hidroxilo, la presencia de grupos glicosilados y un doble enlace conjugado en las posiciones 2 y 3. Su capacidad antioxidante puede atribuirse mayormente a los grupos hidroxilo que actúan como donadores de electrones, donan un átomo de hidrógeno al radical libre, estabilizándolo al emparejar su electrón desapareado y a su vez, dan lugar a la formación de un radical flavonoide estabilizado por resonancia electrónica. Según su estructura pueden clasificarse en seis clases principales: flavanoles , flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas ¹⁹¹⁻¹⁹³.

Su potencial farmacológico se extiende a efectos anticancerígenos, inhibiendo el crecimiento tumoral, induciendo la apoptosis e impidiendo la angiogénesis. Además, sus propiedades antioxidantes, reducen el estrés oxidativo, vinculado a diversas condiciones crónicas, como fue discutido anteriormente. También pueden modular vías inflamatorias, siendo benéficos en condiciones como la artritis y las enfermedades cardiovasculares. Algunos flavonoides muestran efectos cardio-protectores, apoyando la salud del corazón y reduciendo el riesgo de enfermedades cardíacas. Por otra parte, son estudiados por sus propiedades neuroprotectoras, ya que pueden prevenir enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. Además, algunos flavonoides específicos demuestran efectos antidiabéticos al regular el azúcar en sangre y mejorar la sensibilidad a la insulina. Así mismo, los flavonoides

exhiben actividades antimicrobianas y antivirales, lo cual les da potencial para combatir infecciones y fortalecer el sistema inmunológico ^{194,195}.

7.1.1. Naringina

La naringina es identificada químicamente como 4',5,7-trihidroxi-flavonona-7-ramnoglucósido (C₂₇H₃₂O₁₄), su estructura es comprendida como un glucósido de flavanona que se forma a partir de la flavanona naringenina y el disacárido neohesperidosa (Figura I-8) ¹⁹⁶. Está presente en el pomelo, la naranja y la lima, entre otros. Es la principal causa del amargor en los jugos y frutas cítricas ¹⁹⁷, posee diversas propiedades farmacológicas y biológicas de interés ¹⁹⁸.

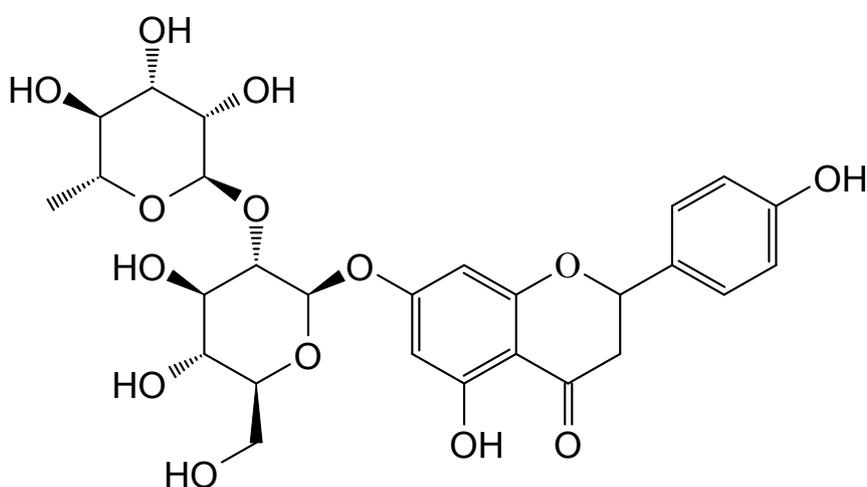


Figura I-8. Estructura química de la naringina.

Se ha demostrado experimentalmente que la naringina posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica ¹⁹⁹⁻²⁰¹, también posee actividad antidiabética, neuroprotectora, cicatrizante, quelante, antimicrobiana y antimutagénica ²⁰². Además, se reportó que puede disminuir los niveles de glucosa en sangre y aumentar los niveles de insulina en plasma en ratas diabéticas ²⁰³; en el cuerpo humano, se metaboliza rápidamente en naringenina gracias a la acción de las enzimas α -ramnosidasa y β -glucosidasa ²⁰⁴.

En relación al estrés oxidativo, se ha demostrado que la naringina posee actividad secuestrante de radicales de manera dosis-dependiente frente a cloruro de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo y tetraetilamonio. En concentraciones de 5 a 2000 μ M, la naringina mostró actividad antioxidante y redujo la frecuencia de daño al ADN por H₂O₂ en células de fibroblastos de hámster chino (V79). De

manera similar, el pretratamiento con naringina sobre células de mioblastos (L6) sometidas a estrés oxidativo, revirtió la disminución de los niveles de glutatión (GSH) y el aumento de radicales libres intracelulares, así como la absorción de glucosa. Además, la naringina también demostró una reducción considerable en la glicación de proteínas. Por otro lado, la naringina activó la vía de señalización Nrf2 (encargada de la regulación de la respuesta celular frente al estrés oxidativo y protección contra lesiones celulares) en la línea celular mesangial glomerular de rata HBZY-1 ¹⁹⁶.

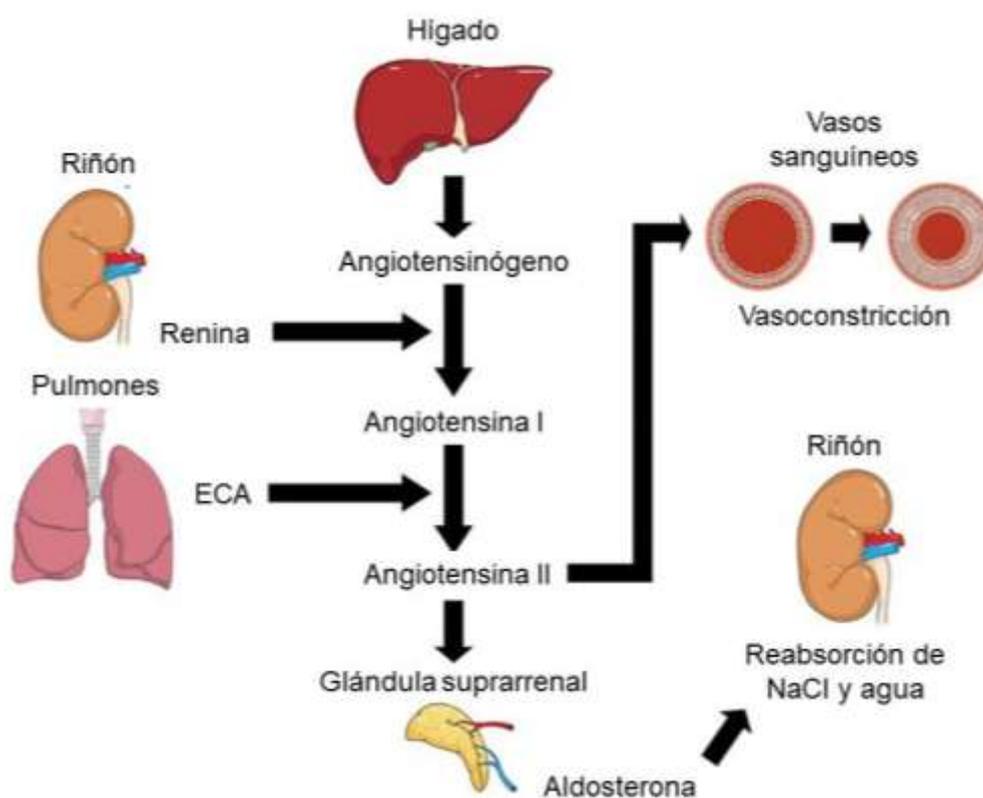
Con respecto a su actividad anticancerígena, numerosos estudios han demostrado que la naringina inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis sobre células tumorales, incluyendo células de cáncer de mama triple negativo (TNBC), células de cáncer cervical humano (SiHa) y células de cáncer de vejiga; también desempeña un papel en la motilidad celular al reducir la migración e invasión de algunas células tumorales ¹⁹⁶.

Existe numerosa evidencia que asocia el tratamiento con naringina, sola o en combinación con otros fármacos, y la actividad antitumoral; la naringina emplea mecanismos multidireccionales para obstaculizar el inicio, la promoción y la progresión del cáncer mediante la modulación de cascadas de señalización desreguladas involucradas en la proliferación celular, la autofagia, la apoptosis, la inflamación, la angiogénesis, la metástasis y la invasión. Por otro lado, los complejos naringina-metal han mostrado mayores efectos anticancerígenos en comparación con la naringina libre, haciendo de este flavonoide un candidato prometedor para la prevención y el tratamiento del cáncer ¹⁹⁸.

7.2. Bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRAs)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) se ha identificado en varios tejidos, incluidos el corazón, el cerebro, los riñones y las paredes de los vasos, y se caracteriza por una secuencia de reacciones enzimáticas. El sistema SRAA es el sistema más importante que regula la presión arterial. El angiotensinógeno formado en el hígado es escindido por la enzima renina para formar el decapeptido inactivo angiotensina I (Ang I), que es escindido aún más por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para formar la hormona octapeptido (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) angiotensina II (Ang II)

(Esquema I-3). El sistema SRAA juega un papel fundamental en la homeostasis cardiovascular y la regulación de la presión arterial ²⁰⁵.



Esquema I-3. Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Adaptado de Vargas-Rodriguez *et al.*, 2022 ²⁰⁶.

La angiotensina II es el componente biológicamente activo del sistema renina-angiotensina y es responsable de la mayoría de los efectos periféricos de este sistema. La angiotensina II es un importante regulador de la presión arterial, la secreción de aldosterona y la homeostasis de los líquidos, y también es un factor etiológico importante en la hipertensión y otros trastornos cardiovasculares. Los bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRAs), también conocidos como sartanes, se han desarrollado como una terapia moduladora para el sistema renina-angiotensina-aldosterona. También son conocidos como antagonistas de los receptores de angiotensina II, como su nombre lo indica, se dirigen al sistema renina-angiotensina bloqueando la acción de la angiotensina II a nivel del receptor. Algunos grupos funcionales comúnmente presentes en la estructura química de estos compuestos comprenden un grupo bifenilo, un anillo imidazol y un anillo tetrazol ²⁰⁷. En la

Figura I-9 se muestran las estructuras de diferentes sartanes usados como fármacos antihipertensivos.

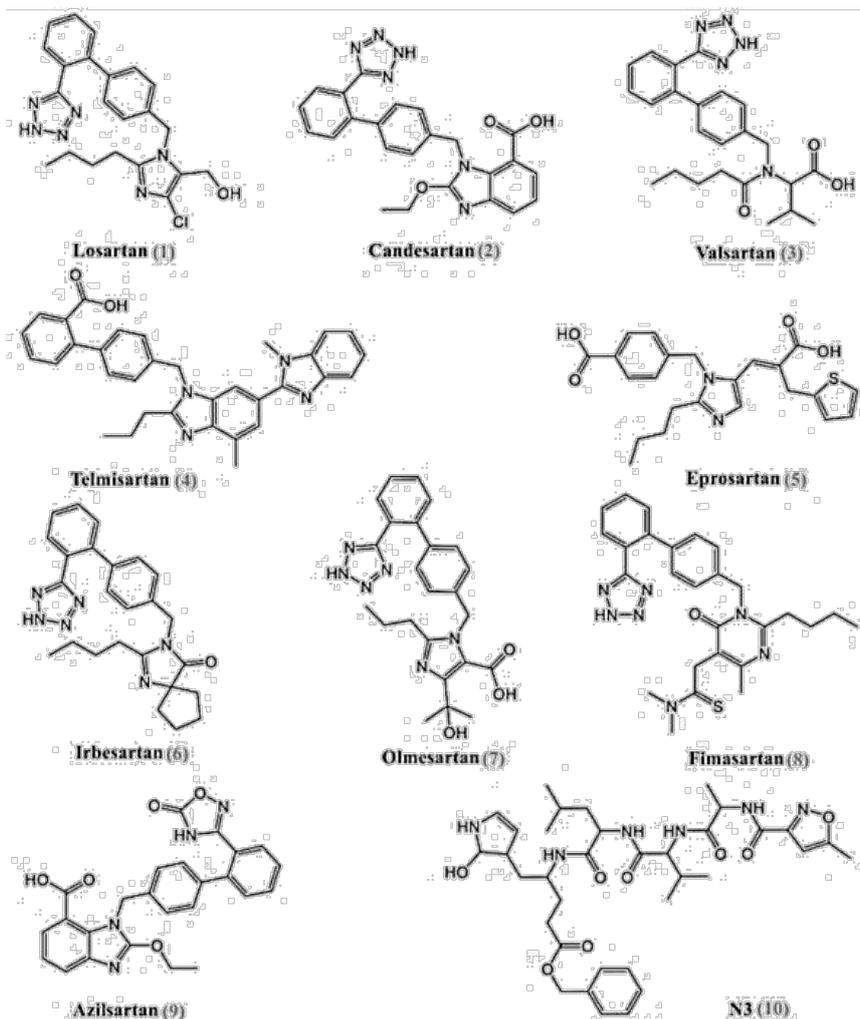


Figura I-9. Estructuras químicas de algunos sartanes disponibles actualmente. Tomado de Alnajjar *et al.*, 2020 ²⁰⁸.

La Ang II se encuentra involucrada en los procesos fisiopatológicos de diversas enfermedades a través de la inducción de estrés oxidativo, angiogénesis e inflamación. La inducción de la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa explica la afirmación anterior. Se ha reconocido durante mucho tiempo que la señalización del receptor AT1 mediada por Ang II estimula la activación de la proteína quinasa C (PKC). La PKC- α activada media la inducción de la enzima NADPH oxidasa vascular, lo que conduce a una producción excesiva de radicales superóxido. Además de la PKC, la regulación positiva del leucotrieno B4 (LTB4) mediada por Ang II también participa en la inducción de la NADPH oxidasa. Por otra parte, la Ang II regula positivamente

la señalización descendente de NF- κ B lo que conduce a la transcripción de varios mediadores proinflamatorios, incluido el VEGF ²⁰⁹.

7.2.1. Olmesartan

De entre los diferentes BRA, el olmesartán se destaca como un medicamento eficaz para el tratamiento de la hipertensión por múltiples razones. En primer lugar, ha demostrado ser altamente efectivo en la reducción de la presión arterial en adultos. Además, su excelente tolerancia general se refleja en efectos secundarios leves y transitorios, que tienden a desaparecer con el tiempo. Su perfil de seguridad es particularmente notable en comparación con otros fármacos para la hipertensión ^{210,211}. El olmesartán se suministra como olmesartán medoxomilo (Figura I-10), que es la pro-droga que hidroliza *in vivo* a la forma activa olmesartán ²¹².

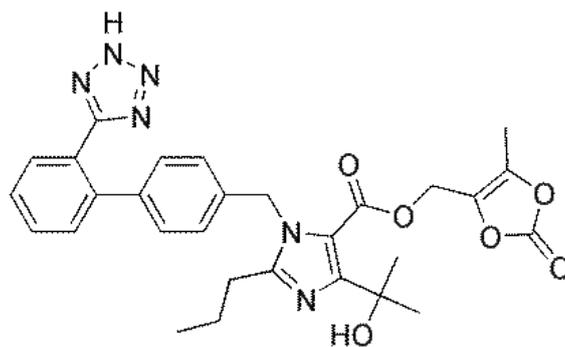


Figura I-10. Estructura química del olmesartán medoxomilo.

El olmesartán es bien tolerado y efectivo en el tratamiento de la hipertensión arterial ²¹³, fue aprobado por la FDA en 2002 ²¹⁴ y se comercializa como olmesartán medoxomil. Este profármaco se metaboliza rápidamente a su componente activo por esterasas en la mucosa gastrointestinal, la sangre venosa portal y el hígado ²¹⁵.

Los sartanes más afines a los receptores AT1 son olmesartán y candesartán, seguidos por irbesartán y eprosartán. Con menor afinidad se destacan valsartán e irbesartán, seguidos por losartán ²¹⁶⁻²¹⁸. La Figura I-11 muestra la interacción entre el olmesartán y el receptor de angiotensina II. Se observa el bloqueo del receptor por las diferentes interacciones de los grupos imidazol, bifenilmetil y tetrazol.

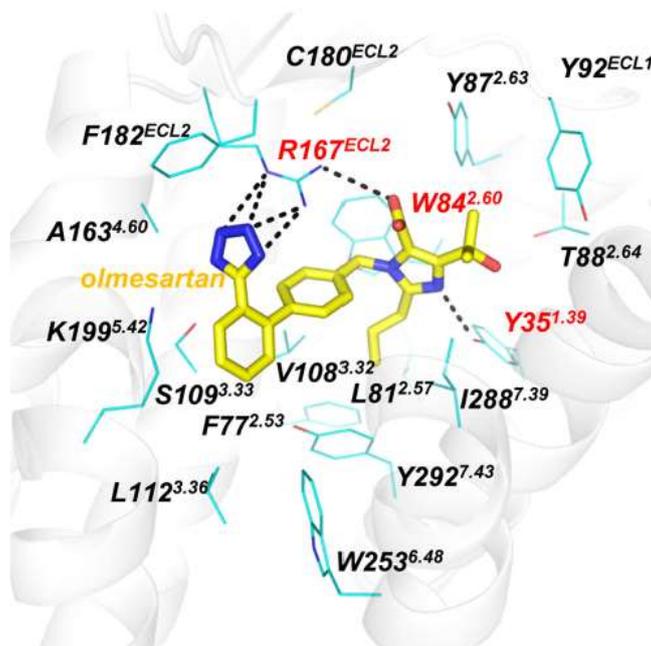


Figura I-11. Estructura cristalina que muestra las interacciones entre el receptor AT1 y olmesartán. Tomado de Zhang *et al.*, 2015²¹⁹.

Referencias bibliográficas

- (1) Dale, M. T.; Elkins, M. R. Chronic Disease. *J. Physiother.* **2021**, *67* (2), 84–86. <https://doi.org/10.1016/j.jphys.2021.02.001>.
- (2) Bergman, P.; Brighenti, S. Targeted Nutrition in Chronic Disease. *Nutrients* **2020**, *12* (6), 1682. <https://doi.org/10.3390/nu12061682>.
- (3) Allegrante, J. P.; Wells, M. T.; Peterson, J. C. Interventions to Support Behavioral Self-Management of Chronic Diseases. *Annu. Rev. Public Health* **2019**, *40*, 127–146. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040218-044008>.
- (4) Bernell, S.; Howard, S. W. Use Your Words Carefully: What Is a Chronic Disease? *Front. Public Health* **2016**, *4*, 159. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00159>.
- (5) Noce, A.; Romani, A.; Bernini, R. Dietary Intake and Chronic Disease Prevention. *Nutrients* **2021**, *13* (4), 1358. <https://doi.org/10.3390/nu13041358>.
- (6) Meetoo, D. Chronic Diseases: The Silent Global Epidemic. *Br. J. Nurs. Mark Allen Publ.* **2008**, *17* (21), 1320–1325. <https://doi.org/10.12968/bjon.2008.17.21.31731>.
- (7) NCD Countdown 2030 collaborators. NCD Countdown 2030: Worldwide Trends in Non-Communicable Disease Mortality and Progress towards Sustainable Development Goal Target 3.4. *Lancet Lond. Engl.* **2018**, *392* (10152), 1072–1088. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31992-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31992-5).
- (8) Nugent, R. Preventing and Managing Chronic Diseases. *BMJ* **2019**, *364*, 1459. <https://doi.org/10.1136/bmj.l459>.
- (9) Islam, S. M. S.; Purnat, T. D.; Phuong, N. T. A.; Mwingira, U.; Schacht, K.; Fröschl, G. Non-Communicable Diseases (NCDs) in Developing Countries: A Symposium Report. *Glob. Health* **2014**, *10* (1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12992-014-0081-9>.
- (10) Dessi, M.; Noce, A.; Bertucci, P.; Noce, G.; Rizza, S.; De Stefano, A.; Manca di Villahermosa, S.; Bernardini, S.; De Lorenzo, A.; Di Daniele, N. Plasma and Erythrocyte Membrane Phospholipids and Fatty Acids in Italian General Population and Hemodialysis Patients. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13* (1), 54. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-54>.
- (11) Cabello-Verrugio, C.; Vilos, C.; Rodrigues-Diez, R.; Estrada, L. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2018. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, e2835189. <https://doi.org/10.1155/2018/2835189>.
- (12) Ng, R.; Sutradhar, R.; Yao, Z.; Wodchis, W. P.; Rosella, L. C. Smoking, Drinking, Diet and Physical Activity—Modifiable Lifestyle Risk Factors and Their Associations with Age to First Chronic Disease. *Int. J. Epidemiol.* **2020**, *49* (1), 113–130. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz078>.
- (13) Roser, M.; Ritchie, H.; Spooner, F. Burden of Disease. *Our World Data* **2023**.
- (14) Al-hadlaq, S. M.; Balto, H. A.; Hassan, W. M.; Marraiki, N. A.; El-Ansary, A. K. Biomarkers of Non-Communicable Chronic Disease: An Update on Contemporary Methods. *PeerJ* **2022**, *10*, e12977. <https://doi.org/10.7717/peerj.12977>.
- (15) Bashan, N.; Kovsan, J.; Kachko, I.; Ovadia, H.; Rudich, A. Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Physiol. Rev.* **2009**, *89* (1), 27–71. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2008>.
- (16) De Cristofaro, R.; Rocca, B.; Vitacolonna, E.; Falco, A.; Marchesani, P.; Ciabattini, G.; Landolfi, R.; Patrono, C.; Davi, G. Lipid and Protein Oxidation Contribute to a Prothrombotic State in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2003**, *1* (2), 250–256. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00072.x>.
- (17) Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; Abete, P. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- (18) Balasubramanian, S. Progression of Chronic Kidney Disease: Mechanisms and Interventions in Retardation. *Apollo Med.* **2013**, *10* (1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.apme.2013.01.009>.
- (19) Zielinska, E.; Zauszkiewicz-Pawlak, A.; Wojcik, M.; Inkielewicz-Stepniak, I. Silver Nanoparticles of Different Sizes Induce a Mixed Type of Programmed Cell Death in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9* (4), 4675–4697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22563>.
- (20) Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis* **2000**, *21* (3), 361–370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>.

- (21) Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, *121* (11), 2381–2386. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>.
- (22) Abete, P.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Basile, C.; Langelotto, A.; Galizia, G.; Testa, G.; Canonico, V.; Bonaduce, D.; Cacciatore, F. Cognitive Impairment and Cardiovascular Diseases in the Elderly. A Heart-Brain Continuum Hypothesis. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *18*, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.07.003>.
- (23) Cacciatore, F.; Abete, P.; de Santis, D.; Longobardi, G.; Ferrara, N.; Rengo, F. Mortality and Blood Pressure in Elderly People with and without Cognitive Impairment. *Gerontology* **2005**, *51* (1), 53–61. <https://doi.org/10.1159/000081436>.
- (24) Liu, J.; Li, M.; Pan, Y.; Lan, W.; Zheng, R.; Wu, F.-X.; Wang, J. Complex Brain Network Analysis and Its Applications to Brain Disorders: A Survey. *Complexity* **2017**, *2017*, e8362741. <https://doi.org/10.1155/2017/8362741>.
- (25) Sies, H. On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>.
- (26) Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86* (1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- (27) Forman, H. J.; Zhang, H. Targeting Oxidative Stress in Disease: Promise and Limitations of Antioxidant Therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>.
- (28) Flohé, L. Looking Back at the Early Stages of Redox Biology. *Antioxid. Basel Switz.* **2020**, *9* (12), 1254. <https://doi.org/10.3390/antiox9121254>.
- (29) Sies, H. Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- (30) *BioRender*. <https://app.biorender.com/> (accessed 2024-02-07).
- (31) Jomova, K.; Raptova, R.; Alomar, S. Y.; Alwasel, S. H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Valko, M. Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging. *Arch. Toxicol.* **2023**, *97* (10), 2499–2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>.
- (32) He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2017**, *44* (2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>.
- (33) Jakubczyk, K.; Dec, K.; Kałduńska, J.; Kawczuga, D.; Kochman, J.; Janda, K. Reactive Oxygen Species - Sources, Functions, Oxidative Damage. *Pol. Merkuriusz Lek.* **2020**, *48* (284), 124–127.
- (34) Roy, Z.; Bansal, R.; Siddiqui, L.; Chaudhary, N. Understanding the Role of Free Radicals and Antioxidant Enzymes in Human Diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2023**, *24* (10), 1265–1276. <https://doi.org/10.2174/1389201024666221121160822>.
- (35) Sharifi-Rad, M.; Anil Kumar, N. V.; Zucca, P.; Varoni, E. M.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Tsouh Fokou, P. V.; Azzini, E.; Peluso, I.; Prakash Mishra, A.; Nigam, M.; El Rayess, Y.; Beyrouthy, M. E.; Polito, L.; Iriti, M.; Martins, N.; Martorell, M.; Docea, A. O.; Setzer, W. N.; Calina, D.; Cho, W. C.; Sharifi-Rad, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **2020**, *11*.
- (36) Jha, N.; Ryu, J. J.; Choi, E. H.; Kaushik, N. K. Generation and Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Induced by Plasma, Lasers, Chemical Agents, and Other Systems in Dentistry. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 7542540. <https://doi.org/10.1155/2017/7542540>.
- (37) Ozcan, A.; Ogun, M.; Ozcan, A.; Ogun, M. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*; IntechOpen, 2015. <https://doi.org/10.5772/61193>.
- (38) Ďuračková, Z. Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. In *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*; Laher, I., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; pp 3–38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_2.
- (39) Tvrdá, E.; Benko, F. Chapter 1 - Free Radicals: What They Are and What They Do. In *Pathology*; Preedy, V. R., Ed.; Academic Press, 2020; pp 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00001-9>.

- (40) Di Meo, S.; Venditti, P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, e9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>.
- (41) Martemucci, G.; Costagliola, C.; Mariano, M.; D'andrea, L.; Napolitano, P.; D'Alessandro, A. G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2022**, *2* (2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>.
- (42) Hermes-Lima, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In *Functional Metabolism*; John Wiley & Sons, Ltd, 2004; pp 319–368. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>.
- (43) Halliwell, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3>.
- (44) Li, R.; Jia, Z.; Trush, M. A. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species Apex NC* **2016**, *1* (1), 9–21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>.
- (45) Al-Shehri, S. S. Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Innate Immune Response. *Biochimie* **2021**, *181*, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.022>.
- (46) Averill-Bates, D. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. Review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2024**, *1871* (2), 119573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119573>.
- (47) Konno, T.; Melo, E. P.; Chambers, J. E.; Avezov, E. Intracellular Sources of ROS/H₂O₂ in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. *Cells* **2021**, *10* (2), 233. <https://doi.org/10.3390/cells10020233>.
- (48) Lavranos, G.; Balla, M.; Tzortzopoulou, A.; Syriou, V.; Angelopoulou, R. Investigating ROS Sources in Male Infertility: A Common End for Numerous Pathways. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **2012**, *34* (3), 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.06.007>.
- (49) Angelopoulou, R.; Lavranos, G.; Manolakou, P. ROS in the Aging Male: Model Diseases with ROS-Related Pathophysiology. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **2009**, *28* (2), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.003>.
- (50) Winterbourn, C. C. Hydrogen Peroxide Reactivity and Specificity in Thiol-Based Cell Signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48* (3), 745–754. <https://doi.org/10.1042/BST20190049>.
- (51) Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22* (1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- (52) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
- (53) Lennicke, C.; Cochemé, H. M. Redox Metabolism: ROS as Specific Molecular Regulators of Cell Signaling and Function. *Mol. Cell* **2021**, *81* (18), 3691–3707. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>.
- (54) Rice, M. E. H₂O₂: A Dynamic Neuromodulator. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **2011**, *17* (4), 389–406. <https://doi.org/10.1177/1073858411404531>.
- (55) Fourquet, S.; Huang, M.-E.; D'Autreaux, B.; Toledano, M. B. The Dual Functions of Thiol-Based Peroxidases in H₂O₂ Scavenging and Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10* (9), 1565–1576. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2049>.
- (56) Zhou, J.; Li, X.-Y.; Liu, Y.-J.; Feng, J.; Wu, Y.; Shen, H.-M.; Lu, G.-D. Full-Coverage Regulations of Autophagy by ROS: From Induction to Maturation. *Autophagy* **2022**, *18* (6), 1240–1255. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1984656>.
- (57) Lushchak, V. I.; Lushchak, O. Interplay between Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Living Organisms. *Chem. Biol. Interact.* **2021**, *349*, 109680. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109680>.
- (58) Checa, J.; Aran, J. M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 1057–1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>.
- (59) Crow, J. P.; Beckman, J. S. The Role of Peroxynitrite in Nitric Oxide-Mediated Toxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1995**, *196*, 57–73. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79130-7_7.
- (60) Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. The Chemistry of Peroxynitrite: A Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide. *Am. J. Physiol.* **1995**, *268* (5 Pt 1), L699–722. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.5.L699>.
- (61) Lee, J.; Koo, N.; Min, D. B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2004**, *3* (1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>.

- (62) Möller, M. N.; Rios, N.; Trujillo, M.; Radi, R.; Denicola, A.; Alvarez, B. Detection and Quantification of Nitric Oxide-Derived Oxidants in Biological Systems. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (40), 14776–14802. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>.
- (63) Piacenza, L.; Trujillo, M.; Radi, R. Reactive Species and Pathogen Antioxidant Networks during Phagocytosis. *J. Exp. Med.* **2019**, *216* (3), 501–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20181886>.
- (64) Cheng, A. J.; Yamada, T.; Rassier, D. E.; Andersson, D. C.; Westerblad, H.; Lanner, J. T. Reactive Oxygen/Nitrogen Species and Contractile Function in Skeletal Muscle during Fatigue and Recovery. *J. Physiol.* **2016**, *594* (18), 5149–5160. <https://doi.org/10.1113/JP270650>.
- (65) Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5* (1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- (66) Weidinger, A.; Kozlov, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **2015**, *5* (2), 472–484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>.
- (67) Betteridge, D. J. What Is Oxidative Stress? *Metabolism* **2000**, *49* (2, Supplement 1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3).
- (68) Tirzitis, G.; Bartosz, G. Determination of Antiradical and Antioxidant Activity: Basic Principles and New Insights. *Acta Biochim. Pol.* **2010**, *57* (2), 139–142.
- (69) Trembl, J.; Šmejkal, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (4), 720–738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>.
- (70) Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Cooke, M. S. Oxidative DNA Damage and Disease: Induction, Repair and Significance. *Mutat. Res.* **2004**, *567* (1), 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>.
- (71) Catalá, A. A Synopsis of the Process of Lipid Peroxidation since the Discovery of the Essential Fatty Acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *399* (3), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.087>.
- (72) Buettner, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300* (2), 535–543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
- (73) Grune, T.; Siems, W. G.; Schneider, W. Accumulation of Aldehydic Lipid Peroxidation Products during Postanoxic Reoxygenation of Isolated Rat Hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15* (2), 125–132. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90051-U](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90051-U).
- (74) Nakamura, H.; Takada, K. Reactive Oxygen Species in Cancer: Current Findings and Future Directions. *Cancer Sci.* **2021**, *112* (10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>.
- (75) Bardaweel, S. K.; Gul, M.; Alzweiri, M.; Ishaqat, A.; ALSalamat, H. A.; Bashatwah, R. M. Reactive Oxygen Species: The Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J. Med.* **2018**, *50* (3), 193. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397>.
- (76) Yin, H.; Xu, L.; Porter, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
- (77) Sies, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* **2020**, *9* (9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>.
- (78) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press, 2015. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>.
- (79) Tan, B. L.; Norhaizan, M. E.; Liew, W.-P.-P.; Sulaiman Rahman, H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
- (80) Moussa, Z.; Judeh, Z. M. A.; Ahmed, S. A.; Moussa, Z.; Judeh, Z. M. A.; Ahmed, S. A. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. In *Free Radical Medicine and Biology*; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87778>.
- (81) Zhang, W.; Gong, M.; Zhang, W.; Mo, J.; Zhang, S.; Zhu, Z.; Wang, X.; Zhang, B.; Qian, W.; Wu, Z.; Ma, Q.; Wang, Z. Thiostrepton Induces Ferroptosis in Pancreatic Cancer Cells through STAT3/GPX4 Signalling. *Cell Death Dis.* **2022**, *13* (7), 630. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05082-3>.
- (82) Sies, H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (13), 8735–8741. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>.

- (83) White, K.; Someya, S. The Roles of NADPH and Isocitrate Dehydrogenase in Cochlear Mitochondrial Antioxidant Defense and Aging. *Hear. Res.* **2023**, *427*, 108659. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108659>.
- (84) Strange, R. C.; Spiteri, M. A.; Ramachandran, S.; Fryer, A. A. Glutathione-S-Transferase Family of Enzymes. *Mutat. Res.* **2001**, *482* (1–2), 21–26. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00206-8).
- (85) Waśkiewicz, A.; Beszterda, M.; Goliński, P. Chapter 7 - Nonenzymatic Antioxidants in Plants. In *Oxidative Damage to Plants*; Ahmad, P., Ed.; Academic Press: San Diego, 2014; pp 201–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>.
- (86) Chaudière, J.; Ferrari-Iliou, R. Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37* (9), 949–962. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00090-3).
- (87) Azmanova, M.; Pitto-Barry, A. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? *ChemBioChem* **2022**, *23* (10), e202100641. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100641>.
- (88) Gupta, S. C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B. B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16* (11), 1295–1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>.
- (89) Park, J. H.; Pyun, W. Y.; Park, H. W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells* **2020**, *9* (10), 2308. <https://doi.org/10.3390/cells9102308>.
- (90) Santarpia, L.; Lippman, S. M.; El-Naggar, A. K. Targeting the MAPK-RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16* (1), 103–119. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>.
- (91) Siqueira, P. B.; de Sousa Rodrigues, M. M.; de Amorim, Í. S. S.; da Silva, T. G.; da Silva Oliveira, M.; Rodrigues, J. A.; de Souza da Fonseca, A.; Mencialha, A. L. The APE1/REF-1 and the Hallmarks of Cancer. *Mol. Biol. Rep.* **2024**, *51* (1), 47. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08946-9>.
- (92) Dolcet, X.; Llobet, D.; Pallares, J.; Matias-Guiu, X. NF-κB in Development and Progression of Human Cancer. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **2005**, *446* (5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>.
- (93) Zhang, C.; Liu, J.; Xu, D.; Zhang, T.; Hu, W.; Feng, Z. Gain-of-Function Mutant P53 in Cancer Progression and Therapy. *J. Mol. Cell Biol.* **2020**, *12* (9), 674–687. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa040>.
- (94) Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D. Genomic Instability—an Evolving Hallmark of Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.
- (95) Kim, Y.-M.; Kim, S.-J.; Tatsunami, R.; Yamamura, H.; Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. ROS-Induced ROS Release Orchestrated by Nox4, Nox2, and Mitochondria in VEGF Signaling and Angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2017**, *312* (6), C749–C764. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00346.2016>.
- (96) Black, S. M.; DeVol, J. M.; Wedgwood, S. Regulation of Fibroblast Growth Factor-2 Expression in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Involves Increased Reactive Oxygen Species Generation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2008**, *294* (1), C345–C354. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00216.2007>.
- (97) Lee, S. Y.; Ju, M. K.; Jeon, H. M.; Lee, Y. J.; Kim, C. H.; Park, H. G.; Han, S. I.; Kang, H. S. Reactive Oxygen Species Induce Epithelial-mesenchymal Transition, Glycolytic Switch, and Mitochondrial Repression through the Dlx-2/Snail Signaling Pathways in MCF-7 Cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20* (3), 2339–2346. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10466>.
- (98) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- (99) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (100) Gorrini, C.; Harris, I. S.; Mak, T. W. Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (12), 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.
- (101) ArulJothi, K. N.; Kumaran, K.; Senthil, S.; Nidhu, A. B.; Munaff, N.; Janitri, V. B.; Kirubakaran, R.; Singh, S. K.; Gupt, G.; Dua, K.; Krishnan, A. Implications of Reactive Oxygen Species in Lung Cancer and Exploiting It for Therapeutic Interventions. *Med. Oncol.* **2022**, *40* (1), 43. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01900-y>.
- (102) Niu, B.; Liao, K.; Zhou, Y.; Wen, T.; Quan, G.; Pan, X.; Wu, C. Application of Glutathione Depletion in Cancer Therapy: Enhanced ROS-Based Therapy, Ferroptosis, and

- Chemotherapy. *Biomaterials* **2021**, *277*, 121110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121110>.
- (103) Perillo, B.; Di Donato, M.; Pezone, A.; Di Zazzo, E.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in Cancer Therapy: The Bright Side of the Moon. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52* (2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>.
- (104) Sahoo, B. M.; Banik, B. K.; Borah, P.; Jain, A. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2022**, *22* (2), 215–222. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210608095512>.
- (105) Mortezaee, K.; Salehi, E.; Mirtavoos-Mahyari, H.; Motevaseli, E.; Najafi, M.; Farhood, B.; Rosengren, R. J.; Sahebkar, A. Mechanisms of Apoptosis Modulation by Curcumin: Implications for Cancer Therapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (8), 12537–12550. <https://doi.org/10.1002/jcp.28122>.
- (106) Alexander, A.; Cai, S.-L.; Kim, J.; Nanez, A.; Sahin, M.; MacLean, K. H.; Inoki, K.; Guan, K.-L.; Shen, J.; Person, M. D.; Kusewitt, D.; Mills, G. B.; Kastan, M. B.; Walker, C. L. ATM Signals to TSC2 in the Cytoplasm to Regulate mTORC1 in Response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (9), 4153–4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>.
- (107) Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. Reactive Oxygen Species Are Essential for Autophagy and Specifically Regulate the Activity of Atg4. *EMBO J.* **2007**, *26* (7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>.
- (108) Zhang, D.-W.; Shao, J.; Lin, J.; Zhang, N.; Lu, B.-J.; Lin, S.-C.; Dong, M.-Q.; Han, J. RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science* **2009**, *325* (5938), 332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1172308>.
- (109) Wang, Z.; Jiang, H.; Chen, S.; Du, F.; Wang, X. The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 Functions at the Convergence Point of Multiple Necrotic Death Pathways. *Cell* **2012**, *148* (1), 228–243. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>.
- (110) Griendling, K. K.; Camargo, L. L.; Rios, F. J.; Alves-Lopes, R.; Montezano, A. C.; Touyz, R. M. Oxidative Stress and Hypertension. *Circ. Res.* **2021**, *128* (7), 993–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318063>.
- (111) Touyz, R. M.; Rios, F. J.; Alves-Lopes, R.; Neves, K. B.; Camargo, L. L.; Montezano, A. C. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can. J. Cardiol.* **2020**, *36* (5), 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.081>.
- (112) Tousoulis, D.; Kampoli, A.-M.; Tentolouris, C.; Papageorgiou, N.; Stefanadis, C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2012**, *10* (1), 4–18. <https://doi.org/10.2174/157016112798829760>.
- (113) Shaito, A.; Aramouni, K.; Assaf, R.; Parenti, A.; Orekhov, A.; Yazbi, A. E.; Pintus, G.; Eid, A. H. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **2022**, *27* (3), 105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703105>.
- (114) Kattoor, A. J.; Pothineni, N. V. K.; Palagiri, D.; Mehta, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2017**, *19* (11), 42. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>.
- (115) Peng, J.; Liu, B.; Ma, Q.-L.; Luo, X.-J. Dysfunctional Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases: Role of NADPH Oxidase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2015**, *65* (1), 80–87. <https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000166>.
- (116) Peng, W.; Cai, G.; Xia, Y.; Chen, J.; Wu, P.; Wang, Z.; Li, G.; Wei, D. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *DNA Cell Biol.* **2019**, *38* (7), 597–606. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4552>.
- (117) Qu, K.; Yan, F.; Qin, X.; Zhang, K.; He, W.; Dong, M.; Wu, G. Mitochondrial Dysfunction in Vascular Endothelial Cells and Its Role in Atherosclerosis. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 1084604. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1084604>.
- (118) Cadenas, S. ROS and Redox Signaling in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Cardioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *117*, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>.
- (119) Pecchillo Cimmino, T.; Ammendola, R.; Cattaneo, F.; Esposito, G. NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (3), 2086. <https://doi.org/10.3390/ijms24032086>.
- (120) García-Redondo, A. B.; Aguado, A.; Briones, A. M.; Salices, M. NADPH Oxidases and Vascular Remodeling in Cardiovascular Diseases. *Pharmacol. Res.* **2016**, *114*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.015>.

- (121) Montezano, A. C.; Tsiropoulou, S.; Dulak-Lis, M.; Harvey, A.; Camargo, L. D. L.; Touyz, R. M. Redox Signaling, Nox5 and Vascular Remodeling in Hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2015**, *24* (5), 425–433. <https://doi.org/10.1097/MNH.000000000000153>.
- (122) Clempus, R. E.; Griendling, K. K. Reactive Oxygen Species Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *71* (2), 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.033>.
- (123) Badran, A.; Nasser, S. A.; Mesmar, J.; El-Yazbi, A. F.; Bitto, A.; Fardoun, M. M.; Baydoun, E.; Eid, A. H. Reactive Oxygen Species: Modulators of Phenotypic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (22), 8764. <https://doi.org/10.3390/ijms21228764>.
- (124) Lamb, F. S.; Choi, H.; Miller, M. R.; Stark, R. J. TNF α and Reactive Oxygen Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells in Hypertension and Atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* **2020**, *33* (10), 902–913. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa089>.
- (125) Mercer, J. R. Mitochondrial Bioenergetics and Therapeutic Intervention in Cardiovascular Disease. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *141* (1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.011>.
- (126) Hasheminasabgorji, E.; Jha, J. C. Dyslipidemia, Diabetes and Atherosclerosis: Role of Inflammation and ROS-Redox-Sensitive Factors. *Biomedicines* **2021**, *9* (11), 1602. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111602>.
- (127) Krzemińska, J.; Wronka, M.; Młynarska, E.; Franczyk, B.; Rysz, J. Arterial Hypertension-Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxid. Basel Switz.* **2022**, *11* (1), 172. <https://doi.org/10.3390/antiox11010172>.
- (128) Wang, L.; Cheng, C. K.; Yi, M.; Lui, K. O.; Huang, Y. Targeting Endothelial Dysfunction and Inflammation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2022**, *168*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.04.011>.
- (129) Morgan, M. J.; Liu, Z. Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF- κ B Signaling. *Cell Res.* **2011**, *21* (1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- (130) Esper, R. J.; Vilariño, J. O.; Machado, R. A.; Paragano, A. Endothelial Dysfunction in Normal and Abnormal Glucose Metabolism. *Adv. Cardiol.* **2008**, *45*, 17–43. <https://doi.org/10.1159/000115120>.
- (131) Ginn-Pease, M. E.; Whisler, R. L. Redox Signals and NF- κ B Activation in T Cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25* (3), 346–361. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00067-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00067-7).
- (132) Hulsmans, M.; Holvoet, P. The Vicious Circle between Oxidative Stress and Inflammation in Atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14* (1–2), 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00978.x>.
- (133) Otoupalova, E.; Smith, S.; Cheng, G.; Thannickal, V. J. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis. *Compr. Physiol.* **2020**, *10* (2), 509–547. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190017>.
- (134) Salminen, A. The Role of Immunosuppressive Myofibroblasts in the Aging Process and Age-Related Diseases. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2023**, *101* (10), 1169–1189. <https://doi.org/10.1007/s00109-023-02360-1>.
- (135) Kelley, N.; Jeltema, D.; Duan, Y.; He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>.
- (136) Fanelli, C.; Zatz, R. Linking Oxidative Stress, the Renin-Angiotensin System, and Hypertension. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **2011**, *57* (3), 373–374. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167775>.
- (137) Araujo, M.; Wilcox, C. S. Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20* (1), 74–101. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5259>.
- (138) Jha, J. C.; Banal, C.; Chow, B. S. M.; Cooper, M. E.; Jandeleit-Dahm, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25* (12), 657–684. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>.
- (139) Yang, S.; Yang, Y.; Yu, P.; Yang, J.; Jiang, X.; Villar, V. A. M.; Sibley, D. R.; Jose, P. A.; Zeng, C. Dopamine D1 and D5 Receptors Differentially Regulate Oxidative Stress through Paraoxonase 2 in Kidney Cells. *Free Radic. Res.* **2015**, *49* (4), 397–410. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1006215>.
- (140) Qaddumi, W. N.; Jose, P. A. The Role of the Renal Dopaminergic System and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Biomedicines* **2021**, *9* (2), 139. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020139>.

- (141) Ratliff, B. B.; Abdulmahdi, W.; Pawar, R.; Wolin, M. S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25* (3), 119–146. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>.
- (142) Scott-Solomon, E.; Boehm, E.; Kuruvilla, R. The Sympathetic Nervous System in Development and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2021**, *22* (11), 685–702. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00523-y>.
- (143) Campese, V. M.; Ye, S.; Zhong, H.; Yanamadala, V.; Ye, Z.; Chiu, J. Reactive Oxygen Species Stimulate Central and Peripheral Sympathetic Nervous System Activity. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2004**, *287* (2), H695–H703. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00619.2003>.
- (144) Ye, S.; Zhong, H.; Campese, V. M. Oxidative Stress Mediates the Stimulation of Sympathetic Nerve Activity in the Phenol Renal Injury Model of Hypertension. *Hypertension* **2006**, *48* (2), 309–315. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000231307.69761.2e>.
- (145) Tsai, P.-C.; Chao, Y.-M.; Chan, J. Y. H. Sympathetic Activation of Splenic T-Lymphocytes in Hypertension of Adult Offspring Programmed by Maternal High Fructose Exposure. *J. Physiol. Investig.* **2020**, *63* (6), 263. https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_85_20.
- (146) Reedijk, J. Bioinorganic Chemistry. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.05374-9>.
- (147) Cohen, S. M. Translating Bioinorganic Chemistry. *ChemMedChem* **2014**, *9* (6), 1087–1089. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402148>.
- (148) Bertini, I.; Rosato, A. Bioinorganic Chemistry in the Postgenomic Era. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (7), 3601–3604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0736657100>.
- (149) Ros-Vivancos, C.; González-Hernández, M.; Navarro-Gracia, J. F.; Sánchez-Payá, J.; González-Torga, A.; Portilla-Sogorb, J. [Evolution of treatment of syphilis through history]. *Rev. Espanola Quimioter. Publicacion Of. Soc. Espanola Quimioter.* **2018**, *31* (6), 485–492.
- (150) Yousuf, I.; Bashir, M.; Arjmand, F.; Tabassum, S. Advancement of Metal Compounds as Therapeutic and Diagnostic Metallodrugs: Current Frontiers and Future Perspectives. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *445*, 214104. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214104>.
- (151) van Rijt, S. H.; Sadler, P. J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (23–24), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.003>.
- (152) Li, Z.-Y.; Shen, Q.-H.; Mao, Z.-W.; Tan, C.-P. Rising Interest in the Development of Metal Complexes in Cancer Immunotherapy. *Chem. – Asian J.* **2022**, *17* (13), e202200270. <https://doi.org/10.1002/asia.202200270>.
- (153) Anthony, E. J.; Bolitho, E. M.; Bridgewater, H. E.; Carter, O. W. L.; Donnelly, J. M.; Imberti, C.; Lant, E. C.; Lermyte, F.; Needham, R. J.; Palau, M.; Sadler, P. J.; Shi, H.; Wang, F.-X.; Zhang, W.-Y.; Zhang, Z. Metallodrugs Are Unique: Opportunities and Challenges of Discovery and Development. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (48), 12888–12917. <https://doi.org/10.1039/D0SC04082G>.
- (154) Jomova, K.; Makova, M.; Alomar, S. Y.; Alwasel, S. H.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Rhodes, C. J.; Valko, M. Essential Metals in Health and Disease. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *367*, 110173. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173>.
- (155) Mikulewicz, M.; Chojnacka, K.; Kawala, B.; Gredes, T. Trace Elements in Living Systems: From Beneficial to Toxic Effects. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, e8297814. <https://doi.org/10.1155/2017/8297814>.
- (156) Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.
- (157) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>.
- (158) Boros, E.; Dyson, P. J.; Gasser, G. Classification of Metal-Based Drugs According to Their Mechanisms of Action. *Chem* **2020**, *6* (1), 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.10.013>.
- (159) Komeda, S.; Casini, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12* (3), 219–235.

- (160) González-Ballesteros, M. M.; Mejía, C.; Ruiz-Azuara, L. Metallodrugs: An Approach against Invasion and Metastasis in Cancer Treatment. *FEBS Open Bio* **2022**, *12* (5), 880–899. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13381>.
- (161) Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.
- (162) Zhang, C.; Xu, C.; Gao, X.; Yao, Q. Platinum-Based Drugs for Cancer Therapy and Anti-Tumor Strategies. *Theranostics* **2022**, *12* (5), 2115–2132. <https://doi.org/10.7150/thno.69424>.
- (163) Baudino, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12* (1), 3–20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>.
- (164) Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Dugo, L.; Di Paola, R.; Caputi, A. P.; Salvemini, D. Superoxide: A Key Player in Hypertension. *FASEB J.* **2004**, *18* (1), 94–101. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0428com>.
- (165) Martínez, V. R.; Aguirre, M. V.; Todaro, J. S.; Lima, A. M.; Stergiopulos, N.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. Zinc Complexation Improves Angiotensin II Receptor Type 1 Blockade and in Vivo Antihypertensive Activity of Telmisartan. *Future Med. Chem.* **2021**, *13* (1), 13–23. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0093>.
- (166) Martínez, V.; Diaz, R. G.; Perez, N. G.; Rueda, J. O. V.; Lofeudo, J. M.; Silva, M.; Gironacci, M.; Portiansky, E.; Williams, P.; Giusti, V. D. Antihypertensive and Cardiac Effect of Zn-Telmisartan in Ovariectomized Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2022**, *173*, S117. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.08.230>.
- (167) Martínez, V. R.; Martins Lima, A.; Stergiopulos, N.; Velez Rueda, J. O.; Islas, M. S.; Grier, M.; Calleros, L.; Rodríguez Puyol, M.; Jaquenod de Giusti, C.; Portiansky, E. L.; Ferrer, E. G.; De Giusti, V.; Williams, P. A. M. Effect of the Structural Modification of Candesartan with Zinc on Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *946*, 175654. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175654>.
- (168) Costa Pessoa, J. Thirty Years through Vanadium Chemistry. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *147*, 4–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.004>.
- (169) Tripathi, D.; Mani, V.; Pal, R. P. Vanadium in Biosphere and Its Role in Biological Processes. *Biol. Trace Elem. Res.* **2018**, *186* (1), 52–67. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1289-y>.
- (170) Kawakami, N.; Ueki, T.; Amata, Y.; Kanamori, K.; Matsuo, K.; Gekko, K.; Michibata, H. A Novel Vanadium Reductase, Vanabin2, Forms a Possible Cascade Involved in Electron Transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2009**, *1794* (4), 674–679. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.01.007>.
- (171) Carter, J. N.; Beatty, K. E.; Simpson, M. T.; Butler, A. Reactivity of Recombinant and Mutant Vanadium Bromoperoxidase from the Red Alga *Corallina officinalis*. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91* (1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00400-2](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00400-2).
- (172) Schlesinger, W. H.; Klein, E. M.; Vengosh, A. Global Biogeochemical Cycle of Vanadium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (52), E11092–E11100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715500114>.
- (173) Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D. Vanadium Compounds in Medicine. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301–302*, 24–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>.
- (174) Sharfalddin, A. A.; Al-Younis, I. M.; Mohammed, H. A.; Dhahri, M.; Mouffouk, F.; Abu Ali, H.; Anwar, M. J.; Qureshi, K. A.; Hussien, M. A.; Alghrably, M.; Jaremko, M.; Alasmael, N.; Lachowicz, J. I.; Emwas, A.-H. Therapeutic Properties of Vanadium Complexes. *Inorganics* **2022**, *10* (12), 244. <https://doi.org/10.3390/inorganics10120244>.
- (175) Stefanidou, M.; Maravelias, C.; Dona, A.; Spiliopoulou, C. Zinc: A Multipurpose Trace Element. *Arch. Toxicol.* **2006**, *80* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0009-5>.
- (176) Tapiero, H.; Tew, K. D. Trace Elements in Human Physiology and Pathology: Zinc and Metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57* (9), 399–411. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00081-7).
- (177) Chasapis, C. T.; Loutsidou, A. C.; Spiliopoulou, C. A.; Stefanidou, M. E. Zinc and Human Health: An Update. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86* (4), 521–534. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>.
- (178) Lansdown, A. B. G.; Mirastschijski, U.; Stubbs, N.; Scanlon, E.; Agren, M. S. Zinc in Wound Healing: Theoretical, Experimental, and Clinical Aspects. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **2007**, *15* (1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x>.

- (179) Hassan, N.; Krieg, T.; Zinser, M.; Schröder, K.; Kröger, N. An Overview of Scaffolds and Biomaterials for Skin Expansion and Soft Tissue Regeneration: Insights on Zinc and Magnesium as New Potential Key Elements. *Polymers* **2023**, *15* (19), 3854. <https://doi.org/10.3390/polym15193854>.
- (180) Krężel, A.; Maret, W. The Biological Inorganic Chemistry of Zinc Ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *611*, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>.
- (181) Gammoh, N. Z.; Rink, L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* **2017**, *9* (6), 624. <https://doi.org/10.3390/nu9060624>.
- (182) Thingholm, T. E.; Rönstrand, L.; Rosenberg, P. A. Why and How to Investigate the Role of Protein Phosphorylation in ZIP and ZnT Zinc Transporter Activity and Regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2020**, *77* (16), 3085–3102. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03473-3>.
- (183) Hennigar, S. R.; McClung, J. P. Zinc Transport in the Mammalian Intestine. *Compr. Physiol.* **2018**, *9* (1), 59–74. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180001>.
- (184) Sharma, G.; Merz, K. M. Mechanism of Zinc Transport through the Zinc Transporter YiiP. *J. Chem. Theory Comput.* **2022**, *18* (4), 2556–2568. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00927>.
- (185) Hübner, C.; Haase, H. Interactions of Zinc- and Redox-Signaling Pathways. *Redox Biol.* **2021**, *41*, 101916. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101916>.
- (186) Costa, M. I.; Sarmiento-Ribeiro, A. B.; Gonçalves, A. C. Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (5), 4822. <https://doi.org/10.3390/ijms24054822>.
- (187) Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; Murillo, C. A.; Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, 1999.
- (188) Storr, T.; Thompson, K. H.; Orvig, C. Design of Targeting Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (6), 534–544. <https://doi.org/10.1039/B514859F>.
- (189) Renfrew, A. K. Transition Metal Complexes with Bioactive Ligands: Mechanisms for Selective Ligand Release and Applications for Drug Delivery. *Metallomics* **2014**, *6* (8), 1324–1335. <https://doi.org/10.1039/c4mt00069b>.
- (190) Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- (191) Dias, M. C.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>.
- (192) Hassanpour, S. H.; Doroudi, A. Review of the Antioxidant Potential of Flavonoids as a Subgroup of Polyphenols and Partial Substitute for Synthetic Antioxidants. *Avicenna J. Phytomedicine* **2023**, *13* (4), 354–376. <https://doi.org/10.22038/AJP.2023.21774>.
- (193) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13* (10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).
- (194) Ullah, A.; Munir, S.; Badshah, S. L.; Khan, N.; Ghani, L.; Poulson, B. G.; Emwas, A.-H.; Jaremko, M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules* **2020**, *25* (22), 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.
- (195) Prasad, B.; Mallick, S.; Bharati, A. C.; Singh, S. Chapter 23 - Flavonoids: Chemistry, Biosynthesis, Isolation, and Biological Function. In *Handbook of Biomolecules*; Verma, C., Verma, D. K., Eds.; Elsevier, 2023; pp 467–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91684-4.00002-5>.
- (196) Chen, R.; Qi, Q.-L.; Wang, M.-T.; Li, Q.-Y. Therapeutic Potential of Naringin: An Overview. *Pharm. Biol.* **2016**, *54* (12), 3203–3210. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1216131>.
- (197) Ribeiro, M. H.; Lage, P. Naringin: Advances on Resources, Biosynthesis Pathway, Bioavailability, Bioactivity, and Pharmacology. In *Handbook of Dietary Flavonoids*; Xiao, J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2023; pp 1–50. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94753-8_29-1.
- (198) Ghanbari-Movahed, M.; Jackson, G.; Farzaei, M. H.; Bishayee, A. A Systematic Review of the Preventive and Therapeutic Effects of Naringin Against Human Malignancies. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 639840. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.639840>.
- (199) Bharti, S.; Rani, N.; Krishnamurthy, B.; Arya, D. S. Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review. *Planta Med.* **2014**, 437–451. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368351>.

- (200) Chen, M.; Li, R.; Gao, Y.; Zheng, Y.; Liao, L.; Cao, Y.; Li, J.; Zhou, W. Encapsulation of Hydrophobic and Low-Soluble Polyphenols into Nanoliposomes by pH-Driven Method: Naringenin and Naringin as Model Compounds. *Foods* **2021**, *10* (5), 963. <https://doi.org/10.3390/foods10050963>.
- (201) Gao, G.; Chang, F.; Zhang, T.; Huang, X.; Yu, C.; Hu, Z.; Ji, M.; Duan, Y. Naringin Protects Against Interleukin 1 β (IL-1 β)-Induced Human Nucleus Pulposus Cells Degeneration via Downregulation Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Pathway and P53 Expression. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 9963–9972. <https://doi.org/10.12659/MSM.918597>.
- (202) Adil, M.; Kandhare, A. D.; Ghosh, P.; Venkata, S.; Raygude, K. S.; Bodhankar, S. L. Ameliorative Effect of Naringin in Acetaminophen-Induced Hepatic and Renal Toxicity in Laboratory Rats: Role of FXR and KIM-1. *Ren. Fail.* **2016**, *38* (6), 1007–1020. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2016.1163998>.
- (203) A. Bakheet, S.; M. Attia, S. Evaluation of Chromosomal Instability in Diabetic Rats Treated with Naringin. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2011**, *2011*, e365292. <https://doi.org/10.1155/2011/365292>.
- (204) Kim, D.-H.; Jung, E.-A.; Sohng, I.-S.; Han, J.-A.; Kim, T.-H.; Han, M. J. Intestinal Bacterial Metabolism of Flavonoids and Its Relation to Some Biological Activities. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21* (1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/BF03216747>.
- (205) Matsoukas, J.; Apostolopoulos, V.; Zulli, A.; Moore, G.; Kelaidonis, K.; Moschovou, K.; Mavromoustakos, T. From Angiotensin II to Cyclic Peptides and Angiotensin Receptor Blockers (ARBs): Perspectives of ARBs in COVID-19 Therapy. *Molecules* **2021**, *26* (3), 618. <https://doi.org/10.3390/molecules26030618>.
- (206) Vargas-Rodriguez, J. R.; Garza-Veloz, I.; Flores-Morales, V.; Badillo-Almaraz, J. I.; Rocha-Pizaña, M. R.; Valdés-Aguayo, J. J.; Martinez-Fierro, M. L. Hyperglycemia and Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Pulmonary Function in the Context of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Med.* **2022**, *8*.
- (207) Muszalska, I.; Sobczak, A.; Dołhań, A.; Jelińska, A. Analysis of Sartans: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (1), 2–28. <https://doi.org/10.1002/jps.23760>.
- (208) Alnajjar, R.; Mostafa, A.; Kandeil, A.; Al-Karmalawy, A. A. Molecular Docking, Molecular Dynamics, and in Vitro Studies Reveal the Potential of Angiotensin II Receptor Blockers to Inhibit the COVID-19 Main Protease. *Heliyon* **2020**, *6* (12), e05641. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05641>.
- (209) Behl, T.; Kotwani, A. Potential of Angiotensin II Receptor Blockers in the Treatment of Diabetic Retinopathy. *Life Sci.* **2017**, *176*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.03.020>.
- (210) Chrysant, S. G.; Dimas, B.; Shiraz, M. Treatment of Hypertension with Olmesartan Medoxomil, Alone and in Combination with a Diuretic: An Update. *J. Hum. Hypertens.* **2007**, *21* (9), 699–708. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002241>.
- (211) Al-Majed, A. A.; Bakheit, A. H. H.; Abdel Aziz, H. A.; Al-Jallal, A. A. M. Olmesartan. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2017**, *42*, 241–286. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2017.02.005>.
- (212) Scott, L. J.; McCormack, P. L. Olmesartan Medoxomil: A Review of Its Use in the Management of Hypertension. *Drugs* **2008**, *68* (9), 1239–1272. <https://doi.org/10.2165/00003495-200868090-00005>.
- (213) Li, K.-Y.; Qiu, Y.; Jiang, Y.; Luo, C.-H.; Lin, X.-P.; Wang, J.; Yang, N. Effect of Probenecid on Pharmacokinetics and Tolerability of Olmesartan in Healthy Chinese Volunteers. *Curr. Ther. Res.* **2014**, *76*, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2013.11.004>.
- (214) Abdelghany, M.; Gonzalez, L.; Slater, J.; Begley, C. Olmesartan Associated Sprue-Like Enteropathy and Colon Perforation. *Case Rep. Gastrointest. Med.* **2014**, *2014*, e494098. <https://doi.org/10.1155/2014/494098>.
- (215) Rubio-Tapia, A.; Herman, M. L.; Ludvigsson, J. F.; Kelly, D. G.; Mangan, T. F.; Wu, T.-T.; Murray, J. A. Severe Spruelike Enteropathy Associated With Olmesartan. *Mayo Clin. Proc.* **2012**, *87* (8), 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.06.003>.
- (216) Markan, U.; Pasupuleti, S.; Pollard, C. M.; Perez, A.; Aukszi, B.; Lymperopoulos, A. The Place of ARBs in Heart Failure Therapy: Is Aldosterone Suppression the Key? *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **2019**, *13*, 1753944719868134. <https://doi.org/10.1177/1753944719868134>.
- (217) Unger, T. Significance of Angiotensin Type 1 Receptor Blockade: Why Are Angiotensin II Receptor Blockers Different? *Am. J. Cardiol.* **1999**, *84* (10A), 9S-15S. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(99\)00728-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(99)00728-6).

- (218) Israili, Z. H. Clinical Pharmacokinetics of Angiotensin II (AT1) Receptor Blockers in Hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **2000**, *14 Suppl 1*, S73-86. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1000991>.
- (219) Zhang, H.; Unal, H.; Desnoyer, R.; Han, G. W.; Patel, N.; Katritch, V.; Karnik, S. S.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (49), 29127–29139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689000>.

Capítulo II

Materiales y métodos

Tabla de contenidos

Introducción.....	89
1. Reactivos	89
1.1. Naringina.....	89
1.2. Olmesartán.....	90
2. Síntesis química de los complejos de coordinación	91
2.1. Síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (VONarg9).....	91
2.2. Síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{Cl}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (VONF.Cl).....	91
2.3. Síntesis del complejo $\text{K}_2[\text{VO}(\text{Narg})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (VONarg12).....	92
2.4. Síntesis del complejo $[\text{Zn}(\text{Olme})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (ZnOlme).....	92
3. Métodos de caracterización fisicoquímica.....	93
3.1. Estudios en fase sólida	93
3.1.1. Análisis elemental para carbono, hidrogeno y nitrógeno.	93
3.1.2. Determinación de Vanadio	93
3.1.3. Determinación de Zinc.....	94
3.1.4. Espectroscopía de absorción atómica	94
3.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA).....	95
3.1.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	95
3.1.7. Espectroscopía de reflectancia difusa UV-Vis (UV-Vis DRS).....	96
3.1.8. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	96
3.2. Estudios en solución	97
3.2.1. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis).....	97
3.2.2. Comportamiento del ligando por variación del pH	97
3.2.3. Interacción de ligado y metal por variación del pH	98
3.2.4. Determinación de la relación estequiométrica	98
3.2.5. Estabilidad	99
3.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	99

3.2.7.	Conductividad molar	100
3.2.8.	Espectroscopía de fluorescencia	100
4.	Interacción con albúmina sérica bovina (biodisponibilidad)	101
5.	Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	101
5.1.	Determinación de la actividad secuestrante del radical hidroxilo (HO·)	102
5.2.	Determinación de la actividad secuestrante del radical DPPH·	102
5.3.	Determinación de la actividad símil superóxido dismutasa (SOD)	103
5.4.	Determinación de la actividad secuestrante del radical peroxilo (ROO·)....	104
6.	Determinación de actividad anticancerígena y mecanismos de acción	105
6.1.	Cultivo de líneas celulares	105
6.2.	Determinación de la viabilidad celular por el método del MTT	106
6.3.	Análisis morfológico por tinción con cristal violeta	107
6.4.	Medida de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	108
6.5.	Medida de sistemas antioxidantes	109
6.5.1.	Determinación de glutatión reducido (GSH)	110
6.5.2.	Determinación de glutatión oxidado (GSSG).....	110
6.6.	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	111
6.7.	Absorción de vanadio intracelular	111
6.8.	Determinación de la viabilidad celular en presencia de DIDS	112
7.	Evaluación de la actividad antihipertensiva y efectos cardíacos	113
7.1.	Animales	113
7.2.	Preparación de los tejidos para determinaciones <i>ex vivo</i>	115
7.3.	Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido animal	115
7.4.	Determinación de glutatión en tejido animal.....	115
7.5.	Peroxidación lipídica en tejido animal	115
7.6.	Determinación del área transversal de cardiomiocitos	116
7.7.	Determinación de colágeno.....	116

8. Análisis de datos	116
Referencias bibliográficas	118

Capítulo II. Materiales y métodos

Introducción

En este capítulo se describen los reactivos y materiales utilizados en la síntesis, caracterización y determinación de las propiedades biológicas de los compuestos estudiados en este trabajo de tesis. Además, se presentan los procedimientos llevados a cabo en cada una de estas etapas, con el objetivo de proporcionar una descripción completa de los métodos empleados en esta investigación.

1. Reactivos

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y se emplearon tal como se suministraron: Naringina (Sigma, St. Louis, MO, USA), cloruro de oxidovanadio(IV) (solución acuosa al 50 % p/v, Carlo Erba), acetilacetato de oxidovanadio(IV) (Fluka), sulfato de oxidovanadio(IV) pentahidrato (Merck), monohidrato de 1,10-fenantrolina (Merck), $ZnCl_2$ (Biopack, Argentina) y olmesartán (Zhuhai Rundu Pharmaceutical Co., Ltd. China).

1.1. Naringina

La naringina es un compuesto polifenólico también conocido como naringósido o naringina hidratada, es una flavanona-7-O-glicósido formada entre la flavanona naringenina y el disacárido neohesperidosa, químicamente se conoce como 4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucósido ($C_{27}H_{32}O_{14}$), posee un peso molecular igual a 580,5 g/mol y una solubilidad en agua de 1 mg/mL a 40 °C^{1,2}. Se clasifica como una flavanona glicosilada que puede ser obtenida de diversas fuentes vegetales, principalmente pomelo y otras frutas cítricas.

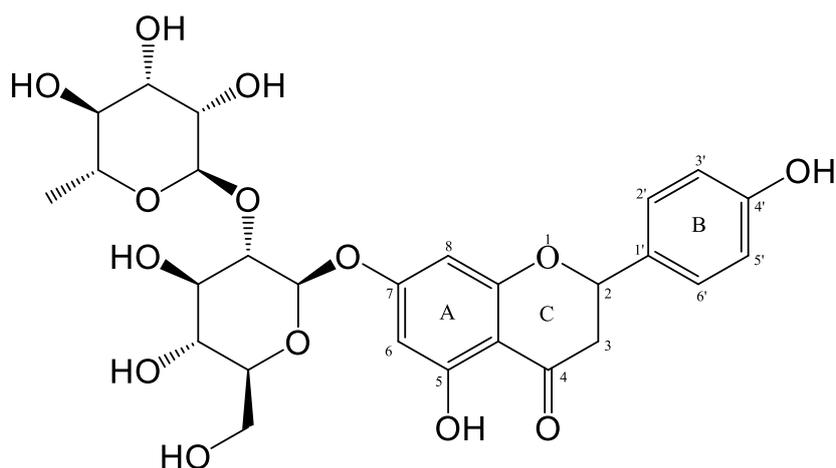


Figura II-1. Estructura química de la naringina.

