



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

“Obtención y estudio de complejos de metales de transición con moléculas bioactivas. Evaluación de sus propiedades enzimáticas y biológicas *in vitro*”

Bqca. Luciana Naso

Directora: Dra. Patricia A.M. Williams

Codirectora: Dra. Evelina G. Ferrer

Año 2012

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Patricia A.M. Williams y la codirección de la Prof. Dra. Evelina G. Ferrer.

La Plata, Año 2012

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo de Tesis:

- Al director del CEQUINOR, Prof. Dr. Dr. Carlos O. Della Védova por permitir que realice el trabajo de Tesis doctoral en dicho centro.
- Al CONICET por otorgarme las becas de Tipo I y II para el desarrollo de este trabajo de Tesis doctoral.
- A la ANPCyT, CONICET, UNLP y CICPBA por el otorgamiento de fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.
- A Patricia y Evelina por permitirme, en primer lugar, desarrollar la tesis con ellas, por la enseñanza diaria, las explicaciones, la infinita paciencia, la dedicación, la ayuda constante, por preocuparse y ocuparse, por las palabras y el apoyo sobre todo en los momentos más difíciles y por el inmenso cariño. De corazón, no tengo palabras para agradecer todo lo que me brindan día a día!!!!.
- A Nené por permitirme trabajar en el “cuarto de cultivo”, por las palabras, los consejos y el inmenso cariño.
- A Jose que me enseñó las primeras armas en esto del cultivo celular.
- A Luis Lezama por su dedicación, su paciencia y sus medidas de EPR y al Dr. Teófilo Rojo por aceptarme en su grupo de investigación en la Universidad del País Vasco.
- A Sole, por traer alegría, música y baile al laboratorio, por los momentos de charla y por su amistad.
- A Carlitos y Martín por querer ayudarme siempre a pesar de mis negativas, por todos los momentos compartidos y por su amistad.
- A Vicky, a Nati y a Jime, por todo lo compartido dentro y fuera de Cequinor, las quiero!!!!.

- A los chicos del labo (Idoia, Nagore, Verónica, Javi, Sonia, Ana, Amaia, Idoia) en la UPV por la ayuda desinteresada y por hacer que me sienta como en casa.
- A las “brujas” (Bea, Betty, Eli, Sonia y Anita) y a algún brujo que anda por ahí por intentar en todo momento que me integre, por la buena onda y por el inmenso cariño. Gracias!!!.
- A Susana por recibirme cada día con una sonrisa y por el cariño.
- A Marix por la muy buena onda a pesar de todo.
- A todos mis compañeros de Cequinor (Ignacio, Anto, Lucas, Pato, Christian, Vero, Magui, Carlitos, Sole, Martín, Ana Laura) por los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.
- A Cristina y a Adriana por la buena energía y por los ratitos de charlas y a todo el personal técnico de CEQUINOR por la ayuda brindada, especialmente a Jorge (J.D) por estar atento en todo momento y a Daniel Turne.
- A todos mis compañeros y ex compañeros de la cátedra de Química Inorgánica.
- A mis amigos, porque de alguna u otra manera contribuyeron al desarrollo de esta tesis, por estar presentes y por la amistad! Gracias Vero, Edgardo, Luisito, Vicky, Lore, Jime, Inés, Nati B., Nati S, Coqui, Gabi, Euge, Pao, Ana F. Octavio.
- A mis grandes amigas Andre, Mima y Caro, por bancarme, por entender y por la amistad de tantos años.
- A las Dras. Stella Maris Rusticci, Silvia Inda y Mónica Machain por su insistencia en que debía estudiar la carrera de grado, sin su impulso hoy yo no estaría acá. Eternamente agradecida!.
- A mis hermanas por apoyar todas mis decisiones, por entender algunas ausencias y por el amor inmenso.

- A mamá y a papá por impulsarme siempre, por enseñarme que hay que ir siempre para adelante, por respetar y apoyar mis decisiones y por el amor infinito.
- A mis 4 amores Cami, Valen, Lola y Manu! Las adoro!!!!

ÍNDICE

	Pág.
Objetivos	1
Capítulo I	
1.1. Radicales libres y especies reactivas	4
1.1.1. Definición y clasificación	4
1.1.2. Fuentes y reacciones de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)	5
1.1.3. Química y bioquímica de los principales ROS y RNS	7
1.2. Estrés oxidativo	8
1.3. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo	9
1.3.1. Clasificación de los mecanismos de defensa antioxidante	10
1.4. Estrés oxidativo y enfermedades humanas	11
1.5. Flavonoides	11
1.5.1. Distribución y función en plantas	12
1.5.2. Farmacodinamia	13
1.5.3. Propiedades biológicas	13
1.5.4. Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	14
1.5.5. Flavonoides como prooxidantes	16
1.5.6. Características estructurales y actividad antioxidante	17
1.6. ROS y cáncer	19
1.6.1. Carcinogénesis	19
1.6.2. Estrés oxidativo, señalización celular y cáncer	22
1.7. Aspectos generales sobre la química de los flavonoides	23
1.7.1. Espectroscopía UV-vis	23
1.7.2. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	24
Capítulo II	
2.1. Vanadio: Generalidades	25
2.2. Absorción, excreción y almacenamiento	26
2.3. Impacto de la deficiencia de vanadio en animales	27

superiores

2.4.	Propiedades químicas y bioquímicas de vanadio	27
2.5.	Química del vanadio(IV) en solución	28
2.6.	Toxicidad de compuestos de vanadio en animales y humanos	30
2.7.	Importancia farmacológica y terapéutica de los compuestos de vanadio	30
2.8.	Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio	31
2.9.	Tratamiento antineoplásico	33
2.10.	¿Cuál es la importancia de complejar al $V(IV)O^{2+}$?	33
2.11.	Algunas evidencias sobre la actividad antitumoral de complejos con $V(IV)O^{2+}$	34
2.12.	Algunos aspectos de la química vanadio	35
2.12.1.	Estados de oxidación y estereoquímica	35
2.12.2.	Espectro electrónico del catión $V(IV)O^{2+}$	35
2.12.3.	Espectro infrarrojo (FTIR)	37
2.12.4.	Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)	38

Capítulo III

3.1.	Caracterización fisicoquímica	40
3.1.1.	Introducción: ligandos	40
3.1.1.1.	Crisina	40
3.1.1.2.	Silibinina	40
3.1.1.3.	Morina	41
3.1.1.4.	Ácido clorogénico	42
3.1.2.	Preparación de los complejos	43
3.1.3.	Caracterización de los complejos sólidos	44
3.1.3.1.	Análisis térmico	44
3.1.3.2.	Espectros de reflectancia difusa	47
3.1.3.3.	Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	50
3.1.3.3.1.	Aspectos generales	50
3.1.3.3.2.	Espectros infrarrojos de ligandos y complejos	50
3.1.3.4.	Espectroscopía de resonancia paramagnética	58

	electrónica (EPR) en estado sólido	
3.1.4.	Estudios en solución	65
3.1.4.1.	Espectros electrónicos: Generalidades	65
3.1.4.2.	Espectros UV-vis	66
3.1.4.3.	Titulación espectrofotométrica	71
3.1.4.4.	Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica (EPR)	75
3.1.4.5.	Análisis e identificación de las especies en solución: Diagramas de distribución de especies y espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)	79
3.1.5.	Conclusiones	84
3.2.	Capacidades antioxidantes	88
3.2.1.	Capacidad para secuestrar el radical DPPH [•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	88
3.2.1.1.	Conclusiones sobre la capacidad para secuestrar radicales DPPH [•]	90
3.2.2.	Actividad antioxidante total (TAA) y coeficiente antioxidante equivalente trolox (TEAC)	91
3.2.2.1.	Conclusiones sobre la capacidad de secuestrar al catión radical ABTS ^{•+}	94
3.2.3.	Actividad superóxido dismutasa símil	94
3.2.3.1.	Conclusiones sobre la capacidad de secuestrar al radical superóxido	96
3.2.4.	Actividad antioxidante frente al radical OH [•]	97
3.2.4.1.	Conclusiones sobre la capacidad de secuestrar al radical OH [•]	99
3.2.5.	Ensayo de inhibición del radical peroxilo (ROO [•])	100
3.2.5.1.	Conclusiones sobre la capacidad de secuestrar al radical ROO [•]	102
3.2.6.	Ácido clorogénico	102
3.2.6.1.	Capacidades antioxidantes: ácido clorogénico	103
3.2.6.2.	Conclusiones	107
3.2.7.	Resumen de las capacidades antioxidantes	107
3.3.	Actividad biológica	108
3.3.1.	Clivaje del ADN plasmídico	108
3.3.2.	Modelos de células de tipo osteoblastos de origen murino	110
3.3.3.	Ensayo de viabilidad celular	111
3.3.3.1.	Ensayo mitogénico	111
3.3.3.2.	Conclusiones sobre el ensayo de viabilidad celular	114
3.3.4.	Estudios morfológicos	114
3.3.4.1.	Conclusiones estudios morfológicos	117

3.3.5.	Mecanismo de acción	118
3.3.5.1.	Generación intracelular de ROS	118
3.3.5.2.	Conclusiones generación intracelular de ROS	121
3.3.6.	Comparación estructura-actividad	121
3.3.7.	Conclusiones generales	125

Capítulo IV

4.1.	Cobre	126
4.1.1.	Generalidades	126
4.1.2.	Absorción de cobre	126
4.1.3.	Consumo y transporte de cobre	127
4.2.	Enzimas dependientes de cobre	127
4.3.	Cobre como pro-oxidante	130
4.4.	Cobre y enfermedades asociadas	131
4.5.	Complejos de cobre como probables agentes terapéuticos	132
4.6.	Algunos aspectos de la química del cobre	133
4.6.1.	Estados de oxidación y estereoquímica	133
4.6.2.	Espectros electrónicos característicos para el cobre(II)	134
4.6.3.	Espectro Infrarrojo (FTIR)	136
4.6.4.	Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	136

Capítulo V

5.1.	Complejos de cobre(II) con los ligandos sacarina, 4-aminopiridina y 4-cianopiridina	140
5.1.1.	Aspectos generales sobre sacarina, 4-aminopiridina y 4-cianopiridina	140
5.1.2.	Preparación de los complejos	142
5.1.3.	Resultados	143
5.1.3.1.	Estructura cristalina	143
5.1.3.2.	Espectroscopía Infrarroja (FTIR)	146
5.1.3.3.	Espectroscopía electrónica	150
5.2.	Complejos de cobre(II) con los ligandos ácido tricarbálico e imidazol	152
5.2.1.	Aspectos generales del ácido tricarbálico e imidazol	152
5.2.2.	Preparación de los complejos	155

5.2.3.	Resultados	156
5.2.3.1	Caracterización de los complejos sólidos	156
5.2.3.1.1.	Análisis termogravimétrico	156
5.2.3.1.2.	Espectroscopía de reflectancia difusa	157
5.2.3.1.3.	Espectroscopía Infrarroja	157
5.2.3.1.4.	Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	159
5.2.3.2.	Estudios de los sistemas en solución	161
5.2.3.2.1.	Constantes de estabilidad y medidas de resonancia paramagnética electrónica	161
5.3.	Actividad enzimática	168
5.3.1.	Aspectos generales	168
5.3.2.	Resultados	168
5.4.	Conclusiones	171
Capítulo VI		
Anexo		
6.1.	Zn: Generalidades	174
6.2.	Preparación de $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]$	177
6.3.	Resultados	177
6.3.1.	Estructura cristalina	177
6.3.2.	Espectroscopía infrarroja (FTIR)	182
6.3.3.	Estabilidad térmica	186
6.4.	Conclusiones	187
Capítulo VII		
7.	Materiales y Métodos	188
7.1.	Caracterización fisicoquímica	188
7.1.1	Análisis elemental	188
7.1.2.	Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)	188
7.1.3.	Espectros electrónicos (UV-vis) y titulaciones espectrofotométricas	188
7.1.4.	Espectros infrarrojos (FTIR)	188
7.1.5.	Espectros Raman	189
7.1.6.	Espectros de Reflectancia Difusa	189
7.1.7.	Espectros de resonancia paramagnética electrónica	189

	(EPR)	
7.1.8.	Susceptibilidad magnética	189
7.1.9.	Determinación de la estructura cristalina	189
7.2.	Estudios en solución	190
7.2.1.	Estudios de estabilidad en solución	190
7.2.2.	Titulación potenciométrica	190
7.2.3.	Resonancia paramagética electrónica (EPR) en solución	192
7.3.	Medidas de las capacidades antioxidantes	192
7.3.1.	Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil	192
7.3.2.	Ensayo de secuestro del radical DDPH [•]	193
7.3.3.	Ensayo de decoloración del catión radical ABTS ^{•+}	193
7.3.4.	Actividad secuestrante del radical OH [•]	194
7.3.5.	Inhibición del radical ROO [•] por un método fluorescente (ORAC-fluoresceína)	194
7.3.6.	Inhibición del radical ROO [•] por un método espectrofotométrico	195
7.4.	Clivaje de ADN plasmídico en gel de agarosa	195
7.5.	Actividad biológica	196
7.5.1.	Cultivos de osteoblastos	196
7.5.2.	Ensayos de viabilidad celular	196
7.5.2.1.	Ensayo mitogénico	196
7.5.3.	Estudio morfológico	197
7.5.3.1.	Tinción con Giemsa	197
7.5.4.	Mecanismos de acción	197
7.5.4.1.	Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)	197
7.6.	Técnicas auxiliares	198
7.6.1.	Determinación de proteínas por el método de Bradford	198
7.6.2.	Análisis estadístico	198
	Publicaciones	199

Objetivos

Introducción

La Química de Coordinación tiene como objeto el estudio de aquellos compuestos químicos denominados compuestos de coordinación, complejos metálicos o simplemente complejos, en los que un átomo o ion metálico central se encuentra rodeado por un grupo de moléculas, átomos o iones denominados ligandos¹. La Química de Coordinación tiene importancia en sí misma, tanto por lo referente a los aspectos teóricos de enlace y la preparación de numerosos compuestos de interés práctico, como por su inestimable cooperación al desarrollo de otros campos de la Química. Actualmente constituye uno de las ramas más importantes de la Química Inorgánica, no sólo por su amplitud y complejidad, sino por el gran volumen de investigación que se le está dedicando.

Las propiedades de los complejos dependerán tanto de las características del ion metálico central como de la naturaleza de los ligandos. A su vez, el comportamiento del metal central en el proceso de formación de una especie compleja viene determinado fundamentalmente por su carga, su tamaño y la configuración electrónica de la capa de valencia. Como es bien sabido, los efectos de la carga y el tamaño del ion central actúan en forma complementaria. Cuanto mayor es la relación Z/r tanto más estable suele ser, en general, la especie compleja formada.

Por otra parte, el número atómico y la configuración electrónica de la capa de valencia del ion metálico central condicionarán en gran medida el valor del número de coordinación y la fortaleza del enlace metal-ligando. En este último aspecto conviene tener en cuenta que la carga, el tamaño, y el tipo y número de orbitales vacíos condicionan el carácter ácido-base de dicho ion, el cual podrá comportarse como ácido duro o blando de Pearson².

En lo que se refiere al ligando, su comportamiento en el proceso de formación y estabilidad del complejo, queda determinado por la basicidad de sus átomos donadores, por el número de ellos y por su tamaño. Dependiendo de cuáles sean los átomos donadores del ligando, éste se comportará como base dura o blanda de Pearson² y formará enlaces más o menos fuertes con el ion central (ácido duro o blando, respectivamente). En general, cuanto mayor es la fuerza de un grupo ligante como base, tanto mayor es su tendencia a formar complejos estables¹.

Los ligandos con dos o más átomos donadores pueden dar lugar a la formación de especies complejas más estables (complejos quelatos) que los ligandos monodentados, debido a un efecto más favorable en la variación de

¹ F. Basolo, R.C. Johnson, "Coordination Chemistry". 3rd ed., Science Reviews, Northwood (1987).

² R.J. Pearson, J. Chem. Educ. (1968) 45:581-587.

entropía asociada a su formación³. Se ha observado que la estabilidad en los quelatos depende del número de átomos que forman el anillo. En general, para grupos ligantes sin dobles enlaces, los quelatos más estables son aquellos que forman anillos con cinco átomos, mientras que si poseen dobles enlaces son más estables cuando contienen anillos de seis átomos⁴.

Por último, cabe destacar que, por razones estéricas, los grupos ligantes voluminosos suelen formar complejos metálicos menos estables que los compuestos formados por grupos ligantes más pequeños.

El estudio de los complejos metálicos de coordinación presentes en los sistemas biológicos y relacionados con los mismos, el conocimiento de las funciones que desarrollan y la comprensión de la relación que existe entre su estructura y su función biológica son algunos de los temas que trata la Química Bioinorgánica. Por lo tanto, esta disciplina se ocupa tanto del estudio de los sistemas y compuestos inorgánicos presentes en tejidos y fluidos biológicos como de sistemas inorgánicos ("modelos") mediante los cuales se puede simular o reproducir en forma parcial o total el comportamiento químico de los sistemas naturales. Y, en última instancia, se trata de correlacionar la actividad biológica de un sistema inorgánico con las características estructurales, electrónicas y químicas de los mismos. La Química bioinorgánica resulta un pilar fundamental en el desarrollo de múltiples ramas científico-tecnológicas como la farmacología, la medicina, la agricultura, la veterinaria, la ecología, etc. En especial en las dos primeras, en lo que respecta al diseño de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento y la comprensión de muchas enfermedades⁵.

En este contexto nuestro grupo de trabajo desarrolla un área de investigación que incluye la profundización en el conocimiento de la química de coordinación de metales de interés biológico ($V(IV)O^{2+}$, $Cu(II)$, $Zn(II)$) con el fin de sintetizar modelos capaces de mimetizar el comportamiento determinadas de metaloenzimas y con la posibilidad de presentar importantes propiedades terapéuticas.

Estos contenidos abarcan los estudios presentados en esta tesis con la intención de realizar un aporte riguroso y novedoso en relación a la química de coordinación, potenciales aplicaciones biológicas y/o farmacológicas de nuestros sistemas y de sus mecanismos de acción.

Para la realización de la misma se proponen los siguientes objetivos que serán cumplimentados a lo largo de los diferentes capítulos:

³ J. Huheey, J., "Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad". 4ª ed., Harla, México D.F. (1997).

⁴ A.E. Martell, M. CALVIN, "Chemistry of the Metal Chelate Compounds". Prentice-Hall, London (1953).

⁵ E. J. Baran, Química Bioinorgánica, McGraw Hill (1995).

Objetivo general

Lograr una mejor comprensión del comportamiento químico de los metales de transición (biometales), en relación a la interacción y formación de complejos con ligandos de interés biológico y/o farmacológico. El desarrollo del mismo pretende abordar el aspecto químico que determina los factores condicionantes de su actividad biológica, principalmente los nexos de relación entre la estructura, las propiedades fisicoquímicas y los mecanismos de acción en medios biológicos.

Objetivos específicos

- Sintetizar complejos con ligandos bioactivos e iones metálicos de relevancia biológica (Cu(II), Zn(II), V(IV)O²⁺).
- Generar sistemas que presenten analogías con los existentes en la naturaleza.
- Caracterizarlos principalmente en relación a su estructura y a sus propiedades fisicoquímicas.
- Evaluar en algunos de estos compuestos los efectos de los ligandos libres y los complejos sobre la proliferación, y la morfología celular. Investigar si el posible mecanismo de acción es por estrés oxidativo (generación de ROS).
- Correlacionar la estructura tanto del complejo como de la enzima con sus actividades biológicas.

Capítulo I

1.1. Radicales libres y especies reactivas

1.1.1. Definición y clasificación

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones desapareados en su última órbita. Puede tener carga positiva, negativa o neutra¹.

Muchas de estas especies están centradas en oxígeno y algunas de ellas en nitrógeno. Esas moléculas son inestables y tienden a reaccionar con moléculas adyacentes donando, sustrayendo o incluso compartiendo sus electrones externos. Estas reacciones no solo producen cambios en la molécula vecina sino que, a veces, un electrón no apareado pasa a la molécula blanco generando un segundo radical libre u otras especies reactivas del oxígeno conocidas como ROS (del inglés, Reactive Oxygen Species) que pueden luego reaccionar con otras moléculas. La alta reactividad de los ROS se debe a la generación de reacciones en cadena amplificando muchas veces sus efectos.

Las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas pueden clasificarse en dos grupos: radicales y no radicales (Tabla 1).

-Dentro del primer grupo, las especies contienen al menos un electrón desapareado en su última órbita y son capaces de existir independientemente. Debido a esto son sustancias altamente reactivas ya que donan u obtienen otro electrón para alcanzar estabilidad. Por definición, el oxígeno molecular es por sí mismo un radical (birradical), ya que posee dos electrones desapareados en orbitales diferentes pero con el mismo número de espín. Es poco reactivo por la llamada restricción de espín, la cual no permite la donación o aceptación de otro electrón antes de la reorganización de la dirección de espín alrededor del átomo.

-El segundo grupo comprende una amplia variedad de sustancias que a pesar de no ser considerados radicales por definición, presentan una alta reactividad.

Los radicales son descritos en la literatura con un punto como superíndice (R[•]) para distinguirlos de otros metabolitos del oxígeno².

¹ Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC Recommendations (2005).

² R. Kohen, A. Nyska, Toxicol. Pathol. (2002) 30:620–650.

Nombre	Símbolo
Radicales	
Oxígeno (biradical)	$O_2^{\bullet\bullet}$
Anión superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Hidroxilo	OH^{\bullet}
Peroxilo	ROO^{\bullet}
Alcoxilo	RO^{\bullet}
Óxido nítrico	NO^{\bullet}
No radicales	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Peróxidos orgánicos	$ROOH$
Ácido hipocloroso	$HCIO$
Ozono	O_3
Aldehídos	$HCOR$
Oxígeno singlete	1O_2
Peroxinitrito	$ONOOH$

Tabla 1: Especies reactivas de oxígeno, radicales y no radicales.

R puede representar tanto un grupo alifático o de cadena abierta como un grupo aromático o derivado del benceno.

1.1.2. Fuentes y reacciones de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS)

Los ROS y RNS pueden ser producidos por fuentes endógenas o a partir de sustancias exógenas.

Las potenciales fuentes endógenas incluyen mitocondrias, metabolismo del citocromo P-450, peroxisomas y activación celular inflamatoria³.

³ M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Chem. Biol. Interact. (2006) 160:1-40.

-Durante la respiración aeróbica, en la cadena transportadora de electrones mitocondrial ocurren una serie de reacciones de óxido reducción (redox) donde se transfieren electrones desde un donador (NADH o FADH₂) (NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido, FADH₂: flavina adenina dinucleótido reducido) al oxígeno que es el aceptor final de la cadena, el cual es reducido a H₂O. También se generan pequeñas cantidades de O₂^{•-}, una especie de ROS altamente reactiva, que es transformado luego en oxígeno y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), más estable, por la enzima superóxido dismutasa (SOD) ya sea en la matriz mitocondrial a través de Mn-SOD o en el espacio intermembrana por acción de Cu,Zn-SOD. Cuando los sistemas antioxidantes mitocondriales no metabolizan al peróxido de hidrógeno, se genera el radical hidroxilo (OH[•]) a través de la reacción de Fenton (Fe(II) + H₂O₂ → Fe(III) + OH[•] + OH⁻). Esta última especie es aún más reactiva y se cree que es esencialmente perjudicial. También se ha acreditado a las mitocondrias como fuente de RNS (del inglés, Reactive Nitrogen Species) derivadas de NO[•]⁴.

-El sistema microsomal monooxigenasa unido a la membrana (MMO) contiene enzimas pertenecientes al sistema citocromo P450 y cataliza la oxigenación de una amplia variedad de compuestos exógenos como fármacos y endógenos como componentes tóxicos derivados del metabolismo (ej bilirrubina)⁵. Sin embargo, tras la inducción de las enzimas del citocromo P450 surge la posibilidad de producción de ROS, principalmente O₂^{•-} y H₂O₂, debido a la ruptura o desacoplamiento del ciclo catalítico P450³.

-Los microsomas y peroxisomas son también fuente de ROS. Los primeros son responsables del 80 % de la concentración de peróxido de hidrógeno producido *in vivo* en sitios hiperóxicos. En los peroxisomas principalmente de hígado, se produce H₂O₂ (pero no O₂^{•-})³ bajo condiciones fisiológicas, la cual es luego degradada por la enzima catalasa. Cuando dicha enzima no cumple con su función, ya sea por un exceso de H₂O₂ o por alguna anomalía de la misma, estas especies reactivas salen de estas organelas y dañan macromoléculas situadas en otros compartimientos.

-Una fuente endógena adicional de ROS son los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. Los macrófagos activados a través del “estallido respiratorio” provocan un aumento rápido pero transitorio de varios ROS entre los que se encuentran: H₂O₂, O₂^{•-} y NO[•]. Las moléculas activas biológicamente (ej: citoquinas e intermediarios reactivos del oxígeno) liberadas desde células de Kupffer activadas (macrófagos residentes en el hígado) están implicadas en eventos hepatotxicológicos y hepatocarcinogénicos⁶.

Los factores externos que incrementan los niveles de ROS y RNS son la contaminación ambiental (agua y aire), el humo de cigarrillo, el alcohol, los metales pesados o metales de transición (Cd, Hg, Fe, As, Pb), ciertos fármacos (ciclosporina, gentamicina, bleomicina), los solventes industriales, la cocción

⁴ A. J. Kowaltowski , N. C. de Souza-Pinto , R. F. Castilho , A. E. Vercesi, Free Radical Biol. Med. (2009) 47:333-343.

⁵ R. C. Zangar, D. R. Davydov, S. Verma, Toxicol. Appl. Pharmacol. (2004) 199:316-331.

⁶ J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (2004) 44:239-267.

(carne ahumada, aceite usado, grasas) y la radiación (UV, gamma, rayos X). Después de penetrar en el cuerpo por diferentes vías estos compuestos son metabolizados o descompuestos a radicales libres⁷.

1.1.3. Química y bioquímica de los principales ROS y RNS

-Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$): Como se mencionó anteriormente, este radical es producido en el cuerpo durante la respiración aeróbica, a través de reacciones enzimáticas o por el metabolismo de ciertas drogas. Por sí mismo no es tan reactivo sobre biomoléculas como proteínas, polipéptidos o ADN (ácido desoxirribonucleico) pero puede ayudar en la generación de otros radicales como radical OH^{\cdot} ⁸ y peroxinitrito⁹.

El superóxido se consume a través de la siguiente reacción:



La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción anterior aumentando su velocidad en sistemas biológicos (aproximadamente 4 órdenes de magnitud). Trabaja en conjunto con otras enzimas como catalasa y glutatión peroxidasa que catalizan la subsiguiente reacción de descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 (en el caso de la primera enzima) y en agua para el caso de la segunda enzima.



-Radical hidroxilo (OH^{\cdot}): es ampliamente reactivo y tiene una vida media de menos de 1 ns en solución acuosa. Así, *in vivo*, reacciona cerca de su sitio de formación.

Puede ser generado por varios mecanismos, entre los cuales están:

-reacción de Fenton: $Fe(II) + H_2O_2 \longrightarrow Fe(III) + OH^{\cdot} + OH^-$

-descomposición del agua por radiación ionizante para generar átomos de hidrógeno y OH^{\cdot}

-descomposición fotolítica de alquil hidroperóxidos

⁷ L. A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Int. J. Biomed. Sci. (2008) 4:89-96.

⁸ A. Barik, B. Mishra, L. Shen, H. Mohan, R.M. Kadam, S. Dutta, H. Zhang, K. I. Priyadarsini, Free Radical Biol. Med. (2005) 39:811-822.

⁹ A. B. Das, P. Nagy, H. F. Abbott, C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, Free Radical Biol. Med. (2010) 48:1540-1547.

La producción de este radical cerca del ADN podría conducir al mismo a reaccionar con las bases del ácido nucleico o con el esqueleto de desoxirribosa produciendo daño en las bases o rotura de las cadenas³.

-Radical peroxilo (ROO[•]): Son especies de alta energía con un potencial de reducción en el rango de +0,77 a 1,44 V, dependiendo del grupo R.

La química de este tipo de moléculas depende de la naturaleza del grupo R, del medio ambiente local, de la concentración de oxígeno y otros reactivos.

Los ROO[•] participan en el clivaje del ADN y en la modificación de esqueletos proteicos, también actúan sinérgicamente con el radical superóxido para dañar al ADN³.

-Óxido nítrico (NO[•]): es un radical reactivo muy abundante que actúa en una variedad de procesos biológicos, entre los cuales se encuentran: neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune. A nivel del sistema nervioso, la molécula gaseosa actúa como mensajero sintetizándose en cuestión de segundos y difundiendo rápidamente a las neuronas adyacentes. Sin embargo, a través de su combinación con el radical superóxido para dar peroxinitrito, ejerce daño tisular¹⁰. La sobreproducción de especies reactivas de nitrógeno es conocido como “estrés nitrosativo” y ocurre cuando la generación de estas especies en un sistema excede la habilidad del mismo de neutralizarlos y eliminarlos. El estrés nitrosativo puede conducir a reacciones de nitrosilación las cuales pueden llevar a la alteración de la estructura de las proteínas e inhibir su normal funcionamiento.

El NO[•] es generado en los tejidos por óxido nítrico sintasas específicas (NOSs), que metabolizan arginina a citrulina vía reacción oxidativa de cinco (5) electrones¹¹. Este radical tiene una vida media de unos pocos segundos en ambientes acuosos. Está bien establecido que la diferencia entre los efectos protectores y deletéreos del mismo está determinada por la concentración, tiempo de exposición y tipo celular¹².

1.2. Estrés oxidativo

Frecuentemente se define como un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos (oxidantes) y su eliminación por mecanismos protectores (antioxidantes)¹³, es decir, este estado se traduce en un aumento de la producción de oxidantes o una disminución en la producción de antioxidantes. El daño incluye modificación oxidativa de macromoléculas, muerte celular por

¹⁰ F. Pricci, G. Leto, L. Amadio, C. Iacobini, S. Cordone, S. Catalano, A. Zicari, M. Sorcini, U. Di Mario, G. Pugliese, *Free Radical Biol. Med.* (2003) 35:683-694.

¹¹ P. Ghafourifar, E. Cadenas, *Trends Pharmacol. Sci.* (2005) 26:190-195.

¹² A. H.B. Poliandri, L. I. Machiavelli, A. F. Quinteros, J. P. Cabilla, B. H. Duvilanski, *Free Radical Biol. Med.* (2006) 40:679-688.

¹³ S. Reuter, S. C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal, *Free Radic. Biol. Med.* (2010) 49:1603-1616.

necrosis o apoptosis, lesión estructural de tejidos, etc. Particularmente lípidos, proteínas y ADN son moléculas “blanco” para el mecanismo de oxidación.

Las modificaciones en el ADN pueden conducir a mutaciones, rupturas de doble o simple cadena y eventualmente a muerte celular.

Las oxidaciones en las proteínas conducen a un funcionamiento defectuoso de enzimas, las cuales son incapaces de cumplir con sus funciones.

Los lípidos, que son constituyentes importantes de las membranas celulares y los ácidos grasos insaturados, en particular, son fácilmente oxidados pudiendo comenzar una cadena de reacciones que conducen a comprometer la integridad celular¹⁴.

1.3. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo

La exposición continua a diversos tipos de estrés oxidativo provenientes de diferentes fuentes conduce a las células y al organismo entero a desarrollar mecanismos de defensa para la protección contra metabolitos reactivos. Esos mecanismos abarcan actividades directas e indirectas.

El grupo de acción directa está constituido por enzimas, como SOD, catalasa y peroxidasa. Existen otras enzimas que se ubican en el entorno celular y que apoyan la actividad antioxidante de las primeras, como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la xantina oxidasa.

El enfoque indirecto puede involucrar el control de la producción endógena de ROS, por ejemplo: alteración de la función de enzimas que indirectamente producen metabolitos del oxígeno como xantina oxidasa. Un sistema eficiente de reparación consiste en el uso de enzimas y pequeñas moléculas que reparan sitios dañados en macromoléculas. Otro sistema implica la utilización de moléculas que pueden donar átomos de hidrógeno a otras que están dañadas, un ejemplo de ello es la donación de un átomo de hidrógeno por el ascorbato o tocoferol a un ácido graso radical que fue atacado con anterioridad por un radical y perdió un hidrógeno. Las defensas físicas como las membranas, les permiten a las células defenderse del daño oxidativo. Por otro lado, compuestos como los tocoferoles pueden proporcionar una mayor estabilidad a las membranas celulares y la interferencia estérica puede prevenir que los ROS se acerquen a destino. Entre los diversos mecanismos de defensa, aquellos que implican antioxidantes son muy importantes debido a la eliminación directa de los pro-oxidantes y a la variedad de los mismos. Este sistema contiene dos grupos principales: enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular.

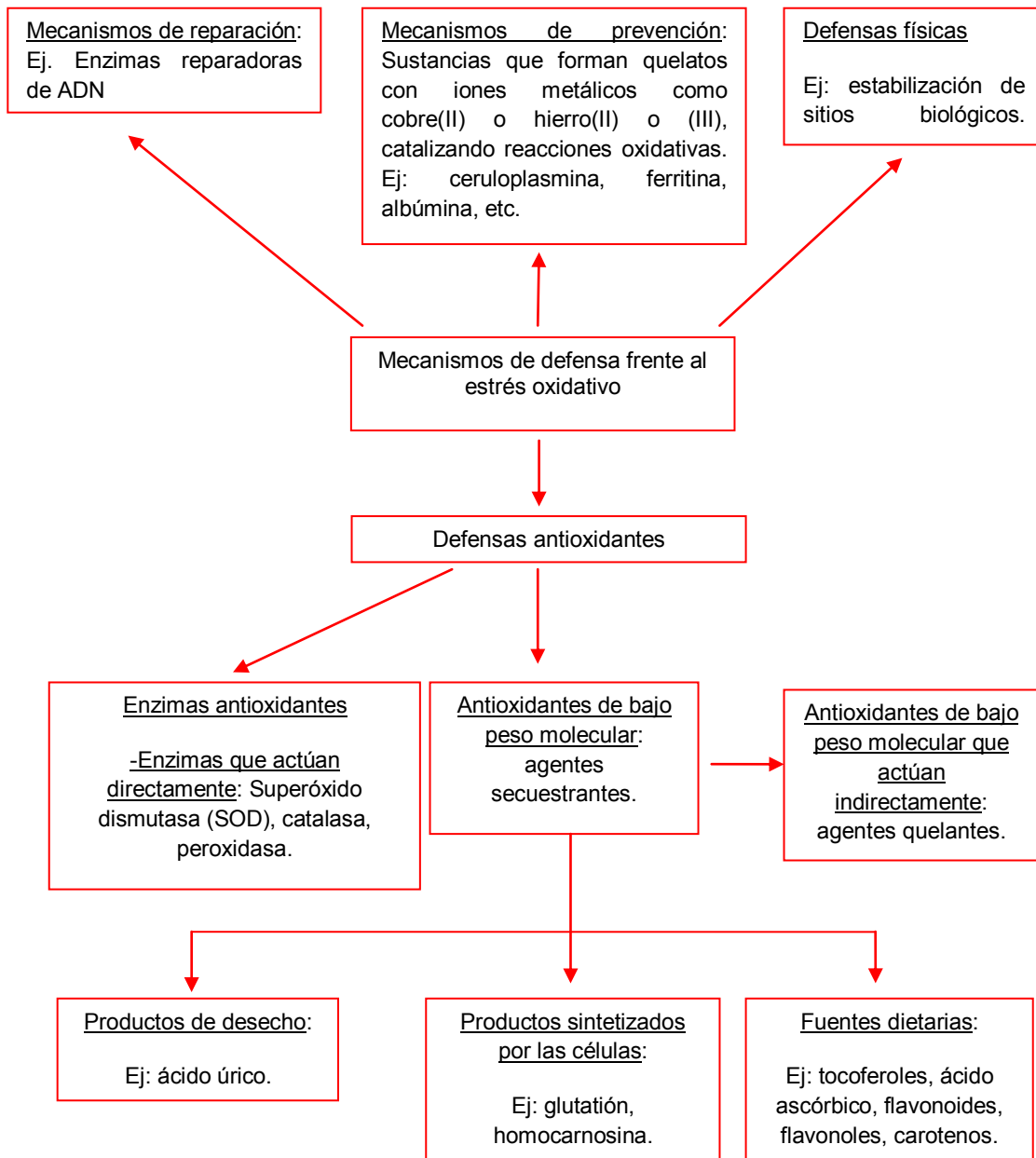
Dentro del segundo grupo existen también moléculas que actúan indirectamente formando complejos de coordinación tipo quelato con metales que catalizan reacciones de oxidación y aquellas que accionan directamente (agentes

¹⁴ J. Lykkesfeldt, O. Svendsen, Vet. J. (2007) 173:502-511.

secuestrantes). Estos últimos presentan grandes ventajas ya que al ser pequeños atraviesan las membranas y pueden localizarse cerca de los blancos biológicos².

1.3.1. Clasificación de los mecanismos de defensa antioxidante

En el esquema 1 se resumen los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.



Esquema 1. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo.

1.4. Estrés oxidativo y enfermedades humanas

El daño oxidativo asociado a diferentes macromoléculas está implicado en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades, entre las que se encuentran: aterosclerosis, cáncer, disfunción pulmonar, cataratas, artritis, enfermedades inflamatorias, diabetes, shock, trauma, isquemia, enfermedad renal, hemodiálisis, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria y colitis, enfermedad de Parkinson, reacciones a medicamentos, Alzheimer, enfermedad cardiovascular, lesiones dermatológicas, envejecimiento y obesidad^{13,15}.