1.2. Olmesartán

El olmesartán es un antagonista del receptor de angiotensina II, pertenece a la familia de fármacos llamados bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA). Su estructura química presenta un anillo imidazol y un grupo bifenil-tetrazol, estas características son comunes en las estructuras de otros BRA como: losartán, valsartán, telmisartán, irbesartán, candesartán y azilsartán. Los BRA se unen selectivamente al receptor de angiotensina II, tipo 1 o receptor AT1, y previenen que la proteína angiotensina II se una y ejerza sus efectos hipertensivos, los cuales incluyen vasoconstricción, estimulación y síntesis de aldosterona, estimulación cardíaca y reabsorción renal de sodio, entre otros ³.

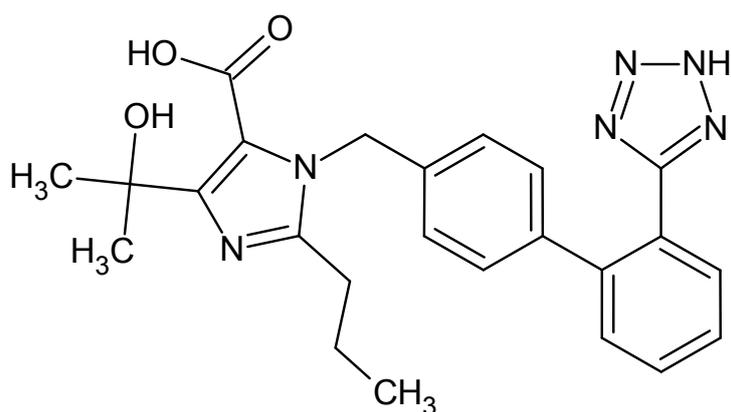


Figura II-2. Estructura química del olmesartán.

2. Síntesis química de los complejos de coordinación

2.1. Síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (VONarg9)

El complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (VONarg9) fue sintetizado empleando métodos diferentes a los reportados previamente ⁴. El primer método consistió en agregar gota a gota una solución de sulfato de oxidovanadio(IV) pentahidrato en metanol (0,25 mmol, 5 mL) a una solución metanólica de naringina (0,5 mmol, 20 mL); se ajustó el pH a 9 con NaOH 0,2 M y después de 1 hora de agitación bajo atmósfera de nitrógeno, se precipitó un sólido amarillo de tonalidad verde al agregar 100 mL de agua destilada. El sólido obtenido se filtró, se lavó con agua destilada y se secó a 60 °C. El segundo método consistió en agregar 0,25 mmol de acetilacetato de oxidovanadio(IV) a una solución acuosa de naringina (0,5 mmol, 20 mL) a pH 9 y 80 °C. Después de 30 minutos de agitación bajo atmósfera de nitrógeno, el precipitado de color amarillo y tonalidad verde se filtró y lavó varias veces con agua destilada caliente y se dejó secar a 60 °C.

2.2. Síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{Cl}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (VONF.Cl)

Con el propósito de cambiar ciertas propiedades del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, se sintetizó el complejo $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{Cl}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (VONF.Cl), mediante la sustitución de uno de los ligandos (Narg) por (Fen). Para llevar a cabo esta síntesis, se empleó un método previamente descrito para un sistema similar, con algunas modificaciones ⁵. Primero, el método consistió en preparar un precursor de $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ con 1,10-fenantrolina. Para ello, se mezclaron 0,5 mmol de monohidrato de 1,10-fenantrolina y 0,5 mmol de VOCl_2 en 2,4 mL de agua destilada bajo atmósfera de nitrógeno hasta obtener una solución uniforme. Luego, esta solución se agregó sobre una mezcla de naringina (0,5 mmol) y trietilamina (0,25 mmol) en 5,6 mL de etanol, el pH final fue de 3 – 3,5. Después de agitar durante 60 minutos, se ajustó el pH de la solución a 6 con trietilamina. Finalmente, se precipitó un sólido verde utilizando acetona o acetonitrilo. El complejo se recuperó por filtración y se lavó varias veces con el solvente utilizado para precipitar antes de dejarlo secar a una temperatura de 60 °C.

2.3. Síntesis del complejo $K_2[VO(Narg)(H_2O)_2] \cdot 3H_2O$ (VONarg12)

Con el objetivo de comparar cómo el sitio de coordinación influye en la actividad biológica del sistema VO-Naringina, se sintetizó el complejo $K_2[VO(Narg)(H_2O)_2] \cdot 3H_2O$ (VONarg12), que se une al metal a través de la región glicosídica del flavonoide. De esta manera, pudimos estudiar las diferencias con respecto al complejo $[VO(Narg)_2] \cdot 8H_2O$ (VONarg9), que coordina a través de los grupos 4-carbonilo y 5-hidroxi de la naringina.

Para obtener el complejo VONarg12, se tomaron 0,2 mmol de naringina y se disolvieron en 4 mL de agua destilada mediante la adición de KOH 1M hasta alcanzar un pH de 12,8. Después de agitar durante 30 minutos, se agregaron 0,2 mmol de acetilacetonato de oxidovanadio(IV) bajo atmósfera de nitrógeno y se continuó agitando hasta que el sólido se disolvió por completo. Rápidamente, se reajustó el pH a 12,5 y se precipitó el complejo sobre alcohol isopropílico frío (8 °C). El sólido floculento fue recuperado mediante centrifugación y posterior filtración, después fue lavado con más alcohol isopropílico y se dejó secar a 60 °C.

2.4. Síntesis del complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme)

Para obtener el complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme), se agregó gota a gota una solución de $ZnCl_2$ en agua (1 mmol, 10 mL), sobre una solución de olmesartán en metanol neutralizada con NaOH 1M (1 mmol, 100 mL), la mezcla se agitó durante 30 minutos y posteriormente se recuperó el sólido precipitado mediante filtración. El sólido se lavó con agua y metanol y se secó a 60 °C.

Con la intención de obtener cristales de los complejos sintetizados, se aplicaron diversos métodos de cristalización: evaporación lenta, difusión líquido-líquido, difusión líquido-vapor, cristalización por enfriamiento, cristalización en geles de silicato o síntesis en reactor solvotermal⁶⁻¹⁰. Sin embargo, ninguno de los métodos aplicados permitió la obtención de monocristales aptos para su determinación estructural mediante difracción de rayos-X. Los complejos que contienen el catión oxidovanadio(IV) se descomponen luego de varios días en solución y/o el vanadio se oxida, por lo que no pueden permanecer en solución durante un proceso de cristalización por evaporación del solvente y/o enfriamiento, incluso a baja temperatura o en atmósfera inerte (N_2). Por otra

parte, las técnicas aplicadas para el complejo de ZnOlme, condujeron a la formación inmediata de un precipitado.

3. Métodos de caracterización fisicoquímica

3.1. Estudios en fase sólida

3.1.1. Análisis elemental para carbono, hidrogeno y nitrógeno.

El análisis elemental es una técnica que permite determinar los principales elementos de una sustancia orgánica, es decir, carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, se determinan comúnmente utilizando analizadores comerciales en los que la muestra sufre una descomposición oxidativa y la posterior reducción de los óxidos de nitrógeno y azufre con la formación de los productos finales: dióxido de carbono, agua, nitrógeno elemental y dióxido de azufre ¹¹.

Los diferentes análisis elementales para C, H y N realizados en este trabajo de tesis se contrataron con el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE-CONICET) de la Universidad de Buenos Aires y los análisis se efectuaron en un analizador Carlo Erba Elemental Analyzer 1108. En este equipo se produce la combustión de la muestra en un tubo reactor donde se transforma a CO₂, H₂O y N₂, la separación de los gases se realizó por cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable y para la detección se utilizó un detector de conductividad térmica. Previo al análisis se realizó una calibración con sustancias de composición conocida. Para la calibración se utilizó sulfanilamida, y para el ensayo de control, ácido sulfanilico.

3.1.2. Determinación de Vanadio

La determinación de vanadio se realizó por un método en el que se mide la absorbancia de un producto coloreado (fosfotungstovanadato), el cual es obtenido como resultado de la reacción de vanadio(V) en solución ácida, con ácido fosfórico y tungstato de sodio ^{12,13}.

Para la determinación, se tomó la muestra solida (15 – 20 mg) y se sometió a digestión acida por el agregado de ácido sulfúrico y ácido nítrico en relación 3:1 y calentamiento. Este proceso se repitió de 3 a 5 veces con la intención de destruir toda la materia orgánica y oxidar el vanadio. Posteriormente, sobre la

muestra digerida se añadieron 5 mL de ácido fosfórico al 50 % v/v y 5 mL de tungstato de sodio al 10 % p/v. La mezcla se calentó a 100 °C por 15 min y se aforó a 50 mL con agua destilada. La absorbancia de la solución se midió a 400 nm y el contenido de vanadio se obtuvo al comparar los resultados con una curva de calibración previamente realizada utilizando NH_4VO_3 .

3.1.3. Determinación de Zinc

Para determinar el contenido de Zn(II) se utilizó el reactivo Zincon (ácido 2-[2-[(Z)-N-[(E)-(6-oxo-3-sulfociclohexa-2,4-dien-1-ylidene)amino]-C-fenilcarbonimidoil]hidrazinil] benzoico). En primer lugar, se preparó una solución stock de la sal sódica de Zincon a una concentración de 1,6 mM mediante la disolución de 7 mg del sólido en 0,2 mL de NaOH 1M y aforando a 10 mL con agua destilada. Para la determinación, se mezclaron 25 μL de la solución stock de zincon y 25 μL de la muestra en 950 μL de tampón borato 50 mM pH 9. Después de incubar a 20 °C durante 5 minutos, se midió la absorbancia de la mezcla a 620 nm. La concentración de zinc se obtuvo mediante la comparación de los resultados con una curva de calibración previamente realizada utilizando $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un rango de concentración entre 0 y 40 μM ¹⁴.

3.1.4. Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica es una técnica utilizada para determinar la concentración de un metal específico en una muestra, para ello se mide la cantidad de luz absorbida por los átomos de ese metal ¹⁵. Es una herramienta muy útil en química analítica para determinar metales y metaloides debido a su alta sensibilidad y baja interferencia. Las dos formas básicas de atomizar la muestra son la llama y el calentamiento electrotérmico ¹⁶.

Los análisis realizados por espectrometría de absorción atómica se contrataron con el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco” (CINDECA-CONICET) de la Universidad Nacional de La Plata. La determinación se realizó empleando un espectrómetro de absorción atómica Varian AA240, la atomización de la muestra se hizo por llama de aire-acetileno y la cuantificación se hizo empleando una curva de calibración externa.

3.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis térmico se refiere al estudio del comportamiento de un material en función de su temperatura. En el análisis termogravimétrico (TGA), se registra la masa de una muestra mientras se incrementa la temperatura a lo largo del tiempo, lo que proporciona información sobre la estabilidad térmica del compuesto ¹⁷. En general, el TGA permite determinar la presencia de moléculas de agua o solvente directamente coordinados al metal o moléculas de solvatación ¹⁸, a partir de la lectura del porcentaje de masa de residuo obtenido, y de su caracterización, puede determinarse parte de la estequiometría del complejo.

El análisis termogravimétrico se realizó utilizando una termobalanza Shimadzu TGA-50. Las medidas se condujeron en atmósfera de O₂ con un flujo de 50 mL/min y una velocidad de calentamiento igual a 10 °C/min y se registró la descomposición térmica desde temperatura ambiente hasta 800 °C.

Para cada análisis se utilizaron entre 10 y 20 mg de muestra. Los residuos fueron identificados por espectroscopía FTIR.

3.1.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica que se utiliza para analizar los modos vibracionales de las moléculas. Los grupos funcionales presentes en las moléculas pueden ser identificados por medio de bandas de absorción infrarroja que son características de cada uno de ellos. Estas bandas corresponden a las vibraciones fundamentales de los grupos funcionales ¹⁹.

Para la obtención de los espectros infrarrojos, se tomó una cantidad adecuada de la muestra (1-2 mg) y se mezcló con bromuro de potasio (Merck) (0,05 – 0,1 g). Luego, se pulverizó y homogeneizó la mezcla con un mortero hasta obtener un polvo fino. A continuación, se preparó una pastilla con una prensa hidráulica. Los espectros infrarrojos de la pastilla fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro FTIR Bruker IFS 66, con una resolución espectral de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ y un total de 60 escaneos acumulados en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Para el análisis de los espectros, se utilizó el programa OPUS 4.2.

3.1.7. Espectroscopía de reflectancia difusa UV-Vis (UV-Vis DRS)

La espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de polvos y superficies, la técnica se basa en que un haz de radiación UV-Vis colimada se dirige con un cierto ángulo sobre la muestra y, como resultado, la superficie refleja la radiación. El valor obtenido se convierte en la reflectancia (reflectancia relativa) con respecto a la reflectancia del estándar de referencia^{20,21}.

Los espectros de reflectancia difusa UV-Vis fueron registrados en un espectrofotómetro UV-Vis, Shimadzu UV 2600 con el accesorio ISR-2600PLUS usando BaSO₄ como estándar. El análisis de los espectros se realizó utilizando el programa UVProbe 2.43 Shimadzu Visual solutions. Los espectros de reflectancia difusa fueron transformados a su equivalente en unidades de absorbancia al aplicar la función Kubelka-Munk.

3.1.8. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) se utiliza para medir la absorción de radiación en la región de microondas (104–106 MHz) por sustancias que contienen uno o más electrones desapareados (paramagnéticas). Las sustancias paramagnéticas exhiben espectros de EPR bajo la influencia de un campo magnético aplicado mediante su interacción con los electrones desapareados. La espectroscopía EPR también se conoce como espectroscopía de resonancia de espín de electrones (ESR) o espectroscopía de resonancia magnética electrónica²².

Los espectros de EPR se midieron en colaboración con el Departamento de Física de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los espectros de EPR en banda X se obtuvieron de muestras en polvo y soluciones en DMSO o en mezcla con H₂O a temperaturas entre 100 K (-173,15 °C) y 298 K (24,85 °C) en un espectrómetro Bruker EMX-Plus, equipado con una cavidad rectangular con modulación de campo de 100 kHz. Se corrigió la línea base de los espectros, cuando fue necesario, utilizando el programa de procesamiento WinEPR (Bruker, Inc). Los valores g - y A - se obtuvieron mediante simulaciones utilizando las herramientas EasySpin 5.2.3²³ y asumiendo un hamiltoniano de spin axial de la forma: $H = \mu_B [g_{\parallel} B_z S_z +$

$g_{\perp} (B_x S_x + B_y S_y)] + [A_{\parallel} S_z I_z + A_{\perp} (S_x I_x + S_y I_y)]$, donde μ_B es el magnetón de Bohr y g_{\parallel} , g_{\perp} , A_{\parallel} , A_{\perp} son los componentes de los tensores axiales g y A , respectivamente; $B_{x/y/z}$, $S_{x/y/z}$, e $I_{x/y/z}$ son los componentes del campo magnético, y de los operadores de spin del electrón y del núcleo V , respectivamente.

3.2. Estudios en solución

3.2.1. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis)

La espectrofotometría UV-Vis es un método analítico ampliamente utilizado que mide la absorción de luz en la región espectral ultravioleta-visible (200 – 800 nm) por parte de una muestra ²⁴. La absorción detectada se debe a la promoción de electrones a un estado excitado de energía. Los electrones en diferentes entornos en una sustancia requieren una cantidad de energía específica para ser promovidos a un estado de mayor energía y, por lo tanto, las sustancias absorben la luz a diferentes longitudes de onda, lo que se detecta como el máximo de absorbancia.

Los espectros electrónicos UV-Vis de los diferentes compuestos utilizados en este trabajo fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-Vis, Shimadzu UV 2600 con arreglo de diodos de doble haz. El equipo cuenta con una resolución igual a 0,1 nm desde 185 hasta 900 nm con ancho de banda variable. Se utilizaron cubetas de cuarzo con una longitud de 1 cm. Los espectros y datos registrados con este equipo se analizaron utilizando el programa UVProbe 2.43 Shimadzu Visual solutions.

3.2.2. Comportamiento del ligando por variación del pH

Con el objetivo de estudiar el comportamiento en solución de los distintos ligandos empleados en este trabajo, se disolvieron en un solvente apropiado a una concentración de 1×10^{-5} M y se registraron sus espectros electrónicos en intervalos ascendentes de una unidad de pH desde 2 hasta 12-13 mediante la adición de NaOH o HCl, según correspondiera. Este procedimiento permitió identificar variaciones estructurales, como desprotonaciones, conforme se varió el pH.

3.2.3. Interacción de ligado y metal por variación del pH

Para investigar la interacción entre ligando y metal en solución, se disolvieron ligandos en un solvente apropiado a una concentración de 1×10^{-2} M. El pH se ajustó a 2 con HCl y se mezcló con una solución de una sal del metal estudiado a una concentración final de 5×10^{-3} M, para obtener una proporción final ligando a metal de 2:1. Luego, se registraron los espectros electrónicos por intervalos ascendentes de una unidad de pH, por adición de NaOH o HCl, según correspondiera, hasta alcanzar un pH de 12-13. Este procedimiento permitió estudiar la formación de complejos en solución y su estabilidad bajo diferentes condiciones de pH.

3.2.4. Determinación de la relación estequiométrica

La determinación de la relación estequiométrica de los complejos sintetizados en este trabajo se realizó empleando el método de la relación molar. Este método permite determinar la estequiometría de un complejo formado en solución al graficar la absorbancia de la solución de ligando y metal, a una longitud de onda fija, frente a la relación molar de los dos reactivos, manteniendo constante la concentración del ligando ²⁵. Para ello, se agregó gradualmente una solución de la sal del metal estudiado a una solución de ligando de concentración conocida y se midió la absorbancia de la solución después de cada adición a un valor fijo de pH identificado previamente para cada sistema. La relación estequiométrica se determinó a partir del punto de equivalencia, es decir, el punto en el que se ha agregado suficiente sal del metal para que se formen todas las moléculas del complejo de coordinación.

Concretamente, a una solución de ligando 1×10^{-2} M en un solvente apropiado, se agregaron diferentes volúmenes de la solución de la sal metálica 0,5 M en el mismo solvente resultando en proporciones ligando a metal de 10:1 hasta 0,5:1. En cada punto de la valoración se midió la absorbancia del complejo formado. Los datos de absorbancia se registraron en función de la relación molar entre ligando y sal, lo que permitió la construcción de una curva de titulación, el punto de equivalencia es la intersección entre las rectas generadas a partir de los datos de absorbancia.

Para el complejo $[\text{Zn}(\text{Olme})(\text{H}_2\text{O})_2]$, también se determinó la estequiometría por el método de Benesi-Hildebrand ²⁶, al medir la intensidad de fluorescencia de soluciones 1×10^{-3} M de olmesartán con diferentes concentraciones de Zn(II) desde 1×10^{-4} M hasta 2×10^{-3} M. Al suponer que el Zn(II) forma un complejo 1:1 con olmesartán, la ecuación aplicada fue: $1/(F - F_0) = 1/(F_\infty - F_0)K[\text{Me}]_0 + 1/(F_\infty - F_0)$, donde F es la intensidad de fluorescencia en cada concentración de metal ($[\text{Me}]_0$) y F_0 es la intensidad de fluorescencia del olmesartán, y K es la constante de asociación.

3.2.5. Estabilidad

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de los complejos en solución y verificar que no sufran cambios antes de ser utilizados en los ensayos biológicos, se midió la variación de sus espectros electrónicos con el paso del tiempo. Para ello, se disolvieron los complejos en un solvente adecuado a una concentración en el orden de 10^{-3} - 10^{-5} M y se registró la variación de sus espectros electrónicos por un periodo de al menos 2 horas a temperatura ambiente. La estabilidad de los complejos se determinó al evaluar la permanencia de sus características espectrales en función del tiempo, asegurando que no haya alteraciones significativas en su estructura y, por ende, en su funcionalidad biológica.

3.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) implica la detección de interacciones entre núcleos con momentos magnéticos intrínsecos (es decir, con un spin distinto de cero) y campos magnéticos aplicados, en la zona de radiofrecuencias, lo que permite determinar los entornos químicos locales de los núcleos activos para la RMN ²⁷. El campo magnético aplicado produce desdoblamiento de los niveles de energía del spin nuclear, tal que se inducen transiciones entre ellos con la absorción de la radiación electromagnética adecuada. Como los niveles de energía dependen de los núcleos y su entorno electrónico, la intensidad y posición de las señales en el espectro se relacionan con su estructura molecular ²⁸.

Se registraron los espectros de RMN para ^1H y ^{13}C en un espectrómetro Bruker Ultrashield 600, 14,1 Tesla, a partir de soluciones en DMSO- d_6 a 25 °C y una

frecuencia de 600 MHz y 150 MHz, respectivamente. Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno para calibrar el desplazamiento químico (δ). Los Espectros obtenidos fueron analizados utilizando el programa MestreNova.

Es importante aclarar que, si bien las medidas de RMN se realizan sobre compuestos diamagnéticos, las muestras paramagnéticas también pueden ser analizadas, pero generan señales anchas. Por lo tanto, se seleccionó la espectroscopía de EPR para las determinaciones estructurales de los complejos de vanadio y la espectroscopía de RMN para el complejo de zinc.

3.2.7. Conductividad molar

El estudio del comportamiento electrolítico de compuestos de coordinación en solución ofrece información valiosa sobre su naturaleza y composición. Al analizar la conductividad eléctrica de soluciones de estos complejos, se puede obtener información sobre el número de iones presentes en la solución y, por lo tanto, deducir información estructural relevante ²⁹. Las medidas de conductividad molar se realizaron a temperatura ambiente con un conductímetro TDS Probe 850.084, Sper Scientific Direct a soluciones de concentración 1×10^{-3} M. Como una medida de la estabilidad en solución, se registró el cambio en la conductividad por un periodo de al menos 2 horas.

3.2.8. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica analítica que se utiliza para medir la emisión de luz fluorescente en una muestra. Con esta técnica se irradia luz con una longitud de onda específica sobre la muestra, lo que provoca que los electrones en ella se exciten y salten a estados de energía más altos. Al volver a su estado de energía original, los electrones emiten luz de una longitud de onda más larga y menor energía que la luz de excitación. La luz emitida se detecta y se utiliza para obtener información sobre la muestra, como la concentración de una sustancia específica o su estructura molecular ³⁰.

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000, con lámpara de xenón de 150 W, en un rango de longitud de onda de 200 a 900 nm, con una resolución de 1 nm y ancho de banda variable, con ancho de rendija de entrada y salida de 10 nm, usando una

velocidad de escaneo de entre 2000 y 6000 nm/min. Se utilizaron cubetas de cuarzo con sus cuatro caras pulidas de 1 cm de longitud. Los espectros y datos registrados con este equipo se visualizaron con el programa Lab solutions RF versión 1.11.

4. Interacción con albúmina sérica bovina (biodisponibilidad)

La interacción entre biomacromoléculas, en especial aquella entre las proteínas plasmáticas y los medicamentos, ha sido un campo de investigación interesante en las ciencias de la vida, la química y la medicina clínica. La albúmina sérica bovina (ASB) se utiliza como proteína modelo para la entrega de medicamentos debido a su importancia médica, abundancia, bajo costo, facilidad de purificación, propiedades de unión a ligandos y su aceptación generalizada en la industria farmacéutica. Es bien sabido que la albúmina sérica bovina tiene dos residuos de triptófano que exhiben fluorescencia intrínseca, situados en las posiciones 134 y 212, respectivamente ^{31,32}.

Con el fin de medir la interacción entre los diferentes compuestos estudiados en este trabajo y la albúmina sérica bovina, se disolvió esta última en tampón Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) para obtener una concentración final de 6 μ M y se mezcló con los compuestos en estudio hasta obtener soluciones con concentraciones finales de entre 0 y 100 μ M, cuando no fue posible disolver directamente los compuestos en tampón Tris-HCl, se empleó DMSO a una concentración final de 0,5 % v/v. Las soluciones se incubaron a 25, 30 y 37 °C por una hora, posterior a cada incubación se midieron los espectros de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 280 nm y se registró el espectro de emisión entre 290 y 450 nm, las ranuras de emisión se ajustaron a 10 nm y la velocidad de escaneo fue de 6000 nm/minuto. Para cada muestra y concentración se midieron mínimo 3 réplicas en al menos 3 experimentos independientes. El análisis de los datos se hizo empleando el programa OriginPro 9.1.0.

5. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Los compuestos antioxidantes han ganado gran interés debido a sus roles protectores contra la deterioración oxidativa en productos alimentarios y farmacéuticos, así como en el cuerpo contra los procesos patológicos

mediados por el estrés oxidativo. Como resultado, frecuentemente se estudia la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos derivados de plantas y extractos naturales debido a sus posibles efectos protectores ³³.

5.1. Determinación de la actividad secuestrante del radical hidroxilo (HO·)

El estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de muchas enfermedades. Ocurre cuando la capacidad del cuerpo para defenderse contra las especies reactivas de oxígeno (EROs) se ve superada. Los radicales hidroxilo (HO·) son EROs que pueden dañar biomoléculas importantes en el cuerpo, lo que lleva a condiciones como inflamación crónica, neurodegeneración y cáncer. Muchas investigaciones tienen el objetivo de encontrar moléculas antioxidantes con el potencial de prevenir o detener la progresión de enfermedades asociadas al estrés oxidativo excesivo al reducir la producción de radicales libres o su eliminación ³⁴.

Para determinar la actividad secuestrante de radicales HO·, se generaron los radicales por el sistema ascorbato/Fe³⁺/H₂O₂. La mezcla de reacción contiene 2-desoxirribosa 3,75 mM, H₂O₂ 2,0 mM, FeCl₃ 100 μM y EDTA 100 μM con los compuestos estudiados en concentraciones de entre 0 y 100 μM en tampón fosfato 20 mM, pH 7,4. La reacción se inició por la adición de ácido ascórbico 100 μM, y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, la degradación de la 2-desoxirribosa por los radicales HO· se midió por el método de Halliwell y colaboradores ³⁵. El producto formado por la degradación de la 2-desoxirribosa reacciona con ácido tiobarbitúrico (ATB) a 100 °C en condiciones ácidas (en presencia de ácido tricloroacético (TCA)) dando como resultado la formación de un grupo cromógeno cuya absorbancia se registró a 532 nm ³⁶. El porcentaje de secuestro se determinó al normalizar los resultados con respecto al control (sin antioxidante), asignándole a este un valor arbitrario del 100 %. Para asegurar la precisión de los resultados, para cada muestra y concentración se midieron mínimo 3 réplicas en al menos 3 experimentos independientes.

5.2. Determinación de la actividad secuestrante del radical DPPH·

Para medir la actividad secuestrante de radicales, el método del DPPH· (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) se destaca como un método sencillo y reproducible. El

radical DPPH·, un radical libre y estable, de color violeta intenso, se utiliza ampliamente para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*. El ensayo del DPPH· se basa en la reacción entre el antioxidante (donante de hidrógeno o agente reductor) y el radical DPPH·, lo que resulta en el cambio a su forma no radical, que es de color amarillo pálido³⁷. Si bien, el radical DPPH· no es una especie reactiva de oxígeno, es utilizado de manera rutinaria para evaluar la actividad antioxidante, en este trabajo se determinó la capacidad secuestrante frente a este compuesto con fines comparativos.

En este sentido, para determinar la actividad antioxidante frente al radical DPPH· se agregaron 0,5 mL de los compuestos en estudio en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, para formar soluciones con concentraciones finales de entre 0 y 100 µM sobre 2 mL de una solución en metanol del radical DPPH· (40 ppm). Luego de incubar por 1 hora en ausencia de luz a 25 °C, se registró la absorbancia de las muestras a 517 nm. Los resultados fueron normalizados con respecto al control (sin antioxidante), asignándole un valor arbitrario del 100 %, de esta manera se calculó el porcentaje de secuestro del radical DPPH·. Se empleó ácido ascórbico a una concentración de 100 ppm como control positivo. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron al menos 3 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

5.3. Determinación de la actividad similar superóxido dismutasa (SOD)

La evaluación de la actividad SOD-símil de los compuestos estudiados se determinó de forma indirecta por su capacidad para inhibir la reducción del azul de nitro-tetrazolio (NBT). En esta reacción, el NBT actúa como un aceptor de electrones y se reduce a formazán (un compuesto azul) cuando se expone a radicales superóxido generados *in situ* por la reacción entre el sistema PMS (fenazina metosulfato) y NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido). A medida que la reacción avanza, se observa un cambio de coloración de amarillo (NBT oxidado) a azul (NBT reducido), aumentando la absorbancia a 560 nm. A medida que los compuestos inhiben la reducción del NBT, la absorbancia asociada con la formación de formazán disminuye. Por lo tanto,

cuanto menor sea el aumento de la absorbancia a 560 nm, mayor será la capacidad SOD-símil de los compuestos estudiados ^{36,38}.

Para medir la capacidad SOD-símil se agregaron 0,5 mL de los compuestos en estudio (para formar soluciones con concentraciones finales de entre 0 y 1000 μM), 0,5 mL de NADH 1,40 mM y 0,5 mL de NBT 300 μM en tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0,1 M, pH 7,4. Después de incubar durante 15 min a 25 °C, la reacción se inició mediante la adición de 0,5 mL de fenazina metosulfato 120 μM . Luego, la mezcla se incubó durante 5 min, y se midió su absorbancia a 560 nm. El porcentaje de inhibición se obtuvo luego de normalizar los datos con respecto al control (sin antioxidante), asignándole a este un valor arbitrario de 100 %, luego, la cantidad de compuesto que produjo una inhibición del 50 % (IC_{50}) se obtuvo al trazar el porcentaje de inhibición versus el logaritmo de la concentración del compuesto estudiado utilizando un asistente de regresión sigmoideo provisto por el programa SigmaPlot 12.0. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron al menos 3 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

5.4. Determinación de la actividad secuestrante del radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)

Para medir la actividad secuestrante de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), se midió la capacidad de los compuestos estudiados para retrasar la degradación de la piranina causada por la acción de los radicales $\text{ROO}\cdot$ generados *in situ* a partir de la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) ³⁹. Se incubó AAPH (50 mM) durante 30 minutos a 37 °C y se agregó el compuesto estudiado en concentraciones de entre 0 y 100 μM y piranina (50 μM) en tampón fosfato-salino (PBS, 11 mM KH_2PO_4 , 26 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, pH 7,4). La degradación de la piranina se siguió espectrofotométricamente midiendo la disminución en su absorbancia a 454 nm en función del tiempo a 37 °C. Finalmente, se determinó la fase de retardo o fase *lag*, que es el tiempo transcurrido (en minutos) antes de que haya una reducción significativa en su absorbancia ⁴⁰. El tiempo transcurrido (retraso de la degradación) se debe al efecto protector del agente antioxidante. La fase *lag* se obtiene de la intersección entre las rectas generadas a partir de los datos de

absorbancia en función del tiempo. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron al menos 3 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

6. Determinación de actividad anticancerígena y mecanismos de acción

Los materiales empleados para cultivo celular se obtuvieron de Corning o Falcon (Corning, NY, EE. UU.). El medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) se obtuvo en Gibco (Gaithersburg, MD, EE. UU.), la solución TrypLE™ en Invitrogen (Argentina SRL) y el suero fetal bovino (SFB) en Internegocios, Argentina. Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico.

6.1. Cultivo de líneas celulares

Para la realización de este trabajo se emplearon diferentes líneas celulares tumorales y normales con el fin de evaluar la citotoxicidad y mecanismos de acción de los compuestos estudiados:

A549: Esta línea celular se aisló por primera vez en 1972 de un paciente masculino de 58 años con adenocarcinoma de pulmón. Son células humanas de epitelio alveolar basal y se clasifican como carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) derivadas de neumocitos de tipo II en el pulmón, las que *in vitro* crecen adherentemente como una monocapa ⁴¹.

HEK-293: La línea celular HEK-293 se refiere a la línea celular de riñón embrionario humano, que es una línea celular de uso común en la investigación biológica. Las células se derivaron originalmente del tejido renal de un embrión humano a principios de la década de 1970, y desde entonces se han estudiado y caracterizado de forma exhaustiva como modelo de células humanas normales ⁴².

WISH: La línea celular WISH, se aisló por primera vez en noviembre de 1958 del amnios epitelial humano normal por L. Hayflick en el *Wistar Institute of Anatomy and biology*, son células epiteliales adherentes que crecen en monocapa ⁴³.

Las líneas celulares empleadas se obtuvieron de ABAC (Asociación Banco Argentino de Células, INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina) o del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE-CONICET-CIC) de La Universidad Nacional de La Plata.

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de 75 cm² a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, usando el medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB). Cuando las células alcanzaron el 70-80 % de confluencia, fueron despegadas utilizando TrypLE™ de Gibco (Gaithersburg, MD, EE.UU) o una solución de este al 20 % v/v en tampón fosfato-salino suplementado con EDTA (PBS-EDTA, 11 mM KH₂PO₄, 26 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). Luego, se cuantificaron las células por conteo en cámara de Neubauer y se sembraron en microplacas de múltiples pocillos (96, 48, 24 o 6) o en platos de 100 mm² con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10 % v/v a una densidad de siembra promedio de 0,03x10⁶ células/cm² siguiendo las recomendaciones del proveedor ⁴⁴. Luego de 24 horas, se removió el medio, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se añadieron los compuestos estudiados en concentraciones finales de entre 0 y 100 µM en DMEM; cuando no fue posible disolver directamente los compuestos en el medio de cultivo, se empleó DMSO a una concentración final máxima de 0,5 % v/v ⁴⁵. Después de 24, 48 o 72 horas de tratamiento con los compuestos estudiados, se retiró el medio, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se continuó con los procedimientos para la determinación de citotoxicidad o mecanismos de acción.

6.2. Determinación de la viabilidad celular por el método del MTT

El ensayo con MTT es un método ampliamente utilizado para determinar el número de células viables en estudios de proliferación y citotoxicidad. El ensayo colorimétrico se basa en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT), por acción de enzimas mitocondriales (succinato-deshidrogenasa) para formar cristales de formazán de color violeta. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas (células viables).

Los cristales de formazán insolubles en el medio de cultivo, son posteriormente solubilizados con un solvente apropiado y la disolución coloreada es cuantificada midiendo la absorbancia a 570 nm^{46,47}.

Para la determinación de la viabilidad celular se sembraron $0,012 \times 10^6$ células por pocillo en 100 μ L de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 96 pocillos. Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con los compuestos estudiados en concentraciones de entre 0 y 100 μ M en DMEM por 24 horas. Después, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se incubaron las células por 3 horas a 37 °C con 100 μ L del reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Abcam, Cambridge, UK) a una concentración de 0,5 mg/mL en DMEM para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad. Posteriormente, se retiró el medio con la solución de MTT, y se lavó la monocapa con PBS, los cristales de formazán se disolvieron con 50 μ L de DMSO. A continuación, se midió la absorbancia en un lector de micro placas (IVDIAGNOSTIK M201) a 570 nm. El porcentaje de viabilidad celular se estimó al normalizar los datos de absorbancia con respecto al control, asumiendo para este un valor de viabilidad igual al 100 %. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron al menos 6 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

6.3. Análisis morfológico por tinción con cristal violeta

Con el fin de estudiar los cambios morfológicos a nivel celular causados por el tratamiento con los compuestos estudiados, se sembraron $0,3 \times 10^6$ células por pocillo en 2 mL de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 6 pocillos. Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células por 24 y/o 48 horas con los compuestos estudiados a concentraciones de 0 y 100 μ M. Después de retirar el medio, se lavó cuidadosamente la monocapa con PBS, se fijaron las células a la placa con metanol por 5 minutos, y se tiñeron durante 5 minutos con una solución de cristal violeta al 0,5 % p/v en metanol al 25 % v/v. Por último, se lavaron los pocillos con abundante agua y se examinaron los cambios

morfológicos por microscopía óptica, se registraron las imágenes utilizando una cámara fotográfica.

6.4. Medida de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Como fue mencionado en el capítulo anterior, las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno. Se forman naturalmente como un subproducto del metabolismo del oxígeno y desempeñan funciones importantes en la señalización celular y la homeostasis. Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo, los niveles de EROs pueden aumentar drásticamente, lo que puede ocasionar daño en proteínas, lípidos y ADN celular. El estrés oxidativo surge cuando hay un desequilibrio debido a un exceso de EROs u otros agentes oxidantes, frente a los cuales la célula no puede generar una respuesta antioxidante efectiva ⁴⁸.

Las células cancerígenas se caracterizan por presentar niveles más altos de EROs en comparación con las células normales como resultado de un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes. Recientemente, un nivel elevado de estrés oxidativo se ha considerado un nuevo objetivo para la terapia contra el cáncer. Esto puede inducirse al aumentar las EROs exógenas y/o inhibiendo el sistema antioxidante protector endógeno. Los estudios preclínicos han aclarado que esto puede ser una estrategia anticancerígena eficaz ^{49,50}.

La inducción de estrés oxidativo puede determinarse al medir la generación de las EROs, para ello, en este trabajo se utilizó la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Esta sonda se difunde fácilmente a través de la membrana celular y es hidrolizada por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), no fluorescente, que en presencia de EROs, se oxida rápidamente a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente. La intensidad de fluorescencia de la DCF es directamente proporcional a la cantidad de EROs intracelular ⁵¹.

Para medir la generación de EROs se sembraron $0,03 \times 10^6$ células por pocillo en 300 μ L de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 48 pocillos. Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con los compuestos estudiados en

concentraciones de entre 0 y 100 μM en DMEM por 24 horas. Después, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C con la sonda fluorescente H₂DCFDA (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una concentración de 10 μM en PBS. Luego de retirar la sonda, se lavó nuevamente la monocapa, se agregó tritón X-100 al 0,1 % v/v, y se incubó por 1 hora a 4 °C con el fin de lisar las células. Finalmente, se midió la emisión de fluorescencia de los lisados celulares (λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm). La generación de especies reactivas de oxígeno se estimó al normalizar los datos de fluorescencia con respecto al control, asignándole a este un valor arbitrario de 100 %. Asimismo, se realizó un ajuste de los resultados con respecto a la cantidad de proteínas contenida en cada pocillo, su cuantificación se realizó por el método de Bradford ⁵², se empleó albúmina sérica bovina para la curva de calibración. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron 6 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

6.5. Medida de sistemas antioxidantes

El glutatión (GSH) es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina; es un agente antioxidante intracelular que protege a las células del daño causado por los peróxidos lipídicos, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y los xenobióticos. Existe en forma de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), es el tiol no proteico más abundante presente en concentraciones milimolares en los tejidos de los mamíferos y juega un papel importante en la eliminación y desintoxicación de carcinógenos. Su síntesis, transporte, utilización y metabolismo están estrictamente controlados para mantener la homeostasis intracelular y el equilibrio redox. Se ha demostrado que la alteración del sistema antioxidante del glutatión está asociada con múltiples formas de muerte celular programada en las células cancerosas. Por lo tanto, se han desarrollado varias terapias novedosas para atacar el sistema antioxidante GSH en los tumores como un medio para aumentar la respuesta y disminuir la resistencia a los medicamentos ^{53,54}.

Para medir la depleción de glutatión se sembraron $0,03 \times 10^6$ células por pocillo en 300 μL de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 48 pocillos. Luego de 24

horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con los compuestos estudiados en concentraciones de entre 0 y 100 μM en DMEM por 24 horas. Después, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se lisaron las células al agitar por 30 min con triton X-100 al 0,1 % v/v, conservando la placa refrigerada. Con los lisados celulares se llevó a cabo la determinación de GSH y GSSG, el método utilizado se aprovecha de la capacidad que posee el *o*-ftalaldehído (OPT) de reaccionar con el GSH a pH 8 y con el GSSG a pH 12. Para la determinación de GSSG, se previnieron las interferencias del GSH al hacerlo reaccionar previamente con N-etilmaleimida (NEM), compuesto que añade el tior de la cisteína por reacción de Michael a su estructura ⁵⁵.

6.5.1. Determinación de glutatión reducido (GSH)

Se mezclaron 50 μL del lisado celular con 900 μL de tampón fosfato-EDTA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 8) y 50 μL de OPT (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0,1 % p/v en metanol, se agitó la mezcla por 15 minutos a 4 °C y se midió la emisión de fluorescencia (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 420 nm).

6.5.2. Determinación de glutatión oxidado (GSSG)

Se mezclaron 50 μL del lisado celular con 50 μL de NEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) 40 mM, y se agitó por 30 min a 4 °C, luego, se agregaron 850 μL de NaOH 0,1 M y 50 μL de OPT al 0,1 % p/v en metanol, finalmente, se agitó la mezcla por 15 minutos a 4 °C y se midió la emisión de fluorescencia (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 420 nm).

Los niveles de GSH y GSSG se cuantificaron a partir de curvas de calibración obtenidas de soluciones estándares de GSH y GSSG (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se realizó un ajuste de los resultados con respecto a la cantidad de proteínas contenida en cada pocillo, su cuantificación se realizó por el método de Bradford ⁵², para la curva de calibración se empleó albúmina sérica bovina. Los niveles de GSH y GSSG se calcularon como μg GSH/mg de proteína o μg GSSG/mg de proteína, también se calculó la relación GSH/GSSG, los resultados fueron expresados como porcentaje de GSH o GSSG con respecto al control, después de normalizar los datos con respecto a este, asignándole un valor arbitrario del 100 %. Para asegurar la precisión de los resultados, se

midieron 6 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

6.6. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es un parámetro importante de la función mitocondrial y un indicador de la salud celular. La reducción del $\Delta\psi_m$ sugiere la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial lo que refleja el inicio de la señal pro-apoptótica ⁵⁶.

Para medir el cambio en el potencial de membrana mitocondrial, se sembraron $0,03 \times 10^6$ células por pocillo en 300 μ L de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 48 pocillos. Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con los compuestos estudiados en concentraciones de entre 0 y 100 μ M en DMEM por 24 horas. Después, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS y se incubaron las células durante 30 min a 37 °C con la sonda fluorescente ioduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DIOC₆) ⁵⁶ a una concentración de 400 nM en tampón PBS, a continuación, se retiró el medio con la sonda, se lavó la monocapa cuidadosamente con PBS, se agregaron 500 μ L de PBS-EDTA y se desprendió la monocapa por raspado del fondo del pocillo. Finalmente, se midió la emisión de fluorescencia de las suspensiones celulares obtenidas (λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm). El cambio en el potencial de membrana mitocondrial se expresó como porcentaje, luego de normalizar los datos de fluorescencia con respecto al control, asignándole a este un valor arbitrario de 100 %. Para asegurar la precisión de los resultados, se midieron 6 réplicas de cada muestra y concentración en un mínimo de 3 experimentos independientes.

6.7. Absorción de vanadio intracelular

Para medir la absorción de vanadio intracelular, se sembraron $2,2 \times 10^6$ células por pocillo en 10 mL de DMEM con SFB al 10 % v/v en platos de 100 mm². Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con los compuestos estudiados a concentraciones de 0 y 100 μ M, o el valor de concentración hallado previamente correspondiente al IC₅₀ en DMEM por 24 horas. Después, se descartó el medio con los compuestos estudiados, se lavó la monocapa

cuidadosamente con PBS y se recuperaron las células por el agregado de trypLE al 20 % v/v en PBS-EDTA y posterior centrifugado, el pellet obtenido se lavó con PBS y se lisó durante toda la noche con 100 µL de NaOH 0,1 M a 4 °C. Al día siguiente, se cuantificaron las proteínas de los lisados celulares por el método de Bradford ⁵², empleando para la curva de calibración albúmina sérica bovina bajo las mismas condiciones experimentales. El resto de los lisados celulares se llevó a 1 mL con HNO₃ al 20 % v/v, y se trataron en un baño ultrasónico a 50 °C por 1 hora, posteriormente los lisados se calentaron a 80 °C durante 1 hora y se centrifugaron a 10000 RPM durante 10 min, se almacenaron los sobrenadantes a 4 °C y se cuantificó la concentración de vanadio por ICP-OES.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que en conjunto con un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituyen el equipo de ICP-OES. El plasma acoplado inductivamente (ICP) se ha convertido en la fuente dominante para el análisis multielemento espectroscópico rápido debido a sus atributos, que incluyen bajos límites de detección, un amplio rango dinámico lineal y alta precisión ⁵⁷. Es un método que permite la determinación simultánea de todos los elementos metálicos y presenta varias ventajas sobre las técnicas de absorción atómica, como la atomización completa, un plasma prácticamente libre de radiación de fondo e interferencias inmatriciales de ionización o autoabsorción ⁵⁸.

Las medidas para la cuantificación de vanadio por ICP-OES realizadas en este trabajo se contrataron con la Planta Piloto Multipropósito - Laboratorio de Servicios a la Industria y al Sistema Científico (PLAPIMU-LaSeSiC) de la Universidad Nacional de La Plata. Los análisis se efectuaron en un espectrofotómetro de emisión óptica Shimadzu ICPE-9800 siguiendo la norma EPA 6010 ⁵⁹.

6.8. Determinación de la viabilidad celular en presencia de DIDS

El ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) es un compuesto químico utilizado en investigación biológica y en estudios de transporte iónico. DIDS es conocido por su capacidad para inhibir ciertos canales aniónicos ⁶⁰ y

transportadores de membrana⁶¹, particularmente aquellos relacionados con el transporte de iones cloruro (Cl⁻)^{62,63}.

Para la determinación se sembraron $0,020 \times 10^6$ células por pocillo en 100 μ L de DMEM con SFB al 10 % v/v en placa de 96 pocillos. Luego de 24 horas de crecimiento, y con una confluencia de entre el 70 y 80 %, se lavó la monocapa con PBS y se trataron las células con ácido diisotiociano-2,2'-estilbenodisulfónico (DIDS) 100 μ M por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, se trataron las células con el complejo estudiado (VONarg12) en concentraciones de entre 0 y 100 μ M en DMEM por 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Después, se determinó la viabilidad celular por el método del MTT (apartado 6.2)⁶⁴.

7. Evaluación de la actividad antihipertensiva y efectos cardíacos

7.1. Animales

Los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, del instituto nacional de salud" (*National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*)⁶⁵ y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (Número de protocolo: P02-03-2021). Las ratas espontáneamente hipertensas (SHRs, 12 semanas de edad, machos, 200-300 g peso corporal) con presión arterial sistólica superior a 160 mmHg se obtuvieron del Instituto de Investigaciones Médicas "Dr. Alfredo Lanari" de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata y se dividieron al azar en 4 grupos con 4 individuos cada uno (n=16), se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio (temperatura 23 °C \pm 1, con ciclo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, 60-70 % de humedad) con libre acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron alimentados con un balanceado estándar comercial para ratas y ratones (Cooperación, Buenos Aires, Argentina).

Los diferentes compuestos suministrados a los animales (ZnCl₂, Olmesartán, ZnOlme) fueron disueltos por ultrasonido (3 horas) en el agua de bebida a una

dosis molar equivalente a la del olmesartán (10 mg/kg de peso corporal), al grupo control se le suministró agua corriente. Se administraron dosis equivalentes de ZnOlme (12,2 mg/kg de peso corporal) y ZnCl₂ (3,0 mg/kg de peso corporal) por día, de acuerdo con los datos reportados para el fármaco ⁶⁶. Los volúmenes consumidos se controlaron cada día. Semanalmente, se pesaron los animales y se controló la presión arterial sistólica mediante el método no invasivo de pletismografía de cola. Para estudiar la hipertrofia cardíaca (HC), se realizó ecocardiografía transtorácica bidimensional en modo M con un transductor de 7 MHz al principio y al final del protocolo bajo anestesia con isoflurano ~2-3 % en flujo de oxígeno. Las mediciones se realizaron de acuerdo al método de la sociedad americana de ecocardiografía ⁶⁷. La masa del ventrículo izquierdo (MVI) se calculó según Devereaux y Reichek ⁶⁸, y el índice de la masa del ventrículo izquierdo (IMVI) se calculó como el cociente entre la MVI y la longitud tibial. El acortamiento fraccional se calculó como $[(LVDd-LVDs)*100]/LVDd$ (LVDd: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; LVDs: diámetro sistólico del ventrículo izquierdo).

Después de 8 semanas, los animales fueron sacrificados mediante la administración de una dosis única de uretano (1 g/kg de peso corporal), luego de verificar la ausencia de reflejos, se extrajo el corazón y se pesó para el cálculo del índice de peso cardíaco/peso corporal. A continuación, se separó el ventrículo izquierdo y se extrajo la tibia para calcular la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia y la relación entre la masa del ventrículo izquierdo y la longitud de la tibia. Luego, los ventrículos izquierdos fueron divididos y congelados con nitrógeno líquido para finalmente conservarlos a -80 °C. Estas fracciones luego se usaron para la medición de especies reactivas de oxígeno (EROs), glutatión (GSH) y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las secciones coronales obtenidas del ecuador del ventrículo izquierdo se fijaron en formaldehído tamponado al 10 % v/v durante 24 horas e impregnados con parafina. Luego, se tiñeron secciones gruesas (5 µm) para estudios histológicos.

7.2. Preparación de los tejidos para determinaciones *ex vivo*

Se homogeneizó una fracción de tejido de aproximadamente 250 mg sobre hielo con 1 mL de tampón tris 40 mM por cada 100 mg de tejido utilizando un homogeneizador Pro-Scientific Bio-gen Series Pro 2000. Posteriormente, se utilizó el homogenato para las determinaciones de EROs, GSH y TBARS.

7.3. Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido animal

Para medir la generación de EROs en el tejido cardíaco se tomaron 50 microlitros del homogenato y se mezclaron con 2 mL de tampón tris 40 mM y la sonda H₂DCFDA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato) a una concentración final de 2,7 μ M⁶⁹. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. Finalmente, se detectaron las EROs con el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000, al medir la emisión de fluorescencia (λ_{ex} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm). La generación de especies reactivas de oxígeno se estimó al normalizar los datos de fluorescencia con respecto al control, asignándole a este un valor arbitrario de 100 %.

7.4. Determinación de glutatión en tejido animal

Para la determinación de la forma reducida de glutatión (GSH), se tomaron 50 μ L de homogenato y se mezclaron con 900 μ L de tampón fosfato-EDTA (Na₂HPO₄ 0,1 M-EDTA 0,005 M, pH 8) y 50 μ L de *o*-ftalaldehído (OPT) al 0,1 % p/v en metanol, después de incubar durante 15 min a 4 °C. Se midieron los niveles de GSH en el espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm⁵⁵.

7.5. Peroxidación lipídica en tejido animal

La determinación de peróxidos lipídicos como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico se llevó a cabo según el procedimiento reportado⁷⁰. El homogenato (50 μ L) se mezcló con 100 μ L de dodecilsulfato sódico al 8,1 % v/v, 750 μ L de tampón acetato 3,5 M a pH 3,5, 750 μ L de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % p/v y 350 μ L de agua. Luego, la mezcla se calentó a 95 °C durante 1 hora y, después de enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 500 μ L de agua y 2,5 mL de una mezcla 15:1 de n-butanol y piridina. Se agitó y centrifugó

a 4000 rpm y se midió la absorbancia de la fase orgánica a 532 nm. La generación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se estimó al normalizar los datos de absorbancia con respecto al control, asignándole a este un valor arbitrario de 100 %.

7.6. Determinación del área transversal de cardiomiocitos

Se tiñeron secciones de 5 micrómetros de grosor con hematoxilina eosina para determinar el área transversal (CSA, *Cross-Sectional Area*) de los cardiomiocitos. Las imágenes histológicas ($\times 40$ de aumento) se digitalizaron utilizando una cámara de video digital (Olympus DP71, Japón) montada en un microscopio de campo amplio (Olympus BX53, Japón). Para las mediciones, solo se consideraron las células redondas u ovoides con núcleos redondos visibles y se contaron 50 células en al menos 10 imágenes obtenidas de cada ventrículo izquierdo. La determinación del área transversal se realizó empleando el programa de análisis de imágenes (Image-Pro Plus v6.3 - Media Cybernetics, EE. UU).

7.7. Determinación de colágeno

Para la evaluación del colágeno, se tiñeron secciones de 5 μm de grosor del ventrículo izquierdo utilizando la técnica de Rojo Picrosirius (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI 53233, EE. UU). Las muestras se examinaron bajo luz polarizada, utilizando un analizador (U-ANT, Olympus) y un polarizador (U-POT, Olympus) para estudiar la birrefringencia del colágeno teñido. Las imágenes histológicas (20x de magnificación) se digitalizaron empleando una cámara de video digital (Olympus DP71, Japón) montada en un microscopio de campo amplio (Olympus BX53, Japón). El porcentaje de colágeno total se calculó como la suma de todas las áreas de tejido conectivo (colágeno tipo I y tipo III) de las secciones, dividido por la superficie total de la sección.

8. Análisis de datos

Todos los valores se expresaron como la media \pm DE y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. La evaluación de las diferencias entre grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando para el análisis *post-hoc* la prueba de Tuckey. Para comparar

los valores de la presión arterial sistólica se utilizó un ANOVA bifactorial usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los resultados se presentaron en gráficos generados con el programa SigmaPlot 12.0, OriginPro 9.1.0 o GraphPad Prism 9.3.0 y el análisis estadístico se realizó con el programa OriginPro 9.1.0.

Referencias bibliográficas

- (1) Memariani, Z.; Abbas, S. Q.; ul Hassan, S. S.; Ahmadi, A.; Chabra, A. Naringin and Naringenin as Anticancer Agents and Adjuvants in Cancer Combination Therapy: Efficacy and Molecular Mechanisms of Action, a Comprehensive Narrative Review. *Pharmacol. Res.* **2021**, *171*, 105264. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105264>.
- (2) PubChem. *Naringin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442428> (accessed 2023-03-15).
- (3) Michel, M. C.; Foster, C.; Brunner, H. R.; Liu, L. A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65* (2), 809–848. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007278>.
- (4) Badea, M.; Olar, R.; Uivarosi, V.; Marinescu, D.; Aldea, V. Synthesis and Characterization of Some Vanadyl Complexes with Flavonoid Derivatives as Potential Insulin-Mimetic Agents. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *107* (1), 279–285. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1413-0>.
- (5) Andelescu, A. A.; Cretu, C.; Sasca, V.; Marinescu, S.; Cseh, L.; Costisor, O.; Szerb, E. I. New Heteroleptic Zn(II) and Cu(II) Complexes with Quercetine and N^N Ligands. *Polyhedron* **2018**, *147*, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.03.016>.
- (6) Spingler, B.; Schnidrig, S.; Todorova, T.; Wild, F. Some Thoughts about the Single Crystal Growth of Small Molecules. *CrystEngComm* **2012**, *14* (3), 751–757. <https://doi.org/10.1039/C1CE05624G>.
- (7) Nievergelt, P. P.; Spingler, B. Growing Single Crystals of Small Molecules by Thermal Recrystallization, a Viable Option Even for Minute Amounts of Material? *CrystEngComm* **2016**, *19* (1), 142–147. <https://doi.org/10.1039/C6CE02222G>.
- (8) Tung, H.-H.; Paul, E. L.; Midler, M.; McCauley, J. A. *Crystallization of Organic Compounds*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470447796>.
- (9) Davey, R. J.; Schroeder, S. L. M.; ter Horst, J. H. Nucleation of Organic Crystals—A Molecular Perspective. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (8), 2166–2179. <https://doi.org/10.1002/anie.201204824>.
- (10) Alvarez, R.; Nievergelt, P. P.; Slyshkina, E.; Müller, P.; Alberto, R.; Spingler, B. Single Crystal Growth of Water-Soluble Metal Complexes with the Help of the Nano-Crystallization Method. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (28), 9632–9640. <https://doi.org/10.1039/D0DT01236J>.
- (11) Fadeeva, V. P.; Tikhova, V. D.; Nikulicheva, O. N. Elemental Analysis of Organic Compounds with the Use of Automated CHNS Analyzers. *J. Anal. Chem.* **2008**, *63* (11), 1094–1106. <https://doi.org/10.1134/S1061934808110142>.
- (12) Onishi, H. *Photometric Determination of Traces of Metals*; New York, NY (USA); John Wiley and Sons Inc., 1989.
- (13) Wright, E. R.; Mellon, M. G. The Phosphotungstate Method for Vanadium: Spectrophotometric Study. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1937**, *9* (6), 251–254. <https://doi.org/10.1021/ac50110a001>.
- (14) Säbel, C. E.; Neureuther, J. M.; Siemann, S. A Spectrophotometric Method for the Determination of Zinc, Copper, and Cobalt Ions in Metalloproteins Using Zincon. *Anal. Biochem.* **2010**, *397* (2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.10.037>.
- (15) Wineland, D. J.; Itano, W. M.; Bergquist, J. C. Absorption Spectroscopy at the Limit: Detection of a Single Atom. *Opt. Lett.* **1987**, *12* (6), 389–391. <https://doi.org/10.1364/OL.12.000389>.
- (16) Hill, S. J.; Fisher, A. S. Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier, 2017; pp 37–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00099-6>.
- (17) Rabiei, K.; Mohammadkhani, Z.; Keypour, H.; Kouhdareh, J. Palladium Schiff Base Complex-Modified Cu(BDC-NH₂) Metal–Organic Frameworks for C–N Coupling. *RSC Adv.* **2023**, *13* (12), 8114–8129. <https://doi.org/10.1039/D3RA01020A>.
- (18) Palermo, P. J. 6 - Solid Dosage-Form Analysis. In *Separation Science and Technology*; Ahuja, S., Scypinski, S., Eds.; Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis; Academic Press, 2001; Vol. 3, pp 235–267. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(01\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(01)80008-8).
- (19) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>.

- (20) Morozzi, P.; Ballarin, B.; Arcozzi, S.; Brattich, E.; Lucarelli, F.; Nava, S.; Gómez-Cascales, P. J.; Orza, J. A. G.; Tositti, L. Ultraviolet–Visible Diffuse Reflectance Spectroscopy (UV–Vis DRS), a Rapid and Non-Destructive Analytical Tool for the Identification of Saharan Dust Events in Particulate Matter Filters. *Atmos. Environ.* **2021**, *252*, 118297. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2021.118297>.
- (21) Torrent, J.; Barrón, V. Diffuse Reflectance Spectroscopy. In *SSSA Book Series*; Ulery, A. L., Richard Drees, L., Eds.; American Society of Agronomy and Soil Science Society of America: Madison, WI, USA, 2015; pp 367–385. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.5.c13>.
- (22) Yadav, L. D. S. Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy. In *Organic Spectroscopy*; Yadav, L. D. S., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2005; pp 224–249. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2575-4_7.
- (23) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (24) Mukherjee, P.; Chakraborty, D. D.; Chakraborty, P.; Shrestha, B.; Bhuyan, N. R. Ms DIFFERENT ULTRAVIOLET SPECTROSCOPIC METHODS: A RETROSPECTIVE STUDY ON ITS APPLICATION FROM THE VIEWPOINT OF ANALYTICAL CHEMISTRY. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2021**, 1–11. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2021.v14i9.42172>.
- (25) Marcus, Y. On the Use of the Molar Ratio Method for Determining Association Stoichiometry. *Isr. J. Chem.* **1967**, *5* (4), 143–149. <https://doi.org/10.1002/ijch.196700028>.
- (26) Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (8), 2703–2707. <https://doi.org/10.1021/ja01176a030>.
- (27) Walkley, B.; Provis, J. L. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Cements. *Mater. Today Adv.* **2019**, *1*, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100007>.
- (28) Laurella, S. L. *Resonancia magnética nuclear*; Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2017. <https://doi.org/10.35537/10915/62803>.
- (29) Ali, I.; Wani, W. A.; Saleem, K. Empirical Formulae to Molecular Structures of Metal Complexes by Molar Conductance. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2013**, *43* (9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.756898>.
- (30) Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*; Wiley-VCH: Weinheim, 2011.
- (31) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Antioxidant and Anticancer Effects and Bioavailability Studies of the Flavonoid Baicalin and Its Oxidovanadium(IV) Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.005>.
- (32) Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. Fluorescence Behavior of Tryptophan Residues of Bovine and Human Serum Albumins in Ionic Surfactant Solutions: A Comparative Study of the Two and One Tryptophan(s) of Bovine and Human Albumins. *J. Protein Chem.* **1996**, *15* (3), 265–272. <https://doi.org/10.1007/BF01887115>.
- (33) Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94* (3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- (34) Trembl, J.; Šmejkal, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (4), 720–738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>.
- (35) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I. The Deoxyribose Method: A Simple “Test-Tube” Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, *165* (1), 215–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90222-3).
- (36) Naso, L. G.; Ferrer, E. G.; Butenko, N.; Cavaco, I.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. A. M. Antioxidant, DNA Cleavage, and Cellular Effects of Silibinin and a New Oxovanadium(IV)/Silibinin Complex. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (4), 653–668. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0769-8>.
- (37) Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; Terao, J. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-Scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62* (6), 1201–1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>.
- (38) Nishikimi, M.; Appaji Rao, N.; Yagi, K. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46* (2), 849–854. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3).

- (39) Huang, W.-Y.; Majumder, K.; Wu, J. Oxygen Radical Absorbance Capacity of Peptides from Egg White Protein Ovotransferrin and Their Interaction with Phytochemicals. *Food Chem.* **2010**, *123* (3), 635–641. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.083>.
- (40) Hapner, C. D.; Deuster, P.; Chen, Y. Inhibition of Oxidative Hemolysis by Quercetin, but Not Other Antioxidants. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186* (3), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.010>.
- (41) Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51* (5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>.
- (42) Kavsan, V. M.; Iershov, A. V.; Balynska, O. V. Immortalized Cells and One Oncogene in Malignant Transformation: Old Insights on New Explanation. *BMC Cell Biol.* **2011**, *12* (1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-23>.
- (43) Hayflick, L. The Establishment of a Line (WISH) of Human Amnion Cells in Continuous Cultivation. *Exp. Cell Res.* **1961**, *23* (1), 14–20. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90059-3).
- (44) *Useful Numbers for Cell Culture - AR.* <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html> (accessed 2023-04-25).
- (45) Timm, M.; Saaby, L.; Moesby, L.; Hansen, E. W. Considerations Regarding Use of Solvents in in Vitro Cell Based Assays. *Cytotechnology* **2013**, *65* (5), 887–894. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9530-6>.
- (46) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (47) Sylvester, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In *Drug Design and Discovery*; Satyanarayananjois, S. D., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 716, pp 157–168. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9.
- (48) Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- (49) Ozben, T. Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96* (9), 2181–2196. <https://doi.org/10.1002/jps.20874>.
- (50) Van Loenhout, J.; Peeters, M.; Bogaerts, A.; Smits, E.; Deben, C. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects. *Antioxidants* **2020**, *9* (12), 1188. <https://doi.org/10.3390/antiox9121188>.
- (51) McLennan, H. R.; Esposti, M. D. The Contribution of Mitochondrial Respiratory Complexes to the Production of Reactive Oxygen Species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, *32* (2), 153–162. <https://doi.org/10.1023/A:1005507913372>.
- (52) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (53) Kennedy, L.; Sandhu, J. K.; Harper, M.-E.; Cuperlovic-Culf, M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules* **2020**, *10* (10), 1429. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>.
- (54) Lv, H.; Zhen, C.; Liu, J.; Yang, P.; Hu, L.; Shang, P. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, e3150145. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>.
- (55) Hissin, P. J.; Hilf, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal. Biochem.* **1976**, *74* (1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
- (56) Chang, H.-Y.; Huang, H.-C.; Huang, T.-C.; Yang, P.-C.; Wang, Y.-C.; Juan, H.-F. Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. *BIO-Protoc.* **2013**, *3* (8). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.430>.
- (57) Olesik, J. W. Elemental Analysis Using ICP-OES and ICP/MS. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (1), 12A-21A. <https://doi.org/10.1021/ac00001a711>.
- (58) Zhu, F.-M.; Du, B.; Li, F.-Y.; Zhang, J.-C.; Li, J. Measurement and Analysis of Mineral and Heavy Metal Components in Grape Cultivars by Inductively Coupled Plasma-Optical

- Emission Spectrometer (ICP-OES). *J. Für Verbraucherschutz Leb.* **2012**, 7 (2), 137–140. <https://doi.org/10.1007/s00003-012-0770-3>.
- (59) US EPA, O. *EPA Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry.* <https://www.epa.gov/esam/epa-method-6010d-sw-846-inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectrometry> (accessed 2023-04-28).
- (60) Bollmann, E.; Schreiber, J. A.; Ritter, N.; Peischard, S.; Ho, H. T.; Wunsch, B.; Strünker, T.; Meuth, S.; Budde, T.; Strutz-Seebohm, N.; Seebohm, G. 4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-Stilbenedisulfonic Acid (DIDS) Modulates the Activity of KCNQ1/KCNE1 Channels by an Interaction with the Central Pore Region | *Cell Physiol Biochem. Cell. Physiol. Biochem.* **2020**, 54 (2), 321–332.
- (61) Wilson, M. C.; Meredith, D.; Bunnun, C.; Sessions, R. B.; Halestrap, A. P. Studies on the DIDS-Binding Site of Monocarboxylate Transporter 1 Suggest a Homology Model of the Open Conformation and a Plausible Translocation Cycle. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (30), 20011–20021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014217>.
- (62) Demeyer, A.; Fonteneau, L.; Liennard, M.; Foyer, C.; Weigel, P.; Laurent, A. D.; Lebreton, J.; Fleury, F.; Mathé-Allainmat, M. Synthesis and Biological Evaluation of DIDS Analogues as Efficient Inhibitors of RAD51 Involved in Homologous Recombination. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2023**, 87, 129261. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129261>.
- (63) Henry, R. I.; Cobbold, S. A.; Allen, R. J. W.; Khan, A.; Hayward, R.; Lehane, A. M.; Bray, P. G.; Howitt, S. M.; Biagini, G. A.; Saliba, K. J.; Kirk, K. An Acid-Loading Chloride Transport Pathway in the Intraerythrocytic Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum*. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (24), 18615–18626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120980>.
- (64) Nunes, P.; Correia, I.; Cavaco, I.; Marques, F.; Pinheiro, T.; Avecilla, F.; Pessoa, J. C. Therapeutic Potential of Vanadium Complexes with 1,10-Phenanthroline Ligands, Quo Vadis? Fate of Complexes in Cell Media and Cancer Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, 217, 111350. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111350>.
- (65) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Research Council (U.S.), Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), National Academies Press (U.S.), Eds.; National Academies Press: Washington, D.C, 2011.
- (66) Fernandes-Santos, C.; de Souza Mendonça, L.; Mandarin-de-Lacerda, C. A. Favorable Cardiac and Aortic Remodeling in Olmesartan-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Heart Vessels* **2009**, 24 (3), 219–227. <https://doi.org/10.1007/s00380-008-1104-3>.
- (67) Jones, E. F.; Harrap, S. B.; Calafiore, P.; Tonkin, A. M. Development and Validation of Echocardiography Methods for Estimating Left Ventricular Mass in Rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1992**, 19 (5), 361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1992.tb00472.x>.
- (68) Devereux, R. B.; Reichek, N. Echocardiographic Determination of Left Ventricular Mass in Man. Anatomic Validation of the Method. *Circulation* **1977**, 55 (4), 613–618. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.55.4.613>.
- (69) Mousavi, K.; Niknahad, H.; Ghalamfarsa, A.; Mohammadi, H.; Azarpira, N.; Ommati, M. M.; Heidari, R. Taurine Mitigates Cirrhosis-Associated Heart Injury through Mitochondrial-Dependent and Antioxidative Mechanisms. *Clin. Exp. Hepatol.* **2020**, 6 (3), 207–219. <https://doi.org/10.5114/ceh.2020.99513>.
- (70) Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, 95 (2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).

Capítulo III

Caracterización Físicoquímica

Tabla de contenidos

Introducción.....	126
1. Caracterización fisicoquímica del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (VONarg9).....	127
1.1. Caracterización en estado sólido	128
1.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ...	128
1.1.2. Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)	130
1.1.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	130
1.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA).....	133
1.1.5. Análisis elemental.....	134
1.2. Estudios en solución	134
1.2.1. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	134
1.2.2. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis).....	139
1.2.3. Comportamiento del ligando por variación del pH	140
1.2.4. Determinación de la relación estequiométrica	142
1.2.5. Estabilidad	143
1.3. Estructura propuesta para el compuesto VONarg9.....	144
2. Caracterización fisicoquímica del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{Cl}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (VONF.Cl).....	146
2.1. Caracterización en estado sólido	146
2.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ...	146
2.1.2. Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)	149
2.1.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	150
2.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA).....	152
2.1.5. Análisis elemental.....	152
2.2. Estudios en solución	153
2.2.1. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis).....	153

2.2.2.	Conductividad molar	154
2.2.3.	Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	155
2.3.	Estructura propuesta para el compuesto VONF.Cl	157
3.	Caracterización fisicoquímica del complejo $K_2[VO(Narg)(H_2O)_2] \cdot 3H_2O$ (VONarg12).....	160
3.1.	Caracterización en estado sólido	160
3.1.1.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ...	160
3.1.2.	Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)	162
3.1.3.	Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)	164
3.1.4.	Análisis termogravimétrico (TGA)	165
3.1.5.	Análisis elemental.....	166
3.2.	Estudios en solución	166
3.2.1.	Espectrofotometría electrónica (UV-Vis).....	166
3.2.2.	Determinación de la relación estequiométrica	168
3.2.3.	Conductividad molar	169
3.2.4.	Estabilidad	170
3.3.	Estructura propuesta para el compuesto VONarg12.....	171
4.	Caracterización fisicoquímica del complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme)	173
4.1.	Caracterización en estado sólido	173
4.1.1.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ...	173
4.1.2.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	175
4.1.3.	Análisis elemental.....	176
4.2.	Estudios en solución	176
4.2.1.	Resonancia magnética nuclear (1H -RMN y ^{13}C -RMN).....	176
4.2.2.	Determinación de la relación estequiométrica	178
4.2.3.	Estabilidad	180
4.3.	Estructura propuesta para el compuesto ZnOlme.....	181

Referencias bibliográficas 183

Capítulo III. Caracterización fisicoquímica

Introducción

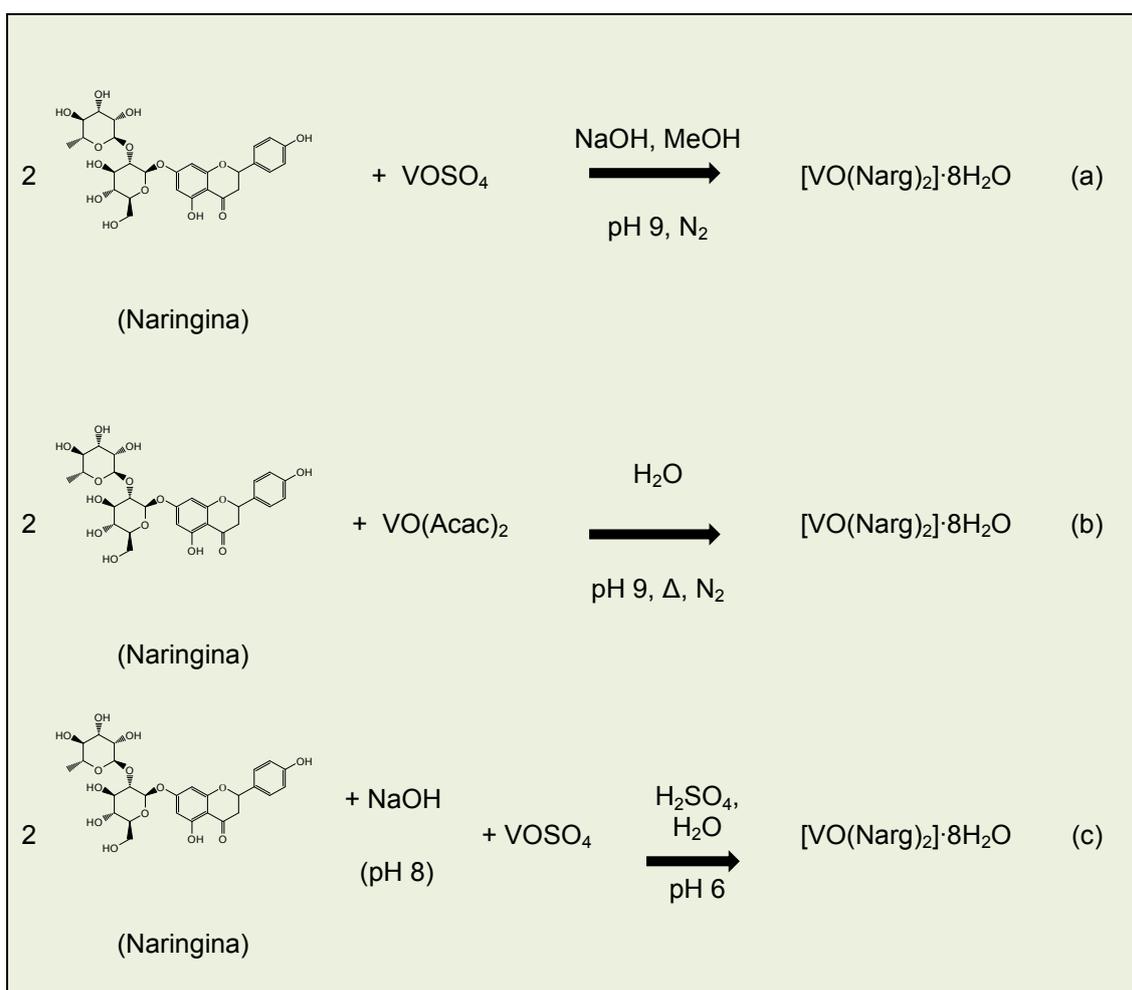
La caracterización fisicoquímica de un material resulta fundamental para comprender sus propiedades y su comportamiento. Estos análisis ofrecen información valiosa acerca de la estructura molecular del compuesto, así como su pureza, solubilidad y reactividad, entre otras características. En el caso de los compuestos de interés biológico, resulta especialmente relevante, ya que están diseñados para interactuar con sistemas vivos complejos, como células o tejidos. El estudio de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos permite establecer relaciones directas entre su estructura química y su actividad biológica o farmacológica. De esta manera, se puede determinar cómo las propiedades de un compuesto pueden influir en su capacidad de, por ejemplo, penetrar en las células, interactuar con receptores, proteínas o ácidos nucleicos y afectar la función biológica en general.

Con la intención de elucidar las estructuras de los complejos de coordinación estudiados durante esta investigación, se evaluaron algunos parámetros físicos y químicos en estado sólido y solución, tales como: propiedades térmicas, propiedades eléctricas y magnéticas, y propiedades espectrales. Para ello, se emplearon diversas técnicas, las cuales fueron descritas en el capítulo anterior. Cada una de estas técnicas proporcionó información relevante con la que se pudo determinar la composición elemental, la cantidad de moléculas de ligando unidas al centro metálico (estequiometría), el modo de coordinación, moléculas de solvatación, estabilidad, para finalmente proponer una estructura molecular de los compuestos sintetizados.

En este capítulo se discutirán los resultados de la caracterización fisicoquímica de los complejos de coordinación obtenidos durante esta investigación con los compuestos bioactivos naringina y olmesartán, y los cationes V(IV) y Zn(II), respectivamente.

1. Caracterización fisicoquímica del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (VONarg9)

Durante las pruebas para la obtención de un complejo entre el catión $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ y el flavonoide naringina, el complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ pudo obtenerse bajo dos condiciones experimentales (Esq. III-1 a y b), siendo diferentes a la reportada en la literatura (Esq. III-1 c) ¹, en cuyo caso, la caracterización del complejo en estado sólido está incompleta, y tampoco se reportó la caracterización de las especies en solución.



Esquema III-1. Reacciones simplificadas para la obtención del complejo $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

Es importante mencionar que para la caracterización fisicoquímica y los ensayos posteriores se utilizó únicamente el producto obtenido de la reacción b (Esq. III-1 b); la preparación del complejo por esta vía resultó más simple y eficiente, con respecto a (a), ya que no se utilizaron solventes orgánicos y se obtuvo un mejor rendimiento.

1.1. Caracterización en estado sólido

1.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros FTIR de naringina y VONarg9, y se compararon los modos vibracionales de los dos compuestos (Figura III-1). A partir de la comparación, se identificaron los cambios más relevantes por efecto de la complejación y/o desprotonación, y se asignaron tentativamente los modos vibracionales de los principales grupos funcionales (Tabla III-1) basado en reportes previos para sistemas $[V^{IV}O]^{2+}$ -flavonoides similares^{2,3}.

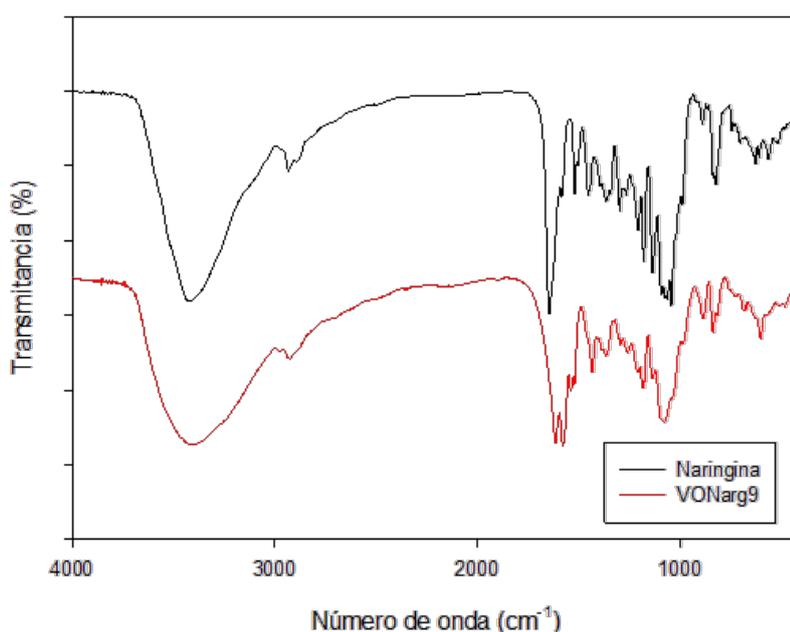


Figura III-1. Espectros FTIR de naringina (negro) y de VONarg9 (rojo).

La banda debida al estiramiento C=O a 1645 cm^{-1} se desplazó en el complejo a 1613 cm^{-1} debido a la coordinación de este grupo con el catión $[V^{IV}O]^{2+}$. Los modos que implican el estiramiento O-H y la flexión C-O-H ($1360\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) se modificaron y/o redujeron las intensidades debido a la desprotonación o coordinación del grupo C5-OH, lo que indica la interacción del catión oxidovanadio(IV) a través de estos grupos. Además, pudo notarse el estiramiento V=O a 980 cm^{-1} mostrando la coordinación típica a través de los grupos 5-C-O⁻ y 4-C=O de los anillos A y C de la naringina, respectivamente. Esta banda apareció superpuesta con la banda del ligando a 987 cm^{-1} . Los espectros de infrarrojo sugieren que el sitio de coordinación es la región 5-

hidroxipiran-4-ona en lugar de los grupos hidroxilo desprotonados del anillo B o la región glicosídica.

Tabla III-1. Asignación de los espectros FTIR de naringina y de VONarg9 (posiciones de las bandas en cm⁻¹).

Naringina	VONarg9	Modos vibracionales/grupos funcionales
3422 a	3395 a	v O-H
3231 h	3205 h	
1645 mf	1613 mf	v C=O (anillo C)
1629 h	1577 mf	v C=C
1615 h	1537 m	
1582 m		
1520 m	1520 m	v C=C
1504 m		
1355 h	1357 h	δ COH
1341 m		
1295 m	1292 d	δ HOC
1281 d	1256 d	δ HOC, v (C-O-C)
1265 d		
1134 f	1134 m	v C-O alcohol secundario
1074 mf	1076 mf	v O-C
1062 mf	1060 h	v C-O alcohol primario
1041 mf	1040 h	v O-C azúcar
987 m	987 m	v O-C
	980 m	v V=O
822 m	814 d	v C-C, v O-C

Abreviaturas de intensidades relativas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; md, muy débil; a, ancha; h, hombro; v, estiramiento; δ, flexión.

1.1.2. Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)

Los resultados de las medidas de los espectros de UV-Vis DRS para el complejo VONarg9, muestran el perfil esperado para complejos de oxidovanadio(IV) con entorno piramidal cuadrado ⁴⁻⁶ (Figura III-2). En el espectro de UV-Vis DRS del complejo pueden observarse varias bandas de absorción ubicadas en 870, 554, 394 y 324 nm. Las dos primeras se atribuyen a transiciones d-d: ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}$, $3d_{yz}$) y ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$), respectivamente. Típicamente los complejos de oxidovanadio(IV) exhiben 3 bandas de absorción debido a transiciones d-d ⁶. Sin embargo, la tercera transición esperada ($d_{xy} \rightarrow d_z^2$) no es observada ya que se encuentra solapada por las bandas de transferencia de carga entre orbitales del metal y el ligando que están ubicadas a 394 y 324 nm.

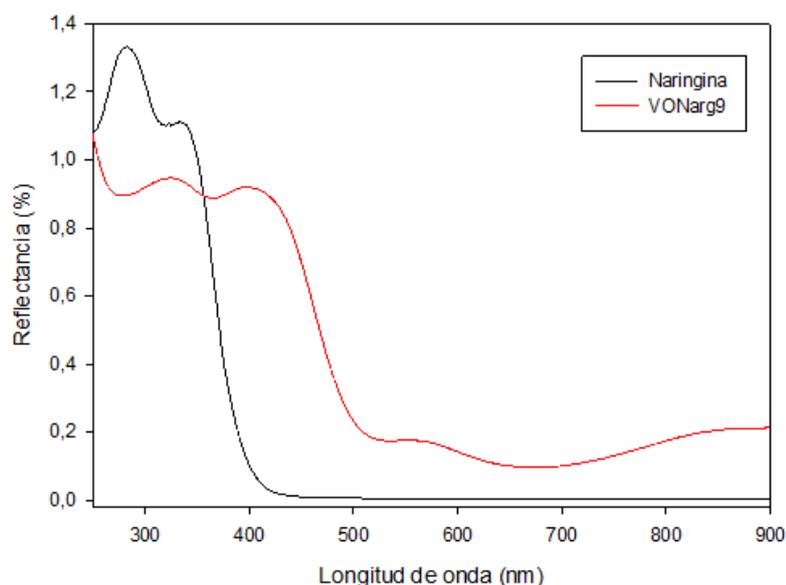


Figura III-2. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro) y VONarg9 (rojo).

1.1.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopía de EPR es una técnica que puede proporcionar amplia información sobre especies paramagnéticas, como los complejos de oxidovanadio(IV) ($3d^1$). Al medir la absorción de radiación de microondas (MO) por electrones desapareados en un campo magnético, la espectroscopía de EPR revela detalles sobre la estructura electrónica, el entorno de coordinación y varios parámetros de la muestra. Los parámetros determinados a partir de los espectros de EPR incluyen el factor de Landé, también denominado como

tensor giromagnético o valor g , que describe el momento magnético del/los electrón(es) desapareados y puede indicar el estado de spin de la molécula. En el caso de un electrón libre, este valor es 2,0023, mientras que para el catión oxidovanadio(IV) es menor, aproximadamente 1,95. Por otra parte, los estados electrónicos también se ven afectados por la interacción con el espín nuclear, lo que para el vanadio resulta en la división de los estados electrónicos en ocho diferentes estados energéticos ($2I + 1 = 8$), ya que para el catión oxidovanadio(IV) el espín nuclear (I) de ^{51}V es igual a $7/2$. Estos estados energéticos están separados por la constante de acoplamiento hiperfino, A , y dan lugar a la formación de un espectro de EPR característico de 8 líneas para el oxidovanadio(IV) ⁷.

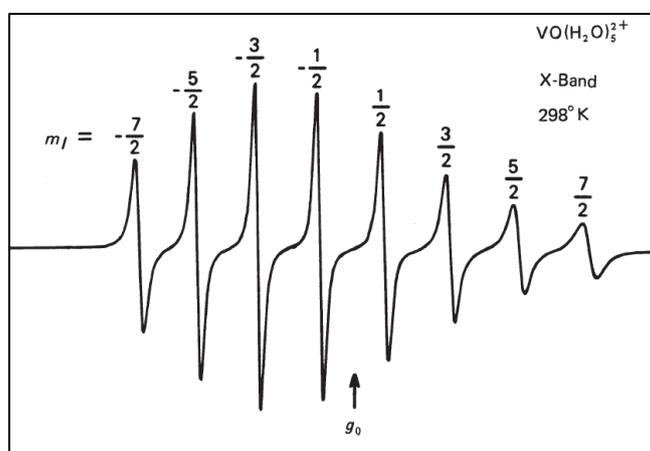


Figura III-3. Espectro de EPR en banda X del catión $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a temperatura ambiente. Tomado de Chasteen.,1981 ⁸.

Cada línea del espectro de EPR representa una transición electrónica permitida dentro del sistema y proporciona información valiosa sobre el entorno de coordinación y los parámetros del complejo. Con la magnitud de A se pueden identificar los núcleos acoplados y determinar el número de núcleos asociados con una transición de EPR. Específicamente, la componente paralela (al campo magnético aplicado) de la constante de acoplamiento hiperfino ($A_{||}$) puede correlacionarse con el tipo y número de ligandos presentes en el plano ecuatorial ⁷.

Los espectros de EPR en banda X (9,48 GHz) del complejo VONarg9 se midieron en estado sólido a dos temperaturas, 120 K (-153 °C) y 298 K (25 °C). La señal cuasi-isotrópica ($g_x \approx g_y \approx g_z$) consiste en una línea de resonancia

amplia en la que no se aprecian claramente las líneas producidas por el acoplamiento hiperfino. Esta falta de apreciación se debe a las interacciones de intercambio espín-espín entre núcleos de V^{4+} cercanos^{9,10}. Sin embargo, se pudieron detectar pequeñas señales (ver recuadro inferior Figura III-4) que mostraron una separación aproximada de 180 G (A). Además, se obtuvieron valores de g_{iso} de 3439,87 y 3438,30 G para 120 K y 298 K, respectivamente.

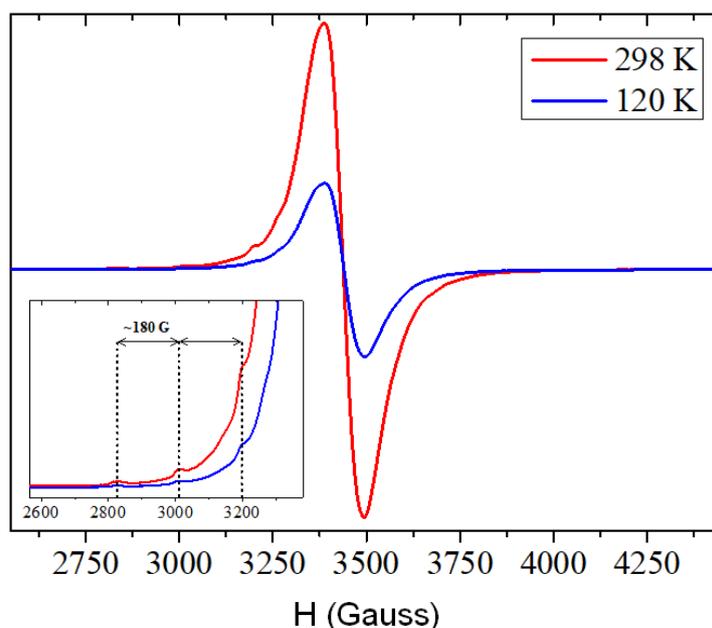


Figura III-4. Espectros de EPR en banda X de VONarg9 a 120 y 298 K.

A partir de estos valores, fue posible estimar el valor de g_{iso} en estado sólido utilizando la ecuación (1)⁷, donde h representa la constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34}$ J.s), ν es la frecuencia del campo magnético (9,48 GHz), g es el factor de Landé, μ_B es el magnetón de Bohr ($9,274 \times 10^{-28}$ J.G⁻¹) y B_0 es la intensidad del campo magnético:

$$h\nu = g\mu_B B_0 \quad (1)$$

Despejando la ecuación para g , se obtiene la siguiente expresión:

$$g = 714,4705 \text{ (GHz}^{-1}\cdot\text{G)} \times \frac{\nu \text{ (GHz)}}{B_0 \text{ (G)}} \quad (2)$$

Al sustituir los valores obtenidos gráficamente para el factor de Landé (g_{iso}) (3439,87 y 3438,30 G para 120 y 298 K) en la ecuación (2), se obtiene que g_{iso} es igual a 1,9690 y 1,9699 (~ 1.97) para 120 y 298 K, respectivamente. Estos

valores se encuentran en concordancia con un campo de ligandos casi axial o pseudoaxial, como suele observarse en los complejos de oxidovanadio(IV) debido a la fuerte interacción vanadio-oxígeno en la unidad de V=O, un comportamiento y valores de g_{iso} similares se han observado previamente para complejos de oxidovanadio(IV) con los flavonoides apigenina, naringenina y quercetina ^{2,11,12}.

Mediante el estudio de los espectros de EPR en solución a diferentes temperaturas, y sus simulaciones, que se detallan más adelante (*Apartado 2.2.1*), se obtuvo una descripción más precisa del entorno de coordinación para el complejo VONarg9.

1.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico del complejo VONarg9 arrojó resultados consistentes con hallazgos previos ¹. La descomposición térmica de VONarg9 ocurre en tres etapas bien definidas (Figura III-5). La primera pérdida de peso ocurre a una temperatura de 107 °C, correspondiente al 10,60 % de la masa y equivalente a la pérdida de 8 moléculas de agua de cristalización lábiles (% calculado = 10,51 %). Posteriormente, la especie anhidra se descompone en una segunda etapa a temperaturas superiores a 200 °C, esta pérdida de masa es asignada a la degradación oxidativa de la unidad glicosídica ¹. En la etapa final, la aglicona unida al catión se descompone hasta alcanzar una masa constante a 304 °C. La masa restante del residuo fue igual al 6,43 % de la masa inicial (% residuo calculado, $V_2O_5 = 6,64$ %). Mediante la medida del espectro de FTIR se confirmó la identidad del residuo como V_2O_5 .

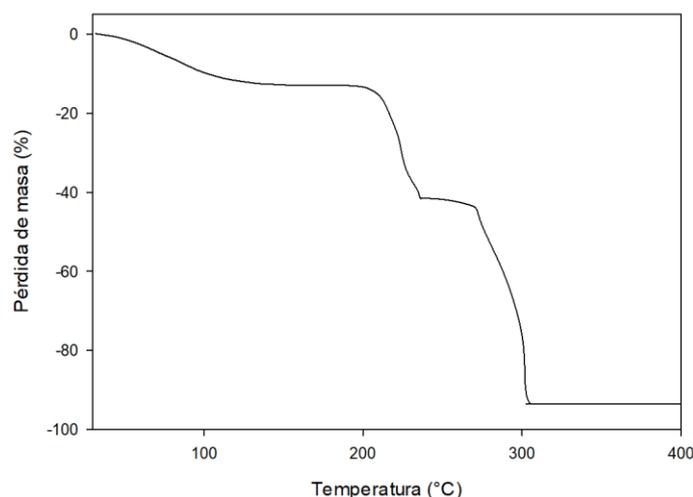


Figura III-5. Curva de calentamiento del complejo VONarg9 en atmósfera de O₂.

1.1.5. Análisis elemental

El análisis elemental para C, H y V del complejo VONarg9 mostró resultados consistentes con los porcentajes teóricos calculados a partir de la fórmula molecular propuesta, C₅₄H₇₈O₃₇V, como se muestra a continuación:

Tabla III-2. Contenido porcentual de C, H y V para el complejo VONarg9.

	C (%)	H (%)	V (%)
Experimental	47,10	5,60	3,90
Calculado	47,33	5,73	3,71

1.2. Estudios en solución

1.2.1. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR en banda X del complejo VONarg9 obtenidos a partir de soluciones congeladas (usando DMSO como solvente), medidos desde 100 a 250 K y a temperatura ambiente (298 K) mostraron un comportamiento inesperado.

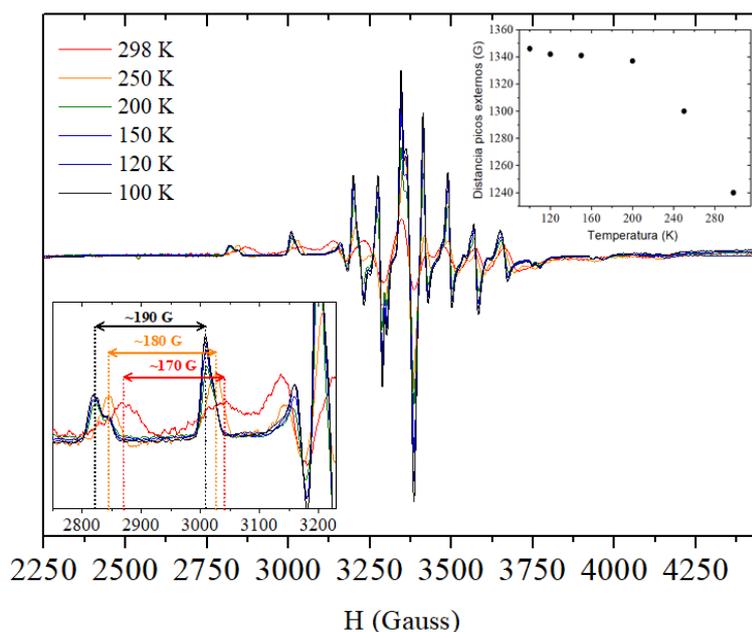


Figura III-6. Espectros de EPR en banda X de VONarg9 en DMSO desde 100 a 298 K.

El patrón característico de ocho líneas en el espectro de una solución congelada se observa a $T \geq 250$ K (Figura III-6), y a temperatura ambiente no se observa el espectro típico en solución. En cambio, se puede apreciar un espectro similar a uno medido en estado sólido de V^{4+} anisotrópico. También, es importante resaltar que desde 200 hasta 298 K, el valor de A_{\parallel} disminuye (recuadro inferior izquierdo de la Figura III-6). Sin embargo, por debajo de los 200 K, hasta 100 K, A_{\parallel} no sufrió cambios. Por otra parte, el espectro está compuesto por dos especies (etiquetadas como S1 y S2) con diferentes contribuciones (1:0,2).

Con el fin de realizar un análisis exhaustivo de los espectros se calcularon los parámetros del Hamiltoniano de espín (Tabla III-3) obtenidos a partir de simulaciones con el software *EasySpin* 5.2.3 ¹³.

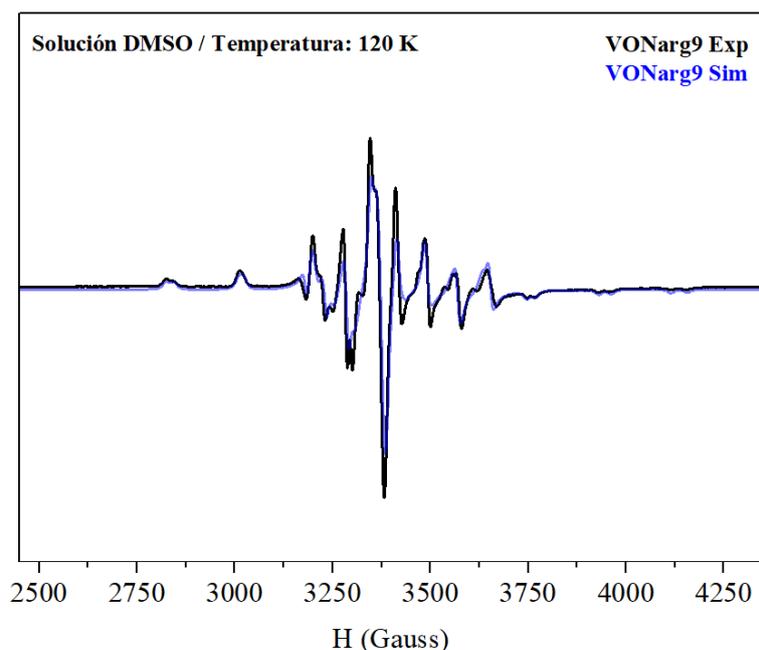


Figura III-7. Espectros de EPR de VONarg9 simulado (azul) y experimental (negro) en DMSO a 120 K.

Tanto a 250 K como a 120 K (para S1 y S2), se cumple que $g_{\parallel} < g_{\perp} < g_e = 2,0023$ y $|A_{\parallel}| > |A_{\perp}|$, lo que indica una geometría octaédrica con compresión tetragonal y un estado fundamental d_{xy} , además, la relación $\Delta g_{\parallel}/\Delta g_{\perp}$ también indica una considerable distorsión tetragonal⁸.

Tabla III-3. Parámetros del Hamiltoniano de espín obtenidos a partir de simulaciones para VONarg9.

T (K)	g_{\parallel}	g_{\perp}	$*A_{\parallel}$	$*A_{\perp}$	$\Delta g_{\parallel}/\Delta g_{\perp}$	$*P$	k	$*P \times k$	
250	1,9355	1,9702	160,8	63,9	2,08	114,1	0,76	86,4	
120	S1	1,9332	1,9717	167,0	62,8	2,26	121,8	0,72	87,3
	S2	1,9398	1,9751	159,4	51,6	2,30	125,8	0,62	78,2

*A, P y $P \times k$ se expresan en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Por otra parte, para determinar la identidad de los ligandos ecuatoriales en complejos de V(IV) (con una precisión de $\pm 3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) se emplea la regla de aditividad descrita por Chasteen⁸. Para ello, es necesario estimar de antemano el entorno probable de coordinación y su contribución a la constante de acoplamiento hiperfino, estos parámetros pueden ser obtenidos de la literatura^{7,14}. Posteriormente, el aporte a la constante de acoplamiento

hiperfino estimada se compara con los parámetros obtenidos a partir de la simulación, los resultados experimentales, y se evalúa su concordancia.

Para diferentes composiciones de ligandos, la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino, A_{\parallel} , puede estimarse al emplear la siguiente ecuación: $A_{\parallel} = \sum(n_i \cdot A_{\parallel,i})$. En ella, n_i representa el número de ligandos ecuatoriales de tipo i , mientras que $A_{\parallel,i}$ corresponde a la contribución al acoplamiento hiperfino paralelo de cada uno de ellos ⁸.

Considerando las contribuciones a la constante de acoplamiento hiperfino paralelo de los modos de coordinación más probables para la naringina ($\text{CO} = 44,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $\text{ArO}^- = 38,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) ^{12,14,15}, al emplear la regla de aditividad mencionada previamente, el resultado ($A_{\parallel} = 166,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), es consistente con el valor de A_{\parallel} obtenido a partir de la simulación para la especie S1 (Tabla III-3) y se encuentra en concordancia con la estructura propuesta con 2 grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y 2 grupos arilo (ArO^-) en el plano ecuatorial, sin embargo, no se puede descartar la posible presencia de una molécula de DMSO en posición axial.

Asimismo, el valor estimado de A_{\parallel} a partir de las simulaciones para la especie S2 muestra un valor ligeramente más bajo, lo que puede deberse a la presencia de una molécula de DMSO en el plano ecuatorial. Estos cambios han sido reportados en espectros de EPR de otros complejos con esferas de coordinación $\text{VO}(\text{O}_4)$ de derivados de pirona y piridinona ¹⁶.

Por otro lado, el cambio del valor de A_{\parallel} con la temperatura no es inusual, ya que se ha observado en otros compuestos de oxidovanadio(IV) ¹⁷. El recuadro superior a la derecha de la figura III-6, muestra cómo cambia la separación entre los picos más externos del componente paralelo en función de la temperatura. Es notable que cuando A_{\parallel} se mantiene constante (100 – 200 K), se pueden observar dos especies (S1 y S2) (Figura III-8). El recuadro de la figura III-8 muestra los espectros simulados de dichas especies.

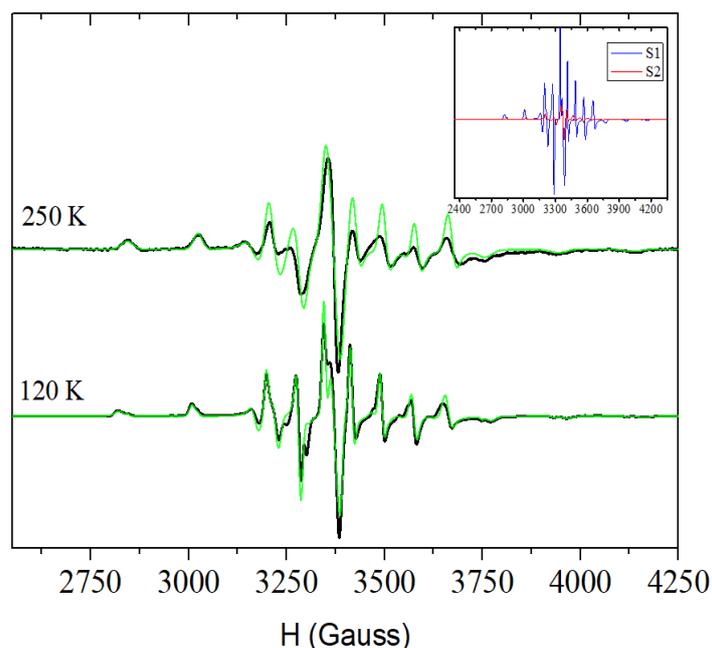


Figura III-8. Espectros de EPR experimentales (negro) y simulados (verde) de soluciones congeladas en DMSO a 250 y 120 K para VONarg9. El recuadro muestra los espectros simulados para las especies S1 (azul) y S2 (rojo) a 120 K.

Por último, se calculó el parámetro de acoplamiento hiperfino dipolar (P), que representa la interacción dipolo-dipolo entre los momentos electrónicos y nucleares, empleando las siguientes ecuaciones ¹⁸:

$$A_{\parallel} = -P \left[k + \frac{4}{7} - \Delta g_{\parallel} - \frac{3}{7} \Delta g_{\perp} \right] \quad (3)$$

$$A_{\perp} = -P \left[k - \frac{2}{7} - \frac{11}{4} \Delta g_{\perp} \right] \quad (4)$$

Los valores de P en compuestos de oxidovanadio(IV) varían entre 100 y 160 ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) ¹⁹. Estos valores se calculan mediante la fórmula $P = g_e g_N \mu_B \mu_N \langle r^{-3} \rangle$, donde g_N es el factor-g nuclear, g_e es el factor-g del electrón libre, μ_N es el magnetón nuclear y $\langle r^{-3} \rangle$ se puede calcular para los orbitales 3d del vanadio ²⁰. El parámetro k es la constante adimensional de interacción de contacto de Fermi, sus valores oscilan entre 0,6 y 0,9. Este parámetro es altamente sensible a las deformaciones de los orbitales del ion metálico y muestra la contribución isotrópica de contacto de Fermi al acoplamiento hiperfino ²¹.

Para el complejo VONarg9, los valores calculados de P son de 114-126 $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (Tabla III-3). Estos valores son considerablemente menores en

comparación con el valor del ion libre V^{4+} ($160 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)^{20,22}, lo que indica una cantidad considerable de enlace covalente en el complejo. Por otro lado, los valores de k para el complejo VONarg9 (0,62 - 0,76) indican una contribución moderada a la constante de acoplamiento hiperfino por parte del electrón s no apareado. La señal registrada a 250 K muestra valores de P y k que indican una alta presencia de enlace covalente y una contribución significativa a la constante de acoplamiento hiperfino por parte del electrón s no apareado, y posiblemente una contribución adicional de polarización de espín²³.

1.2.2. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis)

El espectro UV-Vis del complejo VONarg9 0,01 M, a pH 9 en DMSO (Figura III-9), exhibe dos bandas localizadas a 598 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$, $\epsilon = 50,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 810 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$, $\epsilon = 60,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El espectro mostró diferencias con respecto al registrado en estado sólido por reflectancia difusa (UV-Vis DRS), lo que sugiere cambios en la esfera de coordinación del complejo luego de la disolución, debido a la presencia de una molécula de DMSO, como se pudo determinar a partir de las medidas de EPR en solución (*Apartado 1.2.1*).

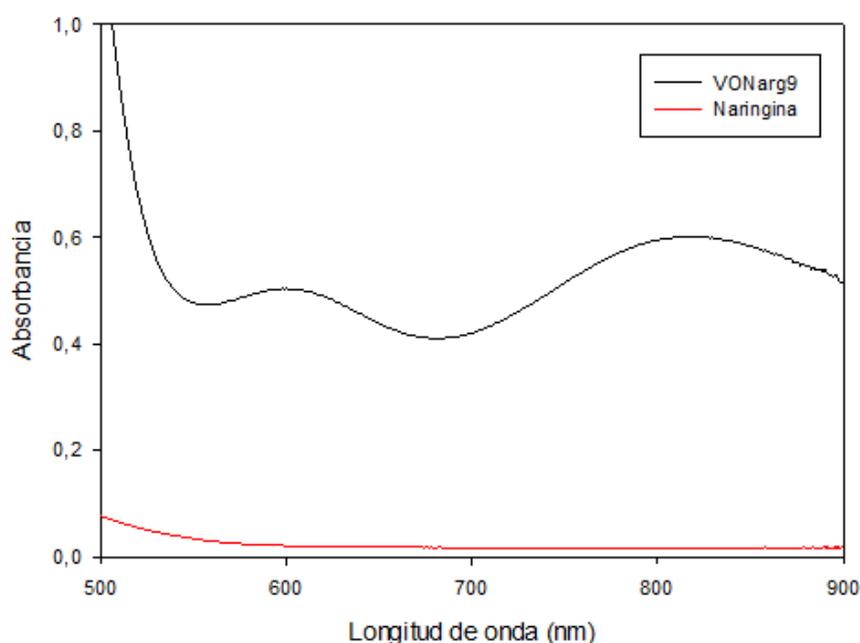


Figura III-9. Espectros electrónicos de naringina (rojo) y VONarg9 (negro) en DMSO, pH 9 (región del visible).

1.2.3. Comportamiento del ligando por variación del pH

En general, las variaciones espectrales mostraron los procesos de desprotonación de la naringina en función del pH, en un primer momento estas medidas permitieron la selección de las condiciones experimentales para la síntesis y estudio del complejo VONarg9.

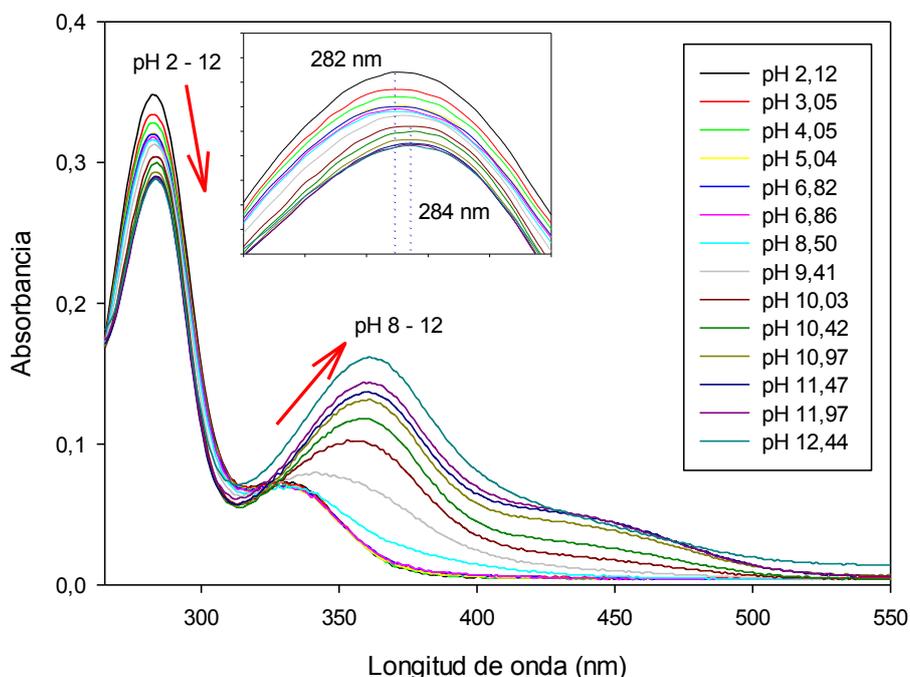


Figura III-10. Espectros electrónicos de naringina (2×10^{-5} M) por variación del pH.

A partir de soluciones acuosas de naringina con una concentración de 2×10^{-5} M, se registraron los cambios espectrales producidos por la variación del pH (Figura III-10), los espectros mostraron dos bandas características de los flavonoides. En general, una de ellas tiene su máximo de absorción en el rango de 240 - 285 nm, suele denominarse como banda II y está asociada a las transiciones electrónicas del anillo A, benzoílo, $n \rightarrow \pi^*$. La otra banda, tiene su máximo de absorción en el rango de 300 - 400 nm, y se denomina como banda I, está relacionada con las transiciones electrónicas del anillo B, cinamoílo, $\pi \rightarrow \pi^*$ ²⁴.

Tabla III-4. Máximos de absorción para las bandas I y II de naringina en función del pH.

pH	Máximo de absorción Banda II (nm)	Máximo de absorción Banda I (nm)
2,12	282	328
3,05	282	328
4,05	282	328
5,04	282	328
6,86	282	328
8,5	282	333
9,41	283	341
10,03	284	353
10,97	284	361
11,97	284	361

A partir de los espectros se puede apreciar como el aumento del pH ocasiona un desplazamiento de los máximos de absorción de ambas bandas a mayores longitudes de onda (desplazamiento batocrómico) y la aparición de una banda en 430 nm lo que indica la desprotonación de los grupos hidroxilo unidos a los anillos A y B en posición C5 y C4', respectivamente. Sin embargo, el máximo de absorción de la banda II se mantiene constante entre pH 2 – 9 (282 nm) y muestra una disminución en su valor de absorbancia, indicando que en este rango se produce la desprotonación del grupo C5-OH. No obstante, para valores superiores de pH, el máximo de absorción de esta banda se desplaza y se mantiene en 284 nm sin sufrir cambios significativos en su valor de absorbancia, indicando que este grupo funcional se encuentra completamente desprotonado. De manera similar, el máximo de absorción de la banda I se modifica a partir de pH 8,5 hasta alcanzar pH 11 indicando la completa desprotonación del grupo funcional C4'-OH (Tabla III-4).

A partir de los resultados de estas medidas se seleccionó un valor de pH = 9 para realizar posteriores ensayos, ya que de esta manera se favorece una mayor interacción del catión $[V^{IV}O]^{2+}$ a través del grupo C5-O⁻, y la formación

de un quelato con el grupo C4=O, a la vez que disminuye la posibilidad de interacción con el grupo C4'-OH.

1.2.4. Determinación de la relación estequiométrica

Con el fin de establecer la estequiometría del complejo que se forma en solución, se empleó el método de la razón molar ²⁵. Para la determinación, se registraron los espectros electrónicos de diferentes soluciones en DMSO de naringina (2×10^{-2} M) con cloruro de oxidovanadio(IV) en relaciones molares de ligando a metal que variaron desde 10 a 0,5 (pH 9) (Figura III-11).

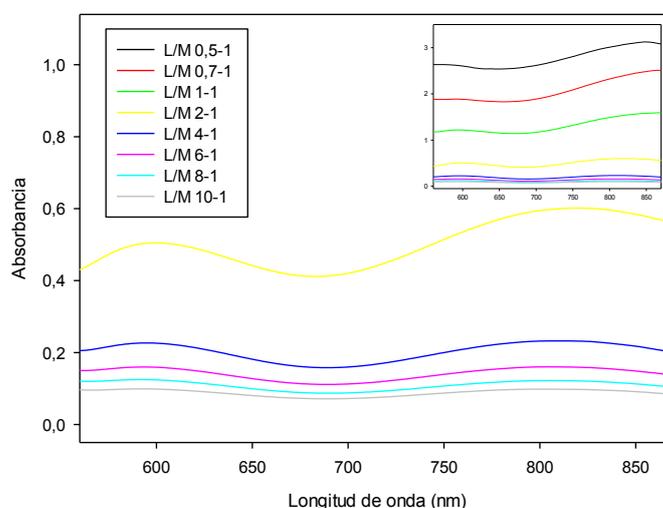


Figura III-11. Espectros electrónicos de naringina (0,02 M) con VO(IV) a diferentes relaciones L/M en DMSO a pH 9.

Se monitoreó la absorbancia de la banda a 810 nm para cada relación molar, y a partir de los datos obtenidos se determinó una estequiometría ligando a metal de 2:1 (Figura III-12).

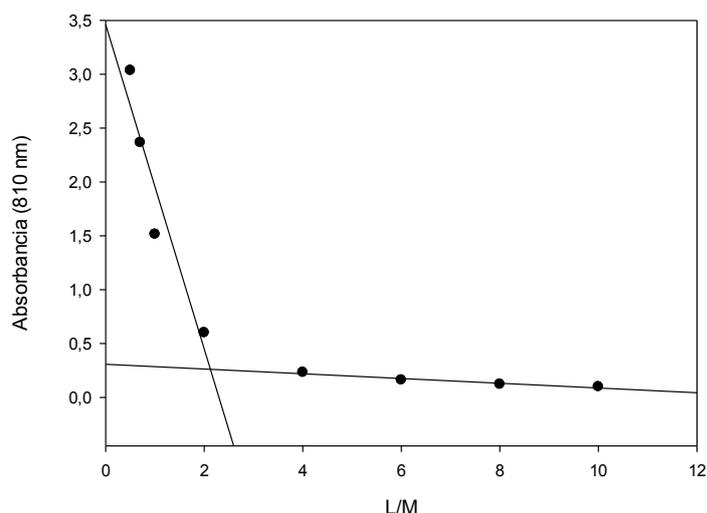


Figura III-12. Titulación espectrofotométrica de naringina con VO(IV) en DMSO a pH 9.

1.2.5. Estabilidad

La estabilidad en solución del complejo VONarg9 se evaluó al medir su espectro UV-Vis en función del tiempo a una concentración de 0,015 M, y la conductividad molar a una concentración de 1×10^{-3} M. Los cambios en las características espectrales o en la conductividad pueden indicar que la especie en solución es similar a la hallada en estado sólido o bien que se está descomponiendo, disociando o interactuando con el entorno.

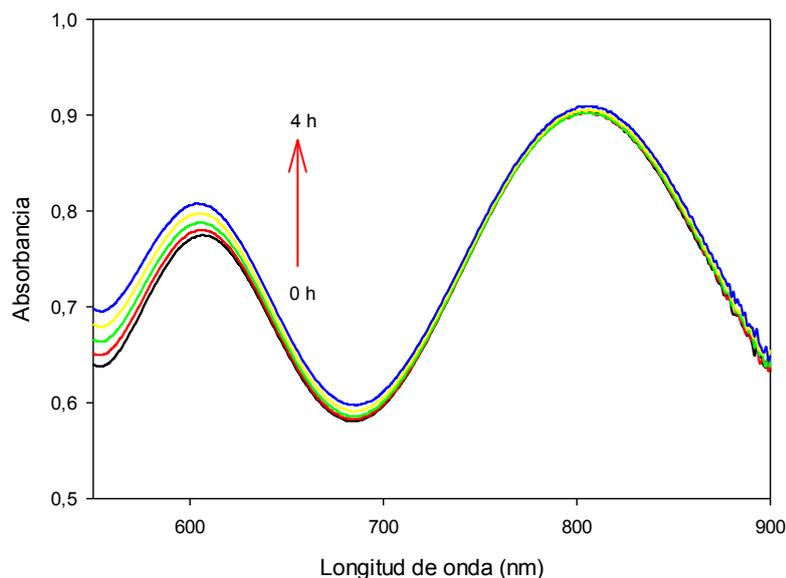


Figura III-13. Variación de los espectros electrónicos de VONarg9 (0,015 M) en función del tiempo (DMSO).

A partir de las mediciones de los espectros electrónicos en DMSO durante 4 horas (Figura III-13), no se detectaron variaciones significativas en las características espectrales del complejo que indicaran cambios estructurales. Del mismo modo, la conductividad del complejo VONarg9 en DMSO, a una concentración de 1×10^{-3} M, se mantuvo constante en $0 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ durante 24 horas, lo cual sugiere que el complejo no se comporta como un electrolito. Estos resultados permiten concluir que el complejo VONarg9 es lo suficientemente estable en una solución con DMSO durante un período adecuado para su manipulación y evaluación de sus propiedades biológicas.

1.3. Estructura propuesta para el compuesto VONarg9

La caracterización fisicoquímica del complejo de coordinación obtenido a partir de naringina y el catión oxidovanadio(IV), denominado como VONarg9, reveló que el ligando naringina muestra un modo de coordinación tipo acetilacetato, coordinando con dos moléculas de naringina que actúan como ligando bidentado, a través de los grupos 5-hidroxi desprotonado y 4-carbonilo de los anillos A y C, respectivamente (FTIR). También, se pudo estimar que el centro de V=O se encuentra en un entorno de coordinación piramidal cuadrado (UV-Vis) ⁵. Estos resultados se confirmaron mediante espectroscopía paramagnética electrónica, donde el factor-g estimado del espectro cuasi-isotrópico, fue similar al factor-g de complejos de oxidovanadio(IV) con flavonoides que presentan el mismo tipo de coordinación ^{2,11,12}. Por otro lado, se estimó la cantidad de moléculas de agua de cristalización, lo cual concordó con estudios previos ¹. Finalmente, el análisis elemental de C, H y V confirmó la estructura propuesta en estado sólido: $[\text{VO}(\text{Narg})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Figura III-14).

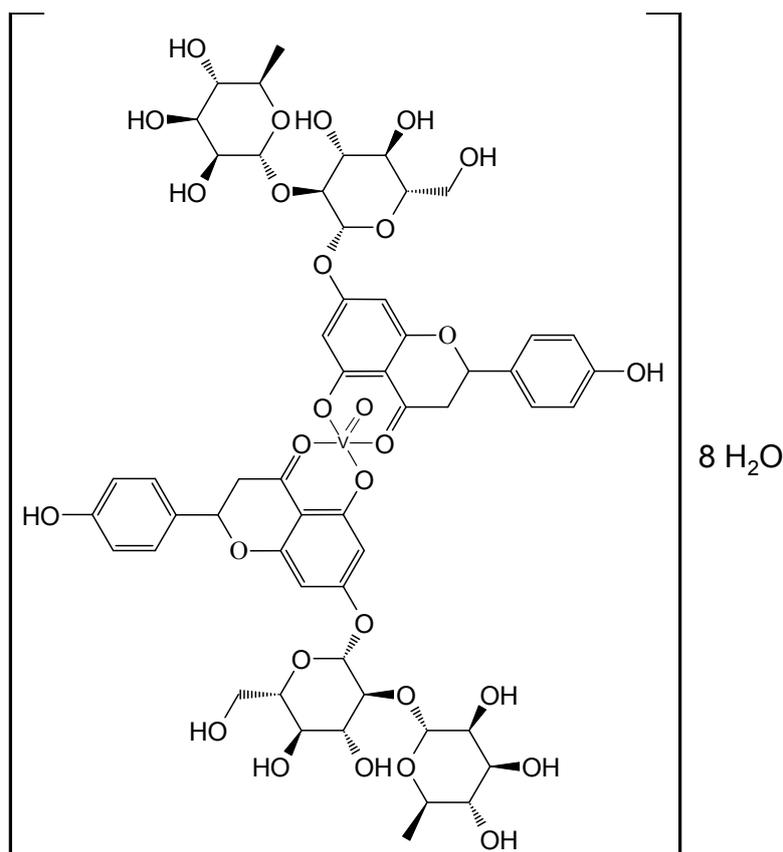
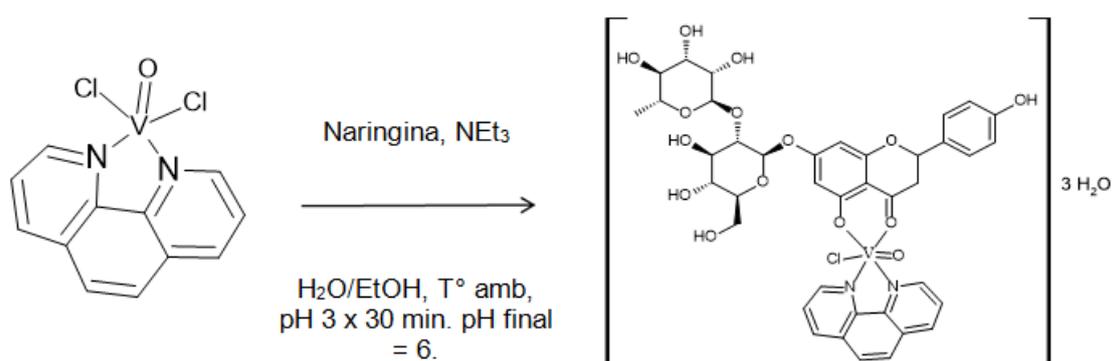


Figura III-14. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONarg9.

Por otra parte, las medidas en solución indicaron que la identidad del complejo en DMSO se mantiene con una relación (Nar)/(VO(IV)) 2/1 y geometría octaédrica con distorsión tetragonal, pero, añadiendo a su estructura una molécula de solvente en posición *-trans* (83,3 %) y posición *-cis* (16,6 %), dando lugar a las especies etiquetadas como S1 y S2, respectivamente (EPR en solución). Del mismo modo, el cambio de la esfera de coordinación se evidenció por la modificación del máximo de absorción de las bandas relacionadas con las transiciones ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}$, $3d_{yz}$) y ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$) en el espectro electrónico en solución con respecto al registrado en estado sólido. Por último, el complejo muestra un comportamiento de no electrolito, que se mantiene inalterado por al menos 24 h, del mismo modo, las características espectrales se mantienen, lo que facilita su manejo para la determinación de propiedades biológicas.

2. Caracterización fisicoquímica del complejo [VO(Narg)(Fen)Cl]·3H₂O (VONF.Cl)

Como se mencionó en el capítulo anterior, el complejo VONF.Cl se sintetizó al reemplazar uno de los ligandos naringina, por fenantrolina. La 1,10-fenantrolina posee diversas propiedades estructurales y químicas atractivas, tales como rigidez, aromaticidad, basicidad, capacidad quelante y planaridad ²⁶. Estas características convierten a la fenantrolina en un ligando interesante para la modificación estructural del complejo VONarg9, y en general, para la modificación estructural de complejos de coordinación con potencial anticancerígeno. Se ha demostrado que su estructura plana puede inducir la intercalación o la unión en surco (*groove binding*) con el ADN o el ARN ²⁷. Además, confiere una mayor lipofilidad a la estructura, lo cual favorece el transporte a través de las membranas plasmáticas mejorando la actividad anticancerígena del sistema V^{IV}O-naringina ^{28,29}.



Esquema III-2. Síntesis del complejo VONF.Cl y su estructura propuesta en estado sólido.

2.1. Caracterización en estado sólido

2.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR del complejo VONF.Cl se comparó con los espectros de los ligandos libres naringina, 1,10-fenantrolina y el complejo VONarg9 (Figura III-15), a partir de estas comparaciones se identificaron los cambios más relevantes y se asignaron tentativamente los modos vibracionales de los principales grupos funcionales (Tabla III-5) considerando reportes previos para sistemas [V^{IV}O]²⁺-flavonoides similares ^{2,3,30}.

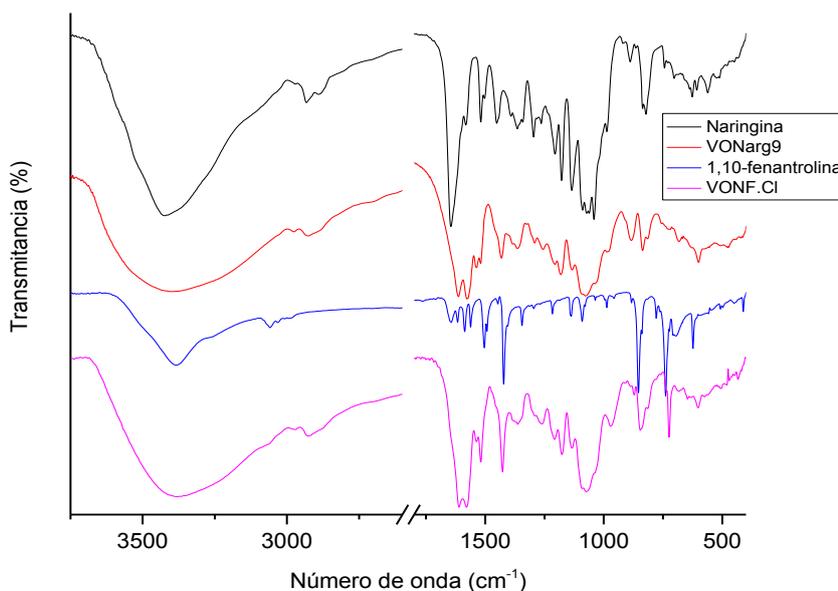


Figura III-15. Espectros FTIR de naringina (negro), VONarg9 (rojo), 1,10-fenantrolina (azul) y VONF.CI (rosa).

En el rango de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ se observa en todos los espectros, una banda de estiramiento O-H debido a los grupos alifáticos (R-OH) así como a los grupos aromáticos (Ar-OH) de la naringina la que también puede atribuirse a las moléculas de agua de cristalización (fenantrolina monohidratada). A 1645 cm^{-1} se encuentra la banda de estiramiento C=O, correspondiente al grupo carbonilo en el carbono 4 del anillo C de la naringina. Para el complejo VONarg9 y VONF.CI puede notarse el desplazamiento de esta banda a menor número de onda, además, los modos que implican el estiramiento O-H y la flexión C-O-H ($1360\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) también se modificaron debido a la coordinación del grupo C5-OH del anillo A, lo que indica la interacción del catión oxidovanadio(IV) a través de estos grupos funcionales en ambos complejos. Por otro lado, en 1041 cm^{-1} se observa una banda asociada al estiramiento C-O de la región glicosídica. Esta banda no se modificó para ninguno de los complejos, lo que indica que los átomos de oxígeno del azúcar no participan en la coordinación con el centro metálico. Además, en el espectro de VONF.CI pueden observarse las bandas características de la fenantrolina a 848 cm^{-1} y 725 cm^{-1} , atribuidas a flexiones fuera del plano de los enlaces C-H de los anillos aromáticos. Puede notarse que en el ligando libre, las bandas aparecen a mayores números de onda (852 cm^{-1} y 738 cm^{-1}) indicando la interacción de la fenantrolina con el centro metálico.

Tabla III-5. Asignación de los espectros FTIR de naringina, VONarg9 y VONF.CI (posiciones de las bandas en cm^{-1}).

Naringina	VONarg9	VONF.CI	Modos Vibracionales/Grupos Funcionales
3422 a 3231 h	3395 a 3205 h	3389 a 3216 h	ν O-H
1645 mf 1629 h 1615 h	1613 mf 1574 mf	1612 mf	ν C=O anillo C, ν C=C
1582 m	1537 m	1579 mf 1535 m	ν C=C
1520 m 1504 m	1520 m	1520 m	ν C=C
1355 h 1341 m	1357 h	1361 d	δ COH
1295 m	1292 d	1291 d	δ HOC
1281 d 1265 d	1256 d	1260 d	δ HOC, ν (C-O-C)
1134 f	1134 m	1135 m	ν C-O alcohol secundario
1074 mf	1076 mf	1074 mf	ν O-C
1062 mf	1060 h		ν C-O alcohol primario
1041 mf	1040 h	1039 h	ν O-C azúcar
987 m	987 m	987 sh	ν O-C
	980 m	972 m	ν V=O
		848 m	δ (torsión) Ar-H Fenantrolina
822 m	814 d	814 d	ν C-C, ν O-C
		725 m	δ (aleteo) Ar-H Fenantrolina

Abreviaturas de intensidades relativas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; md, muy débil; a, ancha; h, hombro; ν , estiramiento; δ , flexión.

Por último, la banda de estiramiento del grupo V=O para el complejo VONarg9 (980 cm^{-1}) se ve superpuesta con una banda de tensión O-C de la naringina que aparece a 987 cm^{-1} . Para VONF.CI esta banda puede verse a 971 cm^{-1} , donde el desplazamiento a menores números de onda (menor energía) con respecto a VONarg9, indica un alargamiento del enlace V=O y una disminución del orden de enlace. Esto se debe a una mayor inducción de carga por parte de la 1,10-fenantrolina (donante N-N), que es un mejor donante π que la naringina (donante O-O) ocasionando deslocalización π en el enlace V=O ⁶. (Figura III-16).

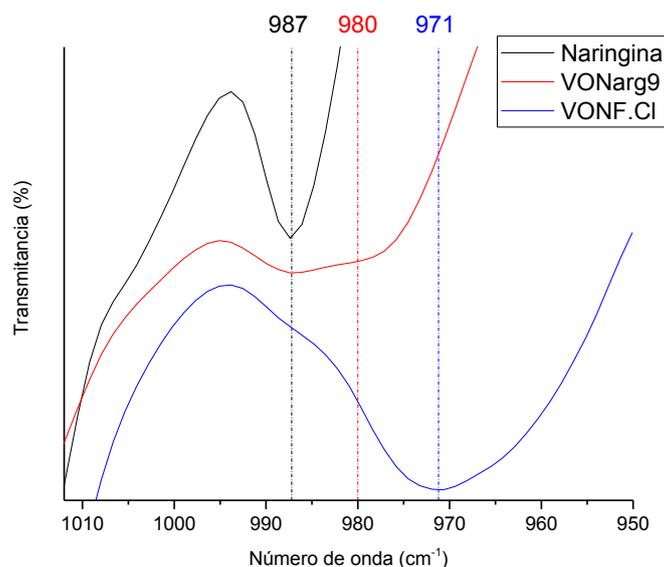


Figura III-16. Espectros FTIR de naringina (negro), VONarg9 (rojo) y VONF.CI (azul) en la zona $\nu V=O$.

2.1.2. Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)

El espectro UV-Vis DRS para el complejo VONF.CI muestra varias bandas centradas en 277, 320 (hombro), 384, y 825 nm (Figura III-17), las asignaciones realizadas para las transiciones electrónicas se muestran en la tabla III-6.

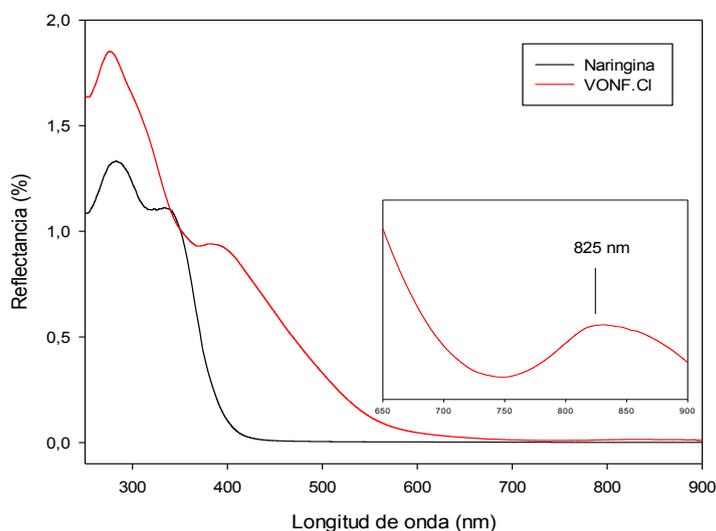


Figura III-17. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro) y VONF.CI (rojo). Recuadro interior: Zona ampliada del espectro entre 600 nm y 900 nm.

Debido a la alta absorción del ligando observada en la zona de mayor energía, que se extiende hasta aproximadamente 600 nm, las bandas ocasionadas por

las transiciones electrónicas entre los orbitales d se encuentran solapadas, imposibilitando su observación, excepto por la banda a 825 nm, que se atribuye a la transición $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$. La disminución en el máximo de absorción de esta banda con respecto al complejo VONarg9 (870 nm), demuestra el cambio en la esfera de coordinación de un ligando naringina, por un ligando fenantrolina, ya que el desplazamiento a menores longitudes de onda (*blue shift*), correspondiente a un aumento en la energía de la transición electrónica, indica un mayor desdoblamiento del campo cristalino en el complejo VONF.Cl, debido a una mayor fuerza del campo ligante por parte del ligando fenantrolina (donante N-N) con respecto al ligando naringina (donante O-O), produciendo un mayor desdoblamiento del campo cristalino ³¹.

Tabla III-6. Asignación de las transiciones electrónicas en los espectros de UV-Vis DRS para Naringina, VONarg9 y VONF.Cl.

Naringina	VONarg9	VONF.Cl	Asignación
280 nm 341 nm	-	277 nm	Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$
-	324 nm	320 nm (h)	Transferencia de carga
-	394 nm	384 nm	Transferencia de carga
-	554 nm	-	$3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$
-	870 nm	825 nm	$3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$

2.1.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR en banda X del complejo VONF.Cl se midieron en estado sólido a dos temperaturas: 120 K y 298 K. Sin embargo el espectro obtenido a 298 K no presentó diferencias notables en comparación con el espectro a 120 K (gráfico no incluido). El espectro obtenido fue comparado con el espectro simulado bajo las mismas condiciones experimentales (Figura III-18). Como se mencionó previamente, el espín nuclear para el ^{51}V es igual a $7/2$, lo que da lugar a la división de los estados electrónicos en 8 estados energéticos diferentes, reflejados en el número de picos en la señal. El espectro muestra una señal característica producida por el acoplamiento hiperfino, debido a la interacción magnética entre el espín del electrón no apareado ($3d^1$) y el espín nuclear, contrario a lo que pudo observarse para el complejo VONarg9.

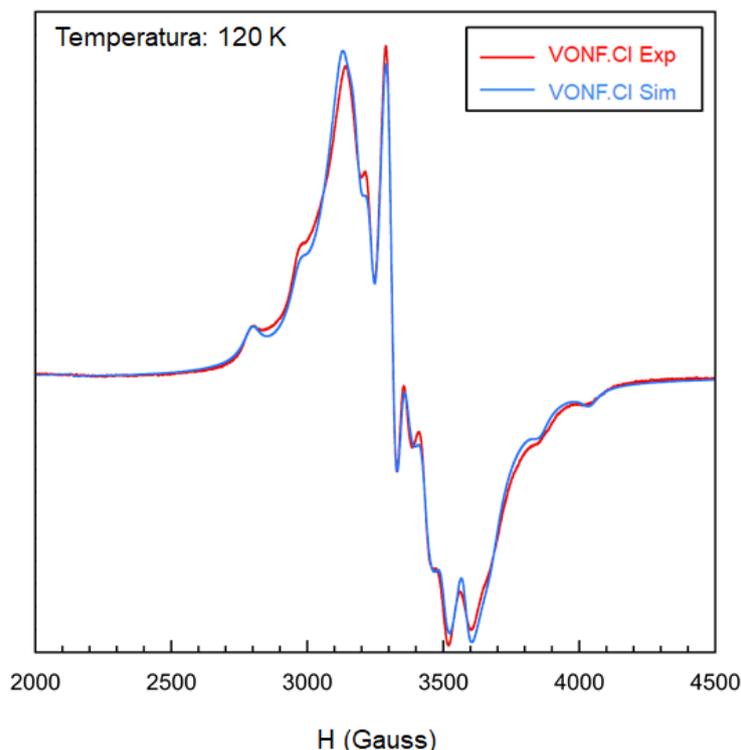


Figura III-18. Espectros de EPR en banda X de VONF.Cl experimental (rojo) y simulado (azul) a 120 K.