1.5. Flavonoides

Son un grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular¹⁶. Generalmente se encuentran en plantas como derivados glicosilados y contribuyen a los colores azul, rojo y naranja brillantes presentes en hojas, flores y frutas. Además de pertenecer a vegetales y frutas, los flavonoides se encuentran en semillas, frutos secos, cereales, especias y diferentes plantas medicinales así como en bebidas como vino (especialmente vino tinto), té y cerveza (en bajos niveles)¹⁷.

La estructura de los flavonoides se basa en un núcleo flavan (Figura 1a), que consta de tres anillos fenólicos denominados A, B y C. El anillo A se condensa con un anillo de seis miembros (C), que en la posición 2 tiene como sustituyente a un grupo benceno (B). El anillo C puede ser un heterociclo pirano dando lugar a flavanoles (catequinas) y antocianidinas, o pirona que conduce a la formación de flavonoles, flavonas y flavanonas (Figura 2). El término 4-oxo-flavonoides se utiliza para describir a los flavonoides que tienen un grupo carbonilo en el C-4 en el anillo C, como es el caso de catequinas, flavanonas, flavonoles y flavonas (Figura 1b).

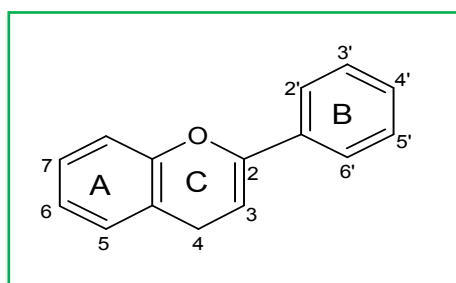


Figura 1a. Estructura del núcleo flavan.

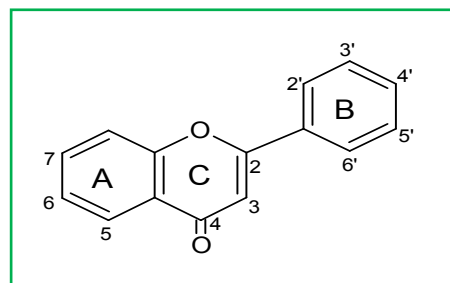


Figura 1b. Estructura base de los 4-oxo-flavonoides.

La naturaleza química de los flavonoides depende de la clase de estructura, grado de hidroxilación, otras sustituciones y conjugaciones y del grado de polimerización. En las plantas son relativamente resistentes al calor, oxígeno,

¹⁵ M. Percival NUT031 1/96 Rev. 10/98 Clinical Nutrition Insights.

¹⁶ N.C. Cook, S. Samman, Nutr. Biochem. (1996) 7:66-76.

¹⁷ P.G. Pietta, J. Nat. Prod. (2000) 63:1035-1042.

sequedad y moderado grado de acidez pero pueden ser modificados por la luz. La fotoestabilidad de esas moléculas depende de la naturaleza del grupo OH unido al átomo de carbono del anillo C denominado C-3. La ausencia o glicosilación de esos grupos resulta en un aumento de la fotoestabilidad del flavonoide¹⁸.

Mientras que las distintas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y en el patrón de sustitución del anillo C, los compuestos individuales entre clases se diferencian en el patrón de sustitución de los anillos A y B¹⁷.

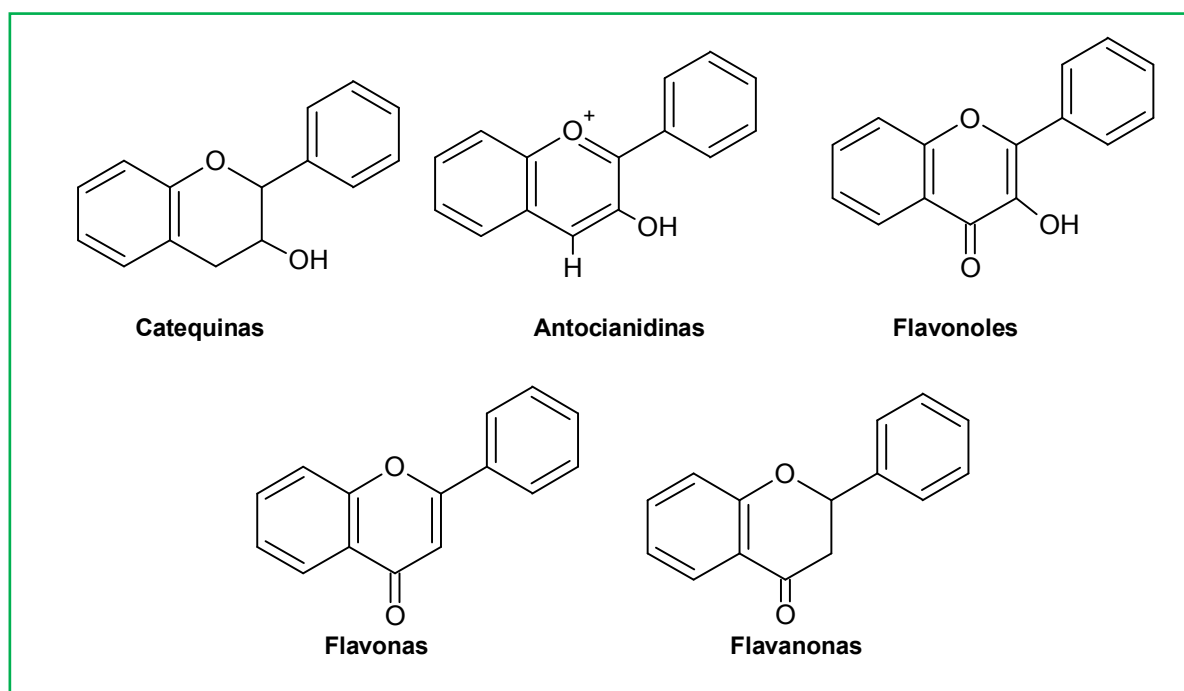


Figura 2. Estructura de catequinas, antocianidinas, flavonoles, flavonas y flavanonas.

1.5.1. Distribución y función en plantas

Se han identificado más de 4000 tipos de flavonoides en plantas vasculares, los cuales varían en tipo y cantidad debido a cambios en el ritmo de crecimiento, maduración y condiciones de las mismas.

Las plantas producen flavonoides para protección contra parásitos fúngicos, herbívoros, patógenos e injuria oxidativa, pero por el contrario, producen estímulos para favorecer la polinización y sirven de guía a los insectos para que lleguen hacia su alimento.

¹⁸ S. Aisling Aherne, N.M. O'Brien, Nutrition (2002) 18:75-81.

1.5.2. Farmacodinamia de los flavonoides

Aquellos flavonoides que no poseen azúcares en su molécula se denominan agliconas y los que sí poseen azúcares en su estructura son llamados flavonoides glicósidos. A excepción de las catequinas, los flavonoides no existen como agliconas en plantas, sino que se encuentran como derivados glicósidos. El principal sitio de glicosilación es el C en posición 3 y el menos frecuente es el C en posición 7.

Los flavonoides nutricionales, es decir, aquellos incorporados con la dieta, son absorbidos en el tracto gastrointestinal mientras que aquellos que son medicinales son administrados directamente en el tejido dañado o enfermo si éste está accesible, por ejemplo, en la piel o la garganta, o a través de una ruta que lleva de inmediato al lugar deseado, por ejemplo, vía nasal o sistema vascular. Luego de la liberación de los glicósidos por las enzimas bacterianas en el intestino, el 15% de los flavonoides agliconas se absorben junto con las micelas biliares dentro de las células epiteliales y luego pasan a los ganglios linfáticos. La absorción de los flavonoides glicósidos en el intestino depende de los residuos de azúcar que se unen al grupo hidroxilo. Algunos flavonoides inhiben la difusión facilitada no dependiente de Na(I) de monosacáridos en las células del epitelio intestinal. Consecuentemente, gana eficiencia el transporte activo dependiente de Na(I) acoplado a la ATPasa (subconjunto de enzimas capaces de producir la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) en adenosín difosfato (ADP) y un ión fosfato libre). La linfa transporta a los flavonoides hasta la sangre portal cerca del hígado, y aproximadamente el 80%, probablemente, se absorbe en el primer paso. Parte de ellos se unen a la albúmina sérica. Otros se encuentran en conjugados que han mantenido sus propiedades antioxidantes. Los hepatocitos transfieren a los flavonoides al aparato de Golgi y posiblemente, también a los peroxisomas, en los que son degradados por oxidación. En algunos casos la degradación oxidativa de los flavonoides agliconas también se lleva a cabo en el intestino debido a que algunas enzimas bacterianas pueden abrir el anillo C del esqueleto flavonoide. Los productos son secretados por los transportadores de ácidos orgánicos en la sangre y posteriormente se excretan a través de los riñones. La vida media de un flavonoide en el cuerpo se estima en 1-2 horas, pero aún no se ha determinado con exactitud¹⁹. Los flavonoides que no son solubles en agua se excretan junto a la bilis hacia el duodeno²⁰.

1.5.3. Propiedades biológicas de los flavonoides

Algunos flavonoides poseen actividades antilipoperoxidantes, antitumorales, antiplaquetarias, antiisquémicas, antialérgicas y antiinflamatorias. Hay varios informes que certifican que los flavonoides inhiben la actividad de una serie de enzimas, incluyendo la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, monooxigenasa,

¹⁹ B.H. Havsteen, *Pharmacol. Therapeut.* (2002) 96:67-202.

²⁰ C.I. Escamilla Jiménez, E.Y. Cuevas Martínez, J. Guevara Fonseca, *Rev. Fac. Med. UNAM* (2009) 52:73-75.

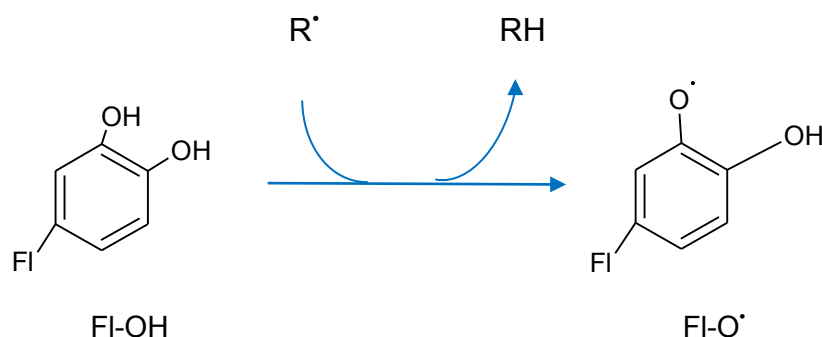
xantina oxidasa, succinoxidasa mitocondrial, NADH-oxidasa, fosfolipasa A₂ y proteínas quinasas. Estos efectos biológicos se cree que provienen de las propiedades antioxidantes de estos compuestos y la inhibición de las enzimas podría deberse a una reacción de los flavonoides con los radicales libres generados en el sitio activo de las mismas. En contraste con los efectos benéficos, se demostró *in vitro* que, algunos flavonoides son mutagénicos; esto, aparentemente, se debe a la actividad pro-oxidante de los mismos que se contraponen con la actividad antioxidante²¹.

Aunque los mecanismos de mutagenicidad aún no son conocidos, los efectos se observan bajo condiciones aeróbicas, lo que sugiere una fuerte participación del oxígeno. Se reportó que miricetina y kaempferol pueden inducir la peroxidación lipídica junto con la ruptura de las hebras del ADN en núcleos aislados de hígado de rata debido a que se producen ROS por auto-oxidación o ciclo redox²². Por otro lado se ha demostrado la mutagenicidad de quercetina a través de una serie de tests de mutagenicidad en bacterias²³.

1.5.4. Actividad antioxidante *in vitro* de flavonoides

Los flavonoides pueden prevenir los daños causados por radicales libres a través de los siguientes mecanismos:

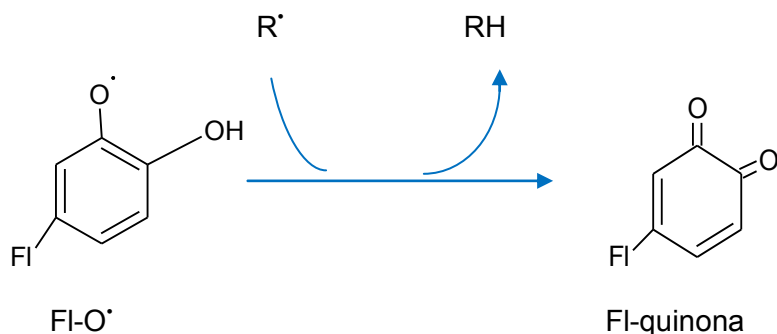
-Actividad secuestrante directa de los ROS: Los flavonoides son capaces de eliminar los radicales libres directamente a través de la donación de un átomo de hidrógeno. Los radicales se desactivan de acuerdo con la siguiente ecuación (Esquema 2):



²¹ G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Free Radical Biol. Med. (1997) 22:749-760.

²² S.C. Sahu, G.C. Gray, Cancer Lett. (1996) 104:193-196.

²³ I.M.C.M. Rietjens, M.G. Boersma, H. van der Woude, S.M.F. Jeurissen, M.E. Schutte, G.M. Alink, Mutat. Res. (2005) 574:124-138.



Esquema 2. Secuestro de ROS (R[•]) por flavonoides (FI-OH).

En primer lugar, el flavonoide (FI-OH) le cede un átomo de hidrógeno al radical libre (R[•]) dando lugar a la formación del radical fenoxilo (FI-O[•]).

En segundo lugar, ese radical FI-O[•] le cede otro átomo de hidrógeno a un R[•] adquiriendo el primero una estructura de quinona estable²⁹.

-Activación de enzimas antioxidantes: Los flavonoides son capaces de inducir enzimas de la fase II de desintoxicación (por ejemplo, NADPH quinona oxidoreductasa, glutatión S-transferasa y UDP-glucuronosil transferasa), que son importantes en la defensa contra las sustancias tóxicas electrofílicas y estrés oxidativo²⁹.

-Capacidad de quelación de metales: Ciertos flavonoides son conocidos por formar quelatos con hierro y cobre, eliminando así un factor causal para el desarrollo de los radicales libres. Pietta¹⁷ propuso que los sitios de unión de metales traza son el grupo catecol en el anillo B, los grupos 3-OH y 4-oxo en el anillo C, y los grupos 4-oxo y 5-OH entre los anillos C y A²⁹.

-Reducción del radical α -tocoferil: El α -tocoferol representa un antioxidante importante en las membranas celulares y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas. Protege a las partículas de lipoproteínas contra el daño oxidativo. Hirano²⁴ sugirió que el α -tocoferol puede donar un átomo de hidrógeno a los ROS y dar lugar a la formación del radical α -tocoferil, que es un potencial prooxidante²⁹.

-Inhibición de oxidasas: Los flavonoides inhiben las enzimas responsables de la producción del anión radical O₂^{•-}, tales como xantina oxidasa y la proteína quinasa C. También inhiben otras enzimas como la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, succinoxidasa microsomal y NADH oxidasa²⁹.

-Mitigación del estrés oxidativo causado por el NO[•]: Algunos flavonoides inhiben la producción de NO[•] en varias líneas celulares en cultivo. Probablemente este efecto se debe a la inhibición de la expresión de la NO sintasa pero no a la

²⁴ R. Hirano, W. Sasamoto, A. Matsumoto, H. Itakura, O. Igarashi, K. Kondo, J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2001) 47:357-362.

inhibición de la actividad. También ciertos compuestos secuestran directamente al radical $\text{NO}^{\cdot 29}$.

-Aumento de los niveles de ácido úrico: Algunos autores afirman que el aumento de la capacidad antioxidante total del plasma a costa del ácido úrico se observó luego de consumir alimentos ricos en flavonoides, pero aún no está claro este mecanismo²⁹.

-Modificación de las propiedades pro-oxidantes de los antioxidantes de bajo peso molecular: Diversos autores describieron la actividad pro-oxidativa del β -caroteno bajo ciertas condiciones (como irradiación con luz ultravioleta de onda larga (320-400 nm), radiación UVA) y sugirieron que su combinación con flavonoides puede ejercer efectos preventivos^{25,26}.

1.5.5. Flavonoides como pro-oxidantes

Los flavonoides bajo ciertas circunstancias, pueden actuar como pro-oxidantes y, por lo tanto, son capaces de promover la oxidación de otros compuestos.

-Oxidación por flavonoides radical fenoxilo: Como se mencionó anteriormente el producto final de la acción secuestrante de los ROS por los flavonoides es el radical fenoxilo (FI-O^{\cdot}), con un tiempo de vida media de 200 μseg . Ellos son altamente reactivos y son sometidos a una oxidación posterior, dando, entre otros productos posibles, una quinona estable. Estas últimas son aún reactivas pero pueden ser estabilizados por conjugación con nucleófilos, tales como GSH (glutatiión reducido), cisteína o ácidos nucleicos. Dicha reacción es responsable de uno de los efectos pro-oxidantes de los flavonoides. Otra reacción que puede ser responsable de dichas propiedades no deseadas, podría ser la interacción de FI-O^{\cdot} con oxígeno en presencia de catalizadores como metales de transición en altas concentraciones, generando quinonas y $\text{O}_2^{\cdot -}$. Canada²⁷ y colaboradores encontraron que la generación de radical fenoxilo en el caso de quercetina y miricetina podría deberse a un mecanismo de autooxidación, el cual se incrementaría con la adición de iones Fe. Por otro lado, la autooxidación de quercetina es acompañada por la rápida acumulación de H_2O_2 en presencia de iones cobre²⁸.

-Inhibición de la respiración mitocondrial: Los flavonoides son capaces de causar insensibilización del estallido respiratorio en mitocondrias aisladas con posterior autooxidación, la cual está asociada a la producción de ROS.

²⁵ B. Halliwell, Novartis Foundation symposium Chichester: Wiley (2007) 93-104.

²⁶ U.C. Obermüller-Jevic, P.I. Francz, J. Frank, A. Flaccus, H.K. Biesalski, FEBS Lett. (1999) 460:212-216.

²⁷ A.T. Canada, E. Giannella, T.D. Nguyen, R.P. Mason, Free Radical Biol. Med. (1990) 9:441-449.

²⁸ H. El Hajji, E. Nkhili, V. Tomao, O. Dangles, Free Radical Res. (2006) 40:303-320.

-Oxidación por peroxidasas: Un mecanismo alternativo para la toxicidad de los flavonoides implica a las peroxidasas que catalizan la oxidación de los polifenoles. Los radicales fenoxilo intracelulares formados por acción de la mieloperoxidasa de los neutrófilos también inducen la peroxidación lipídica y co-oxidan el GSH para dar lugar a los radicales tiol con la activación simultánea del oxígeno.

-Oxidación de antioxidantes de bajo peso molecular: Aquellos flavonoides que poseen un anillo catecol son capaces de oxidar al ascorbato, NADH o GSH. Se encontró que mientras existe un aumento de la oxidación, disminuye el potencial redox de estos compuestos. Por lo tanto los flavonoides más oxidables son los más eficaces.

-Daño directo sobre el ADN: En presencia de RNS los flavonoides con estructura del tipo pirogalol inducen la ruptura de ADN de cadena simple.

En conclusión, las propiedades pro-oxidantes o antioxidantes de un flavonoide en particular dependen sobre todo de su concentración. En la práctica, los efectos pro-oxidantes también pueden ser beneficiosos, ya que, un grado leve de estrés oxidativo, podría elevar los niveles de defensas antioxidantes y las enzimas de la biotransformación lo que lleva a una citoprotección general²⁹.

1.5.6. Características estructurales y actividad antioxidante

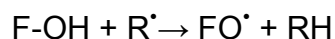
La actividad antioxidante de flavonoides y sus metabolitos *in vitro* depende de la disposición de los grupos funcionales sobre la estructura del núcleo.

-Grupos hidroxilo

La disposición espacial de los sustituyentes es tal vez un gran determinante de la actividad antioxidante del esqueleto flavan.

La configuración y el número total de grupos hidroxilo presentes en la estructura de un flavonoide influyen sobre los mecanismos de su actividad antioxidante.

La actividad de depuración de radicales libres es atribuida, en primer lugar, a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo que participan en la siguiente reacción:



Los grupos OH presentes en el anillo B (Figura 3) tienen una participación significativa en la capacidad secuestrante de ROS y RNS.

²⁹ D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, *Fitoterapia* (2011) 82:513-523.

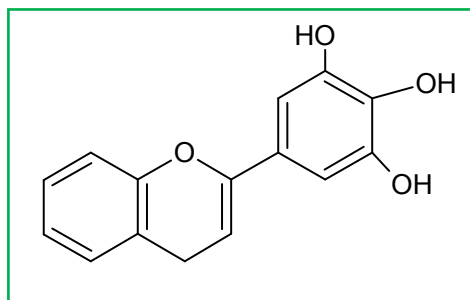


Figura 3. Presencia de grupos OH en la estructura básica de los flavonoides.

La presencia de estos grupos permite donar un átomo de hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito dando lugar a una estabilidad relativa del radical flavonoide.

La estructura 3',4'-catecol en el anillo B mejora fuertemente la inhibición de la peroxidación lipídica. El poder secuestrante de peroxinitritos por catequinas es atribuido principalmente al grupo catecol que se oxida a orto-semiquinona (ver Esquema 2).

Las flavanonas que carecen del grupo catecol o los sistemas trihidroxilos (pirogalol) forman radicales relativamente inestables y son secuestrantes débiles de radicales libres.

La importancia de otros grupos OH es menos clara pero más allá del aumento del número de estos grupos, la sustitución en el anillo A se correlaciona poco con la actividad antioxidante. La presencia de un grupo OH en la posición cinco (5) del átomo de C (5-OH) del anillo B puede contribuir a dichos efectos.

También, el grupo OH en la posición 3 del anillo C es muy importante en la actividad antioxidante de los flavonoides.

El anillo C cerrado puede no ser crítico en la actividad de flavonoides puesto que las chalconas son activas antioxidantes.

La torsión del ángulo del anillo B con respecto al resto de la molécula influye fuertemente en la habilidad de secuestrar radicales libres.

Los flavanoles y flavonoles con un grupo OH en la posición tres (3) del anillo de seis miembros (C) son planares, pero los que carecen de este grupo están levemente torcidos. La planaridad permite la conjugación, la deslocalización electrónica, y el correspondiente aumento de la estabilidad del radical fenoxilo del flavonoide.

Se ha postulado que los grupos OH del anillo B forman puentes de hidrógeno con el grupo 3-OH del anillo C alineando el anillo B con el heterociclo y el anillo A. Eliminando el puente de hidrógeno se genera una menor torsión del anillo B comprometiendo la capacidad de deslocalización electrónica. Debido a esta unión, la influencia del grupo 3-OH es potenciada por la presencia de 3',4'-catecol en el anillo B explicando la potente actividad antioxidante de flavan-3-oles y flavon-3-oles.

-O-metilación

Las diferencias en la actividad antioxidante entre los flavonoides polihidroxiados y polimetilados es muy amplia debido a la hidrofobicidad y planaridad molecular. La supresión de la actividad antioxidante de compuestos O-metilados refleja efectos estéricos que perturban la planaridad.

-Doble enlace C₂-C₃ y función 4-oxo del anillo C

Una característica distintiva de los flavonoides es la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C en combinación con el grupo oxo en el carbono 4 de dicho anillo.

Aquellos compuestos que tengan ambas características presentan una fuerte actividad antioxidante.

Uno de los flavonoides que reúne las condiciones de presencia de doble enlace C₂-C₃, estructura 3',4'-catecol en el anillo B, función 4-oxo y grupos OH en posiciones 3, 5 y 7 es la quercetina. Este compuesto se toma como referente de una sustancia con fuerte capacidad antioxidante.

-Presencia de carbohidratos

Aquellos flavonoides del tipo agliconas son más potentes como antioxidantes que sus correspondientes glicósidos. Aparte de la mera presencia y el número total, la posición y la estructura del azúcar juegan un papel importante. A pesar de que los glicósidos suelen ser antioxidantes más débiles que las agliconas, la biodisponibilidad a veces es reforzada por la presencia de azúcares. A pesar de esto, debido a diferentes experimentos se sabe que como los flavonoides glicosídicos se escinden a nivel intestinal, la influencia de restos de azúcar en las propiedades antioxidantes es de cuestionable importancia en los seres humanos.

Por lo tanto, la eliminación del sustituyente glicosídico por enzimas intestinales o bacterias probablemente aumente la actividad *in vivo* de los flavonoides de la dieta³⁰.

1.6. ROS y cáncer

Como el daño oxidativo sobre el ADN es considerado el factor molecular más importante en el proceso de carcinogénesis diversos estudios están enfocados en el rol de los ROS en la inducción, promoción y progresión de cáncer.

1.6.1. Carcinogénesis

Es un proceso complejo de múltiples etapas que involucra el pasaje desde una célula sana a un estado precanceroso hasta finalmente llegar a un estadio temprano de cáncer (Figura 4).

³⁰ K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, J. Nutr. Biochem. (2002) 13:572-584.

Existen varias teorías acerca de la carcinogénesis, las más antiguas hablan en relación a una “enfermedad que afecta la diferenciación celular” o “enfermedad de las células madre” (stem cell), esto parece indicar que el origen del cáncer comienza en una sola célula. Han sido propuestos dos mecanismos fundamentales para la inducción del cáncer. En uno, se plantea un aumento en la síntesis de ADN y mitosis por carcinógenos no genotóxicos que pueden inducir mutaciones en células en división. Las mutaciones, luego, pueden expandirse por clonación desde un estado celular preneoplásico a un estado celular neoplásico.

El otro mecanismo representa un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. Si el daño al ADN es demasiado grande, existe un proceso que elimina selectivamente las células alteradas. Este proceso se denomina apoptosis y es una muerte celular programada que lleva a importantes cambios morfológicos. Durante la proliferación celular, la proteína p53 juega un papel primordial verificando la integridad del ADN. Se desencadenan mecanismos que eliminan, por ejemplo, las bases oxidadas del ADN que causan mutaciones. Cuando el daño celular es importante, la proteína p53 desencadena la muerte celular por apoptosis, pero si este proceso no es controlado puede resultar perjudicial para el organismo, conduciendo a la destrucción de las células sanas. Por lo tanto, existe un sistema de regulación que involucra factores pro-apoptóticos (p53) y anti-apoptóticos. El proceso carcinogénico se describe como un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular desplazado hacia la proliferación celular.

Además de estos mecanismos, existe la comunicación intercelular que juega un rol muy importante en la regulación del control de crecimiento, diferenciación y apoptosis de células progenitoras. La iniciación del proceso involucra una mutación no letal del ADN que produce una célula alterada seguida de al menos una nueva síntesis de ADN para reparar el daño iniciado. Si las células en división se encuentran dañadas son capaces de interrumpir en forma temporaria el ciclo celular en G1 (fase de crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN (ácido ribonucleico)), S (fase de replicación o síntesis del ADN) o G2 (fase donde continúa la síntesis de proteínas y ARN), reparar el daño y luego reanudar la división³. El daño oxidativo al ADN puede ocurrir a través de los siguientes procesos:

1- el radical OH^{*} presente en las proximidades del ADN inicia la mutación.

2- el aumento de calcio libre intracelular (Ca(II)), como resultado de su liberación a partir de los sitios de almacenamiento o a través del flujo de Ca(II) extracelular. La movilización de dicho catión se puede producir por un alto nivel de estrés oxidativo, que agota las reservas de antioxidantes endógenos. Los cambios en la concentración de Ca(II) pueden activar a las endonucleasas y producir la fragmentación del ADN (un proceso normal durante la apoptosis). Al mismo tiempo, el oxígeno singlete generado puede provocar daños selectivamente en los residuos de guanina³¹.

³¹ G. Pérez Trueba, G. Martínez Sánchez, A. Giuliani, *Front. Biosci.* (2004) 9:2029-2044.

La etapa de promoción es caracterizada por la expansión clonal de las células iniciadas por la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la muerte celular programada. Este proceso resulta en la formación de una lesión focal identificable y requiere la presencia continua de estímulos para la promoción de tumores y por lo tanto es un proceso reversible. Muchos promotores de tumores inhiben fuertemente el efecto de los sistemas de defensa antioxidantes de las células. Mientras que un alto nivel de estrés oxidativo es citotóxico para las células y la proliferación se detiene por inducción de la apoptosis o incluso necrosis, un nivel bajo de estrés oxidativo puede, de hecho, estimular la división celular en la fase de promoción y así estimular el crecimiento del tumor. Esto implica que la producción de ROS durante esta etapa es la línea principal de la promoción de tumores relacionados con ROS.

La progresión es la tercera y última etapa del proceso carcinogénico. Consiste en cambios moleculares y celulares que ocurren en el pasaje del estado preneoplásico al neoplásico. Esta etapa es irreversible y se caracteriza por la acumulación de daños genéticos adicionales, que facilitan la transición de la célula de un estadio benigno a uno maligno. Esta etapa se caracteriza por la inestabilidad genética y la alteración de la integridad de los cromosomas.

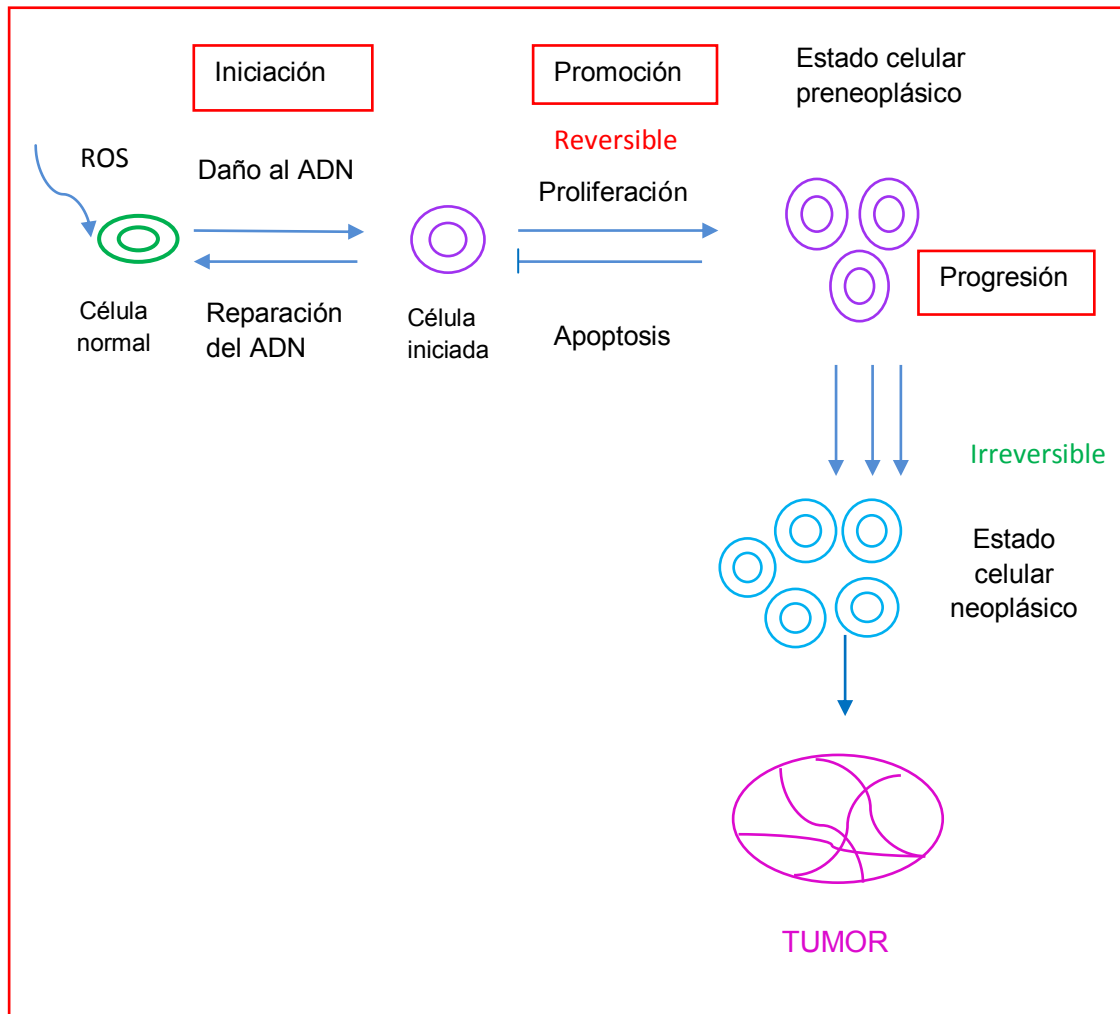


Figura 4. Modelo de 3 etapas en el mecanismo de carcinogénesis.

1.6.2. Estrés oxidativo, señalización celular y cáncer

Las células se comunican entre sí y responden a estímulos extracelulares a través de mecanismos biológicos llamados “señalización celular o transducción de señales”. Este es un proceso que permite que la información se transmita desde el exterior de una célula a varios de los elementos funcionales que se encuentran dentro de la misma.

La transducción de señales se activa a través de señales extracelulares como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y neurotransmisores. Las señales enviadas a la maquinaria de transcripción para la expresión de ciertos genes se transmiten normalmente al núcleo de la célula por una clase de proteínas llamadas factores de transcripción. Aunque los ROS están predominantemente implicados en el daño celular también desempeñan un papel fisiológico importante ya sea en la señalización o en la regulación intracelular

(actúan como segundos mensajeros). Se ha demostrado claramente que los ROS interfieren con la expresión de algunos genes y en las vías de transducción de señales. Debido a que los ROS son oxidantes por naturaleza, influyen en el estado redox y dependiendo de la concentración, causan una respuesta positiva (proliferación celular) o negativa (detención del crecimiento o muerte celular)³².

1.7. Aspectos generales sobre la química de los flavonoides

1.7.1. Espectroscopía UV-vis

Los espectros UV-vis de los flavonoides presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

Un espectro típico UV-vis de flavonoides incluye 2 bandas de absorción características.

La banda I, se encuentra en el rango de 300-350 nm en el caso de las flavonas y entre 350 y 385 nm en el caso de flavonoles y representa la absorción del anillo B (sistema cinamoílo). Se considera como procedente de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ en el sistema benceno.

La banda II, se encuentra entre 250-290 nm y representa la absorción del anillo A (sistema benzoílo).

En el caso de flavanonas y dihidroflavonoles, la banda I se reduce a un hombro en el rango de 300-330 nm y la banda II es el pico principal (277-295 nm)^{33,34}.

Por lo general, la banda I cambia hacia el rojo por desprotonación, metilación o glicosilación de los grupos OH presentes en la molécula. Un cambio batocrómico también se observa cuando estos ligandos forman quelatos con los metales, debido a que existe un aumento en la conjugación generada por la formación de un nuevo anillo entre el metal y los grupos 3-OH o 5-OH y el C=O en posición 4^{35,36}.

El espectro UV-visible del ácido clorogénico presenta 2 picos máximos: la primera banda aparece en 217 nm con un hombro en 240 nm y la segunda banda se encuentra en 324 nm con un hombro en 296 nm. La banda en 324 nm se corresponde con la transición HOMO \longrightarrow LUMO presentando, principalmente, carácter $\pi \rightarrow \pi^*$ con localización de la densidad electrónica en el anillo benceno y la cadena carbonada. El otro pico y los hombros también están presentes en las mismas transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ ³⁷.

³² M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Chem. Biol. Interact. (2006) 160:1-40.

³³ A. Torreggiani, M. Tamba, A. Trincherio, S. Bonora, J. Mol. Struct. (2005) 744-747:759-766.

³⁴ D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou, V. Oreopoulou, Molecules (2007) 12:593-606.

³⁵ D. Malešev, V. Kunti, J. Serb. Chem. Soc. (2007) 72:921-939.

³⁶ S. Dowling, F. Regan, H. Hughes, J. Inorg. Biochem. (2010) 104:1091-1098.

³⁷ A. Belay, A.V. Gholap, Afr. J. Pure Appl. Chem. (2009) 11:234-240.

1.7.2. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

En el caso de los flavonoides, la frecuencia de estiramiento del grupo carbonilo aparece en el rango 1680-1610 cm^{-1} . Los sustituyentes en posición 5 o 7 causan una modificación de ese modo de vibración hacia mayores números de onda por resonancia o quelación. Para el caso del grupo 5-OH ese cambio se relaciona con algún tipo de puente de hidrógeno. Como las bandas espectrales corresponden a más de un modo vibracional, se puede dividir el espectro FTIR de los flavonoides en diferentes zonas para analizarlo.

-Las bandas de estiramiento de los grupo OH aparecen entre 3600-3200 cm^{-1} .

-Las bandas correspondientes al estiramiento C-H están localizadas en la región 3100-2900 cm^{-1} .

-Las vibraciones del anillo aromático ($\nu(\text{C}=\text{C})$) en el plano aparecen aproximadamente en 1600 cm^{-1} .

-La banda correspondiente al estiramiento de la función óxido de la pirona ($\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$) aparece en 1320-1250 cm^{-1} .

-El modo de deformación del grupo OH situado en el anillo fenólico aparece en 1170-1150 cm^{-1} y la frecuencia de estiramiento del mismo grupo ($\nu(\text{C}-\text{O})$) aparece en 1280-1200 cm^{-1} .

Si los cambios en ($\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$) y en ($\nu(\text{C}=\text{C})$) del anillo no se modifican significativamente luego de la complejación, esto indica que el átomo de oxígeno no está involucrado en la unión con el centro metálico. Por otro lado, una disminución en la frecuencia de estiramiento del grupo ($\nu(\text{C}=\text{O})$) indica que existe coordinación entre el metal y ese grupo y el grupo 3-OH o 5-OH del flavonoide^{38,39}.

³⁸ J.H. Looker, W.W. Hanneman, J. Org. Chem. (1962) 27:381-389.

³⁹ D. Lin Vien, N.B. Colthup, W.F. Fateley, J.G. Grasselli, Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, inc, Boston (1991).

Capítulo II

2.1. Vanadio: Generalidades

El elemento debe su nombre a la diosa escandinava Vanadis, diosa de la belleza y la fertilidad. En 1801, el Químico Andrés Manuel del Río habló sobre un nuevo elemento, sin embargo fue en 1830 cuando el sueco Nils Sefstrom lo descubrió. El vanadio en su estado puro es un metal gris-plateado brillante, suave y dúctil y es uno de los 22 elementos más abundante en la corteza terrestre, océanos, suelo y combustibles fósiles¹. Aunque en los alimentos se encuentra en baja concentración (< 1 ng/g), estos son la mayor fuente de exposición para la población en general. Algunos de los alimentos ricos en vanadio son champiñones, mariscos, semillas de eneldo, perejil, pimienta negra, cereales y frutas frescas².

En 1911, Henze descubrió que ciertos organismos invertebrados marinos sésiles, denominados ascidias, poseían altos niveles de vanadio en sus células sanguíneas. Estos niveles ascienden hasta una concentración de 100 mM, un millón de veces más que el valor encontrado en el agua de mar. A pesar que no se conoce con exactitud la función de este elemento en dichos organismos, se postula que participa en la transducción de señales, almacenamiento de energía y defensa contra la depredación^{3,4}.

En 1986, se descubrió en una bacteria del suelo llamada *Azotobacter chroococcum* una enzima nitrogenasa que posee vanadio en su sitio activo en vez de molibdeno. Si bien no se conoce concretamente la función del metal, se cree que la presencia del mismo surgió como una adaptación a ambientes ácidos o de baja temperatura⁵.

También existe una familia de enzimas, las haloperoxidasas, que contienen vanadio en su sitio activo y que están presentes en algas, líquenes y hongos⁶.

Si bien este elemento traza es considerado como esencial para los animales aún no se ha establecido como un micronutriente importante para los humanos⁷ aunque algunos trabajos indican que este metal se incluye en el grupo de otros 40 micronutrientes esenciales^{8,9}.

¹ H. Fickl, A.J. Theron, H. Grimmer, J. Oommen, G.J. Ramafi, H.C. Steel, S.S. Visser, R. Anderson, Free Radical Biol. Med. (2006) 40:146-155.

² G.B. García, Acta Toxicol. Argent. (2006) 14:32-36.

³ M. Henze, Z. Hoppe-Seyers, Physiol. Chem. (1911) 72:494-501.

⁴ T. Ueki, H. Michibata, Coord. Chem. Rev. (2011) 255:2249-2257.

⁵ R.L. Robson, R.R. Eady, T.H. Richardson, R.W. Miller, M. Hawkins, J. R. Postgate, Nature (1986) 322:388-390.

⁶ A. Butler, J.V. Walker, Chem. Rev. (1998) 93:1937-1944.

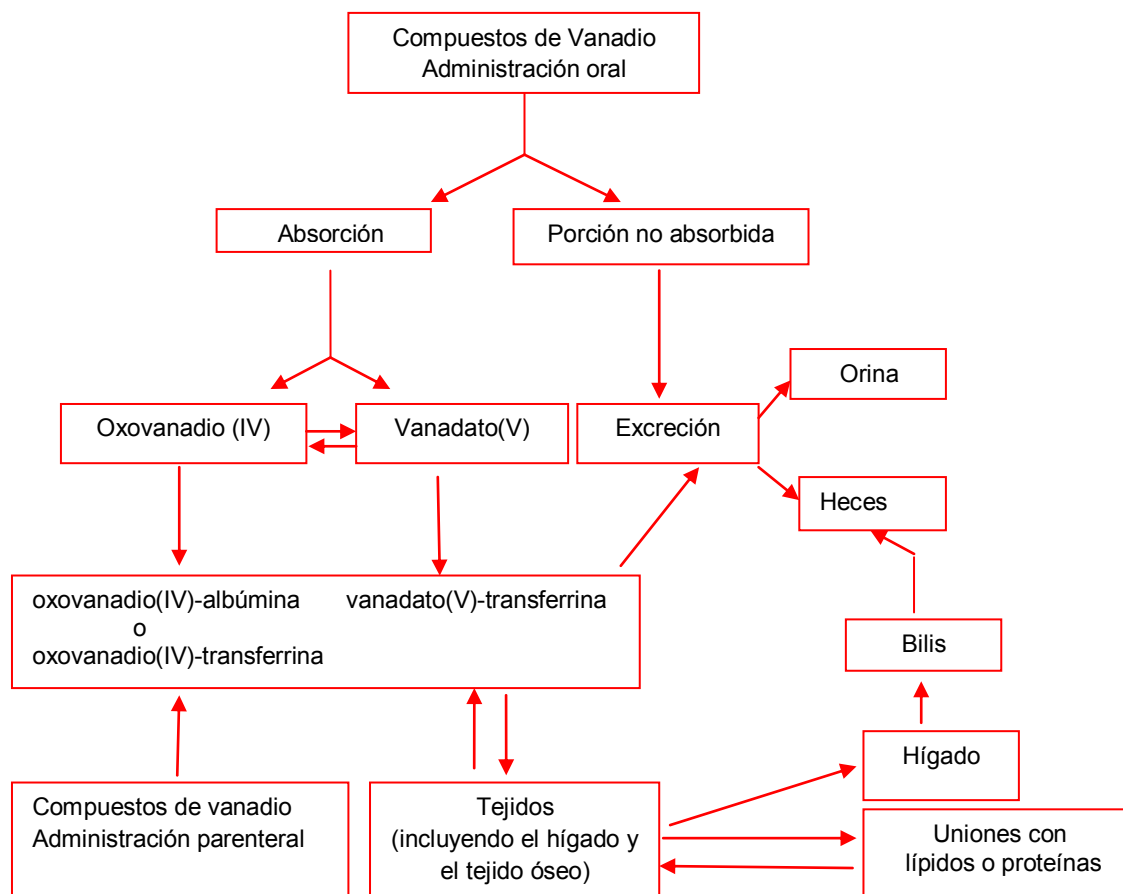
⁷ A. Bishayee, A. Waghray, M.A. Patel, M. Chatterjee, Cancer Lett. (2010) 294:1-12.

⁸ T. Chakraborty, A. Chatterjee, A. Rana, D. Dhachinamoorthi, A. Kumar, M. Chatterjee, Biochim. Biophys. Acta (2007) 1772:48-59.

⁹ E. Sabbioni, J. Kierab, R. Pietra, O. Vesterberg, Sci. Total Environ. (1996) 188:49-58.

2.2. Absorción, excreción y almacenamiento

Aunque los mecanismos de absorción, excreción y almacenamiento de vanadio en sistemas vivos no están bien comprendidos, en el Esquema 1 se representa brevemente lo que podría ocurrir en animales superiores.



Esquema 1. Principales rutas de absorción, distribución y excreción de los compuestos de vanadio.

Varios informes demuestran que el vanadio es absorbido pobremente en el tracto gastrointestinal (solo un 10 %). Diversos estudios sugieren que la mayor parte del vanadio ingerido se transforma en la forma catiónica en el estómago antes de ser absorbido en el duodeno a través de un mecanismo desconocido. El vanadio en forma de vanadato(V) aniónico (VO_3^-) puede ser absorbido en gran parte (alrededor de cinco veces más que el oxovanadio(IV)) a través del sistema de transporte aniónico¹⁰. El vanadato intracelular puede ser reducido a V(IV)O^{2+} por varios reductores fisiológicos como el glutatión (GSH), catecoles y otros constituyentes celulares¹¹. Luego ambas especies, vanadato(V) y oxovanadio(IV) son transportados por proteínas a través de la

¹⁰ B. Mukherjee, B. Patra, S. Mahapatra, P. Banerjee, A. Tiwari, M. Chatterjee, *Toxicol. Lett.* (2004) 150:135-143.

¹¹ J. Liu, D.J. Reuland, L. Rosenhein, Z. Xin Cao, L.A. Franklin, Supriya Ganguli, *Metabolism* (1997) 46:562-572.

sangre hacia los tejidos. Finalmente el vanadio absorbido se excreta por heces y a través de la bilis y la orina.

La suplementación oral e intraperitoneal en modelos animales demostró que el vanadio se acumula en cerebro, páncreas, pulmones, testículos, corazón, bazo, hígado y principalmente en huesos^{6,12}.

Estudios *in vitro* demostraron que aquellas drogas que contienen vanadio ejercen un efecto estimulador sobre líneas celulares osteoblásticas. Sin embargo, aún no se han determinado los efectos *in vivo* de los compuestos de vanadio sobre la incorporación de este elemento a los huesos¹³.

2.3. Impacto de la deficiencia de vanadio en animales superiores

Diversos reportes demostraron que aquellas cabras que han sido alimentadas con dietas deficientes en vanadio exhiben tasas de aborto altas y disminución en la producción de leche¹⁴. Otras alteraciones bioquímicas en estos animales incluyen disminución de los niveles de enzimas como isocitrato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, creatinina sérica, betalipoproteínas y glucosa sérica.

Dentro de las anomalías físicas se incluyen hinchazón de las articulaciones y deformaciones esqueléticas en los miembros anteriores. También se ha reportado que los compuestos de vanadio modulan los niveles de hormonas tiroideas en la sangre, debido a esto si los animales son privados de este elemento exhiben disminución del peso de la glándula tiroides y de la relación peso de la tiroides/peso corporal. Los compuestos de vanadio también afectan el metabolismo de la glucosa y los lípidos. En ciertos animales como pollos y ratas, los síntomas de deficiencia son retardo en el crecimiento, deterioro de la reproducción, alteración del metabolismo de los lípidos e inhibición de la Na(I)/ K(I) ATPasa en el riñón, el cerebro y en el corazón¹⁰.

2.4. Propiedades químicas y bioquímicas de vanadio

El vanadio posee una geometría bien definida de su esfera de coordinación interna con respecto a los estados de oxidación habituales del metal [V(III), V(IV), V(V)], mientras que la esfera externa no está bien delimitada. Por lo tanto, hay una donación de un par de electrones desde los ligandos a la esfera interna del metal, confiriéndole a la unión un alto grado de carácter covalente. La facilidad relativa con la que un ligando puede entrar y salir de la esfera de coordinación determina que un complejo sea denominado como "lábil", mientras que un falta de movimiento caracteriza a los mismos como "inertes"¹⁵.

El vanadio existe en solución acuosa como tetravalente ($V(IV)O^{+2}$) y pentavalente (HVO_4^{-2} , VO_3^- y/o $H_2VO_4^-$). Especies de vanadio monoméricas y poliméricas tetravalentes y pentavalentes pueden estar presentes en soluciones acuosas y su composición depende del pH y de la concentración del metal. En presencia de agentes oxidantes el vanadio está presente como HVO_4^{-2} o $H_2VO_4^-$ a concentraciones micromolares cerca del pH neutro mientras

¹² E.J. Baran, J. Inorg. Biochem. (2000) 80:1-10.

¹³ D.M. Facchini, V.G. Yuen, M.L. Battell, J.H. McNeill, M.D. Grynpsas, Bone (2006) 38:368-377.

¹⁴ V. Badmaev, S. Prakash, M.Majeed, J. Altern. Complem. Med. (1999) 5:273-291.

¹⁵ A. Morinville, D. Maysinger, A.Shaver, TIPS (1998) 19:452-460.

que la presencia de agentes reductores intracelulares o extracelulares (por ejemplo glutatión) reduce el anión al catión $V(IV)O^{2+}$ en pocos minutos.

Una de las características más relevantes e interesantes del vanadato es su similitud en cuanto a carga y estructura con el fosfato. En la Figura 1 se muestran las analogías estructurales entre las formas monoprotonadas. Se ha demostrado que el vanadato puede formar vínculos estéricos de manera análoga al fosfato y esto puede ser la base de muchos efectos biológicos, particularmente la inhibición enzimática¹⁶.

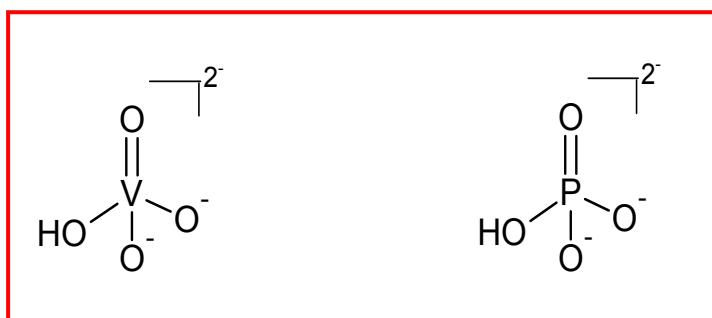


Figura 1. Analogías entre el vanadato y el fosfato.

2.5. Química del vanadio(IV) en solución acuosa

La especie más conocida de vanadio(IV) es el catión oxovanadio(IV) ($V(IV)O^{2+}$ o $[VO(H_2O)_5]^{2+}$). Dicho catión es estable a pH ácido y es la especie mayoritaria a pH 3.

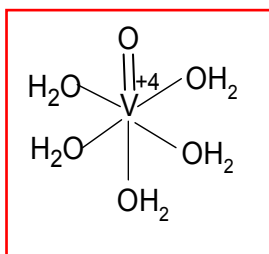
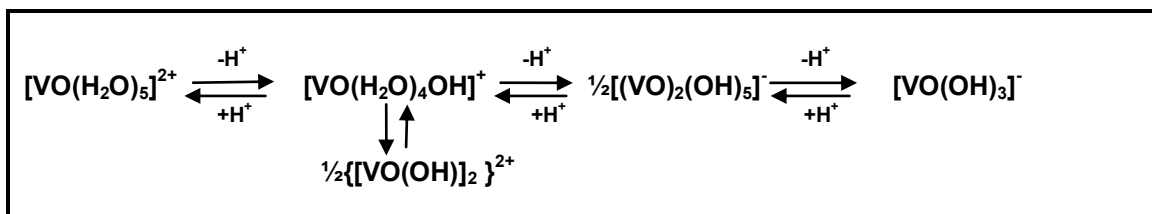


Figura 2. Estructura del catión $[VO(H_2O)_5]^{2+}$.

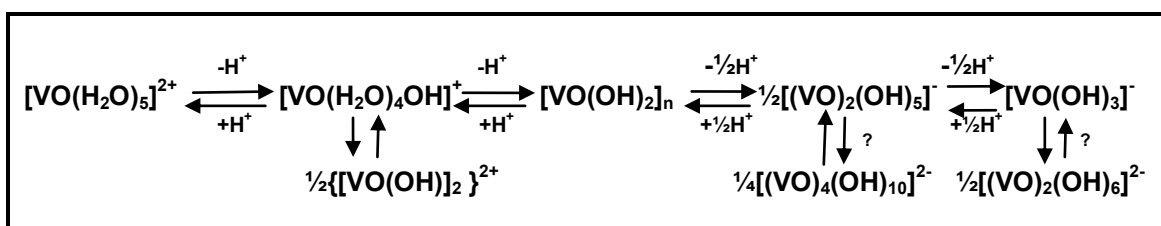
Cuando el pH aumenta a un valor de 4, se pierde un protón (los valores de pKa reportados se encuentran en un rango entre 5,00 y 6,04) y la especie hidrolizada que se forma en solución es $[VO(H_2O)_4OH]^+$ (esquemas 2 y 3). El esquema 2 muestra la distribución de especies de vanadio(IV) que existe a concentración nanomolar (nM) y el esquema 3 muestra la distribución de especies pero a concentración micromolar (μ M).

¹⁶ E. Tsiani, I.G. Fantus, TEM (1997) 8:51-58.



Esquema 2. Productos obtenidos por la hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentración nanomolar de vanadio(IV)

El hidróxido insoluble $[\text{VO}(\text{OH})_2]_n$ se encuentra en equilibrio con especies monoméricas cargadas positiva y negativamente.



Esquema 3. Productos obtenidos por la hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentraciones micromolares hasta milimolares de vanadio(IV).

Una vez que se forma la especie $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4\text{OH}]^+$ aparece un dímero silencioso en el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) ($\frac{1}{2}\{[\text{VO}(\text{OH})_2]_2\}^{2+}$). Si el pH de la solución aumenta a un valor por encima de 5 se observa una disminución abrupta en la intensidad de la señal de EPR por formación de la especie insoluble $[\text{VO}(\text{OH})_2]_n$.

A un pH mayor, esta última especie se disuelve para formar el dímero $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ y finalmente el monómero $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$. Este último fue caracterizado por espectroscopía EPR y UV-vis mientras que la formación del dímero fue deducida por análisis potenciométrico.

La fórmula $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$ parece ser que implica una especie tetracoordinada. Sin embargo, los estudios experimentales son consistentes con la especie hexacoordinada.

Los métodos empleados no proporcionan información exacta sobre la cantidad de moléculas de agua asociadas al ión metálico en solución. Presumiblemente, dos moléculas de agua están asociadas con el ión $[\text{VO}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2]^-$. Tal estequiometría podría convertir este anión en el catión oxovanadio(IV) a través de tres pasos de protonación sin cambios en la esfera de coordinación¹⁷.

¹⁷ D.C. Crans, J.J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang, Chem. Rev. (2004) 104:849-902.

2.6. Toxicidad de compuestos de vanadio en animales y humanos

La administración de compuestos de vanadio en seres humanos y animales revela que este elemento puede ejercer diversos efectos tóxicos. Los estudios en animales (principalmente en ratas y ratones) demostraron que dichos efectos están relacionados con la especie, la dosis, la ruta y la duración de la administración, así como con la naturaleza del compuesto. Cuando se administraron estos compuestos a personas que sufrían diabetes mellitus o enfermedad de las arterias coronarias en tratamientos a corto plazo (máximo de 4 semanas), el efecto secundario más común fue una leve perturbación gastrointestinal. Por inhalación, los síntomas principales son irritación de los ojos y del tracto respiratorio superior con sangrado nasal, tos, rinitis y dolor de garganta.

La toxicidad aguda en animales por ingestión de compuestos de vanadio lleva a disturbios nerviosos, parálisis de los miembros, falla respiratoria, convulsiones, deposiciones sanguinolentas y muerte².

En gatos la administración de NaVO_3 por vía intravenosa produjo vasoconstricción renal y disminución de la filtración glomerular¹⁸.

2.7. Importancia farmacológica y terapéutica de los compuestos de vanadio

Los usos farmacológicos del vanadio incluyen disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos, efectos diuréticos y natriuréticos, efectos anticancerígenos, contracción de los vasos sanguíneos, mejora de la afinidad del oxígeno por la mioglobina y la hemoglobina¹⁴.

Se han reportado varios trabajos que indican que la administración exógena de vanadato(V) y oxovanadio(IV) puede disminuir los niveles de glucosa, estimular la ingesta de hexosas, y la oxidación de la glucosa, ya que estos compuestos actúan como agentes insulino-miméticos¹⁹.

Por otro lado, Wang y colaboradores demostraron que un compuesto de vanadio (bis(maltolato)oxovanadio(IV)) puede aumentar la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y disminuir el apetito y la grasa corporal por disminución de los niveles del NPY (neuropéptido hipotalámico Y) en el hipotálamo. Esto sugiere que este complejo puede ser utilizado como un agente anti-obesidad²⁰.

El VOSO_4 es utilizado para mejorar el rendimiento de los atletas que realizan levantamiento de pesas. Existen ciertas preocupaciones sobre su uso ya que dichos compuestos de vanadio pueden causar anemia y alteraciones en los glóbulos blancos pero Fawcett y colaboradores realizaron diversos estudios y no observaron dichos efectos hematológicos²¹.

¹⁸ J.A. Larsen, O.O. Thomsen, *Acta Physiol. Scand.*(1980) 110:367-374.

¹⁹ L.H. Cazarolli, L. Zanatta, A.P. Jorge, E. de Sousa, H. Horst, V.M. Woehl, M.G. Pizzolatti, B. Szpoganicz, F.R. Mena Barreto Silva, *Chem-Biol. Interact.* (2006) 163:177-191.

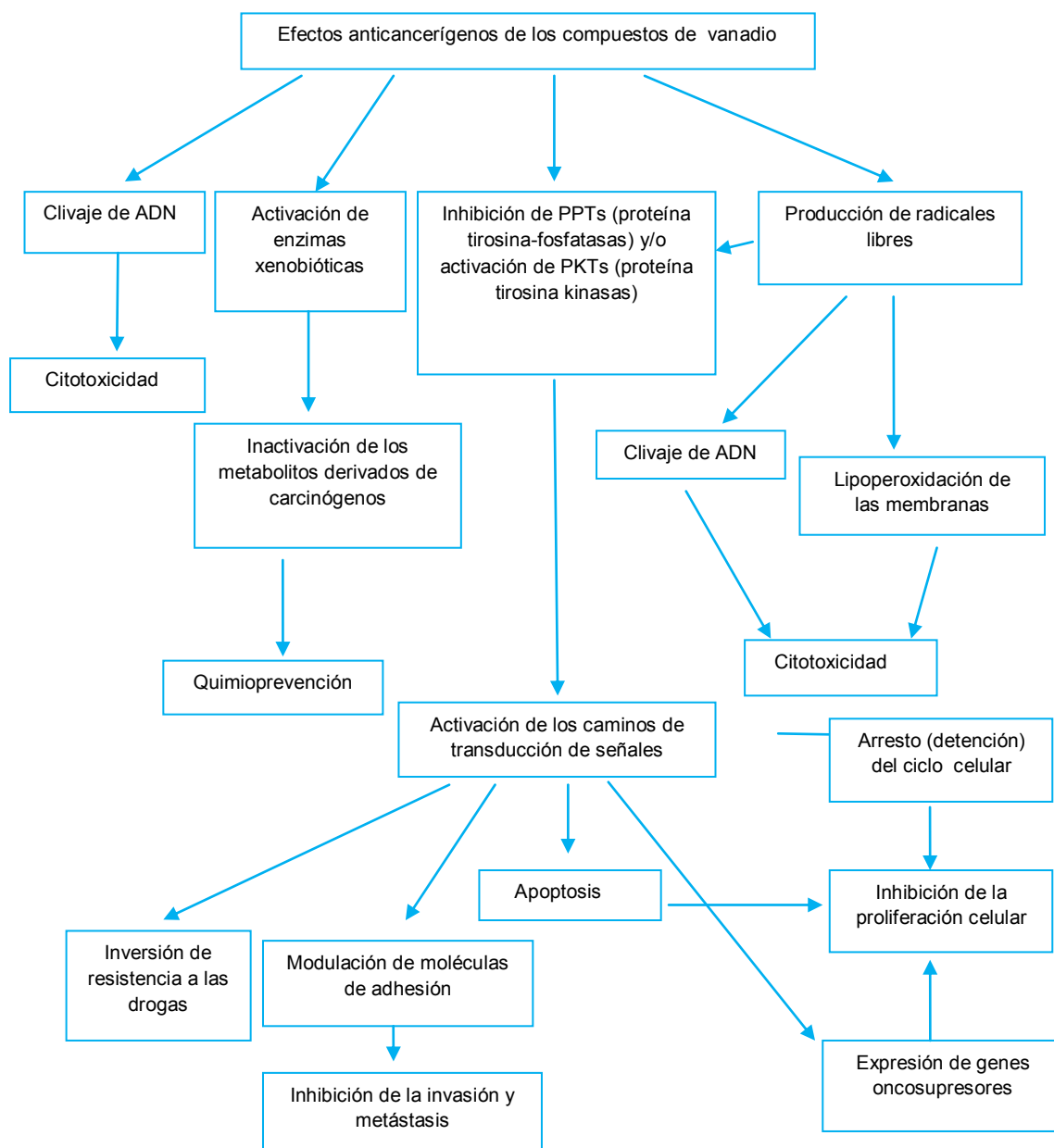
²⁰ J. Wang, V.G. Yuen, J.H. McNeill, *Metabolism* (2001) 50:667-673.

²¹ J.P. Fawcett, S.J. Farquhar, T. Thou, B.I. Shand, *Pharmacol. Toxicol.* (1997) 80:202-206.

2.8. Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio

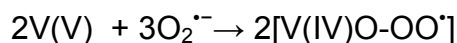
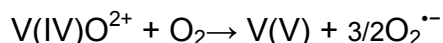
Los mecanismos universales por los cuales los compuestos de vanadio ejercen su actividad anticancerígena están resumidos en el Esquema 4.

Uno de los mecanismos principales está basado en la interconversión entre vanadio(IV) y vanadio(V) en el medio biológico, donde los compuestos de este metal generan estrés oxidativo, así, sus efectos anticancerígenos y citotóxicos están atribuidos al aumento de la producción de radicales libres.



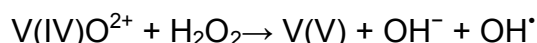
Esquema 4. Presentación esquemática de las acciones a través de las cuales ejercen sus efectos antitumorales los compuestos de vanadio.

Las siguientes reacciones tienen lugar dentro de las células:



Estas reacciones conducen a la formación del radical peroxovanadilo ($[V(IV)O-OO^{\bullet}]$) e hidroperóxido de vanadilo ($[V(IV)O-OH^{\bullet}]$)²².

Como se mostró anteriormente el radical $O_2^{\bullet -}$ es transformado en H_2O_2 por la enzima SOD. Finalmente:

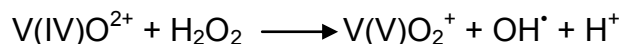


Otro mecanismo está basado en la similitud entre vanadato y fosfato (como se mostró anteriormente), esto permite a los compuestos de vanadio ejercer sus efectos sobre las vías de transducción de señales inhibiendo a las proteínas tirosina fosfatasas²³.

Por otro lado, los complejos de vanadio ejercen efectos antiproliferativos y, en algunos casos proliferativos, sobre algunos tipos de líneas celulares. Para algunas sales de vanadio se ha observado un efecto bifásico en la proliferación celular, esto es, a una concentración menor a 1×10^{-10} M de estos compuestos se estimula la proliferación de células tumorales y a una concentración mayor a 1×10^{-10} M se inhibe la formación de tumores.

Aparentemente el mecanismo por el cual estos complejos ejercen sus efectos antiproliferativos (tanto en líneas celulares normales como tumorales) es el arresto del ciclo celular. Esta detención del ciclo celular a través de los complejos de vanadio puede estar mediada por la inhibición de las proteínas tirosina fosfatasas o por la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (superfamilia de las MAPKs)²⁴.

También existe evidencia que indica que los complejos de vanadio inducen la ruptura del ADN, pero no reaccionando directamente con sus componentes sino a través de la producción de ROS. A través de estudios de EPR se demostró que los radicales OH^{\bullet} generados cuando el oxovanadio(IV) reacciona con H_2O_2 son los que participan en la ruptura del ADN²⁵.



La necrosis y la apoptosis son dos mecanismos que llevan a la muerte celular por vías diferentes. La necrosis es el resultado de efectos citotóxicos los cuales inducen inflamación en las células pero no se observan cambios

²² M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Chem. Biol. Interact. 160 (2006) 1-40.

²³ Q. Wang, T.T. Liu, Y. Fu, Kui Wang, X.G. Yang, J. Biol. Inorg. Chem. (2010) 15:1087-1097.

²⁴ A.M. Evangelou, Crit. Rev. Oncol. Hematol. (2002) 42:249-265.

²⁵ H. Sakurai, Environ. Health Perspect. (1994) 3:35-36.

morfológicos en los núcleos, sino que la muerte se debe a que se daña la membrana celular y hay pérdida de citoplasma y contenido nuclear.

En el otro caso, la apoptosis, se caracteriza principalmente por la condensación citoplasmática y nuclear, fragmentación del núcleo, presencia de burbujas en las membranas y también aparecen los denominados “cuerpos apoptóticos” (fragmentos citosólicos que contienen restos picnóticos de núcleos). Si bien este es un proceso fisiológico, la regulación inapropiada del mismo puede dar lugar a diversas condiciones patológicas, entre las que se encuentra el cáncer.

La regulación por parte de los compuestos de vanadio de las vías de señalización celular puede influir, además de lo visto anteriormente, en la muerte celular programada²⁴.

2.9. Tratamiento antineoplásico

El tratamiento ideal contra el cáncer de cualquier compuesto debe cumplir con ciertos criterios y ejercer los siguientes efectos selectivos sobre las células malignas:

- (a) reducción de la tasa de crecimiento celular (efecto antiproliferativo).
- (b) acciones citotóxicas y/o citostáticas, expresadas por necrosis o apoptosis.
- (c) reducción y/o inhibición de la invasión o potencial metastásico de las células.
- (d) disminución o ausencia de potencia para inducir la resistencia celular.

Algunos compuestos de vanadio son capaces de cumplir con estas condiciones, ya sean ejercidas en conjunto o por separado, a través de una variedad de mecanismos celulares²⁵.

2.10. ¿Cuál es la importancia de complejar al $V(IV)O^{2+}$?

La actividad antitumoral del cisplatino (cis-diamino-dicloroplatino(II)) fue descubierta hace más de 40 años y desde ese momento dicho compuesto fue utilizado como un fármaco quimioterapéutico potente. El cisplatino juega un papel fundamental en el tratamiento frente a algunos tipos de cáncer: testículo, vejiga, ovario, cuello, cabeza, colorectal y pulmón²⁶. Debido a que ciertos tipos de tumores malignos presentan resistencia al tratamiento con el cisplatino, se sintetizaron diversos análogos del mismo como el carboplatino (cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato) platino(II)) y el lobaplatino (cis-[trans-1,2-ciclobutanbis(metil-amina)-N,N']-[(2S)-lactato-O¹,O²]-platino(II)) y sus derivados. Estos son los denominados compuestos de platino de segunda generación²⁷.

²⁶ B. Köberle, M.T. Tomicic, S. Usanova, B. Kaina, *Biochim. Biophys. Acta* (2010) 1806:172-182.

²⁷ R. Bakhtiar, E.I. Ochiai, *Gen. Pharmacol.* (1999) 32:525-540.

A partir de estos descubrimientos se comenzó a estudiar la aplicación de diferentes complejos metálicos como agentes terapéuticos. En particular, una gran variedad de compuestos de vanadio han sido sintetizados, en un esfuerzo por ofrecer una mejor tolerancia, una acción más potente, una mayor selectividad y menor toxicidad en los tratamientos terapéuticos por ejemplo en diabetes, osteogénesis y cáncer²⁸. Por otro lado, la complejación de este catión permite aumentar la absorción del vanadio en el tracto gastrointestinal²⁹.

2.11. Algunas evidencias sobre la actividad antitumoral de complejos con V(IV)O²⁺

Existe evidencia que complejos de vanadio con diversos ligandos ejercen una acción citotóxica muy fuerte frente a diversos tipos de cáncer. Dong y colaboradores sintetizaron 4 complejos de vanadio utilizando como ligandos 1,10-fenantrolina y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y encontraron que estos compuestos exhiben una potente actividad citotóxica sobre las células de leucemia linfoblástica aguda. Dicha actividad está modulada por el entorno de coordinación³⁰. El complejo sulfato de bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) oxovanadio(IV) o Metvan es un agente anticancerígeno potente, cuya propiedad es inducir la apoptosis de células de leucemia humana, células de mieloma múltiple y una serie de tumores sólidos derivados de pacientes con cáncer³¹. También existen reportes de un nuevo complejo de oxovanadio(IV) con curcumina, el cual es más efectivo que el ligando libre frente a células de linfoma de ratón³².

En nuestro grupo de trabajo, se trabajó con el complejo de oxovanadio(IV) con hesperidina, el cual fue testeado frente a dos líneas tumorales, UMR106 (derivadas de osteosarcoma de rata) y Caco-2 (adenocarcinoma de colon) observándose que mejora el efecto antiproliferativo del ligando lo cual se correlaciona con alteraciones morfológicas que se traducen en apoptosis³³.

Ciertos resultados revelan que el complejo VO-salen (donde salen es N,N'-etilen bis(salicilimina)) inhibe la proliferación de las células K562 (derivadas de leucemia mieloide crónica, establecida a partir de un derrame pleural de personas con crisis blástica), pero no se observan alteraciones morfológicas, ni en el grado de apoptosis ni en la diferenciación. Esto da idea que este compuesto tiene efecto citostático e inhibe el ciclo celular en las fases G2/M. También se encontró que este efecto se potencia con el agregado de taxol³⁴.

²⁸ J. Benítez, L. Guggeri, I. Tomaz, J. Costa Pessoa, V. Moreno, J. Lorenzo, F.X. Avilés, B. Garat, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.* (2009) 103:1386-1394.

²⁹ V.G. Yuen, C. Orvig, J.H. McNeill, *Canadian J. Physiol. Pharmacol.* (1993) 71:263-269.

³⁰ Y. Dong, R.K. Narla, E. Sudbeck, F.M. Uckun, *J. Inorg. Biochem.* (2000) 78:321-330.

³¹ O.J. D'Cruz, F.M. Uckun, *Expert Opin. Investig. Drugs* (2002) 11:1829-1836.

³² K. Mohammadi, K.H. Thompson, B.O. Patrick, T. Storr, C. Martins, E. Polishchuk, V.G. Yuen, J.H. McNeill, C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.* (2005) 99:2217-2225.

³³ S.B. Etcheverry, E.G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A.M. Williams, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2008) 13:435-447.

³⁴ A. Meshkini, R. Yazdanparast, *Exp. Mol. Pathol.* (2010) 89:334-342.

2.12. Algunos aspectos de la química vanadio

2.12.1. Estados de oxidación y estereoquímica

El vanadio presenta diferentes estados de oxidación que van desde -I hasta +V siendo los estados (III), (IV) y (V) los más relevantes en sistemas biológicos.

Si bien el vanadio(III) es un ejemplo conocido (se encuentra en los vanadocitos de la sangre de los tunicados), los estados de oxidación IV y V son los más accesibles bajo condiciones fisiológicas.

En la tabla 1 se resumen los principales estados de oxidación y la estereoquímica del vanadio³⁵.

Estado de oxidación	Número de coordinación	Geometría
V(III) (d^2)	3	Planar
	4	Tetraédrica
	5	Bipirámide trigonal
	6	Octaédrica
	7	Bipirámide pentagonal
V(IV) (d^1)	4	Tetraédrica
	5	Bipirámide trigonal
	6	Octaédrica
	7	Bipirámide pentagonal
	8	Dodecaédrica
V(V) (d^0)	3	Planar
	4	Tetraédrica
	5	Bipirámide trigonal
	6	Octaédrica
	7	Bipirámide pentagonal

Tabla 1. Principales estados de oxidación y estereoquímica del vanadio.

2.12.2. Espectro electrónico del catión $V(IV)O^{2+}$

Como observamos anteriormente, el catión oxovanadio(IV) se encuentra en solución como catión $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ con geometría octaédrica.

En base al esquema de niveles moleculares propuestos por Ballhausen y Gray³⁶ para el catión $[VO(H_2O)_5]^{2+}$ con simetría C_{4v} , las bandas de absorción pueden ser asignadas a las siguientes transiciones:

³⁵ N.N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemistry of the elements, 2nd Ed, Butterworth-Heinemann, (1997).

- Banda I: ${}^2B_2 \longrightarrow {}^2E(I)$ o $b_2 \longrightarrow e$ o $d_{xy} \longrightarrow d_{xz}, d_{yz}$ (~ 770 nm)
- Banda II: ${}^2B_2 \longrightarrow {}^2B_1(I)$ o $b_2 \longrightarrow b_1$ o $d_{xy} \longrightarrow d_{x^2-y^2}$ (~ 625 nm)
- Banda III: ${}^2B_2 \longrightarrow {}^2A_1(I)$ o $b_2 \longrightarrow a_1$ o $d_{xy} \longrightarrow d_z^2$

Esta última banda generalmente se encuentra enmascarada por una banda intensa de transferencia de carga ubicada alrededor de 330 nm. Debido a que esta banda de transferencia de carga se encuentra en la misma posición tanto en solución acuosa como en el espectro de reflectancia difusa del catión $V(IV)O^{2+}$ y el espectro cristalino de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ se puede sugerir que estas transiciones involucran los orbitales π del oxovanadio(IV).

Para formar los orbitales moleculares, Ballhausen y Gray tomaron en cuenta que el enlace $V=O$ es muy fuerte, que las 4 moléculas de H_2O en el plano son equivalentes y que la molécula de H_2O en la posición axial se encuentra débilmente unida al centro metálico.

Si se acepta el modelo de Ballhausen y Gray y simetría C_{4v} , los orbitales d del vanadio se desdoblan como se indica en la Figura 3.

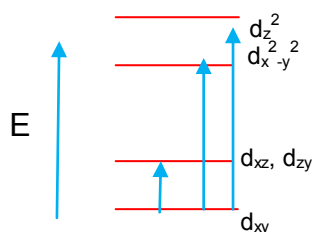


Figura 3. Desdoblamiento de los orbitales d del vanadio.

Cabe esperar entonces que se produzcan tres bandas correspondientes a transiciones d-d desde el orbital d_{xy} , ocupado con un electrón, a los restantes orbitales vacíos. La banda de absorción localizada en 760 nm corresponde a la transición $d_{xy} \longrightarrow (d_{xz}, d_{yz})$ y la banda de absorción situada en 625 nm a una transición $d_{xy} \longrightarrow d_{x^2-y^2}$. No se aprecia la banda correspondiente a la transición $d_{xy} \longrightarrow d_z^2$ porque se presenta solapada con la banda de transferencia de carga en la zona ultravioleta. En esta región se manifiesta una banda a 220 nm y un hombro a 240 nm, que se atribuyen a la transferencias de carga del grupo $V=O$. La banda a 220 nm corresponde a la transición de un electrón desde orbitales p_π del oxígeno a orbitales d_{xz}, d_{zy} del vanadio y el hombro a 240 nm a una transferencia al orbital d_{xy} .