Los parámetros obtenidos a partir de la simulación para el complejo VONF.Cl en estado sólido fueron $A_{||} = 161 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_{||} = 1,946$, $A_{\perp} = 57 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_{\perp} = 1,975$ y son consistentes con un ion de oxidovanadio(IV) en un campo de ligandos pseudoaxial⁸. Del mismo modo, se cumple que $g_{||} < g_{\perp} < g_e = 2,0023$ y $|A_{||}| > |A_{\perp}|$, lo que indica una geometría octaédrica con compresión tetragonal y un estado fundamental d_{xy} , como pudo observarse a partir de las medidas en solución para el complejo VONarg9 (*Apartado 1.2.1*).

Por otra parte, la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino, $A_{||}$, se calculó de acuerdo a la regla de aditividad descrita anteriormente⁸, se consideraron las contribuciones de los siguientes grupos funcionales: C=O ($44,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), ArO^- ($38,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)¹² y N-fen (x2) ($2 \times 40,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)³², obteniéndose un resultado de $A_{||}$ igual a $164,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, que es consistente con el valor obtenido a partir de la simulación, por lo que se puede concluir que el complejo en estado sólido presenta una esfera de coordinación en el plano ecuatorial de 2N, 2O.

2.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir de la curva de calentamiento del complejo VONF.Cl (Figura III-19), se identificó una primera etapa de descomposición correspondiente a la reducción de 6 % de masa a 108 °C, atribuida a la pérdida de tres moléculas de agua de cristalización lábiles (% calculado = 5,9 %). Después de las posteriores etapas de descomposición, la masa del residuo fue del 9,8 % de la masa inicial, el cual fue identificado como V_2O_5 por espectroscopía FTIR (% residuo calculado = 9,9 %).

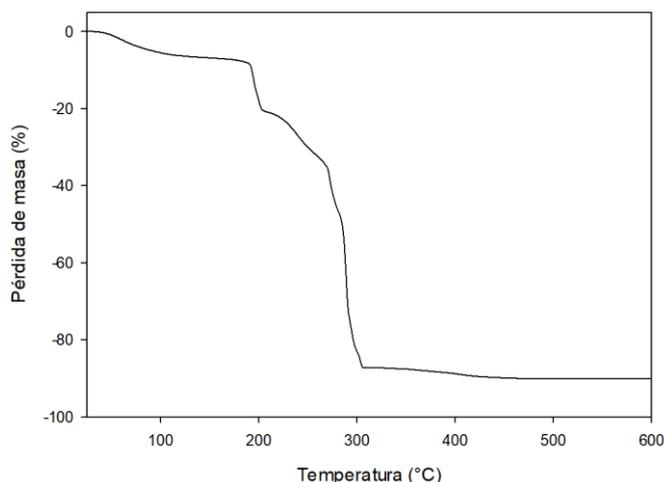


Figura III-19. Curva de calentamiento del complejo VONF.Cl en atmósfera de O_2 .

2.1.5. Análisis elemental

El análisis elemental para C, H, N y V del complejo VONF.Cl mostró resultados consistentes con los porcentajes teóricos calculados a partir de la fórmula molecular propuesta, $C_{39}H_{45}O_{18}N_2VCl$, como se muestra a continuación:

Tabla III-7. Contenido porcentual de C, H, N y V para el complejo VONF.Cl.

	C (%)	H (%)	N (%)	V (%)
Experimental	51,3	5,0	3,1	5,9
Calculado	51,1	4,9	3,1	5,6

2.2. Estudios en solución

2.2.1. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis)

El espectro electrónico del complejo VONF.Cl (2×10^{-3} M) en DMSO mostró una banda a 769 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$, $\epsilon = 57 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que se asigna a transiciones electrónicas entre los orbitales d. Se pudo notar que en solución acuosa (DMSO 1 % v/v) el máximo de absorción de esta banda se desplazó hasta 653 nm ($\epsilon = 130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) indicando un mayor desdoblamiento de los orbitales d. Este comportamiento se observó de forma consistente para diferentes proporciones DMSO/H₂O (Figura III-20). Un comportamiento similar fue observado en las medidas de conductividad molar (*Apartado 2.2.2*), notándose un aumento de este parámetro para mayores proporciones de agua. Sobre la base de la serie espectroquímica, se dedujo que se producen sustituciones del ligando *cloro* ubicado en la esfera de coordinación en posición *-trans* (respecto al enlace V=O, axial) por ligandos *acuo*, lo que fue confirmado por espectroscopía EPR (*Apartado 2.2.3*).

Debido a la naturaleza aniónica de los ligandos haluro (donores π), su capacidad para desestabilizar los orbitales d y generar un campo de carga alrededor del centro metálico (Δ_o) es menor en comparación con los ligandos *acuo*, los cuales poseen carga neutra (ligandos de campo medio, no donores-no aceptores π). Esto sitúa a los ligandos haluro en una posición inferior en la serie espectroquímica³¹. Por lo cual, cuando en solución acuosa se reemplaza el ligando *cloro* por *acuo* en el complejo VONF.Cl para formar el complejo catiónico: $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{H}_2\text{O}]^+$, el desdoblamiento de los orbitales d aumenta y la banda del espectro electrónico se desplaza a mayor energía, o menor longitud de onda (*blue shift*).

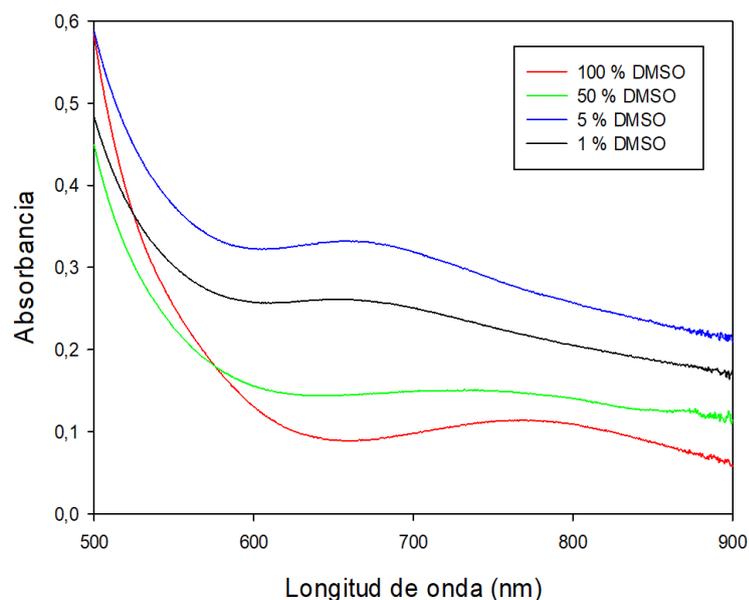


Figura III-20. Espectros electrónicos de VONF.Cl (2×10^{-3} M) en solución con DMSO y diferentes porcentajes de H₂O.

2.2.2. Conductividad molar

Como se mencionó previamente, la conductividad molar del complejo VONF.Cl a una concentración de 1×10^{-3} M mostró variaciones dependiendo de la proporción DMSO/H₂O. Además, se observó un ligero aumento en la conductividad a lo largo del tiempo para las soluciones con una mayor proporción de agua, lo cual se atribuye a la disociación del ligando *cloro*. Los valores de conductividad obtenidos en el medio con mayor proporción de agua (1% DMSO), se encuentran por debajo, pero cerca de los valores de referencia en agua para electrolitos 1:1 ($118 - 131 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)³³, en concordancia para la presencia de un único ligando *cloro*. Además, los datos no indican posteriores procesos de descomposición (Tabla III-8).

Tabla III-8. Conductividad molar del complejo VONF.Cl (1×10^{-3} M) en DMSO y en solución acuosa con diferentes porcentajes de DMSO.

T (min)	Conductividad molar ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)			
	DMSO 100%	DMSO 50%	DMSO 5%	DMSO 1%
0	0	11	50	60
5	0	11	54	62
10	0	12	54	62
20	0	12	55	65
30	0	12	57	67
60	0	12	60	69
120	0	12	62	71
300	0	13	64	72
30 (h)	14	14	71	80

Estos resultados, junto con las medidas de UV-Vis (*Apartado 2.2.1*), permiten concluir que el complejo VONF.Cl en DMSO presenta una naturaleza no electrolítica, pero en solución acuosa intercambia un ligando *cloro* por un ligando *acu* para formar la especie $[\text{VO}(\text{Narg})(\text{Fen})\text{H}_2\text{O}]^+$, que se mantiene estable por al menos 30 h.

2.2.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR en banda X del complejo VONF.Cl fueron obtenidos a partir de soluciones congeladas a 120 K, en DMSO y en solución acuosa al 5% v/v. Estos espectros revelaron la presencia del ion oxidovanadio(IV) en un campo de ligandos casi axial o pseudoaxial⁸ (Figura III-21). Los parámetros del Hamiltoniano de espín en solución con DMSO no mostraron cambios significativos en comparación con los parámetros obtenidos a partir de la muestra en estado sólido (Tabla III-9). Además, no se observaron diferencias significativas en solución acuosa (Figura III-21).

Tabla III-9. Parámetros del Hamiltoniano de espín obtenidos a partir de VONF.Cl en solución con DMSO y en estado sólido a 120 K.

	A_{\parallel} ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)	g_{\parallel}	A_{\perp} ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)	g_{\perp}
DMSO	165,2	1,941	59,5	1,976
Estado sólido	161,0	1,946	57,0	1,975

De igual forma, las relaciones $g_{\parallel} < g_{\perp} < g_e = 2,0023$ y $|A_{\parallel}| > |A_{\perp}|$ se cumplen, tal como se observó para la muestra en estado sólido. Además, el valor calculado

de A_{II} , empleando la regla de aditividad ⁸ ($164,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (*Apartado 2.1.3*), concuerda razonablemente con el valor obtenido en solución con DMSO ($165,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (Tabla III-9).

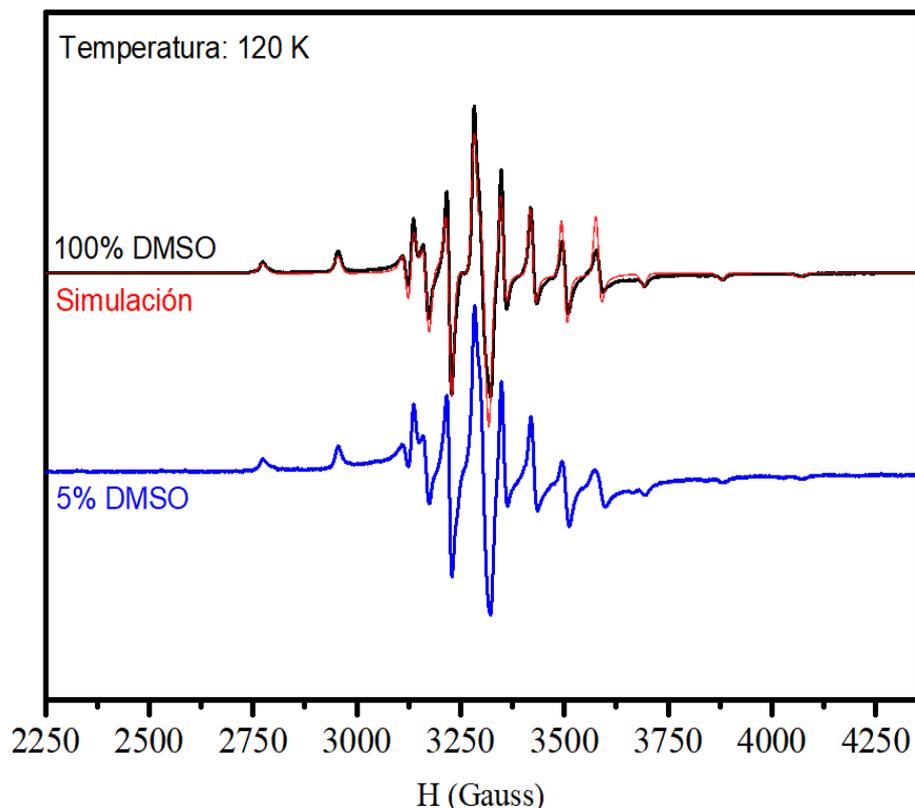


Figura III-21. Espectros de EPR de VONF.Cl en DMSO (negro), en solución acuosa con 5 % v/v DMSO (azul) y simulado (rojo) a 120 K.

2.2.4. Estabilidad

Para determinar la estabilidad en solución del complejo VONF.Cl, además de las medidas de conductividad molar en función del tiempo, vistas anteriormente (*Apartado 2.2.2*), se registró la variación de los espectros electrónicos en DMSO a una concentración de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, y en solución acuosa a una concentración de $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ con DMSO al 1 % v/v, durante dos horas (Figura III-22). A partir de los espectros, pudo observarse que durante este período las características espectrales, tanto en DMSO como en solución acuosa, se mantuvieron aproximadamente inalteradas, indicando que el complejo es lo suficientemente estable durante un período adecuado para su manipulación, facilitando la evaluación de sus propiedades biológicas.

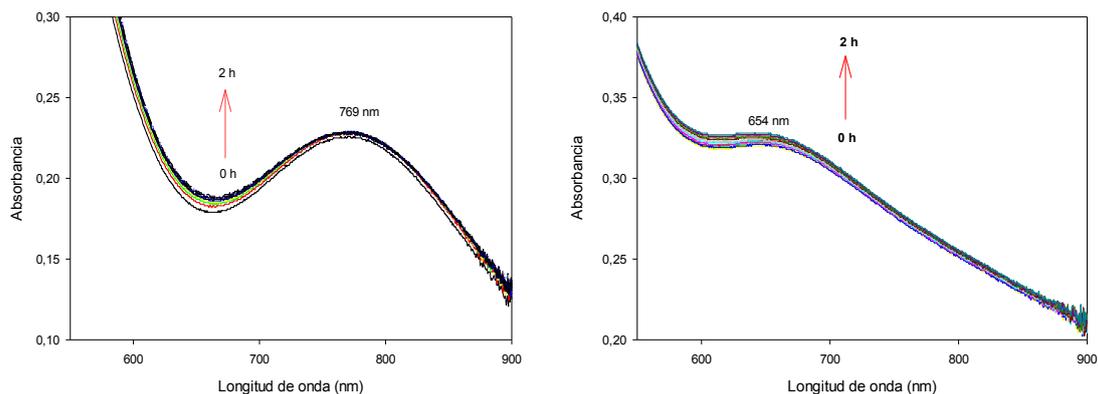


Figura III-22. Variación de los espectros electrónicos de VONF.Cl (5×10^{-3} M) en DMSO (izquierda) y (2×10^{-5} M) en DMSO al 1 % v/v (derecha) durante 2 horas.

2.3. Estructura propuesta para el compuesto VONF.Cl

La caracterización fisicoquímica del complejo ternario VONF.Cl, mostró que el ion oxidovanadio(IV) se encuentra coordinando con un ligando naringina, a través de los grupos 5-hidroxi desprotonado y 4-carbonilo de los anillos A y C, respectivamente, como se vio para el complejo homoléptico VONarg9. Del mismo modo, se identificó la coordinación con el ligando fenantrolina, y pudo notarse la disminución en el orden de enlace del grupo V=O, con respecto al complejo VONarg9, debido a la deslocalización π en el enlace ocasionada por el ligando fenantrolina (FTIR). De manera similar, la banda debida a la transición $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$, en los espectros electrónicos del complejo heteroléptico VONF.Cl, se encontró a menores longitudes de onda que en el complejo VONarg9, debido a una mayor energía del campo cristalino (mayor desdoblamiento de los orbitales d) para VONF.Cl. Asimismo, se confirmó la disposición de los ligandos naringina y fenantrolina en el plano ecuatorial, mostrando una geometría octaédrica distorsionada con compresión tetragonal (espectroscopía EPR). Por otra parte, el análisis termogravimétrico confirmó la presencia de 3 moléculas de agua fuera de la esfera de coordinación. Finalmente, el análisis elemental de C, H, N y V confirmaron la estructura propuesta en estado sólido: $C_{39}H_{39}O_{15}N_2VCl \cdot 3H_2O$ (Figura III-23).

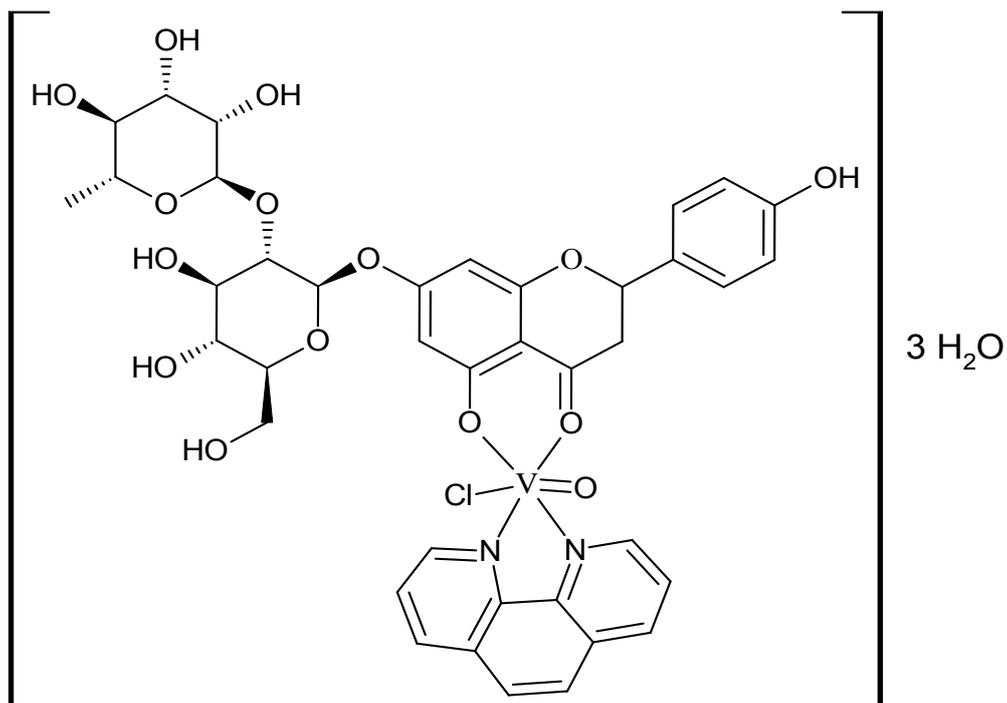


Figura III-23. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONF.Cl en estado sólido.

Por otra parte, las medidas en solución indicaron que la identidad del complejo en DMSO se mantiene inalterada. Sin embargo, en solución acuosa, el ligando *cloro* ubicado en posición *-trans* con respecto al oxígeno del grupo $V=O$, se intercambia por un ligando *acu* y forma la especie catiónica: $[VO(Narg)(Fen)H_2O]^+$ (Figura III-24). No obstante, la geometría octaédrica con distorsión tetragonal encontrada para el complejo en estado sólido, se conserva (Espectroscopía EPR). Por último, la conductividad molar del complejo y sus características espectrales en función del tiempo indican que el complejo catiónico es estable en solución acuosa, durante el tiempo de manipulación, permitiendo la evaluación de sus propiedades biológicas.

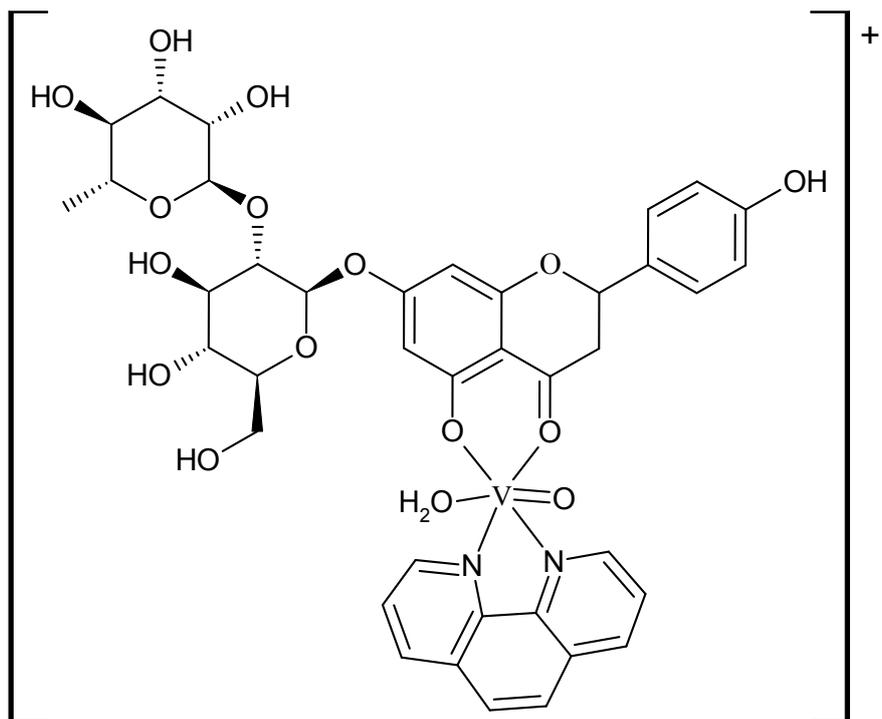


Figura III-24. Estructura propuesta para el complejo de coordinación VONF.Cl en solución acuosa.

3. Caracterización fisicoquímica del complejo $K_2[VO(Narg)(H_2O)_2] \cdot 3H_2O$ (VONarg12)

El complejo VONarg12 fue obtenido como el resultado de la complejación de naringina con el catión oxidovanadio(IV) a través de la región glicosídica del flavonoide. Previamente, se encontró que los complejos de oxidovanadio(IV) preparados a partir de los flavonoides hesperidina y diosmina, con este tipo de coordinación, tuvieron mejoras en su actividad anticancerígena con respecto al flavonoide libre ^{34,35}. En este trabajo, se preparó el complejo VONarg12 con el fin de estudiar cómo, el sitio de coordinación en un mismo flavonoide, puede influenciar sus propiedades fisicoquímicas y actividad anticancerígena *in vitro*.

3.1. Caracterización en estado sólido

3.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros FTIR de naringina, VONarg9 y VONarg12, y se compararon los modos vibracionales de los tres compuestos (Figura III-25). A partir de la comparación, se identificaron los cambios más relevantes por efecto de la complejación y/o desprotonación, y se asignaron tentativamente los modos vibracionales de los principales grupos funcionales (Tabla III-10) basado en reportes previos para sistemas $[V^{IV}O]^{2+}$ -flavonoides similares ^{2,3,34,35}.

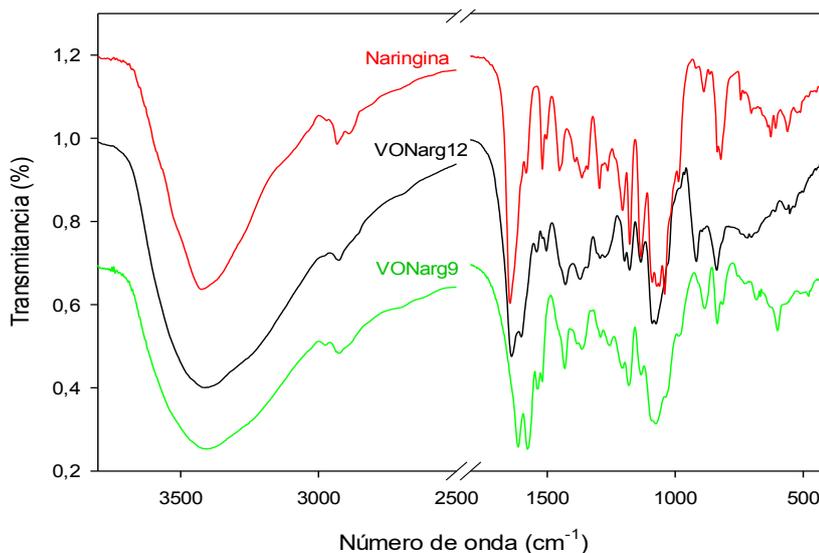


Figura III-25. Espectros FTIR de naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONarg12 (negro).

Se puede observar en los espectros que la banda de estiramiento del grupo C=O de la naringina a 1645 cm^{-1} se mantuvo sin cambios significativos en 1639 cm^{-1} en el complejo VONarg12. Esto sugiere que la forma de interacción con el catión oxidovanadio(IV) es diferente a la observada en los complejos VONarg9 y VONF.Cl, en los que la banda $\nu\text{ C=O}$ podía apreciarse en 1613 cm^{-1} y 1612 cm^{-1} , respectivamente, donde la interacción con el catión oxidovanadio(IV) ocurre a través de grupos 5-hidroxi desprotonado y 4-carbonilo de los anillos A y C. Por otra parte, las bandas asignadas a los estiramientos y deformaciones de C-OH ($1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) se desplazaron y/o cambiaron sus intensidades al formar el complejo. Si se considera, además, el pH alcalino empleado en la preparación del mismo, puede inferirse que los grupos -OH de la región glicosídica del flavonoide se desprotonaron e interactuaron con el catión oxidovanadio(IV). Por otro lado, como ya fue mencionado, la banda de estiramiento del grupo V=O para los complejos VONarg9 y VONF.Cl se encontró en 980 cm^{-1} y 971 cm^{-1} , respectivamente, en concordancia con lo observado para el tipo de coordinación acetilacetato, a través de los grupos 5-hidroxi y 4-carbonilo ^{2,4,12,36}. Sin embargo, para el complejo VONarg12 esta banda aparece en 918 cm^{-1} , lo que indica que la coordinación del catión oxidovanadio(IV) ocurrió a través de pares de grupos O-H vecinales desprotonados en posición -*cis* de la región glicosídica, como se pudo observar previamente con los flavonoides diosmina y hesperidina ^{34,35}. De manera similar, este tipo de coordinación y su correlación con la frecuencia de estiramiento $\nu\text{ V=O}$, también pudo observarse en varios complejos de oxidovanadio(IV) con mono y disacáridos ³⁷⁻³⁹.

Tabla III-10. Asignación de los espectros FTIR de naringina, VONarg9 y VONarg12 (posiciones de las bandas en cm^{-1}).

Naringina	VONarg9	VONarg12	Modos Vibracionales/Grupos Funcionales
3422 a 3231 h	3395 a 3205 h	3423 a	ν O-H
1645 mf 1629 h 1615 h	1613 mf 1574 mf	1639 mf 1626 h 1600 f	ν C=O anillo C, ν C=C
1582 m	1537 m	1540 m	ν C=C
1520 m 1504 m	1520 m	1504 m	ν C=C
1355 h 1341 m	1357 h	1342 m	δ COH
1281 d 1265 d	1256 d	1274 f, a	δ HOC, ν (C-O-C)
1134 f	1134 m	1135 d	ν C-O alcohol secundario
1074 mf	1076 mf	1072 m	ν O-C
1062 mf	1060 h	1056 h	ν C-O alcohol primario
1041 mf	1040 h	1028 m	ν O-C azúcar
987 m	987 m	982 md	ν O-C
	980 m	918 m	ν V=O
822 m	814 d	822 h	ν C-C, ν O-C

Abreviaturas de intensidades relativas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; md, muy débil; a, ancha; h, hombro; ν , estiramiento; δ , flexión.

3.1.2. Espectroscopía UV-Vis de reflectancia difusa (UV-Vis DRS)

El espectro UV-Vis DRS para el complejo VONarg12 (Figura III-26) muestra un perfil similar al observado en el complejo VONarg9, sin embargo, las bandas debido a las transiciones electrónicas entre los orbitales d, están solapadas por la alta absorción mostrada en la región ultravioleta, y únicamente se logró identificar una banda de este tipo a 667 nm atribuida a la transición $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}$, $3d_{yz}$. Las asignaciones realizadas para las transiciones electrónicas se muestran en la tabla III-11.

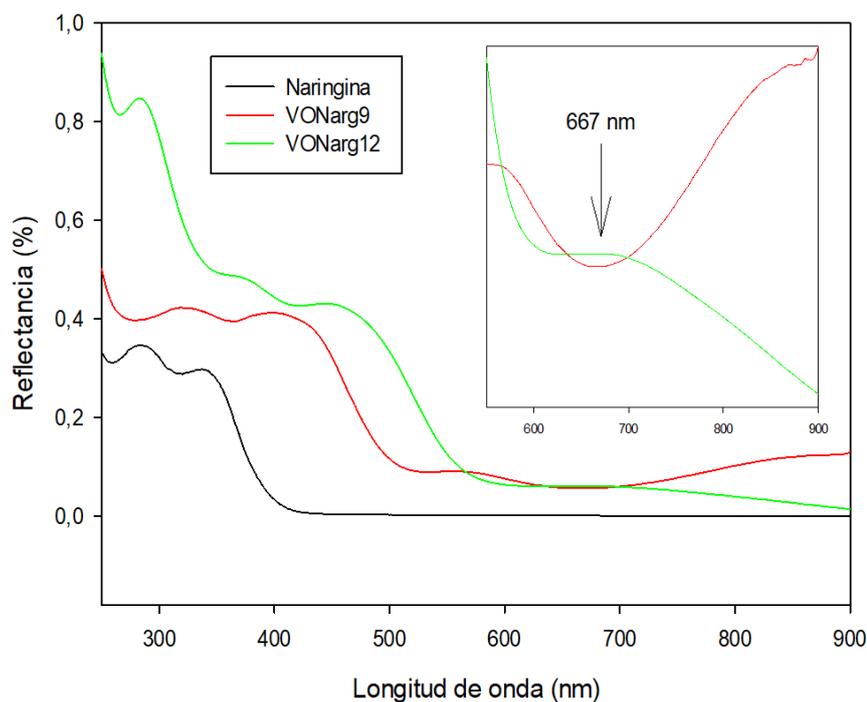


Figura III-26. Espectros de reflectancia difusa de naringina (negro), VONarg9 (rojo) y VONarg12 (verde). El recuadro muestra la zona de 550 a 900 nm ampliada.

La disminución de la energía de absorción de esta banda con respecto al complejo VONarg9 (870 nm), demuestra el cambio en el tipo de coordinación, ya que el desplazamiento a menores longitudes de onda corresponde a un aumento en la energía de desdoblamiento de los orbitales d, debido a una mayor capacidad por parte de los grupos C-O⁻ de la región glicosídica para generar un campo de carga alrededor del catión oxidovanadio(IV), con respecto a los grupos 5C-O⁻ y 4C=O. Además, el máximo de absorción atribuido a la transición $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$, es consistente con resultados previos para complejos de coordinación mononucleares del catión oxidovanadio(IV) obtenidos a partir de diferentes carbohidratos³⁹. En estos casos, se observa un espectro electrónico con 3 bandas de absorción bien definidas y localizadas aproximadamente en 420 nm, 510 nm y 690 nm, típico de azúcares coordinados al catión oxidovanadio(IV)³⁷.

Tabla III-11. Asignación de las transiciones electrónicas en los espectros de UV-Vis DRS para Naringina, VONarg9 y VONarg12.

Naringina	VONarg9	VONarg12	Asignación
280 nm 341 nm	-	282 nm	Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$
-	324 nm	372 nm	Transferencia de carga
-	394 nm	444 nm	Transferencia de carga
-	554 nm	-	$3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$
-	870 nm	667 nm	$3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$

3.1.3. Espectroscopía paramagnética electrónica (EPR)

Los espectros de EPR en banda X (9,48 GHz) del complejo VONarg12 se midieron en estado sólido a dos temperaturas, 120 K (-153 °C) y 298 K (25 °C). Sin embargo, el espectro obtenido a 298 K no presentó diferencias notables en comparación con el espectro a 120 K (gráfico no incluido). El espectro obtenido fue comparado con el espectro simulado bajo las mismas condiciones experimentales (Figura III-27). El espectro característico de 8 picos, correspondiente a 8 estados energéticos diferentes, es producto de la interacción entre el spin electrónico y el spin nuclear del ^{51}V (acoplamiento hiperfino), como fue mencionado anteriormente en otras secciones.

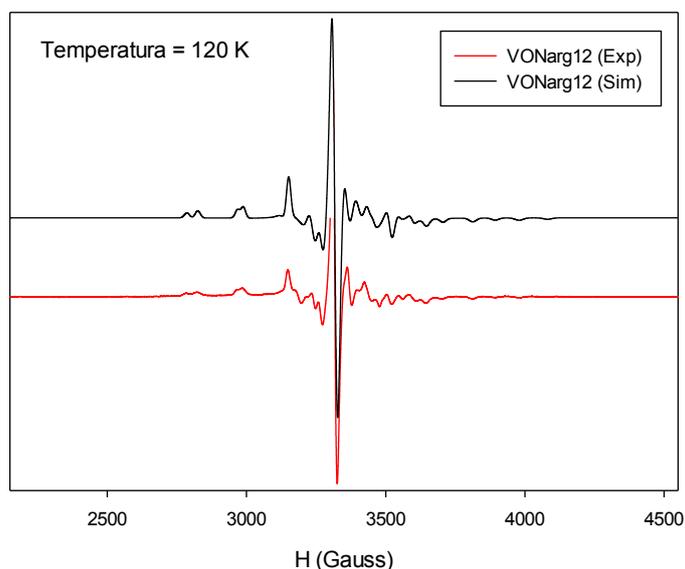


Figura III-27. Espectros de EPR en banda X de VONarg12 experimental (rojo) y simulado (negro) a 120 K.

Los parámetros obtenidos a partir de la simulación para el complejo VONarg12 en estado sólido fueron $A_{\parallel} = 161,87 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_{\parallel} = 1,937$, $A_{\perp} = 47,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_{\perp} = 1,974$ y son consistentes con un ion de oxidovanadio(IV) en un campo de ligandos pseudoaxial⁸. Del mismo modo, se cumple que $g_{\parallel} < g_{\perp} < g_e = 2,0023$ y $|A_{\parallel}| > |A_{\perp}|$, lo que indica una geometría octaédrica con compresión tetragonal y un estado fundamental d_{xy} , como pudo observarse para los complejos VONarg9 y VONF.Cl.

Por otra parte, la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino, A_{\parallel} , se calculó de acuerdo a la regla de aditividad descrita en secciones anteriores⁸. Se consideraron las contribuciones de los siguientes grupos funcionales: 2 (H₂O) ($2 \times 45,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) y 2 RO⁻ ($2 \times 35,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)³², obteniéndose un resultado de A_{\parallel} igual a $162 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, que es consistente con el valor obtenido a partir de la simulación ($161,87 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), por lo que se puede concluir que el complejo en estado sólido presenta una esfera de coordinación en el plano ecuatorial de 2 RO⁻ (coordinación glucósida con naringina) y 2 ligandos *acuo*.

3.1.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir de la curva de calentamiento del complejo VONarg12 (Figura III-28), se identificó una primera etapa de descomposición correspondiente a la reducción del 6,9 % de masa a 114 °C, atribuida a la pérdida de tres moléculas de agua de cristalización lábiles (% calculado = 6,7 %). En una segunda etapa de descomposición, correspondiente a la reducción del 11,7 % de masa inicial a 170° C, se identificó la pérdida de 2 moléculas de agua de coordinación (% calculado = 11,1 %). Después de las posteriores etapas de descomposición, la masa del residuo fue del 28,98 %, el cual fue identificado como la mezcla de V₂O₅ y K₂CO₃ (en relación 1:2) por espectroscopía FTIR (% residuo calculado = 28,23 %).

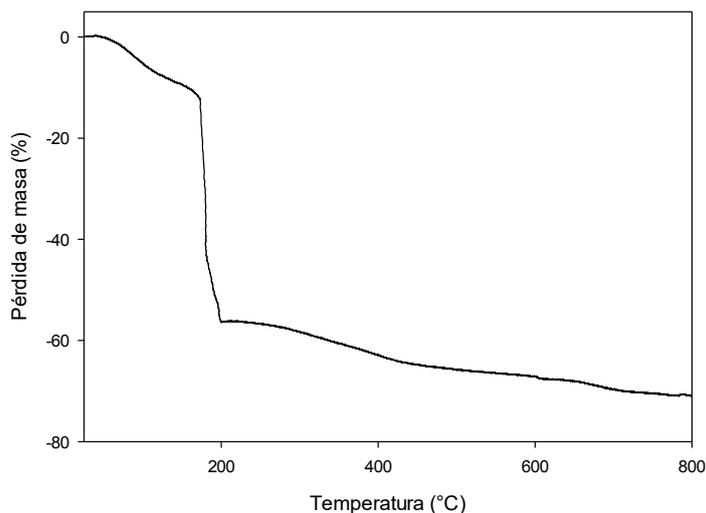


Figura III-28. Curva de calentamiento del complejo VONarg12 en atmósfera de O₂.

3.1.5. Análisis elemental

El análisis elemental para C, H, V y K (V y K se determinaron por espectroscopía de absorción atómica) del complejo VONarg12 mostró resultados consistentes con los porcentajes teóricos calculados a partir de la fórmula molecular propuesta, C₂₇H₃₈O₂₀K₂V, como se muestra a continuación:

Tabla III-12. Contenido porcentual de C, H, V y K para el complejo VONarg12.

	C (%)	H (%)	V (%)	K (%)
Experimental	39,3	4,2	6,9	10,0
Calculado	40,0	4,7	6,3	9,6

3.2. Estudios en solución

Los estudios en solución del complejo VONarg12 se llevaron a cabo en tampón NaOH (0,145 M) – KCl (0,055 M) pH 13, con el propósito de mantener y asegurar las condiciones nativas en las que el compuesto fue obtenido (pH = 12 - 13). En este valor de pH, se asegura la desprotonación de los grupos C4'-OH y C5-OH (*Apartado 1.2.3*), y comienzan a desprotonar los grupos OH de la unión glicosídica.

3.2.1. Espectrofotometría electrónica (UV-Vis)

El espectro electrónico del complejo VONarg12 registrado en solución con tampón NaOH (0,145 M) – KCl (0,055 M) pH 13 a una concentración de 0,02 M

(Figura III-29), mostró una única banda debida a transiciones electrónicas entre los orbitales d a 724 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$, $\epsilon = 20,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), desplazada a menores energías con respecto al espectro electrónico registrado en estado sólido, probablemente debido a efectos solvatocrómicos ³⁷.

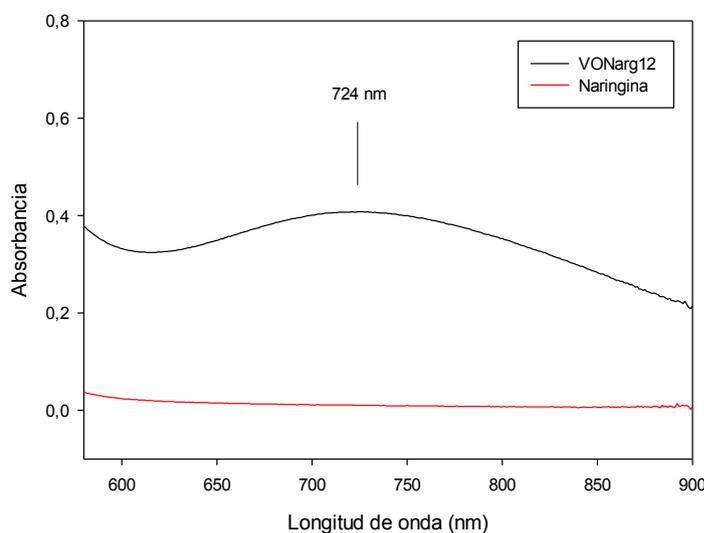


Figura III-29. Espectros electrónicos de VONarg12 (0,02 M) en tampón NaOH-KCl pH 13.

En comparación al espectro electrónico en solución del complejo VONarg9, se evidenció el desplazamiento a mayor energía de la banda asignada a la transición $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}$. Esto indica que el cambio en el modo de coordinación al catión oxidovanadio(IV), identificado en estado sólido por UV-Vis DRS (*Apartado 3.1.2*), a través de grupos hidroxilo en posición *-cis* desprotonados de la región glicosídica, se conserva en solución acuosa. Además, el máximo de absorción (724 nm) y el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 20,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que se relacionan con la energía y la intensidad de la absorción del tránsito electrónico, obtenidos para VONarg12, son consistentes con resultados previos para complejos de V=O obtenidos a partir de diferentes azúcares ³⁷⁻³⁹. Como se mencionó previamente (*Apartado 3.1.2*), los espectros electrónicos de complejos de oxidovanadio(IV) con carbohidratos presentan 3 bandas de absorción bien definidas y localizadas aproximadamente en 420 nm, 510 nm y 690 nm ³⁷. Por otra parte, considerando los resultados obtenidos para los complejos VONarg9 y VONF.Cl, puede esperarse que la esfera de coordinación octaédrica se complete en posición *-trans* al enlace V=O con un ligando *acuo* proveniente del solvente.

3.2.2. Determinación de la relación estequiométrica.

Para determinar si la estequiometría del complejo VONarg12 en solución, es similar o difiere de la especie en estado sólido, se empleó el método de la razón molar ²⁵. Para la determinación, se preparó una solución acuosa de naringina (0,03 M, pH 13) y se registraron sus espectros electrónicos con diferentes cantidades de cloruro de oxidovanadio(IV) en relaciones molares de ligando a metal que variaron desde 10 a 0,5 (pH 13) (Figura III-30).

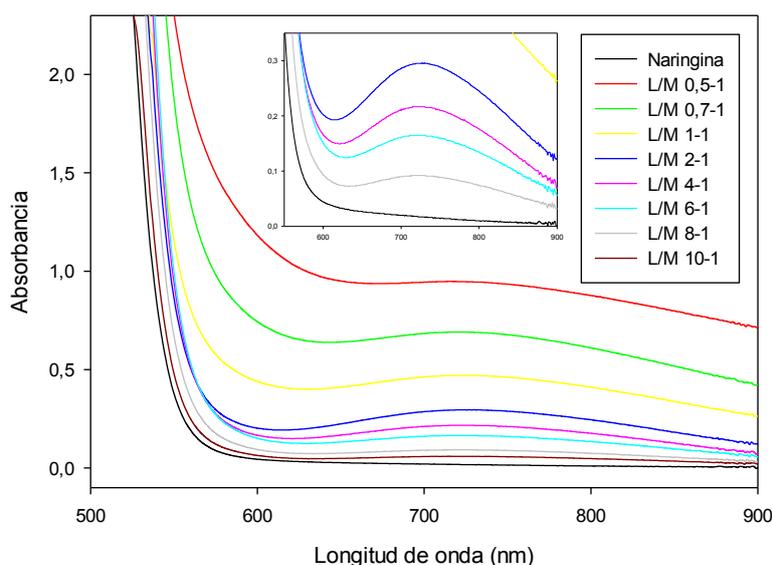


Figura III-30. Espectros electrónicos de naringina con VO(IV) a diferentes relaciones L/M en solución acuosa a pH 13.

Se monitoreó la absorbancia de la banda a 724 nm para cada relación molar, y a partir de los datos obtenidos se determinó una estequiometría ligando a metal de 1:1 (Figura III-31).

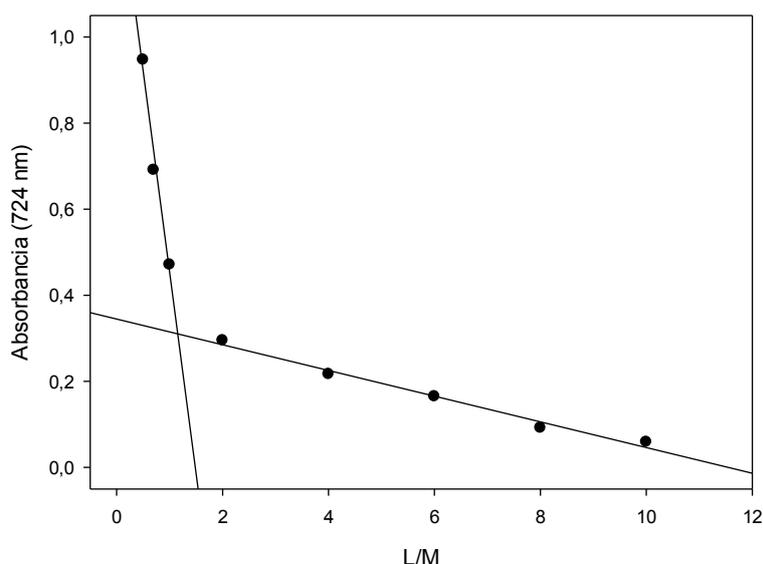


Figura III-31. Titulación espectrofotométrica de naringina con VO(IV) en H₂O a pH 13.

3.2.3. Conductividad molar

La conductividad molar del complejo VONarg12 se registró en solución acuosa a una concentración de 1×10^{-3} M en función del tiempo (Tabla III-13), los resultados mostraron que la conductividad fue de $282 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, con pequeñas variaciones en el tiempo, las cuales se atribuyeron a la disociación del catión K^+ , sin embargo, los datos no indican procesos de descomposición por al menos 24 h. Además, los valores de conductividad obtenidos muestran que el complejo se comporta como un electrolito 1:2³³, en concordancia con la presencia de dos cationes K^+ fuera de la esfera de coordinación, como pudo corroborarse por espectroscopía de absorción atómica (*Apartado 3.1.5*).

Tabla III-13. Conductividad molar del complejo VONarg12 (1×10^{-3} M).

Tiempo (min)	Conductividad molar ($\Omega^{-1} \text{mol}^{-1} \text{cm}^2$)
0	282
5	302
10	302
30	302
60	302
120	302
180	302
240	302
300	309
360	310
24 (h)	315

3.2.4. Estabilidad

La estabilidad en solución del complejo VONarg12 (0,02 M) se evaluó midiendo su espectro UV-Vis y conductividad molar en función del tiempo, como se vio anteriormente (Apartado 3.2.3). Los resultados de conductividad molar obtenidos revelaron la disociación del complejo en las especies iónicas K^+ (2) y $[VO(Narg)(H_2O)_2]^{-2}$. A pesar de esto, no se observó un incremento significativo en la conductividad durante al menos 24 horas, lo que sugiere que el complejo aniónico conserva su identidad en solución.

No obstante, se observó una disminución en la absorbancia de la banda localizada a 724 nm en los espectros electrónicos, sin que se produjera un desplazamiento del máximo de absorción (Figura III-32). Esto podría sugerir la degradación del complejo. Sin embargo, al considerar los resultados de conductividad, podemos inferir que el catión $V^{IV}O^{2+}$ se mantiene complejado. A pesar de estas observaciones, se puede afirmar que el complejo muestra suficiente estabilidad para su manipulación durante la evaluación de sus propiedades biológicas, ya que los tiempos de disolución y agregado de las muestras no superan los 15 minutos.

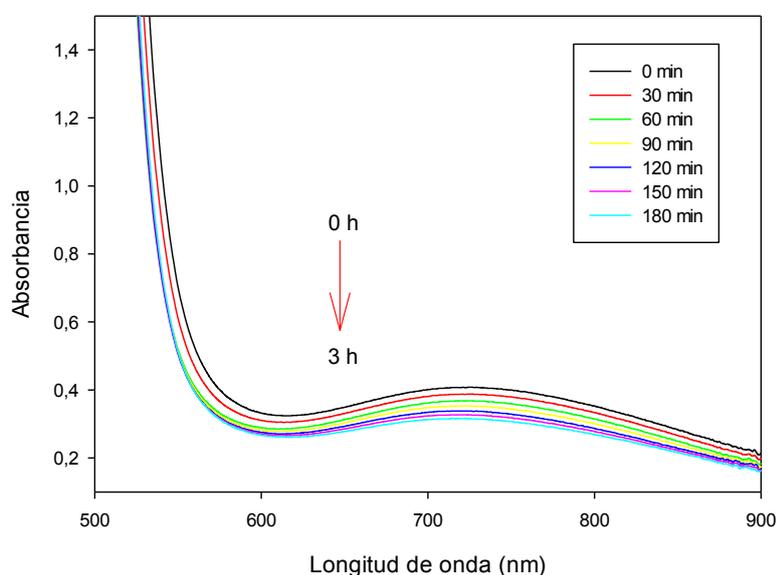


Figura III-32. Variación de los espectros electrónicos de VONarg12 (0,02 M) durante 3 horas en buffer NaOH-KCl pH 13.

3.3. Estructura propuesta para el compuesto VONarg12

La caracterización fisicoquímica del complejo VONarg12 mostró que el catión oxidovanadio(IV) se encuentra coordinando con el ligando naringina, a través de dos grupos hidroxilo vecinales desprotonados en posición *-cis*, de la región glicosídica del flavonoide (FTIR, EPR y UV-Vis), en concordancia con resultados previos obtenidos con los flavonoides glicosilados hesperidina y diosmina, y diferentes carbohidratos que presentaron este modo de coordinación al catión oxidovanadio(IV). Por otra parte, el análisis termogravimétrico reveló la presencia de 3 moléculas de agua fuera de la esfera de coordinación, y 2 moléculas de agua coordinando directamente al centro metálico (EPR). Finalmente, el análisis elemental para C, H, V y K confirmó la estructura propuesta en estado sólido: $C_{27}H_{38}O_{20}K_2V$ (Figura III-33).

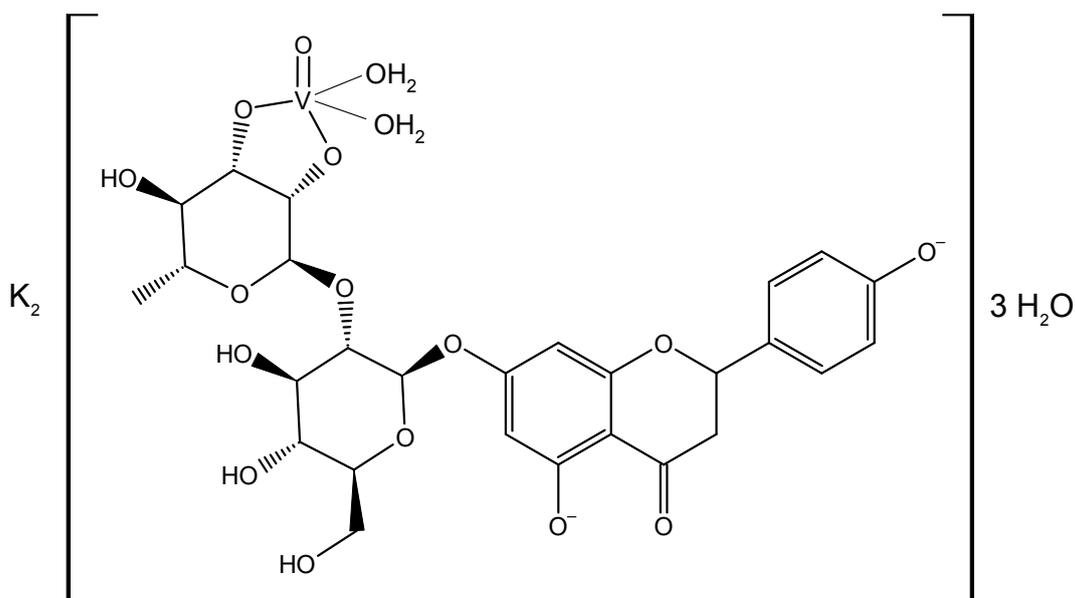


Figura III-33. Estructura propuesta para el complejo VONarg12 en estado sólido.

Por otra parte, los estudios en solución revelaron que el modo de coordinación de naringina con el catión oxidovanadio(IV) a pH 13, es similar al que presenta en estado sólido, manteniéndose la coordinación a través de la región glicosídica, presentando también una estequiometría L/M 1:1. Igualmente, las medidas de conductividad molar mostraron la naturaleza electrolítica del complejo, el cual se disocia en las especies iónicas K^+ y $[VO(Narg)(H_2O)_2]^{-2}$ (Figura III-34). A partir de estas medidas no se evidenció variación en la

conductividad molar por al menos 24 h, indicando que el catión $V^{IV}O^{2+}$ se mantuvo coordinado. Por otra parte, los cambios observados en los espectros electrónicos en función del tiempo indican la posible descomposición del complejo en solución, sin embargo, VONarg12 muestra suficiente estabilidad para la evaluación de sus propiedades antitumorales debido a que el tiempo de manipulación antes del agregado a las células no supera los 15 minutos.

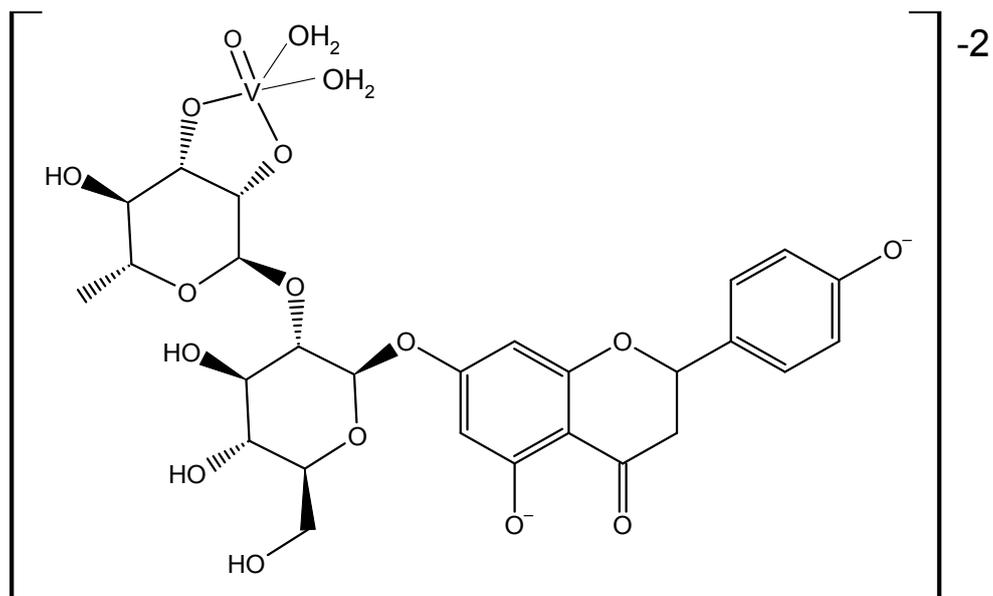


Figura III-34. Estructura propuesta para el complejo VONarg12 en solución acuosa.

4. Caracterización fisicoquímica del complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme)

El olmesartán, nombrado de acuerdo a la IUPAC como ácido 5-(2-hidroxipropil)-2-propil-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]imidazol-4-carboxílico (Figura III-35), es un fármaco utilizado para tratar la hipertensión. Pertenece a una clase de medicamentos llamados bloqueadores del receptor de angiotensina II (BRA). Estos medicamentos se unen selectivamente al receptor de angiotensina II, o receptor AT_1 , impidiendo que la hormona se una y desencadene sus efectos fisiológicos ⁴⁰.

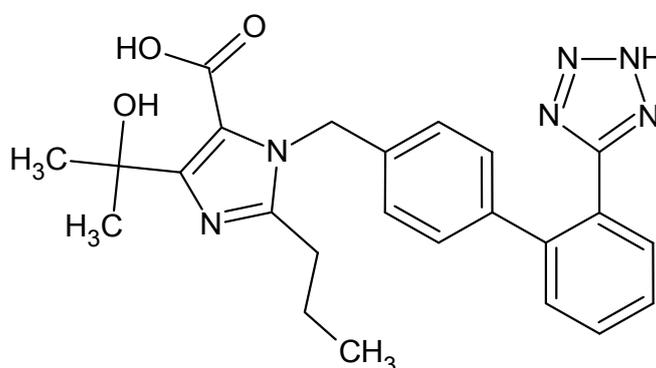


Figura III-35. Estructura química del fármaco olmesartán.

La modificación estructural del olmesartán por complejación con el catión $Zn(II)$ se propuso como estrategia para mejorar su actividad antihipertensiva, obteniéndose el complejo de coordinación identificado como $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme).

4.1. Caracterización en estado sólido

4.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR del complejo ZnOlme se comparó con el espectro del ligando libre olmesartán (Figura III-36), a partir de estas comparaciones se identificaron los cambios más relevantes y se asignaron tentativamente los modos vibracionales de los principales grupos funcionales (Tabla III-14) de acuerdo a reportes previos ^{41,42}.

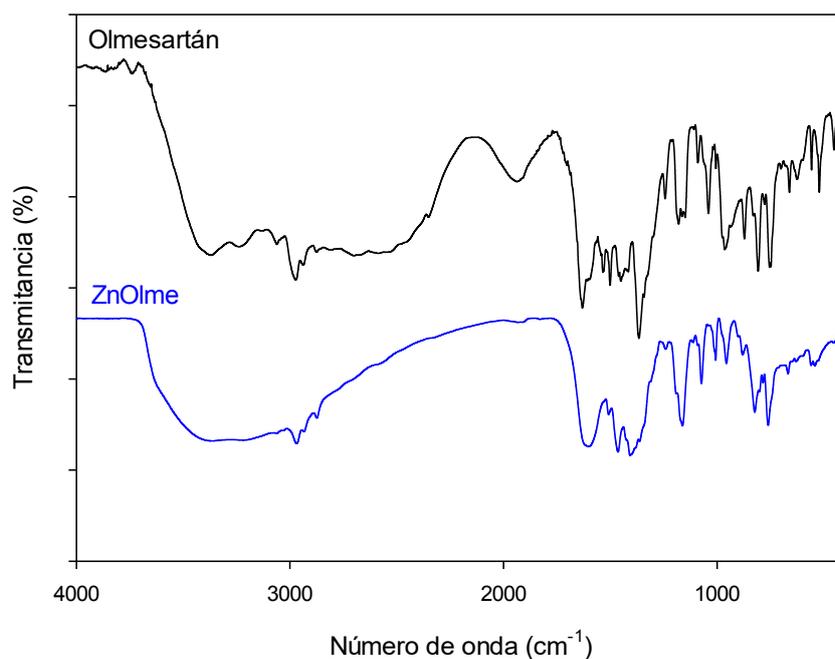


Figura III-36. Espectros FTIR de olmesartán (negro) y ZnOlme (azul).

El olmesartán puede existir como un *zwitterion* en el cual el protón del ácido carboxílico se transfiere al átomo de N del anillo imidazol, de acuerdo a los valores de pKa ($pK_{a1} = 0,91$ (ácido carboxílico); $pK_{a2} = 4,96$ (grupo amina); $pK_{a3} = 5,57$ (grupo amina); $pK_{a4} = 13,93$ (alcohol terciario)⁴³. En concordancia, las longitudes de los enlaces C-O medidas para el grupo carboxilato (COO^-) del olmesartán fueron 1,238 y 1,237 Å, lo que mostró la ausencia del átomo de H en el grupo $-\text{COOH}$ y un efecto de resonancia entre ambos enlaces C-O⁴⁴.

En concordancia con estas observaciones, se asignó la banda de 1632 cm^{-1} al estiramiento antisimétrico del grupo $-\text{COO}^-$, y la banda ubicada a 1420 cm^{-1} se asignó al estiramiento simétrico, y a partir de estos valores se obtuvo la diferencia $\Delta\nu$ ($\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}}$) de 212 cm^{-1} lo que concuerda con la presencia del *zwitterion* en estado sólido. El valor hallado en el complejo ZnOlme para la diferencia de estos dos modos vibracionales ($\nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}}$) fue igual a 223 cm^{-1} , lo que sugiere una coordinación monodentada del grupo carboxilato al catión Zn(II)⁴⁵. Ambos compuestos mostraron bandas intensas y anchas en el rango de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, lo cual concuerda con la presencia de grupos O-H y N-H, incluyendo el estiramiento debido a las molécula de agua coordinadas en el complejo. Otra característica importante en el espectro de ZnOlme es que en la región de $2800\text{ a }2300\text{ cm}^{-1}$, la intensidad y anchura de las bandas debidas a la

formación de enlaces puente de hidrógeno intramoleculares en olmesartán, disminuyen al desprotonar y/o coordinar. Además, las bandas relacionadas con el estiramiento del enlace N-N y la flexión de NNH mostraron diferencias en posición o intensidad, lo que indica desprotonación y/o coordinación a través del grupo tetrazol ⁴².

Tabla III-14. Asignación de los espectros FTIR de olmesartán y ZnOlme (posiciones de las bandas en cm⁻¹).

Modos Vibracionales/Grupos Funcionales	Olmesartán	ZnOlme
v -OH	3395 f	3392 f
v -NH	3239 h	3238 h
v -CH ₂ , -CH ₃	2975 m	2971 m
	2937 m	2937 m
	2875 m	2876 m
Enlaces de hidrogeno intramolecular.	2818 a	-
	2704 a	-
v COO ⁻ as	1632 f	1626 mf
v C=C	1599 h	1599 h
v C=N	1535 m	1537 m
δ CNH	1502 m	1505 f
δ NNH + δ CCH + v CN	1453 m	1465 f
v COO ⁻ s	1420 m	1403 f
δ NNH + δ CCH	1367 mf	1383 f
δ NNH + v NN + v C-C enlace puente bifenilo δ NNH + v NN	1244 m	1241 m
δ NNH + v NN	1183 m	1180 h
δ NNH + v NN	1155 m	1165 m

Abreviaturas de intensidades relativas: mf, muy fuerte; f, fuerte; m, media; d, débil; md, muy débil; a, ancha; h, hombro; v, estiramiento; δ, flexión.

4.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

A partir de la curva de calentamiento del complejo ZnOlme (Figura III-37), se identificó una primera etapa de descomposición correspondiente a la reducción del 6,5 % de masa a 89 °C, atribuida a la pérdida de dos moléculas de agua de coordinación (% calculado = 6,6 %). Después de las posteriores etapas de descomposición, la masa del residuo fue del 14,8 %, el cual fue identificado como ZnO por espectroscopía FTIR (% residuo calculado = 14,9 %).

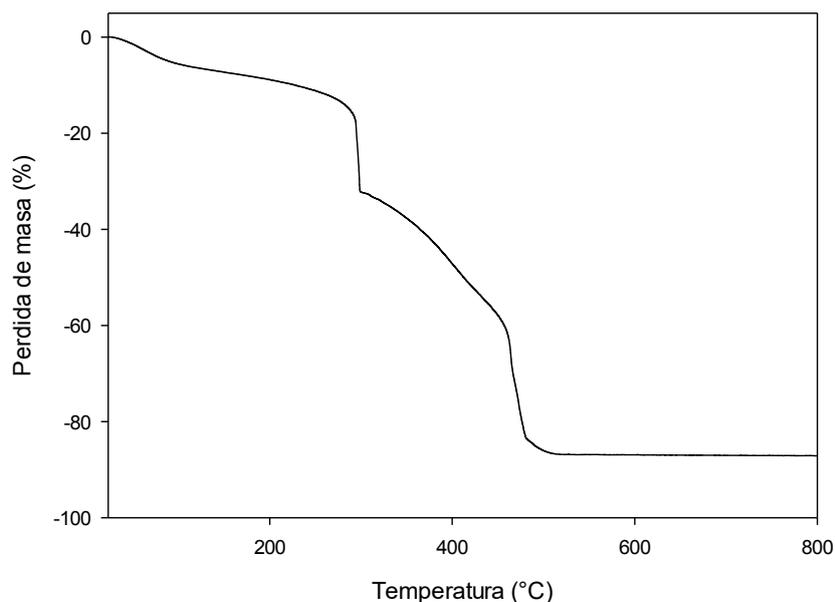


Figura III-37. Curva de calentamiento del complejo ZnOlme en atmósfera de O₂.

4.1.3. Análisis elemental

El análisis elemental para C, H, N y Zn del complejo ZnOlme mostró resultados consistentes con los porcentajes teóricos calculados a partir de la fórmula molecular propuesta, C₂₄H₂₈N₆O₅Zn, como se muestra a continuación:

Tabla III-15. Contenido porcentual de C, H, N y Zn para el complejo ZnOlme.

	C (%)	H (%)	N (%)	Zn (%)
Experimental	52,9	5,1	15,5	12,1
Calculado	52,8	5,2	15,4	12,0

4.2. Estudios en solución

4.2.1. Resonancia magnética nuclear (¹H-RMN y ¹³C-RMN)

Los espectros de RMN del ligando olmesartán se obtuvieron a partir de la bibliografía (¹H-RMN olmesartán (DMSO-d₆, 600 MHz) (δ ppm): desplazamientos químicos relacionados al grupo bifenilo: 7,67, 7,64, 7,56, 7,53, 7,06, 6,95; 5,65 (>N-CH₂), 2,58 (-CH₂CH₂CH₃), 1,54 (-C(OH)(CH₃)₂), 1,53, 0,85 (-CH₂CH₂CH₃)⁴⁶. Los desplazamientos químicos observados en el espectro de ¹H-RMN del complejo ZnOlme (¹H-RMN ZnOlme (DMSO-d₆, 600 MHz) (δ ppm): 7,55, 7,43, 7,01, 6,86, 5,59, 1,91, 1,48, 0,85.) concuerdan con los desplazamientos en el olmesartán para los grupos bifenilo y propilo (Figura III-

38). El singlete a 1,9 ppm detectado para el complejo se debe a -C-OH (alcohol terciario) y el singlete amplio a 3,4 ppm se asignó al agua coordinada ⁴⁷. Desafortunadamente, ni en el complejo ZnOlme, o en el espectro reportado para el olmesartán, se observaron los desplazamientos químicos para el grupo -COOH (o imidazol, para la forma zwitteriónica) o el grupo tetrazol, esperados a campo bajo con desplazamientos químicos superiores a 10 ppm ⁴⁸.

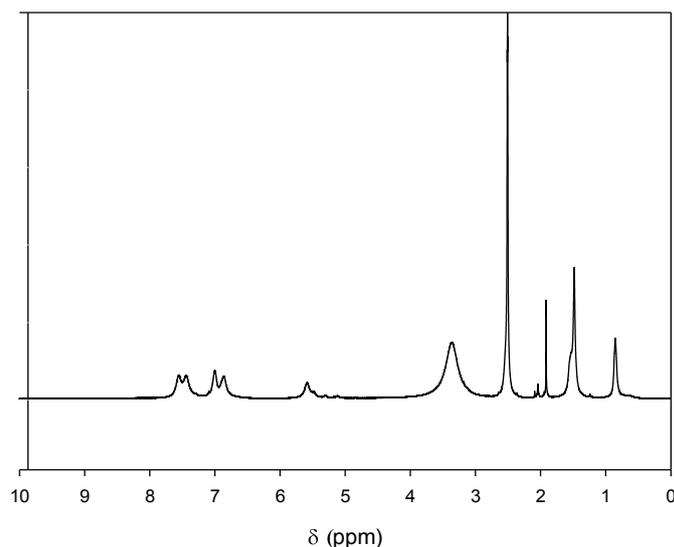


Figura III-38. Espectro de ¹H-RMN del complejo ZnOlme (DMSO-d₆, 600 MHz, δ , ppm).