También se ha observado en varias oportunidades en complejos con $V(IV)O^{2+}$ la aparición de 4 bandas en el espectro de absorción^{37,38} (Figura 4), las cuales son atribuidas a la reducción de la simetría del campo de ligandos y se explica en base al "modelo de cluster" que predice que la banda I del modelo de Ballhausen y Gray contiene tres transiciones electrónicas con energías similares.

³⁶ C. J. Ballhausen, H.B. Gray, Inorg Chem (1972) 1:111-122.

³⁷ E. Garribba, G. Micera, A. Panzanelli, Inorg. Chem. (2003) 42:3981-3987.

³⁸ J. Selbin, L. Morpurgo, J. Inorg. Nucl. Chem. (1965) 27:673-678.

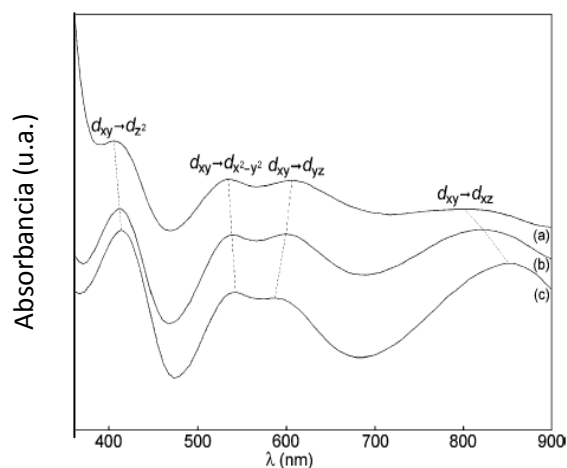


Figura 4. Espectros electrónicos de absorción de Compuestos de coordinación con el catión oxovanadio(IV). Tomado de Garribba y colaboradores³⁷. a) $[\text{VO}(\text{glicolato})_2]^{2-}$, b) $[\text{VO}(\text{D-L mandelato})_2]^{2-}$, c) $[\text{VO}(\text{benzilato})_2]^{2-}$

2.12.3. Espectro infrarrojo (FTIR)

Selbin y colaboradores³⁹ realizaron un estudio sobre 51 complejos de oxovanadio(IV), registrando sus espectros infrarrojos en la región de 5000 a 650 cm^{-1} , tanto en estado sólido como en solución. De los resultados obtenidos se deduce que la frecuencia de estiramiento del grupo $\text{V}=\text{O}$ oscila en un margen de $985 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$, observando, además, que el efecto de las fuerzas reticulares resulta prácticamente despreciable en el desplazamiento de las frecuencias, ya que esta variación no es superior a $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ entre el producto sólido y la solución. Sin embargo, los ligandos unidos al V(IV)O^{2+} ejercen un marcado efecto en la frecuencia de estiramiento del enlace $\text{V}=\text{O}$ y las modificaciones que se producen permiten deducir las características estructurales y de enlace del compuesto.

El enlace $\text{V}=\text{O}$ es un enlace múltiple que consta de un enlace σ superpuesto a otro de donación $p_{\pi} \rightarrow d_{\pi}$ de oxígeno a vanadio. El grado de donación depende de la tendencia que presenta el átomo de oxígeno a ceder electrones y el átomo de vanadio a aceptarlos. El oxígeno cede electrones a consecuencia de su elevada densidad electrónica por tener la capa de valencia llena y ser un átomo de escaso volumen. Esta tendencia a ceder electrones del oxígeno no se modifica por los ligandos coordinados al grupo V(IV)O^{2+} mientras que las propiedadesceptoras del átomo de vanadio sí resultan afectadas por los ligandos, ya que al coordinarse estos por intermedio de enlaces σ , aumenta la densidad electrónica en el átomo de vanadio, por lo que presentará menor tendencia a aceptar electrones, resultando menor la donación $p_{\pi} \rightarrow d_{\pi}$. Con ello se produce una disminución en la fuerza del enlace, desplazándose a menores frecuencias de estiramiento. Por lo tanto, cuanto mayor es la capacidad dadora σ de los ligandos menor será el orden de enlace $\text{V}=\text{O}$.

En la tabla 2 se muestran una serie de frecuencias asignadas a la vibración del enlace múltiple $\text{V}-\text{O}$ para algunos compuestos.

³⁹ J. Selbin, L.H. Holmes Jr, S.P. McGlynn, J. Inorg. Nucl. Chem. (1963) 25:1359-1369.

Compuesto	$\nu(\text{V}=\text{O}) \text{ cm}^{-1}$
$\text{VO}(\text{ox})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	986
$\text{VOSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1003,1017,975
$\text{VO}(\text{acac})_2$	996
$\text{VO}(\text{mal})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1000
$\text{VO}(\text{malon})\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	990
$\text{VOCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$	990
$\text{VOBr}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$	996
$\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{ClO}_4)_2$	1005

Tabla 2: Algunas frecuencias de estiramiento V=O para compuestos de oxovanadio (IV).

(Ox: oxalato; acac: acetilacetato; mal:maleato;malon: malonato)

2.12.4. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una herramienta poderosa que provee información sobre la composición elemental, la nuclearidad (presencia de muchos centros magnéticos) y la estructura electrónica de los estados paramagnéticos⁴⁰.

La naturaleza de los ligandos involucrados en la coordinación con el centro metálico puede determinarse con una muy buena aproximación mediante la conocida “regla de aditividad” (Additivity rule) descrita por Chasteen⁴¹. Utilizando la fórmula de la sumatoria, podemos estimar la componente hiperfina A_{\parallel} para diferentes composiciones de ligandos:

$$A_z = \sum n_i A_{z,i}$$

donde n_i es el número de ligandos ecuatoriales de tipo i y $A_{z,i}$ es la contribución al acoplamiento hiperfino paralelo de cada uno de ellos. El procedimiento consiste en estimar, a priori, el entorno probable de coordinación, considerando luego la contribución a la constante de acoplamiento hiperfino de los diferentes modos de coordinación, cuyos datos se encuentran publicados en la literatura^{42,43} (tabla 3), y finalmente comparar los mismos con los valores experimentales, por lo tanto debe existir una buena concordancia dentro del error experimental^{44,45,46,47,48,49,50,51}.

⁴⁰ T.S. Smith II, R. LoBrutto, V.L. Pecoraro, Coord. Chem. Rev. (2002) 228:1–18.

⁴¹ L.J. Berliner, J.Reuben (eds). Chasteen ND. Biological magnetic resonance (1981) vol 3 Plenum, New York.

⁴² M. Cárdenas, M. Marder, V.C. Blank, L.P. Roguin, Bioorg. Med. Chem. (2006) 14: 2966–2971

⁴³ J. Costa Pessoa, I. Cavaco, I. Correia, I.Tomaz, T. Duarte, P.M. Matias, J. Inorg. Biochem. (2000) 80:35–39.

⁴⁴ E. Chruscinska, E. Garribba, G. Micera, A. Panzanelli, J. Inorg. Biochem. (1999) 75:225–232

⁴⁵ P. Buglyó, E.Kiss, I. Fábrián, T. Kiss, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, Inorg. Chim. Acta (2000) 306:174–183.

⁴⁶ G.R. Hanson, Y. Sun, C. Orvig, Inorg. Chem. (1996) 35:6507–6512.

⁴⁷ S.S. Amin, K. Cryer, B. Zhang, S.K. Dutta, S.S. Eaton, O.P. Anderson, S.M. Miller, B.A. Reul, S.M. Brichard, D.C. Crans, Inorg. Chem. (2000) 39:406–416.

⁴⁸ C.P. Stewart, A.L. Porte, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1972) 1661–1666.

Grupo	Contribución A_{II} ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)
CO	44,7
Etanol	45,7
ArO ⁻	38,6
H ₂ O	45,7
COO ⁻	42,1

Tabla 3. Contribución a A_{II} de los diferentes grupos (en cm^{-1}).

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica muestra la transición entre los estados de espín electrónicos separados por la presencia de un campo magnético externo. Esos estados se encuentran separados por una energía que depende del valor de g . Este valor, en el caso de un electrón libre es 2,0023 pero para oxovanadio(IV) es menor (1,95). Estos estados electrónicos son luego separados por la interacción con el espín nuclear (acoplamiento hiperfino).

En el caso del oxovanadio(IV), el espín del núcleo de ^{51}V es $I=7/2$ y los estados son divididos en $2I + 1 = 8$ estados energéticos diferentes, separados por la constante de acoplamiento hiperfino, A . Como vimos anteriormente, esta constante, (específicamente A_{II}) permite correlacionar con el tipo y número de ligandos presentes en el plano ecuatorial. Las reglas de selección para las transiciones electrónicas son $\Delta M_S = \pm 1$ y $\Delta M_I = 0$.

Esto da lugar a la formación de un espectro de 8 líneas para el oxovanadio(IV) (Figura 5)⁵². Como se menciona en el capítulo de materiales y métodos, la asignación de los espectros de EPR se realiza mediante la simulación de los mismos por medio del programa WINEPR SimFonia.

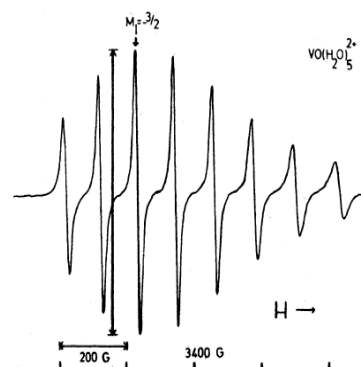


Figura 5. Espectro de resonancia paramagnética electrónica de 8 líneas propio de la especie $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a temperatura ambiente. Tomado de Smith y colaboradores⁵²

⁴⁹ P. Caravan, L. Gelmini, N. Glover, F. Geoffrey Herring, H. Li, J.H. McNeill, S.J. Rettig, I.A. Setyawati, E. Shuter, Y. Sun, A.S.Tracey, V.G. Yuen, C. Orvig, J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:2759-12770.

⁵⁰ T. Kiss, T. Jakush, M. Kilyén, E. Kiss, A. Lakatos, Polyhedron (2000) 19:2389-2401.

⁵¹ T.C. Delgado, A.I. Tomaz, I. Correia, J. Costa Pessoa, J.G. Jones, C.F.G.C. Geraldés, M. Margarida, C.A. Castro, J. Inorg. Biochem. (2005) 99: 2328-2339.

⁵² T.S. Smith II, R. LoBrutto, V.L. Pecoraro, Coord. Chem. Rev. (2002) 228:1-18.

Capítulo III

3.1. Caracterización fisicoquímica

3.1.1. Introducción: ligandos

3.1.1.1. Crisina

La crisina (Figura 1) (5,7-dihidroxi flavona) es un flavonoide natural que se encuentra en muchos extractos de plantas, en la miel y el propóleo. Varios estudios recientes han demostrado que la crisina tiene múltiples actividades biológicas, tales como efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antioxidativos.

También puede ser potencialmente utilizada para aplicaciones clínicas y terapéuticas contra los efectos fisiológicos y bioquímicos del envejecimiento¹. Este ligando a su vez, puede inhibir el metabolismo del carcinógeno benzo [α] pireno en células embrionarias de hámster y en tejidos en cultivo y aumenta significativamente la citotoxicidad del FNT (factor de necrosis tumoral)². Se ha reportado que la crisina inhibe la proliferación de células tumorales humanas (Hela y KB (células de carcinoma orofaríngeo), $CI_{50}=13\mu M$ y murinas (LM3 (adenocarcinoma mamario) y B16-F0 (melanoma), $CI_{50}=16\mu M$ y $CI_{50}=22\mu M$ respectivamente)³.

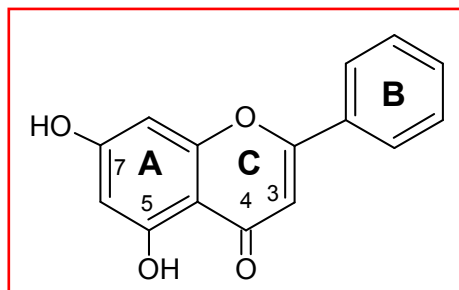


Figura 1. Estructura de la crisina.

3.1.1.2. Silibinina

El extracto de flores y hojas de *Sylibum marianum* (Cardo de Santa María) contiene una mezcla de flavolignanosa llamada silimarina compuesta por silibinina, isosilibinina, silicristina y silidianina⁴. Los lignanos, presentes en plantas, son una de las principales clases de fitoestrógenos polifenólicos con un esqueleto de dibencilbutano y poseen actividad antioxidante.

La silibinina (Figura 2) es el principal y más activo componente de silimarina.

¹ E.K. Shin, H.S. Kwon, Y.H. Kim, H.K. Shin, J.K. Kim, Biochem. Bioph. Res. Comm. (2009) 381:502-507.

² X. Zheng, W.D. Meng, Y.Y. Xu, J.G. Cao, F.L. Qing, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2003) 13:881-884.

³ M. Cárdenas, M. Marder, V.C. Blank, L.P. Roguin, Bioorg. Med. Chem. (2006) 14:2966-2971.

⁴ T.K. Maiti, K.S. Ghosh, A. Samanta, S. Dasgupta, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. (2008) 194:297-307.

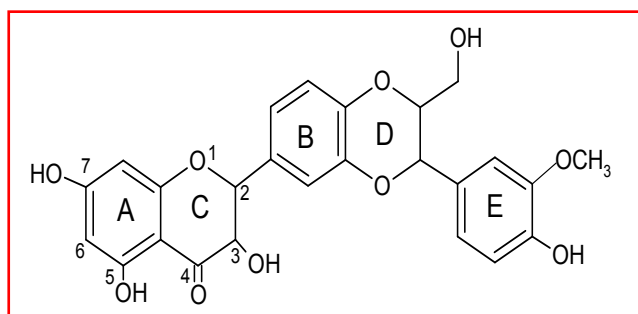


Figura 2. Estructura de la silibinina.

Posee propiedades antioxidantes y capacidad de secuestrar radicales libres⁵. Este ligando es ampliamente utilizado en terapia humana para el mejoramiento de la función hepática y como protector contra una serie de hepatotoxinas (CCl₄, galactosamina, tert-butilhidroperóxido y faloidina)⁶. Estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron la capacidad de la silibinina de actuar contra el cáncer pleiotrópico incluyendo efectos antiproliferativos y una fuerte muerte por apoptosis en las células endoteliales. Otros estudios demostraron que este ligando puede inhibir el crecimiento, arrestar moderadamente el ciclo celular e inducir la apoptosis de pequeñas y no pequeñas células de carcinoma de pulmón. También se ha sugerido que la silibinina activa la cascada de caspasas que es el mecanismo de inducción de apoptosis en el cáncer de próstata⁷.

3.1.1.3. Morina

La morina (Figura 3) [2-(2,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirán-4-ona] es un flavonoide que pertenece al grupo de los flavonoles. Se la ha identificado en frutas, verduras, té, vino y medicinas herbales Chinas. Es un pigmento color amarillo, aislado de plantas de la familia de las Moráceas⁸. La morina posee una fuerte capacidad antioxidante y una gran habilidad para formar compuestos quelato con iones metálicos.

Dentro de sus efectos biológicos y bioquímicos se encuentran actividad antiinflamatoria, anticarcinógena y cardioprotectiva^{9,10}. Además, la morina puede modular la actividad de las enzimas del metabolismo, incluyendo el citocromo P450 y protege del daño oxidativo a varias células como miocitos, eritrocitos, hepatocitos y células endoteliales.

⁵ M. Gharagozloo, Z. Khoshdel, Z. Amirghofran, Eur. J. Pharmacol. (2008) 589:1-7.

⁶ R. Gažák, A. Svobodová, J. Pšotová, P. Sedmera, V. Píkářlová, D. Walterová, Vladimír Křena, Bioorg. Med. Chem. (2004) 12:5677-5687.

⁷ M.J. Mokhtari, N. Motamed, M.A. Shokrgozar, Cell Biol. Int. (2008) 32:888-892.

⁸ J.W. Kim, J.H. Lee, B.Y. Hwang, S.H. Mun, N.Y. Ko, D.K. Kim, B. Kim, H.S. Kim, Y.M. Kim, W.S. Choi, Biochem. Pharmacol. (2009) 77:1506-1512.

⁹ C.S. Yang, J.M. Landau, M.T. Huang, H.L. Newmark, Annu. Rev. Nutr. (2001) 21:381-406.

¹⁰ P.C.H. HoUran, M.G.L. Hertog, M.B. Katanc, Food Chem. (1996) 57:43-46.

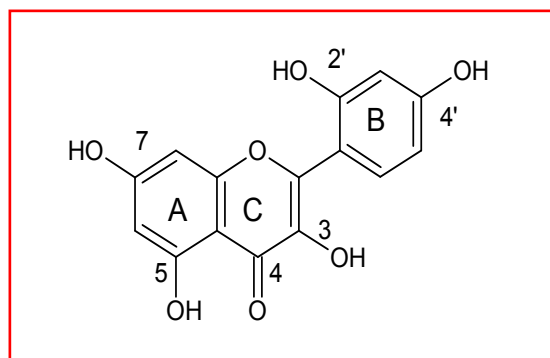


Figura 3. Estructura de la morina.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que este compuesto actúa como un agente quimiopreventivo contra la carcinogénesis oral¹¹.

3.1.1.4. Ácido clorogénico

En los últimos años, los compuestos no-flavonoides con grupos catecol en su molécula han tenido un creciente interés debido a sus múltiples funciones biológicas y farmacológicas¹².

Los ácidos hidroxycinámicos como el ácido cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumarínico están presentes en una gran cantidad de vegetales y frutas como arándanos, uvas, salvado, manzanas, lechuga, brócoli y espinaca¹³.

El ácido clorogénico (Figura 4) (ácido 3-cafeoil-D-quínico) es un éster entre el ácido quínico y el ácido cafeico y es uno de los componentes polifenólicos mayoritarios presentes en frutas y vegetales¹⁴. Este ácido es uno de los componentes de las semillas de café y de las hojas de tabaco y se extrae comercialmente a partir de las primeras¹⁵.

Al igual que otros polifenoles presentes en la dieta, el ácido clorogénico presenta propiedades antioxidantes. Los estudios *in vitro* sugieren que este compuesto elimina radicales generados en fase acuosa, aumenta la resistencia de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) a la peroxidación lipídica e inhibe el daño al ADN. *In vivo*, cuando se añade en la dieta, inhibe la carcinogénesis inducida químicamente del intestino grueso, del hígado y la lengua en ratas y hámsters¹⁶.

Dentro de las actividades biológicas de este ligando se encuentran: actividad anti-HIV, antioxidante, anticancerígena, antialérgica, modulación de la actividad del citocromo P450, inducción de la apoptosis de las células del

¹¹ S. Subash, P. Subramanian, Singapore Med. (2008) 49:650-655.

¹² M.D. dos Santos, P.R. Martins, P.A. dos Santos, R. Bortocan, Y. Iamamoto, N.P. Lopes, Eur. J. Pharm. Sci. (2005) 26:62-70.

¹³ M.N. Clifford, J. Sci. Food Agric. (1999) 79:362-372.

¹⁴ Y. Kono, S. Sashine, T. Yoneyama, Y. Sakamoto, Y. Matsui, H. Shibata, Biosci. Biotechnol. Biochem. (1998) 62:22-27.

¹⁵ R.K.Sharma, M.R. Hajaligol, P.A. Martoglio Smith, J.B. Wooten, V. Baliga, Energ. Fuels (2000) 14:1083-1093.

¹⁶ M.P. Gonthier, M.A. Verny, C. Besson, C. Révész, A. Scalbert, J. Nutr. (2003) 133:1853-1859.

carcinoma oral de células escamosas y en líneas celulares de tumores de glándulas salivales¹⁷.

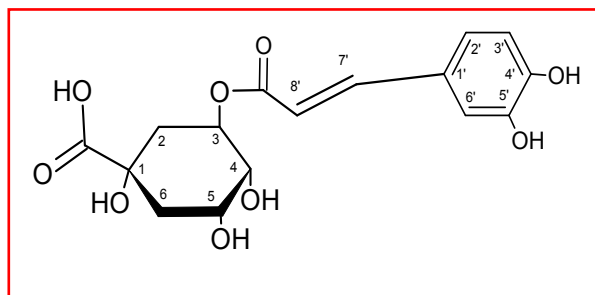


Figura 4. Estructura del ácido clorogénico.

3.1.2. Preparación de los complejos

[VO(crisina)₂EtOH]₂ (VOcrisina)

Se disolvió 1mmol de crisina en 5ml de etanol mediante agitación continua. Sobre la misma se agregaron 0,5 mmoles de V(IV)O(acac)₂ (acac:acetilacetonato) sólido en pequeñas porciones manteniendo constante la agitación. La solución resultante (pH=5) se colocó a reflujo durante 1,30 hs. Pasado ese tiempo se observó la formación de un precipitado color verde que se filtró por succión y se lavó varias veces con etanol absoluto. El sólido obtenido se secó al aire.

Anal. Calc. para C₆₄H₄₈O₂₀V₂: C, 62,0; H, 3,9; V, 8,2 %. Exp.: C, 61,9 H, 4,0; V, 8,3 %.

El espectro UV-vis obtenido por disolución en DMSO del complejo VOcrisina (8,3 x 10⁻³ M) muestra dos bandas de absorción ubicadas en 576 nm (3d_{xy} → 3d_{x²-y²}, ε=12,0 M⁻¹cm⁻¹) y 794 nm (3d_{xy} → 3d_{xz}, 3d_{yz}, ε = 27,7 M⁻¹cm⁻¹).

Na₂[VO(silibinina)₂].6H₂O (Vosilibinina)

Sobre una solución etánolica de silibinina (0,25mmoles en 10 ml) se agregaron 0,125 mmoles de una solución acuosa de VOCl₂ (50%). A la misma se le ajustó el pH a un valor de 9 utilizando NaOCH₃ sólido y se mantuvo bajo calentamiento suave y agitación durante 1 hora. Luego de ese lapso se observó la formación de un precipitado verde que posteriormente se filtró y lavó al menos 3 veces con etanol absoluto. Se dejó secar en estufa a 60 °C. Anal. Calc. para C₅₀H₅₂O₂₇VNa₂: C:50,8; H:4,4; V: 4,3; Na:3,9%. Exp: C:50,0; H:4,4; V:4,3; Na:4,0%.

En el espectro UV-vis obtenido por disolución en DMSO del complejo Vosilibinina (8,3 x 10⁻³ M) se observa la banda d-d característica del oxovanadio(IV) con un

¹⁷ S. Rakshit, L. Mandal, B. Chandra Pal, J. Bagchi, N. Biswas, J. Chaudhuri, A. Acharya Chowdhury, A. Manna, U. Chaudhuri, A. Konar, T. Mukherjee, P. Jaisankar, S. Bandyopadhyay, Biochem. Pharmacol. (2010) 80:1662-1675-

máximo de absorbancia en 775 nm ($\epsilon=90 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que presenta en la región de alta frecuencia un hombro cuyo máximo está ubicado en 560 nm.

[VO(morina)₂H₂O].5H₂O (VOMorina)

Se agregaron 0,25 mmoles de una solución acuosa (50 %) de VOCl₂ a una solución metanólica de morina (10 ml, 0,5 mmol). Se ajustó el pH a un valor de 5 agregando pequeñas porciones de NaOCH₃ sólido. Luego de un reflujo de 3 horas, se formó un sólido verde amarronado. Se filtró la suspensión, se lavó 3 veces con metanol y se secó en estufa a 60 °C.

Anal. Calc. para C₃₀H₃₀O₂₁V: C:46,3, H: 3,9, V 6,5 %. Exp: C: 46,2, H: 3,9, V: 6,3 %.

El espectro UV-vis obtenido por disolución en DMSO del complejo VOMorina ($7,7 \times 10^{-3} \text{ M}$) presenta una banda de absorción en 753 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}, \epsilon = 33,11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y un hombro en 560 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$).

Na[VO(clorog)(H₂O)₃].4H₂O (VOclorog)

Se disolvieron 0,125 mmoles de ácido clorogénico (clorog) en 3 ml de una mezcla metanol:agua (0,5:3) y se agregó el volumen adecuado de una solución acuosa de VOCl₂ (50%) para obtener una relación 1:1. Se ajustó el pH a un valor de 5 con una solución 1M de NaOH. Luego se mantiene la suspensión bajo agitación continua en atmósfera de N₂ durante 15 minutos. Finalmente se precipitó el sólido con alcohol isopropílico, se filtró por succión y el precipitado violeta obtenido se lavó varias veces con el mismo alcohol. Se secó en estufa a 60°C.

Anal. Calc. para C₁₆H₂₉O₁₇VNa: C, 33,8 ; H, 5,1 ; V, 9,0; Na, 4,1 %. Exp.: C, 33,5; H, 5,2; V, 9,2; Na, 4,2 %.

El espectro UV-vis obtenido por disolución en agua del complejo VOclorog ($2,3 \times 10^{-3} \text{ M}$) muestra dos bandas de absorción ubicadas en 555 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$); $\epsilon=300,9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y 864 nm ($3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz}, 3d_{yz}, \epsilon = 210,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.1.3. Caracterización de los complejos sólidos

3.1.3.1. Análisis térmico

Para el complejo VOcrisina el contenido de etanol fue confirmado por medidas termogravimétricas. El TGA (Figura 5) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min demostró en un primer paso (20-193 °C) la pérdida de una molécula de etanol ($\Delta m_{\text{calc.}} 7,43\%$, $\Delta m_{\text{exp.}} 7,54\%$). El residuo final obtenido a 800 °C fue caracterizado por espectroscopía infrarroja como V₂O₅. El peso del residuo final fue 14,7% y está de acuerdo con el valor teórico calculado para la estequiometría propuesta.

Reacción de descomposición:



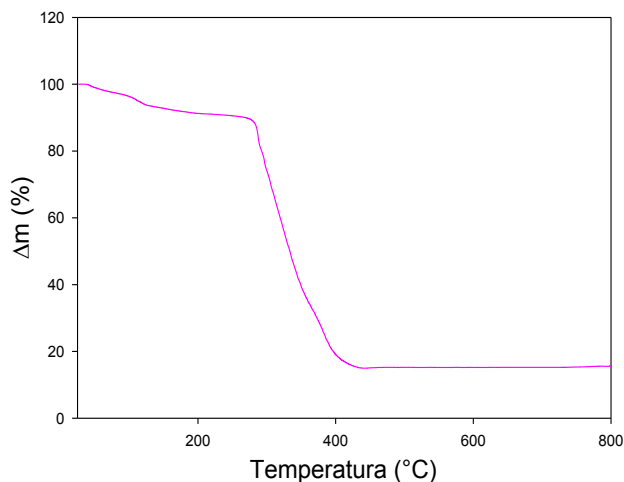


Figura 5. Curva termogravimétrica (TGA) de VOcrisina en atmósfera de O₂.

El análisis termogravimétrico para VOsilibinina permitió observar que en una primera etapa (30-110°C) la pérdida de peso experimental de 9,2% coincidía razonablemente bien con el valor esperado para la pérdida de las 6 moléculas de H₂O presentes en el complejo. Los productos finales de descomposición a 800°C fueron NaVO₃ (caracterizado por espectroscopía infrarroja) y Na₂O. El valor del residuo final obtenido (12,8%) estuvo de acuerdo con el valor teórico calculado considerando los residuos previamente identificados.

Reacción de descomposición:

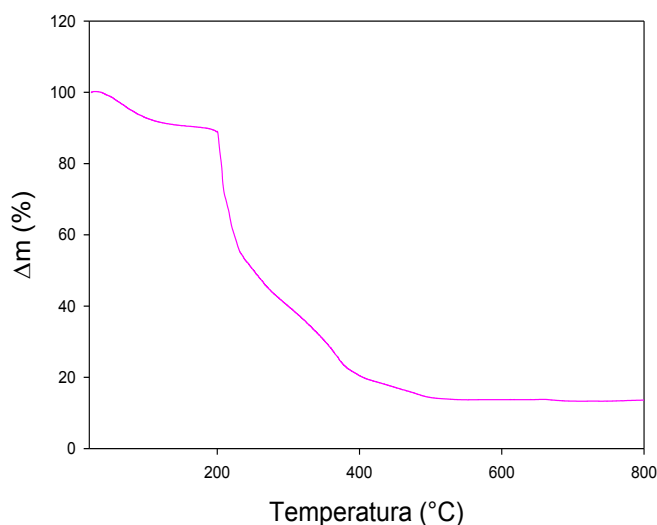


Figura 6. Curva termogravimétrica (TGA) de VOsilibinina en atmósfera de O₂.

Para el caso de VOMorina, en una primera etapa (20-100 °C) se perdieron 5 moléculas de H₂O ($\Delta m_{\text{calcd.}}$ 11,58 %, $\Delta m_{\text{exp.}}$ 11,94 %). La sexta molécula de H₂O, que sería de coordinación, se perdería a mayor temperatura. Dicho paso coincidiría con la iniciación de la descomposición del ligando. El residuo obtenido a 800 °C (V₂O₅) fue caracterizado por espectroscopía infrarroja y su masa coincide con el valor teórico (11,71 %).

Reacción de descomposición:

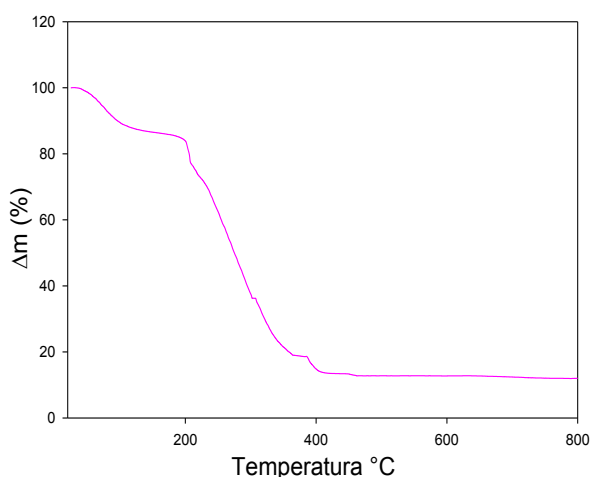
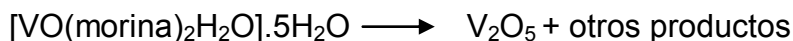
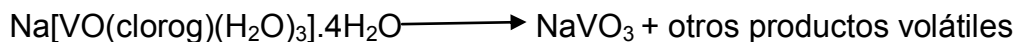


Figura 7. Curva termogravimétrica (TGA) de VOMorina en atmósfera de O₂.

En la descomposición térmica (Figura 8) del complejo VOclorog se observan dos etapas: la primera etapa correspondería a la pérdida de 4 moléculas de agua y ocurre en el rango de temperatura 20-120 °C ($\Delta m_{\text{exp.}}$ =12,40%; $\Delta m_{\text{calcd.}}$ =12,69%) y la segunda etapa pertenecería a la pérdida de 3 moléculas de agua de coordinación y ocurre en el rango de temperatura 120-200 °C ($\Delta m_{\text{exp.}}$ =10,20%; $\Delta m_{\text{calcd.}}$ =9,52%). El residuo final obtenido a 800°C fue caracterizado por espectroscopía infrarroja como NaVO₃. El peso del residuo final fue 21,11 % y está de acuerdo con el valor teórico (21,51%).

Reacción de descomposición:



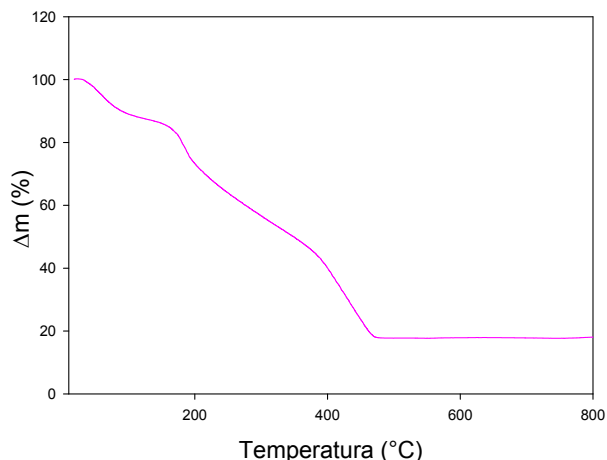


Figura 8. Curva termogravimétrica (TGA) de VOclorog en atmósfera de O₂.

3.1.3.2. Espectros de reflectancia difusa

A continuación se presentan los datos obtenidos para los espectros de reflectancia difusa de los complejos preparados. En líneas generales las posiciones de las bandas concuerdan con las esferas de coordinación propuestas para cada uno de ellos¹⁸.

En la Figura 9 se muestra el espectro de reflectancia difusa de VOcrisina, se observa un hombro en 580 nm y una banda en 650 nm.

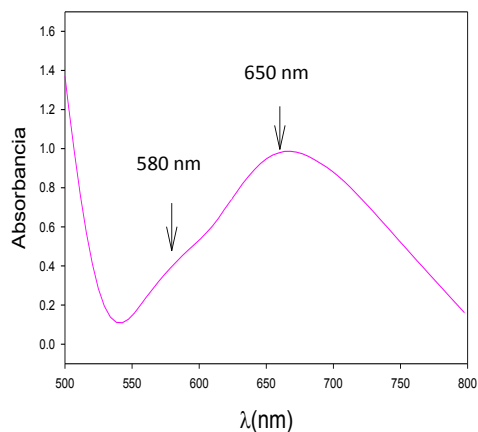


Figura 9. Espectro de reflectancia difusa de VOcrisina.

¹⁸ V. Uivarosi, S. F. Barbuceanu, V. Aldea, C. C. Arama, M. Badea, R. Olar, D. Marinescu, *Molecules* (2010) 15:1578-1589.

En la Figura 10 se muestra el espectro de reflectancia difusa de VOsilibinina. Se observan dos bandas, una localizada en 640 nm y la otra a una longitud de onda > 800 nm y un hombro en 603 nm, típicas de la coordinación del oxovanadio(IV) a centros oxigenados.

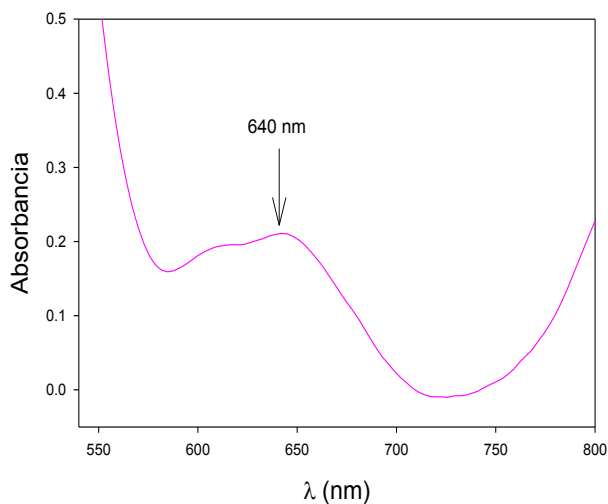


Figura 10. Espectro de reflectancia difusa de VOsilibinina.

En la Figura 11 se muestra el espectro de reflectancia difusa de VOMorina. Se observan dos bandas, una en 650 nm y la otra a una longitud de onda > 800 nm.

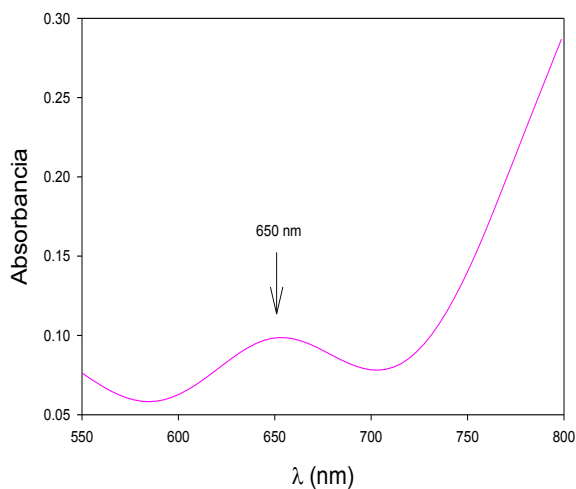


Figura 11. Espectro de reflectancia difusa de VOMorina.

En la Figura 12 se muestra el espectro de reflectancia difusa de VOclorog. Se observa una banda bien definida en 483 nm y otra banda ancha cuyo máximo

aparece en 750 nm. Con la finalidad de realizar una mejor asignación de ésta última, se procede a su fiteo y deconvolución para determinar las bandas que componen la misma. Así puede observarse en la Figura 12 B la presencia de dos componentes localizadas a 689 nm y 764 nm. El complejo muestra un típico patrón de 3 bandas característico para la coordinación de oxovanadio(IV) con grupos dioles adyacentes^{19,20,21}.

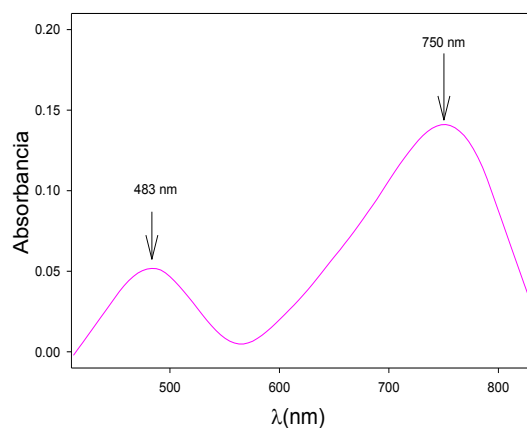


Figura 12. (A) Espectro de reflectancia difusa de VOclorog.

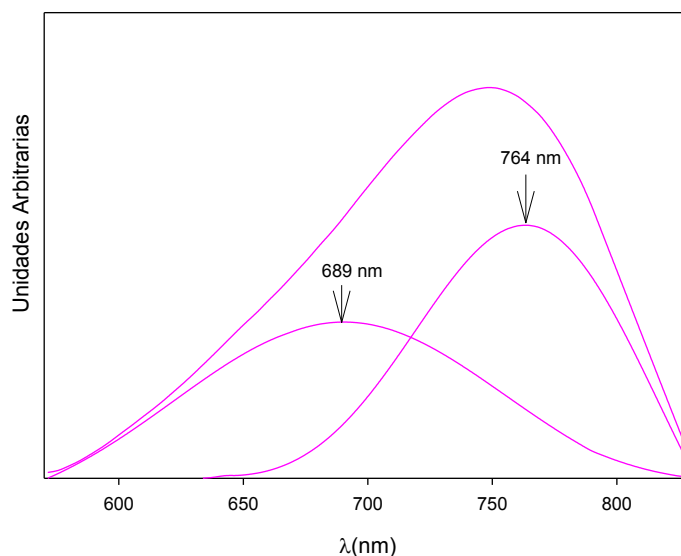


Figura 12. (B) Fiteo y deconvolución de la banda en la región de 570-820nm.

¹⁹ S. B. Etcheverry, P. A. M. Williams, E. J. Baran, J. Inorg. Biochem. (1996) 63:285-289.

²⁰ S.B. Etcheverry, D.A. Barrio, J. Zinzuk, P.A.M. Williams, E.J. Baran, J. Inorg. Biochem. (2005) 99:2322-2327.

²¹ E.J. Baran, J. Carbohydr. Chem. (2001) 20:769-788.

3.1.3.3. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

3.1.3.3.1. Aspectos generales

En este apartado se discutirán las bandas características que pueden observarse en el espectro FTIR tanto de los ligandos utilizados como de los complejos sólidos preparados. Las asignaciones a los modos de frecuencias característicos para estas bandas se han realizado por comparación con resultados previos y con datos de la literatura.

En el caso de los flavonoides, tomaremos como referencia para la discusión las bandas mencionados en la sección 1.7.2. del capítulo I donde las mismas se discutieron con detalle. Además, tendremos presente lo mencionado como indicio de interacción con el centro metálico, donde la disminución en la frecuencia de estiramiento del grupo ($\nu(\text{C}=\text{O})$) indicaría que existe coordinación entre el metal y ese grupo posiblemente en conjunto con el grupo 3-OH ó 5-OH desprotonado del flavonoide^{22,23}.

3.1.3.3.2. Espectros infrarrojos de ligandos y complejos

La banda en el espectro infrarrojo de la crisina (Figura 13, Tabla1) correspondiente al modo de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ aparece en 1665 cm^{-1} y se corre 36 cm^{-1} a menores números de onda por complejación, lo que indicaría que la longitud de ese enlace aumenta cuando la crisina se coordina con el oxovanadio(IV). La desprotonación y coordinación del grupo OH (posición 5 del anillo A) se pone de manifiesto por la presencia de las bandas relacionadas al mismo en 1596 , 1351 y 1247 cm^{-1} . Las modificaciones en los modos de estiramiento de los anillos A y C se detectaron por los desplazamientos de las bandas a 1616 y 1360 cm^{-1} indicando una alteración de la estructura del anillo. La banda correspondiente al modo relacionado a la vibración del anillo B localizada en 1097 cm^{-1} no se presenta afectada por la complejación. La posición de la banda de estiramiento típica $\nu(\text{V}=\text{O})$ se detecta en 968 cm^{-1} siendo la posición de la misma acorde a la coordinación del centro metálico con especies oxigenadas.

²² J.H. Looker, W.W. Hanneman, J. Org. Chem. (1962) 27:381-389.

²³ D. Lin Vien, N.B. Colthup, W.F. Fateley, J.G. Grasselli, Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, inc, Boston (1991).

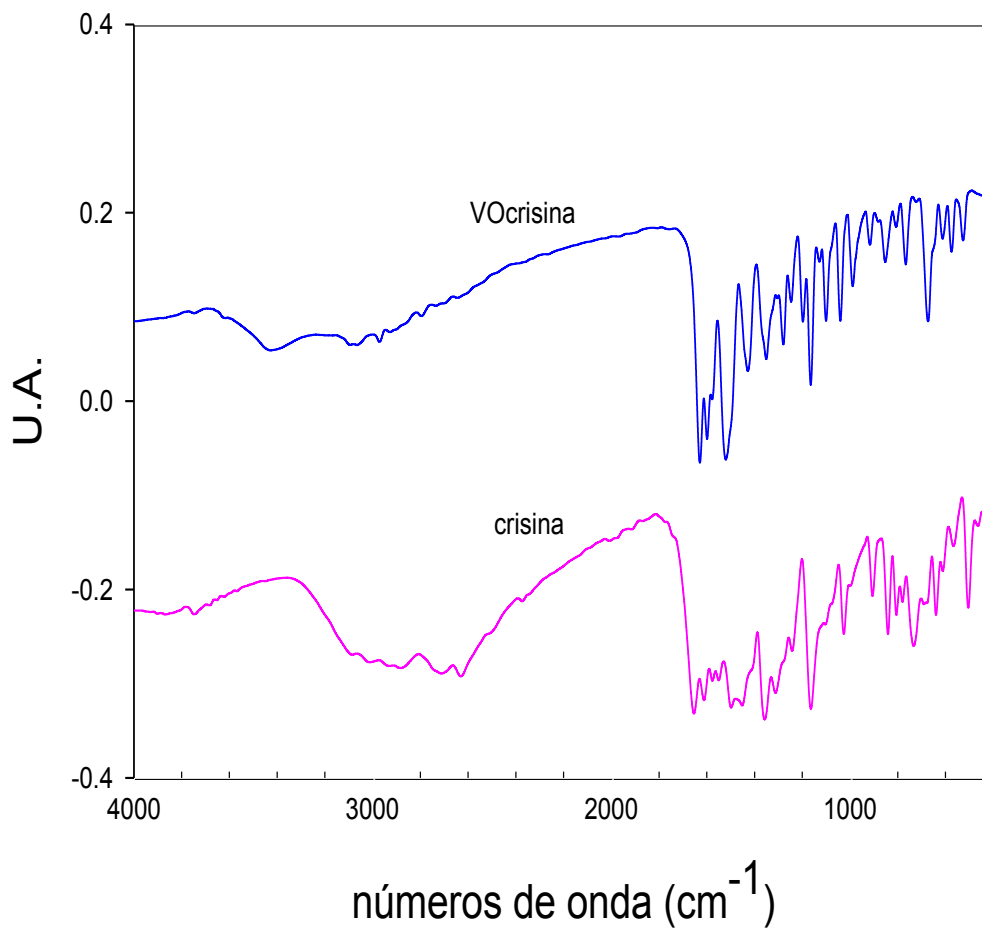


Figura 13. Espectro FTIR de crisina y VOcrisina.

Crisina	VOcrisina	Asignaciones tentativas
1665 mf	1629 f	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1616 f	1596 f	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}2=\text{C}3) + \text{estiramiento anillo A}$
1580 m		$\delta(5\text{OH}) + \delta(7\text{OH}) + \text{estiramiento anillo A}$
1490 m	1520 mf	anillo B + $\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
1450 m	1426 f	$\delta(7\text{OH}) + \delta(\text{C}8\text{H})_{\text{en el plano}}$
1362 mf	1351 f	Anillo A + estiramiento anillo C + $\delta(5\text{OH}) + \delta(7\text{OH})$
1239 m	1247 m	$\delta(\text{C}3\text{H})_{\text{en el plano}} + \delta(5\text{OH}) + \delta(7\text{OH})$
1167 mf	1162 mf	Anillo B + $\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
1097 m	1092 m	$\delta(\text{COC})_{\text{en el plano}} + \delta_{\text{en el plano}}(\text{CH})$
1034 m	1034 m	$\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
	968 m	$\nu(\text{V}=\text{O})$

Intensidades relativas de las bandas: mf=muy fuerte, f=fuerte, m=mediana

Tabla 1: Asignaciones (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de crisina y su complejo con $\text{V}(\text{IV})\text{O}^{2+}$.

En el espectro infrarrojo de la silibinina (Figura 14, Tabla 2) se observan las bandas correspondientes a la vibración del grupo carbonilo localizada en 1635 cm^{-1} y las bandas de absorción relacionadas con las vibraciones C=C en los anillos benceno, lignano y pirona, que aparecen en 1598 , 1511 y 1465 cm^{-1} , respectivamente²⁴.

Cuando el ligando interactúa con el metal se observa que la banda correspondiente al estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ se corre a menores frecuencias (1611 cm^{-1}), lo que indicaría que la coordinación, probablemente, involucra este grupo así como el grupo OH ubicado en la posición 3 del anillo denominado C ó el ubicado en la posición 5 del anillo denominado A en la estructura representativa del flavonoide (Figura 2)²⁵. En el espectro, la banda que representa al modo de estiramiento $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ se desplaza levemente hacia menores frecuencias lo que sugeriría una débil alteración de la estructura del anillo y ausencia de interacción del átomo de oxígeno del anillo designado como C con el centro metálico. La probabilidad de interacción vía grupos OH se refuerza con las siguientes observaciones: (i) existen en el espectro del complejo cambios en la posición y en las intensidades de las bandas de silibinina asociadas con los modos de deformación de los grupos $\delta(3\text{-OH, anillo C})$ y $\delta(5\text{-OH, anillo A})$, (ii) uno de ellos se encuentra desprotonado y coordinado a pH 9 que es el pH utilizado para la síntesis del complejo y, finalmente, (iii) la banda correspondiente al modo de estiramiento $\nu(\text{C}-\text{O})$ asociada a la presencia de un alcohol primario en el ligando (1029 cm^{-1}), disminuye su intensidad por desprotonación (los alcoholes primarios se desprotonan a menor pH que los secundarios). La posición de la banda de estiramiento $\nu(\text{V}=\text{O})$ en 945 cm^{-1} es típica de la coordinación de vanadio con especies oxigenadas⁵.

En conclusión, se sugiere que cada ligando adquiere una doble carga negativa y el complejo se precipita como sal de sodio para neutralizar el complejo aniónico obtenido en concordancia con los resultados obtenidos por medio de los análisis elementales.

²⁴ C.M. Popescu, G. Singure, M.C. Popescu, C. Vasile, D.S. Argyropoulos, S. Willför, Carbohydr. Polym. (2009) 77:851-857.

²⁵ E.G. Ferrer, M.V. Salinas, M.J. Correa, L. Naso, D.A. Barrio, S.B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2006) 11:791-801.

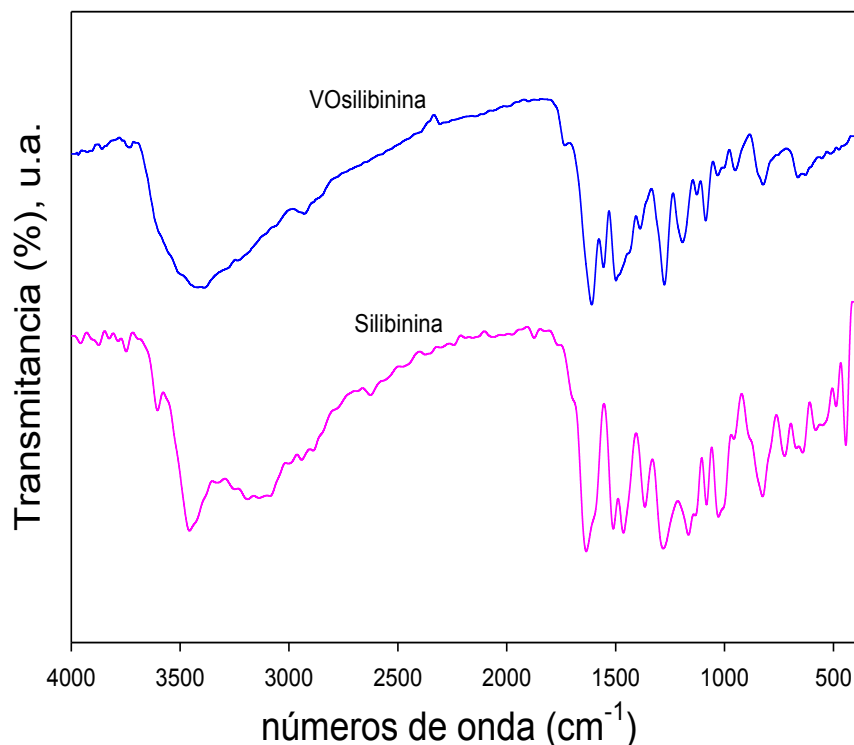


Figura 14. Espectro FTIR de silibinina y VOsilibinina.

Silibinina	VOsilibinina	Asignaciones tentativas
3459 f	3398 m	$\nu(\text{OH})$
2943 m	2955 h, 2926 d	$\nu(\text{O-CH}_3)$
1635 mf	1637 h, 1611 f	$\nu(\text{C=O})$
1598 h	1556 m	$\delta(\text{OH})$
1511 f	1505 f	$\nu(\text{anillo fenilo})$
1465 f	1467 m	$\nu(\text{anillo fenilo}) + \delta(\text{OH})$
1438 m	1439 h	$\delta(\text{CH})_{\text{aromático}}$
1366 f	1373 m	Anillo A + Estiramiento C trigonal + $\delta(3\text{-OH})$ + $\delta(5\text{-OH})$
1281 f	1309 h, 1275 mf	$\nu(\text{C-O-C})$
1240 h	1214 h	$\delta(3\text{-OH}) + \delta(5\text{-OH})$
1188 h	1177 m	$\nu(\text{CO})$
1164 f	1162 h	Anillo B + $\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
1130 m	1126 m	$\nu(\text{CO}) + \delta(\text{CH})_{\text{aromático}}$
1082 m	1089 m	$\delta(\text{COC})_{\text{en el plano}} + \delta(\text{CH})_{\text{en el plano}} + \nu(\text{CO})_{\text{alcohol secundario}}$
1029 m	1030 d	$\nu(\text{CO})_{\text{alcohol primario}}$
	945 m	$\nu(\text{V=O})$

Intensidades relativas de las bandas: mf: muy fuerte, f: fuerte, m: media, d: débil, md: muy débil, h: hombro.

Tabla 2: Asignaciones (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de silibinina y su complejo con V(IV)O^{2+} .

En la Tabla 3 se observan las asignaciones de las principales bandas (en cm^{-1}) del espectro infrarrojo para la morina y su complejo con oxovanadio(IV). Los espectros FTIR fueron registrados en la región entre 400-4000 cm^{-1} (Figura 15).

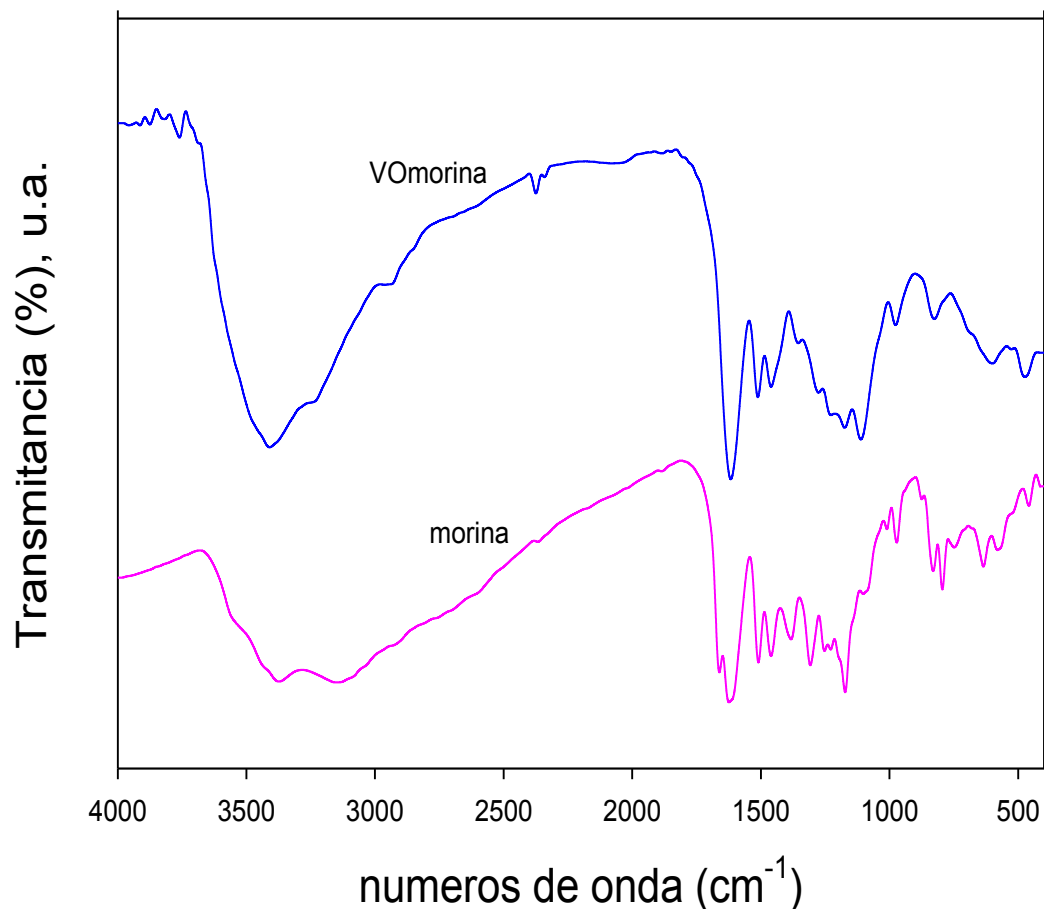


Figura 15. Espectros FTIR para VOMorina y morina.

morina	VOMorina	Asignaciones probables
3371a, 3142a	3411a	$\nu(\text{OH})$
1661m	1637h	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1624mf	1618mf	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{anillo aromático}}$
1612h	1594h	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{anillo aromático}} + \nu(\text{C}-\text{O})_{\text{as}} + \delta(5\text{OH}) + \delta(7\text{OH})$
1509f	1510m	$\delta_{\text{en el plano}}(\text{CH})$
1460f	1457m	$\delta(7\text{OH}) + \delta_{\text{en el plano}}(\text{C8H})$
	1424 h	$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{s}}$
1382m	1357md	$\delta(\text{C}-\text{OH})$
1252d	1271h	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$
1228d	1229h	$\delta_{\text{en el plano}}(\text{C3H}) + \delta(5\text{OH}) + \delta(7\text{OH})$
1172mf	1173d	Anillo B + $\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
1102md, 1085h	1108d	$\delta(\text{COC})_{\text{en el plano}} + \delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
1010d, 973d		$\delta_{\text{en el plano}}(\text{CH})$
	979a	$\nu(\text{V}=\text{O})$
971m		$\delta(\text{C}-\text{H})$

Intensidades relativas de las bandas: mf= muy fuerte, f=fuerte, m=media, d=débil, md=muy débil, h=hombro, a=ancha .

Tabla 3: Asignaciones (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de morina y su complejo con V(IV)O^{2+} .

En la morina, la banda característica del grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ aparece en 1661 cm^{-1} , mientras que en el complejo aparece en 1637 cm^{-1} . Este desplazamiento de 24 cm^{-1} hacia menores números de onda, debido al aumento de la longitud del enlace $\text{C}=\text{O}$ sugiere que la coordinación se llevará a cabo a través del átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Además, las bandas asociadas con los modos de deformación vibracional de los grupos OH reducen su intensidad o se modifican luego de la desprotonación y/o coordinación con el oxovanadio(IV). En la literatura se asignan las bandas localizadas en 1550 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} a los modos de estiramiento C-O antisimétrico y simétrico en el sitio de quelación²⁶. En el complejo VOmorina, la banda a 1550 cm^{-1} se encuentra superpuesta con la banda ancha en 1600 cm^{-1} , mientras que la banda de 1424 cm^{-1} se observa como un hombro.

Estos resultados sugieren que la coordinación con el metal sería, probablemente, a través del oxígeno del grupo carbonilo y los grupos OH desprotonados localizados en posición 5 ó 3 de la morina. Se ha observado en el complejo VOquercetina un cambio similar de la banda de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ hacia menores números de onda²⁷. El espectro electrónico indicaría que el grupo OH ubicado en posición 3 estaría involucrado en la coordinación. Debido a que la banda asignada al modo de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{C})$ se modifica poco por complejación indicaría la insignificante participación de los 2 anillos. Debido a que la banda $\nu(\text{COC})$ cambia levemente por complejación se sugiere que el átomo de oxígeno del anillo no interacciona con el catión oxovanadio(IV)²⁸. La banda de estiramiento que se presenta ancha y aparece en el rango de $3690\text{-}2390\text{ cm}^{-1}$ correspondería al modo $\nu(\text{OH})$, pero también se la suele asignar como perteneciente a moléculas de agua de cristalización.

Los espectros FTIR para el ácido clorogénico, su sal sódica y el complejo VOclorog se muestran en la Figura 16. Los números de onda, intensidades relativas y asignaciones de las bandas FTIR correspondientes al ácido clorogénico, su sal de sodio y su complejo con oxovanadio(IV) se observan en la Tabla 4. Las asignaciones espectrales fueron hechas en base a los datos encontrados en la literatura^{29,30,31,32,33,34,35,36}.

²⁶ J.P. Cornard, J.C. Merlin, J. Inorg. Biochem. (2002) 92:19-27.

²⁷ E.G. Ferrer, M.V. Salinas, M.J. Correa, L. Naso, D. A. Barrio, S.B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2006) 11:791-801.

²⁸ Q.K. Panhwar, S. Memon, M.I. Bhangar, J. Mol. Struct. (2010) 967:47-53.

²⁹ R. Swisłocka, Spectrochim. Acta Part. A (2012). En prensa.

³⁰ Y. Allegretti, E.G. Ferrer, A.C. González Baró, P.A.M. Williams, Polyhedron (2000) 19:2613-2619.

³¹ M. Menelaou, C. Mateescu, H. Zhao, N. Laloti, A. Salifoglou, Polyhedron (2009) 28:883-890.

³² J. P. Cornard, C. Lapouge, J. Phys. Chem. A (2004) 108:4470-4478.

³³ A. Horn, C.A.L. Filgueiras, J.L. Wardell, M.H. Herbst, N.V. Vugman, P.S. Santos, J.G.S. Lopes, R.A. Howie, Inorg. Chim. Acta 357 (2004) 357:4240-4246.

³⁴ N.A. Illán-Cabeza, M.N. Moreno-Carretero, J. Costa Pessoa, Inorg. Chim. Acta (2005) 358:2246-2254.

³⁵ G. Santoni, D. Rehder, J. Inorg. Biochem. (2004) 98:758-764.

³⁶ R.M. El-Abassy, P. Donfack, A. Materny, Food Chem. (2011) 126:1443-1448.

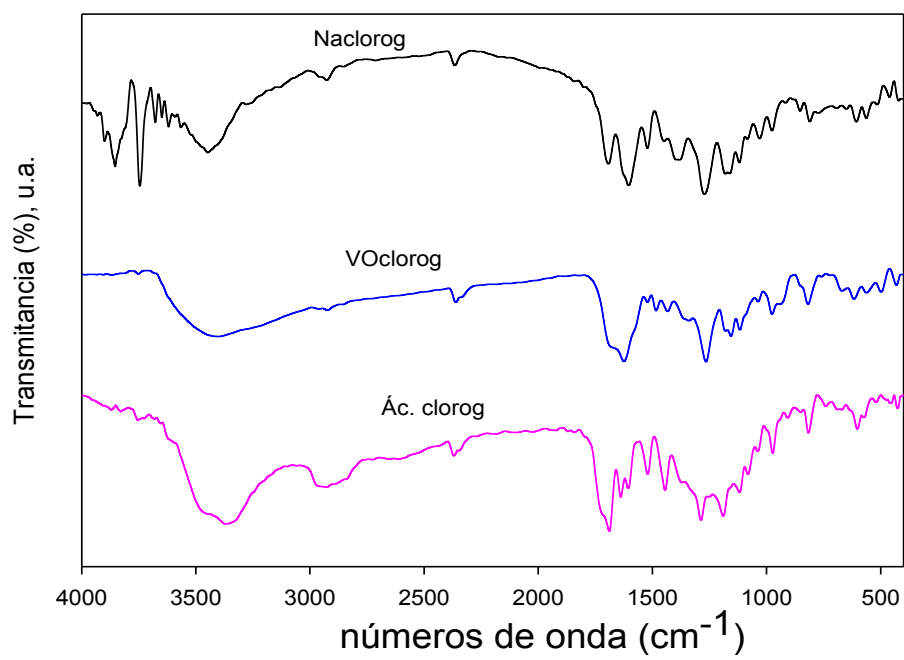


Figura 16. Espectros FTIR de ácido clorogénico, NaClorog y VOClorog.

Ácido clorogénico	Naclorog	VOclorog	Asignaciones probables
3364a			Uniones de H de las formas diméricas del ácido
3468h	3448a	3402a	$\nu(\text{OH})_{\text{arilo}}$
2967m	2962d	2967d	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{etileno}}$
2924m	2924d	2924d	$\nu(\text{C}-\text{H})$
1717h			$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}$
1689mf	1690f	1689f	$\nu(\text{C}=\text{O})$
	1597mf	1576h	$\nu(\text{COO})_{\text{as}}$
1638m	1635md	1624f	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{etileno}}$
1606m, 1522m, 1445f	1527f, 1465d	1522md, 1484d, 1433d	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{aromático}}$
1371h			$\nu(\text{C}=\text{C}) + \delta(\text{C}-\text{H})$
	1383f	1363m	$\nu(\text{COO})_{\text{s}}$
1331h	1324 m	1340h	$\beta(\text{C}-\text{H})_{\text{C}=\text{C}} + \beta(\text{C}-\text{H}) + \nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenolato}}$
1287f	1287 h		$\nu(\text{C}-\text{OH}) + \delta(\text{C}-\text{OH})$
	1273 f	1265 mf	$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenolato}}$
1191f	1177mf	1180h	$\delta(\text{C}-\text{OH}) + \beta(\text{C}-\text{H})$
	1145md	1156m	$\delta(\text{C}-\text{OH}) + \beta(\text{C}-\text{H})$
1120d, 1081d, 1039d	1119m, 1081m, 1034m	1117d, 1086h, 1037md	$\beta(\text{C}-\text{H})$
973m	969m	976m	$\gamma(\text{C}-\text{H})_{\text{C}=\text{C}} + \gamma(\text{C}-\text{H})$
		945f	$\nu(\text{V}=\text{O})$
907d	925d	921h	$\delta(\text{C}-\text{OH})$
852md	843d	871h	$\gamma(\text{C}-\text{H})$
816m	811m	818m	$\beta(\text{C}=\text{O})$
740md	720md	760md	$\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CCC})$
		666md	$\nu(\text{V}-\text{O})_{\text{fenolato}}$

Intensidades relativas de las bandas: mf: muy fuerte, f: fuerte, m: media, d: débil, md: muy débil, h: hombro.
 β , modo de unión en el plano; α , modo de unión del anillo aromático en el plano; γ , modo de unión fuera del plano.

Tabla 4. Asignaciones (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de ácido clorogénico y su complejo con V(IV)O^{2+} .

En primera instancia se esperaría la interacción del ácido clorogénico vía su grupo carboxilato con el metal. Generalmente tanto en la formación de la sal de sodio como en la formación de complejos metálicos se espera que la banda correspondiente al modo de estiramiento $\nu(\text{COOH})$ del ligando libre se desdoble apareciendo dos nuevas bandas correspondientes al modo de estiramiento antisimétrico y simétrico del nuevo grupo carboxilato (COO^-). En nuestro caso se observa que en la sal de sodio esas bandas aparecen en 1597 cm^{-1} y 1383 cm^{-1} y en el complejo en 1576 cm^{-1} y 1363 cm^{-1} para los modos de estiramiento antisimétrico y simétrico respectivamente. El grupo carboxilato presenta diferentes formas de interactuar (monodentado, bidentado, puente, etc). Con la finalidad de analizar la posibilidad de alguna interacción con el catión oxovanadio(IV), se procede al cálculo de $\Delta\nu$, cuyo valor en comparación tanto con el obtenido para la sal de sodio como con datos previos de diferentes tipos de complejos permite sugerir la forma de coordinación. El valor $\Delta\nu$ ($\nu(\text{COO}^-)_{\text{as}} - \nu(\text{COO}^-)_{\text{s}}$) calculado en base a nuestras asignaciones es de 213 cm^{-1} similar al obtenido para la sal de sodio (214 cm^{-1}) lo que indicaría la presencia del grupo carboxilato en forma iónica de igual manera que en la sal de sodio.

Continuando con nuestro análisis, se puede también observar que la banda de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ no se modifica luego de la coordinación, aunque

disminuye su intensidad. Esto indicaría que el grupo C=O del éster no participa en la formación del complejo.

Surge entonces la necesidad de analizar los modos correspondientes a los grupos OH, observando en particular la aparición en el complejo y en la sal de sodio de una banda en la zona de 1273-1265 cm^{-1} la cual, de acuerdo a datos de la literatura, se asigna al modo de estiramiento $\nu(\text{C-O})_{\text{fenolato}}$. El corrimiento relativo de esta banda indicaría la complejación del anión con el oxovanadio(IV).

Otra alternativa que surge para verificar el modo de coordinación que se propone, consiste en la ubicación en el espectro de la banda relacionada al modo de estiramiento $\nu(\text{V=O})$. Generalmente la coordinación por grupo carboxilato exclusivamente la ubica alrededor de 990-980 cm^{-1} ⁸. El corrimiento de la misma hacia menores frecuencias da cuenta de la incorporación en la esfera de coordinación del metal de grupos que provocan un debilitamiento del enlace V=O.

Esto puede observarse para ligandos con mayor carácter de donador sigma como ocurre, por ejemplo, en el complejo entre el oxovanadio(IV) y el ácido glucurónico¹⁸ y también en aquellos compuestos de coordinación entre el oxovanadio(IV) y drogas antiinflamatorias no esteroideas como ibuprofeno, naproxeno y tolmetin³⁷, en los que la banda asociada a $\nu(\text{V=O})$ se ubica alrededor de los 930-940 cm^{-1} indicando que la coordinación ocurre a través de grupos OH desprotonados. En nuestro complejo ésta banda se localiza en 945 cm^{-1} correspondiéndose entonces a dicha posibilidad. También el espectro muestra la presencia de una banda a 666 cm^{-1} asignada al modo de estiramiento V-O fenólico. En base a lo discutido se puede plantear que posiblemente en la esfera de coordinación ecuatorial del oxovanadio(IV) se encuentren dos grupos Ar-O^- provenientes del ligando junto a 2 de las 3 moléculas de agua identificadas por termogravimetría.

3.1.3.4. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en estado sólido

Los espectros para VOcrisina se obtuvieron utilizando un polvo microcristalino a temperatura ambiente en banda X (Figura 17, espectro A).

La multiplicidad de líneas y el ancho del espectro alrededor de 3500 G se relacionan a la presencia de una especie dimérica con superposición de una especie monomérica (estructura hiperfina de especies de oxovanadio(IV) aisladas, abundancia del 100 % de núcleos de ^{51}V con $I=7/2$, identificadas como impurezas típicas de este tipo de espectros). Para la especie dimérica el espectro corresponde a un estado triplete, indicando la existencia de dos núcleos V(IV)O^{2+} interactuando con espín $1/2$ dando un estado singlete $S=0$ y un estado triplete $S=1$.

Las componentes paralelas y perpendiculares de ambos se superponen extensivamente debido a la similitud entre g_{\parallel} y g_{\perp} . El conjunto de líneas en la región perpendicular fueron separadas por el parámetro D (desdoblamiento a campo cero) (zero-field splitting), mientras que las líneas paralelas fueron

³⁷ S.B. Etcheverry, D.A. Barrio, A.M. Cortizo, P.A.M. Williams, J. Inorg. Biochem. (2002) 88:94-100.

separadas por 2D. Las transiciones $\Delta M_s = \pm 2$ características de los dímeros no se pudieron observar.

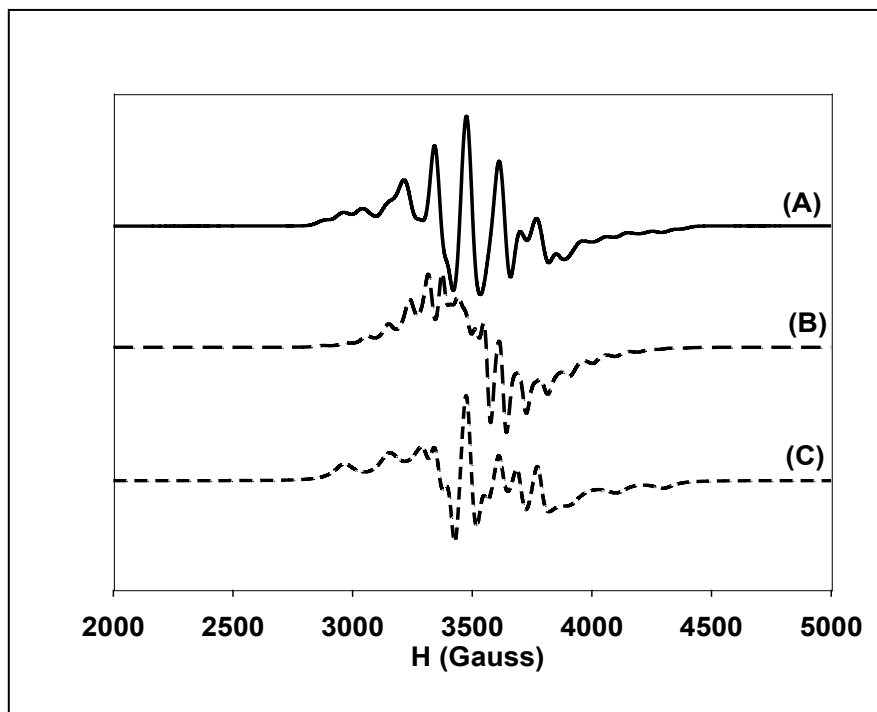


Figura 17. (A): Espectro experimental EPR del complejo VOcrisina sólido a temperatura ambiente, en banda X (9,87 GHz). (B): espectro calculado para la componente dimérica. (C): espectro calculado para la componente monomérica.

A pesar de la superposición de los diferentes componentes y del análisis espectral de la resonancia del dímero, los parámetros para el Hamiltoniano de espín de la contribución principal pueden ser estimados por comparación del espectro a temperatura ambiente con el generado por un programa de simulación trabajando con una teoría de perturbación de segundo orden.

Los parámetros calculados para el dímero fueron (Figura 17, simulación B):

$$\begin{aligned} g_{\parallel} &= 1,943, A_{\parallel} = 86 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ g_{\perp} &= 1,983, A_{\perp} = 32 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ D &= 80 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

y para la impureza monomérica resultaron (Figura 17, simulación C):

$$\begin{aligned} g_{\parallel} &= 1,943, A_{\parallel} = 173 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ g_{\perp} &= 1,983, A_{\perp} = 62 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

En el caso del dímero el valor obtenido para la constante de acoplamiento hiperfina resultó ser la mitad del valor del monómero de oxovanadio(IV) como se esperaba. Considerando la regla de aditividad, el valor de A_{\parallel} obtenido ($A_{\parallel} = 173,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) está de acuerdo con la presencia de un complejo de conformación *cis*-VOL₂(etanol) siendo el valor comparable con los reportados para complejos del tipo VO(IV)-maltol y sistemas relacionados. Por lo tanto, el plano ecuatorial estaría formado por dos grupos C=O, un grupo OH desprotonado (ArO^-) y una molécula de etanol ocupando la posición ecuatorial (Figura 18).

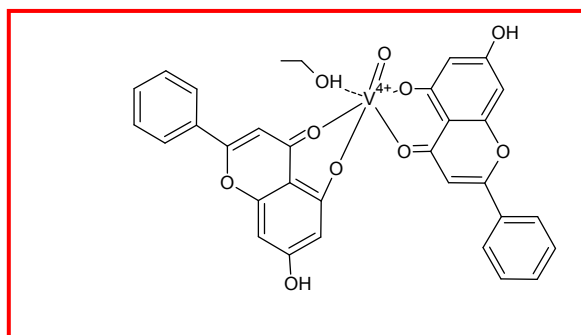


Figura 18. Probable estructura de VOcrisina (monomérico).

Debido a que no existe un monocristal del complejo sintetizado, no se puede determinar por esta técnica el modo de unión de los iones oxovanadio(IV) en el dímero. Por lo tanto, nos basamos en el espectro de EPR (estado de triplete, $S=1$) para proponer que VOcrisina es un dímero.

Los factores que apoyan la estructura propuesta son:

-La concordancia entre el espectro experimental A (dímero) y el espectro calculado para especies monoméricas (espectro C) es mejor que la del espectro A con el B (espectro calculado para la especie dimérica) en la parte central del espectro. En la región paralela del espectro en la zona de campo alto dicha superposición es mínima.

-La hipótesis del estado triplete $S=1$ con un desdoblamiento a campo cero significativo es la única posibilidad que permite una interpretación simultánea del desdoblamiento observado tanto en la banda X como en la banda Q, con el mismo grupo de parámetros.

Por otro lado, el valor similar de g tanto para las especies monoméricas como diméricas implica que ambos compuestos están estrechamente relacionados.

Las medidas de susceptibilidad magnética no revelan interacciones apreciables hasta 5 K. Pero, como es sabido, la técnica de EPR es muy sensible para la detección de interacciones magnéticas^{38,39} y la observación de un espectro triplete confirma el estado $S=1$. Por lo tanto, considerando el débil acoplamiento magnético detectado se debe tener en cuenta una vía de intercambio a través de

³⁸ A. Bencini, D. Gatteschi, EPR of exchange coupled systems. Springer, Berlin (1990).

³⁹ I. Unamuno, J.M. Gutiérrez-Zorrilla, A. Luque, P. Román, L. Lezama, R. Calvo, T. Rojo, Inorg. Chem. (1998) 37:6452-6460.

uniones covalentes. La dimerización está, probablemente, basada en puentes de hidrógeno, apilamiento π - π entre unidades adyacentes y/o interacciones O=V-O=V. La detección de estados triplete aislados en el EPR del sólido implica ausencia de ordenamientos magnéticos de largo alcance (cadenas, planos, arreglos 3 D).