Sin embargo, la coordinación del olmesartán al catión Zn(II), pudo confirmarse por las mediciones de ¹³C-RMN. Los datos espectrales de ¹³C-RMN para el complejo ZnOlme (¹³C-RMN ZnOlme (DMSO-d₆, 150 MHz) (δ ppm): 162,4, 158,8, 154,8, 150,5, 141,4, 138,9, 136,7, 131,0, 129,4, 127,8, 126,3, 124,6, 119,0, 70,5, 47,4, 30,4, 28,6, 21,5, 21,0, 14,1) revelaron que las señales asociadas al grupo carboxilato (-COO⁻) y al grupo tetrazol, se desplazaron a campo bajo, con respecto a las señales del ligando libre (¹³C-RMN olmesartán (DMSO-d₆, 150 MHz) (δ ppm): de 160,9 a 162,4 (>C=O) y de 155,0 a 158,8 (tetrazol C-5), debido a la desprotonación e interacción de estos grupos con el catión Zn(II) (Figura III-39). Además se observan las siguientes señales para el complejo: 153,1 (imidazol C-4), 150,7 (imidazol C-2), los desplazamientos químicos relacionados al grupo bifenilo: 141,0, 138,1, 136,8, 131,1, 130,6, 130,6, 129,0, 127,8, 126,0, 123,4; 118,0 (imidazol C-5), 70,8 (-C(OH)(CH₃)₂), 47,0 (>N-CH₂-), 29,7 (2C, -C(OH)(CH₃)₂) y los desplazamientos químicos relacionados a -CH₂CH₂CH₃: 28,0, 20,4, 13,6.).

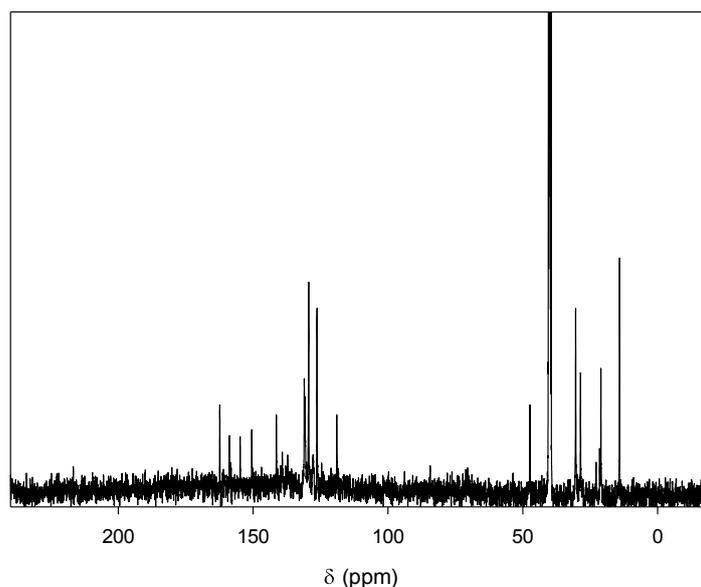


Figura III-39. Espectro de ^{13}C -RMN del complejo ZnOlme (DMSO- d_6 , 150 MHz, δ , ppm).

4.2.2. Determinación de la relación estequiométrica

Para determinar si la estequiometría de la especie que se forma en solución es similar a la del complejo ZnOlme en estado sólido, se utilizó el método de Benesi-Hildebrand ⁴⁹, y se midió la intensidad de fluorescencia de soluciones de olmesartán 1×10^{-3} M, con diferentes concentraciones de Zn(II) desde 1×10^{-4} M hasta 2×10^{-3} M en DMSO (Figura III-40).

Es importante considerar que, el olmesartán, al igual que otros bloqueadores del receptor de Angiotensina II (BRA), muestra fluorescencia intrínseca debido a los grupos bifenilo, tetrazol e imidazol en su estructura ^{50,51}. En este trabajo, se determinaron las longitudes de onda de excitación y emisión de olmesartán y su complejo de zinc (ZnOlme) a partir de soluciones 1×10^{-3} M en DMSO, mediante espectroscopía de fluorescencia tridimensional. Se encontró, que el olmesartán presenta un máximo de emisión en 366 nm cuando se excita a 295 nm (λ_{ex} : 295 nm/ λ_{em} : 366 nm), mientras que el complejo ZnOlme emite a 363 nm cuando se excita a 294 nm (λ_{ex} : 294 nm/ λ_{em} : 363 nm).

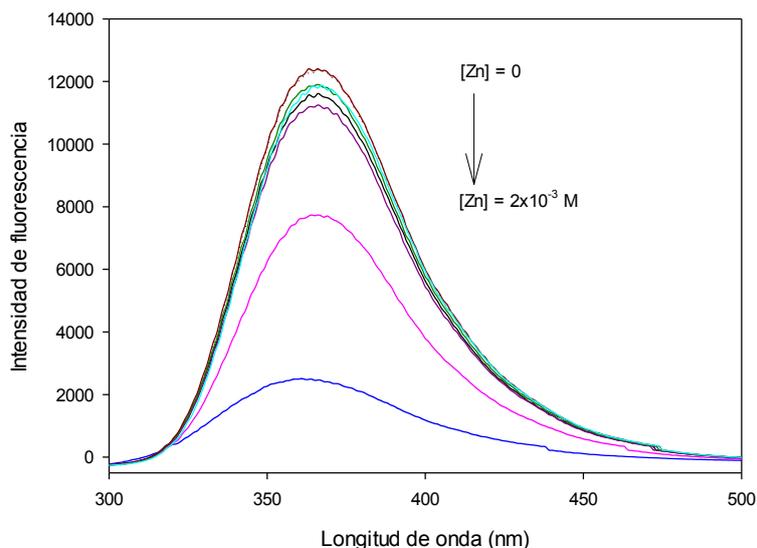


Figura III-40. Espectros de emisión de soluciones de olmesartán 1×10^{-3} M en DMSO con diferentes concentraciones de Zn(II). $L/M = 10, 6, 4, 2, 1, 0.5$; λ_{ex} : 294 nm; λ_{em} : 363 nm.

Asumiendo que el catión Zn(II) forma un complejo 1:1 con el ligando olmesartán, la ecuación aplicable es: $1/(F - F_0) = 1/(F_\infty - F_0)K[Me]_0 + 1/(F_\infty - F_0)$, donde F es la intensidad de fluorescencia en cada concentración de metal ($[Me]_0$) y F_0 es la intensidad de fluorescencia del olmesartán, y K es la constante de asociación.

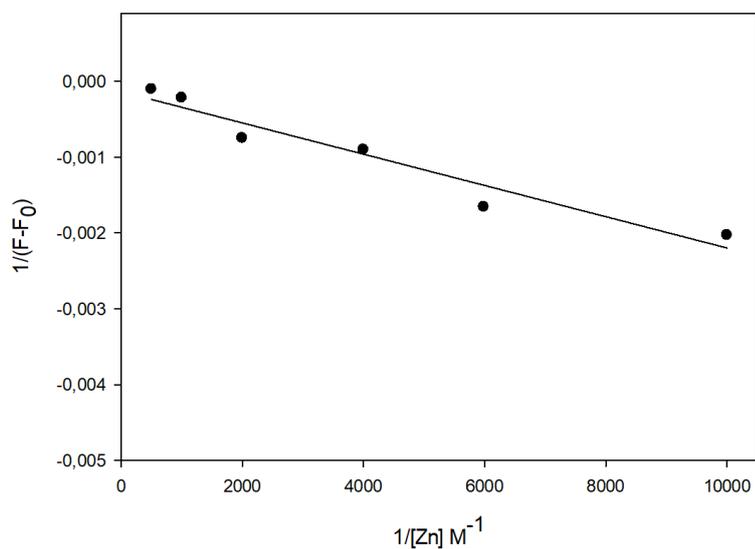


Figura III-41. Gráfico de Benesi-Hildebrand para el complejo ZnOlme asumiendo una estequiometría 1:1.

A partir del gráfico de $1/(F - F_0)$ vs $1/[Zn]_0$ (Figura III-41) se obtuvo un comportamiento lineal de los datos, mostrando que la estequiometría 1:1 para

el complejo en estado sólido, es igual a la obtenida de la interacción del olmesartán con Zn(II) en solución. Se obtuvo la misma conclusión empleando el método de la razón molar²⁵ (Figura III-42).

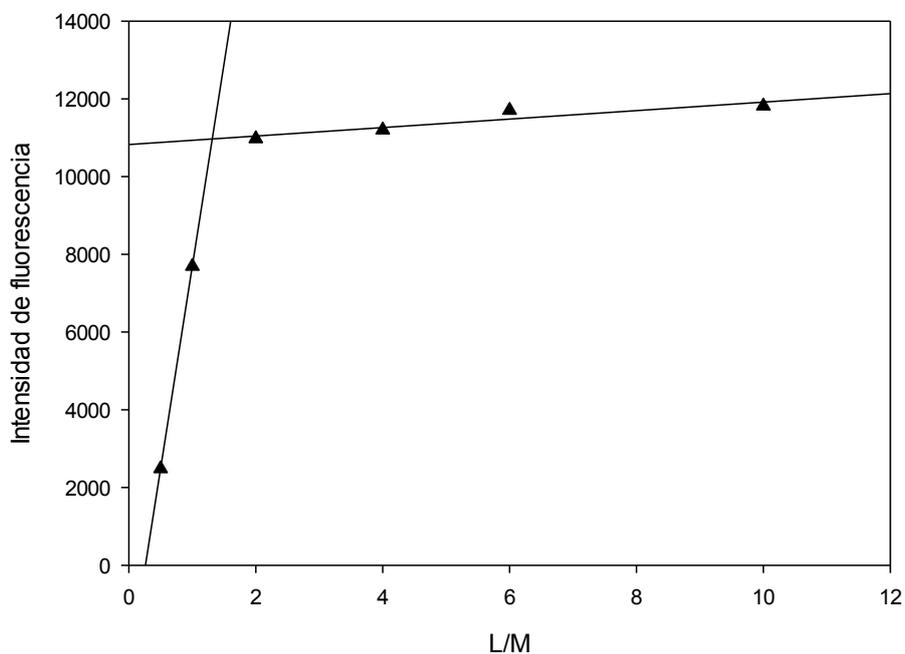


Figura III-42. Intensidad de fluorescencia frente a la relación molar (ligando/metal) para el complejo ZnOlme en DMSO. [Olmesartán] = 1×10^{-3} M.

4.2.3. Estabilidad

La estabilidad del complejo ZnOlme en solución se monitoreó empleando medidas de conductividad molar y espectrofotometría UV-Vis en función del tiempo. Las medidas de conductividad realizadas en DMSO a una concentración de 1×10^{-3} M, mostraron que el complejo ZnOlme no se comporta como electrolito ($0 - 12 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) y no se observaron cambios en este parámetro por al menos 4 h. Por otra parte, los espectros electrónicos de ZnOlme $4,65 \times 10^{-5}$ M en DMSO al 10 % v/v (Figura III-43), no mostraron cambios significativos durante 120 min, lo que sugiere que el complejo es estable durante un período adecuado para su manipulación, facilitando la evaluación de sus propiedades biológicas.

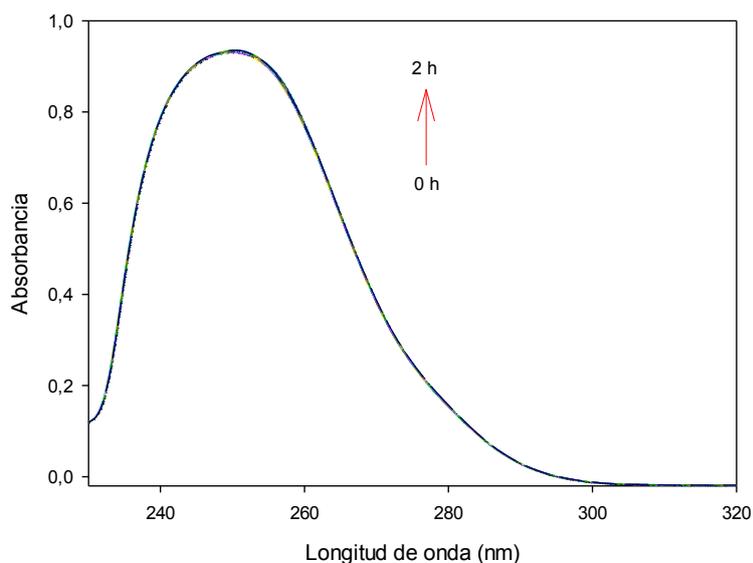


Figura III-43. Variación del espectro electrónico del complejo ZnOlme $4,65 \times 10^{-5}$ M en DMSO al 10% v/v durante 2 horas.

4.3. Estructura propuesta para el compuesto ZnOlme

La caracterización fisicoquímica del complejo ZnOlme tanto en estado sólido como en solución, mostró un entorno de coordinación tetraédrico bien definido alrededor del catión Zn(II), con el olmesartán actuando como ligando bidentado a través de los grupos COO^- del anillo imidazol, y el N desprotonado del anillo tetrazol, además, se identificó el modo de coordinación monodentado del grupo carboxilato (FTIR). Este modo de coordinación se confirmó por ^{13}C -RMN, al observar el desplazamiento a campo bajo de los picos relacionados con los grupos COO^- , y el grupo tetrazol, con respecto al ligando libre olmesartán. Por otra parte, el análisis termogravimétrico permitió identificar 2 moléculas de agua unidas directamente al catión Zn(II) que completan la esfera de coordinación. Finalmente, el análisis elemental para C, H, N y Zn, confirmó la estructura propuesta: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5\text{Zn}$ (Figura III-44).

Las medidas en solución, confirmaron la estequiometría 1:1 (Zn:Olme) en solución, y revelaron que el complejo no se comporta como un electrolito durante al menos 4 horas, del mismo modo, durante 2 horas mantuvo inalteradas sus características espectrales, indicando su alta estabilidad en solución con DMSO, permitiendo la evaluación de sus propiedades biológicas.

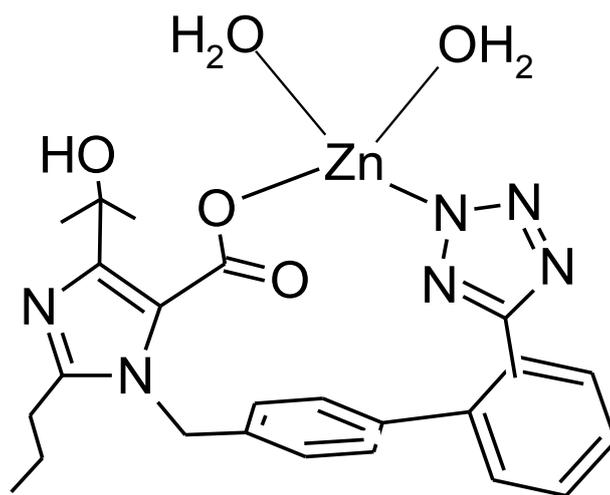


Figura III-44. Estructura propuesta para el complejo ZnOIme.

Referencias bibliográficas

- (1) Badea, M.; Olar, R.; Uivarosi, V.; Marinescu, D.; Aldea, V. Synthesis and Characterization of Some Vanadyl Complexes with Flavonoid Derivatives as Potential Insulin-Mimetic Agents. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, *107* (1), 279–285. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1413-0>.
- (2) Islas, M. S.; Naso, L. G.; Lezama, L.; Valcarcel, M.; Salado, C.; Roura-Ferrer, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Insights into the Mechanisms Underlying the Antitumor Activity of an Oxidovanadium(IV) Compound with the Antioxidant Naringenin. *Albumin Binding Studies. J. Inorg. Biochem.* **2015**, *149*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.011>.
- (3) R, R. S.; R, B.; N, K.; H, S.; S, S. Structural Geometry, Vibrational and Electronic Spectra Investigation on Naringin Molecule Using Experimental and Density Functional Calculations. *Int. J. Mol. Theor. Phys.* **2018**, *2* (1).
- (4) Naso, L.; Ferrer, E. G.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. Role of Oxidative Stress in the Antitumoral Action of a New Vanadyl(IV) Complex with the Flavonoid Chrysin in Two Osteoblast Cell Lines: Relationship with the Radical Scavenger Activity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (6), 889–902. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0652-z>.
- (5) Uivarosi, V.; Barbuceanu, S. F.; Aldea, V.; Arama, C.-C.; Badea, M.; Olar, R.; Marinescu, D. Synthesis, Spectral and Thermal Studies of New Rutin Vanadyl Complexes. *Molecules* **2010**, *15* (3), 1578–1589. <https://doi.org/10.3390/molecules15031578>.
- (6) Ballhausen, C. J.; Gray, H. B. The Electronic Structure of the Vanadyl Ion. *Inorg. Chem.* **1962**, *1* (1), 111–122. <https://doi.org/10.1021/ic50001a022>.
- (7) Smith, T. S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V. L. Paramagnetic Spectroscopy of Vanadyl Complexes and Its Applications to Biological Systems. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228* (1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(01\)00437-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(01)00437-4).
- (8) Chasteen, N. D. Vanadyl(IV) EPR Spin Probes Inorganic and Biochemical Aspects. In *Biological Magnetic Resonance: Volume 3*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1981; pp 53–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3201-5_2.
- (9) Cammack, R.; Williams, R.; Guigliarelli, B.; More, C.; Bertrand, P. Long-Distance Spin-Spin Interactions with Iron-Sulphur Clusters as Observed by e.p.r. Spectroscopy. *Biochem. Soc. Trans.* **1994**, *22*, 721–725. <https://doi.org/10.1042/bst0220721>.
- (10) Costa Pessoa, J.; Tomaz, I.; Henriques, R. T. Preparation and Characterisation of Vanadium Complexes Derived from Salicylaldehyde or Pyridoxal and Sugar Derivatives. *Inorganica Chim. Acta* **2003**, *356*, 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00395-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00395-5).
- (11) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Okulik, N. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Apigenin Oxidovanadium(IV) Cation Interactions. Synthesis, Spectral, Bovine Serum Albumin Binding, Antioxidant and Anticancer Studies. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2017**, *344*, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.05.007>.
- (12) Ferrer, E. G.; Salinas, M. V.; Correa, M. J.; Naso, L.; Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B.; Lezama, L.; Rojo, T.; Williams, P. A. M. Synthesis, Characterization, Antitumoral and Osteogenic Activities of Quercetin Vanadyl(IV) Complexes. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (6), 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0122-9>.
- (13) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (14) Smith, T. S.; Root, C. A.; Kampf, J. W.; Rasmussen, P. G.; Pecoraro, V. L. Reevaluation of the Additivity Relationship for Vanadyl–Imidazole Complexes: Correlation of the EPR Hyperfine Constant with Ring Orientation. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (5), 767–775. <https://doi.org/10.1021/ja991552o>.
- (15) Costa Pessoa, J.; Cavaco, I.; Correia, I.; Tomaz, I.; Duarte, T.; Matias, P. M. Oxovanadium(IV) Complexes with Aromatic Aldehydes. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80* (1), 35–39. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00037-4).
- (16) Rangel, M.; Tamura, A.; Fukushima, C.; Sakurai, H. In Vitro Study of the Insulin-like Action of Vanadyl-Pyrone and -Pyridinone Complexes with a VO(O4) Coordination Mode. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6* (2), 128–132. <https://doi.org/10.1007/s007750000180>.
- (17) Nascimento, O. R.; Magon, C. J.; Lopes, L. V. S.; Donoso, J. P.; Benavente, E.; Paez, J.; Lavayen, V.; Santa Ana, M. A.; Gonzalez, G. Magnetic Resonance Study of Vanadium

- Pentoxide Gels. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2006**, *447* (1), 233/[551]-242/[560]. <https://doi.org/10.1080/15421400500377248>.
- (18) Kivelson, D.; Lee, S. ESR Studies and the Electronic Structure of Vanadyl Ion Complexes. *J. Chem. Phys.* **1964**, *41* (7), 1896–1903. <https://doi.org/10.1063/1.1726180>.
 - (19) Chand, P.; Krishna, R. M.; Rao, J. L.; Lakshman, S. V. J. EPR and Optical Studies of Vanadyl Complexes in Two Host-Crystals of Tutton Salts of Thallium. *Radiat. Eff. Defects Solids* **1993**, *127* (2), 245–254. <https://doi.org/10.1080/10420159308220322>.
 - (20) Watson, R. E. Iron Series Hartree-Fock Calculations. *Phys. Rev.* **1960**, *118* (4), 1036–1045. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.118.1036>.
 - (21) Kuo-Tung Liu; Jiang-Tsu Yu; Ssu-Hao Lou; Chung-Hsien Lee; Yutung Huang; Kwang-Hwa Lii. Electron Paramagnetic Resonance Study of V⁴⁺-Doped KTiOPO₄ Single Crystals. *J. Phys. Chem. Solids* **1994**, *55* (11), 1221–1226. [https://doi.org/10.1016/0022-3697\(94\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0022-3697(94)90202-X).
 - (22) Golding, R. M. An E.S.R. Study of a Diluted Single Crystal of Potassium Vanadyl Oxalate. *Mol. Phys.* **1962**, *5* (4), 369–375. <https://doi.org/10.1080/00268976200100411>.
 - (23) Bandyopadhyay, A. K. Optical and ESR Investigation of Borate Glasses Containing Single and Mixed Transition Metal Oxides. *J. Mater. Sci.* **1981**, *16* (1), 189–203. <https://doi.org/10.1007/BF00552072>.
 - (24) Markham, Ken. R.; Mabry, Tom. J. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In *The Flavonoids*; Harborne, J. B., Mabry, T. J., Mabry, H., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1975; pp 45–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2909-9_2.
 - (25) Marcus, Y. On the Use of the Molar Ratio Method for Determining Association Stoichiometry. *Isr. J. Chem.* **1967**, *5* (4), 143–149. <https://doi.org/10.1002/ijch.196700028>.
 - (26) Bencini, A.; Lippolis, V. 1,10-Phenanthroline: A Versatile Building Block for the Construction of Ligands for Various Purposes. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (17), 2096–2180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>.
 - (27) Sammes, P. G.; Yahioglu, G. 1,10-Phenanthroline: A Versatile Ligand. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23* (5), 327. <https://doi.org/10.1039/cs9942300327>.
 - (28) Marverti, G.; Gozzi, G.; Lauriola, A.; Ponterini, G.; Belluti, S.; Imbriano, C.; Costi, M. P.; D'Arca, D. The 1,10-Phenanthroline Ligand Enhances the Antiproliferative Activity of DNA-Intercalating Thiourea-Pd(II) and -Pt(II) Complexes Against Cisplatin-Sensitive and -Resistant Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (24), 6122. <https://doi.org/10.3390/ijms20246122>.
 - (29) Sharma, M.; Ganeshpandian, M.; Majumder, M.; Tamilarasan, A.; Sharma, M.; Mukhopadhyay, R.; Islam, N. S.; Palaniandavar, M. Octahedral Copper(II)-Diimine Complexes of Triethylenetetramine: Effect of Stereochemical Fluxionality and Ligand Hydrophobicity on CuI/CuI Redox, DNA Binding and Cleavage, Cytotoxicity and Apoptosis-Inducing Ability. *Dalton Trans.* **2020**, *49* (24), 8282–8297. <https://doi.org/10.1039/D0DT00928H>.
 - (30) Actis Dato, A.; Naso, L. G.; Rey, M.; Gonzalez, P. J.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Phenanthroline Complexation Enhances the Cytotoxic Activity of the VO-Chrysin System. *Inorganics* **2021**, *10* (1), 4. <https://doi.org/10.3390/inorganics10010004>.
 - (31) Ishii, T.; Tsuboi, S.; Sakane, G.; Yamashita, M.; Breedlove, B. K. Universal Spectrochemical Series of Six-Coordinate Octahedral Metal Complexes for Modifying the Ligand Field Splitting. *Dalton Trans* **2009**, No. 4, 680–687. <https://doi.org/10.1039/B810590A>.
 - (32) Benítez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S. M.; Guiset, H.; Pessoa, J. C.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. Vanadium Polypyridyl Compounds as Potential Antiparasitic and Antitumoral Agents: New Achievements. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.001>.
 - (33) Ali, I.; Wani, W. A.; Saleem, K. Empirical Formulae to Molecular Structures of Metal Complexes by Molar Conductance. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2013**, *43* (9), 1162–1170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.756898>.
 - (34) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Rivadeneira, J.; Salinas, V.; Williams, P. A. M. Antioxidant Effects of the VO(IV) Hesperidin Complex and Its Role in Cancer Chemoprevention. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (3), 435–447. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0332-9>.
 - (35) Naso, L.; Martínez, V. R.; Lezama, L.; Salado, C.; Valcarcel, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Antioxidant, Anticancer Activities and Mechanistic Studies of the Flavone Glycoside

- Diosmin and Its Oxidovanadium(IV) Complex. Interactions with Bovine Serum Albumin. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (18), 4108–4119. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.053>.
- (36) Naso, L. G.; Ferrer, E. G.; Butenko, N.; Cavaco, I.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. A. M. Antioxidant, DNA Cleavage, and Cellular Effects of Silibinin and a New Oxovanadium(IV)/Silibinin Complex. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (4), 653–668. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0769-8>.
- (37) Etcheverry, S. B.; Williams, P. A. M.; Baran, E. J. Synthesis and Characterization of Oxovanadium(IV) Complexes with Saccharides. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302* (3), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00132-8).
- (38) Williams, P. A. M.; Etcheverry, S. B.; Baran, E. J. Characterization of New Oxovanadium(IV) Complexes of Saccharides. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329* (1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00171-3).
- (39) Williams, P. A. M.; Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B.; Baran, E. J. Characterization of Oxovanadium (IV) Complexes of d-Gluconic and d-Saccharic Acids and Their Bioactivity on Osteoblast-like Cells in Culture. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (2), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.10.019>.
- (40) Ladhari, A.; La Mura, G.; Di Marino, C.; Di Fabio, G.; Zarrelli, A. Sartans: What They Are for, How They Degrade, Where They Are Found and How They Transform. *Sustain. Chem. Pharm.* **2021**, *20*, 100409. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100409>.
- (41) Islas, M. S.; Franca, C. A.; Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Computational Study and Spectroscopic Investigations of Antihypertensive Drugs. *Vib. Spectrosc.* **2012**, *62*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.04.009>.
- (42) Franca, C. A.; Etcheverry, S. B.; Pis Diez, R.; Williams, P. A. M. Irbesartan: FTIR and Raman Spectra. Density Functional Study on Vibrational and NMR Spectra. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (9), 1296–1300. <https://doi.org/10.1002/jrs.2282>.
- (43) PubChem. *Olmestartan*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/158781> (accessed 2023-06-19).
- (44) Yanagisawa, H.; Amemiya, Y.; Kanazaki, T.; Shimoji, Y.; Fujimoto, K.; Kitahara, Y.; Sada, T.; Mizuno, M.; Ikeda, M.; Miyamoto, S.; Furukawa, Y.; Koike, H. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists: Synthesis, Biological Activities, and Structure–Activity Relationships of Imidazole-5-Carboxylic Acids Bearing Alkyl, Alkenyl, and Hydroxyalkyl Substituents at the 4-Position and Their Related Compounds. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (1), 323–338. <https://doi.org/10.1021/jm950450f>.
- (45) Deacon, G. B.; Phillips, R. J. Relationships between the Carbon-Oxygen Stretching Frequencies of Carboxylate Complexes and the Type of Carboxylate Coordination. *Coord. Chem. Rev.* **1980**, *33* (3), 227–250. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80455-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80455-5).
- (46) Dams, I.; Ostaszewska, A.; Puchalska, M.; Chmiel, J.; Cmoch, P.; Bujak, I.; Białońska, A.; Szczepek, W. J. Synthesis and Physicochemical Characterization of the Process-Related Impurities of Olmesartan Medoxomil. Do 5-(Biphenyl-2-Yl)-1-Triphenylmethyltetrazole Intermediates in Sartan Syntheses Exist? *Molecules* **2015**, *20* (12), 21346–21363. <https://doi.org/10.3390/molecules201219762>.
- (47) Cobas, C.; Seoane, F.; Domínguez, S. A New Approach to Improving Automated Analysis of Proton NMR Spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). **2011**, *23* (1).
- (48) Sinirlioglu, D.; Muftuoglu, A. E.; Bozkurt, A. Investigation of Proton Conductivity of Inorganic–Organic Hybrid Membranes Based on Boronic Acid and Tetrazole. *J. Polym. Res.* **2014**, *21* (8), 526. <https://doi.org/10.1007/s10965-014-0526-0>.
- (49) Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (8), 2703–2707. <https://doi.org/10.1021/ja01176a030>.
- (50) Hussein, S. A. E.-R.; El-Wadood, H. M. A.; Abdallah, M. A.-E. W.; Khorshed, A. A. E.-H. HPTLC with Fluorescence Densitometry for Simultaneous Determination of Some Angiotensin II Receptor Blockers in Tablets and Plasma. *J. AOAC Int.* **2015**, *98* (2), 354–360. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-179>.
- (51) El-Shaboury, S. R.; Hussein, S. A.; Mohamed, N. A.; El-Sutohy, M. M. Spectrofluorimetric Method for Determination of Some Angiotensin II Receptor Antagonists. *J. Pharm. Anal.* **2012**, *2* (1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.10.005>.

Capítulo IV

Propiedades biológicas *in vitro* de
complejos de naringina-V(IV)

Tabla de contenidos

Introducción.....	188
1. Diseño Racional.....	189
2. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	193
2.1. Determinación de la actividad secuestrante del radical DPPH.....	194
2.2. Determinación de la actividad secuestrante del radical hidroxilo (HO·).....	196
2.3. Determinación de la actividad símil superóxido dismutasa (SOD)	198
2.4. Determinación de la actividad secuestrante del radical peroxilo (ROO·).....	200
2.5. Conclusiones parciales	201
3. Determinación de la actividad anticancerígena y mecanismos de acción	203
3.1. Determinación de la viabilidad celular por el método del MTT	205
3.2. Determinación de la viabilidad celular frente a células normales	208
3.3. Análisis morfológico por tinción con cristal violeta.....	210
3.4. Medida de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	214
3.5. Medida de sistemas antioxidantes	218
3.6. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	220
3.7. Absorción de vanadio intracelular	222
3.8. Conclusiones parciales	224
4. Interacción con albúmina sérica bovina (biodisponibilidad).....	226
4.1. Desactivación de la fluorescencia	229
4.2. Mecanismo de desactivación de fluorescencia y determinación de las constantes y número de sitios de unión.....	231
4.3. Modo de interacción: parámetros termodinámicos.....	236
4.4. Conclusiones parciales.	239
Referencias bibliográficas	241

Capítulo IV. Propiedades biológicas *in vitro* de complejos de naringina-V(IV)

Introducción

Una de las propiedades que caracteriza a los flavonoides es su capacidad para formar complejos de coordinación con iones metálicos. Estos complejos pueden poseer una amplia gama de actividades farmacológicas, que incluyen efectos antioxidantes, antitumorales, antimicrobianos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antineurodegenerativos, inmunoestimulantes, entre otras. La formación de complejos de coordinación con flavonoides no sólo puede mejorar sus actividades biológicas, sino que también sirve como estrategia para el diseño de nuevos compuestos bioactivos. Gracias a esto, han sido encontrados compuestos con actividades farmacológicas y perfiles clínicos mejorados en comparación con los flavonoides originales ¹⁻⁶.

Específicamente, algunos complejos de coordinación de vanadio han demostrado tener un gran potencial terapéutico ⁷, pero han visto limitada su aplicabilidad por sus efectos adversos ^{8,9}. Debido a esto, la complejación del vanadio con flavonoides ha surgido como una estrategia para reducir reacciones indeseables e incrementar su actividad biológica. Distintas investigaciones sugieren que dicho incremento se debe a una mayor capacidad por parte del complejo de coordinación para regular las vías metabólicas, con respecto al ion metálico o flavonoide por sí solos ¹⁰. Por otra parte, la capacidad para generar especies reactivas de oxígeno, y de secuestrar radicales libres hacen de esta familia de compuestos una alternativa interesante para modular el estrés oxidativo ¹¹, el cual se ha relacionado con la ocurrencia y desarrollo de diversas enfermedades crónicas ¹²⁻¹⁴, y ha demostrado tener un rol fundamental tanto en la promoción, como en la supresión del cáncer ¹⁵.

En este capítulo se abordarán los resultados obtenidos de la evaluación de algunas propiedades biológicas *in vitro* de los complejos de coordinación obtenidos a partir del catión oxidovanadio(IV) y el flavonoide naringina. Se discutirá su capacidad para secuestrar algunos radicales libres *in vitro*, su capacidad anticancerígena sobre células en cultivo, sus mecanismos de acción, y la interacción con albúmina sérica bovina.

1. Diseño Racional

Como fue mencionado, el cáncer es una enfermedad compleja que está caracterizada por la división y la propagación descontrolada de células anormales. Puede afectar casi todos los tejidos del cuerpo y ha sido asociada con diversos factores de riesgo y causas, como el tabaquismo, la obesidad, la exposición a radiación y ciertas infecciones, entre otros ^{16,17}. En este contexto, se han llevado a cabo diversas investigaciones enfocadas en comprender los mecanismos moleculares subyacentes de los distintos tipos de cáncer, con el fin de desarrollar terapias más específicas y eficaces ¹⁸.

La exploración de nuevos fármacos basados en metales se vio motivada, por una parte, gracias al éxito de los agentes anticancerígenos basados en platino, pero también, debido a los nuevos desafíos que dicho descubrimiento supuso, como la ocurrencia de efectos adversos, la falta de selectividad y la alta toxicidad sistémica ¹⁹⁻²¹. Este paradigma, permitió el desarrollo de nuevos compuestos basados en metales con potenciales aplicaciones tanto terapéuticas como diagnósticas para diferentes enfermedades ²²⁻²⁴, especialmente cáncer ²⁵⁻²⁸. Sin embargo, a pesar de los avances realizados, la relevancia de los metales y metalofármacos en los sistemas biológicos aún no se ha explorado por completo, además, es necesario investigar los diversos mecanismos de acción de los nuevos compuestos basados en metales, de manera que se pueda entender y predecir su actividad biológica en función de su estructura molecular.

Particularmente, los complejos de vanadio han surgido como una potencial alternativa a los medicamentos contra el cáncer basados en platino debido a su toxicidad relativamente baja y sus diferentes estados de oxidación ^{7,29-31}. El interés terapéutico que suscita se debe a su capacidad para participar en diferentes procesos biológicos, por ejemplo, el vanadio en su estado de oxidación (V) y sus derivados presentan una fascinante analogía con los fosfatos, mostrando similitudes tanto en términos estructurales como electrónicos. Esta correlación explica la capacidad de diversos compuestos de vanadio para actuar como potentes inhibidores de fosfatasa, ribonucleasas y ATPasas ³² o activar numerosas vías de señalización y factores de

transcripción ⁷. Por otra parte, el vanadio en su estado de oxidación (IV) ha sido caracterizado como un agente mimético de la insulina, potenciador de la insulina o similar a esta, también posee el potencial para mejorar la captación celular de glucosa, de reducir los niveles de glucosa en sangre en animales de laboratorio, o suprimir la liberación de ácidos grasos libres en adipocitos ³³. También, se ha encontrado vanadio en el sitio activo de haloperoxidasas ³⁴ y nitrogenasas ³⁵, entre otros.

Dada su relevancia biológica, se han desarrollado compuestos basados en vanadio con potencial terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades ^{7,36,37}, principalmente diabetes ^{38,39}, cáncer ⁴⁰⁻⁴² y afecciones causadas por parásitos ^{43,44}. Haciendo que la investigación del vanadio y sus compuestos sea de gran relevancia para la química bioinorgánica y la química inorgánica medicinal ⁴⁵.

La actividad anticancerígena exhibida por los compuestos de vanadio ocurre a través de diversos mecanismos que incluyen: la alteración del metabolismo celular, inhibición de la proliferación celular, inducción de la apoptosis y restricción de la invasión tumoral y la metástasis. Estos procesos se dan como resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno y por consiguiente, al aumento del estrés oxidativo, alteración de orgánulos celulares como los lisosomas y las mitocondrias, alteración de proteínas estructurales como tubulinas y actinas, la alteración de vías de transducción de señales, y la regulación de la actividad de ciclinas y caspasas, las cuales desempeñan un papel fundamental en el control del ciclo celular y la apoptosis. Además, la proliferación celular también puede verse perturbada por los efectos genotóxicos ejercidos por el vanadio en los núcleos de las células a través de la interacción y daño al ADN ^{7,40,46-48}.

Se han descrito muchos mecanismos para explicar la inhibición del ciclo celular o la inducción de la muerte celular en células tumorales por los derivados del vanadio. Existe evidencia importante que apoya la hipótesis de que la actividad antitumoral de los compuestos de vanadio está mediada por la inhibición de proteínas fosfatasa específicas de tirosina (PTPasas), y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales ocasionan la escisión o

separación de las cadenas de ADN, promueven la inhibición de las PTPasas y ocasionan daño a diferentes componentes y orgánulos celulares. Se han identificado y descrito una serie de PTPasas específicas como SHP2/SYP y fosfatasa dual como cdc25 implicadas en la promoción de la proliferación celular. Se ha sugerido que los compuestos de vanadio pueden actuar sobre estos blancos celulares provocando la inhibición de este tipo de fosfatasa y, como consecuencia, detener la proliferación celular ⁴⁹.

Por su parte, la naringina posee un importante potencial terapéutico debido principalmente a sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias que juegan un papel protector en la fisiopatología humana. Su actividad anticancerígena se da a través de la interacción con diversas moléculas involucradas en la señalización celular, supresión de la producción de citocinas y factores de crecimiento, además de la detención del ciclo celular ⁵⁰⁻⁵².

Por otro lado, el tratamiento con complejos de coordinación que contienen 1,10-fenantrolina en su estructura, se ha relacionado con diversos procesos biológicos implicados con el estrés oxidativo. Se ha descubierto que la fenantrolina promueve el ingreso de complejos de cobre a células tumorales que inducen la apoptosis al inhibir la actividad del proteasoma ⁵³. Además se ha demostrado que el complejo bis-(1,10-fenantrolina) cobre (II) escinde el ADN, potencialmente a través de la intercalación en el surco menor, lo que provoca estrés oxidativo y la posterior hidrólisis de los enlaces ADN-hidrógeno ^{54,55}. Asimismo, se demostró que complejos de Cu(II) fenantrolina-fenazina además de ocasionar daños al ADN, también ejercieron sus efectos por aumento del daño oxidativo asociado con una salud mitocondrial comprometida ⁵⁶. De manera similar, se encontró que compuestos de coordinación que contienen fenantrolina desencadenan la muerte celular por la activación del mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas en el retículo endoplasmático ⁵⁷.

Como fue mencionado en el capítulo I, uno de los factores clave identificados en las condiciones fisiopatológicas y del desarrollo del cáncer es el estrés oxidativo; se ha demostrado que las células normales emplean diversos mecanismos para mantener la homeostasis redox y evitar el daño sobre el

ADN, proteínas y lípidos ⁵⁸. Por el contrario, en las células cancerosas el balance redox se encuentra alterado, sin embargo, estas células adquieren resistencia al estrés oxidativo aumentando la expresión de enzimas antioxidantes y disminuyendo la expresión de genes que promueven la apoptosis. Este estado favorece la proliferación y supervivencia de las células cancerosas y, además, contribuye a la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones. El estrés oxidativo también estimula la angiogénesis, y suprime la respuesta inmune antitumoral, promoviendo el desarrollo y progresión del cáncer ^{59,60}. Sin embargo, un aumento del estrés oxidativo, frente al cual las células cancerosas no pueden hacer frente induce la apoptosis, autofagia y/o necrosis ^{15,61}. Debido a esto, la regulación del estado redox, supone una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento del cáncer. No obstante, aumentar o disminuir el estrés oxidativo como estrategia terapéutica dependerá del tipo específico de cáncer, la etapa del mismo y los antecedentes genéticos del paciente. Por ejemplo, algunos pueden beneficiarse del aumento del estrés oxidativo para inducir la apoptosis o sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia, mientras que otros pueden beneficiarse de la disminución del estrés oxidativo para inhibir la angiogénesis o activar el sistema inmunitario antitumoral ¹⁵.

La complejación de vanadio con flavonoides (VO-flavonoides) ha demostrado ser una estrategia prometedora para diversas aplicaciones terapéuticas, particularmente en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, afecciones causadas por parásitos como la tripanosomiasis, la leishmaniasis y la leptospirosis, y el cáncer, como se mencionó previamente ¹⁰. Aunque los mecanismos moleculares exactos involucrados en su acción farmacológica siguen siendo investigados, se ha observado que en general, estos complejos reducen la toxicidad del vanadio y muestran efectos farmacológicos superiores en comparación con los flavonoides originales. Se ha propuesto que la capacidad anticancerígena de los VO-flavonoides se relaciona con la regulación de diversas vías metabólicas, como la activación de vías apoptóticas mediadas por receptores de membrana, la muerte celular apoptótica mediada por especies reactivas de oxígeno, la alteración en la fluidez de la membrana y la muerte celular mediada por detención mitótica ^{4,10}.

En particular, el estado de oxidación del vanadio, los grupos funcionales involucrados en el enlace coordinado y los grupos funcionales presentes en la estructura del complejo tienen un impacto significativo en su actividad farmacológica ⁷. La estructura de estos complejos está fuertemente influenciada por las condiciones de síntesis y las características del flavonoide utilizado ⁶². Estos factores deben tenerse en cuenta al diseñar nuevos compuestos de vanadio-flavonoides ya que pueden afectar los potenciales sitios de acción y el alcance de las interacciones biológicas que el complejo pueda tener.

Así mismo, poseer la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, pero también, para secuestrar radicales libres, hacen de esta familia de compuestos una propuesta terapéutica interesante para el tratamiento del cáncer, a través de la regulación del estado redox ¹¹. No obstante, es importante determinar para cada complejo en particular, sus capacidades anti y pro-oxidantes.

Por lo tanto, al diseñar fármacos anticancerígenos con un mecanismo de acción basado en la regulación del estado redox, es esencial investigar exhaustivamente los efectos de las EROs en función de su concentración para superar la resistencia a los medicamentos y preservar los tejidos normales, este enfoque permitiría el desarrollo de nuevos metalofármacos anticancerígenos con menor toxicidad y mayor especificidad.

2. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

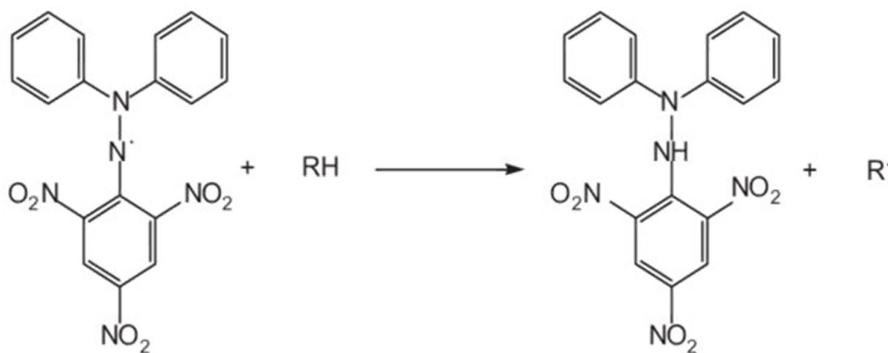
Como ya se mencionó, los polifenoles, son compuestos fitoquímicos estudiados en gran medida debido a sus propiedades antioxidantes, además, un alto consumo de estos compuestos se ha relacionado con una menor incidencia de enfermedades crónicas progresivas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas. Dentro de estos compuestos se incluyen flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos y lignanos ⁶³.

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos de evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de la naringina y los complejos de coordinación VONarg9 y

VONF.Cl frente a los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·), el radical hidroxilo (HO·), el radical superóxido (O₂^{·-}) y el radical peroxilo (ROO·). Si bien, el radical DPPH· no se clasifica como una especie reactiva de oxígeno (ERO), se midió la capacidad antioxidante frente a este con fines comparativos, dado que existen numerosos reportes en la literatura de la acción de productos fitoquímicos y derivados frente a este radical ^{64,65}. Por otro lado, la capacidad antioxidante del complejo VONarg12 no fue evaluada debido a la baja estabilidad presentada por este complejo durante el tiempo que duran las experiencias (contrario a lo que sucede en las determinaciones en cultivos celulares, donde el tiempo de preparación de las soluciones y su agregado a las células es menor a 5 min). Por otra parte, el ligando fenantrolina no mostró actividades antioxidantes contra los radicales superóxido, peroxilo, hidroxilo ni DPPH·, por lo que no se incluye en las siguientes determinaciones ⁶⁶.

2.1. Determinación de la actividad secuestrante del radical DPPH·

El radical DPPH· (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en solución metanólica presenta una coloración violeta intensa y estable, y se ha usado ampliamente como modelo para evaluar la capacidad antioxidante. Cuando una solución del radical DPPH· se mezcla con un compuesto antioxidante, el color violeta desaparece, producto de la reducción del radical a la hidracina DPPH-H cuya coloración es amarilla, este cambio puede ser cuantificado de manera simple y reproducible mediante espectroscopia UV-Vis a 517 nm (Esquema IV-1). Este método es ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de extractos de hierbas o compuestos fenólicos ⁶⁷.



Esquema IV-1. Reacción entre un antioxidante (RH) y el radical DPPH·. Tomado de Dureja et al., 2012 ⁶⁸.

La capacidad antioxidante de VOCl_2 , naringina, VONarg9 y VONF.CI frente al radical $\text{DPPH}\cdot$ fue medida por el método de Yamaguchi y colaboradores ⁶⁹. El procedimiento utilizado para la determinación fue descrito en el apartado 5.2 del capítulo II.

Los resultados muestran que los compuestos evaluados exhiben una capacidad moderada para reducir al radical $\text{DPPH}\cdot$. Ninguno de los compuestos logró reducir al radical más allá del 50% (concentración inhibitoria del 50%, CI_{50}) utilizando concentraciones hasta $100\ \mu\text{M}$ (Figura IV-1). Los porcentajes de reducción del radical $\text{DPPH}\cdot$ a $100\ \mu\text{M}$ fueron de: naringina ($1,9 \pm 2,14\%$) < VONF.CI ($24,3 \pm 1,99\%$) < VOCl_2 ($36,0 \pm 1,45\%$) < VONarg9 ($46,3 \pm 6,10\%$).

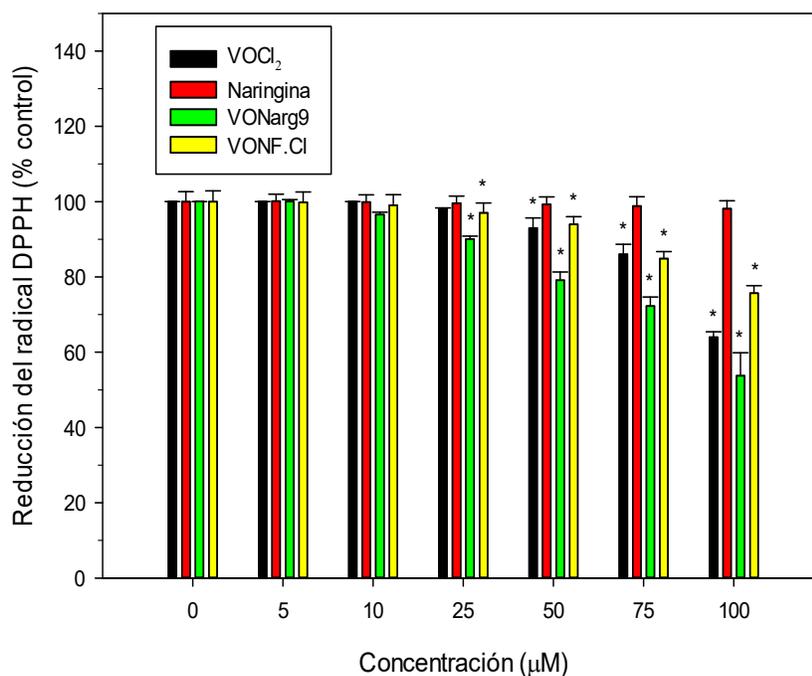


Figura IV-1. Efectos de VOCl_2 (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.CI (amarillo) sobre la reducción del radical $\text{DPPH}\cdot$.

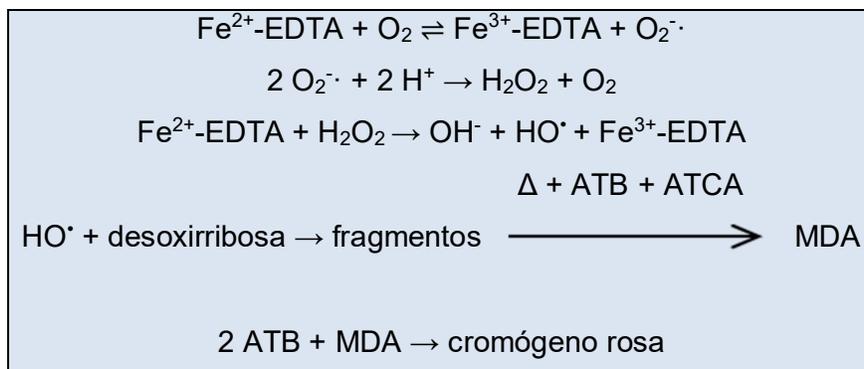
Los resultados obtenidos para la naringina concuerdan con los hallazgos publicados por Ye y colaboradores en el 2009 ⁷⁰. En ese estudio, el flavonoide no mostró capacidad reductora frente al radical $\text{DPPH}\cdot$ a una concentración de $100\ \mu\text{M}$, incluso a concentraciones de $2000\ \mu\text{M}$ su capacidad reductora fue únicamente del 11,1 %.

Por otra parte, la capacidad reductora de ambos complejos fue mejorada con respecto al ligando naringina, el complejo VONF.Cl exhibió una mejora del 22,4 %, equivalente a un incremento en su actividad de aproximadamente 13 veces. Además, el complejo VONarg9 presento una mejora del 44,4 % con respecto a la naringina, equivalente a un incremento en su actividad de aproximadamente 24 veces, así mismo, con respecto al complejo VONF.Cl, su actividad fue superior en un 22 %, correspondiente a casi el doble de su actividad reductora.

La mayor capacidad para reducir al radical DPPH· por parte del complejo VONarg9 estaría relacionada con un mayor potencial para donar hidrógeno, y la conversión del radical a la correspondiente hidracina, a su vez, dándose la oxidación de los sustituyentes hidroxilo a cetona ⁷¹. De manera que la capacidad del complejo VONF.Cl para reducir al DPPH· estaría limitada con respecto al complejo VONarg9, pues en su estructura se reemplazó uno de los ligandos naringina por fenantrolina.

2.2. Determinación de la actividad secuestrante del radical hidroxilo (HO·)

La determinación de la capacidad antioxidante frente a los radicales hidroxilo (HO·), se realizó por el método de Halliwell y colaboradores ⁷². El procedimiento seguido fue detallado en el apartado 5.1 del capítulo II. El método se basa en que los radicales hidroxilo, generados *in situ* por la reacción de un complejo hierro-EDTA con H₂O₂ en presencia de ácido ascórbico, reaccionan con la desoxirribosa para formar productos que, al calentarse con ácido tiobarbitúrico a pH ácido, generan un cromógeno rosa (Esquema IV-2). Los agentes antioxidantes neutralizan los radicales hidroxilo, evitando la formación de los productos de descomposición de la desoxirribosa, y por consiguiente, del cromógeno. La absorbancia del cromógeno se midió a 532 nm, y la capacidad antioxidante se determinó por comparación con el control (sin agregado de antioxidante).



Abreviaturas: ATB = ácido tiobarbitúrico; ATCA= ácido tricloroacético; MDA = malondialdehído; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético; Δ = calentamiento.

Esquema IV-2. Generación de radicales hidroxilos por el sistema Fe/H₂O₂/ascorbato, y su reacción con la desoxirribosa. Adaptado de Halliwell et al., 1987 ⁷².

Los compuestos evaluados muestran una capacidad baja para neutralizar a los radicales hidroxilo. A una concentración de 100 μM, ninguno de ellos logró inhibir más allá del 50 % (CI₅₀), más aún, el complejo VONarg9 no presentó actividad inhibitoria (Figura IV-2). Los porcentajes de inhibición a 100 μM fueron de: VONarg9 (0 ± 8,12 %) < naringina (27,3 ± 0,15 %) < VONF.CI (29,0 ± 3,08 %) < VOCl₂ (38,0 ± 2,00 %).

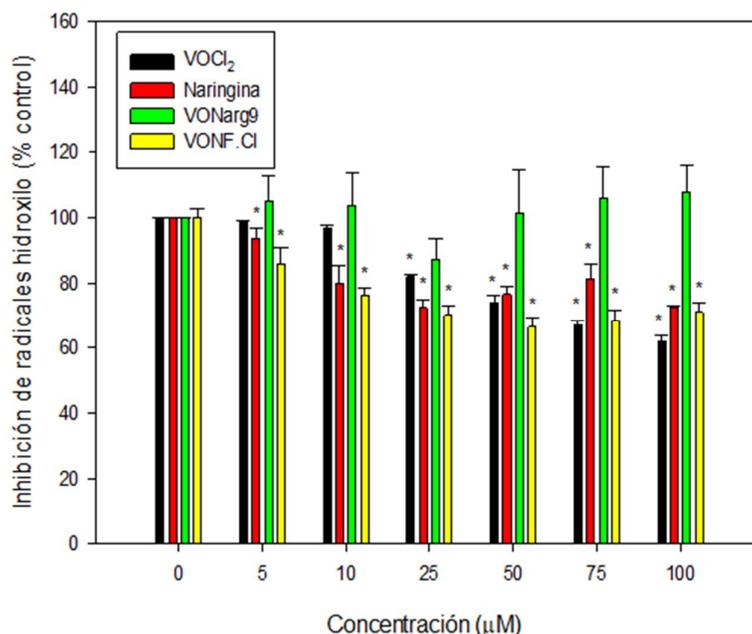


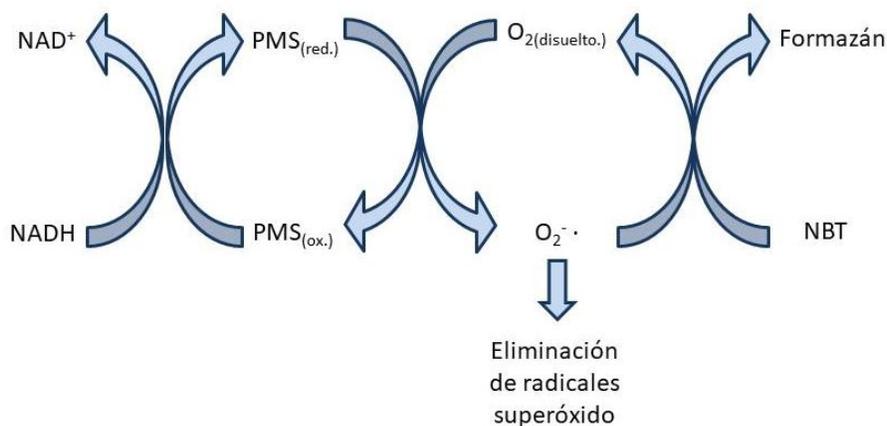
Figura IV-2. Efectos de VOCl₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.CI (amarillo) sobre la inhibición de radicales hidroxilo (HO·).

El complejo VONarg9 no presentó una mejora en su capacidad inhibitoria frente a los radicales hidroxilo, por el contrario, su actividad disminuyó en comparación con la naringina. Anteriormente, pudo observarse un efecto similar para los flavonoides apigenina, baicalina y la aglicona de la naringina, la naringenina, ya que, como resultado de su complejación al catión oxidovanadio(IV) sus capacidades inhibitorias a una concentración de 100 μM frente a los radicales hidroxilo disminuyó ligeramente en un 2 %, 6 % y 13 %, respectivamente ^{11,73-75}.

Por otra parte, el complejo VONF.Cl exhibió una mejor actividad inhibitoria a concentraciones bajas (14,07 % a 5 μM) en comparación con el flavonoide (6,39 % a 5 μM). Además, su capacidad de inhibición se mantuvo alrededor del 30 % desde 25 μM hasta 100 μM , superando ligeramente a la naringina en cada concentración evaluada.

2.3. Determinación de la actividad símil superóxido dismutasa (SOD)

La determinación de la capacidad para inhibir al radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) de manera similar a la enzima superóxido dismutasa (SOD) se realizó empleando el método reportado por Nishikimi y colaboradores ⁷⁶. El procedimiento se detalló en el apartado 5.3 del capítulo II. El mismo se basa en cómo la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán, por parte del radical superóxido, puede inhibirse por adición de un agente SOD-símil. EL NBT es reducido a formazán por los radicales generados *in situ* a través de la reacción entre el sistema PMS (fenazina metosulfato) y NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) (Esquema IV-3). La absorbancia del formazán se mide a 560 nm y, cuanto menor sea su valor, mayor será la capacidad del agente SOD-símil para inhibir la reducción del NBT, y por ende para neutralizar la acción de los radicales. El porcentaje de inhibición se determina por comparación con el control (sin agregado del agente SOD-símil).



Esquema IV-3. Mecanismo para la generación e inhibición de radicales superóxido a través del sistema NBT/NADH/PMS. Adaptado de Patel et al., 2011 ⁷⁷.

Los compuestos evaluados mostraron una mejora con respecto a la naringina en su capacidad para inhibir un 50 % (CI₅₀) la reducción del NBT por los radicales O₂^{•-}. Las concentraciones medias capaces de generar dicho efecto fueron de: naringina (>1000 μM), VONarg9 (870 ± 5.2 μM), VONF.Cl (35,5 ± 3,6 μM) y VOCl₂ (15,0 ± 0,2 μM) (Figura IV-3).

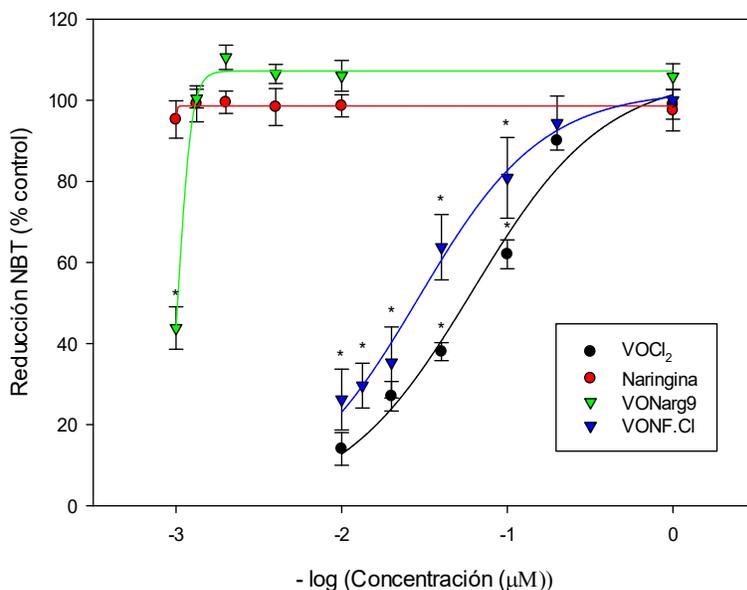


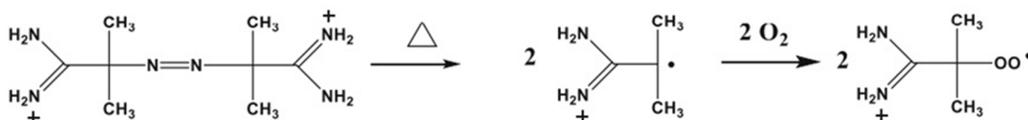
Figura IV-3. Efectos de VOCl₂ (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (azul) en la reducción del NBT por radicales O₂^{•-}.

El complejo VONarg9 exhibió un incremento en su capacidad SOD-símil de al menos un 13 % (sí se considera que la CI₅₀ de la naringina fue de al menos

1000 μM). Por su parte, el complejo VONF.Cl mostró una mejora de al menos un 96,5 % en comparación con el flavonoide y, por otra parte, al compararse con el complejo VONarg9, esta mejora es del 95,9 %, equivalente a un aumento en la actividad de al menos 24 veces. Sin embargo, pese al incremento en la actividad SOD-símil como resultado de la complejación al catión oxidovanadio(IV), los complejos no son agentes SOD-símil efectivos, ya que para serlo su Cl_{50} debería ser de al menos 20 μM ⁷⁸.

2.4. Determinación de la actividad secuestrante del radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)

La determinación de la capacidad secuestrante frente al radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), se realizó al evaluar la capacidad de los compuestos estudiados para retrasar la degradación de la piranina por los radicales $\text{ROO}\cdot$ generados *in situ* por la degradación térmica del compuesto 2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) ^{79,80} (Esquema IV-4). El procedimiento se detalló en el apartado 5.4 del capítulo II. La degradación de la piranina se siguió espectrofotométricamente a 454 nm en función del tiempo. El período transcurrido (en minutos) antes de que hubiera una reducción significativa en su absorbancia, denominado como fase de retardo o fase *lag*, se obtuvo de la intersección entre las rectas generadas a partir de los valores de absorbancia en función del tiempo. El retraso de la degradación de la piranina, se debe a la capacidad del compuesto antioxidante para inhibir los radicales $\text{ROO}\cdot$.



Esquema IV-4. Descomposición térmica del AAPH en radicales $\text{ROO}\cdot$. Tomado de Zhang et al., 2018 ⁸¹.

Los resultados obtenidos muestran que el ligando naringina no presentó actividad inhibitoria frente a los radicales $\text{ROO}\cdot$, en cambio, los complejos exhibieron una mejora en su capacidad para retrasar el consumo de la piranina por estos radicales. La fase de retardo encontrada para VONarg9 fue de $3,8 \pm 0,8$ min, y para VONF.Cl fue de $6,0 \pm 0,4$ min. Por su parte, la fase de retardo del cloruro de vanadilo fue de $6,4 \pm 1,1$ min (Figura IV-4).

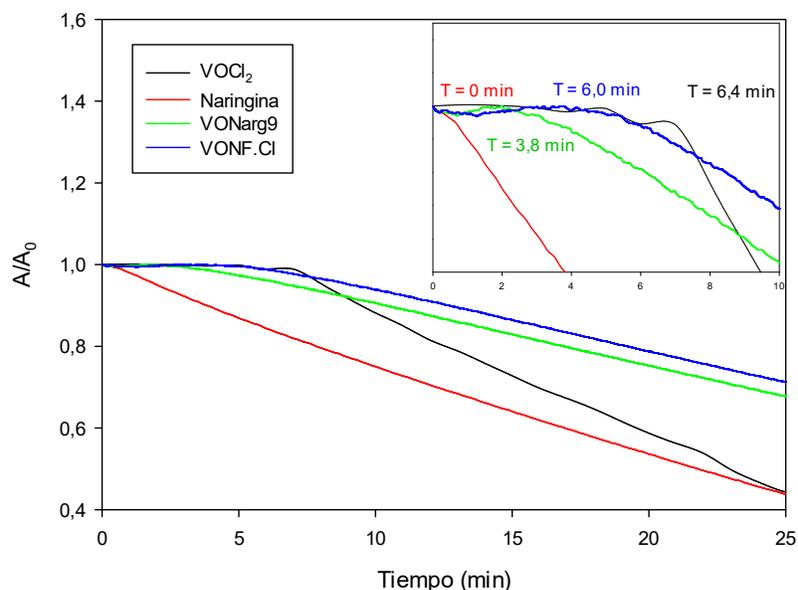


Figura IV-4. Descomposición de la piranina por radicales $\text{ROO}\cdot$ en presencia de VOCl_2 (negro), naringina (rojo), VONarg9 (verde) y VONF.Cl (azul).

El complejo VONF.Cl presentó una mejora con respecto al complejo VONarg9 de 2,2 min, correspondiente a un incremento del 57,89 % de efectividad. Sin embargo, los compuestos exhiben una actividad limitada para neutralizar al radical peroxilo, ya que el compuesto antioxidante de referencia, trolox, ocasiona una fase *lag* de 35,94 min⁸².

2.5. Conclusiones parciales

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que los complejos VONarg9 y VONF.Cl, exhibieron una mejor capacidad antioxidante con respecto al ligando naringina. Puntualmente, la capacidad antioxidante del complejo VONarg9, con respecto a la naringina, se vio mejorada en todos los casos, excepto frente al radical $\text{HO}\cdot$. Por otra parte, el complejo VONF.Cl presentó una actividad antioxidante superior a la exhibida por la naringina en todos los casos, así mismo, su actividad se vio incrementada con respecto al complejo VONarg9, excepto en su capacidad reductora frente al radical DPPH· (Tabla IV-1).

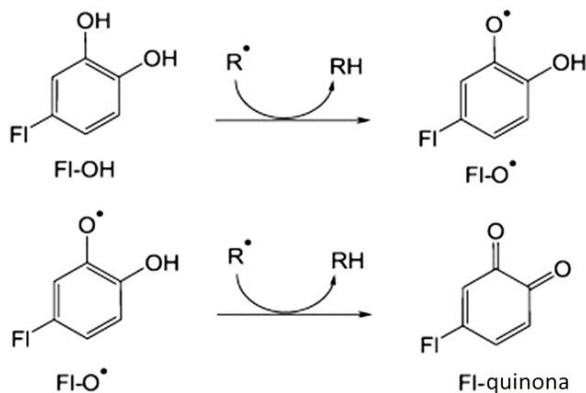
La mejora en la capacidad antioxidante se debe principalmente a la complejación con el catión oxidovanadio(IV) y la formación de un doble anillo quelato con el centro metálico, el cual permite la estabilización de electrones

desapareados a través de conjugación π con el centro $V=O$ ¹¹. Este efecto se vio aumentado para el complejo VONF.Cl debido a la inclusión de la fenantrolina en su estructura.

Tabla IV-1. Inhibición de radicales libres por acción de $VOCl_2$, naringina, VONarg9 y VONF.Cl.

Radical	% Inhibición			
	$VOCl_2$	Naringina	VONarg9	VONF.Cl
DPPH \cdot , 100 μ M	36,0 \pm 1,45	1,9 \pm 2,14	46,3 \pm 6,10	24,3 \pm 1,99
HO \cdot , 100 μ M	38,0 \pm 2	27,3 \pm 0,15	0	29,0 \pm 3,08
SOD (Cl_{50} , μ M)	15,0 \pm 0,2	>1000	870 \pm 5,2	35,5 \pm 3,6
ROO \cdot , lag (min), 100 μ M	6,4 \pm 1,1	0	3,8 \pm 0,8	6,0 \pm 0,4

Además, es importante considerar que la naringina posee una capacidad antioxidante moderada, ya que existen ciertas propiedades ausentes en su estructura que desempeñan un papel crucial en el mecanismo de neutralización de radicales libres. Este proceso implica la formación de radicales fenoxi-flavonoides de menor reactividad, los cuales posteriormente se oxidan a sus correspondientes quinonas (Esquema IV-5) ⁷¹.



Esquema IV-5. Eliminación de radicales libres por flavonoides. Tomado de Procházková et al., 2011 ⁷¹.

Estos mecanismos de acción son característicos de compuestos polifenólicos y están vinculados estrechamente a atributos específicos, como la presencia de múltiples grupos hidroxilo, especialmente en la posición C3, así como la estructura tipo catecol en el anillo B (ausentes en naringina). Además, la existencia de un doble enlace entre los carbonos C2 y C3 (que tampoco está presente en naringina) contribuye a estabilizar la carga del radical fenoxi-flavonoide a través de la resonancia electrónica con el anillo B, previniendo la propagación de reacciones en cadena de los radicales fenoxi-flavonoide ^{83,84}.

Estas afirmaciones pueden ser sustentadas al revisar el trabajo de Ye y colaboradores del 2009, en él, se obtuvieron e identificaron dos nuevos compuestos derivados de la naringina. Uno de ellos presentó un sustituyente hidroxilo adicional en la posición C3', mientras que el otro, dos sustituyentes hidroxilo adicionales en las posiciones C3' y C5'. Estas modificaciones estructurales condujeron a una mejora significativa en la capacidad de reducción frente al radical DPPH· a 100 µM, alcanzando un 38,4 % y un 43,6 % de reducción, respectivamente ⁷⁰.