Los espectros de VOsilibinina fueron registrados sobre muestras policristalinas en banda X a temperatura ambiente. Para este complejo, se observa un espectro típico de ocho líneas axiales relativamente bien resuelto indicando la presencia de un sitio paramagnético de ^{51}V ($I = 7/2$) señalando el predominio de una especie de oxovanadio(IV) mononuclear. En la Figura 19 se observa que el espectro simulado (Figura 19 (B)), con la finalidad de obtener los datos para los parámetros del Hamiltoniano de espín, concuerda razonablemente bien con el espectro experimental (Figura 19 (A)). Los parámetros g calculados para el Hamiltoniano de espín resultaron:

$$g_{\parallel} = 1,942 \text{ y } g_{\perp} = 1,976$$

y las constantes de acoplamiento hiperfino:

$$A_{\parallel} = 167,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \text{ y } A_{\perp} = 61 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

$$g_{\text{iso}} = 1,965, A_{\text{iso}} = 96,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

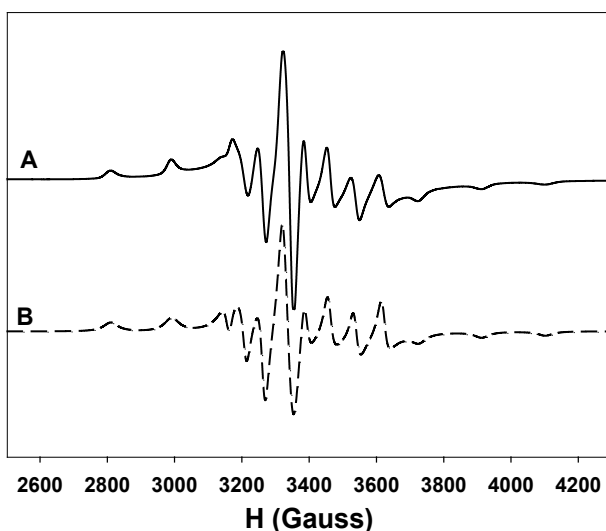


Figura 19. Espectros de EPR de VOsilibinina a temperatura ambiente y en banda X (9,742 GHz).
(A) experimental, (B) calculado.

Como mencionamos en la sección 2.12.4. la constante de acoplamiento hiperfino A se correlaciona con el número y tipo de ligandos presentes en el plano ecuatorial.

En nuestro caso, el valor de A calculado para la coordinación propuesta es

$166,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (dos grupos C=O, dos grupos ArO^-). El valor de A calculado se corresponde con el experimental, indicando que en el modo de enlace del complejo podrían estar involucrados dos átomos de oxígeno provenientes de los grupos C=O y otros dos provenientes de los dos grupos ArO^- desprotonados en el plano ecuatorial unidos a un centro de oxovanadio (IV) dando lugar a una estructura *trans*-VOL₂, típica de los compuestos con ligandos de tipo maltol (Figura 20).

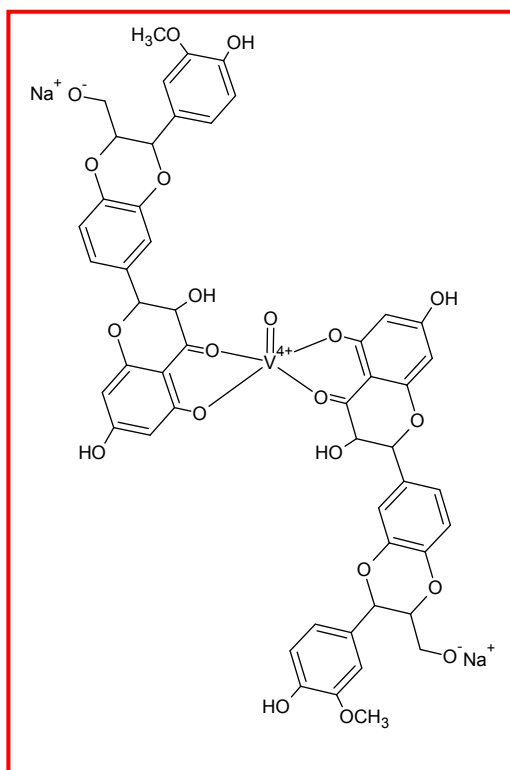


Figura 20. Estructura probable de VOsilibinina.

El espectro EPR de VOMorina fue medido a temperatura ambiente y se observó un patrón de desdoblamiento hiperfino de 8 líneas debido a la presencia de un electrón desapareado de un núcleo de ^{51}V ($I = 7/2$) indicando que predomina solo una especie mononuclear de oxovanadio(IV) en el complejo sólido. El espectro experimental y el simulado coinciden (Figura 21, A y B). La simulación predice que la señal observada del cromóforo de vanadio es consistente con el ion oxovanadio(IV) en un campo de ligandos axial o pseudoaxial.

Los parámetros para hamiltonianos de espín y las correspondientes constantes de acoplamiento hiperfino son:

$$\begin{aligned}
 g_{\parallel} &= 1,942; A_{\parallel} = 172 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\
 g_{\perp} &= 1,976; A_{\perp} = 67 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\
 (g_{\text{iso}} &= 1,965, A_{\text{iso}} = 102 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})
 \end{aligned}$$

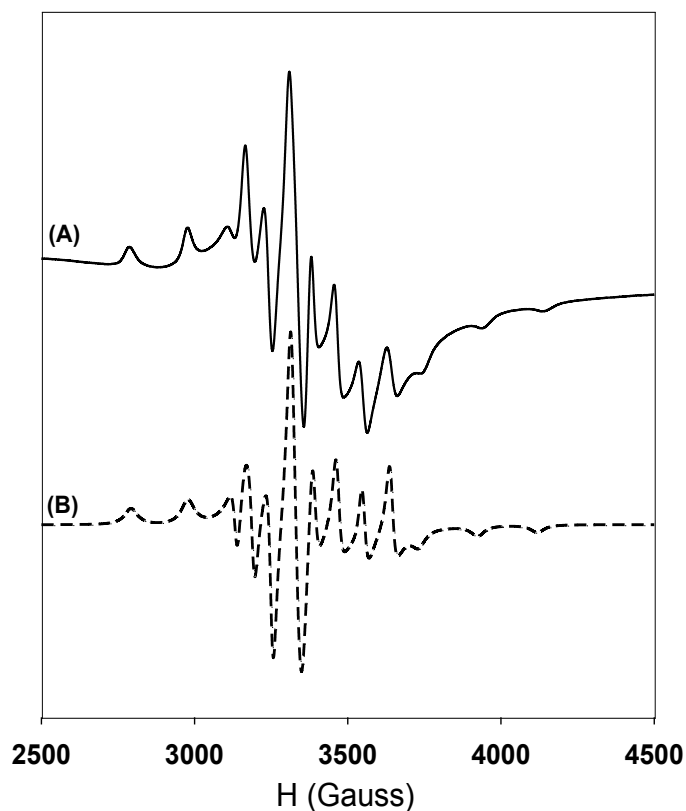


Figura 21. Espectro EPR de VOMorina medido en banda X (9,4006 GHz, 290 K). (A) experimental, (B) calculado.

Teniendo en cuenta el conjunto probable de donores, el valor de A_z calculado es de $173,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (considerando dos C=O, un ArO^- y una molécula de H_2O) el que se obtuvo utilizando los datos de literatura para cada grupo donador (ver sección 2.12.4)⁴⁰. El valor de A_z sugiere que en la esfera de coordinación del complejo se incluyen en el plano ecuatorial dos átomos de oxígeno de grupos C=O, un grupo ArO^- desprotonado, una molécula de agua unida al centro de oxovanadio(IV), dando la bien conocida estructura *cis*- $\text{VOL}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ observada en compuestos de tipo maltol⁹ (Figura 22).

⁴⁰ L. Naso, E.G. Ferrer, L. Lezama, T. Rojo, S.B. Etcheverry, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2010) 15:889-902.

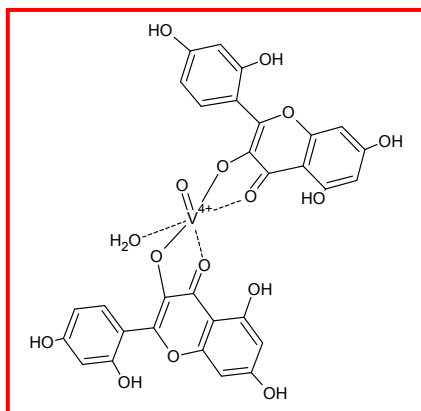


Figura 22. Estructura probable de VOmorina.

El espectro de VOclorog fue registrado en banda X a temperatura ambiente. La Figura 23 muestra un espectro característico para complejos de oxovanadio(IV) con estructura hiperfina detectable. La simulación de los espectros con el programa WINEPR SimFonia da lugar a los siguientes valores de los principales parámetros para el hamiltoniano de espín:

$$g_{\parallel} = 1,943; A_{\parallel} = 170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1};$$

$$g_{\perp} = 1,981; A_{\perp} = 61 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

$$(g_{\text{iso}} = 1,968, A_{\text{iso}} = 97,33 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$$

Las características del espectro experimental se asocian a la presencia de una especie monomérica de oxovanadio(IV) con simetría axial.

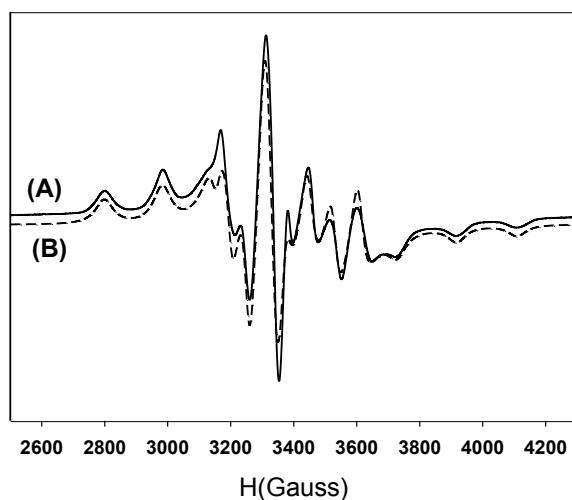


Figura 23. Espectro EPR de VOclorog en banda X a 290K. (A) experimental, (B) simulado.

Como se mencionó anteriormente, la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino es sensible a los átomos donores sobre la esfera de

coordinación ecuatorial del centro metálico. Utilizando la “regla de la aditividad” y suponiendo una coordinación como la planteada por espectroscopía FTIR con dos grupos Ar-O⁻ ($A_{||} = 2 \times 38,6$) y dos moléculas de agua ($A_{||} = 2 \times 45,7$)ⁱ en la esfera de coordinación con sus respectivas contribuciones, se calcula un valor de $A_{||} = 168,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ que concuerda, razonablemente bien, con el valor experimental proveniente de la simulación.

Tanto lo discutido por espectroscopía FTIR, reflectancia difusa, termogravimetría y lo obtenido por EPR, nos permite sugerir la presencia de este entorno en el plano ecuatorial del oxovanadio(IV) con la probable presencia de una tercera molécula de agua en posición axial (Figura 24).

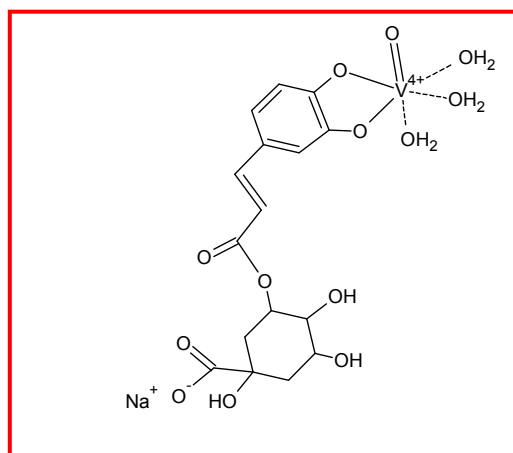


Figura 24. Estructura probable de VOclorog.

3.1.4. Estudios en solución

3.1.4.1. Espectros electrónicos: Generalidades

Como fuera discutido en la sección 1.7.1. del capítulo I, los espectros UV-vis de los flavonoides presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos (banda I, rango de 300-350 nm en el caso de las flavonas y entre 350 y 385 nm en el caso de flavonoles; banda II, se encuentra entre 250-290 nm y representa la absorción del anillo A (sistema benzoilo). En el transcurso de la discusión de sus espectros UV-vis luego de la interacción con el oxovanadio(IV) haremos referencia a los cambios que sobre las mismas se producen.

En cuanto al espectro UV-visible del ácido clorogénico, este presenta 2 picos máximos: la primera banda aparece en 217 nm con un hombro en 240 nm y la segunda banda se encuentra en 324 nm con un hombro en 296 nm. La banda en 324 nm se corresponde con la transición HOMO → LUMO presentando, principalmente, carácter $\pi\pi^*$ con localización de la densidad electrónica en el anillo bencénico y la cadena carbonada. En el otro pico y los hombros también están presentes las mismas transiciones $\pi\pi^*$ ⁴¹.

⁴¹ A. Belay, A.V. Gholap, African J. f Pure Appl. Chem. (2009) 11:234-240.

3.1.4.2. Espectros UV-vis

La crisina, como la mayoría de los flavonoides, exhibe dos bandas principales (I y II) de absorción en la región UV-vis.

Este flavonoide no posee un grupo hidroxilo (OH) en la posición 3 del anillo denominado C, por lo tanto la banda I aparece a menores longitudes de onda (20-30 nm) que la misma banda en flavonoles equivalentes. En la Figura 25 se observa el espectro UV-vis de una solución etanólica de crisina (4×10^{-5} M), en la que dicha banda aparece en una longitud de onda de 314 nm. Se observan, además, dos especies en equilibrio en los rangos de pH 2-8 y 10-12 con el consecuente corrimiento de la banda en el espectro electrónico. Para estudiar y comprender la formación de las diferentes especies en solución se hace necesario observar el comportamiento químico en función del pH del ligando en estudio. En la literatura se encuentran valores de pKa (medidos para este ligando en una mezcla etanol:agua (50% v/v))⁴² para los dos protones ionizables de crisina, siendo ellos $pK_1 = 7,9$ y $pK_2 = 11,40$, respectivamente.

Como se observa en la Figura 25, la forma protonada de crisina presenta un máximo en 314 nm que se corre hacia mayores longitudes de onda (365 nm) cuando el pH es superior a 8, dando lugar a la pérdida de un protón y formación de la especie crisina^{-1} . A medida que el pH se incrementa (utilizando NaOH 1 M) a valores mayores que 12, se observa la desaparición de la banda en 235 nm sugiriendo la pérdida de otro protón y la formación, en solución, de la especie crisina^{-2} .

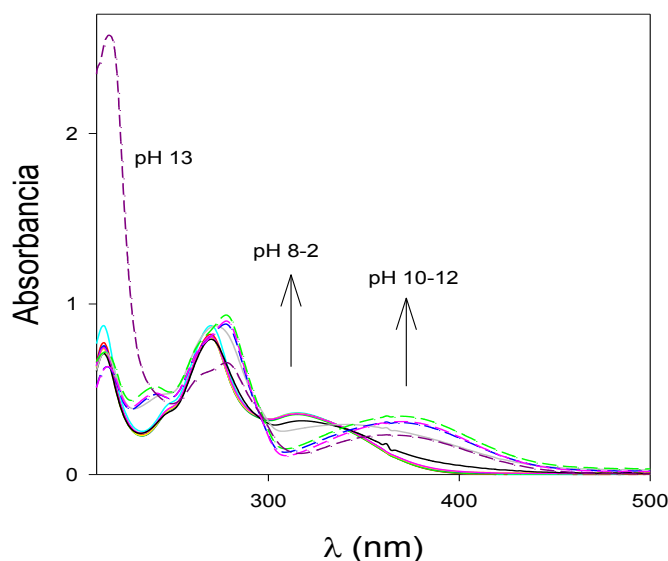


Figura 25. Espectro UV-vis de una solución etanólica de crisina (4×10^{-5} M) para diferentes valores de pH.

Cuando los ligandos básicos interactúan con ácidos de Lewis (como los metales de transición) su valor de pKa se reduce. Así por ejemplo la interacción de

⁴² M.D. Engelmann, R. Hutchison, I.F. Cheng, J. Agric. Food Chem. (2005) 53:2953-2960.

$V(IV)O^{2+}$ con crisina en solución produce dicho efecto observándose que la coordinación de crisina desprotonada con el catión $V(IV)O^{2+}$ se presenta a pH 5 (Figura 26).

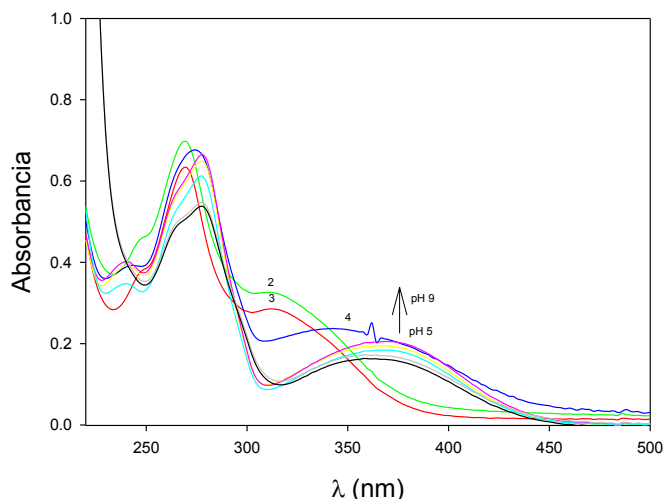


Figura 26.
Espectro de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (2×10^{-5} M)
y solución etanólica de crisina
(4×10^{-5} M) para diferentes valores de
pH.

Éste es el motivo por el cual se seleccionó dicho valor de pH para la preparación del complejo sólido. La posición de las bandas espectrales comparadas con la de crisina⁻¹ fueron levemente modificadas ubicándose en 242, 280 y 370 nm con corrimiento hacia el rojo (efecto batocrómico). Comparando con los sistemas previamente reportados, la banda localizada en 370 nm fue asignada a los grupos C=O (posición 4 del anillo C) y C-OH (posición 5 del anillo A), a través de los cuales el ligando actúa como agente quelante⁴³.

Para el sistema con silibinina, con finalidades comparativas de lo reportado previamente para el ligando se realiza el espectro electrónico de silibinina en solución etanólica (4×10^{-5} M, Figura 27) a diferentes valores de pH en atmósfera de nitrógeno para evitar procesos de oxidación. Los resultados obtenidos muestran que nuestros datos experimentales están de acuerdo con los datos reportados para una solución metanólica de silibinina⁴⁴ en la que no se observan cambios en el espectro electrónico de la misma entre un pH 2 y un pH 6, lo cual indicaría que la primer desprotonación esperada para un grupo OH ocurre por encima de ese valor de pH. A mayores valores de pH, la intensidad de la banda ubicada a 288 nm disminuye mientras que las de las bandas localizadas a 232 y 326 nm aumenta.

Dicho espectro se mantiene hasta pH 9, y por encima de ese valor, se observa un patrón espectral diferente lo que indicaría una segunda desprotonación. El comportamiento observado en el espectro electrónico es el esperado por comparación con los datos reportados para una solución acuosa de

⁴³ J. Pusz, B. Nitka, A. Zielńska, I. Wawer, Microchem. J. (2000) 62:245-253.

⁴⁴ M. Borsari, C. Gabbi, F. Ghelfi, R. Grandi, M. Saladini, S. Severi, F. Borella, J. Inorg. Biochem. (2001) 85:123-129.

silibinina, medidas a 25 °C y con una fuerza iónica de $I = 0,011 \text{ M}$, siendo los valores sucesivos de pK: 6,871; 8,938; 9,721 y 11,644, respectivamente⁴⁵.

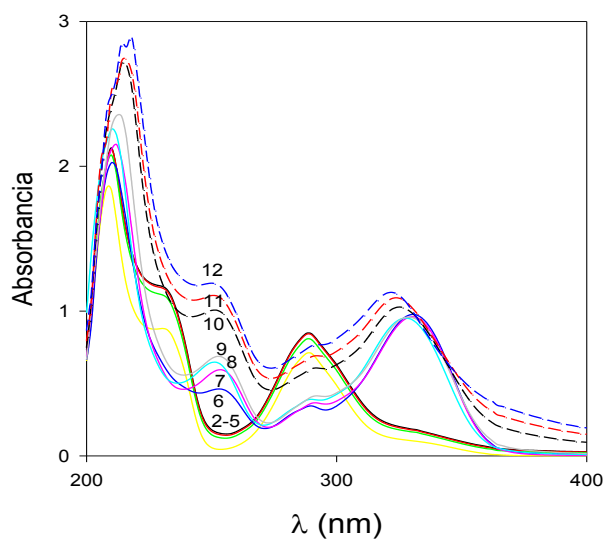


Figura 27.
Espectro UV-vis de una solución etanólica de silibinina ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) para diferentes valores de pH en atmósfera de nitrógeno.

En la Figura 28 se muestra como varía, con el aumento de pH, el espectro electrónico de una solución etanólica de silibinina/ V(IV)O^{2+} en relación 2:1.

Como puede observarse, la intensidad de la banda en 328 nm comienza a aumentar a pH por encima de 8. De acuerdo a lo discutido previamente este comportamiento indicaría que la interacción del metal con el ligando se inicia en esa etapa, por lo que se seleccionó un valor de pH de 9 para la realización de la síntesis del complejo.

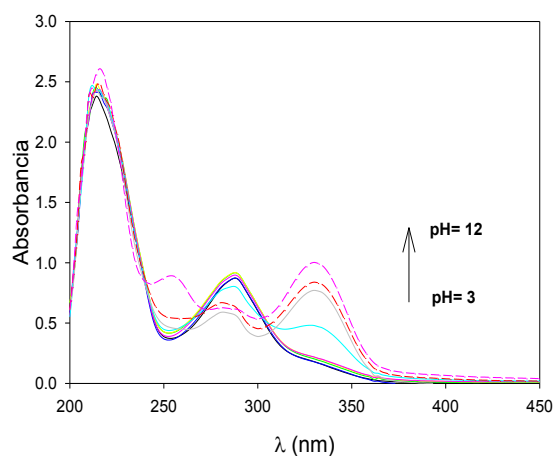


Figura 28.
Espectro UV-vis de $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) y silibinina ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) en etanol a diferentes valores de pH.

⁴⁵ M. Meloun, D. Burkonová, T. Syrový, A. Vrána, Anal. Chim. Acta (2003) 486:125-141.

Ya es conocido que la desprotonación de los grupos OH que forman parte de la estructura de los flavonoides juega un importante papel en la mejora de la acción antioxidante de los mismos⁴⁶.

El flavonol morina es parcialmente soluble en agua y sus valores de pKa no pueden determinarse en solución acuosa. J.M. Herrero-Martínez y colaboradores midieron los valores de pKa de morina para diferentes mezclas metanol/agua. Los 3 valores obtenidos en una solución metanólica (60 %) y con una fuerza iónica fisiológica ($I=0,15$ M) fueron $5,095 \pm 0,032$; $8,484 \pm 0,025$ y $10,366 \pm 0,032$. La primera ionización corresponde al grupo OH en posición 2'. Este hecho puede ser atribuido a la estabilización del anión por formación de un puente de hidrógeno intramolecular⁴⁷. Con el fin de confirmar la presencia de diferentes formas protonadas de morina se registraron los espectros UV-vis de dicho ligando en función del pH. Se muestra en la Figura 29 que los espectros cambian a pH 5, 9 y 10 de acuerdo con los datos reportados previamente.

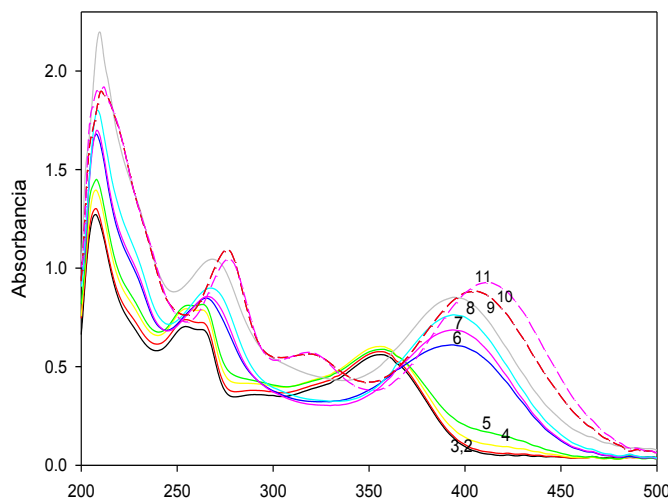


Figura 29.
Espectro UV-vis de una solución metanólica de morina (4×10^{-5} M) para diferentes valores de pH.

En la Figura 30 se muestra el espectro electrónico registrado para una solución metanólica de morina: $V(IV)O^{+2}$, en relación 2:1 a diferentes valores de pH con el fin de determinar a qué valor de pH el ligando comienza a interactuar con el centro metálico. A un valor de pH superior a 5, la banda localizada en 422 nm se ensancha, indicando que hay un cambio en los niveles electrónicos del

⁴⁶ K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zielínskians, E.M.F. Soffers, Ivonne M.C M. Rietjens, Free Radical Biol. Med. (2001) 31:869-881.

⁴⁷ J.M. Herrero-Martínez, C. Repollés, E. Bosch, M. Rosés, C. Ráfols, Talanta (2008) 74:1008-1013.

flavonoide. Por lo tanto, asumimos que la interacción de morina con $V(IV)O^{2+}$ comienza en ese punto.

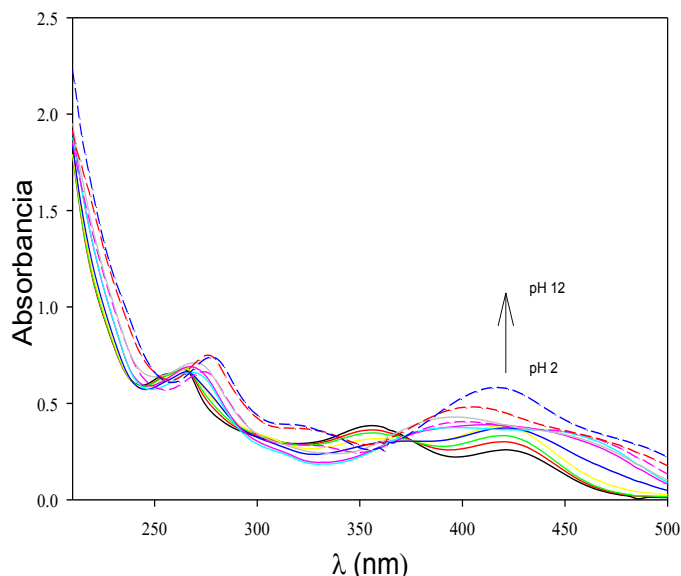


Figura 30.
Espectro UV-vis de $VOSO_4 \cdot 5H_2O$ (2×10^{-5} M) y solución metanólica de morina (4×10^{-5} M) para diferentes valores de pH.

El espectro electrónico de morina en metanol muestra dos bandas de absorción intensas (sección 3.3.1.) una centrada en 357 nm y la otra ubicada en 260 nm (Figura 31).

El espectro de $VOmorina$ muestra un desplazamiento hacia el rojo, en comparación con el espectro de morina (Figura 31). Este cambio batocrómico en ambas bandas de absorción es típico de la formación de complejos. Además, el gran cambio en la longitud de onda de la banda I ($\Delta\lambda = 66$ nm) se observó para otros complejos metálicos de flavonoides⁴⁸ y la nueva banda que aparece en 430 nm es asignada a la unión entre el metal y el grupo 3-hidroxicromona.

⁴⁸ P. Cornard, J.C. Merlin, J. Inorg. Biochem. (2002) 92:19-27.

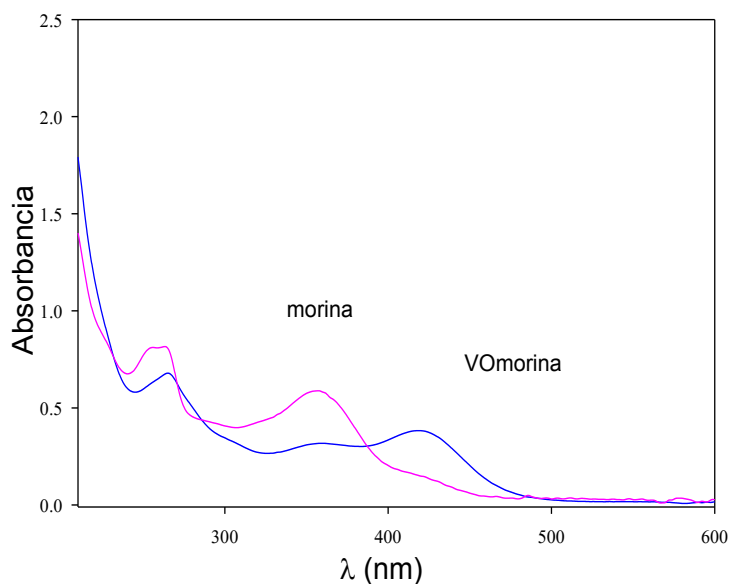


Figura 31. Espectro UV-vis de morina (4×10^{-5} M) y VOmorina (1:2, 2×10^{-5} M: 4×10^{-5} M) en metanol.

3.1.4.3. Titulación espectrofotométrica

La estequiometría de cada complejo formado en solución se determinó a través de una titulación espectrofotométrica. Cada titulación se realizó manteniendo constante la concentración de ligando (4×10^{-5} M) y variando la concentración del catión oxovanadio(IV), utilizando distintas relaciones M/L (0,5-10), en etanol absoluto, bajo atmósfera de N_2 y regulando el pH en el valor de síntesis.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los diferentes sistemas estudiados.

Para el sistema crisina/ $V(IV)O^{2+}$, se observa en la Figura 32 que la banda localizada en 242 nm sufre un incremento en su valor de absorbancia por los diferentes agregados de vanadilo. El complejo se forma a una relación ligando/metal 2:1 (Figura 33).

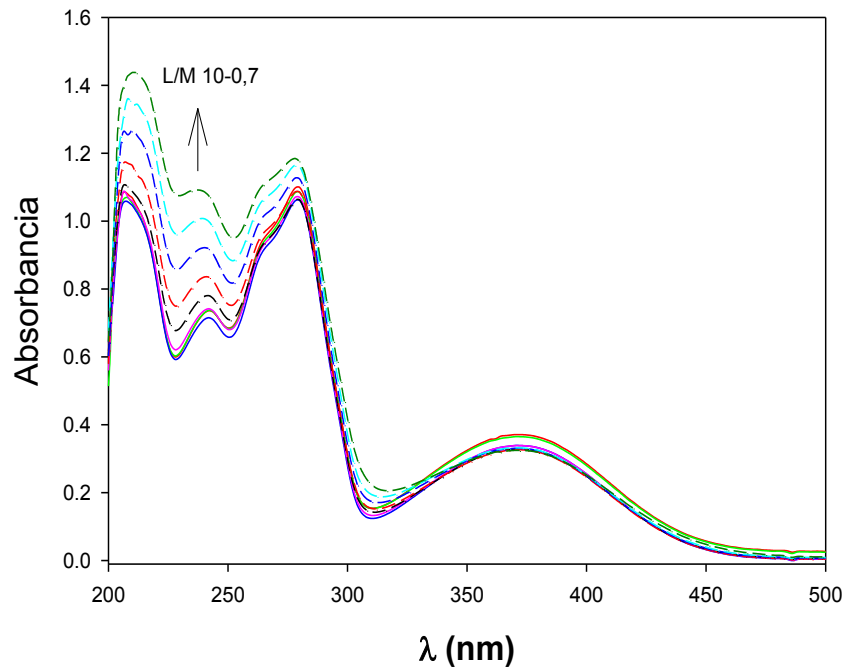


Figura 32. Espectro UV-vis de crisina (4×10^{-5} M) en etanol absoluto con la adición de $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,7) a pH 5 y bajo atmósfera de nitrógeno. La flecha indica aumento de la concentración de metal.

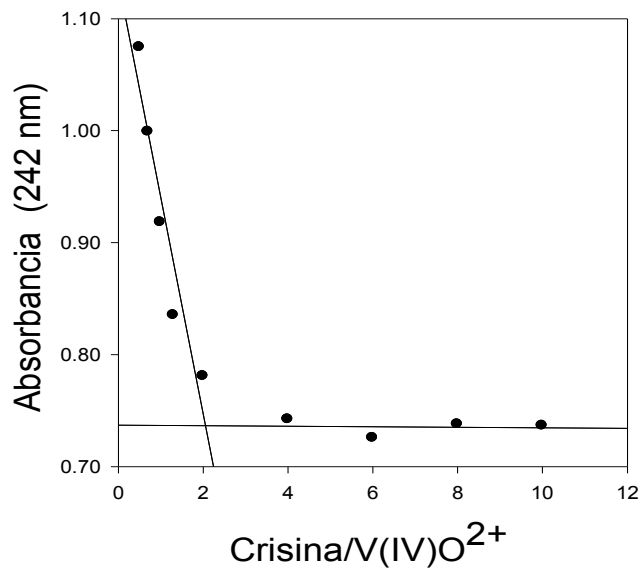


Figura 33. Determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema Crisina/V(IV)O²⁺ a 242 nm por el método de la razón molar (pH=5).

En el caso de silibinina/ $V(IV)O^{2+}$, la titulación espectrofotométrica se efectuó, fijando el pH en 9 y observando el aumento de la banda en 328 nm luego del agregado de distintos volúmenes de $V(IV)O^{2+}$ (Figura 34), obteniéndose por el método de la razón molar también en este caso una relación 2.1 para L:M (Figura 35).

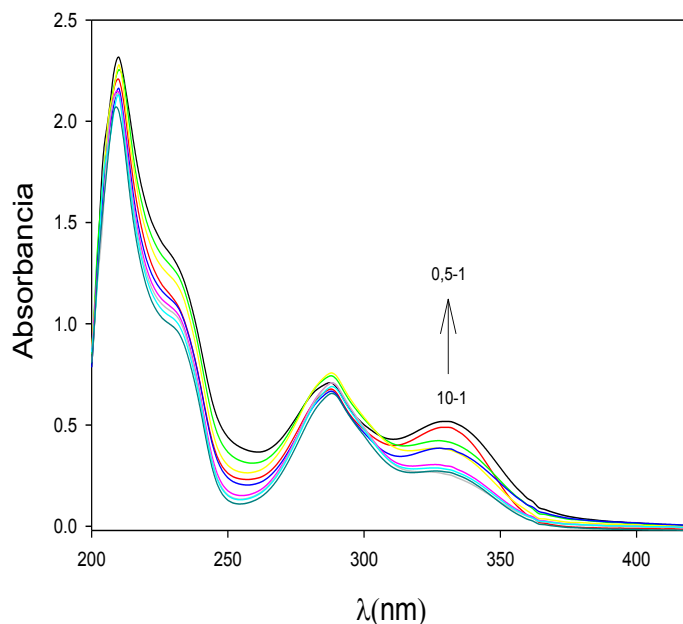


Figura 34. Espectro UV-vis en etanol absoluto de silibinina (4×10^{-5} M) con la adición en forma sucesiva de $VOCl_2$ pH=9, para la obtención de distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,5) bajo atmósfera de nitrógeno. La flecha indica aumento en la concentración de metal.

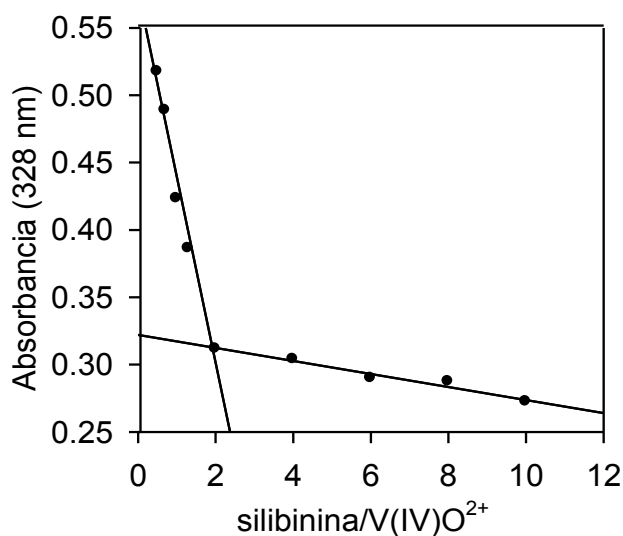


Figura 35. Determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema silibinina/ $V(IV)O^{2+}$ a 328 nm por el método de la razón molar (pH=9).

Completando la serie de los flavonoides, también se analiza el sistema morina/V(IV)O²⁺, efectuándose la titulación espectrofotométrica a pH 5 y observando el aumento de la banda en 422 nm luego del agregado de distintos volúmenes de vanadilo (Figuras 36 y 37).

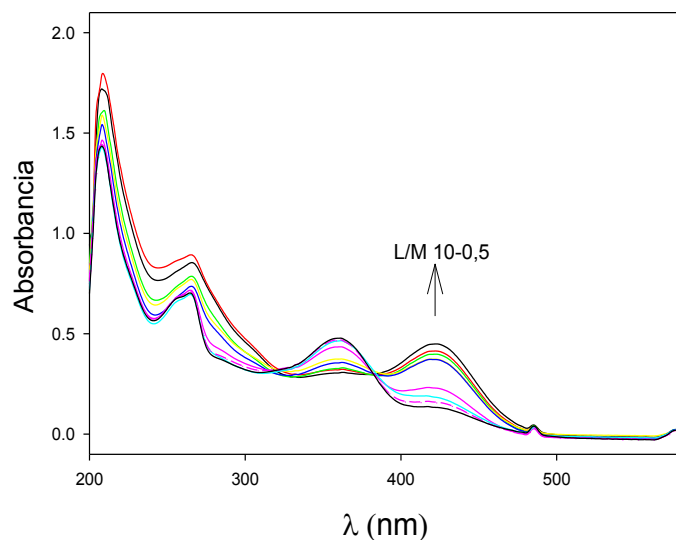


Figura 36. Espectro UV-vis de morina (4×10^{-5} M) con la adición de $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,5) a pH 5 y bajo atmósfera de nitrógeno. La flecha indica aumento de la concentración de metal.

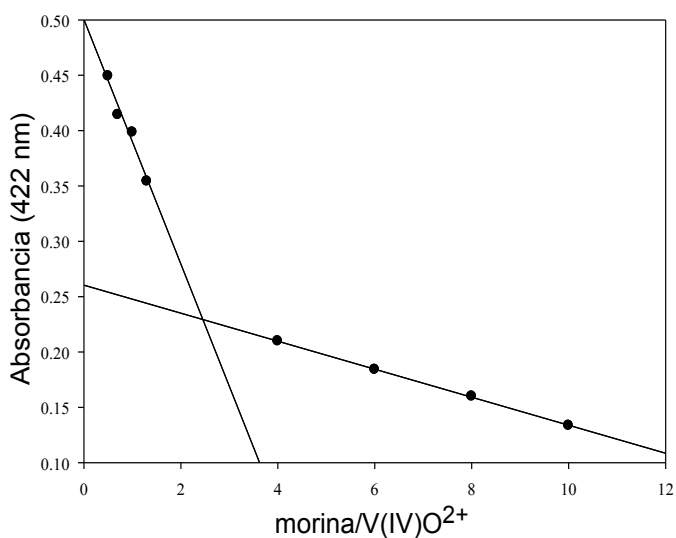


Figura 37. Determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema morina/V(IV)O²⁺ a 422 nm por el método de la razón molar.

3.1.4.4. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica (EPR)

La titulación espectrofotométrica puede ser seguida por espectroscopía EPR y de esta manera ayudar en la identificación de las diferentes especies de vanadio que pueden eventualmente formarse en solución. Por ese motivo y en las mismas condiciones que las utilizadas para los espectros UV-vis, se registraron los espectros a las distintas relaciones ligando/metal (L/M), en etanol, a pH 5 para el sistema crisina:V(IV)O²⁺ (Figura 38). Con la finalidad de comparar con la especie de oxovanadio(IV) sin complejar, se determinó el espectro EPR de una solución etanólica de VOSO₄.5H₂O (0,1M).

Para las relaciones L/M desde 8:1 a 1:1 se presenta un típico espectro de ocho líneas axiales relativamente bien resuelto indicando la presencia de un sitio paramagnético y con características de monómero correspondiente a sistemas con oxovanadio(IV)⁴⁹. Esto indicaría la formación de una sola especie en este rango de relaciones M/L utilizadas, indicada con el número (I) en la Figura 38.

En este caso la simulación del espectro predice para la especie (I), la formación de un centro de V cromóforo cuyos parámetros para el Hamiltoniano de espin están dados por:

$$g_z = 1,949, g_x = 1,975 \text{ y } g_y = 1,981$$

y sus correspondientes constantes de acoplamiento hiperfino:

$$A_z = 165,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_x = 53 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, \text{ y} \\ A_y = 62 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \text{ (} g_{\text{iso}} = 1,968, A_{\text{iso}} = 93,50 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}\text{)}$$

Para relaciones L/M menores que 1, se presentan 3 señales. Esto indica la existencia, en solución, de tres especies diferentes que coexisten de manera simultánea. Se procede entonces a la identificación de las mismas. Una de ellas se corresponde a la especie (I) identificada anteriormente. Las otras dos nuevas especies son indicadas como especies (II) y (III) respectivamente.

La señal asignada como (II) está relacionada a la presencia de V(IV)O²⁺ libre en etanol:

$$g_z = 1,930, g_x = 1,980, g_y = 1,980 \\ A_z = 183 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_x = 70 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_y = 70 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ \text{(} g_{\text{iso}} = 1,963, A_{\text{iso}} = 107,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}\text{)}$$

y la otra señal, asignada como (III), muestra la formación de una nueva especie paramagnética. La simulación de los tensores g:

$$g_z = 1,940, g_x = 1,9805 \text{ y } g_y = 1,979$$

y las constantes de acoplamiento hiperfino:

$$A_z = 177 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_x = 65 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}, A_y = 71,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ \text{(} g_{\text{iso}} = 1,966, A_{\text{iso}} = 104,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}\text{)}$$

⁴⁹ N.D.Chasteen, in: J.Lawrence, L.J.Berliner, J.Reuben (eds.), Plenum, New York (1981) 3:53-119.

Estos parámetros sugieren la formación de una nueva especie en solución con modificación de la esfera de coordinación ecuatorial alrededor del centro metálico.

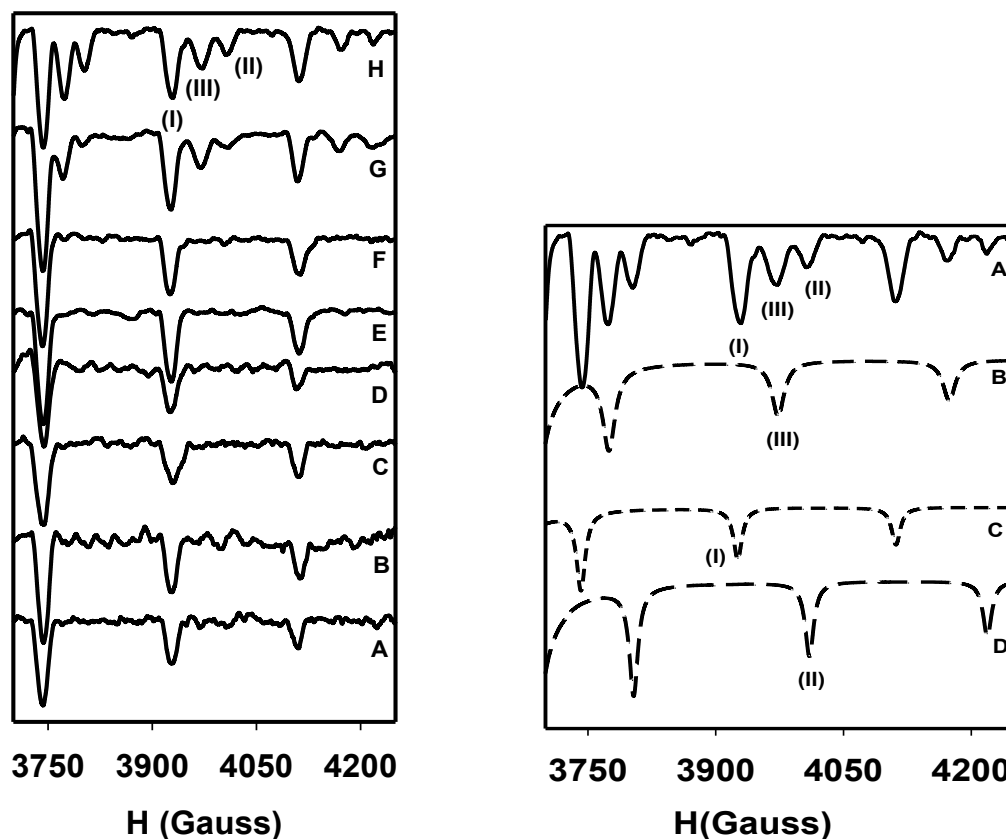


Figura 38. Componente paralelo de los espectros registrados en la región de campo alto a 140 K en etanol absoluto y utilizando distintas relaciones M/L $V(IV)O^{2+}$ / crisina. Izquierda: (A) L/M = 8; (B) L/M = 6; (C) L/M = 4; (D) L/M = 2; (E) L/M = 1,3; (F) L/M = 1; (G) L/M = 0,7; (H) L/M = 0,5. Derecha: (A) L/M = 0,5; (B) calculadas para la especie (III), (C) calculados para la especie I, D calculado para la especie II. Concentración total de crisina $1 \times 10^{-3} M$.

Los valores adquiridos son además comparados con los parámetros para el Hamiltoniano de espín obtenidos en el rango usualmente encontrado para complejos de coordinación O_4 con el catión oxovanadio(IV). En forma adicional la relación g_{II}/A_{II} se compara con diagramas de g_{II} vs A_{II} ⁵⁰ encontrándose en este caso una buena correlación con los mismos (Figura 39).

⁵⁰ D.B. McPhail, B.A. Goodman, J. Chem. Soc. Faraday Trans. (1987), 83:3627-3633.

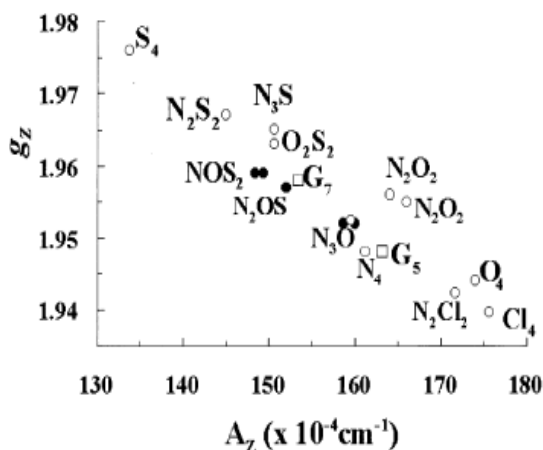


Figura 39.
Correlación entre g_z y A_z para varios complejos con oxovanadio(IV). Tomado de McPhail y colaboradores⁵⁵.

Usando la regla de aditividad, se obtiene un valor calculado de $A_z = 166,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ que está de acuerdo para valores reportados de ligandos tipo maltol, asumiendo una configuración *trans* (V=O/solvente) en solución^{48,54,51}. Se pudo sugerir que la conformación de la especie I correspondería al modo de unión de dos grupos carbonílicos del ligando y dos grupos OH desprotonados en una composición *trans* bidentada del ligando 2(CO, O⁻) incluyendo, probablemente, una molécula de solvente (etanol) en la sexta posición de la esfera de coordinación (Figura 40).

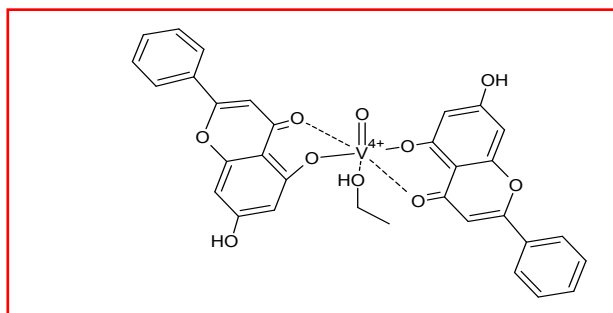


Figura 40.
Estructura probable de VOcrisina en solución.

Para la especie (III) se presume que existe un ligando en el plano ecuatorial (C=O, O⁻), lo cual está en concordancia con los datos experimentales publicados para complejos metálicos coordinados a un solo ligando, VOL^{52,53}. Estas asignaciones pueden ser confirmadas por la desaparición de las especies (II) y (III) en exceso de ligando⁵⁴. Todos estos resultados coinciden con la

⁵¹ A. Dörnyei, S. Marcão, J. Costa Pessoa, T. Jakusch, T. Kiss, Eur. J. Inorg. Chem. (2006) 18:3614-3621.

⁵² S.B. Etcheverry, E.G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2008) 13:435-447.

⁵³ G.R. Hanson, Y. Sun, C. Orvig, Inorg. Chem. (1996) 35:6507-6512.

⁵⁴ P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga K, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, J. Nat. Prod. (1998) 61:71-76.

titulación espectrofotométrica, sugiriendo la formación de *trans*-VOL₂ como la especie principal en solución.

En la Figura 41 (izquierda) se muestra el espectro de EPR (banda X, 150K) en varias relaciones L:M para el sistema morina:V(IV)O²⁺ (pH 5, etanol). En este experimento, se utilizó VOSO₄·5H₂O para obtener el catión V(IV)O²⁺ en solución, capaz de interactuar con morina. Como se muestra en la Figura 41 desde una relación 10:1 hasta una relación 2:1 (de A a D en la Figura 41, a la izquierda) sólo se puede observar una señal de EPR lo que indica la formación de una especie (I) en este rango de concentraciones.

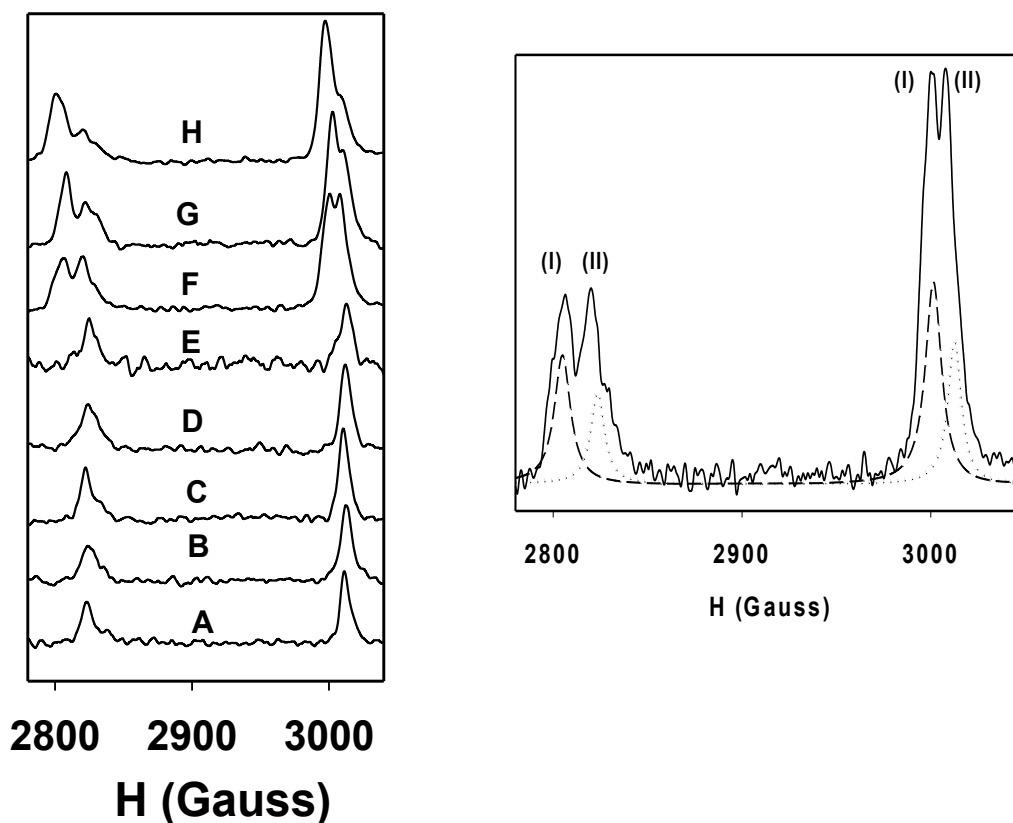


Figura 41. Espectros registrados en la región de campo bajo, a 150 K de soluciones etanólicas de sistemas V(IV)O²⁺-morina. Izquierda: (A=1:10, B= 1:7, C=1:4, D=1:2, E=1:1,5, F=1:1, G=1:0,7, H=1:0,5). Derecha: línea sólida: L/M = 1:1, línea con guiones: especie simulada (II): solución etanólica de V(IV)O²⁺, línea punteada: solución de oxovanadio(IV) (1x10⁻³ M): especie simulada (I) (*cis*-VOL₂·H₂O). Concentración total de morina: 1x10⁻³ M.

Mediante la simulación del espectro se predice la formación de un cromóforo de vanadio con parámetros para el Hamiltoniano de espín y constantes de acoplamiento hiperfino de:

$$g_{II} = 1,937; A_{II} = 174,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1};$$

$$g_{\perp}=1,980; A_{\perp}=65 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$$

Para relaciones inferiores a 2 (E, F, G y H (Figura 41, izquierda) se observan varios cambios en los espectros y aparecen 2 señales: una es la especie (I) y la otra es una nueva especie (especie (II)).

Los parámetros calculados para la especie (I) coinciden con los datos encontrados para compuestos de oxovanadio (IV) con cuatro oxígenos en la esfera de coordinación. Considerando las diferentes contribuciones a la constante de acoplamiento hiperfino, se puede concluir que la conformación de la especie I podría corresponderse con el modo de unión en el complejo sólido con un conjunto de donores ecuatoriales 2(C=O), 1(Ar-O⁻) y una molécula de agua en la cuarta posición en el plano ecuatorial (*cis*-VOL₂.H₂O). Por lo tanto se sugiere que la principal especie en solución a pH 5 es VOL₂. La señal atribuida a la especie II también fue simulada (Figura 41, derecha) y los parámetros Hamiltonianos y las constantes de acoplamiento hiperfino tienen una buena correlación con aquellos medidos en solución etanólica para V(IV)O²⁺:

$$g_{\parallel} = 1,933; A_{\parallel} = 181,5 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1};$$

$$g_{\perp} = 1,979 ; A_{\perp} = 70,5 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$$

3.1.4.5. Análisis e identificación de las especies en solución para el sistema ácido clorogénico:V(IV)O²⁺. Diagramas de distribución de especies y espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

Si bien las constantes de desprotonación del ácido clorogénico han sido estudiadas^{55,56,57,58}, éstas fueron recalculadas para las condiciones experimentales de nuestros ensayos utilizando los programas de cálculo pKas y BEST. Los valores calculados (pK₁= 3,42, pK₂= 8,35 y pK₃=12,25) resultaron comparables con los reportados en la literatura^{33,35,36,59}. En relación al valor del pK₃ (12,25) cabe mencionar la existencia de cierta dispersión en los valores reportados que puede atribuirse a la limitación del funcionamiento del electrodo de vidrio a valores altos de pH.

El modelo de especiación propuesto para el sistema ternario VO²⁺/L³⁻/H⁺ y las correspondientes constantes de formación para las especies se muestran en la Tabla 5. En el mismo se incluyen dos especies producto de la hidrólisis del catión oxovanadio(IV). Durante la formulación del modelo se incluyeron en el sistema diversas especies complejas tanto mono como bimetálicas. Sin embargo las mismas debieron ser descartadas para lograr el mejor ajuste con los datos experimentales.

⁵⁵ J.P. Cornard, C. Lapouge, L. Dangleterre, C. Allet-Bodelot, J. Phys. Chem. (2008) 112:12475-12484.

⁵⁶ I. Lamy, M. Cromer, J.P. Scharff, Anal. Chim. Acta (1988) 212:105-122.

⁵⁷ M.L. Adams, B. O'Sullivan, A.J. Downard, K.J. Powell, J. Chem. Eng. Data (2002) 47:289-296.

⁵⁸ I. Lamy, M. Seywert, M. Cromer, J.P. Scharff, Anal. Chim. Acta (1985) 176:201-212.

⁵⁹ N.D.Chasteen, L.J.Berliner, J. Reuben, Plenum, New York (1981).

Especies(pqr)	Fórmula	log β
011	HL^{2-}	12,25
012	H_2L^-	20,60
013	H_3L	24,02
110	ML^-	16,44
120	ML_2^{-4}	31,11
122	$M(HL)_2^{-2}$	40,88
10-1	$(MH_{.1})^+$	-5,50
10-3	$(MH_{.3})^-$	-17,90

Tabla 5. Composición, notación y constantes de formación (β) para el sistema $V(IV)O^{2+}/L^{3-}/H^+$ (0,150 M NaCl, a 25 °C).

Con el fin de describir el sistema y cotejar los resultados con los obtenidos por espectroscopía EPR, en la Figura 42 (A) se muestra el diagrama de distribución de especies en función del pH en el rango 2,4-7,5 obtenido para las siguientes concentraciones totales: $V(IV)O^{2+}$: 2,5 mM y ácido clorogénico: 5 mM.

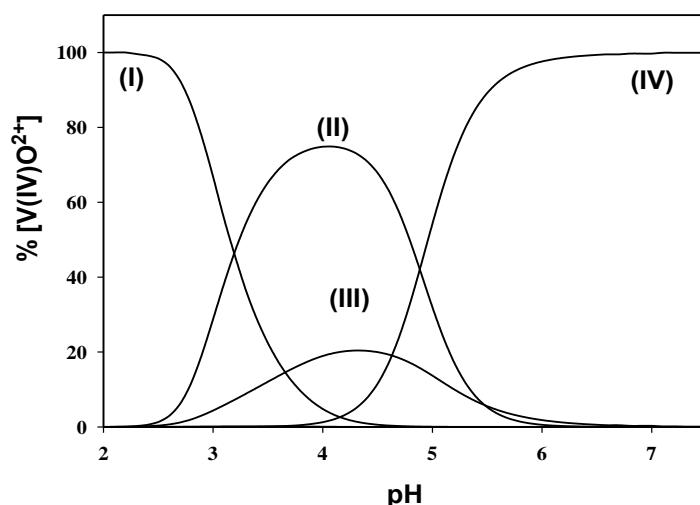


Figura 42 A. Diagrama de distribución de especies en solución en función del pH para el sistema $V(IV)O^{2+}$ /ácido clorogénico con concentraciones totales de 2,5mM y 5,0mM, respectivamente. Denominación de las especies: (I), $[VO(H_2O)_5]^{2+}$; (II) $M(HL)_2^{-2}$; (III), ML^- ; (IV), ML_2^{-4} .

Los espectros de EPR de soluciones de idénticas concentraciones totales, registrados a diferentes valores de pH se muestran en la Figura 42 (B). En la tabla 6 se presentan los parámetros para el Hamiltoniano de Spin resultados de las simulaciones realizadas para cada una de las especies identificadas en solución. Los cambios observados en los espectros de EPR con la variación de pH están de acuerdo con la presencia de las especies predichas por el modelo de especiación propuesto.

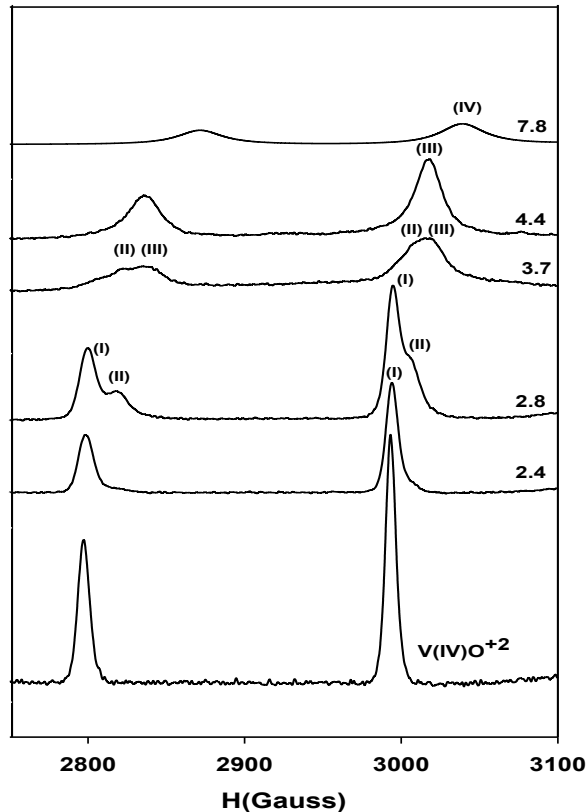


Figura 42 B. Componente paralela en la región a campo bajo para los espectros de EPR en banda X, registrados para soluciones acuosas de $V(IV)O^{+2}$ /ácido clorogénico (2,5 mM: 5,0 mM) a 120 K, a diferentes valores de pH.

Especies a diferentes pH	Coordinación ecuatorial	$g(x)$	$g(y)$	$g(z)$ ó $g_{ }$	g_{iso}	$A(x)^*$	$A(y)^*$	$A(z)$ ó $A_{ }^*$	A_{iso}^*
$V(IV)O^{+2}$, Especie (I)	4 H_2O	1,982	1,977	1,935	1,965	70	70	182	107,3
Especie (II)	2 COO^- , 2 H_2O	1,987	1,977	1,940	1,968	69	69	175	104,3
Especie (III)	2 ArO^- , 2 H_2O	1,975	1,982	1,944	1,967	56	62	169	95,66
Especie (IV)	4 ArO^-	1,978	1,982	1,955	1,972	50	52	155	85,67

Tabla 6. Parámetros de EPR para el sistema VO^{+2} /clorogénico (2,5 mM:5 mM).

*Valores de A en 10^{-4} cm^{-1} .

El diagrama (Figura 42 (A)) muestra que a partir de pH 2,8 comienza a ser apreciable la especie compleja $M(HL)_2^{-2}$ en coexistencia con $V(IV)O^{2+}$ libre. Esto se corresponde con la aparición de la señal denominada (II) en el EPR registrado a pH 2,8. A partir de pH 3,7 se predice la presencia de dos especies complejas la $M(HL)_2^{-2}$ junto a la ML^- presente en menor proporción. Concordantemente, se observa en el espectro EPR registrado a pH 3,7 (Figura 42 (B)) la señal denominada (III) correspondiente a la nueva especie, simultáneamente con la señal (II). A partir de pH 5 la especie compleja ML_2^{-4} resulta ser mayoritaria en la

solución. La aparición de una única señal denominada (IV) y asignada a ésta especie en el EPR registrado a pH 7,8 está de acuerdo con la desaparición total de la especie $M(HL)_2^{-2}$, según muestra el diagrama de distribución de especies.

Cabe mencionar que el modelo propuesto predice para una relación de concentraciones M/L 1:1 (Figura 43) la presencia de la especie ML^- como mayoritaria en la solución en un rango de pH entre 4,2 - 6,20. Esta observación está de acuerdo con la estequiometría del sólido obtenido y caracterizado descripto anteriormente.

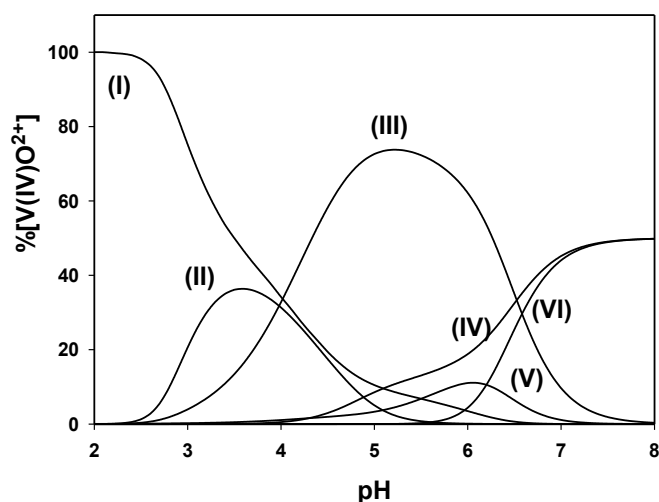


Figura 43. Diagrama de distribución de especies en solución en función del pH para el sistema $V(IV)O^{+2}$ / ácido clorogénico (Concentración total= 2,5 mM). Denominación de las especies: (I), $[VO(H_2O)_5]^{2+}$; (II) $M(HL)_2^{-2}$; (III), ML^- ; (IV), ML_2^{-4} ; (V) $(MH_1)^+$; (VI) $(MH_3)^-$.

Del análisis de los parámetros obtenidos de las correspondientes simulaciones de los espectros EPR para las especies distinguidas en solución (tabla 6), y utilizando la “regla de la aditividad” se pueden sugerir los diferentes modos posibles de coordinación con el centro metálico. Así es posible identificar la presencia de vanadio libre ($[VO(H_2O)_5]^{2+}$, especie I, $A_{II \text{ calc}} = 182,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) tanto a pH ácido como en coexistencia con la denominada especie II como se mencionó previamente. En relación a los potenciales sitios de coordinación disponibles para el ácido clorogénico, se debe tener en cuenta que son tanto el grupo carboxilato como los restos OH presentes en los anillos fenólicos. La interacción que se observa a bajos valores de pH con la aparición de la especie (II), hace posible deducir la presencia del grupo carboxilato en la esfera de coordinación. El diagrama de especiación del complejo muestra la presencia del ligando doblemente desprotonado coordinado al metal y teniendo en cuenta el valor de pKa de 3,42 obtenido para el ácido clorogénico (COOH) se puede especular que el grupo carboxílico puede eventualmente interactuar con el metal a través del grupo carboxilato formado¹⁶. Sobre esta base y con la propuesta de una coordinación ecuatorial formado por dos grupos carboxilato provenientes del ligando y dos

moléculas de agua, el cálculo de A_{II} indica un valor de $175,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{II \text{ H}_2\text{O}} = 45,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $A_{II \text{ COO}^-} = 42,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)⁶⁰ en excelente correlación con el valor obtenido por simulación del espectro. La probable interacción del metal a través del grupo OH fenólico desprotonado queda descartada en base al valor calculado para la constante de acoplamiento hiperfina. Los estudios previos existentes a la interacción de este ligando con diferentes metales^{56,57,58,60,61} predicen que a medida que aumenta el pH del medio, los subsiguientes puntos de interacción posibles son a través de la deprotonación y coordinación de los restos OH provenientes de los anillos fenólicos en el otro extremo de la molécula. Esto se debe esencialmente a cambios que ocurren en la distribución electrónica en el anillo de fenilo y la cadena carbonada, en efecto, el anillo adquiere una conformación quinoidal en las longitudes de los enlace C-C y ese efecto es acompañado por una modificación de la distribución electrónica de los sustituyentes para preservar la conjugación⁶⁴. De este modo, descartando la posibilidad de interacción del grupo hidroxilo alifático localizado en la posición adyacente del grupo carboxilato, la interacción ocurriría en el otro extremo de la molécula como se observa para otros complejos formados entre el ácido clorogénico y los metales Fe⁵⁸, Pb⁶¹ y Al⁵⁶.

Como se mencionara en la parte experimental, al momento de formular el modelo de especiación se tuvieron en cuenta otras especies entre ellas las bimetalicas, como por ejemplo las que planteaban algunos de los estudios mencionados en relación a la coordinación de dos metales sobre ambos extremos del ligando. Sin embargo cuando se postuló la existencia de dichas especies en el caso del oxovanadio(IV), el ajuste del programa empeoró o presentó mucho error lo que llevó a descartar las mismas del modelo propuesto. Teniendo en cuenta esta información, se plantea para la especie denominada (III) una esfera de coordinación que contenga, de acuerdo a lo predicho por el diagrama de distribución de especies, un ligando que estaría coordinando por medio de dos grupos ArO^- y completarían la coordinación dos moléculas de agua en el plano ecuatorial. Esta suposición conlleva a un cálculo de $A_{II} = 169,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{II \text{ H}_2\text{O}} = 45,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $A_{II \text{ ArO}^-} = 38,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)^{35,61} estando este valor en buena correlación con el espectro experimental simulado. A valores mayores de pH, tanto el diagrama de distribución de especies como el valor ajustado en el EPR experimental dan cuenta de una mayor desprotonación del ligando. Teniendo en cuenta además que la tendencia a la disminución de A_{II} y el aumento de g_{II} , indicaría la presencia de donores oxigenados fuertes cargados negativamente⁶², podemos asumir para la especie denominada (IV) una coordinación en el plano ecuatorial que incluya cuatro grupos O^- interaccionando con el catión vanadilo. Si realizamos la predicción del valor de A_{II} ($A_{II \text{ ArO}^-} = 38,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) este muestra un valor de $154,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ que coincide bien con el simulado para el espectro EPR obtenido en ese rango de pH.

⁶⁰ T.S. Smith II, R. LoBrutto, V.L. Pecoraro, Coord. Chem. Rev. (2002) 228:1-18.

⁶¹ T.Jakusch, W.Jin. L.Yang, T.Kiss, D.Crans, J. Inorg. Biochem. (2003) 95:1-13.

⁶² E.Garribba, E. Lodyga-Chruscinska, D. Sanna, G. Micera, Inorg. Chim. Acta (2001) 322:87-98.

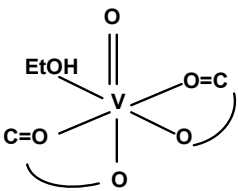
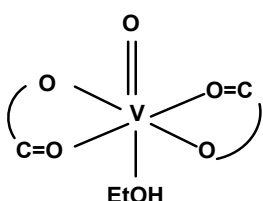
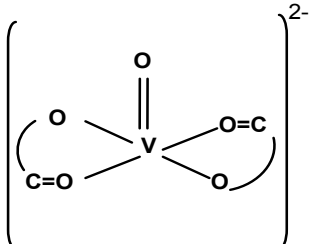
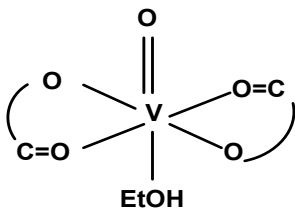
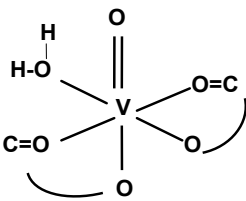
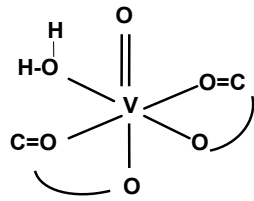
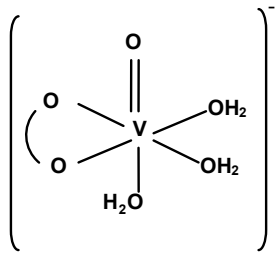
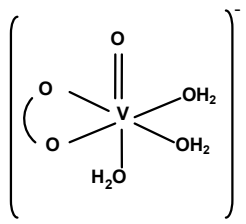
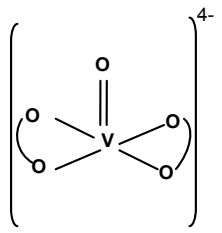
3.1.5. Conclusiones

Durante el transcurso de este trabajo de tesis se sintetizaron 4 nuevos complejos con el catión oxovanadio(IV). Los mismos fueron caracterizados desde el punto de vista fisicoquímico utilizando técnicas espectroscópicas (FTIR, UV-vis, Reflectancia difusa, EPR), análisis elemental y análisis térmico.

Las estructuras que se proponen a continuación resultan del análisis en conjunto de los datos experimentales enumerados anteriormente.

Para el complejo sólido $[\text{VO}(\text{crisina})_2\text{EtOH}]_2$ (VOcrisina), los análisis elementales indican una relación 2:1 (L:M, ligando:metal) a la vez que las determinaciones termogravimétricas ajustan razonablemente bien la presencia de una molécula de etanol de coordinación, siendo el rango de temperatura de su pérdida el esperado para el mismo. A su vez, tanto la posición de las bandas en el espectro de reflectancia difusa (650 nm y 580 nm); como los cambios observados en las bandas que se presentan en el espectro FTIR del complejo relacionadas a frecuencia de estiramiento del grupo ($\nu(\text{C}=\text{O})$) y del grupo ArO^- desprotonado (proveniente del residuo 5-OH) del flavonoide, así como la posición relativa de la banda asignada a la frecuencia de estiramiento $\text{V}=\text{O}$ (968 cm^{-1}) permiten a priori proponer un entorno oxigenado en la esfera de coordinación del catión oxovanadio(IV). La estructura finalmente se propone como dimérica sobre la base de su espectro de EPR que muestra las trazas características (multiplicidad de líneas y anchura del espectro alrededor de 3500 G) para la presencia de un complejo de estas características. En ese contexto, tanto el valor de la constante de acoplamiento hiperfina, que resulta ser la mitad del valor obtenido para el monómero de oxovanadio(IV), como el valor obtenido por utilización de la regla de aditividad para la constante de acoplamiento hiperfino ($A_{\parallel} = 173,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) están de acuerdo con la presencia de un complejo de conformación *cis*-VOL₂(etanol) en estado sólido (ver cuadro).

En cuanto a la especie que se presenta en solución etanólica ha sido posible también comprobar por medio de la titulación espectrofotométrica la presencia de una especie de relación 2:1 (L:M) para el complejo en solución. A su vez la espectroscopía EPR ha identificado la conformación *trans*-VOL₂ (la que probablemente incluya además una molécula de etanol en coordinación axial al centro metálico como la especie principal en solución (ver cuadro).

Sistema	Complejo sólido	Especies bioactivas en solución
crisina/ $V(IV)O^{+2}$	<i>cis</i> -VOL ₂ (EtOH) (VOcrisina) 	<i>trans</i> -VOL ₂ (EtOH), pH=5 
silibinina/ $V(IV)O^{+2}$	$Na_2[VO(\text{silibinina})_2] \cdot 6H_2O$ <i>trans</i> -VOL ₂ (H ₂ O) 	<i>trans</i> -VOL ₂ (EtOH), pH=9 
morina/ $V(IV)O^{+2}$	$[VO(\text{morina})_2 \cdot H_2O] \cdot 5H_2O$ (VOMorina), <i>cis</i> -VOL ₂ (H ₂ O) 	<i>cis</i> -VOL ₂ (H ₂ O), pH=5 
ácido clorogénico/ $V(IV)O^{2+}$	$Na[VO(\text{clorog})(H_2O)_3] \cdot VOclorog$ 	VOL ⁻ (pH=4)  VOL ₂ ⁴⁻ (pH=7) 

En el caso del complejo con silibinina, los análisis denotan la formación de una sal sódica representada con $\text{Na}_2[\text{VO}(\text{silibinina})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VOsilibinina) a la vez que por termogravimetría se logra determinar la pérdida de 6 moléculas de agua de hidratación así como la formación de residuo conteniendo compuestos con sodio que avalan la estequiometría propuesta para esta sal. El espectro de reflectancia se muestra también concordante con la presencia de entornos oxigenados coincidiendo con los datos espectroscópicos de FTIR que evidencian cambios en los modos de las frecuencias características para el grupo ($\nu(\text{C}=\text{O})$) y de los grupos ArO^- desprotonados (provenientes del residuo 3-OH ó 5-OH) del flavonoide proponiendo la coordinación del ligando al centro metálico por esa vía formando una estructura del tipo *trans*-VOL₂. Asimismo el pH de preparación del complejo favorece la desprotonación de grupos OH adicionales que resultan en la obtención de la sal sódica.