En términos generales, a pesar de las mejoras observadas como resultado de la complejación, los compuestos VONarg9 y VONF.Cl solo pueden ser clasificados como agentes antioxidantes moderados. Esto se debe a la capacidad antioxidante limitada que presenta el ligando naringina debido a sus características estructurales. Sin embargo, la complejación con el catión oxidovanadio(IV) representa una estrategia prometedora para potenciar el perfil antioxidante de los flavonoides.

3. Determinación de la actividad anticancerígena y mecanismos de acción

Como se mencionó previamente, el cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células mutadas (anormales o dañadas), y puede afectar a casi todos los tejidos del cuerpo. Estas células eventualmente forman tumores, que pueden llegar a propagarse e invadir otros tejidos. Las células cancerígenas pueden destruir células sanas, bloquear su suministro de nutrientes u oxígeno, y ocasionar la acumulación de productos de desecho,

alterando el buen funcionamiento del organismo, llegando en los casos más avanzados a provocar la muerte ⁸⁵.

Desde el descubrimiento del metalofármaco cisplatino, el estudio de compuestos de coordinación para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, ha recibido gran interés por parte de la comunidad científica, especialmente, para el tratamiento del cáncer ⁸⁶. Este creciente interés, ha hecho posible la síntesis de nuevos potenciales agentes quimioterapéuticos, basados en diferentes metales como, arsénico, antimonio, bismuto, oro, vanadio, hierro, rodio, titanio, galio y platino, entre otros ⁸⁷.

La quimioterapia ralentiza o detiene el crecimiento de las células tumorales de rápida proliferación, a través de la regulación de procesos claves involucrados en la supervivencia celular, como la apoptosis, la transducción de señales, o la replicación del ADN ⁸⁸. Sin embargo, muchos compuestos quimioterapéuticos ven limitada su aplicabilidad clínica debido a la aparición de efectos adversos asociados a su uso ⁸⁹. Es por esta razón que los esfuerzos se centran en el desarrollo de terapias más específicas y eficaces.

Debido al gran desequilibrio generado por los altos niveles de especies reactivas de oxígeno, el cual conduce a la sobre-expresión del sistema antioxidante celular, y además, genera alteraciones metabólicas y genéticas, producto del estrés oxidativo, la regulación de la homeostasis redox en las células cancerígenas ha generado un gran interés como nueva estrategia terapéutica ⁹⁰.

Considerando que los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, pero también pueden ejercer efectos pro-oxidantes en células tumorales ⁹¹, a la vez que el vanadio puede participar de reacciones de óxido-reducción y producir especies reactivas de oxígeno a través de reacciones tipo Fenton, además de poseer diversas características biológicas relevantes ⁹², los complejos de coordinación obtenidos a partir de vanadio y flavonoides surgen como una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer a través de la modulación del estado redox celular ^{10,11}.

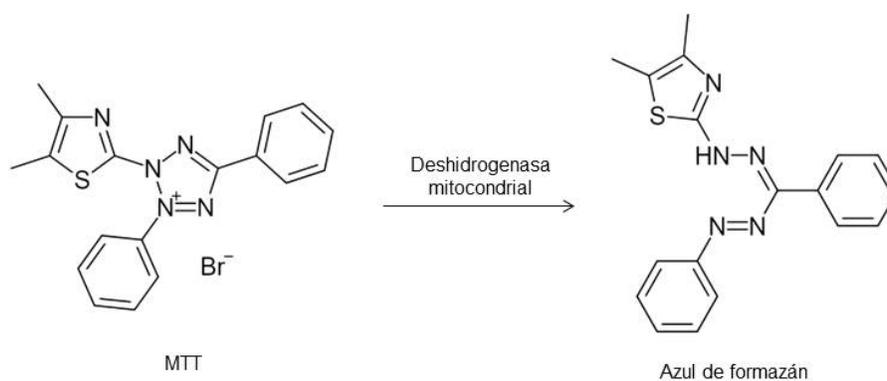
En esta sección se discutirán los resultados obtenidos de evaluar el potencial citotóxico de la naringina y sus complejos de coordinación obtenidos a partir del catión oxidovanadio(IV) (VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl), frente a la línea de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), también se discutirán los mecanismos de acción de estos compuestos, a partir de la determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno, la depleción de glutatión, y el cambio en el potencial de membrana mitocondrial.

Como ya fue mencionado, el efecto de VONarg12 pudo ser medido en este caso, dado que para las experiencias en cultivos celulares, se prepararon soluciones frescas de los compuestos y se agregaron rápidamente a las células, evitando así probables descomposiciones durante la manipulación previa a la experiencia. Además, dentro de las células, todos los complejos son capaces de interactuar con los sistemas quelantes naturales, y los sistemas antioxidantes naturales por lo que no es posible identificar las especies activas luego del ingreso de los compuestos a través de la membrana celular, dada la complejidad de dicho medio, y las bajas concentraciones usadas. Sin embargo, las reacciones de complejos metálicos dentro del medio celular son específicas y cruciales para su actividad biológica *in vivo*.

3.1. Determinación de la viabilidad celular por el método del MTT

La toxicidad celular o citotoxicidad presentada por los compuestos estudiados en este trabajo, se determinó al evaluar la viabilidad celular por el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), el procedimiento seguido para la determinación se detalló en el apartado 6.2 del capítulo II. Este ensayo de viabilidad se basa en la conversión del sustrato MTT por parte de las células metabólicamente activas (viables) en un producto cromogénico. El MTT, que es soluble en agua y de color amarillo, es reducido por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales que producen NADH o NADPH, a azul de formazán, de color violeta e insoluble en agua⁹³ (Esquema IV-6). La cantidad de formazán producida es directamente proporcional a la cantidad de células viables, por lo que, después de solubilizar este producto con un solvente apropiado, su absorbancia se mide a 570 nm y la viabilidad celular se

determina por comparación con el control (sin agregado de agente citotóxico), al cual se le asigna un valor arbitrario del 100 % de viabilidad.



Esquema IV-6. Reducción del MTT a azul de formazán.

Los resultados mostraron que la naringina no ocasionó una disminución significativa en la viabilidad celular hasta 100 μM , mientras que el tratamiento con los complejos de coordinación mostró resultados variables. Los complejos binarios VONarg9 y VONarg12 ocasionaron la disminución de la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración. Por otra parte, el complejo ternario VONF.Cl ocasionó una disminución significativa de este parámetro desde concentraciones bajas (17,25 % a 2 μM y 43,17 % a 5 μM) y se mantuvo en torno al 50 % desde 10 μM (Figura IV-5). El porcentaje de inhibición sobre la viabilidad celular a 100 μM para los diferentes compuestos estudiados fue de: naringina ($4,93 \pm 2,92$ %) < VONarg9 ($20,84 \pm 2,90$ %) < VONarg12 ($42,56 \pm 0,76$ %) < VONF.Cl ($50,91 \pm 3,91$ %) (Figura IV-5). En todos los casos los valores de Cl_{50} fueron superiores a 100 μM , excepto para el complejo ternario VONF.Cl, cuyo valor fue igual a 48,44 μM (determinado por ajuste de la curva, mediante el uso de SigmaPlot).

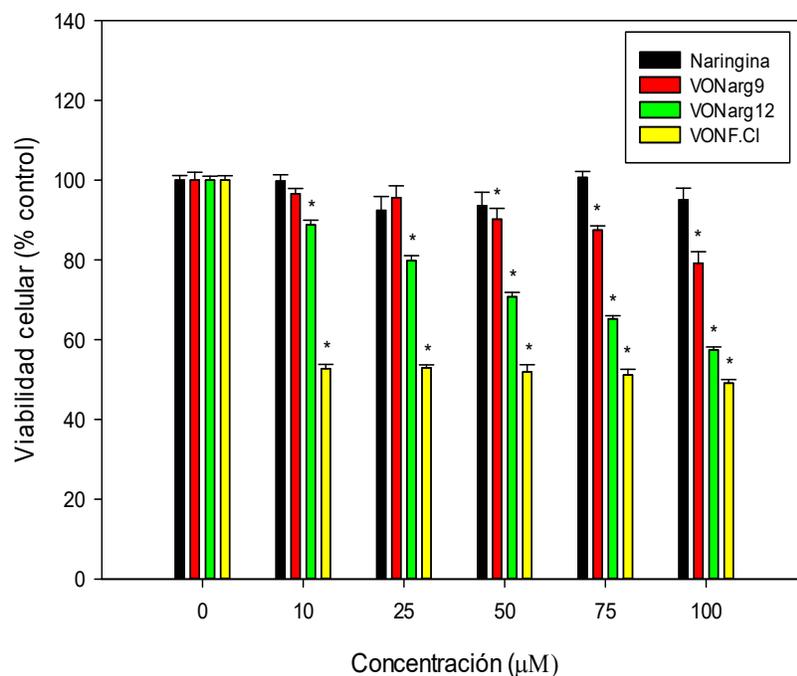


Figura IV-5. Viabilidad celular de la línea A549 tratada con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.Cl (amarillo) por 24 h (0 – 100 μM).

Para estimar la mejora en la actividad anticancerígena *in vitro* en la línea celular A549 debido a la modificación estructural de naringina por formación de los complejos de coordinación, se compararon los valores de inhibición en la viabilidad celular a 100 μM. La mejora presentada por el complejo VONarg9 fue del 15,91 %, para el complejo VONarg12 se obtuvo un 37,63 % de mejora, y el complejo VONF.Cl exhibió una mejora del 45,98 %, con respecto al ligando naringina. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas en las que se ha demostrado que la formación de complejos de coordinación con el catión oxidovanadio(IV) potencia la actividad anticancerígena del flavonoide de partida, cuando la coordinación se produce a través de los grupos C=O y C5O⁻¹¹. Del mismo modo, si la complejación se da a través de la región glicosídica el efecto antitumoral es superior^{94,95}. Así mismo, cuando se emplea un ligando auxiliar como la fenantrolina, que confiere cualidades adicionales, como el incremento del carácter lipófilo, y la capacidad para intercalarse con el ADN, el aumento de la actividad anticancerígena es aún más significativo⁹⁶.

3.2. Determinación de la viabilidad celular frente a células normales

Uno de los grandes inconvenientes de los compuestos quimioterapéuticos es su toxicidad frente a las células normales, lo que finalmente se traduce en el advenimiento de efectos indeseables sobre el paciente. Con el fin de comprobar la inocuidad de los compuestos estudiados se evaluó su citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares normales.

El complejo VONarg9 fue evaluado sobre la línea normal derivada de riñón de embrión humano HEK293. Los resultados mostraron que el complejo no ocasionó una disminución notable de la viabilidad celular con respecto a lo observado sobre la línea A549, ya que a una concentración de 100 μM , el complejo ocasionó una reducción en la viabilidad de las células HEK293 de únicamente $7,86 \pm 2,5 \%$ (Figura IV-6). Considerando que la reducción en la viabilidad sobre la línea A549 fue del 20,84 %, el efecto del complejo sobre las células cancerígenas fue 12,98 % más pronunciado en comparación con las células normales, lo que equivale a ser 2,65 veces más tóxico.

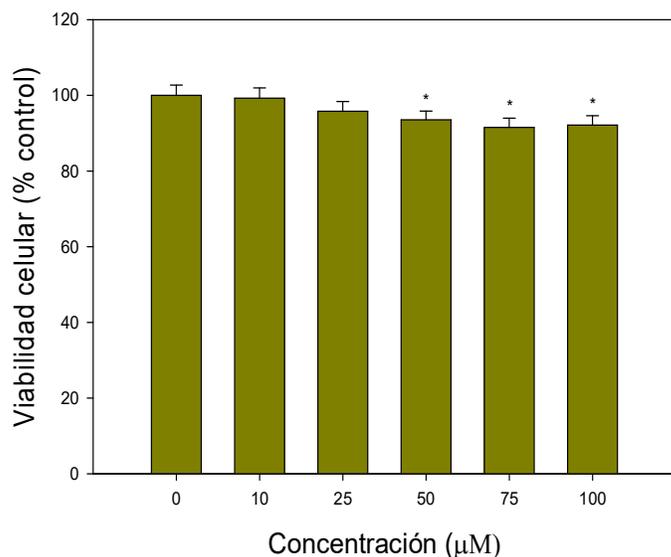


Figura IV-6. Viabilidad celular de la línea HEK293 tratada con VONarg9 por 24 h (0 – 100 μM).

Además, el complejo VONF.CI fue evaluado sobre la línea celular de amnios normal humana, WISH. Los resultados mostraron una disminución significativa

en la viabilidad celular, incluso a concentraciones bajas ($13,43 \pm 1,3 \%$ a $2 \mu\text{M}$), sin embargo, la reducción de la viabilidad celular se mantuvo constante en torno al 27% desde $10 \mu\text{M}$ hasta alcanzar una inhibición del $26,46 \pm 1,01 \%$ a $100 \mu\text{M}$ (Figura IV-7). Al comparar este resultado con la disminución en la viabilidad celular observada sobre la línea A549 a $100 \mu\text{M}$ ($50,91 \pm 3,91 \%$), se puede identificar que el efecto del complejo ternario sobre las células cancerígenas fue mayor en un $24,45 \%$. El complejo ternario demostró ser casi el doble de tóxico sobre las células cancerígenas A549 en comparación con las células normales WISH.

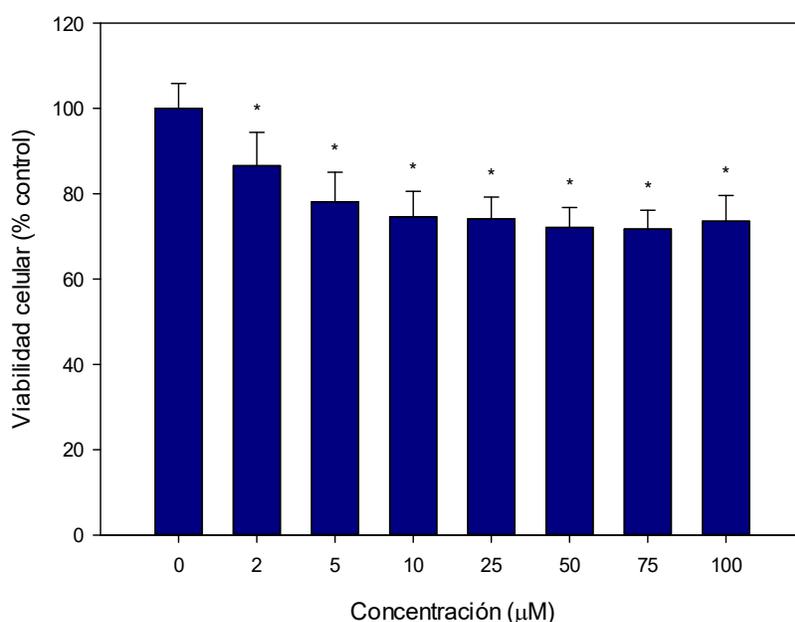


Figura IV-7. Viabilidad celular de la línea WISH tratada con VONF.CI por 24 h (0 – 100 μM).

Por otra parte, el complejo VONarg12 también fue evaluado sobre la línea HEK293. Los resultados mostraron que el complejo ocasionó una disminución moderada de la viabilidad celular y hubo una diferencia considerable con respecto a lo observado en las células A549 para este complejo. En ambos casos, el complejo VONarg12 ocasionó la disminución de la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración. Sobre las células normales se pudo notar un efecto estadísticamente significativo desde $5 \mu\text{M}$, con una reducción igual al $9,53 \pm 13,04 \%$ en la viabilidad, dicha reducción, se mantuvo en torno al 13% hasta alcanzar una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($15,19 \pm 6,9 \%$) (Figura IV-8). Mientras que en las células de adenocarcinoma de pulmón, la

viabilidad se redujo en un $20,19 \pm 1,22$ % con una concentración de VONarg12 igual a $10 \mu\text{M}$, esta continúa disminuyendo conforme se aumentó la concentración hasta alcanzar una reducción de $42,56 \pm 0,76$ % en la viabilidad a $100 \mu\text{M}$ (Figura IV-5).

Si se compara el efecto a $100 \mu\text{M}$, se puede afirmar que el efecto sobre las células de cáncer (A549), con respecto a lo observado sobre las normales (HEK293), es un $27,37$ % más efectivo, siendo 2,8 veces mayor.

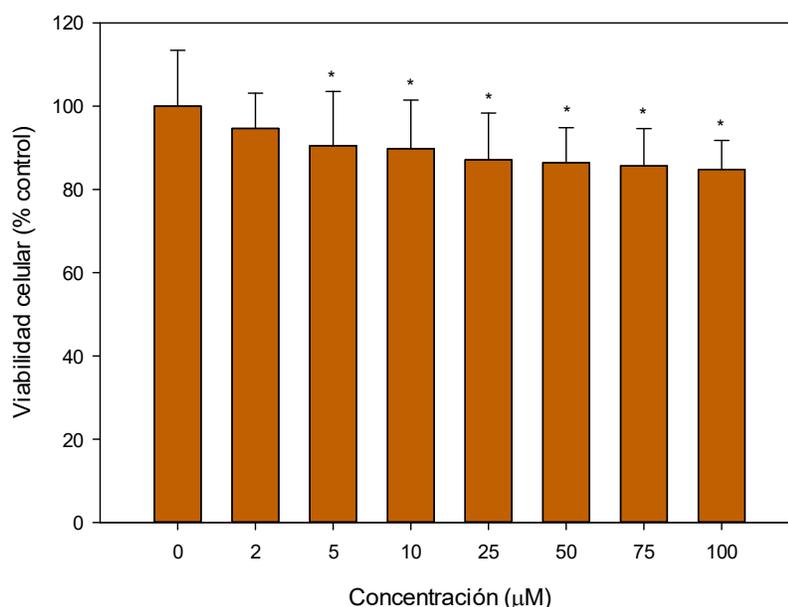
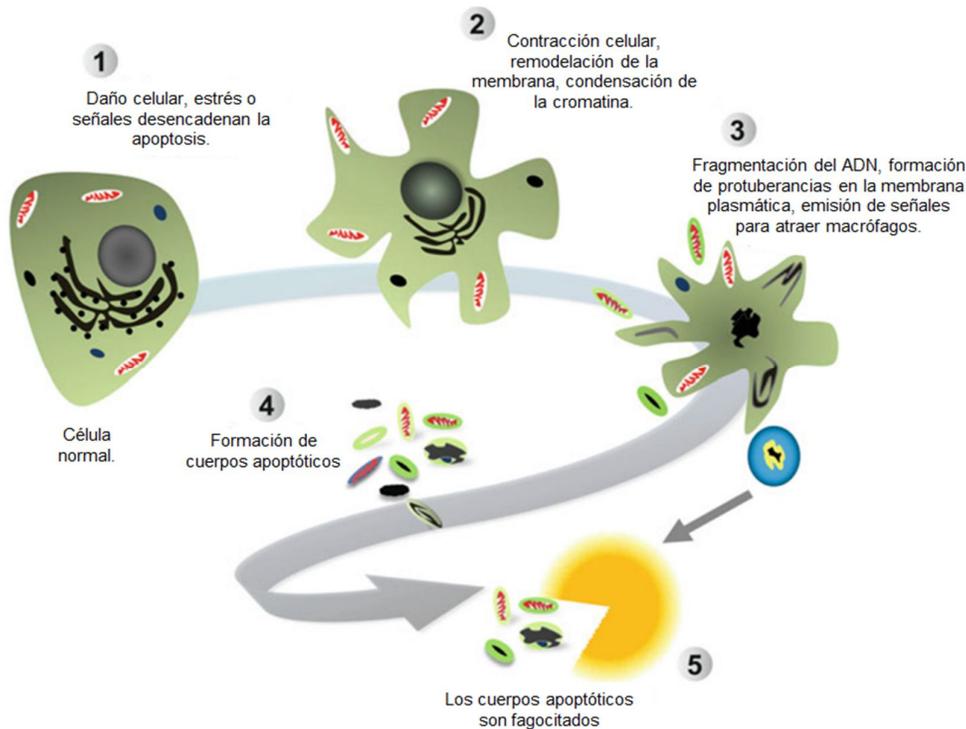


Figura IV-8. Viabilidad celular de la línea HEK293 tratada con VONarg12 por 24 h (0 – 100 μM).

3.3. Análisis morfológico por tinción con cristal violeta

Con el fin de desarrollar terapias eficaces para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades caracterizadas por anomalías en la regulación de la muerte celular, es necesario comprender las diferentes formas en que las células pueden perder viabilidad y eventualmente morir ⁹⁷. El estudio de las alteraciones morfológicas causadas tras el tratamiento con agentes quimioterapéuticos resulta fundamental para caracterizar y comprender mejor el mecanismo de muerte celular inducido por estos. Históricamente se han utilizado estos morfotipos para clasificar la muerte celular en tres formas diferentes: la muerte celular tipo I o apoptosis que ocasiona el redondeo de la célula, la reducción del volumen celular y nuclear, condensación de la

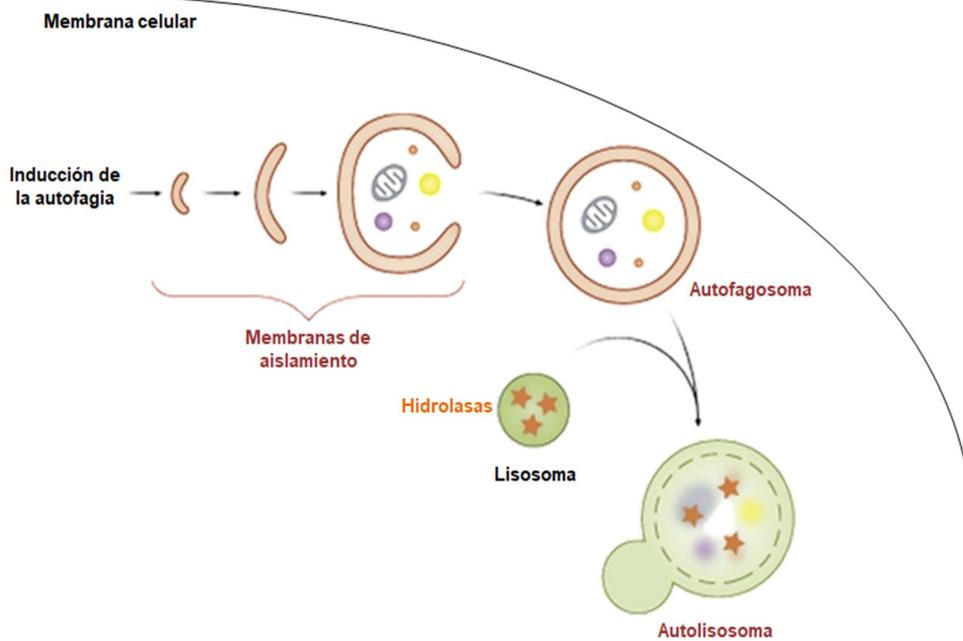
cromatina (picnosis), retracción de pseudopodos (si los hubiera), fragmentación nuclear (cariorrhexis) y formación de protuberancias en la membrana plasmática, el proceso termina con la formación de vesículas (comúnmente conocidas como cuerpos apoptóticos), que posteriormente son fagocitadas por células cercanas y degradadas en los lisosomas ^{98,99} (Esquema IV-7).



Esquema IV-7. Cambios celulares y morfológicos observados durante la apoptosis. Adaptado de Singh y Bose., 2015 ¹⁰⁰.

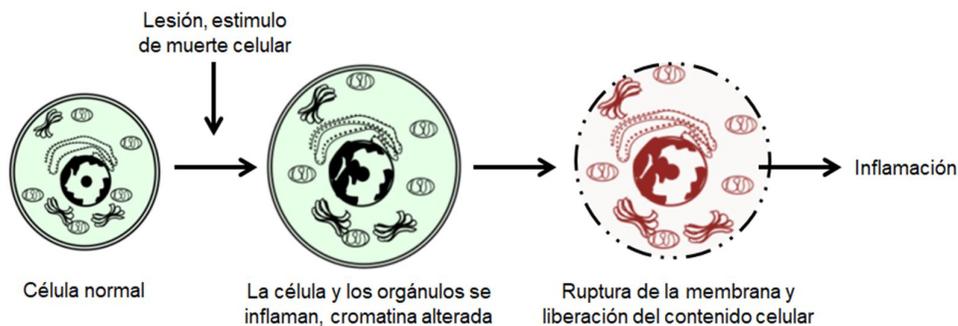
Por otro lado, la muerte celular tipo II o autofagia, es un concepto que se puede confundir con un proceso de muerte celular, sin embargo, no es un mecanismo de muerte, sino uno que puede acompañarla ^{98,101}. Este proceso está relacionado con la supervivencia de la célula a través de la reutilización de componentes celulares bajo condiciones específicas de estrés, como la privación de nutrientes (restricción calórica), o como una respuesta a señales durante la diferenciación celular, la embriogénesis o de daño a orgánulos celulares ⁹⁷. Es un proceso caracterizado por la falta de condensación de la cromatina y por formación de vesículas de doble membrana denominadas autofosomas, estas vesículas secuestran material citoplasmático y después

se fusionan con el lisosoma, en donde ocurre la degradación del material atrapado ^{99,102} (Esquema IV-8).



Esquema IV-8. Cambios celulares y morfológicos observados durante la autofagia. Adaptado de Shibutani y Yoshimori., 2014 ¹⁰³.

Por último, la muerte celular tipo III o necrosis, se caracteriza por la inflamación citoplasmática, hinchazón de orgánulos, condensación moderada de la cromatina y ruptura de la membrana plasmática ^{98,99} (Esquema IV-9).



Esquema IV-9. Cambios celulares y morfológicos observados durante la necrosis. Adaptado de Escobar et al., 2015 ¹⁰⁴.

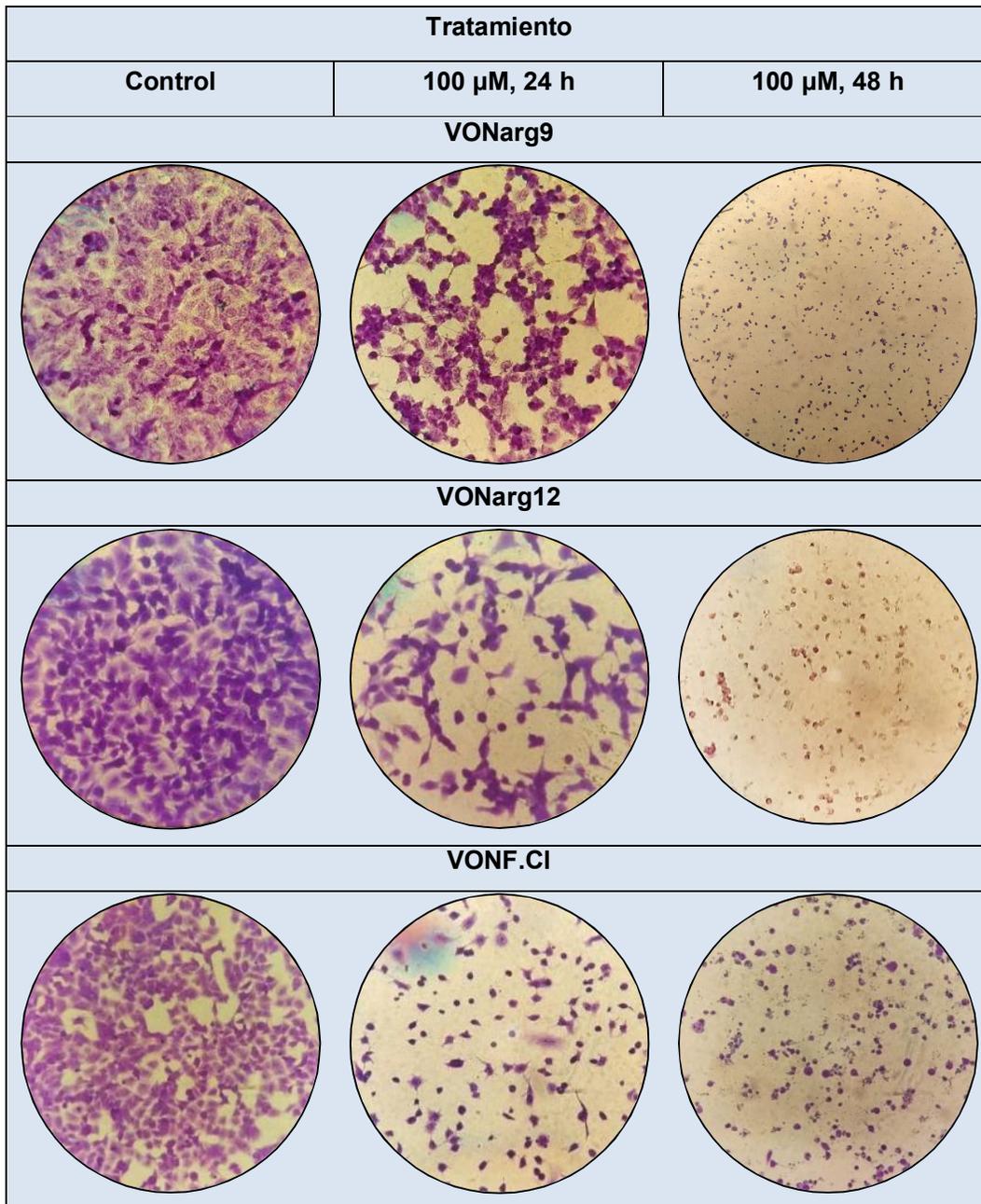
A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma alternativa no controlada de muerte celular que es inducida por lesiones externas, como la hipoxia o la

inflamación. Este proceso a menudo implica la regulación al alza de varias proteínas y compuestos pro-inflamatorios, como el factor nuclear κ B (NF- κ B), lo que resulta en la ruptura de la membrana celular y la liberación del contenido celular en las áreas circundantes, lo que provoca una cascada de inflamación y daño en el tejido ⁹⁷.

Las técnicas de tinción celular se utilizan en biología celular y microscopía para visualizar y estudiar diversos componentes, estructuras y procesos celulares. Se han desarrollado diferentes métodos de tinción celular con la finalidad de mejorar el contraste entre las diferentes estructuras celulares y tisulares, lo que permite su estudio y visualización a través de diferentes métodos ópticos. Estas técnicas implican el uso de tintes o compuestos específicos que se unen selectivamente a elementos celulares particulares, haciéndolos visibles bajo un microscopio ^{105,106}.

En este trabajo se utilizó la tinción con cristal violeta para observar los cambios morfológicos producidos luego del tratamiento con los compuestos estudiados. Este colorante posee carga positiva en su estructura, puede atravesar la membrana celular y unirse a las proteínas aniónicas y al ADN, dotando a las células de un color violeta. Esta técnica de tinción simple no proporciona detalles ultraestructurales detallados de las células, sin embargo, permite apreciar su forma, tamaño y estructura general bajo el microscopio. También, puede revelar el contenido celular general, incluyendo el citoplasma y, en el caso de células eucariotas, el núcleo ¹⁰⁷⁻¹¹⁰. El procedimiento seguido para realizar la tinción fue detallado en el apartado 6.3 del capítulo II.

A partir de las fotografías se puede apreciar que las células A549 no tratadas muestran su morfología epitelial característica y una estrecha adhesión celular (Esquema IV-10) ¹¹¹. Luego de ser tratadas por 24 h con los complejos VONarg9, VONarg12 y VONF.CI, se observó la pérdida del volumen celular y nuclear, redondeo de las células, y una disminución considerable en el número de células, además, se pudo observar la presencia de cuerpos apoptóticos, la cual se hizo más evidente después de 48 h de incubación (Esquema IV-10). Estos resultados sugieren que la muerte celular ocasionada por estos compuestos se da a través de un proceso apoptótico.

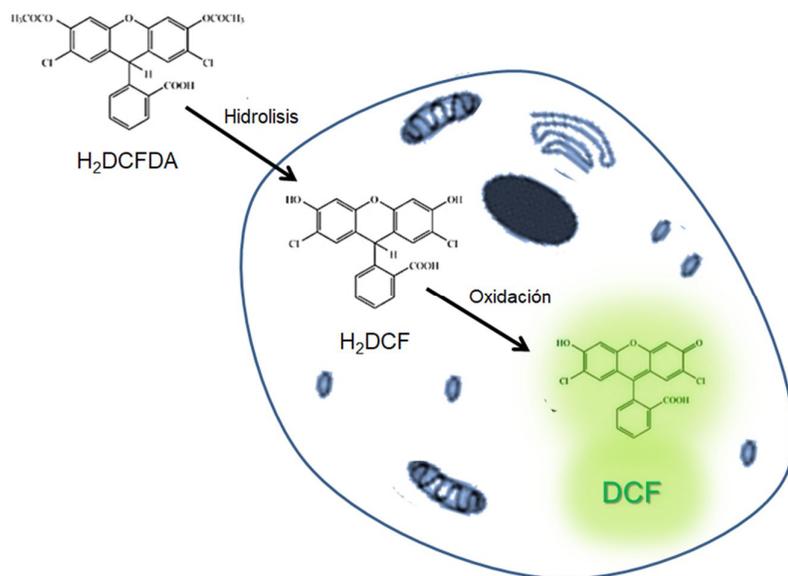


Esquema IV-10. Cambios en la morfología celular de la línea A549 por el tratamiento con VONarg9, VONarg12 y VONF.CI durante 24 h y 48 h a 100 μ M.

3.4. Medida de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Como se ha mencionado previamente, las células cancerígenas poseen un estado redox alterado y vulnerable con respecto a las células normales. Esto hace que el aumento del estrés oxidativo suponga una estrategia terapéutica prometedora y selectiva frente a distintos tipos de cáncer ¹¹².

La generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) por el tratamiento con naringina, VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl en las células A549 se determinó empleando la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). El procedimiento seguido para la determinación se detalló en el apartado 6.4 del capítulo II. El compuesto H₂DCFDA permea la membrana celular, y es posteriormente hidrolizado (desacetilado) a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF) (no fluorescente) por acción de esterasas intracelulares, este a su vez es oxidado en el medio intracelular al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) ¹¹³ (Esquema IV-11). La cantidad de EROs generada es directamente proporcional a la fluorescencia obtenida, después, las EROs son determinadas por comparación con el control (sin agregado de agente citotóxico).



Esquema IV-11. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno empleando la sonda H₂DCFDA.

Los resultados obtenidos mostraron que el ligando naringina no ocasionó un cambio significativo en la generación de especies reactivas de oxígeno después de 24 h de incubación a 100 μ M ($94,3 \pm 8,5$ %), por otra parte, los complejos binarios VONarg9 y VONarg12 elevaron los niveles de las especies reactivas de oxígeno en forma dependiente de la concentración, alcanzando valores iguales al $244,23 \pm 7,7$ % y $212,23 \pm 6,9$ % a 100 μ M, respectivamente (Figura IV-9).

Por otra parte, el complejo ternario VONF.CI pareció disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno, pues pasadas 24 h de incubación, los niveles de EROs se mantuvieron en torno al 86 % desde 10 μ M, hasta alcanzar un valor igual al $80,4 \pm 2,9$ % a 100 μ M (Figura IV-9). Sin embargo, estas observaciones resultan atípicas considerando los antecedentes y la evidencia existente, dado que, previamente se ha observado que la complejación del catión oxidovanadio(IV) con flavonoides hace que estos nuevos compuestos ocasionen en las células un aumento en la producción de EROs, al igual que la mayoría de compuestos de vanadio ^{11,114–117}.

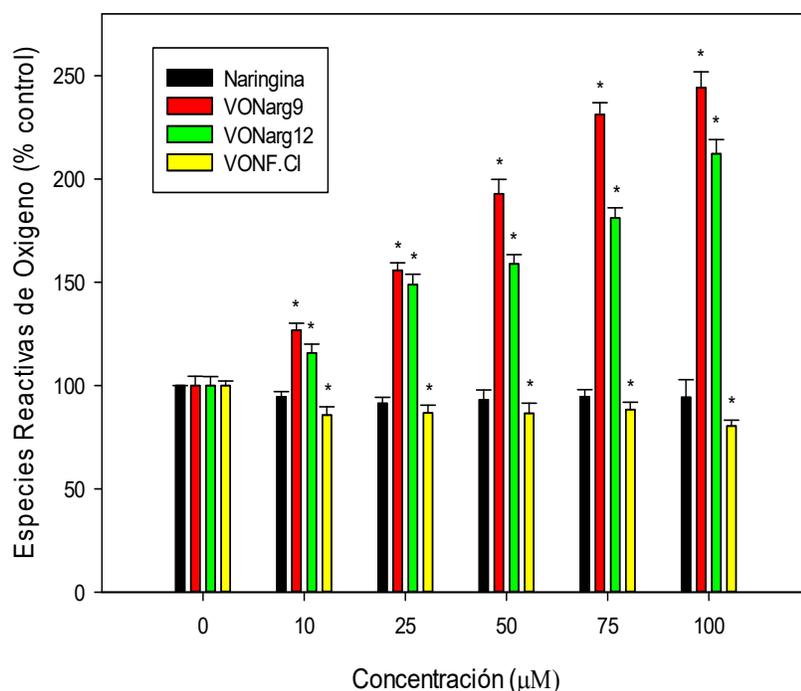


Figura IV-9. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.CI (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μ M).

Si se tiene en cuenta que el complejo VONF.CI ejerce un mayor efecto citotóxico en comparación a VONarg9 y VONarg12, evidenciado por valores significativamente más bajos en la viabilidad celular (ver apartado 4.1), incluso a bajas concentraciones, y cambios morfológicos más evidentes después de 24 h de tratamiento, además de una mayor depleción del antioxidante endógeno glutatión (GSH) (ver apartado 4.5), la reducción en la producción de EROs no

parece factible. Debido a esto, se determinó la producción de EROs, después de un periodo de incubación igual a 4 h con VONF.Cl (Figura IV-10), para determinar si el efecto de generación de EROs podría producirse al inicio de la incubación.

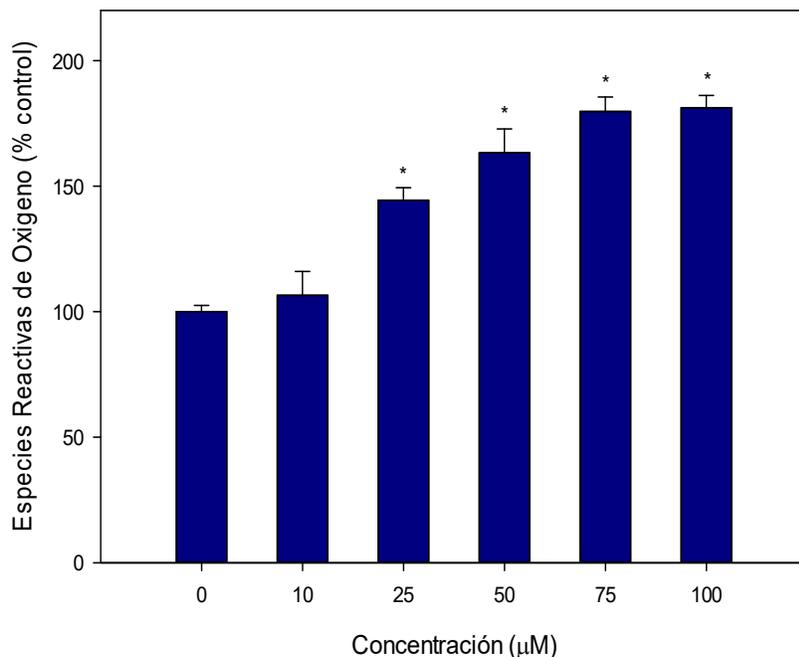


Figura IV-10. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la línea A549 por el tratamiento con VONF.Cl durante 4 h (0 – 100 μM).

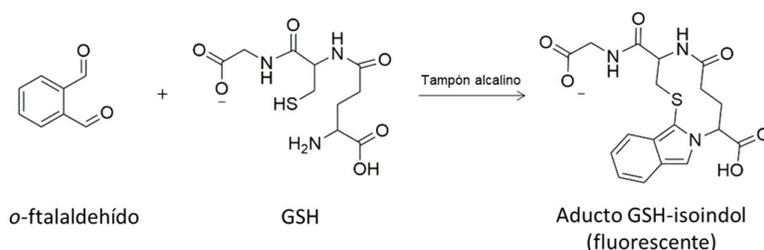
El resultado obtenido después del tratamiento por 4 h, evidenció la generación de especies reactivas de oxígeno en forma dependiente de la concentración, hasta alcanzar un valor del $181,23 \pm 4,9 \%$ a 100 μM, lo cual confirma, como es de esperar, que los complejos ejerzan sus efectos citotóxicos a través del aumento en el estrés oxidativo.

El efecto pro-oxidante por parte de los compuestos de vanadio ha sido ampliamente investigado y discutido, y se explica principalmente por reacciones de tipo Fenton, bio-reducción de vanadato por la acción de glutatión (GSH), flavoenzimas o NAD(P)H oxidasas con posterior formación de EROs y la promoción indirecta de EROs, probablemente por interacciones mitocondriales ¹¹⁷.

3.5. Medida de sistemas antioxidantes

El glutatión (GSH) es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina; es un agente antioxidante intracelular que protege a las células del daño causado por los peróxidos lipídicos, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y los xenobióticos. Existe en forma de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), siendo el tiol no proteico más abundante presente en concentraciones milimolares en los tejidos de los mamíferos y jugando un papel importante en la eliminación y desintoxicación de carcinógenos. Su síntesis, transporte, utilización y metabolismo están estrictamente controlados para mantener la homeostasis intracelular y el equilibrio redox. Se ha demostrado que la alteración del sistema antioxidante del glutatión está asociada con múltiples formas de muerte celular programada en las células cancerosas. Por lo tanto, se han desarrollado varias terapias novedosas para atacar el sistema antioxidante GSH en los tumores como un medio para aumentar la respuesta y disminuir la resistencia a los medicamentos ^{118,119}.

Debido al comportamiento pro-oxidante en cultivo de los complejos de coordinación estudiados en este trabajo, se determinó cómo el tratamiento con estos afectó los niveles de glutatión en las células A549. Para ello, se empleó el método adaptado de Hissin y Hilf ¹²⁰ detallado en el apartado 6.5 del capítulo II. El mismo, se basa en la formación de productos fluorescentes por reacción entre el glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) con *o*-ftalaldehído (OPT), a pH 8 y 12, respectivamente (Esquema IV-12). Posteriormente, la fluorescencia generada por estos productos es empleada para determinar el cambio en los niveles de glutatión por comparación con el control (sin agregado de agente citotóxico).



Esquema IV-12. Formación de un producto fluorescente por reacción de glutatión reducido (GSH) con *o*-ftalaldehído (OPT). Adaptado de Francioso et al., 2021 ¹²¹.

Los resultados obtenidos muestran que el ligando naringina no ocasionó una disminución significativa en los niveles de glutatión después de 24 h de incubación, pues la depleción de GSH a 100 μM fue del $7,4 \pm 7,3 \%$. Por otra parte, los complejos VONarg9, VONarg12 y VONF.CI, ocasionaron la disminución en los niveles de GSH en forma dependiente de la concentración, hasta alcanzar valores de depleción de $23,8 \pm 2,86 \%$, $46,05 \pm 2,99 \%$ y $91,17 \pm 1,43 \%$ a 100 μM , respectivamente (Figura IV-11).

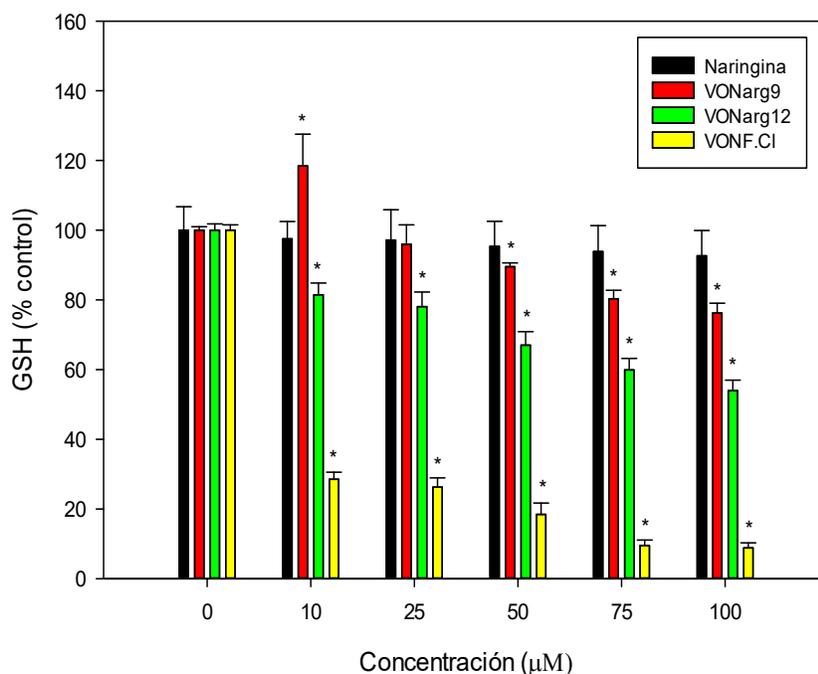


Figura IV-11. Cambio en los niveles de glutatión reducido (GSH) en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.CI (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μM).

Por otra parte, al evaluar la variación de la relación GSH/GSSG, se obtuvieron resultados similares a los encontrados para la depleción de GSH vistos anteriormente. Nuevamente, el ligando naringina no ocasionó una variación significativa de la relación GSH/GSSG. Por otro lado, los complejos de coordinación VONarg9, VONarg12 y VONF.CI después de 24 h de incubación con las células A549, ocasionaron la reducción de los valores de la relación GSH/GSSG en forma dependiente de la concentración hasta alcanzar valores de disminución a 100 μM iguales al $18,03 \pm 2,35 \%$, $28,07 \pm 4,39 \%$ y $79,41 \pm 0,77 \%$, respectivamente (Figura IV-12).

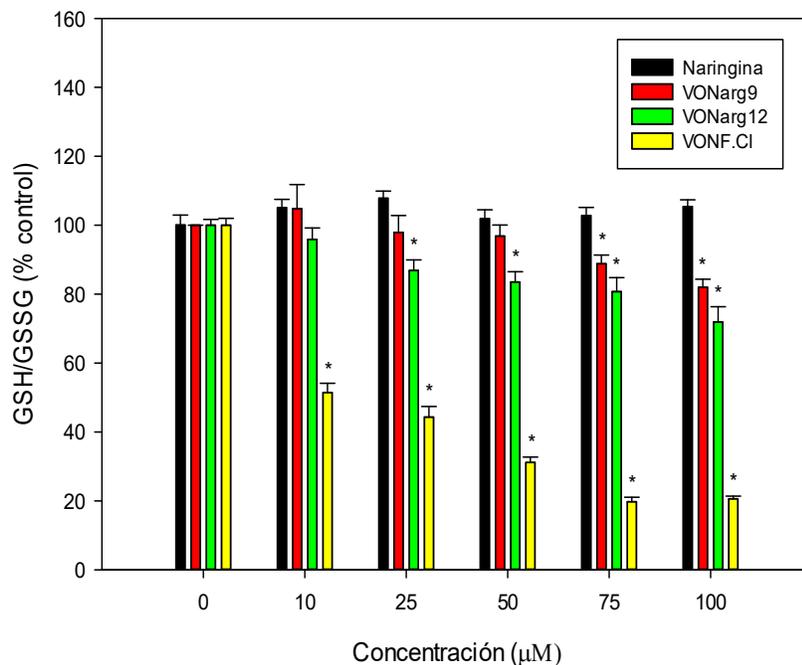


Figura IV-12. Cambio de la relación de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.CI (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μM).

Si bien, no puede notarse una correlación directa entre la generación de especies reactivas de oxígeno y la depleción de GSH, o la variación de la relación GSH/GSSG, es evidente que los complejos de coordinación estudiados en este trabajo interfieren con la homeostasis redox de las células cancerígenas A549, siendo aparentemente el complejo VONF.CI el que interfiere en mayor medida, debido a una mayor depleción de glutatión, y una generación temprana de EROs, lo cual podría estar relacionado con una mayor capacidad para atravesar la membrana celular e ingresar al interior de la célula, debido a la inclusión de fenantrolina en su estructura, lo cual ocasionaría además de la generación de EROs en el espacio intracelular, una mayor interacción con otros blancos celulares, en comparación con VONarg9 y VONarg12.

3.6. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

La función mitocondrial es un indicador clave del bienestar celular, y puede ser determinada al estudiar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), el cual se define como la capacidad de las mitocondrias para mantener

el gradiente electroquímico necesario para producir ATP ¹²². Para medir los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, se empleó el colorante lipófilo, de color verde fluorescente, capaz de atravesar la membrana celular yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆), que se acumula en las mitocondrias debido a su gran potencial de membrana negativo ¹²³. El procedimiento empleado para la determinación se detalló en el apartado 6.6 del capítulo II.

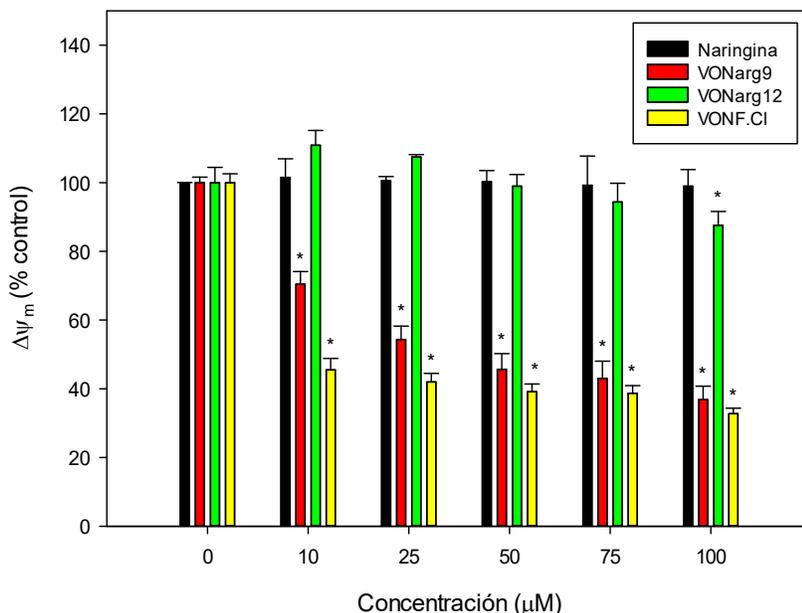


Figura IV-13. Cambio del potencial de membrana mitocondrial en la línea A549 por el tratamiento con naringina (negro), VONarg9 (rojo), VONarg12 (verde) y VONF.CI (amarillo) durante 24 h (0 – 100 μM).

Los resultados de la determinación revelaron que el ligando naringina no ocasionó cambios significativos en el potencial de membrana mitocondrial. En contraste, el complejo VONarg12 provocó cambios estadísticamente significativos a 100 μM ($p < 0.05$), resultando en la disminución de este parámetro en un $12,43 \pm 4,03$ %. Por otra parte, los complejos VONarg9 y VONF.CI provocaron la disminución del potencial de membrana mitocondrial en forma dependiente de la concentración desde concentraciones bajas. El complejo VONarg9 produjo una disminución del $\Delta\psi_m$ del $29,56 \pm 3,65$ % a 10 μM y del $63,18 \pm 3,94$ % a 100 μM. En comparación, el complejo VONF.CI mostró una disminución más pronunciada desde concentraciones bajas, con

una reducción del $\Delta\psi_m$ del $54,5 \pm 3,32$ % a $10 \mu\text{M}$ y una disminución del $67,3 \pm 1,6$ % a $100 \mu\text{M}$ (Figura IV-13).

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial, o expresado de otra manera, la despolarización mitocondrial, indica la pérdida del gradiente electroquímico necesario para la producción de ATP ¹²². Cuando la membrana mitocondrial se despolariza, la producción de ATP se detiene, lo que puede conducir a la muerte celular. En este caso, la despolarización mitocondrial es ocasionada por la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de los complejos de coordinación, y el aumento del estrés oxidativo en las células A549. La despolarización mitocondrial ocasiona la liberación de citocromo c, el cual conduce a la muerte celular por la vía apoptótica intrínseca, también conocida como vía mitocondrial ¹²⁴.

El complejo VONarg12 produce menor despolarización mitocondrial, pero el aumento de las especies reactivas de oxígeno (apartado 4.4) y la depleción de la relación GSH/GSSG (apartado 4.5), permiten asegurar que la muerte celular sea también ocasionada mediante la vía apoptótica intrínseca. Además, el estudio morfológico (apartado 4.3), muestra que hay cambios que indican un proceso apoptótico (contracción de citoplasma, reducción del núcleo y de las prolongaciones intercelulares).

3.7. Absorción de vanadio intracelular

De los tres complejos de vanadio estudiados en este trabajo, el que generó mayores efectos citotóxicos sobre las células A549 fue el complejo ternario VONF.Cl. En comparación al complejo VONarg9, el complejo ternario posee una diferencia estructural importante: el intercambio de un ligando naringina por fenantrolina. Esta sustitución le confiere al complejo un carácter lipófilo aumentado, lo cual le permitiría atravesar con mayor facilidad la membrana celular y ejercer sus efectos anticancerígenos desde el interior de la célula, ya que estos compuestos para ser efectivos, deben alcanzar los blancos terapéuticos al interior de esta ¹²⁵, por otro lado, también favorecería la acumulación de vanadio, ocasionando efectos citotóxicos mejorados.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se cuantificó la cantidad de vanadio intracelular luego del tratamiento con los complejos VONarg9, VONarg12 y VONF.CI. El procedimiento seguido para esta determinación se detalló en el apartado 6.7 del capítulo II. En breve, el procedimiento consistió en lisar las células, posterior al tratamiento con los complejos durante 24 h, para finalmente realizar la cuantificación por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). El resultado obtenido (Tabla IV-2), confirma la hipótesis planteada. Pudo observarse un aumento del 63,57 % de vanadio intracelular por tratamiento con VONF.CI en comparación a VONarg9, atribuible a la presencia de fenantrolina en su estructura, como fue evidenciado en trabajos previos ⁹⁶. En contraposición, el complejo VONarg12 exhibió una menor penetración celular, ya que el contenido intracelular de vanadio para este complejo fue un 69,93 % menor en comparación con el complejo VONarg9.

Tabla IV-2. Contenido de vanadio intracelular (nmol V/mg proteína) de células A549 por el tratamiento con VONarg9, VONF.CI y VONarg12 durante 24 h a 100 μ M.

	Contenido de vanadio intracelular (nmol V/mg proteína)
Control	1,71 \pm 0,51
VONarg9	11,31 \pm 0,75
VONF.CI	18,45 \pm 1,06
VONarg12	3,40 \pm 0,16

El complejo VONF.CI contiene un ligando lipofílico en su estructura, que puede desempeñar un papel crucial para facilitar su difusión a través de la membrana celular y su posterior acumulación dentro de la célula. Estos valores concuerdan con la tendencia observada en los valores de IC₅₀, lo que destaca cómo los efectos citotóxicos a menudo están influenciados, al menos parcialmente, por la internalización celular. Por otra parte en el complejo VONarg9 el ion [V^{IV}O]²⁺ coordina con dos ligandos naringina, lo que facilitaría el ingreso a la célula con respecto al complejo VONarg12, que sólo posee un ligando naringina en su esfera de coordinación. Asimismo, este último en solución es un complejo aniónico, por lo que podría penetrar a la célula a través de los canales aniónicos y no por difusión pasiva.

Para este último caso, se realizó un estudio preliminar con la intención de evaluar el potencial mecanismo de captación celular del complejo, para este fin, se empleó un bloqueador de canales aniónicos, el ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) (ver apartado 6.8 del capítulo II). Se puede observar (Figura IV-14) que el complejo VONarg12 podría estar siendo captado por las células a través de dichos canales, ya que cuando se realizó el pretratamiento con DIDS no se observó una muerte celular significativa, pues al ser tratadas a 100 μM con VONarg12 la viabilidad fue del $92,05 \pm 5,60 \%$. A esta misma concentración sin pretratamiento con DIDS la viabilidad fue del $57,44 \pm 0,76 \%$. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los canales aniónicos están involucrados en el transporte del complejo VONarg12 hacia el interior de la célula, desde donde ejercería su efecto citotóxico.

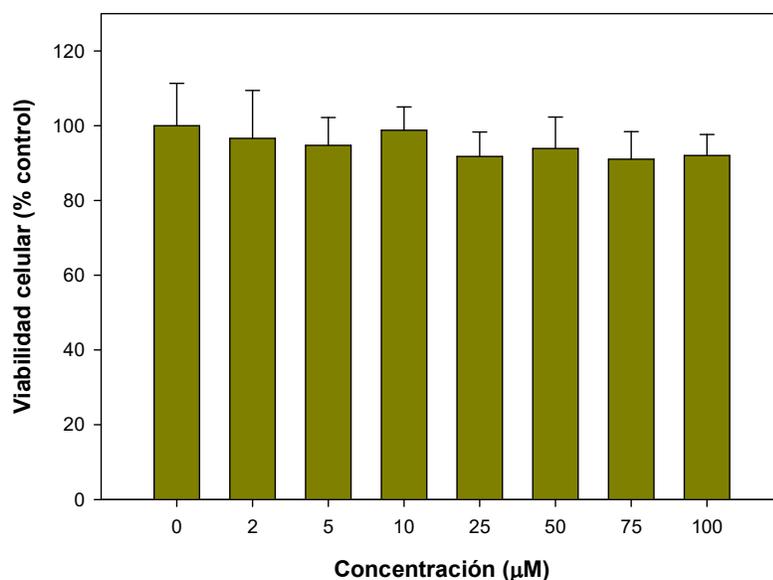


Figura IV-14. Viabilidad celular de la línea A549 tratada con VONarg12 por 24 h (0 – 100 μM). Las células fueron pre incubadas con DIDS (ácido diisotiociano-2,2'-etilbenodisulfónico) 100 μM .

3.8. Conclusiones parciales

Los resultados de evaluar la viabilidad celular posterior al tratamiento con naringina, VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl durante 24 h, sobre la línea celular A549, mostró que todos los compuestos, producto de la modificación estructural por complejación al catión oxidovanadio(IV), exhibieron mayor

citotoxicidad que naringina y VOCl_2 a $100 \mu\text{M}$ (Tabla IV-3). El complejo VONarg9 mostró ser 2,65 veces más tóxico sobre las células A549 a $100 \mu\text{M}$, en comparación a las células normales HEK293. Así mismo, el complejo VONarg12 redujo la viabilidad un 27,37 % más sobre las células A549, en comparación a las HEK293, siendo 2,8 veces más efectivo sobre la línea de cáncer. Además, el complejo VONF.Cl exhibió casi el doble de toxicidad frente a las células A549, en comparación a las células normales WISH.

Tabla IV-3. Valores de viabilidad celular a $100 \mu\text{M}$ para los compuestos VOCl_2 , naringina, cloruro de fenantrolina, VONarg9, VONarg12 y VONF.Cl.

	Viabilidad celular (% control, $100 \mu\text{M}$)
V(IV)O²⁺	83,53 ± 9,12
Naringina	95,07 ± 2,92
Fen.Cl	71,85 ± 5,37
VONarg9	79,16 ± 2,90
VONarg12	57,44 ± 0,76
VONF.Cl	49,09 ± 3,91

Por otra parte, en todos los casos, el análisis morfológico efectuado a través de microscopía óptica después de realizar la tinción con cristal violeta, en las células tratadas con los compuestos estudiados por 24 h, permitió evidenciar cambios propios de la muerte celular por la vía apoptótica, como la disminución del volumen celular, el redondeo de las células, y la formación de cuerpos apoptóticos, la cual fue más evidente cuando las células fueron tratadas por 48 h con los compuestos estudiados.

Así mismo, al estudiar la generación de especies reactivas de oxígeno, y la depleción del antioxidante endógeno glutatión (GSH), se encontraron resultados congruentes, pues se logró identificar que todos los complejos favorecieron la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), y también ocasionaron la depleción de GSH. Lo cual indica que los complejos conducen a la disminución de la viabilidad celular por aumento del estrés oxidativo.

Del mismo modo, se estudió el cambio en el potencial de membrana mitocondrial, encontrando que los complejos VONarg9, VONF.CI, y VONarg12 en menor medida, ocasionaron la despolarización mitocondrial. Estos resultados indican que dichos compuestos generan la muerte celular por la vía apoptótica intrínseca (vía mitocondrial).

Por último, se pudo confirmar una mayor captación de vanadio en las células A549 por tratamiento con el complejo VONF.CI, en comparación al complejo VONarg9. Este resultado indica que la inclusión de fenantrolina en la estructura del complejo ternario facilita su ingreso al interior celular, lo cual conduce al aumento de la citotoxicidad, que puede estar asociado a la acumulación de vanadio intracelular y un mayor impacto sobre blancos celulares claves.

4. Interacción con albúmina sérica bovina (biodisponibilidad)

Como se ha mencionado previamente, los flavonoides y sus complejos de coordinación poseen un importante potencial terapéutico frente a diferentes padecimientos ⁶, sin embargo, algunos aspectos concernientes a su farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), siguen siendo materia de investigación ¹²⁶. Algunos factores, como la biodisponibilidad de los flavonoides dependen en gran medida de la interacción con las proteínas plasmáticas, al igual que su actividad biológica ¹²⁷. No obstante, esto dependerá de la fuerza y tipo de interacción ^{128,129}.

Las proteínas plasmáticas son los constituyentes proteicos más abundantes del sistema circulatorio, y son responsables de diversas funciones fisiológicas ¹³⁰. Estas funciones incluyen el transporte, la distribución y el metabolismo de una amplia variedad de sustancias, pudiendo ser de origen endógeno o exógeno ¹³¹.

La albúmina sérica bovina (ASB), ha sido una de las proteínas más estudiadas de este grupo ¹²⁹, principalmente debido a su homología con la albúmina sérica humana (ASH) ¹³². La ASB posee dos residuos triptófano (Trp) que exhiben fluorescencia intrínseca, Trp-134 y Trp-212. Estos residuos están ubicados en la superficie de la proteína y en un bolsillo de unión hidrofóbico, respectivamente ^{73,132}. Debido a estas características, a su estabilidad y bajo

costo, la ASB es usada frecuentemente como modelo para estudios de biodisponibilidad ¹³³.

Si la ASB interactúa con algún compuesto pueden observarse cambios en su espectro de emisión, como disminución en la intensidad de fluorescencia (desactivación o *quenching*) o desplazamientos en la longitud de onda del máximo de emisión. El mecanismo de interacción se puede estudiar al aplicar la ecuación de Stern-Volmer (1) sobre los datos de fluorescencia medidos a diferentes temperaturas ^{134,135}:

$$F_0/F = 1 + K_q T_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador, respectivamente, K_q es la constante de velocidad de desactivación o constante de desactivación bimolecular, T_0 representa la vida media del fluoróforo en ausencia de desactivador, la cual para un biopolímero es igual a 10^{-8} s ^{136,137}, $[Q]$ es la concentración del desactivador y K_{SV} es la constante de desactivación de Stern-Volmer ¹³⁴.

Del mismo modo, al graficar el logaritmo de $(F_0-F)/F$ en función del logaritmo de $[Q]$, pueden determinarse el número de sitios de unión a la proteína y la constante de unión, al aplicar la siguiente ecuación:

$$\log (F_0-F)/F = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

Donde K_a es la constante de unión (ordenada al origen) y n es el número de sitios de unión (pendiente de la recta) ¹³⁴.

El mecanismo de unión entre las proteínas y las moléculas pequeñas como las drogas implica varios enlaces, como la fuerza hidrofóbica, los enlaces de puente de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y las interacciones de Van der Waals. La relación entre estos tipos de interacción y los parámetros termodinámicos se ha descrito previamente ¹³⁸:

- a) $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$ indica interacciones de Van der Waals y enlaces de puente de hidrógeno.
- b) $\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$ indica interacciones electrostáticas.

c) $\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$ indica fuerzas hidrofóbicas.

Los valores del cambio de entalpía (ΔH) y el cambio de entropía (ΔS) se pueden calcular a partir de las medidas de fluorescencia a diferentes temperaturas usando las siguientes ecuaciones:

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

$$\ln (K_{a2}/K_{a1}) = -\Delta H/R(1/T_2 - 1/T_1) \quad (5)$$

Donde K_a es la constante de unión a las diferentes temperaturas, R es la constante universal de los gases ideales (8,31 J/mol.K) y T es la temperatura de trabajo, en Kelvin. Se utilizaron diagramas de Van't Hoff entre $\ln K_a$ y $1/T$ para estimar los valores de cambio de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS). El cambio de energía libre (ΔG) y el cambio de entropía (ΔS) se evaluaron de acuerdo con las relaciones termodinámicas^{134,139}:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (6)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T \quad (7)$$

Para calcular las constantes de unión y los parámetros termodinámicos de la interacción entre la ASB y los compuestos estudiados, la intensidad de fluorescencia observada (F_{obs}) se corrigió al considerar la influencia del compuesto estudiado sobre ésta; a este fenómeno se le denomina “efecto de filtro interno”. Dicha corrección se realizó al aplicar la fórmula:

$$F_{corr} = F_{obs} \times e^{[(A_{ex} + A_{em})/2]} \quad (8)$$

Donde A_{ex} y A_{em} representan los valores de absorbancia de la muestra en la longitud de onda de excitación (280 nm) y la longitud de onda de emisión (336 nm), respectivamente^{140,141}.

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos de evaluar la interacción de la naringina y los complejos de coordinación VONarg9 y VONF.Cl con la albúmina sérica bovina. El procedimiento seguido para las determinaciones fue

detallado en el apartado 4 del capítulo II. La interacción del complejo VONarg12 con la ASB no fue evaluada debido a su baja estabilidad en condiciones no nativas, durante el tiempo de incubación.

4.1. Desactivación de la fluorescencia

La desactivación de la fluorescencia es un método sensible capaz de indicar alteraciones en el entorno del fluoróforo y es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la afinidad de unión entre ligandos y proteínas. La desactivación de la fluorescencia se define como la disminución del rendimiento cuántico de la fluorescencia de un fluoróforo. Este fenómeno puede ser inducido por diferentes interacciones moleculares entre el fluoróforo y las moléculas desactivadoras, pudiéndose tratar de reacciones en estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos en estado fundamental y desactivación por colisión. Estudiando la desactivación de la fluorescencia es posible obtener información descriptiva del tipo de interacción fluoróforo-ligando ^{134,142}.

Dentro de los aminoácidos de ocurrencia natural, aquellos que presentan fluorescencia intrínseca son la tirosina (Tyr), el triptófano (Trp) y la fenilalanina (Phe). En particular, la fluorescencia exhibida por el triptófano es el indicador más utilizado de la estructura, función y dinámica de las proteínas, ya que su rendimiento cuántico de fluorescencia (relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia y el número total de moléculas excitadas ¹⁴³) es comparativamente grande y también es sensible a los cambios del entorno ¹⁴⁴.

La interacción ligando-fluoróforo se puede estudiar mediante el análisis de la reducción en la intensidad de fluorescencia o el cambio de la longitud de onda de emisión de la proteína tras la adición del ligando ¹³⁴.

La interacción de la ASB con la naringina y los complejos VONarg9 y VONF.CI ocasionaron la desactivación de la fluorescencia en forma dependiente de la concentración, y cambios en el máximo de emisión de la ASB, lo que demuestra la interacción de estos compuestos con la proteína y el cambio en el entorno alrededor de los residuos emisores de fluorescencia (Trp-134 y Trp-212) ¹⁴⁵ (Figura IV-15).

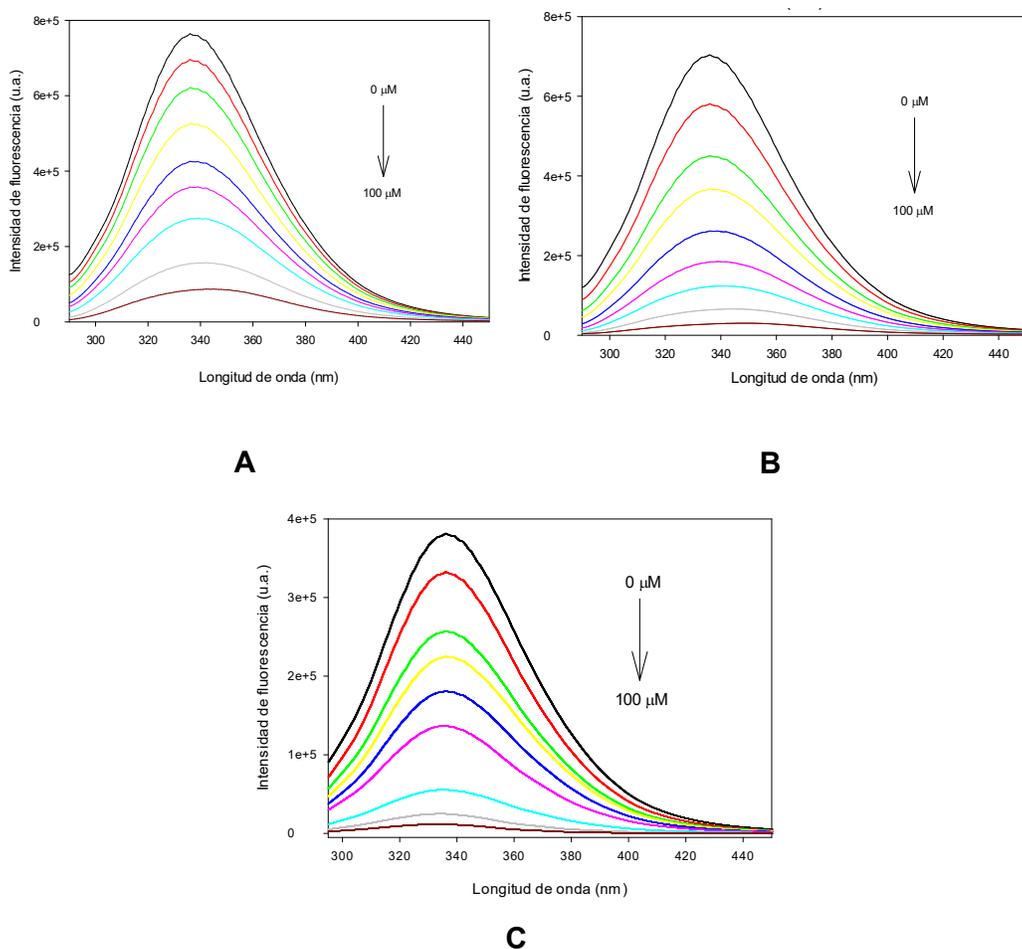


Figura IV-15. Espectros de fluorescencia de ASB 6 μM en solución en ausencia y presencia de: naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.CI (C) (0 – 100 μM). λ_{ex} = 280 nm, T = 298 K.

La naringina ocasionó una desactivación de la fluorescencia igual al 88,61 % a una concentración de 100 μM , por su parte, los complejos VONarg9 y VONF.CI a 100 μM generaron una desactivación igual a 95,71 % y 96,91 %, respectivamente. Además, para la naringina y VONarg9 pudo notarse un desplazamiento del máximo de emisión a mayores longitudes de onda (corrimiento al rojo/*redshift*), mientras que para el complejo VONF.CI, se encontró un leve desplazamiento a menores longitudes de onda (corrimiento al azul/*blueshift*), lo que puede indicar cambios conformacionales de la ASB a nivel de estructura terciaria, o cambios en la polaridad alrededor del entorno de los residuos triptófano por interacción con los compuestos estudiados ^{145,146}.

En el primer caso, el desplazamiento del máximo de emisión de la ASB a mayores longitudes de onda indica un aumento en la polaridad alrededor de los residuos triptófano, por el contrario, en el segundo caso, disminuye la polaridad del entorno por interacción con el complejo VONF.Cl, lo cual podría relacionarse con la presencia del ligando fenantrolina en su estructura ¹⁴⁶.

Para describir la interacción entre la ASB y los compuestos estudiados, se realizó la regresión lineal de una gráfica de F_0/F frente a $[Q]$ y se aplicó la ecuación de Stern-Volmer (1) sobre los datos de fluorescencia medidos a diferentes temperaturas. De esta manera, se estimó la constante de desactivación bimolecular (K_q) y la constante de desactivación de Stern-Volmer (K_{sv}), como se muestra a continuación.

4.2. Mecanismo de desactivación de fluorescencia y determinación de las constantes y número de sitios de unión

La desactivación de la fluorescencia puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes: la desactivación dinámica, que resulta de encuentros difusivos (colisionales) entre el fluoróforo y el desactivador; y la desactivación estática, que ocurre como resultado de la formación de un complejo en estado fundamental entre el fluoróforo y el desactivador. Estos mecanismos de desactivación pueden ser identificados por su diferente dependencia a la temperatura, y por la vida media del estado excitado ^{146,147}. Es de esperar que las constantes de desactivación dinámicas aumenten junto con la temperatura, ya que al ser dependientes de la difusión, temperaturas más altas darán como resultado coeficientes de difusión mayores, aumentando el valor de la constante de desactivación bimolecular (k_q) ¹⁴⁸. Por el contrario, si el mecanismo de desactivación es estático, las constantes disminuirán por el aumento de la temperatura, debido a una reducción en la estabilidad del complejo fluoróforo-ligando ^{136,147,148}. A partir de las curvas de F_0/F vs $[Q]$, que mostraron un comportamiento lineal, sugiriendo un único proceso de desactivación (Figura IV-16), y la ecuación $F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q]$ (1), se obtuvieron los valores de la constante de desactivación de Stern-Volmer (K_{sv}) y la constante de desactivación bimolecular (K_q) para los compuestos estudiados (Tabla IV-4).

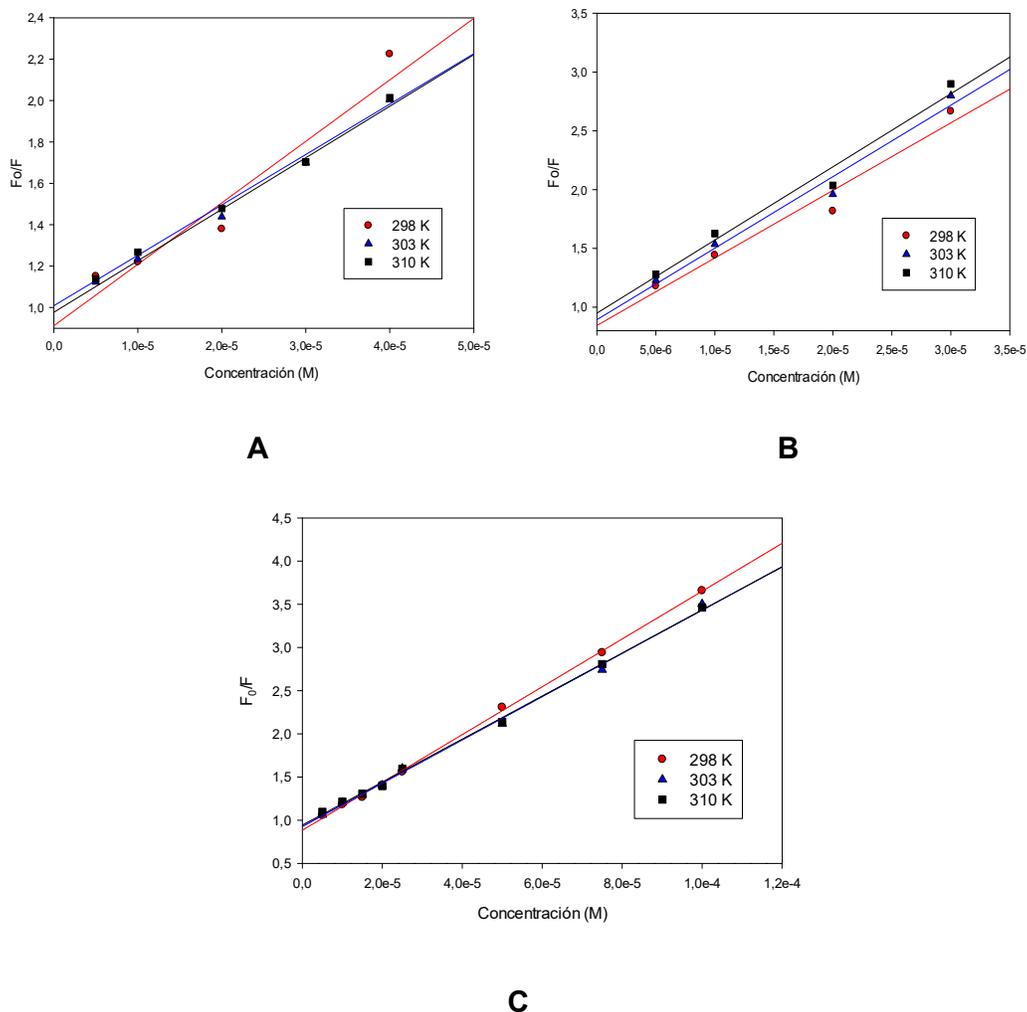


Figura IV-16. Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs $[Q]$), obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.Cl (C) (0 – 100 μM) a diferentes temperaturas 298 K (rojo), 303 K (azul) y 310 K (negro). $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$.

Para la interacción de la ASB con naringina y VONarg9, los valores de K_{sv} (Tabla IV-4) muestran una ligera tendencia al aumento con la temperatura. Por otro lado, los valores de K_q , son mayores en magnitud que el valor máximo que puede alcanzar esta constante en un proceso de desactivación dinámica ($2,0 - 3,0 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$)^{131,149}. Por lo tanto, el mecanismo de interacción más probable es el de formación de un complejo con la ASB. Para VONF.Cl, se presenta una leve disminución de los valores de K_{sv} , sin embargo, los valores de K_q también son superiores al valor de referencia mencionado. Esta comparación permite sugerir que la interacción no se genera a través de una

colisión dinámica pero sí a través de la formación de un complejo con la ASB (mecanismo de desactivación estático).

Cuando el mecanismo de desactivación es estático, el número de sitios de unión a la ASB y su constante de unión pueden ser determinados a partir de las curvas del logaritmo de $(F_0-F)/F$ vs el logaritmo de $[Q]$ (Figura IV-17) y la ecuación de Scatchard: $\log (F_0-F)/F = \log K_a + n \log [Q]$ (2) ^{149–151}, como se discute a continuación.

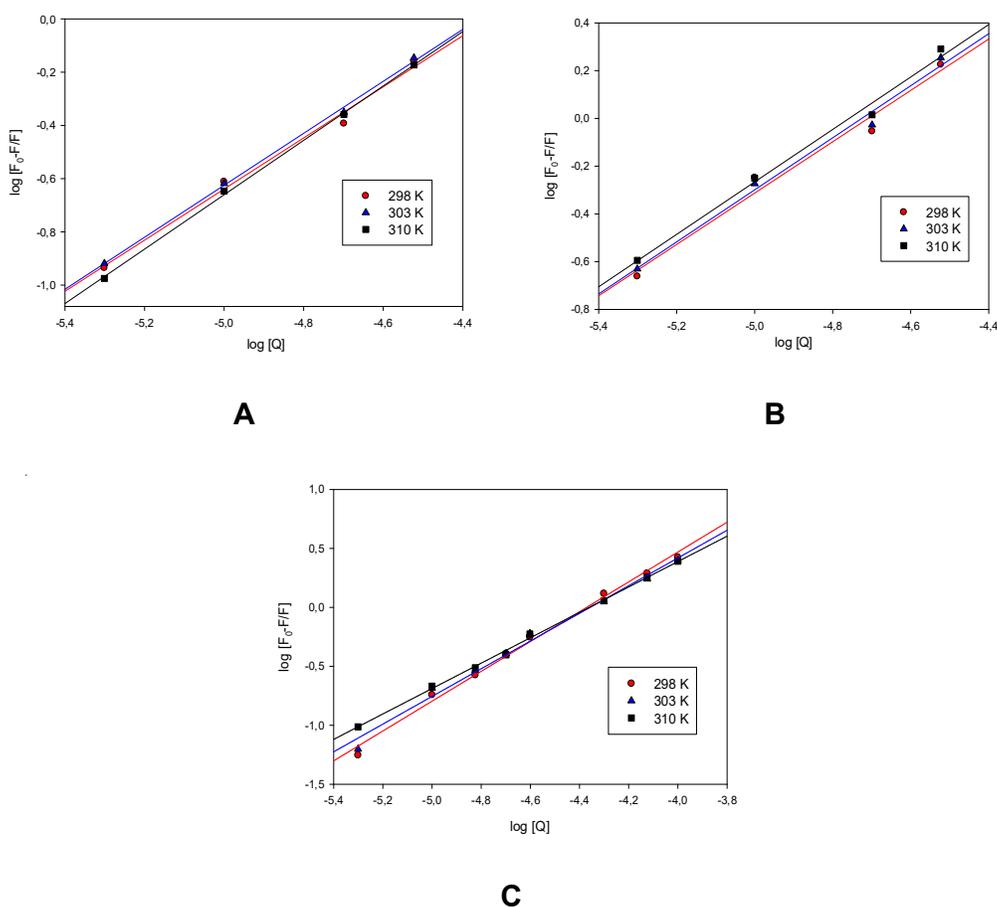


Figura IV-17. Gráficos de Scatchard ($\log(F_0-F)/F$ vs $\log[Q]$) obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (A), VONarg9 (B) y VONF.Cl (C) (0 – 100 μ M) a diferentes temperaturas 298 K (rojo), 303 K (azul) y 310 K (negro). $\lambda_{ex} = 280$ nm.

Evaluar la afinidad de los desactivadores a la ASB es de gran importancia ya que este parámetro se correlaciona directamente con el transporte, distribución y eficacia *in vivo* ^{152–154}. La fuerza, o afinidad con la que los desactivadores se unen a la proteína es un factor crucial que influencia el transporte, duración del

efecto farmacológico, su distribución en los tejidos y su eliminación ¹⁵⁵. Si una molécula posee baja afinidad por las proteínas plasmáticas, es menos probable que sea transportada de manera eficiente, además, la molécula puede liberarse rápidamente al torrente sanguíneo y tener una vida media más corta, también podría distribuirse por diferentes tejidos, pues no se mantendría en el torrente sanguíneo, favoreciendo también su eliminación. De manera similar, una interacción muy fuerte evitaría la liberación y distribución, influyendo de manera negativa en la biodisponibilidad y eficacia ¹⁵⁶.

Tabla IV-4. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), constantes de desactivación bimolecular (K_q), constante de unión (K_a) y sitios de unión (n), obtenidos gráficamente para la interacción entre naringina, VONarg9 y VONF.CI con ASB a diferentes temperaturas.

Compuestos	T(K)	$K_{SV} (x 10^4)$ (L.mol ⁻¹)	$K_q (x 10^{12})$ (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)	$K_a (x 10^4)$ (L.mol ⁻¹)	n
Naringina	298	2,18 ± 0,15	2,18 ± 0,15	1,45 ± 0,23	0,96 ± 0,03
	303	2,28 ± 0,09	2,28 ± 0,09	1,81 ± 0,44	0,98 ± 0,10
	310	2,32 ± 0,13	2,32 ± 0,13	2,81 ± 0,38	1,02 ± 0,09
VONarg9	298	5,67 ± 0,33	5,67 ± 0,33	11,6 ± 0,19	1,08 ± 0,04
	303	5,88 ± 0,31	5,88 ± 0,31	14,1 ± 0,13	1,09 ± 0,03
	310	5,99 ± 0,36	5,99 ± 0,36	16,9 ± 0,19	1,10 ± 0,04
VONF.CI	298	2,77 ± 0,04	2,77 ± 0,04	33,85 ± 3,85	1,27 ± 0,04
	303	2,51 ± 0,06	2,51 ± 0,06	13,06 ± 1,76	1,17 ± 0,05
	310	2,49 ± 0,04	2,49 ± 0,04	4,97 ± 0,27	1,08 ± 0,02

El número de sitios de unión indica las clases independientes de lugares de enlace/interacción para los compuestos estudiados con la ASB, generalmente este valor es cercano a 1 ^{145,157}. Por otra parte, el valor de la constante de unión de un compuesto a la ASB debe ser lo suficientemente alto para garantizar que una cantidad significativa de compuesto (desactivador) sea transportado y distribuido a través del organismo, pero, al mismo tiempo, lo suficientemente bajo para que el compuesto pueda liberarse una vez que

alcance su objetivo, se considera que el valor óptimo para esta constante debe estar en el rango de $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ ¹⁴⁵.

Los valores encontrados para las constantes de unión (K_a) a las diferentes temperaturas para naringina, VONarg9 y VONF.Cl (Tabla IV-4), se encuentran en el rango de $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$, indicando que se unen de manera reversible a la ASB, o sea, los compuestos presentan afinidad suficiente para ser transportados, y al mismo tiempo, ser liberados en el sitio objetivo por esta proteína. Nótese que los valores de K_a , siguen la misma tendencia que las constantes K_{SV} y K_q en función de la temperatura.

Aun cuando los valores de K_a disminuyen ligeramente en función de la temperatura para el complejo VONF.Cl, estos se mantienen en el rango óptimo recomendado para uniones reversibles. En el caso de este complejo, si bien puede existir una parcial disociación con el aumento de la temperatura, esto no afectaría la distribución mayoritaria del mismo.

Al realizar la comparación de los valores de la constante de unión, para los compuestos estudiados, se puede notar que la complejación de naringina al catión oxidovanadio(IV) incrementa el valor de este parámetro en un 700 %, 679 % y 501 % a 298 K, 303 K y 310 K, respectivamente, lo que indica una interacción más estable. Por otra parte, la constante de unión para el complejo VONF.Cl incrementa con respecto a naringina en un 2234,5 %, 621,5 % y 76,81 % a 298 K, 303 K y 310 K, respectivamente. A pesar de que el valor de la constante de unión de VONF.Cl se ve disminuida por el aumento en la temperatura, su unión a la ASB mejoró con respecto al ligando naringina. Luego, al realizar la comparación de K_a entre ambos complejos, debe considerarse su distinta dependencia a la temperatura, por lo que el cambio porcentual de K_a para VONF.Cl con respecto a VONarg9 es de 191,8 %, - 3,5 % y - 70,6 % a 298 K, 303 K y 310 K, respectivamente, de manera que la sustitución de un ligando naringina por fenantrolina incrementó la unión a ASB a 298 K (25 °C), pero a 310 K (37 °C), su unión fue más débil.

Por otra parte, en todos los casos, el valor de (n) fue cercano a 1, indicando un único sitio de unión de los compuestos a la ASB. Por lo tanto, probablemente los compuestos estudiados interactúan con la ASB a través de su bolsillo

hidrofóbico ubicado en el subdominio II-A, con el residuo Trp-212 cerca o dentro del sitio de unión ¹⁵⁸. Estos resultados sugieren que los compuestos estudiados pueden ser transportados por la proteína plasmática. A continuación se describe la naturaleza de las fuerzas de interacción entre los compuestos estudiados y la ASB, a partir de los parámetros termodinámicos obtenidos de gráficos de Van't Hoff.

4.3. Modo de interacción: parámetros termodinámicos

Las fuerzas de interacción entre biomoléculas y fármacos pueden incluir interacciones electrostáticas, múltiples enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, entre otras ¹⁴⁸. Los valores de cambio de entalpía (ΔH) y cambio de entropía (ΔS) pueden descifrar la naturaleza o el tipo de interacción de los complejos fármaco-proteína ¹³⁸. Estos parámetros termodinámicos fueron obtenidos empleando la ecuación de Van't Hoff ($\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R$) sobre un gráfico del $\ln(K_a)$ vs $1/T$ ¹⁴⁵ (Figura IV-18). Por otra parte, el cambio en la energía libre (ΔG) se evaluó de acuerdo con la relación termodinámica: $\Delta G = -RT \ln K_a$ (6) y $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (4).

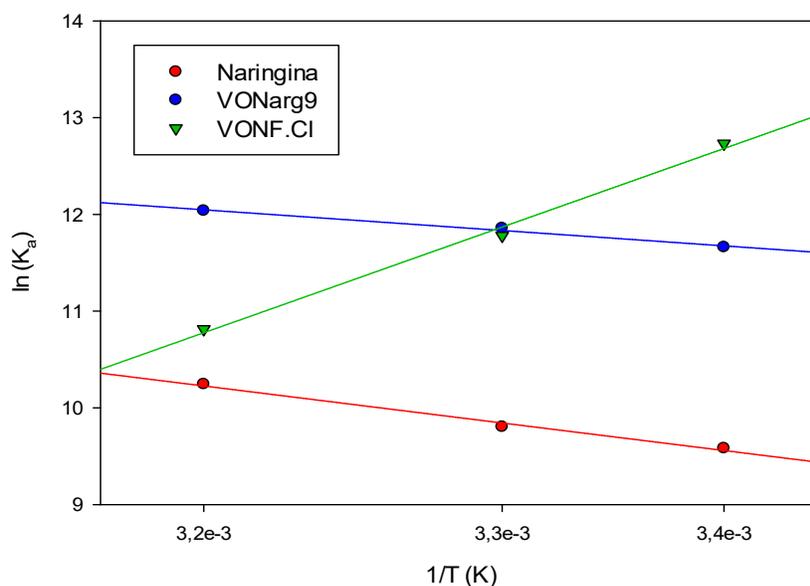


Figura IV-18. Gráfico de Vant Hoff ($\ln(K_a)$ vs $1/T(K)$) obtenidos de la interacción entre ASB y naringina (rojo), VONarg9 (azul) y VONF.CI (verde) a diferentes temperaturas (298 K, 303 K y 310 K).

Los parámetros termodinámicos obtenidos (Tabla IV-5), fueron analizados según lo propuesto por Ross y Subramanian: fuerzas hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$), interacciones electrostáticas ($\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$), y enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals ($\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$)¹³⁸.

Tabla IV-5. Parámetros termodinámicos de los sistemas naringina-ASB, VONarg-ASB y VONF.CI-ASB.

Compuestos	ΔH (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol)	ΔG (KJ/mol)
Naringina	42,7	0,223	- 23,7 (298 K)
			- 24,8 (303 K)
			- 26,3 (310 K)
VONarg9	23,9	0,177	- 28,8 (298 K)
			- 29,7 (303 K)
			- 31,0 (310 K)
VONF.CI	-121,9	-0,304	- 31,4 (298 K)
			- 29,9 (303 K)
			- 27,8 (310 K)

Los valores de ΔH y ΔS para la interacción entre la ASB y la naringina fueron de 42,7 KJ/mol y 0,223 KJ/mol, respectivamente (Tabla IV-5). Por lo que su interacción se da a través de fuerzas hidrofóbicas las cuales involucran valores positivos de ΔH y ΔS , según lo propuesto por Ross y Subramanian¹³⁸. La interacción de la ASB con el complejo VONarg9, presentó valores inferiores de ΔH y ΔS con respecto a la naringina, con una reducción del 44 % y 20,6 %, respectivamente, indicando que esta interacción vio reducido su carácter hidrofóbico, dicho de otra manera, la modificación estructural de la naringina por complejación al catión oxidovanadio(IV) reduce el carácter hidrofóbico de la unión a ASB.

Por otra parte, los valores de ΔH y ΔS para la interacción entre el complejo VONF.CI y la ASB fueron de -121,9 KJ/mol y -0,304 KJ/mol, respectivamente. Indicando que la interacción se da a través de la formación de enlaces de puente de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. Esto puede atribuirse al

carácter catiónico que presenta el complejo en solución acuosa (ver *Apartado 2.2* del capítulo III), debido a la sustitución de un ligando *cloro* por *aquo* formando la especie catiónica: $[\text{VONargFenH}_2\text{O}]^+$. Asimismo, ha sido reportado que los parámetros negativos de auto-asociación para ΔH y ΔS se incrementan a medida que aumenta la polarizabilidad de la densidad electrónica π de los compuestos que interactúan con ASB ¹³⁸. Este sería el caso en el que un ligando naringina es reemplazado por el ligando fenantrolina.

Si se analiza detenida y comparativamente el cambio en la entalpía y entropía (ΔH y ΔS) se puede notar que sus valores siguen esta tendencia: $\text{Narg} > \text{VONarg9} > \text{VONF.Cl}$, indicando que la reacción de formación del complejo ASB-Narg es endotérmica, la complejación al catión oxidovanadio(IV) disminuye este parámetro, por lo que se requiere menor energía para la formación del complejo ASB-VONarg9 que la necesaria para la formación del complejo ASB-Narg. De esta forma, puede notarse que la espontaneidad en la reacción de formación de los complejos ASB-desactivador (Tabla IV-5) está favorecida principalmente por el cambio en la entropía (aumento) y la temperatura del sistema. Por otra parte, al reemplazar un ligando naringina por fenantrolina en el complejo VONF.Cl se favorece la unión a ASB, ya que de esta interacción se obtuvieron valores negativos para ΔH , indicando una reacción de formación para el complejo ASB-VONF.Cl exotérmica, en este caso, y en contraposición a lo discutido anteriormente, la espontaneidad en la reacción de formación del complejo está favorecida principalmente por el cambio en la entalpía, ya que si la temperatura aumenta lo suficiente ($> 401 \text{ K}$), ocasionaría que la reacción no fuera espontánea, lo cual coincide con la dependencia negativa de las constantes de unión a la temperatura para VONF.Cl, como se pudo observar anteriormente (Tabla IV-4). Por último, los valores de ΔG para la interacción entre la ASB, la naringina, y los complejos VONarg9 y VONF.Cl mostraron valores negativos en todos los casos indicando que la reacción de formación de los complejos ASB-desactivador se da de forma espontánea a las temperaturas evaluadas.

4.4. Conclusiones parciales.

A partir de los estudios de desactivación de la fluorescencia, se logró identificar la interacción entre naringina, VONarg9, VONF.Cl y la albúmina sérica bovina, evidenciada por la disminución en la emisión de fluorescencia en función de la concentración, más aún, para el complejo VONarg9, se encontró un aumento en la polaridad del microambiente alrededor de los residuos emisores de fluorescencia. El complejo VONF.Cl ocasionó el efecto contrario.

Así mismo, se determinó que la naringina y ambos complejos interactúan con la ASB, a través de un mecanismo de desactivación estático.

Por otro lado, el valor determinado para la constante de unión a la ASB, por parte de los compuestos estudiados a las diferentes temperaturas evaluadas estuvo en el rango ideal ($10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$) para que estos compuestos puedan unirse a dicha proteína, y al mismo tiempo, ser transportados y liberados. Además, por la comparación de los valores de la constante de unión, se encontró que la modificación estructural por complejación al catión oxidovanadio(IV), mejoró la unión a la ASB.

Pese a que la constante de unión del complejo ternario mostró una dependencia negativa a la temperatura, se determinó que a 310 K (37 °C) su valor se mantiene en el rango óptimo, descrito anteriormente, y también fue casi un 77 % mayor al valor encontrado para la naringina, a la misma temperatura. También, se determinó que hubo un único sitio de unión entre los compuestos estudiados y la ASB.

Por último, se determinó el modo de interacción a partir de los parámetros fisicoquímicos, según lo postulado por Ross y Subramanian¹³⁸. La naringina interactuó con la ASB a través de fuerzas hidrofóbicas, al igual que el complejo VONarg9. Los residuos hidrofóbicos repelieron mutuamente el agua y otros grupos polares, resultando en una atracción neta de los grupos no-polares para ambos compuestos. Sin embargo, en comparación, el complejo metálico presentó valores menores de ΔH y ΔS , indicando una disminución en el carácter hidrofóbico de dicha interacción, o puesto en otras palabras, un aumento del carácter hidrofílico de la misma. Por otra parte, el complejo

ternario interactuó con la ASB a través de la formación de enlaces de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals, debido a la presencia del ligando fenantrolina que posee una nube de carga electrónica π con alto grado de polarizabilidad. En todos los casos la reacción de formación de los complejos ASB-desactivador se dio de forma espontánea a las temperaturas evaluadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los compuestos estudiados interactúan de manera favorable con la albúmina sérica bovina, lo que sugiere que podrían ser absorbidos y encontrarse lo suficientemente disponibles en el cuerpo para producir sus efectos farmacológicos.

Referencias bibliográficas

- (1) Jayaprakash, S.; Ramesh, S.; Karthikeyan, A.; Murugappan, S.; Sidharthan, P.; Selvaraj, S. Transition Metal Coordination Complexes of Flavonoids: A Class of Better Pharmacological Active Molecules to Develop New Drugs. *Anticancer Agents Med. Chem.* **23** (4), 417–431.
- (2) Selvaraj, S.; Krishnaswamy, S.; Devashya, V.; Sethuraman, S.; Krishnan, U. M. Flavonoid–Metal Ion Complexes: A Novel Class of Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34* (4), 677–702. <https://doi.org/10.1002/med.21301>.
- (3) Khater, M.; Ravishankar, D.; Greco, F.; Osborn, H. M. Metal Complexes of Flavonoids: Their Synthesis, Characterization and Enhanced Antioxidant and Anticancer Activities. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (21), 2845–2867. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>.
- (4) Uivarosi, V.; Munteanu, A.-C.; Badea, M.; Olar, R. Metal Complexes of Plant Secondary Metabolites with Therapeutic Potential. In *Plant Secondary Metabolites*; Sharma, A. K., Sharma, A., Eds.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2022; pp 281–327. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_9.
- (5) Uivarosi, V.; Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V.; Munteanu, A.-C. Flavonoid Complexes as Promising Anticancer Metallodrugs. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*; IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/67879>.
- (6) Kasprzak, M. M.; Erxleben, A.; Ochocki, J. Properties and Applications of Flavonoid Metal Complexes. *RSC Adv.* **2015**, *5* (57), 45853–45877. <https://doi.org/10.1039/C5RA05069C>.
- (7) Pessoa, J. C.; Etcheverry, S.; Gambino, D. Vanadium Compounds in Medicine. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301–302*, 24–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>.
- (8) Zwolak, I. Vanadium Carcinogenic, Immunotoxic and Neurotoxic Effects: A Review of in Vitro Studies. *Toxicol. Mech. Methods* **2014**, *24* (1), 1–12. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.843110>.
- (9) Gruzewska, K.; Michno, A.; Pawelczyk, T.; Bielarczyk, H. Essentiality and Toxicity of Vanadium Supplements in Health and Pathology. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **2014**, *65*, 603–611.
- (10) Selvaraj, S.; Krishnan, U. M. Vanadium–Flavonoid Complexes: A Promising Class of Molecules for Therapeutic Applications. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (17), 12435–12452. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00405>.
- (11) Naso, L. G.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Correlation of the Anticancer and Pro-Oxidant Behavior and the Structure of Flavonoid-Oxidovanadium(IV) Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *492*, 215271. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215271>.
- (12) Chen, Z.; Zhong, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30* (2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.
- (13) García, N.; Zazueta, C.; Aguilera-Aguirre, L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 5853238. <https://doi.org/10.1155/2017/5853238>.
- (14) Cabello-Verrugio, C.; Simon, F.; Trollet, C.; Santibañez, J. F. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4310469. <https://doi.org/10.1155/2017/4310469>.
- (15) Azmanova, M.; Pitto-Barry, A. Oxidative Stress in Cancer Therapy: Friend or Enemy? *ChemBioChem* **2022**, *23* (10), e202100641. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100641>.
- (16) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (17) Wu, S.; Zhu, W.; Thompson, P.; Hannun, Y. A. Evaluating Intrinsic and Non-Intrinsic Cancer Risk Factors. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 3490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>.
- (18) Heng, H. H. Q.; Stevens, J. B.; Bremer, S. W.; Ye, K. J.; Liu, G.; Ye, C. J. The Evolutionary Mechanism of Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109* (6), 1072–1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.22497>.
- (19) Qi, L.; Luo, Q.; Zhang, Y.; Jia, F.; Zhao, Y.; Wang, F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32* (8), 1469–1486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00204>.
- (20) Gamelin, L.; Boisdron-Celle, M.; Morel, A.; Gamelin, E. [Oxaliplatin neurotoxicity]. *Bull. Cancer (Paris)* **2006**, *93 Suppl 1*, S17–22.

- (21) Basu, U.; Banik, B.; Wen, R.; Pathak, R. K.; Dhar, S. The Platin-X Series: Activation, Targeting, and Delivery. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003**, *2016*, 45 (33), 12992–13004. <https://doi.org/10.1039/c6dt01738j>.
- (22) Amarsy, I.; Papot, S.; Gasser, G. Stimuli-Responsive Metal Complexes for Biomedical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2022**, *61* (40), e202205900. <https://doi.org/10.1002/anie.202205900>.
- (23) Carver, P. L. Metals in Medicine: The Therapeutic Use of Metal Ions in the Clinic. *Met. Ions Life Sci.* **2019**, *19*, /books/9783110527872/9783110527872-007/9783110527872-007.xml. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-007>.
- (24) Que, E. L.; Chang, C. J. Responsive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents as Chemical Sensors for Metals in Biology and Medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 51–60. <https://doi.org/10.1039/b914348n>.
- (25) Hu, H.; Xu, Q.; Mo, Z.; Hu, X.; He, Q.; Zhang, Z.; Xu, Z. New Anti-Cancer Explorations Based on Metal Ions. *J. Nanobiotechnology* **2022**, *20* (1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01661-w>.
- (26) Riccardi, C.; Piccolo, M. Metal-Based Complexes in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (8), 7289. <https://doi.org/10.3390/ijms24087289>.
- (27) Paprocka, R.; Wiese-Szadkowska, M.; Janciauskiene, S.; Kosmalki, T.; Kulik, M.; Helmin-Basa, A. Latest Developments in Metal Complexes as Anticancer Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *452*, 214307. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214307>.
- (28) Lucaciu, R. L.; Hangan, A. C.; Sevastre, B.; Oprean, L. S. Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Molecules* **2022**, *27* (19), 6485. <https://doi.org/10.3390/molecules27196485>.
- (29) Kostova, I. Titanium and Vanadium Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9* (8), 827–842. <https://doi.org/10.2174/187152009789124646>.
- (30) Nahari, G.; Reytman, L.; Vendier, L.; Tshuva, E. Y.; Lorber, C. Cytotoxic Vanadium Complexes of Branched [ONNO]-Type Diamine Bis(Phenolato) Ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1807–1811. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601276>.
- (31) Vlasίου, M. C.; Pafiti, K. S. Cell Arrest and Apoptosis Induced by the Next Generation of Vanadium Based Drugs: Action Mechanism to Structure Relation and Future Perspectives. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2021**, *21* (16), 2111–2116. <https://doi.org/10.2174/1871520621666201222143839>.
- (32) Crichton, R. R. *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam; Boston, 2008.
- (33) Makinen, M. W.; Salehitazangi, M. The Structural Basis of Action of Vanadyl (VO²⁺) Chelates in Cells. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *279*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.003>.
- (34) Leblanc, C.; Vilter, H.; Fournier, J.-B.; Delage, L.; Potin, P.; Rebuffet, E.; Michel, G.; Solari, P. L.; Feiters, M. C.; Czjzek, M. Vanadium Haloperoxidases: From the Discovery 30 Years Ago to X-Ray Crystallographic and V K-Edge Absorption Spectroscopic Studies. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301–302*, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.02.013>.
- (35) Eady, R. R. Current Status of Structure Function Relationships of Vanadium Nitrogenase. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237* (1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00248-5).
- (36) Treviño, S.; Díaz, A.; Sánchez-Lara, E.; Sanchez-Gaytan, B. L.; Perez-Aguilar, J. M.; González-Vergara, E. Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *188* (1), 68–98. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1540-6>.
- (37) Thompson, K. H.; Orvig, C. Coordination Chemistry of Vanadium in Metallopharmaceutical Candidate Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *219–221*, 1033–1053. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(01\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(01)00395-2).
- (38) He, Z.; You, G.; Liu, Q.; Li, N. Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus in Comparison: The Therapeutic Efficacy of the Vanadium Compound. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (21), 11931. <https://doi.org/10.3390/ijms222111931>.
- (39) Treviño, S.; Diaz, A. Vanadium and Insulin: Partners in Metabolic Regulation. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *208*, 111094. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111094>.
- (40) Kowalski, S.; Wyrzykowski, D.; Inkielewicz-Stępnia, I. Molecular and Cellular Mechanisms of Cytotoxic Activity of Vanadium Compounds against Cancer Cells. *Mol. Basel Switz.* **2020**, *25* (7), 1757. <https://doi.org/10.3390/molecules25071757>.

- (41) Hu, D.; Li, D.; Liu, X.; Zhou, Z.; Tang, J.; Shen, Y. Vanadium-Based Nanomaterials for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biomed. Mater.* **2020**, *16* (1), 014101. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/abb523>.
- (42) Levina, A.; Pires Vieira, A.; Wijetunga, A.; Kaur, R.; Koehn, J. T.; Crans, D. C.; Lay, P. A. A Short-Lived but Highly Cytotoxic Vanadium(V) Complex as a Potential Drug Lead for Brain Cancer Treatment by Intratumoral Injections. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (37), 15834–15838. <https://doi.org/10.1002/anie.202005458>.
- (43) Brenda, C.-T.; Norma, R.-F.; Marcela, R.-L.; Nelly, L.-V.; Teresa, F. Vanadium Compounds as Antiparasitic Agents: An Approach to Their Mechanisms of Action. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ. Soc. Miner. Trace Elem. GMS* **2023**, *78*, 127201. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127201>.
- (44) Gambino, D. Potentiality of Vanadium Compounds as Anti-Parasitic Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (19), 2193–2203. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.028>.
- (45) Del Carpio, E.; Hernández, L.; Ciangherotti, C.; Villalobos Coa, V.; Jiménez, L.; Lubes, V.; Lubes, G. Vanadium: History, Chemistry, Interactions with α -Amino Acids and Potential Therapeutic Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *372*, 117–140. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.06.002>.
- (46) Kioseoglou, E.; Petanidis, S.; Gabriel, C.; Salifoglou, A. The Chemistry and Biology of Vanadium Compounds in Cancer Therapeutics. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301–302*, 87–105. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.03.010>.
- (47) Rozzo, C.; Sanna, D.; Garribba, E.; Serra, M.; Cantara, A.; Palmieri, G.; Pisano, M. Antitumoral Effect of Vanadium Compounds in Malignant Melanoma Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *174*, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.010>.
- (48) Pisano, M.; Arru, C.; Serra, M.; Galleri, G.; Sanna, D.; Garribba, E.; Palmieri, G.; Rozzo, C. Antiproliferative Activity of Vanadium Compounds: Effects on the Major Malignant Melanoma Molecular Pathways. *Metallomics* **2019**, *11* (10), 1687–1699. <https://doi.org/10.1039/c9mt00174c>.
- (49) Barrio, D. A.; Etcheverry, S. B. Potential Use of Vanadium Compounds in Therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **17** (31), 3632–3642.
- (50) Ghanbari-Movahed, M.; Jackson, G.; Farzaei, M. H.; Bishayee, A. A Systematic Review of the Preventive and Therapeutic Effects of Naringin Against Human Malignancies. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 639840. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.639840>.
- (51) Stabrauskienė, J.; Kopustinskiene, D. M.; Lazauskas, R.; Bernatoniene, J. Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines* **2022**, *10* (7), 1686. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071686>.
- (52) Heidary Moghaddam, R.; Samimi, Z.; Moradi, S. Z.; Little, P. J.; Xu, S.; Farzaei, M. H. Naringenin and Naringin in Cardiovascular Disease Prevention: A Preclinical Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *887*, 173535. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173535>.
- (53) Zhang, Z.; Bi, C.; Schmitt, S. M.; Fan, Y.; Dong, L.; Zuo, J.; Dou, Q. P. 1,10-Phenanthroline Promotes Copper Complexes into Tumor Cells and Induces Apoptosis by Inhibiting the Proteasome Activity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17* (8), 1257–1267. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0940-x>.
- (54) Gałczyńska, K.; Drulis-Kawa, Z.; Arabski, M. Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes. *Molecules* **2020**, *25* (15), 3492. <https://doi.org/10.3390/molecules25153492>.
- (55) Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. DNA Cleavage on Photoexposure at the D-d Band in Ternary Copper(II) Complexes Using Red-Light Laser. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (26), 11043–11050. <https://doi.org/10.1021/ic060328e>.
- (56) Rochford, G.; Molphy, Z.; Kavanagh, K.; McCann, M.; Devereux, M.; Kellett, A.; Howe, O. Cu(II) Phenanthroline–Phenazine Complexes Dysregulate Mitochondrial Function and Stimulate Apoptosis. *Metallomics* **2020**, *12* (1), 65–78. <https://doi.org/10.1039/c9mt00187e>.
- (57) O’Leary, T.; McCarron, P.; Devereux, M.; Meaney, S.; Guler, E. M. Potential Interactions between Metal-Based Phenanthroline Drugs and the Unfolded Protein Response Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Exp. Results* **2022**, *3*, e22. <https://doi.org/10.1017/exp.2022.20>.
- (58) Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.

- (59) Arfin, S.; Jha, N. K.; Jha, S. K.; Kesari, K. K.; Ruokolainen, J.; Roychoudhury, S.; Rathi, B.; Kumar, D. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. *Antioxidants* **2021**, *10* (5), 642. <https://doi.org/10.3390/antiox10050642>.
- (60) Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49* (11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- (61) Van Loenhout, J.; Peeters, M.; Bogaerts, A.; Smits, E.; Deben, C. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects. *Antioxidants* **2020**, *9* (12), 1188. <https://doi.org/10.3390/antiox9121188>.
- (62) Sanna, D.; Ugone, V.; Fadda, A.; Micera, G.; Garribba, E. Behavior of the Potential Antitumor VIVO Complexes Formed by Flavonoid Ligands. 3. Antioxidant Properties and Radical Production Capability. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *161*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.04.027>.
- (63) Oliver, S.; Vittorio, O.; Cirillo, G.; Boyer, C. Enhancing the Therapeutic Effects of Polyphenols with Macromolecules. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (8), 1529–1544. <https://doi.org/10.1039/C5PY01912E>.
- (64) Baliyan, S.; Mukherjee, R.; Priyadarshini, A.; Vibhuti, A.; Gupta, A.; Pandey, R. P.; Chang, C.-M. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus Religiosa*. *Mol. Basel Switz.* **2022**, *27* (4), 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>.
- (65) Baranowska, I.; Bajkacz, S. A New UHPLC-MS/MS Method for the Determination of Flavonoids in Supplements and DPPH-UHPLC-UV Method for the Evaluation of the Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Food Chem.* **2018**, *256*, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.138>.
- (66) Naso, L. G.; Martínez Medina, J. J.; D'Alessandro, F.; Rey, M.; Rizzi, A.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Ternary Copper(II) Complex of 5-Hydroxytryptophan and 1,10-Phenanthroline with Several Pharmacological Properties and an Adequate Safety Profile. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *204*, 110933. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110933>.
- (67) Gulcin, İ.; Alwasel, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* **2023**, *11* (8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>.
- (68) Dureja, A.; Dhiman, K. Free Radical Scavenging Potential and Total Phenolic and Flavonoid Content of *Ziziphus Mauritiana* and *Ziziphus Nummularia* Fruit Extracts. *Int. J. Green Pharm.* **2012**, *6* (3), 187. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.104929>.
- (69) Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; Terao, J. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-Scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62* (6), 1201–1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>.
- (70) Ye, H.; Xu, H.; Yu, C.; Dai, Y.; Liu, G.; Xu, W.; Yuan, S. Hydroxylation of Naringin by *Trichoderma Harzianum* to Dramatically Improve Its Antioxidative Activity. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *45* (4), 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.011>.
- (71) Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82* (4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- (72) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I. The Deoxyribose Method: A Simple “Test-Tube” Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Anal. Biochem.* **1987**, *165* (1), 215–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90222-3).
- (73) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Antioxidant and Anticancer Effects and Bioavailability Studies of the Flavonoid Baicalin and Its Oxidovanadium(IV) Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.005>.
- (74) Martínez Medina, J. J.; Naso, L. G.; Pérez, A. L.; Rizzi, A.; Okulik, N. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Apigenin Oxidovanadium(IV) Cation Interactions. Synthesis, Spectral, Bovine Serum Albumin Binding, Antioxidant and Anticancer Studies. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2017**, *344*, 84–100. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.05.007>.
- (75) Islas, M. S.; Naso, L. G.; Lezama, L.; Valcarcel, M.; Salado, C.; Roura-Ferrer, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Insights into the Mechanisms Underlying the Antitumor Activity of an Oxidovanadium(IV) Compound with the Antioxidant Naringenin. Albumin Binding Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *149*, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.011>.

- (76) Nishikimi, M.; Appaji Rao, N.; Yagi, K. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46* (2), 849–854. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3).
- (77) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A. Synthesis, Biological Aspects and SOD Mimic Activity of Square Pyramidal Copper(II) Complexes with the 3rd Generation Quinolone Drug Sparfloxacin and Phenanthroline Derivatives. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14* (1), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2010.10.003>.
- (78) Naso, L.; Ferrer, E. G.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. Role of Oxidative Stress in the Antitumoral Action of a New Vanadyl(IV) Complex with the Flavonoid Chrysin in Two Osteoblast Cell Lines: Relationship with the Radical Scavenger Activity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (6), 889–902. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0652-z>.
- (79) Niki, E. Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 100–108. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86095-d](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86095-d).
- (80) Campos, A. M.; Sotomayor, C. P.; Pino, E.; Lissi, E. A Pyranine Based Procedure for Evaluation of the Total Antioxidant Potential (TRAP) of Polyphenols: A Comparison with Closely Related Methodologies. *Biol. Res.* **2004**, *37* (2), 287–292. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602004000200015>.
- (81) Zhang, L.; Yadav, S.; John Wang, Y.; Mozziconacci, O.; Schöneich, C. Dual Effect of Histidine on Polysorbate 20 Stability: Mechanistic Studies. *Pharm. Res.* **2018**, *35* (2), 33. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2321-1>.
- (82) Islas, M. S.; Rojo, T.; Lezama, L.; Merino, M. G.; Cortes, M. A.; Puyol, M. R.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Improvement of the Antihypertensive Capacity of Candesartan and Trityl Candesartan by Their SOD Mimetic Copper(II) Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *123*, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.02.005>.
- (83) Glevitzky, I.; Dumitrel, G.-A.; Mirel, G.; Pasca, M. B.; Otfísal, P.; Bungau, S.; Cioca, G.; Carmen, P.; Popa, M. Statistical Analysis of the Relationship Between Antioxidant Activity and the Structure of Flavonoid Compounds. *Rev. Chim. -Buchar.- Orig. Ed.-* **2019**, *70*. <https://doi.org/10.37358/RC.19.9.7497>.
- (84) Zhang, Q.; Yang, W.; Liu, J.; Liu, H.; Lv, Z.; Zhang, C.; Chen, D.; Jiao, Z. Identification of Six Flavonoids as Novel Cellular Antioxidants and Their Structure-Activity Relationship. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 4150897. <https://doi.org/10.1155/2020/4150897>.
- (85) Weinberg, R. A. How Cancer Arises. *Sci. Am.* **1996**, *275* (3), 62–70.
- (86) Kumar Singh, A.; Kumar, A.; Singh, H.; Sonawane, P.; Pathak, P.; Grishina, M.; Pal Yadav, J.; Verma, A.; Kumar, P. Metal Complexes in Cancer Treatment: Journey So Far. *Chem. Biodivers.* **2023**, *20* (4), e202300061. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300061>.
- (87) Desoize, B. Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment. *Anticancer Res.* **2004**, *24* (3a), 1529–1544.
- (88) Ricci, M. S.; Zong, W.-X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The oncologist* **2006**, *11* (4), 342–357. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-342>.
- (89) Tímár, J.; Uhlyarik, A. On-Target Side Effects of Targeted Therapeutics of Cancer. *Pathol. Oncol. Res. POR* **2022**, *28*, 1610694. <https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610694>.
- (90) Ghoneum, A.; Abdulfattah, A. Y.; Warren, B. O.; Shu, J.; Said, N. Redox Homeostasis and Metabolism in Cancer: A Complex Mechanism and Potential Targeted Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9), 3100. <https://doi.org/10.3390/ijms21093100>.
- (91) Slika, H.; Mansour, H.; Wehbe, N.; Nasser, S. A.; Iratni, R.; Nasrallah, G.; Shaito, A.; Ghaddar, T.; Kobeissy, F.; Eid, A. H. Therapeutic Potential of Flavonoids in Cancer: ROS-Mediated Mechanisms. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2022**, *146*, 112442. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>.
- (92) Crans, D. C.; Yang, L.; Haase, A.; Yang, X. Health Benefits of Vanadium and Its Potential as an Anticancer Agent. *Met. Ions Life Sci.* **2018**, *18*, /books/9783110470734/9783110470734-015/9783110470734-015.xml. <https://doi.org/10.1515/9783110470734-015>.
- (93) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *2018* (6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- (94) Naso, L.; Martínez, V. R.; Lezama, L.; Salado, C.; Valcarcel, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Antioxidant, Anticancer Activities and Mechanistic Studies of the Flavone Glycoside Diosmin and Its Oxidovanadium(IV) Complex. Interactions with Bovine Serum Albumin. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (18), 4108–4119. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.053>.

- (95) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Rivadeneira, J.; Salinas, V.; Williams, P. A. M. Antioxidant Effects of the VO(IV) Hesperidin Complex and Its Role in Cancer Chemoprevention. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (3), 435–447. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0332-9>.
- (96) Actis Dato, A.; Naso, L. G.; Rey, M.; Gonzalez, P. J.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Phenanthroline Complexation Enhances the Cytotoxic Activity of the VO-Chrysin System. *Inorganics* **2021**, *10* (1), 4. <https://doi.org/10.3390/inorganics10010004>.
- (97) D'Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43* (6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- (98) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D. W.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Antonov, A. V.; Arama, E.; Baehrecke, E. H.; Barlev, N. A.; Bazan, N. G.; Bernassola, F.; Bertrand, M. J. M.; Bianchi, K.; Blagosklonny, M. V.; Blomgren, K.; Borner, C.; Boya, P.; Brenner, C.; Campanella, M.; Candi, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Cecconi, F.; Chan, F. K.-M.; Chandel, N. S.; Cheng, E. H.; Chipuk, J. E.; Cidlowski, J. A.; Ciechanover, A.; Cohen, G. M.; Conrad, M.; Cubillos-Ruiz, J. R.; Czabotar, P. E.; D'Angiolella, V.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; De Laurenzi, V.; De Maria, R.; Debatin, K.-M.; DeBerardinis, R. J.; Deshmukh, M.; Di Daniele, N.; Di Virgilio, F.; Dixit, V. M.; Dixon, S. J.; Duckett, C. S.; Dynlacht, B. D.; El-Deiry, W. S.; Elrod, J. W.; Fimia, G. M.; Fulda, S.; García-Sáez, A. J.; Garg, A. D.; Garrido, C.; Gavathiotis, E.; Golstein, P.; Gottlieb, E.; Green, D. R.; Greene, L. A.; Gronemeyer, H.; Gross, A.; Hajnoczky, G.; Hardwick, J. M.; Harris, I. S.; Hengartner, M. O.; Hetz, C.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Joseph, B.; Jost, P. J.; Juin, P. P.; Kaiser, W. J.; Karin, M.; Kaufmann, T.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Kitsis, R. N.; Klionsky, D. J.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lee, S. W.; Lemasters, J. J.; Levine, B.; Linkermann, A.; Lipton, S. A.; Lockshin, R. A.; López-Otín, C.; Lowe, S. W.; Luedde, T.; Lugli, E.; MacFarlane, M.; Madeo, F.; Malewicz, M.; Malorni, W.; Manic, G.; Marine, J.-C.; Martin, S. J.; Martinou, J.-C.; Medema, J. P.; Mehlen, P.; Meier, P.; Melino, S.; Miao, E. A.; Molkenin, J. D.; Moll, U. M.; Muñoz-Pinedo, C.; Nagata, S.; Nuñez, G.; Oberst, A.; Oren, M.; Overholtzer, M.; Pagano, M.; Panaretakis, T.; Pasparakis, M.; Penninger, J. M.; Pereira, D. M.; Pervaiz, S.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Pinton, P.; Prehn, J. H. M.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G. A.; Rehm, M.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C. M. P.; Rubinsztein, D. C.; Rudel, T.; Ryan, K. M.; Sayan, E.; Scorrano, L.; Shao, F.; Shi, Y.; Silke, J.; Simon, H.-U.; Sistigu, A.; Stockwell, B. R.; Strasser, A.; Szabadkai, G.; Tait, S. W. G.; Tang, D.; Tavernarakis, N.; Thorburn, A.; Tsujimoto, Y.; Turk, B.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P.; Vander Heiden, M. G.; Villunger, A.; Virgin, H. W.; Vousden, K. H.; Vucic, D.; Wagner, E. F.; Walczak, H.; Wallach, D.; Wang, Y.; Wells, J. A.; Wood, W.; Yuan, J.; Zakeri, Z.; Zhivotovsky, B.; Zitvogel, L.; Melino, G.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- (99) Galluzzi, L.; Maiuri, M. C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Cell Death Modalities: Classification and Pathophysiological Implications. *Cell Death Differ.* **2007**, *14* (7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>.
- (100) Singh, N.; Bose, K. Apoptosis: Pathways, Molecules and Beyond. In *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances*; Bose, K., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_1.
- (101) Levine, B.; Yuan, J. Autophagy in Cell Death: An Innocent Convict? *J. Clin. Invest.* **2005**, *115* (10), 2679–2688. <https://doi.org/10.1172/JCI26390>.
- (102) Maciel-Herrerías, M.; Cabrera-Benítez, S.; Maciel-Herrerías, M.; Cabrera-Benítez, S. El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *Neumol. Cir. Tórax* **2016**, *75* (3), 227–236.
- (103) Shibutani, S. T.; Yoshimori, T. Autophagosome Formation in Response to Intracellular Bacterial Invasion. *Cell. Microbiol.* **2014**, *16* (11), 1619–1626. <https://doi.org/10.1111/cmi.12357>.
- (104) Escobar, Ma. L.; Echeverría, O. M.; Vázquez-Nin, G. H. Necrosis as Programmed Cell Death. In *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*; Ntuli, T. M., Ed.; InTech, 2015. <https://doi.org/10.5772/61483>.
- (105) Atale, N.; Gupta, S.; Yadav, U. c. s.; Rani, V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J. Microsc.* **2014**, *255* (1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>.

- (106) Javaeed, A.; Qamar, S.; Ali, S.; Mustafa, M. A. T.; Nusrat, A.; Ghauri, S. K. Histological Stains in the Past, Present, and Future. *Cureus* **13** (10), e18486. <https://doi.org/10.7759/cureus.18486>.
- (107) Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 2016 (4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.
- (108) Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*; IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- (109) Wakelin, L. P. G.; Adams, A.; Hunter, C.; Waring, M. J. Interaction of Crystal Violet with Nucleic Acids. *Biochemistry* **1981**, 20 (20), 5779–5787. <https://doi.org/10.1021/bi00523a021>.
- (110) Krause, R. G. E.; Goldring, J. P. D. Crystal Violet Stains Proteins in SDS-PAGE Gels and Zymograms. *Anal. Biochem.* **2019**, 566, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.015>.
- (111) Ren, Z.-X.; Yu, H.-B.; Li, J.-S.; Shen, J.-L.; Du, W.-S. Suitable Parameter Choice on Quantitative Morphology of A549 Cell in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Biosci. Rep.* **2015**, 35 (3), e00202. <https://doi.org/10.1042/BSR20150070>.
- (112) Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, 8 (7), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>.
- (113) McLennan, H. R.; Esposti, M. D. The Contribution of Mitochondrial Respiratory Complexes to the Production of Reactive Oxygen Species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, 32 (2), 153–162. <https://doi.org/10.1023/A:1005507913372>.
- (114) Xiong, Z.; Xing, C.; Xu, T.; Yang, Y.; Liu, G.; Hu, G.; Cao, H.; Zhang, C.; Guo, X.; Yang, F. Vanadium Induces Oxidative Stress and Mitochondrial Quality Control Disorder in the Heart of Ducks. *Front. Vet. Sci.* **2021**, 8, 756534. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.756534>.
- (115) Zhao, Y.; Ye, L.; Liu, H.; Xia, Q.; Zhang, Y.; Yang, X.; Wang, K. Vanadium Compounds Induced Mitochondria Permeability Transition Pore (PTP) Opening Related to Oxidative Stress. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104 (4), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.11.007>.
- (116) Hadjiadamou, I.; Vlasou, M.; Spanou, S.; Simos, Y.; Papanastasiou, G.; Kontargiris, E.; Dhima, I.; Ragos, V.; Karkabounas, S.; Drouza, C.; Keramidas, A. D. Synthesis of Vitamin E and Aliphatic Lipid Vanadium(IV) and (V) Complexes, and Their Cytotoxic Properties. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, 208, 111074. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111074>.
- (117) Aureliano, M.; De Sousa-Coelho, A. L.; Dolan, C. C.; Roess, D. A.; Crans, D. C. Biological Consequences of Vanadium Effects on Formation of Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (6), 5382. <https://doi.org/10.3390/ijms24065382>.
- (118) Kennedy, L.; Sandhu, J. K.; Harper, M.-E.; Cuperlovic-Culf, M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules* **2020**, 10 (10), 1429. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>.
- (119) Lv, H.; Zhen, C.; Liu, J.; Yang, P.; Hu, L.; Shang, P. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 2019, e3150145. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>.
- (120) Hissin, P. J.; Hilf, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal. Biochem.* **1976**, 74 (1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2).
- (121) Francioso, A.; Fanelli, S.; Cavallaro, R. A.; Fontana, M.; Mattioli, R.; D'Erme, M.; Mosca, L. Fluorometric Optimized Determination of Total Glutathione in Erythrocytes. *Separations* **2021**, 8 (6), 83. <https://doi.org/10.3390/separations8060083>.
- (122) Baranov, S. V.; Jauhari, A.; Carlisle, D. L.; Friedlander, R. M. Two Hit Mitochondrial-Driven Model of Synapse Loss in Neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **2021**, 158, 105451. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105451>.
- (123) Chang, H.-Y.; Huang, H.-C.; Huang, T.-C.; Yang, P.-C.; Wang, Y.-C.; Juan, H.-F. Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. *BIO-Protoc.* **2013**, 3 (8). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.430>.
- (124) Rehfeldt, S. C. H.; Laufer, S.; Goettert, M. I. A Highly Selective In Vitro JNK3 Inhibitor, FMU200, Restores Mitochondrial Membrane Potential and Reduces Oxidative Stress and

- Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7), 3701. <https://doi.org/10.3390/ijms22073701>.
- (125) Puckett, C. A.; Ernst, R. J.; Barton, J. K. Exploring the Cellular Accumulation of Metal Complexes. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (5), 1159–1170. <https://doi.org/10.1039/B922209J>.
- (126) Billowria, K.; Ali, R.; Rangra, N. K.; Kumar, R.; Chawla, P. A. Bioactive Flavonoids: A Comprehensive Review on Pharmacokinetics and Analytical Aspects. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, *0* (0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2105641>.
- (127) Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Wilms, L. C.; Beetstra, S. A. J. N.; Heijnen, C. G. M.; Voss, H.-P.; Bast, A. Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (5), 1184–1187. <https://doi.org/10.1021/jf010855a>.
- (128) Pessoa, J. C.; Santos, M. F. A.; Correia, I.; Sanna, D.; Sciortino, G.; Garribba, E. Binding of Vanadium Ions and Complexes to Proteins and Enzymes in Aqueous Solution. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *449*, 214192. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214192>.
- (129) Papadopoulou, A.; Green, R. J.; Frazier, R. A. Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (1), 158–163. <https://doi.org/10.1021/jf048693g>.
- (130) He, X. M.; Carter, D. C. Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin. *Nature* **1992**, *358* (6383), 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>.
- (131) Macii, F.; Biver, T. Spectrofluorimetric Analysis of the Binding of a Target Molecule to Serum Albumin: Tricky Aspects and Tips. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *216*, 111305. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111305>.
- (132) Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. Fluorescence Behavior of Tryptophan Residues of Bovine and Human Serum Albumins in Ionic Surfactant Solutions: A Comparative Study of the Two and One Tryptophan(s) of Bovine and Human Albumins. *J. Protein Chem.* **1996**, *15* (3), 265–272. <https://doi.org/10.1007/BF01887115>.
- (133) Alhazmi, H. A. FT-IR Spectroscopy for the Identification of Binding Sites and Measurements of the Binding Interactions of Important Metal Ions with Bovine Serum Albumin. *Sci. Pharm.* **2019**, *87* (1), 5. <https://doi.org/10.3390/scipharm87010005>.
- (134) Maltas, E. Binding Interactions of Niclosamide with Serum Proteins. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22* (4), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.03.004>.
- (135) Stern, O.; Volmer, M. Uder Die Abklingzeit Der Fluoreszenz. *Phys Z* **1919**, *20*, 183–188.
- (136) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- (137) Jayabharathi, J.; Thanikachalam, V.; Sathishkumar, R.; Jayamoorthy, K. Fluorescence Investigation of the Interaction of 2-(4-Fluorophenyl)-1-Phenyl-1H-Phenanthro [9,10-d] Imidazole with Bovine Serum Albumin. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *117*, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.10.005>.
- (138) Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- (139) Martini, N.; Parente, J. E.; Toledo, M. E.; Escudero, G. E.; Laino, C. H.; Martínez Medina, J. J.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; Lezama, L.; Williams, P. A. M.; Ferrer, E. G. Evidence of Promising Biological-Pharmacological Activities of the Sertraline-Based Copper Complex: (SerH₂)₂[CuCl₄]. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *174*, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.012>.
- (140) *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*; Steiner, R. F., Weinryb, I., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1971. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1878-1>.
- (141) Peng, S.-H.; Lv, B.-B.; Ali, A.; Wang, J.-M.; Ying, X.; Wang, H.; Liu, J.-B.; Ji, L.-N.; Liu, H.-Y. The Magnetic Properties, DNA/HSA Binding and Nuclease Activity of Manganese N-Confused Porphyrin. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20* (05), 624–638. <https://doi.org/10.1142/S1088424616500449>.
- (142) Tajmir-Riahi, H. A.; Agudelo, D.; Bourassa, P. Nutrition, Diet, the Eye, and Vision. In *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye*; Elsevier, 2014; pp 577–586. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401717-7.00059-9>.
- (143) Matarazzo, A.; Hudson, R. H. E. Fluorescent Adenosine Analogs: A Comprehensive Survey. *Tetrahedron* **2015**, *71* (11), 1627–1657. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.066>.
- (144) Hilaire, M. R.; Ahmed, I. A.; Lin, C.-W.; Jo, H.; DeGrado, W. F.; Gai, F. Blue Fluorescent Amino Acid for Biological Spectroscopy and Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (23), 6005–6009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705586114>.

- (145) TOPALĂ, T.; BODOKI, A.; OPREAN, L.; OPREAN, R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Clujul Med.* **2014**, *87* (4), 215–219. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>.
- (146) Shi, X.; Li, D.; Xie, J.; Wang, S.; Wu, Z.; Chen, H. Spectroscopic Investigation of the Interactions between Gold Nanoparticles and Bovine Serum Albumin. *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57* (10), 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4741-3>.
- (147) Wang, T.; Xiang, B.; Wang, Y.; Chen, C.; Dong, Y.; Fang, H.; Wang, M. Spectroscopic Investigation on the Binding of Bioactive Pyridazinone Derivative to Human Serum Albumin and Molecular Modeling. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, *65* (1), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.03.008>.
- (148) Hu, Y.-J.; Liu, Y.; Zhao, R.-M.; Qu, S.-S. Interaction of Colchicine with Human Serum Albumin Investigated by Spectroscopic Methods. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *37* (3), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.09.007>.
- (149) Shi, X.; Li, X.; Gui, M.; Zhou, H.; Yang, R.; Zhang, H.; Jin, Y. Studies on Interaction between Flavonoids and Bovine Serum Albumin by Spectral Methods. *J. Lumin.* **2010**, *130* (4), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2009.11.008>.
- (150) Scatchard, G. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51* (4), 660–672. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x>.
- (151) Feher, J. 9.1 - General Principles of Endocrinology. In *Quantitative Human Physiology (Second Edition)*; Feher, J., Ed.; Academic Press: Boston, 2017; pp 853–869. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00084-7>.
- (152) Koch-Weser, J.; Sellers, E. M. Binding of Drugs to Serum Albumin (First of Two Parts). *N. Engl. J. Med.* **1976**, *294* (6), 311–316. <https://doi.org/10.1056/NEJM197602052940605>.
- (153) Schmidt, S.; Gonzalez, D.; Derendorf, H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (3), 1107–1122. <https://doi.org/10.1002/jps.21916>.
- (154) Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H. The Effect of Plasma Protein Binding on in Vivo Efficacy: Misconceptions in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (12), 929–939. <https://doi.org/10.1038/nrd3287>.
- (155) Dennis, M. S.; Zhang, M.; Meng, Y. G.; Kadkhodayan, M.; Kirchhofer, D.; Combs, D.; Damico, L. A. Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (38), 35035–35043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205854200>.
- (156) Du Souich, P.; Verges, J.; Erill, S. Plasma Protein Binding and Pharmacological Response: *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *24* (6), 435–440. <https://doi.org/10.2165/00003088-199324060-00001>.
- (157) Sathyadevi, P.; Krishnamoorthy, P.; Butorac, R. R.; Cowley, A. H.; Bhuvanesh, N. S. P.; Dharmaraj, N. Effect of Substitution and Planarity of the Ligand on DNA/BSA Interaction, Free Radical Scavenging and Cytotoxicity of Diamagnetic Ni(II) Complexes: A Systematic Investigation. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003**, *2011*, *40* (38), 9690–9702. <https://doi.org/10.1039/c1dt10767d>.
- (158) Kandagal, P. B.; Seetharamappa, J.; Ashoka, S.; Shaikh, S. M. T.; Manjunatha, D. H. Study of the Interaction between Doxepin Hydrochloride and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques. *Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, *39* (4–5), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.03.027>.

Capítulo V

Actividad antihipertensiva y efectos
cardíacos del complejo $[\text{Zn}(\text{Olme})(\text{H}_2\text{O})_2]$

Tabla de contenidos

Introducción.....	252
1. Diseño Racional	253
2. Presión arterial	255
3. Hipertrofia cardíaca	257
4. Fibrosis cardíaca	261
5. Estrés oxidativo	263
5.1. Determinación de glutatión en tejido animal.....	264
5.2. Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido animal ...	265
5.3. Determinación de especies reactivas de ácido barbitúrico (TBARS) en tejido animal.....	266
6. Función cardíaca.....	267
7. Conclusiones parciales	269
Referencias bibliográficas.....	271

Capítulo V. Actividad antihipertensiva y efectos cardíacos del complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$

Introducción

Es bien sabido que la presión arterial (PA) elevada constituye un alto riesgo para la salud, y es reconocido como un factor de riesgo para accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal en etapa terminal y mortalidad general que afecta a todas las segmentos de la población. Aunque históricamente la PA elevada se ha relacionado con los países económicamente desarrollados, la información más novedosa indica un impacto generalizado de la hipertensión en todas las regiones y poblaciones del mundo ¹. Según estadísticas recientes, el número de adultos con hipertensión casi se ha duplicado en los últimos 40 años, y el aumento se ha producido principalmente en los países de ingresos bajos y medios. La tasa de enfermedades cardiovasculares también ha aumentado marcadamente en los países latinoamericanos, convirtiéndose en la principal causa de morbilidad y mortalidad ².

Existen diversos tratamientos farmacológicos para el control de la presión arterial, como agentes diuréticos, beta-bloqueantes, antagonistas del calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y bloqueadores de los receptores de angiotensina (BRA) ³.