Del mismo modo para este sistema, la especie detectada en solución etanólica a pH=9 resulta ser de relación 2:1 de acuerdo a los resultados obtenidos mediante la titulación espectrofotométrica, asimismo el espectro UV-vis resulta ser coincidente con la interacción del ligando vía dos grupos C=O y dos restos ArO^- provenientes de dos ligandos en una conformación *trans*-VOL₂ (solvente) en forma coincidente con el sitio de coordinación propuesto para el complejo sólido.

El complejo obtenido con morina responde a la formulación propuesta de $[\text{VO}(\text{morina})_2\text{H}_2\text{O}] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (VOMorina), tal como indicaron en un principio los resultados obtenidos para los análisis elementales, así como los estudios termogravimétricos que dan cuenta de la pérdida de las 5 moléculas de agua de hidratación. A su vez, tanto el espectro de reflectancia difusa del complejo que muestra la banda principal a longitudes de onda mayores a 800 nm como los análisis de los espectros de FTIR que revelan el corrimiento a menores frecuencias de la banda asociada al estiramiento C=O así como cambios en las bandas que identifican los restos OH del ligando sugerirían que la coordinación con el metal sería a través del oxígeno del grupo carbonilo y algún resto ArO^- proveniente de la posición 5 ó 3 de los átomos de carbono en los anillos de la morina. De la misma forma el espectro de EPR indica la formación de una especie monomérica con coordinación ecuatorial de dos átomos de oxígenos pertenecientes a dos grupos C=O de dos ligandos, un grupo ArO^- y una molécula de agua conformando una estructura del tipo *cis*-VOL₂.H₂O.

En cuanto a lo estudiado en solución, tanto la titulación espectrofotométrica como los estudios de EPR denotan la presencia de un especie de relación 2.1 L:M con coordinación similar a la obtenida para el complejo sólido (*cis*-VOL₂.H₂O).

Finalmente, de los estudios realizados para el sistema clorogénico/V(IV)O²⁺ las diferentes caracterizaciones permiten proponer un complejo sólido de estequiometría $\text{Na}[\text{VO}(\text{clorog})(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (VOclorog). Cabe mencionar que las condiciones de síntesis se basaron en los estudios potenciométricos, en los diagramas de distribución de las especies en solución y en los resultados de EPR que evidenciaban la presencia de una especie única de vanadio en dichas condiciones. En el transcurso de los ensayos de preparación, diversas técnicas de síntesis arrojaban como resultados sólidos impuros ó con la presencia de especies de vanadio en diferentes estados de oxidación según pudo comprobarse mediante

EPR. Por otra parte los análisis elementales y los estudios de TGA confirman la existencia de cuatro moléculas de agua así como la presencia de sodio arrojando como residuo final el NaVO_3 . En cuanto al estudio espectroscópico, si bien el espectro UV-vis procedente de la disolución del complejo sólido indicaba la presencia de un entorno oxigenado, la asignación del espectro FTIR se tornaba dificultosa debido a la existencia en el ácido clorogénico de diversos sitios posibles de coordinación. Así por ejemplo pudo reafirmarse la hipótesis de la presencia de de sal sódica con la confirmación de la no coordinación del grupo carboxilato con el V(IV)O^{2+} . Tampoco se modificaba la banda relacionada al estiramiento C=O , observándose finalmente que los cambios ocurrían a nivel de los restos OH por medio de los cuales el ligando accede a la interacción con el centro metálico. Esta suposición además se confirmaba el bajo valor de frecuencia de estiramiento localizado para V=O . Lo sugerido espectroscópicamente quedó sustentado por los datos de EPR del sólido que indican una esfera de coordinación formada por dos grupos ArO^- provenientes del mismo ligando así como la presencia de dos moléculas de agua de coordinación en posición ecuatorial y la posibilidad de una tercer molécula de agua en la posición axial respecto a la entidad V(IV)O^{2+} (cuadro).

En relación a los ensayos en solución, se tuvo la posibilidad para el ácido clorogénico de realizar las titulaciones potenciométricas que permitieron a su vez proponer los diagramas de distribución de las especies en solución. Cabe mencionar que para los sistemas con los flavonoides no fueron posibles de perpetrar debido a la insolubilidad de estos compuestos en agua. La utilización de estos diagramas así como el seguimiento de la especiación por EPR permitieron detectar la presencia de la especie 1:1 M:L como mayoritaria en las condiciones de síntesis ($\text{pH}=5$) y de la especie 1:2 M:L para condiciones de pH fisiológico.

Por lo tanto, con los datos espectroscópicos, el análisis elemental, el análisis termogravimétrico y la titulación espectrofotométrica en un caso o potenciométrica en otro caso, podemos estimar cuál es el complejo de coordinación sintetizado, los que, como fuimos mencionando se encuentran resumidos en el cuadro.

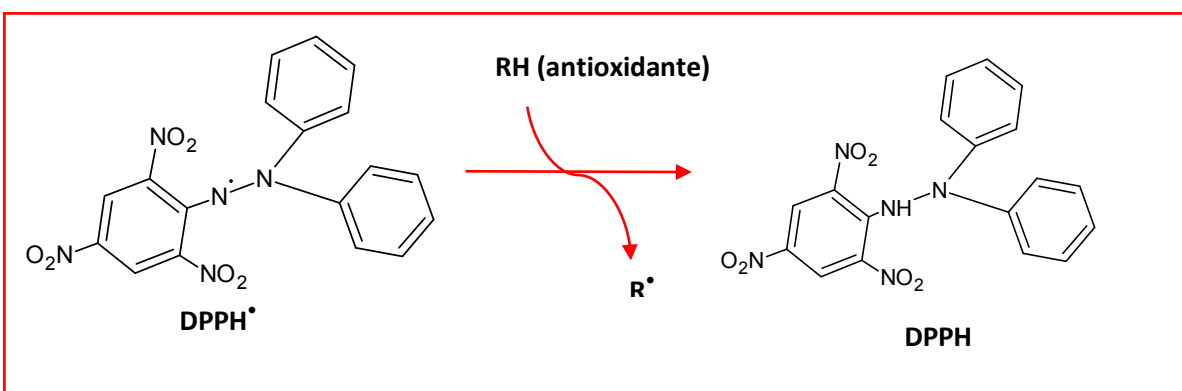
Por otro lado, los estudios en solución nos permiten determinar cual es la especie mayoritaria formada. Esta información es necesaria para la identificación de las especies bioactivas en solución y la interpretación a posteriori de los ensayos de capacidad antioxidante y actividad biológica.

3.2. Capacidades antioxidantes: flavonoides

3.2.1. Capacidad para secuestrar el radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

La capacidad antioxidante de los compuestos frente al radical DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue medida por el método de Yamaguchi y colaboradores¹. Este ensayo es ampliamente utilizado para el estudio de la actividad de antioxidantes naturales debido a su alta sensibilidad y simpleza.

El DPPH[•] es un radical libre estable, que disuelto en metanol posee color violeta. Un agente antioxidante (que en teoría es un donador de hidrógeno) puede reducir este radical (por transferencia de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón seguida de la transferencia de un átomo de hidrógeno) lo que produce una disminución del color inicial. En el esquema 1 se muestra el mecanismo por el cual el radical DPPH[•] acepta un hidrógeno proveniente de un antioxidante².



Esquema 1. Reacción entre un antioxidante (RH) y el radical DPPH para formar DPPH.

En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos para la capacidad secuestrante del radical DPPH[•] de ligandos, complejos y V(IV)O²⁺ libre. La misma es representada como el porcentaje del basal en función de la concentración creciente del compuesto.

El flavonoide crisina secuestra un 4% del radical a una concentración de 25 μM (Figura 1), valor que concuerda con el encontrado en la literatura (1,1% para crisina a 33 μM ³). El complejo en estudio, VOcrisina, secuestra un 9 % a la misma concentración. A una concentración de 100 μM , el ligando libre secuestra solo un 18 % del radical DPPH[•], en cambio la complejación mejora dicha actividad llegando a secuestrar el 45 % de mismo.

¹ T. Yamaguchi, H. Takamura, T.C. Matoba, J. Terao, Biosc. Biotechnol. Biochem. (1998) 62:1201-1204.

² J.K. Moon, T. Shibamoto, J. Agric. Food Chem. (2009) 57:1655-1666.

³ Burda S, Oleszek W, J. Agric. Food Chem. (2001) 49:2774-2779.

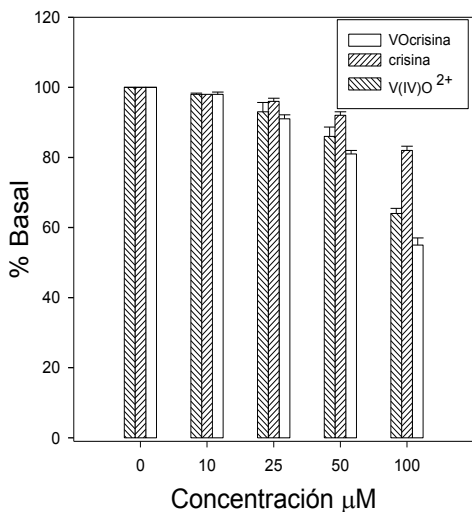


Figura 1.
Efecto de VOcrisina, crisina y V(IV)O²⁺ sobre la reducción del radical DPPH[•]. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

Respecto al sistema con silibinina, según los datos reportados utilizando medidas de EPR, la silibinina posee un $CI_{50} > 1000 \mu M^4$. Los datos de la literatura para la actividad anti radical DPPH[•] utilizando el mismo método espectrofotométrico que el nuestro fueron $CI_{50} = 1745 \mu M^5$ o 7,5% de inhibición a una concentración de $50 \mu M^6$. El valor determinado en nuestro caso es de 16 % de inhibición para el radical DPPH[•] a una concentración de $100 \mu M$ (Figura 2.). La complejación mejora 5 veces esta actividad, ya que VOsilibinina ejerce un 83 % de inhibición en idénticas condiciones.

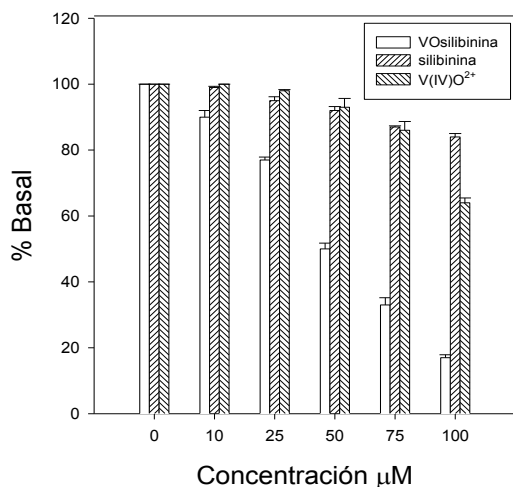


Figura 2.
Efecto de VOsilibinina, silibinina y V(IV)O²⁺ en la reducción de la concentración de DPPH[•]. Los valores son expresados como el promedio ± SEM en 3 experimentos diferentes.

⁴ M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono, Biol. Pharm. Bull. (2001) 24:1202-1205.

⁵ R. Gazák, A. Svobodová, J. Pšotová, P. Sedmera, V. Prikrylová, D. Walterova, V. Kren, Bioorg. Med. Chem. (2004) 12:5677-5687.

⁶ R. Gažák, P. Sedmera, M. Vrbacký, J. Vostálová, Z. Drahota, P. Marhol, D. Walterov, V. Křen, Free Radical Biol. Med. (2009) 46:745-758.

El sistema conteniendo morina se comporta de tal forma que tanto la morina libre como su complejo con oxovanadio(IV) muestran similar y alta capacidad de secuestro del radical DPPH[•] (Figura 3), donde los valores son 88 y 90 % respectivamente a 100 μ M. Nuestros datos sobre morina coinciden con otros reportados previamente ($CI_{50} = 17,89 \mu M^7$, $CI_{50} = 16,50 \mu M^8$, $CI_{50} = 17,13 \mu M^9$).

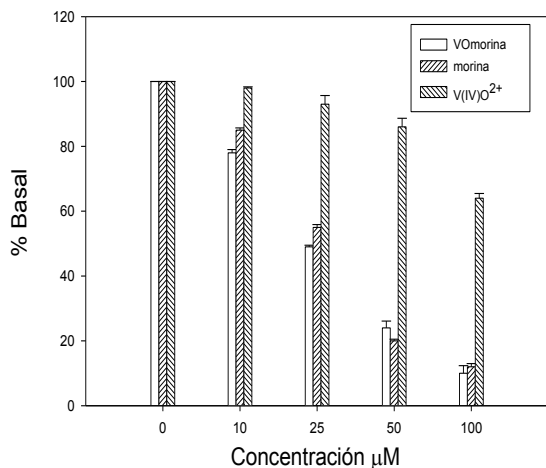


Figura 3. Efecto de VOMorina, morina y V(IV)O²⁺ en la reducción de la concentración de DPPH[•]. Los valores son expresados como el promedio \pm SEM en tres ensayos independientes.

3.2.1.1. Conclusiones sobre la capacidad para secuestrar radicales DPPH[•]

Aquellos flavonoides que no presentan ningún grupo hidroxilo en la molécula (flavonas, flavanonas y 8-metoxiflavonas) o que presentan un único grupo hidroxilo en posición 5 y/o 7, no son buenos agentes secuestrantes del radical DPPH[•]. Por otro lado, aquellos ligandos que contengan un grupo hidroxilo en posición 4' muestran una actividad antirradical $> 90 \%$. Aparentemente la presencia de dicho grupo es esencial para esta actividad. Por otro lado, existen ciertas características como el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C (C₂-C₃) y la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3 y/o 3' que refuerzan la actividad antirradical¹⁰.

La baja actividad antioxidante de silibinina en comparación con quercetina ($CI_{50} = 8,9 \mu M$) se debe a que el flavolignano posee un grupo guaiacil o coniferil en lugar de un grupo catecol² y la baja actividad de crisina puede deberse a la ausencia del grupo OH en la posición 3 del anillo C.

En el caso de la morina, la actividad antioxidante está asociada a la contribución del grupo 3-OH que está presente en el anillo C, el cual se encuentra involucrado en la transferencia de un átomo de H hacia el DPPH formando una especie no radicalaria estable¹¹. A través de métodos experimentales y computacionales, se encontró que los grupos 3-OH, 2'-OH y 4'-OH son los

⁷ S. Tachakittirungrod, F. Ikegami, S. Okonogi, Sci. Pharm. (2007) 75:179-193.

⁸ D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, M.L. Moyá, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, Talanta (2007) 71:230-235.

⁹ A. Seyoum, K. Asres, F. Kandeel El-Fiky, Phytochem. (2006) 67:2058-2070.

¹⁰ S. Burda, W. Oleszek, J. Agric. Food Chem. (2001) 49:2774-2779.

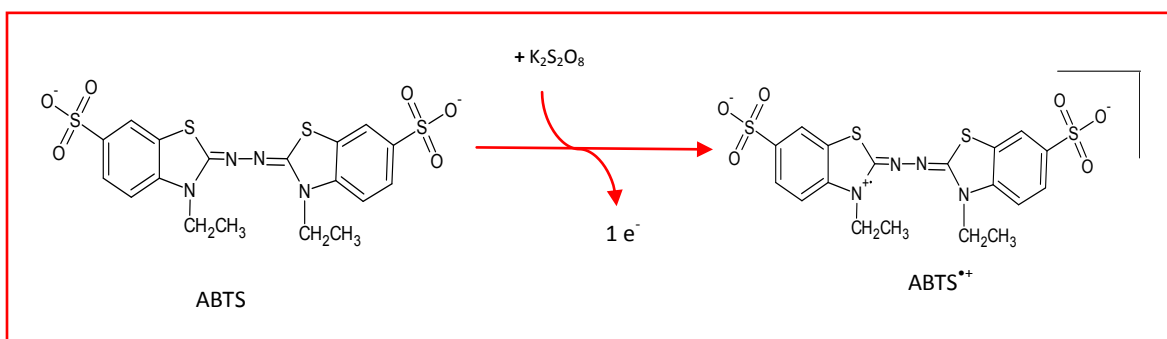
¹¹ Q.K. Panhwar, S. Memonb, M.I. Bhangar, J. Mol. Struct. (2010) 967:47-53.

principales sitios reactivos, y la quinona 3-O-2'-O es el primer producto de la reacción, que tiende a prevalecer en la forma enol a través de un efecto tautomérico, cuya disposición estructural observada corresponde a la semiquinona 3-O¹². Luego de la complejación, y debido a que el grupo 3-OH estaría involucrado en la coordinación con el átomo de vanadio, los grupos 2'-OH y 4'-OH probablemente estarían involucrados en la transferencia del átomo de H.

En el caso de VOsilibinina, ocurriría algo parecido ya que el grupo 3-OH (o el 5-OH) estaría involucrado en la coordinación con el oxovanadio(IV) y los grupos OH libres que pertenecen a los anillos D o E estarían involucrados en la transferencia de un átomo de H.

3.2.2. Actividad antioxidante total (TAA) y coeficiente antioxidante equivalente trolox (TEAC)

La actividad total antioxidante se midió usando el coeficiente antioxidante equivalente (TEAC) de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). La sal del catión radical (ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolino-6-sulfónico), ABTS^{•+}, fue generada incubando ABTS con peroxidisulfato de potasio (K₂S₂O₈) (Esquema 2). Este método permite evaluar la capacidad de donación de un átomo de hidrógeno o un electrón por parte del antioxidante estudiado al catión radical generado. El catión radical en este caso se reduce, lo que se traduce en una disminución de la absorbancia medida.



Esquema 2. Estructura y formación del catión radical ABTS^{•+} a partir de ABTS y peroxidisulfato de potasio.

En las Figuras 4, 5 y 6 se presentan los resultados obtenidos para los diferentes ligandos, complejos, V(IV)O²⁺ y trolox en relación a la capacidad secuestrante del catión radical ABTS^{•+}.

Los resultados se expresan como la concentración mM de Trolox (TEAC) equivalente a la actividad de una solución 1 mM del compuesto testeado. Dicho valor se calcula con la pendiente del gráfico del porcentaje de inhibición de la

¹² A.M. Mendoza-Wilson, H. Santacruz-Ortega, R.R. Balandrán-Quintana, J. Mol. Struct. (2011) 995:134-141.

absorbancia en función de las concentraciones usadas dividido por la pendiente del gráfico del Trolox^{13,14}.

El valor previo de TEAC reportado para crisina fue de 1,43 mM indicando la contribución del anillo A¹⁵. En nuestro caso, los datos de TEAC que obtuvimos fueron 0,9 mM para crisina y 3,96 mM para el complejo, es decir, la complejación mejora la actividad secuestrante frente al catión radical ABTS^{•+}.

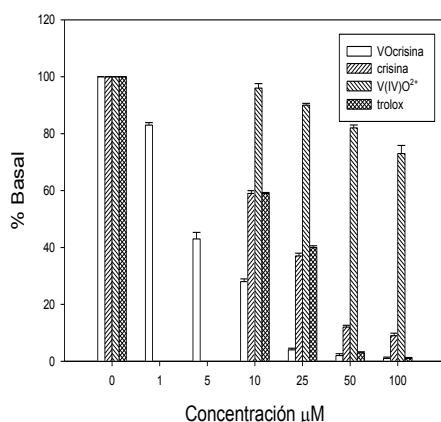


Figura 4. Actividad antioxidante total medida como la reducción del catión radical ABTS^{•+} por agregado de VOcrisina, crisina, V(IV)O₂⁺ o trolox. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

Se puede observar en el gráfico de la Figura 4 que a altas concentraciones el complejo se comporta como el trolox, antioxidante de referencia, secuestrando casi el 100 % del radical.

En la Figura 5 se observa que tanto VOsilibinina como silibinina se comportan en forma comparativa al trolox a altas concentraciones, secuestrando el 90% del catión radical.

El valor de TEAC obtenido para VOsilibinina fue de 1,83 mM mientras que para silibinina fue de 1,80 mM. Nuestros datos están de acuerdo con los reportados para silimarina¹⁶ (debe tenerse en cuenta que silibinina constituye aproximadamente el 80 % de silimarina¹⁷).

¹³ R.N. Pellegrini, A. Protagente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radical Biol. Med. (1999) 26:1231-1237.

¹⁴ S. Gorinstein, S. Moncheva, E. Katrich, F. Toledo, P. Arancibia, I. Goshev, S. Trakhtenberg, Mar. Pollut. Bull. (2003) 46:1317-1325.

¹⁵ K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, J. Nutr. Biochem. (2002) 13:572-584.

¹⁶ E. Köksal, I. Gülcn, S. Beyza, Ö. Sarikaya, E. Bursal, J. Enzym. Inhib. Med. Chem. (2009) 24:395-405.

¹⁷ N. Bhatia, J. Zhao, D.M. Wolf, R. Agarwal, Cancer Lett. (1999) 147:77-84.

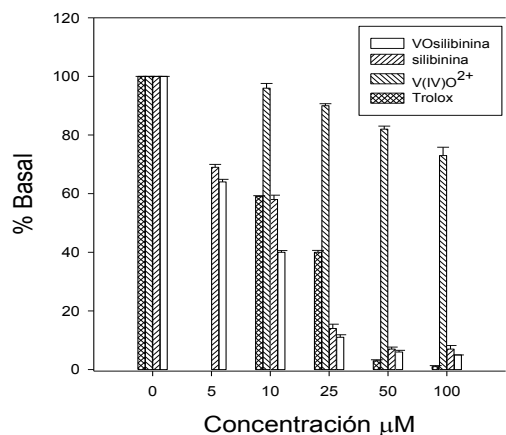


Figura 5. Actividad total antioxidante medida como la reducción de la concentración de ABTS^{•+} causada por adición de VOsilibinina, silibinina, V(IV)O²⁺ o trolox. Los valores son expresados como el promedio ± SEM en 3 experimentos diferentes.

En la Figura 6 se observa que a altas concentraciones (50 y 100 μM) tanto morina como su complejo con el ion oxovanadio(IV) se comportan de manera similar al trolox, secuestrando casi la totalidad del catión radical ABTS^{•+}. A menores concentraciones morina y VOmorina son agentes secuestrantes más eficientes que el trolox.

El valor TEAC para morina es 2,05 mM, la complejación no mejora dicho valor siendo el TEAC para VOmorina 1,98 mM. Nuestros datos para morina concuerdan con los reportados en la literatura (TEAC=2,55 mM¹⁸ ; TEAC=1,79 mM¹⁹ y TEAC=1,20 mM²⁰).

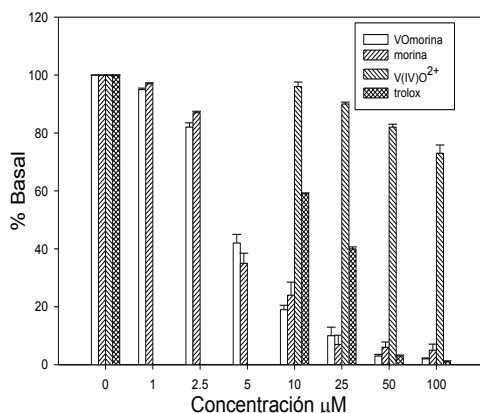


Figura 6. Actividad antioxidante total medida como la reducción del catión radical ABTS^{•+} por agregado de VOmorina, morina, V(IV)O²⁺ o trolox. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

¹⁸ C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Free Radical Biol. Med. (1996) 20:933-956.

¹⁹ R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S.E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K. I. Berker, D. Özyurt, Molecules (2007)12:1496-1547.

²⁰ N. Nenadis, L.F. Wang, M. Tsimidou, Hong-Yu Zhang, J. Agric. Food Chem. (2004) 52:4669-4674.

3.2.1. Conclusiones

Por lo visto anteriormente, todos los ligandos presentan un valor de TEAC menor que el valor reportado por distintos autores para quercetina (TEAC=4,7mM¹⁷, TEAC=4,7 mM²¹; TEAC=3,1 mM²² y TEAC=4,4 mM²³).

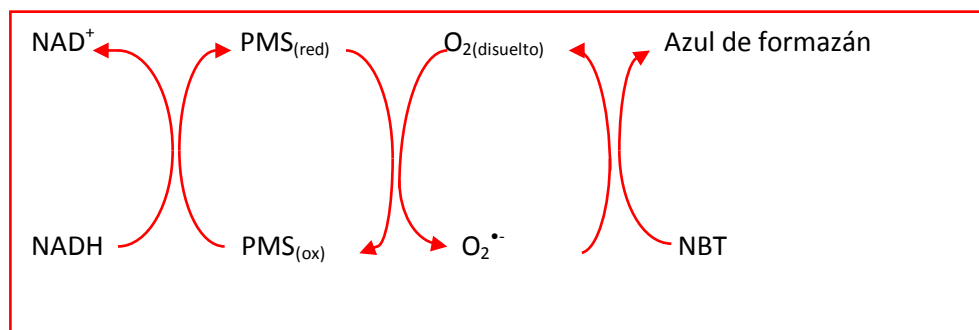
La mayor actividad antioxidante de quercetina frente al catión radical ABTS^{•+} puede deberse a la presencia, en su estructura, de dos grupos hidroxilo en posición *orto* en el anillo B, además de la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (C₂-C₃) y una función oxo en posición 4 del anillo C, como se mencionó en el Capítulo 1. Dicha disposición de grupos en la estructura de este ligando aumenta la deslocalización electrónica. A pesar que quercetina y morina presentan el mismo número de grupos OH como sustituyentes, la menor capacidad antioxidante de morina podría deberse a que presenta dos grupos OH en posición *meta* en el anillo B y no en posición *orto* como quercetina²⁴.

La complejación mejora la actividad del ligando solo para crisina (4 veces). En este caso el valor de VOcrisina se asemeja a los valores reportados para quercetina.

3.2.3. Actividad superóxido dismutasa símil

El método no enzimático para medir la capacidad SOD-símil consiste en generar el radical superóxido a través del sistema fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) (Esquema 3). Esos radicales son capaces de reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. Por lo tanto se determina la habilidad que tienen los complejos, sus ligandos libres o los cationes V(IV)O²⁺ de inhibir dicha reducción.

La concentración de complejo que produce un 50 % de inhibición (CI₅₀) fue obtenida del gráfico: porcentaje de inhibición de la reducción de NBT versus -log de la concentración de los compuestos testeados²⁵.



Esquema 3. Mecanismo para la actividad SOD-símil utilizando en sistema NBT/NADH/PMS.

²¹ P.G. Pietta, J. Nat. Prod. (2000) 63:1035-1042.

²² R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radical Biol. Med. (1999) 26:1231-1237.

²³ D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, Fitoterapia (2011) 82:513-523.

²⁴ D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, A.M. Troncoso, M.C. García-Parrilla, Anal. Chim. Acta (2005) 538:391-398.

²⁵ M.N. Patel, D.S. Gandhi, P.A. Parmar, Inorg. Chem. Comm. (2011) 14:128-132.

En la Figura 7 se presenta el % de la inhibición de la reducción del NBT en función del logaritmo negativo de la concentración de crisina y/o VOcrisina. Debido a que por debajo de una concentración de 1×10^{-4} M el flavonoide crisina no es soluble en el medio de reacción, los datos se presentan dentro del rango de solubilidad para el mismo. El valor de CI_{50} (concentración requerida para inhibir el 50 % de la reducción del NBT) obtenido para el complejo fue de $157 \mu\text{M}$ mientras que el ligando prácticamente no presenta actividad. Estos valores indican que no son buenos agentes SOD miméticos (valor límite de CI_{50} para considerar actividad SOD moderada, $20 \mu\text{M}$).

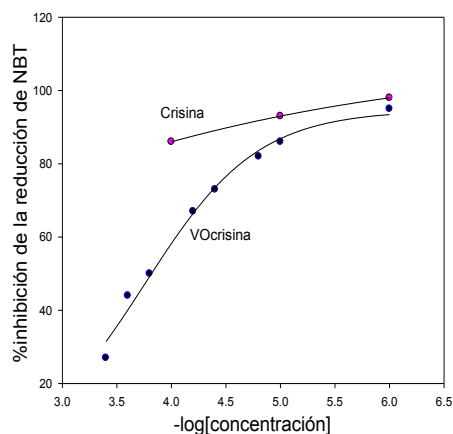
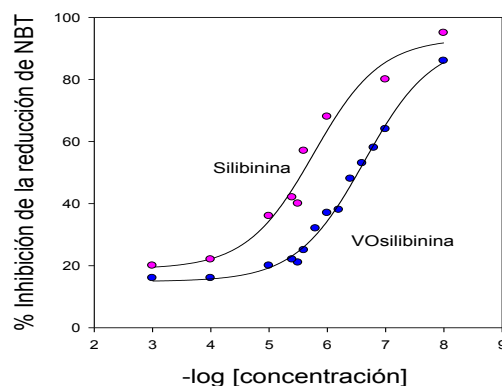


Figura 7. Efecto de VOcrisina y crisina en la reducción de NBT por medio del radical superóxido generado por un método no enzimático.

Para el sistema con silibinina, la determinación de la capacidad del ligando para secuestrar el radical anión superóxido realizada con el método no enzimático mostró que se necesita una concentración de $3,16 \mu\text{M}$ para inhibir un 50 % de la reducción del NBT. Dicho valor es menor que los encontrados en la literatura ya que en esos ensayos los aniones radical superóxido fueron generados por diferentes métodos (35% de inhibición para $50 \mu\text{M}^{26}$ y $CI_{50}=55 \mu\text{M}^5$), por lo tanto no son comparables en forma directa. Sin embargo, podemos decir que en el ensayo realizado la complejación mejora la actividad superóxido dismutasa símil ($CI_{50}=0,26 \mu\text{M}$), siendo ésta al menos doce veces mayor que la encontrada para silibinina en las mismas condiciones experimentales (Figura 8).

Figura 8. Efecto de VOsilibinina y silibinina en la reducción de NBT por medio del radical superóxido generado por un método no enzimático.



²⁶ X. Yang, K.X. Huang, H.B. Li, J.X. Gong, F. Wang, Y.B. Feng, Q.F. Tao, Y.H. Wu, X.K. Li, X.M. Wu, S. Zeng, S. Spencer, Y. Zhao, J. Qu, J. Med. Chem. (2009) 52:7732–7752.

En el caso de los estudios realizados para morina, se encuentra que La concentración de morina que produce una inhibición en la reducción de NBT del 50% (CI_{50}) es de 66 μ M (Figura 9). Este valor difiere de los reportados previamente porque para dichas determinaciones se utilizaron diferentes fuentes de generación de radicales superóxido.

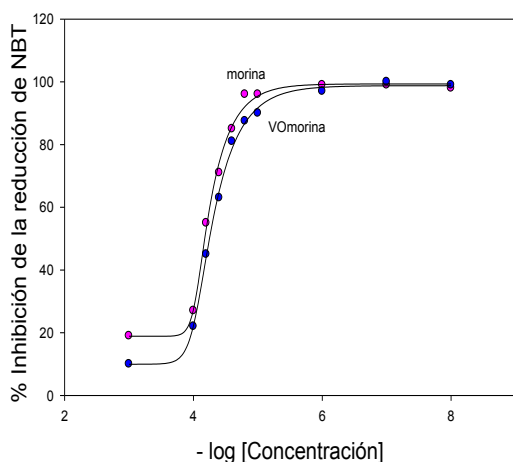


Figura 9. Efecto de VMorina y morina en la reducción de NBT por medio del radical superóxido generado por un método no enzimático.

Para VMorina el CI_{50} es de 54 μ M, lo que demuestra que la complejación mejora levemente la capacidad de secuestrar al anión radical superóxido, aunque es mayor que el valor de 20 μ M esperado para un compuesto con actividad SOD mimética moderada.

3.2.3.1. Conclusiones

En el caso de algunos flavonoles como quercetina, fisetina y miricetina, la presencia de un grupo hidroxilo en C-3' (anillo B) y en C-3 (anillo C) se asocia con una alta capacidad para secuestrar el radical anión superóxido ($CI_{50} = 1,63 \pm 0,02 \mu$ M; $1,84 \pm 0,07 \mu$ M y $0,33 \pm 0,03 \mu$ M, respectivamente, medidas por el método del nitrito). Morina y galangina presentan menor actividad SOD-símil ($CI_{50} = 9,10 \pm 0,08 \mu$ M y $6,74 \pm 0,32 \mu$ M, respectivamente), debido a la ausencia del grupo 3'-OH. La crisina no presenta actividad SOD símil debido a que no posee un grupo hidroxilo en posición 3 (anillo C)²⁷. Por otro lado, silibinina se comporta como el mejor agente secuestrante de radical superóxido probablemente debido a la sustitución del grupo catecol o la presencia de grupos metoxi.

Cabe señalar que los valores de CI_{50} dependen tanto del reactivo que se utiliza como detector (por ej. NBT) como de su concentración. El valor de CI_{50} no es apropiado para realizar comparaciones con los datos de literatura ya que dicho valor es menor a medida que disminuye la concentración de detector. Para valores

²⁷ P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga K, B. Van Poel, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, J. Nat. Prod. (1998) 61:71-76.

de Cl_{50} es posible calcular el valor de constante cinética (K) que es independiente tanto de la naturaleza del detector como de su concentración²⁸. En el caso del NBT, $K_{NBT} = 5,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,²⁹.

Utilizando la siguiente fórmula:

$$K = K_{\text{detector}} * [\text{detector}] / Cl_{50}$$

obtuvimos los valores de constantes cinéticas para los distintos ligandos y sus complejos con el catión oxovanadio(IV) (tabla 1).

Compuesto	Cl_{50} (μM)	K ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
crisina	*	-
VOcrisina	157	$1,1 \times 10^b$
silibinina	3,16	$5,6 \times 10^b$
VOsilibinina	0,26	$6,8 \times 10^7$
morina	66	$2,7 \times 10^b$
VOmorina	54	$3,3 \times 10^b$
V(IV)O ²⁺	15 ³⁰	$1,2 \times 10^b$
SOD nativa	0,21 ³⁶	$8,5 \times 10^7$

Tabla 1. Valores de Cl_{50} y constantes cinéticas para los distintos ligandos y sus complejos con oxovanadio(IV).

* no presenta actividad

Teniendo en cuenta lo visto anteriormente, podemos concluir que con el complejo de coordinación VOsilibinina se logra un efecto secuestrante de aniones superóxido del 80% del valor de la enzima nativa. Existen pocos reportes en la literatura donde se logre imitar a la enzima de manera tan eficaz. Silibinina también es considerada como buen agente SOD símil ya que presentan un valor de $Cl_{50} \leq 20 \mu\text{M}$ (3,16 μM).

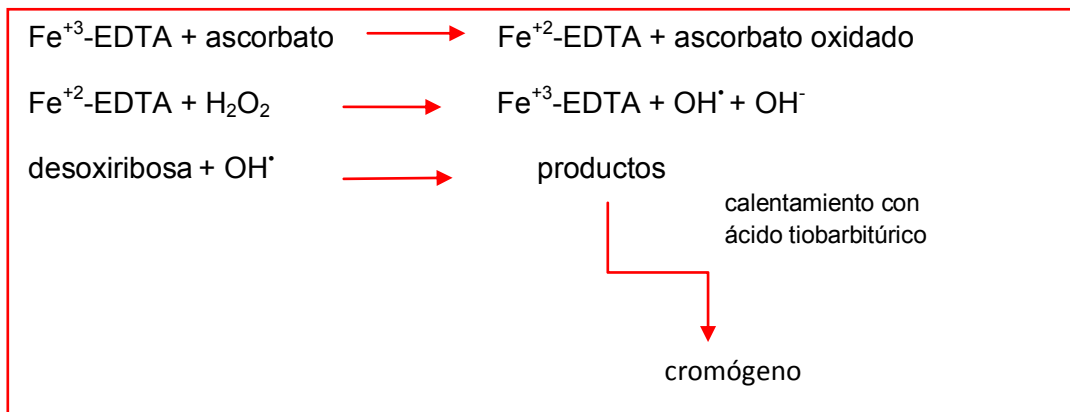
3.2.4. Actividad antioxidante frente al radical OH[·]

En este ensayo el radical OH[·] es generado por el sistema ascorbato/Fe/H₂O₂ (Esquema 4). Los radicales formados reaccionan, luego, con la desoxirribosa, la cual, en condiciones ácidas, reacciona con el ácido tiobarbitúrico para dar un cromógeno.

²⁸ S. Durot, C. Policar, F. Cisnetti, F. Lambert, J.P. Renault, G. Pelosi, G. Blain, H.K Youssoufi, J.P. Mahy, Eur. J. Inorg. Chem. (2005) 2005:3513-3523.

²⁹ Z.R. Liao, X.F. Zheng, B.S. Luo, L.R. Shen, D.F. Li, H.L. Liu, W. Zhao, Polyhedron (2001) 20:2813-2821.

³⁰ S.B. Etcheverry, E.G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2008) 13:435-447.



Esquema 4. Mecanismo de generación de radical OH^\bullet y su posterior reacción con la desoxirribosa.

Algunos antioxidantes inhiben la degradación de la desoxirribosa porque compiten con la misma por el radical OH^\bullet ³¹.

En las figuras 10, 11 y 12 se muestra la capacidad antioxidante de los diferentes ligandos, complejos y V(IV)O^{2+} frente al radical OH^\bullet . Los resultados se expresan como % basal en función de la concentración de compuesto.

En el caso de crisina, se observa que el complejo secuestra 75% del radical, mientras que el ligando un 50 % a 100 μM (Figura 10). Esto indicaría que la complejación mejora la capacidad del ligando de secuestrar al radical OH^\bullet .