El objetivo principal en el tratamiento de la hipertensión es reducir o bloquear el exceso de actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Los inhibidores del RAAS disponibles en la actualidad han demostrado ser efectivos para reducir la presión arterial, sin embargo, no han logrado revertir el daño en los órganos producto de la hipertensión. Además, estos inhibidores del RAAS presentan algunos efectos adversos, como la hipotensión y la hiperpotasemia y, teniendo esto en cuenta, es necesaria la investigación y el desarrollo de nuevas terapias seguras y efectivas ⁴.

En este contexto, el complejo $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme) surge como una alternativa prometedora para el tratamiento de la hipertensión. Este complejo, el cual se obtuvo a partir del BRA olmesartán y el catión Zn(II), exhibió una marcada actividad antihipertensiva y efectos cardíacos positivos sobre un

modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). En este capítulo, se describirán los resultados obtenidos del tratamiento con ZnOlme en comparación a los efectos producidos por olmesartán y Zn por separado en relación a la presión arterial, hipertrofia cardíaca, fibrosis cardíaca, estado redox y función cardíaca, sobre el modelo SHR.

1. Diseño Racional

Como se mencionó en capítulos previos, la complejación de compuestos bioactivos con metales de transición de interés biológico supone una estrategia interesante para el diseño de nuevos compuestos con potencial farmacológico. La estabilidad de estos complejos de coordinación depende de la naturaleza del metal y del ligando, de la afinidad entre los átomos donantes y los iones metálicos según el concepto ácido-base de Pearson y de la afinidad por los electrones del centro metálico. La modificación estructural de los fármacos generada por la complejación de iones metálicos puede conducir a la probable modificación de sus propiedades biológicas.

En este sentido, el zinc, un mineral traza esencial y el segundo metal de transición más abundante en el ser humano, despliega una variedad de funciones fundamentales en el cuerpo humano. Este elemento se encuentra en todas las células y tejidos, y está involucrado en la función de más de 300 enzimas, desempeñando un papel integral en el soporte inmunológico, la proliferación celular, la síntesis y reparación del ADN, y el metabolismo de la vitamina A, es crucial para la visión y la fortaleza inmunológica, también juega un rol fundamental durante el crecimiento, fomentando el desarrollo normal en niños y adolescentes, ayudando a la salud ósea y es fundamental en el intrincado proceso de la cicatrización de heridas. Asimismo, está presente en metalopeptidasas y, por lo tanto, desempeña un papel importante en la función cardíaca.⁵⁻⁸.

Por otra parte, la deficiencia de zinc es peligrosa debido a su papel crucial en funciones corporales. Su falta puede acarrear graves riesgos para la salud, incluyendo problemas inmunológicos, retrasos en el crecimiento y desarrollo infantil, cicatrización lenta de heridas, diarrea, caída del cabello, trastornos de la piel, deterioro cognitivo y mayor susceptibilidad a infecciones como

neumonía y tuberculosis. Incluso las deficiencias leves tienen impactos significativos en la salud, y las causas van desde una dieta deficiente en zinc hasta problemas de absorción, pérdidas excesivas por diarrea, o vómitos. Las formas graves de esta deficiencia pueden llevar hasta la muerte ⁹⁻¹³.

Además, el zinc desempeña un papel crucial tanto como constituyente de agentes antioxidantes y como antiinflamatorios. Su presencia influye en el equilibrio oxidante/antioxidante celular, disminuyendo el estrés oxidativo al actuar como antioxidante y molécula de señalización. La deficiencia de zinc aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y puede afectar negativamente la respuesta inmune, generando mayor auto-reactividad y disminuyendo la eficiencia de la respuesta inmune celular mediada por anticuerpos. Además, las proteínas reguladoras de la homeostasis del zinc tienen un papel fundamental en la fisiología y la fisiopatología cardíaca. Estas proteínas son clave para mantener niveles intracelulares de zinc óptimos, esenciales para la función cardíaca normal, y su disfunción se ha asociado con diversas enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, infarto de miocardio y lesiones por isquemia/reperfusión. Numerosos estudios en animales y humanos han demostrado que la deficiencia de zinc puede estar asociada con factores de riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (ECV), y la administración de zinc podría ser beneficiosa para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades ¹⁴⁻¹⁷.

Por otro lado, se han reportado complejos de coordinación obtenidos a partir de zinc con potencial cardioprotector, a través de la inhibición de prostanoïdes proinflamatorios y regulación positiva de enzimas antioxidantes ¹⁸⁻²⁰.

De manera similar, en nuestro grupo de investigación se ha comprobado cómo la complejación de zinc a compuestos antihipertensivos aumenta la actividad farmacológica del compuesto de partida a través de una mejor interacción con los sitios de unión al receptor, y la modulación del estado redox celular ²¹⁻²³.

Debido a lo planteado anteriormente, la modificación estructural por complejación con zinc de un BRA como el olmesartán, podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento de la hipertensión debido a la efectividad y seguridad que han mostrado esta familia de compuestos, también,

la modificación estructural podría conllevar a una mayor interacción con el receptor AT1, resultando en una respuesta biológica mejorada, además, la inclusión de zinc supone la obtención de mayores beneficios a través de la modulación del estado redox.

2. Presión arterial

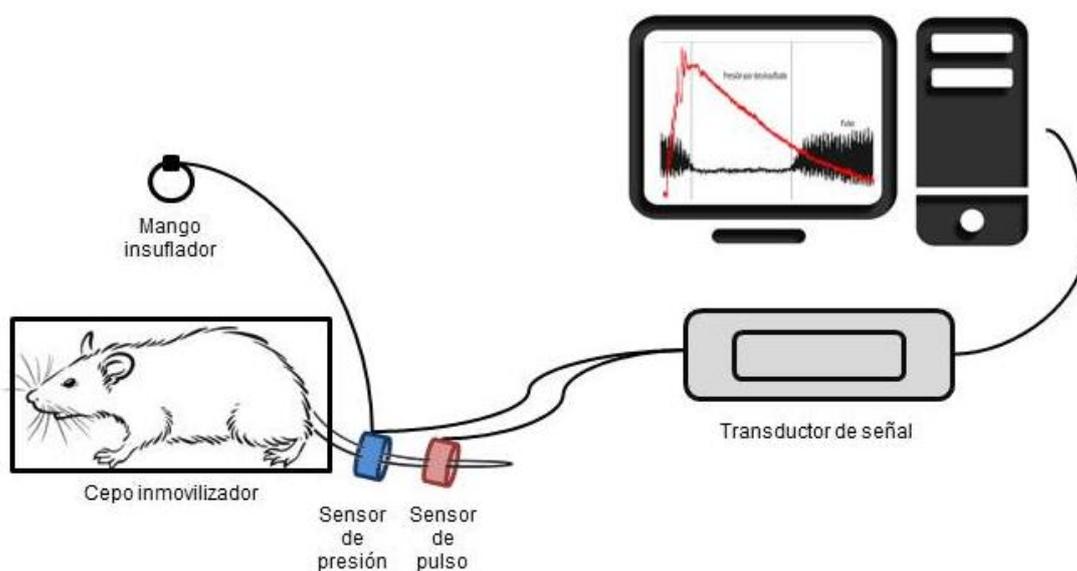
Como fue mencionado, la presión arterial elevada, también conocida como hipertensión es a la vez una enfermedad y un factor de riesgo importante para otras enfermedades. Los estudios poblacionales muestran una tasa creciente de eventos cardiovasculares con un aumento de la presión arterial (a partir de presiones arteriales sistólicas ≥ 115 mmHg). Para definir la hipertensión, los lineamientos internacionales para el manejo de la misma han tomado dos enfoques, ya sea basando su definición en un umbral para el tratamiento, o alternativamente, en la presión arterial por encima de la cual el riesgo de eventos se incrementa. Algunos lineamientos internacionales han elegido un punto de corte de presión arterial por encima del cual se considera que los beneficios del tratamiento, superan las consecuencias negativas del mismo. Utilizando este enfoque, el punto de corte que define la hipertensión es de 140/90 mmHg. Estos lineamientos también enfatizan el rango de gravedad de la hipertensión al estratificar la presión arterial por encima del punto de corte ²⁴:

- Grado 1: 140-159 mmHg sistólica o 90-99 mmHg diastólica.
- Grado 2: 160-179 mmHg sistólica o 100-109 mmHg diastólica.
- Grado 3: ≥ 180 mmHg sistólica o ≥ 110 mmHg diastólica.

En varios modelos animales, se ha observado que los valores de presión arterial de referencia para ratas normotensas son inferiores a 120 mmHg ²⁵⁻²⁷.

El manejo de los animales, y los detalles respecto a su tratamiento con ZnCl₂, olmesartán y ZnOlme se describieron en el apartado 7.1 del capítulo II. La presión arterial sistólica de las ratas se registró utilizando un método no invasivo de pletismografía de cola. Este procedimiento consistió en situar una banda de presión alrededor de la cola de cada rata, inflarla para ocluir temporalmente el flujo sanguíneo y luego liberar la presión de manera gradual.

La presión arterial sistólica se determinó observando el retorno del flujo sanguíneo en la cola a través de un sensor. Para llevar a cabo esta medición, las ratas fueron situadas, con la cola expuesta, en un cepo inmovilizador y sobre una manta térmica calentada a 37 °C. Después de 5 minutos de espera, para garantizar la tranquilidad de los animales, se dispuso un manguito sobre la cola, en contacto con la manta térmica y se infló manualmente. El dispositivo se conectó a un software que permitió la visualización de los datos (Physiologic, Exxer, Ingeniería electrónica, Argentina). El sistema funciona al ocluir el flujo sanguíneo en la cola de forma intermitente a través del manguito, mientras un transductor registra la presión arterial ²⁷ (Esquema V-1).



Esquema V-1. Sistema de medición de la presión arterial en ratas de laboratorio.

La presión arterial sistólica (PAS) se registró semanalmente durante dos meses, los resultados mostraron que dicho parámetro disminuyó de manera considerable por el tratamiento con olmesartán y ZnOlme. Por otra parte, el tratamiento con ZnCl₂, no condujo a la disminución de la PAS. El tratamiento con ZnOlme durante las dos primeras semanas conllevó a una disminución significativa de la PAS con respecto al tratamiento con olmesartán y el grupo control. Al final del tratamiento, la presión arterial del grupo tratado con olmesartán se redujo en un 35,15 % respecto al grupo control, alcanzando un valor promedio de 127,25 ± 1,31 mmHg. Por otra parte, el tratamiento con ZnOlme después de 8 semanas condujo a la disminución de la presión arterial

en un 44,58 % respecto al grupo control, hasta alcanzar un valor promedio de $108,75 \pm 1,11$ mmHg (Figura V-1).

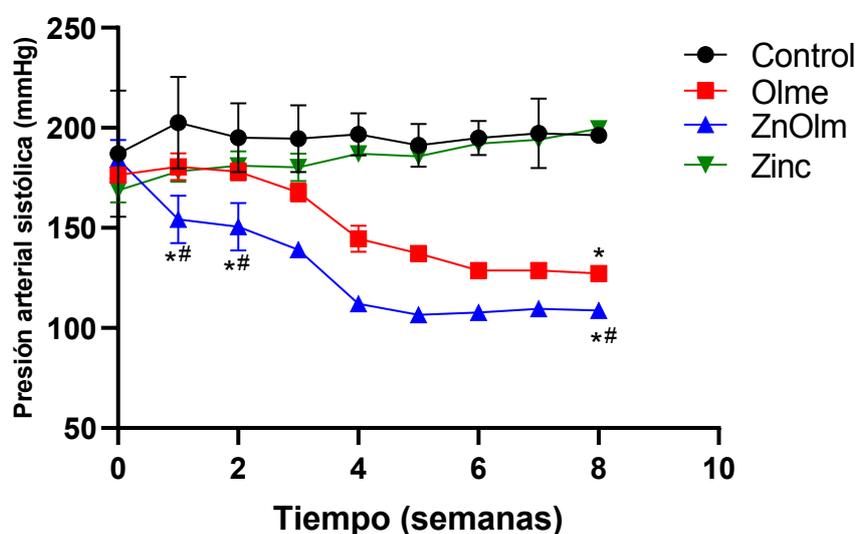


Figura V-1. Efectos de $ZnCl_2$ (verde), olmesartán (rojo) y ZnOlme (azul) sobre la presión arterial sistólica de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Los datos se expresan como la media \pm SEM; *: Diferencia estadísticamente significativa entre Olme, ZnOlme y el control ($*p < 0,01$); #: diferencias estadísticamente significativas entre Olme y ZnOlme ($\#p < 0,01$)

3. Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca se clasifica como fisiológica cuando está asociada con una función cardíaca normal o como patológica cuando está relacionada con la disfunción cardíaca. La hipertrofia patológica está asociada con factores como el estrés hemodinámico prolongado y anormal, debido a la hipertensión, el infarto de miocardio, etc ²⁸. Se han mencionado varios cambios fisiopatológicos y clínicos para explicar la asociación entre la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) y un mayor riesgo cardiovascular. Estos incluyen el deterioro de la función diastólica y del rendimiento sistólico, al menos durante el ejercicio; alteraciones en la actividad del sistema nervioso autónomo cardíaco; reducción de la reserva de flujo sanguíneo coronario; y predisposición a las arritmias ventriculares. Además, es probable que la HVI sea un indicador sensible de cambios estructurales vasculares tanto en arterias grandes como en las pequeñas ²⁹. Como ya se mencionó, la activación sostenida de los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1R) por la hormona vasoactiva angiotensina II aumenta la presión arterial y contribuye a la patogénesis de la hipertensión, por

lo que, debido a la sobrecarga de presión, la masa cardíaca se hipertrofia ³⁰. Este mecanismo también se ve potenciado por el efecto proliferativo y oxidante de la Ang II en los cardiomiocitos ³¹.

Con el fin de evaluar los efectos del tratamiento con ZnCl₂, olmesartán y ZnOlme sobre la hipertrofia cardíaca se realizaron diferentes determinaciones de acuerdo con el método de la Sociedad Americana de Ecocardiografía ³². El índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) se determinó al relacionar la masa de éste con el peso corporal, y también por ecocardiografía, en este caso, la masa del ventrículo izquierdo (MVI) se calculó según Devereaux y Reichek ³³, luego, el IMVI se calculó como el cociente entre la MVI y la longitud de la tibia. Así mismo, empleando ecocardiografía, se determinó el grosor de la pared posterior del VI, y el septo interventricular en diástole cómo se describió en el apartado 7.1 del capítulo II. Además, se determinó el área transversal de los cardiomiocitos por microscopia óptica luego de teñir con hematoxilina eosina, como se detalló en el apartado 7.6 del capítulo II.

Después de ocho semanas de tratamiento, el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) estimado a partir de la relación de la MVI y el peso corporal, no se vio afectado de manera estadísticamente significativa por el tratamiento con olmesartán con respecto al control, pues este parámetro solo se redujo en un 5,92 % hasta alcanzar un valor igual a $2,85 \pm 0,11$ mg/g.

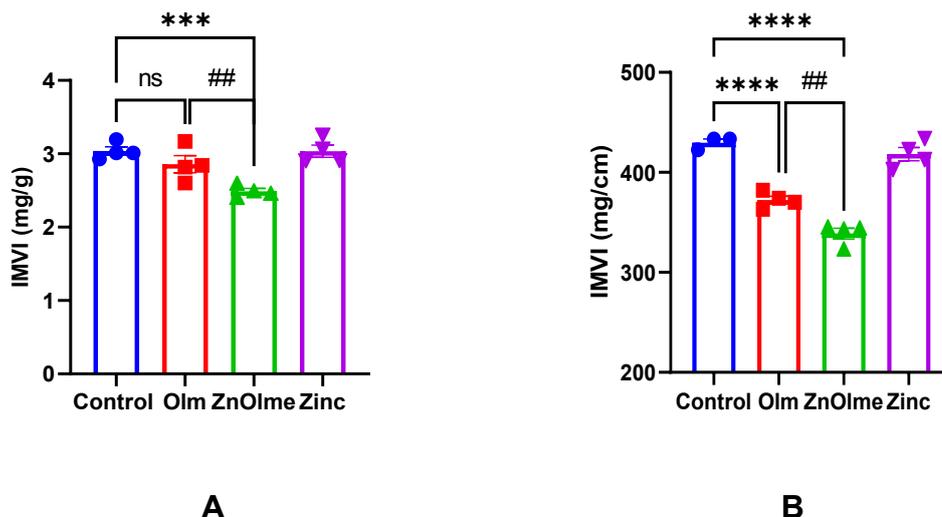


Figura V-2. Hipertrofia cardíaca estimada a partir del índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) (A) como la relación MVI/peso corporal en mg/g. (B) como la relación MVI/longitud tibial en mg/cm. Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y control (**p<0.001; ****p<0.0001), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (##p<0.01).

Además, el tratamiento con ZnOlme condujo a la disminución del IMVI de manera significativa en comparación al grupo control y al grupo tratado con olmesartán, la reducción del IMVI respecto al control fue del 18,11 %, y respecto al tratamiento con olmesartán fue del 12,95 %, siendo este valor igual a $2,48 \pm 0,04$ mg/g (Figura V-2A).

Por otro lado, la estimación realizada a partir de ecocardiografía evidenció la reducción significativa del IMVI por el tratamiento con olmesartán y ZnOlme respecto al control, dicha disminución fue del 10,96 % y 19,81 %, alcanzando valores de $372,25 \pm 3,97$ mg/cm y $338,75 \pm 5,26$ mg/cm respectivamente. Más aun, la diferencia encontrada entre el tratamiento con olmesartán y ZnOlme fue estadísticamente significativa (Figura V-2B). A partir de estas determinaciones, se puede apreciar como el tratamiento con ZnOlme tiene un mayor efecto sobre la reducción del IMVI, respecto al tratamiento con olmesartán y ZnCl₂.

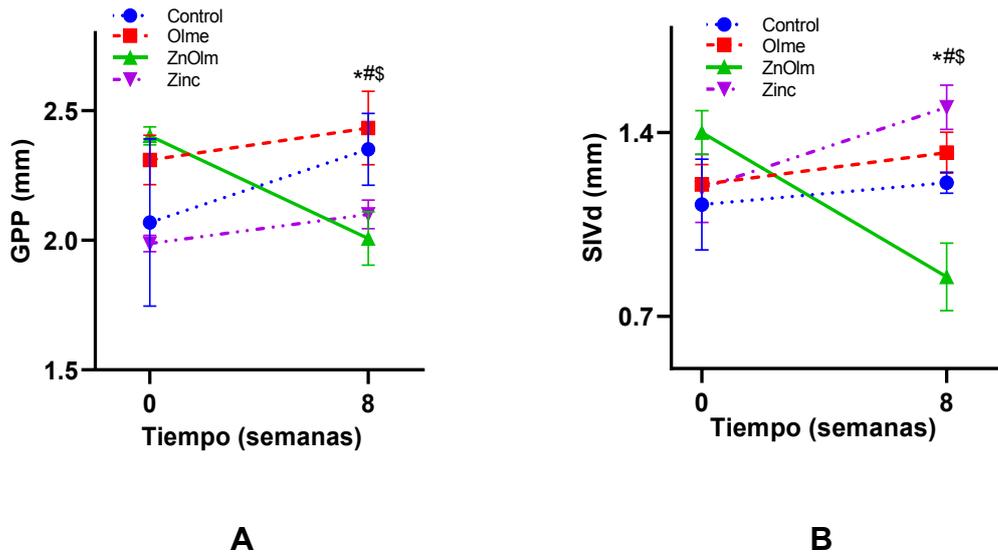


Figura V-3. Hipertrofia cardíaca estimada como el cambio en el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (GPP) (A) y el septo interventricular en diástole (SIVd) (B). Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media ± SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y control (*p<0.05), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (#p<0.05), (\$) valores estadísticamente diferentes entre el tiempo inicial y final en el tratamiento con ZnOlme.

Por otra parte, los cambios ocasionados sobre la hipertrofia cardíaca también se pudieron estimar por el cambio en el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (GPP) y el septo interventricular en diástole (SIVd) (Figura V-3).

Se puede apreciar que el tratamiento con ZnOlme condujo a la disminución del GPP y el SIVd, lo cual indica una disminución en la hipertrofia cardíaca. Por el contrario, el tratamiento con olmesartán y ZnCl₂, no condujo a cambios favorables. El GPP por el tratamiento con ZnOlme disminuyó en un 16,46 % con respecto al grupo control alcanzando un valor medio de 2,007 ± 0,103 mm. Por otra parte, el SIVd se redujo en un 39,28 % con respecto al grupo control, hasta alcanzar un valor medio de 0,850 ± 0,129 mm (Figura V-3).

Además de estas determinaciones, la hipertrofia cardíaca también se estimó al evaluar el cambio en el área transversal de los cardiomiocitos por microscopía óptica (Figura V-4).

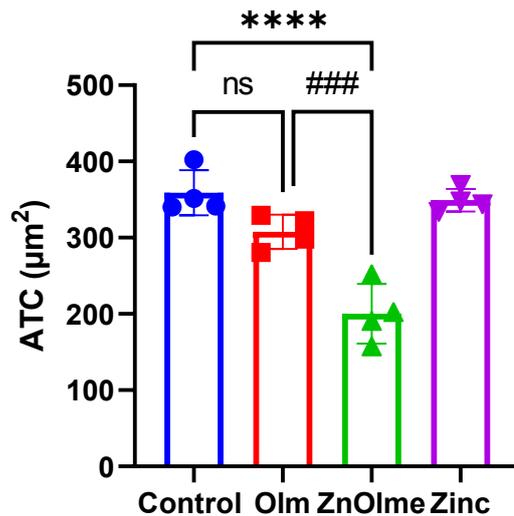


Figura V-4. Hipertrofia cardíaca estimada como el cambio en el área transversal de cardiomiocitos. Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se presentan como la media ± SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y el control (****p<0.0001), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (###p>0.001).

A partir de los resultados se evidenció la disminución del área transversal de los cardiomiocitos (ATC) por el tratamiento con olmesartán y ZnOlme, lo cual indica el efecto positivo del tratamiento sobre la hipertrofia cardíaca. Este parámetro se redujo en un 14,28 % por el tratamiento con olmesartán hasta alcanzar un valor medio de $307,60 \pm 11,22 \mu\text{m}^2$, mientras que el tratamiento con ZnOlme condujo a una disminución del 44,23 % con respecto al grupo control hasta alcanzar un valor medio de $200,10 \pm 19,59 \mu\text{m}^2$. Estos resultados indican que la terapia con ZnOlme redujo de manera más efectiva la hipertrofia del ventrículo izquierdo en comparación con el olmesartán y el ZnCl₂.

4. Fibrosis cardíaca

Las enfermedades fibróticas son responsables de más de 800.000 muertes anuales a nivel mundial, se presentan mayoritariamente como fibrosis pulmonar y cardíaca, y ocasionan el remodelamiento patológico de la matriz extracelular, esta condición puede ser producto del envejecimiento, lesiones o enfermedades. Como consecuencia de la fibrosis cardíaca, el tejido cicatrizal contribuye a la aparición de diversas disfunciones, como la reducción de la fracción de eyección y la alteración de la conductancia eléctrica, lo que puede conducir a resultados fatales. La función contráctil del miocardio está

complejamente regulada por una matriz fibrosa, la cual sufre cambios en estados patológicos, los cuales están frecuentemente caracterizados por el engrosamiento de elementos estructurales finos debido al aumento de la síntesis del colágeno tipo I. Comprender la función de esta matriz fibrosa, y la de los diferentes tipos de colágeno presentes en ella, es de suma importancia para el manejo de los síndromes coronarios agudos y la mitigación de sus consecuencias clínicas a corto y largo plazo en la cardiopatía isquémica^{34,35}.

Con el fin de evaluar la fibrosis cardíaca, se determinó el contenido de colágeno tipo I y tipo III, los cuales están asociados con la rigidez y la elasticidad vascular, respectivamente³⁶. Dicha determinación se realizó mediante microscopía óptica utilizando secciones de 5 μm de grosor del ventrículo izquierdo. Se empleó la técnica del rojo de Picrosirius, como se detalló en el apartado 7.7 del capítulo II.

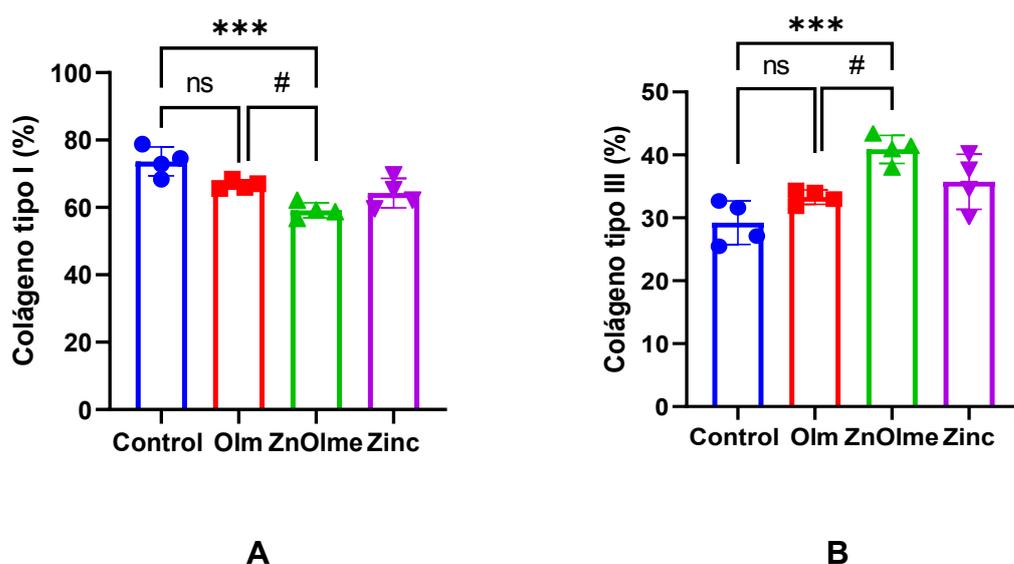


Figura V-5. Fibrosis cardíaca estimada a partir de la evaluación del contenido de colágeno tipo I (A) y colágeno tipo III (B). Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlm (verde), ZnCl_2 (violeta), control (azul). Los valores se presentan como la media \pm SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlm y el control (** $p < 0.001$), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlm a la misma concentración ($\#p < 0.05$).

Los resultados permitieron observar que el tratamiento con ZnOlm mejora de manera notable la fibrosis cardíaca. El colágeno tipo I, responsable de conferir rigidez al tejido cardíaco, se vio disminuido de manera significativa por el

tratamiento con ZnOlme, en comparación al grupo tratado con olmesartán y el grupo control. En este caso, la reducción fue del 14,53 % respecto al control hasta alcanzar un valor medio de $59,12 \pm 1,12$ %, mientras que la reducción ocasionada en el colágeno tipo I por el tratamiento con olmesartán fue únicamente del 6,90 % y no fue estadísticamente significativa (Figura V-5A). De manera similar, el tratamiento con ZnOlme ocasionó el aumento del colágeno tipo III en el tejido cardíaco, en este caso, se pudo notar un aumento estadísticamente significativo del 11,65 % respecto al grupo control, alcanzando un valor final de $40,88 \pm 1,12$ %. El tratamiento con olmesartán condujo a un aumento no significativo del colágeno tipo III igual a un 4,08 % (Figura V-5B). Por lo tanto, se puede observar que el tratamiento con ZnOlme indujo con éxito una reducción significativa de la fibrosis cardíaca con respecto al tratamiento con olmesartán. A continuación se pueden observar imágenes representativas de la tinción con rojo de Picrosirius, tomadas del espacio intersticial del tejido miocárdico, en donde los tonos amarillo-rojo brillante representan las fibras de colágeno tipo I y los tonos verdes muestran el colágeno tipo III (Figura V-6).

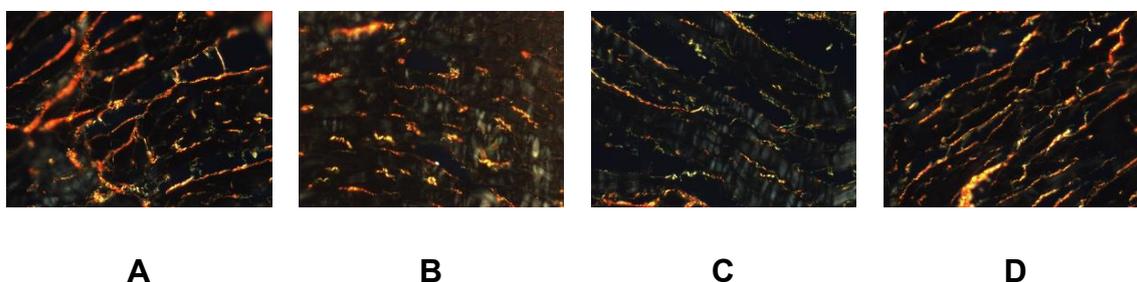


Figura V-6. Imágenes representativas del tejido cardíaco teñido con rojo de picrosirius para la determinación de colágeno tipo I y III. Efectos de control (A), olmesartán (B), ZnOlme (C) y ZnCl₂ (D).

5. Estrés oxidativo

Como ya fue mencionado, la hipertensión se considera el factor de riesgo más común de enfermedades cardiovasculares y también se considera una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Los mecanismos que subyacen al proceso patológico de la hipertensión no están completamente explicados. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que el

aumento del estrés oxidativo desempeña un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión ³⁷.

Las EROs vasculares producidas de manera controlada se consideran mediadores fisiológicos importantes, que funcionan como moléculas de señalización para mantener la integridad vascular regulando la función endotelial y la contracción-relajación vascular. Sin embargo, el estrés oxidativo puede estar implicado en la aparición de disfunción endotelial y lesión vascular relacionada ³⁸. Una característica inicial es la disfunción endotelial con un equilibrio NO/EROs alterado, lo que favorece un aumento de la vasoconstricción, la oxidación, la inflamación, la trombosis y la proliferación en la pared del vaso ³⁹. La actividad de las EROs podría desencadenar cascadas fisiopatológicas que conducen a inflamación, migración de monocitos, peroxidación lipídica y aumento de la deposición de matriz extracelular en la pared vascular, entre otros eventos ³⁸.

Con el fin de estimar el estado redox en el tejido cardíaco, se tomaron fracciones del ventrículo izquierdo para determinar especies reactivas del oxígeno, glutatión reducido y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) como se detalló en los apartados desde el 7.2 al 7.5 del capítulo II.

5.1. Determinación de glutatión en tejido animal

Los resultados obtenidos permitieron apreciar cómo el tratamiento con ZnOlme causó un aumento considerable en los niveles del sistema antioxidante glutatión en el tejido cardíaco. Los niveles de GSH aumentaron por el tratamiento con ZnOlme en un 81,93 % con respecto al control, y un 48,22 % con respecto al grupo tratado con olmesartán, hasta alcanzar un valor medio de $0,450 \pm 0,054 \mu\text{g GSH/mg proteína}$, el tratamiento con ZnCl_2 no produjo cambios notables. Por lo tanto, el tratamiento con ZnOlme aumentó la capacidad antioxidante en el tejido ventricular, previniendo el estrés oxidativo en el corazón (Figura V-7).

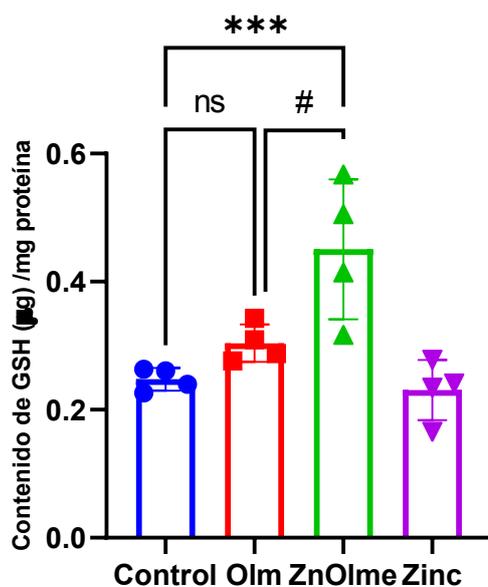


Figura V-7. Contenido de glutatión en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas. Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), $ZnCl_2$ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y el control (** $p < 0.001$), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (# $p < 0.05$).

5.2. Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido animal

Los resultados permitieron apreciar cómo el tratamiento con olmesartán y ZnOlme redujeron la generación de especies reactivas de oxígeno respecto al grupo control, o al tratado con $ZnCl_2$. Más aún, la producción de EROs por el tratamiento con ZnOlme fue significativamente menor en comparación al tratamiento con olmesartán. La generación de EROs por el tratamiento con olmesartán se redujo en un 29,98 % respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con ZnOlme ocasionó la reducción de este parámetro en un 84,60 % (Figura V-8).

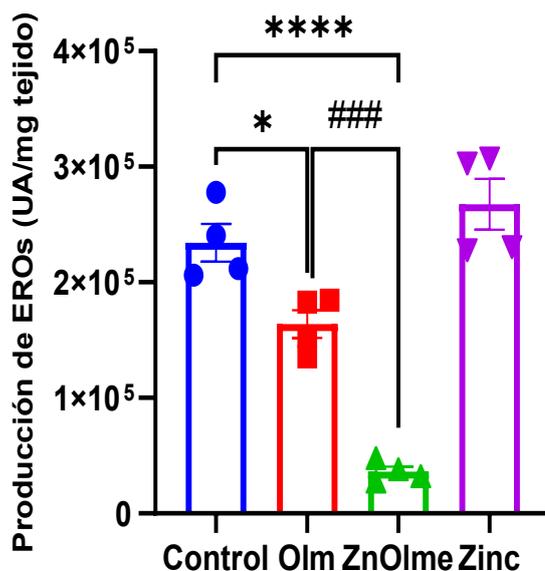


Figura V-8. Producción de especies reactivas de oxígeno en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas. Efectos de olmesartán (rojo), ZnOIme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media ± SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOIme y el control (*p<0.05; ****p<0.0001), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOIme a la misma concentración (###p>0.001).

5.3. Determinación de especies reactivas de ácido barbitúrico (TBARS) en tejido animal

El daño oxidativo sobre el tejido cardíaco se estimó a partir de la determinación de peróxidos lipídicos como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico. En concordancia con los resultados presentados previamente, el tratamiento con ZnOIme redujo la peroxidación lipídica de manera considerable en comparación al grupo control y al tratado con olmesartán. Los niveles de malondialdehído (MDA) se redujeron por el tratamiento con ZnOIme un 42,46 % con respecto al grupo control, y un 30,78 % con respecto al grupo tratado con olmesartán, hasta alcanzar un valor medio de $3,74 \pm 0,13$ nmol MDA/mg proteína (Figura V-9).

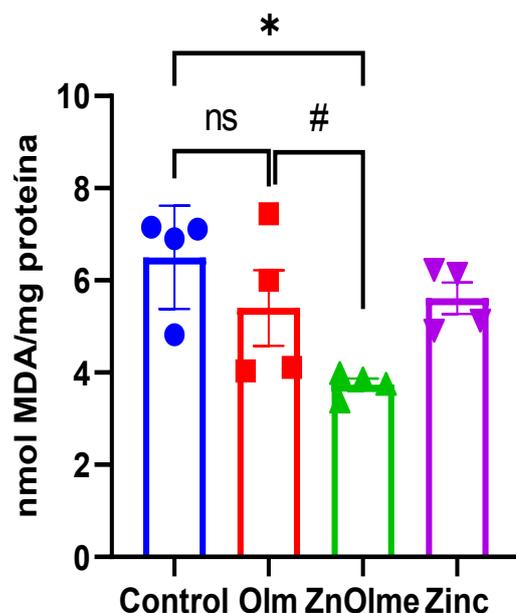


Figura V-9. Peroxidación lipídica en tejido cardíaco de ratas SHR tratadas durante 8 semanas. Medido como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media \pm SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y el control (* $p < 0.05$), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (# $p < 0.05$).

6. Función cardíaca

La función cardíaca es la capacidad del corazón para satisfacer las demandas metabólicas del cuerpo. La entrega de sangre oxigenada y la eliminación de desechos celulares son fundamentales para la vida. La función cardíaca se ve afectada por el volumen de llenado (precarga), la resistencia vascular (poscarga) y la contractilidad miocárdica. La precarga es el volumen de sangre que entra en las cavidades del corazón. La poscarga es la fuerza contra la cual el corazón debe contraerse para mover la sangre hacia el torrente sanguíneo. La poscarga está regulada por el tono muscular en los vasos sanguíneos y su capacidad para distenderse para acomodar el flujo sanguíneo ⁴⁰.

Las diversas modalidades de ecocardiografía hacen de ella una herramienta versátil para identificar anomalías cardíacas estructurales y funcionales. Por ejemplo, el modo M proporciona una evaluación precisa de las dimensiones de la cámara y la pared, mientras que la imagen bidimensional (2D) ayuda en la evaluación del volumen ⁴¹. Las evaluaciones más comunes y rápidas realizadas mediante ecocardiografía, ya sea en entornos intraoperatorios o de cuidados

intensivos, son el tamaño de la cámara del ventrículo izquierdo y su función contráctil o sistólica ⁴².

Para medir la función cardíaca se determinó el delta del porcentaje de acortamiento fraccional (%Δ). La fracción de acortamiento se calculó como $[(DVI_d - DVIs) * 100 / DVI_d]$ (DVI_d: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; DVI_s: diámetro sistólico del ventrículo izquierdo), como se mencionó en el apartado 7.1 del capítulo II.

Al comparar la diferencia entre los valores finales y basales del acortamiento fraccional, se observó un aumento significativo como resultado del tratamiento con ZnOlme, lo cual se encuentra en concordancia con la reducción del índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI). El grupo control y los tratados con olmesartán y zinc mostraron, antes y después del tratamiento, una diferencia negativa en este parámetro, pero no significativa, en el caso del olmesartán. Por lo tanto, ZnOlme mejoró la función contráctil cardíaca en las ratas SHR (Figura V-10)

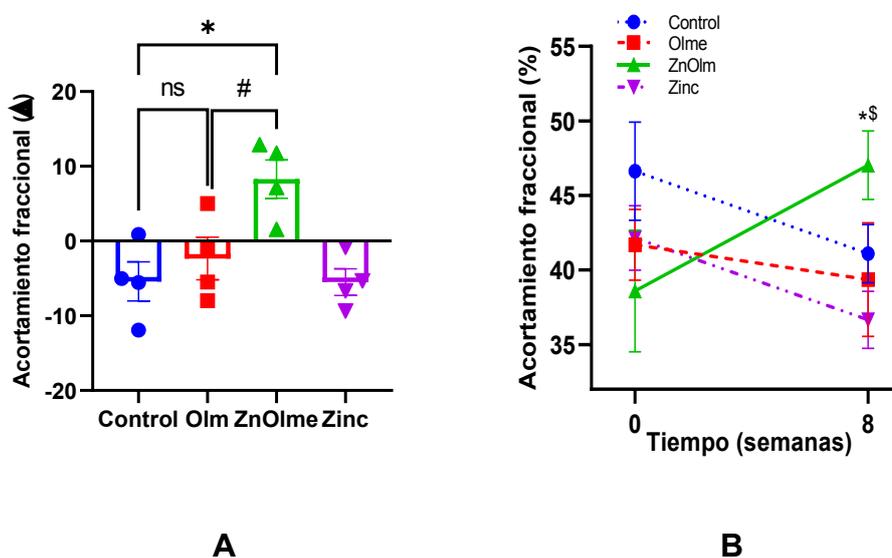


Figura V-10. Función cardíaca evaluada mediante la fracción de acortamiento determinada al inicio y después de 8 semanas de tratamiento (valores delta). Efectos de olmesartán (rojo), ZnOlme (verde), ZnCl₂ (violeta), control (azul). Los valores se expresan como la media ± SEM. (*) Valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme y control (*p<0.05), (#) valores estadísticamente diferentes entre olmesartán o ZnOlme a la misma concentración (#p<0.05), (\$) valores estadísticamente diferentes entre el tiempo inicial y final en el tratamiento con ZnOlme.

7. Conclusiones parciales

A partir de los estudios *in vivo* y *ex vivo* realizados sobre ratas espontáneamente hipertensas (SHR) o sus tejidos, pudo determinarse cómo el tratamiento con el complejo de coordinación $[Zn(Olme)(H_2O)_2]$ (ZnOlme), ocasionó notables efectos antihipertensivos y cardíacos en comparación al ligando libre (olmesartán) y a $ZnCl_2$.

Los resultados permitieron evidenciar como el tratamiento con ZnOlme condujo a la pronta disminución de la PAS, encontrándose diferencias estadísticamente significativas durante las dos primeras semanas de tratamiento, con respecto al grupo control, y al grupo tratado con olmesartán. Si bien, el compuesto olmesartán también indujo la reducción de la PAS, el tratamiento con ZnOlme fue más efectivo.

Como se ha reportado, olmesartán se une a tres residuos del receptor: Tyr351.39, Trp842.60 y Arg167ECL2, como puede observarse en la figura I-12 de la sección 7.2.1 del capítulo I. Mientras que Arg167ECL2 interactúa con olmesartán a través de enlaces de hidrógeno y puentes salinos a través de los grupos carboxilato y tetrazol, Tyr351.39 y Trp842.60 interactúan con el grupo tetrazol mediante enlaces de hidrógeno e interacciones π - π . Olmesartán se une al Zn a través de los mismos grupos (carboxilato y tetrazol) generando el cambio conformacional de estructura propuesto como hipótesis de este estudio. La estructura rígida adoptada por el ligando en el complejo metálico podría permitir una mejor interacción con el receptor mediante interacciones π -stacking, similar a lo encontrado en los casos de los complejos de Zn obtenidos con telmisartán y candesartán^{22,23} permitiendo un mejor efecto bloqueante del receptor de Angiotensina II.

Por otra parte, a partir del cambio en el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI), el grosor de la pared posterior (GPP), el septo interventricular en diástole (SIVd) y el área transversal de los cardiomiocitos, se pudo determinar el efecto positivo del tratamiento con ZnOlme sobre la hipertrofia cardíaca, en concordancia con la disminución de la presión arterial. En todos los casos, el tratamiento con ZnOlme ocasionó un efecto superior y estadísticamente

significativo (exceptuando la determinación del IMVI por ecocardiografía) en comparación al efecto causado por el ligando libre olmesartán.

Del mismo modo, el tratamiento con ZnOlme redujo el contenido del colágeno tipo I, y ocasionó el aumento del colágeno tipo III, en ambos casos, en mayor medida, y de manera estadísticamente significativa en comparación al tratamiento con el ligando libre olmesartán. Este resultado indica una mayor eficacia del complejo para revertir la fibrosis en el tejido ventricular.

Por otro lado, se pudo determinar que el tratamiento con ZnOlme mejoró la capacidad antioxidante del tejido cardíaco ya que se vio aumentado el contenido de glutatión de manera significativa con respecto al control y al tratamiento con olmesartán. De la misma manera, el tratamiento con olmesartán y ZnOlme redujo el estrés oxidativo, pues la generación de EROs se vio disminuida respecto al grupo control, siendo el tratamiento con el complejo significativamente más efectivo. También, se pudo estimar que el daño oxidativo fue significativamente minimizado por el tratamiento con ZnOlme en comparación al grupo control y al tratado con olmesartán.

Por último, en concordancia con los efectos cardíacos observados y la reducción del estrés oxidativo, se encontró una marcada mejora de la función cardíaca por el tratamiento con el complejo ZnOlme, en comparación al tratamiento con olmesartán.

La administración continuada del complejo ZnOlme exhibió un evidente efecto antihipertensivo y cardioprotector sobre el modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a través de la inhibición del estrés oxidativo, siendo estos efectos superiores a los causados por el ligando libre olmesartán. Estos resultados sustentan la hipótesis de que el uso de metalofármacos con propiedades moduladoras del estado redox, supone una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Referencias bibliográficas

- (1) Lackland, D. T.; Weber, M. A. Global Burden of Cardiovascular Disease and Stroke: Hypertension at the Core. *Can. J. Cardiol.* **2015**, *31* (5), 569–571. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.009>.
- (2) Hajri, T.; Caceres, L.; Angamarca-Armijos, V. The Burden of Hypertension in Ecuador: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Hum. Hypertens.* **2021**, *35* (5), 389–397. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-00471-7>.
- (3) Cuspidi, C.; Tadic, M.; Grassi, G.; Mancina, G. Treatment of Hypertension: The ESH/ESC Guidelines Recommendations. *Pharmacol. Res.* **2018**, *128*, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.10.003>.
- (4) Ghatage, T.; Goyal, S. G.; Dhar, A.; Bhat, A. Novel Therapeutics for the Treatment of Hypertension and Its Associated Complications: Peptide- and Nonpeptide-Based Strategies. *Hypertens. Res.* **2021**, *44* (7), 740–755. <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00643-z>.
- (5) Wessels, I.; Fischer, H. J.; Rink, L. Dietary and Physiological Effects of Zinc on the Immune System. *Annu. Rev. Nutr.* **2021**, *41*, 133–175. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-122019-120635>.
- (6) Lin, P.-H.; Sermersheim, M.; Li, H.; Lee, P. H. U.; Steinberg, S. M.; Ma, J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients* **2017**, *10* (1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu10010016>.
- (7) Allouche-Fitoussi, D.; Breitbart, H. The Role of Zinc in Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (20), 7796. <https://doi.org/10.3390/ijms21207796>.
- (8) Bonaventura, P.; Benedetti, G.; Albarède, F.; Miossec, P. Zinc and Its Role in Immunity and Inflammation. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14* (4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>.
- (9) Willoughby, J. L.; Bowen, C. N. Zinc Deficiency and Toxicity in Pediatric Practice. *Curr. Opin. Pediatr.* **2014**, *26* (5), 579–584. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000132>.
- (10) Saper, R. B.; Rash, R. Zinc: An Essential Micronutrient. *Am. Fam. Physician* **2009**, *79* (9), 768–772.
- (11) Skrajnowska, D.; Bobrowska-Korczak, B. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms. *Nutrients* **2019**, *11* (10), 2273. <https://doi.org/10.3390/nu11102273>.
- (12) Gać, P.; Czerwińska, K.; Macek, P.; Jaremków, A.; Mazur, G.; Pawlas, K.; Poręba, R. The Importance of Selenium and Zinc Deficiency in Cardiovascular Disorders. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *82*, 103553. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103553>.
- (13) Muhamed, P. K.; Vadstrup, S. [Zinc is the most important trace element]. *Ugeskr. Laeger* **2014**, *176* (5), V11120654.
- (14) Tamura, Y. The Role of Zinc Homeostasis in the Prevention of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* **2021**, *28* (11), 1109–1122. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17057>.
- (15) Foster, M.; Samman, S. Zinc and Redox Signaling: Perturbations Associated with Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13* (10), 1549–1573. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3111>.
- (16) Zalewski, P. D.; Beltrame, J. F.; Wawer, A. A.; Abdo, A. I.; Murgia, C. Roles for Endothelial Zinc Homeostasis in Vascular Physiology and Coronary Artery Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59* (21), 3511–3525. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1495614>.
- (17) Choi, S.; Liu, X.; Pan, Z. Zinc Deficiency and Cellular Oxidative Stress: Prognostic Implications in Cardiovascular Diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39* (7), 1120–1132. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.25>.
- (18) Korkmaz-Icöz, S.; Atmanli, A.; Radovits, T.; Li, S.; Hegedüs, P.; Ruppert, M.; Brlecic, P.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Karck, M.; Szabó, G. Administration of Zinc Complex of Acetylsalicylic Acid after the Onset of Myocardial Injury Protects the Heart by Upregulation of Antioxidant Enzymes. *J. Physiol. Sci. JPS* **2016**, *66* (2), 113–125. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0403-6>.
- (19) Korkmaz-Icöz, S.; Al Said, S.; Radovits, T.; Li, S.; Brune, M.; Hegedüs, P.; Atmanli, A.; Ruppert, M.; Brlecic, P.; Lehmann, L. H.; Lahrmann, B.; Grabe, N.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Most, P.; Karck, M.; Szabó, G. Oral Treatment with a Zinc Complex of Acetylsalicylic Acid Prevents Diabetic Cardiomyopathy in a Rat Model of Type-2 Diabetes: Activation of the Akt Pathway. *Cardiovasc. Diabetol.* **2016**, *15*, 75. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0383-8>.

- (20) Korkmaz, S.; Atmanli, A.; Li, S.; Radovits, T.; Hegedűs, P.; Barnucz, E.; Hirschberg, K.; Loganathan, S.; Yoshikawa, Y.; Yasui, H.; Karck, M.; Szabó, G. Superiority of Zinc Complex of Acetylsalicylic Acid to Acetylsalicylic Acid in Preventing Postischemic Myocardial Dysfunction. *Exp. Biol. Med.* **2015**, *240* (9), 1247–1255. <https://doi.org/10.1177/1535370215570184>.
- (21) Actis Dato, A. B.; Martinez, V. R.; Velez Rueda, J. O.; Portiansky, E. L.; De Giusti, V.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. Improvement of the Cardiovascular Effect of Methyldopa by Complexation with Zn(II): Synthesis, Characterization and Mechanism of Action. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS* **2023**, *81*, 127327. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127327>.
- (22) Martinez, V. R.; Martins Lima, A.; Stergiopulos, N.; Velez Rueda, J. O.; Islas, M. S.; Griera, M.; Calleros, L.; Rodriguez Puyol, M.; Jaquenod de Giusti, C.; Portiansky, E. L.; Ferrer, E. G.; De Giusti, V.; Williams, P. A. M. Effect of the Structural Modification of Candesartan with Zinc on Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *946*, 175654. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175654>.
- (23) Martínez, V. R.; Aguirre, M. V.; Todaro, J. S.; Lima, A. M.; Stergiopulos, N.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. Zinc Complexation Improves Angiotensin II Receptor Type 1 Blockade and in Vivo Antihypertensive Activity of Telmisartan. *Future Med. Chem.* **2021**, *13* (1), 13–23. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0093>.
- (24) Gabb, G. What Is Hypertension? *Aust. Prescr.* **2020**, *43* (4), 108–109. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2020.025>.
- (25) Li, J.; Kemp, B. A.; Howell, N. L.; Massey, J.; Mińczuk, K.; Huang, Q.; Chordia, M. D.; Roy, R. J.; Patrie, J. T.; Davogustto, G. E.; Kramer, C. M.; Epstein, F. H.; Carey, R. M.; Taegtmeyer, H.; Keller, S. R.; Kundu, B. K. Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy. *J. Am. Heart Assoc.* **2019**, *8* (4), e010926. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010926>.
- (26) Medoff, H. S.; Bongiovanni, A. M. AGE, SEX AND SPECIES VARIATIONS ON BLOOD PRESSURE IN NORMAL RATS. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **1945**. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1945.143.2.297>.
- (27) Fritz, M.; Rinaldi, G. Blood Pressure Measurement with the Tail-Cuff Method in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats: Influence of Adrenergic- and Nitric Oxide-Mediated Vasomotion. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2008**, *58* (3), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.08.002>.
- (28) Shimizu, I.; Minamino, T. Physiological and Pathological Cardiac Hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *97*, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.001>.
- (29) Agabiti-Rosei, E.; Muiesan, M. L. Cardiac Hypertrophy and Hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1998**, *7* (2), 211–216. <https://doi.org/10.1097/00041552-199803000-00011>.
- (30) Carabello, B. A. The Pathophysiology of Afterload Mismatch and Ventricular Hypertrophy. *Struct. Heart* **2021**, *5* (5), 446–456. <https://doi.org/10.1080/24748706.2021.1944708>.
- (31) Bhullar, S. K.; Shah, A. K.; Dhalla, N. S. Role of Angiotensin II in the Development of Subcellular Remodeling in Heart Failure. *Explor. Med.* **2021**, *2* (4), 352–371. <https://doi.org/10.37349/emed.2021.00054>.
- (32) Jones, E. F.; Harrap, S. B.; Calafiore, P.; Tonkin, A. M. Development and Validation of Echocardiography Methods for Estimating Left Ventricular Mass in Rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1992**, *19* (5), 361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1992.tb00472.x>.
- (33) Devereux, R. B.; Reichek, N. Echocardiographic Determination of Left Ventricular Mass in Man. Anatomic Validation of the Method. *Circulation* **1977**, *55* (4), 613–618. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.55.4.613>.
- (34) Hinderer, S.; Schenke-Layland, K. Cardiac Fibrosis – A Short Review of Causes and Therapeutic Strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.011>.
- (35) Swan, H. J. C. Left Ventricular Dysfunction in Ischemic Heart Disease: Fundamental Importance of the Fibrous Matrix. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1994**, *8* (2), 305–312. <https://doi.org/10.1007/BF00877314>.
- (36) Uchinaka, A.; Yoshida, M.; Tanaka, K.; Hamada, Y.; Mori, S.; Maeno, Y.; Miyagawa, S.; Sawa, Y.; Nagata, K.; Yamamoto, H.; Kawaguchi, N. Overexpression of Collagen Type III in Injured Myocardium Prevents Cardiac Systolic Dysfunction by Changing the Balance of

- Collagen Distribution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2018**, *156* (1), 217-226.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.01.097>.
- (37) Ahmad, K. A.; Yuan Yuan, D.; Nawaz, W.; Ze, H.; Zhuo, C. X.; Talal, B.; Taleb, A.; Mais, E.; Qilong, D. Antioxidant Therapy for Management of Oxidative Stress Induced Hypertension. *Free Radic. Res.* **2017**, *51* (4), 428–438. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1322205>.
- (38) Rodrigo, R.; Brito, R.; González, J.; Rodrigo, R.; Brito, R.; González, J. Oxidative Stress and Essential Hypertension. In *Update on Essential Hypertension*; IntechOpen, 2016. <https://doi.org/10.5772/64079>.
- (39) Amponsah-Offeh, M.; Diaba-Nuhoho, P.; Speier, S.; Morawietz, H. Oxidative Stress, Antioxidants and Hypertension. *Antioxidants* **2023**, *12* (2), 281. <https://doi.org/10.3390/antiox12020281>.
- (40) Carreiro, J. E. Chapter 4 - The Cardiovascular System. In *An Osteopathic Approach to Children (Second Edition)*; Carreiro, J. E., Ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2009; pp 73–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06738-9.00004-6>.
- (41) Palamuthusingam, D.; Reyaldeen, R.; Johnson, D. W.; Hawley, C. M.; Pascoe, E. M.; Wahi, S.; Fahim, M. Assessment of Cardiac Structure and Function in Kidney Failure: Understanding Echocardiography and Magnetic Resonance Imaging for the Nephrologist. *Int. Urol. Nephrol.* **2021**, *53* (4), 699–712. <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02610-y>.
- (42) Chengode, S. Left Ventricular Global Systolic Function Assessment by Echocardiography. *Ann. Card. Anaesth.* **2016**, *19* (Suppl 1), S26–S34. <https://doi.org/10.4103/0971-9784.192617>.

Conclusiones finales

Considerando que ha sido ampliamente discutido y revisado el hecho de que la complejación de ligandos bioactivos con metales de interés biológico constituye una estrategia prometedora para mejorar el perfil farmacológico de compuestos basados en metales, este trabajo de tesis doctoral se desarrolló en el marco de la química bioinorgánica. El trabajo desarrollado en esta tesis nos permitió demostrar la hipótesis que la modificación estructural de los compuestos antioxidantes naturales, trabajando en diferentes condiciones experimentales, y del fármaco empleado para el tratamiento de la hipertensión (olmesartán), producen una mejora en su actividad cuando forman complejos de coordinación con biometales,.

En el capítulo III se muestra la modificación estructural del flavonoide naringina mediante la síntesis de los complejos de oxidovanadio(IV), trabajando a diferentes valores de pH y con el agregado de un segundo ligando lipofílico, *o*-fenantrolina (Figura 0-1). Los complejos fueron caracterizados en fase sólida y en solución.

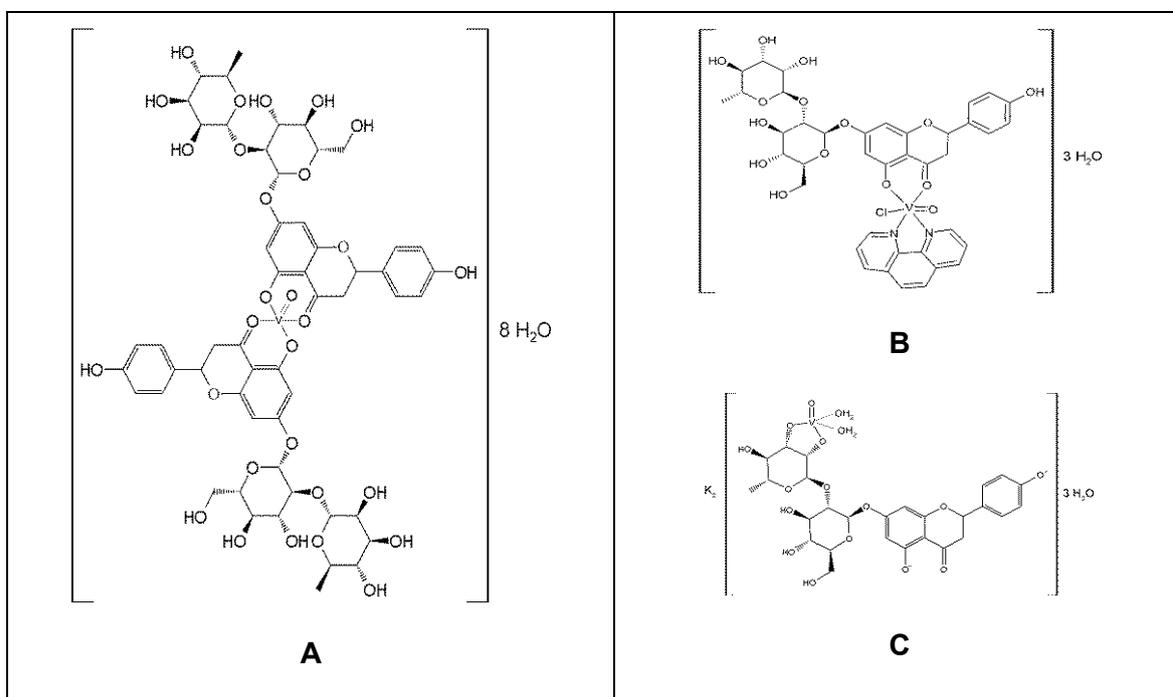


Figura 0-1. Estructuras propuestas para los complejos A) VONarg9, B) VONF.Cl y C) VONarg12.

El complejo VONarg9 (A) presenta una geometría de pirámide de base cuadrada con dos ligandos naringina y ocho moléculas de agua de cristalización. El complejo VONF.Cl (B) presenta una estructura octaédrica con un ligando naringina, un ligando fenantrolina, un ligando cloro y tres moléculas de agua de cristalización. Por último, el complejo VONarg12 (C) presenta una estructura de pirámide base cuadrada con un ligando naringina, 2 ligandos *acuo*, con 2 cationes K^+ estabilizando la carga del complejo aniónico y tres moléculas de agua de cristalización. Los complejos VONarg9 y VONF.Cl mostraron un modo de coordinación tipo acetilacetato que se dio a través de los grupos 5-hidroxi desprotonado y 4-carbonilo de los anillos A y C de la naringina, respectivamente. Por su parte, en el complejo VONarg12, el ligando naringina coordinó a través de dos grupos hidroxilo vecinales desprotonados en posición *-cis* de la región glucósida del flavonoide.

En este capítulo también se muestra la síntesis y caracterización en fase sólida y en solución del complejo formado entre el biometal Zn y el fármaco antihipertensivo olmesartán (Figura 0-2). El ligando coordinó al centro de Zn(II) a través del grupo COO^- del anillo imidazol, y el N desprotonado del anillo tetrazol, exhibiendo un entorno de coordinación tetraédrico bien definido alrededor del catión Zn(II). Este complejo completa su esfera de coordinación con dos ligandos *acuo*.

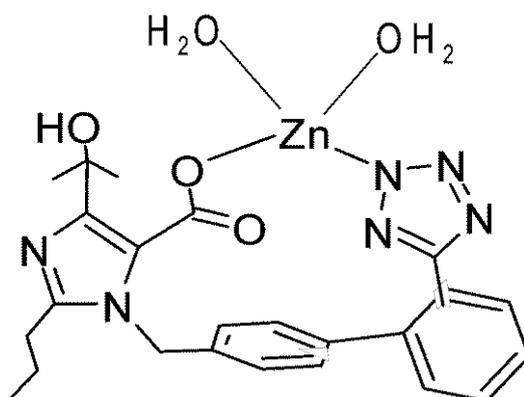


Figura 0-2. Estructura propuesta para el complejo ZnOlme.

Asimismo, se determinó la estabilidad de los complejos en solución, lo que permitió adelantar las determinaciones de actividades biológicas, considerando

que los tiempos de disolución y agregado de las muestras no superan los 15 minutos.

En el capítulo IV se evaluaron las propiedades antioxidantes, de los complejos de naringina, y se demostró que el ligando fenantrolina permite una mayor deslocalización electrónica, al formarse el radical del complejo, que conlleva a un mayor efecto antioxidante.

Con respecto al cáncer, se evaluaron las propiedades antitumorales, en la línea celular de cáncer de pulmón humano A549, mostrando nuevamente, que el ligando fenantrolina, con mayor lipofilicidad, permite un mejor ingreso a la célula y en consecuencia, mayor efecto deletéreo en las células tumorales. Estos efectos resultaron ser específicos dado que los complejos no alteraron (o lo hicieron en menor medida) la viabilidad de las células normales. Se demostró, además, que el mecanismo de acción se produce por estrés oxidativo, con mayor generación de especies reactivas del oxígeno y depleción del sistema antioxidante natural glutatión. Los cambios morfológicos observados, y el cambio en el potencial de membrana mitocondrial indican que la muerte celular se produce, probablemente, a través de la vía apoptótica mitocondrial.

Se determinó que ambos sistemas VO/naringina y VO/fen/naringina interactúan con albúmina sérica bovina de manera espontánea, a través de un único sitio de unión, y la determinación de la constante de unión sugiere que pueden unirse a la ASB y al mismo tiempo, ser transportados y liberados.

En el capítulo V se aborda la enfermedad de hipertensión. Se determinaron también los efectos cardíacos del complejo de olmesartán con Zn. Se trabajó con ratas con hipertensión espontánea *in vivo* y *ex vivo*, notando que la modificación estructural del fármaco por complejación produjo disminución de la presión arterial mayor que el fármaco comercial, incluso de una manera más rápida. Asimismo, se demostró el efecto cardioprotector sobre el modelo de ratas con hipertensión espontánea, mostrando inhibición del estrés oxidativo, con disminución de la hipertrofia y la fibrosis, siendo estos efectos superiores a los causados por el ligando libre olmesartán.

En general, como ya se ha mencionado, la regulación del equilibrio redox es una propuesta terapéutica interesante para el tratamiento de enfermedades crónicas, como la hipertensión y el cáncer. De esta forma, el desarrollo de nuevos complejos de coordinación supone un gran potencial para el futuro de la medicina moderna, ya que la intervención de los procesos redox mediante la utilización de complejos de coordinación obtenidos a partir de ligandos bioactivos con metales de interés biológico, proporciona nuevos enfoques para el desarrollo de compuestos innovadores y efectivos para el tratamiento de enfermedades crónicas asociadas a estos desequilibrios. Los resultados del presente trabajo demostraron la hipótesis que el diseño de nuevos fármacos por formación de complejos de coordinación con biometales y ligandos de interés biológico pueden potenciar sus propiedades biológicas.

En lo que respecta a las perspectivas futuras, de manera general, los compuestos con potencial farmacológico derivados del vanadio podrían emplearse en el tratamiento de la diabetes, enfermedades tropicales y parasitarias. La complejación del vanadio puede alterar su biodisponibilidad, transporte y el mecanismo de direccionamiento de este metal y, gracias a esto, los complejos de coordinación de vanadio han obtenido una creciente popularidad. Aunque se han propuesto diferentes mecanismos de acción para los compuestos derivados de este metal como agentes farmacológicos, se debe continuar con la investigación para identificar los productos de descomposición o biotransformación *in vivo* de los nuevos complejos y la toxicidad de los productos resultantes, hasta alcanzar descripciones más precisas de su especiación y los mecanismos de acción, con el fin de diseñar estrategias terapéuticas más específicas, eficaces y con menor toxicidad, en función de las especies activas.

Por otra parte, considerando la capacidad reguladora del estado redox exhibida por algunos compuestos derivados de Zn, y también, la capacidad que exhiben los fármacos bloqueantes del receptor de angiotensina II para inhibir la angiogénesis, es posible que compuestos como ZnOlme puedan ser utilizados como agentes antimetastásicos. Lo cual, cobra aún más relevancia si se considera la correlación existente entre las enfermedades cardíacas y el cáncer.

Anexo: publicaciones

A partir de este trabajo de Tesis doctoral, se publicaron los siguientes trabajos en revistas científicas:

- A.G. Restrepo-Guerrero, H. Goitia-Semenco, L.G. Naso, M. Rey, P.J. Gonzalez, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams. Antioxidant and Anticancer Activities and Protein Interaction of the Oxidovanadium(IV) Naringin Complex. *Inorganics* 10 (2022) 13. <https://doi.org/10.3390/inorganics10010013>
- Andrés G. Restrepo Guerrero, Valeria R. Martínez, Jorge O. Vélez Rueda, Enrique L. Portiansky, Verónica De Giusti, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams. Complexation of the Antihypertensive Drug Olmesartan with Zn: In Vivo Antihypertensive and Cardiac Effects. *Biol. Trace Elem. Res.* (2023) <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03670-8>
- Andrés G. Restrepo, Angel L. Huamani, Alexandra Velásquez Bravo, Pablo J. González, Luciana G. Naso, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams. Influence of the secondary ligand, phenanthroline, on the antioxidant and pro-oxidant and cytotoxic effects of the oxidovanadium(IV)/naringin complex. *New J. Chem.* (2024) <https://doi.org/10.1039/D4NJ00655K>

Además, se publicaron trabajos relacionados:

- N. Martini, J.E. Parente, G. Restrepo-Guerrero, C.A. Franca, O.E. Piro, G.A. Echeverría, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Tetraacuo-bis-(N,N-dimethylacetamide-O)magnesium(II) chloride trihydrate. An option to improve magnesium effect on phosphatase stimulation and albumin binding. *J. Mol. Struct.* 1223 (2021) 1-11, 129240

Asimismo, se presentaron comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- VII LABIC (Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry) virtual meeting-6th to 9th april 2021. Anticancer effects of two complexes

derived from naringin and oxidovanadium(IV) cation. A.G. Restrepo, H. Goitía Semeco, L.G. Naso, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams

- ISHR-Lat 2022. Congreso anual de la Sección Latinoamericana de la International Society for Heart Research. 29 y 30 de septiembre, La Plata, Argentina. Improvement in the antihypertensive and cardiac effects of olmesartan by complexation with Zn(II) in spontaneously hypertensive rats. Andrés G. Restrepo Guerrero, Valeria R. Martínez, Jorge O. Vélez Rueda, Enrique Portiansky, Verónica De Giusti, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.
- XXIII CAFQI (Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica). UNPA. Facultad Regional de Santa Cruz. El Calafate, Santa Cruz. 11-14 abril 2023. Mejora de la actividad antitumoral del complejo VO(naringina)₂ mediante complejación con fenantrolina. Restrepo-Guerrero Andrés, Huamani Luciano, Velásquez Alexandra, González Pablo, Naso Luciana G., Ferrer Evelina G., Williams Patricia A.M.
- Reunión anual de sociedades de biociencias. Mar del Plata, 15-17 noviembre 2023. Evaluation of the anticancer activity of a novel naringin-V(IV)O coordination complex in human lung cancer A549 cells. G. Restrepo, L. Naso, P. Gonzalez, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams.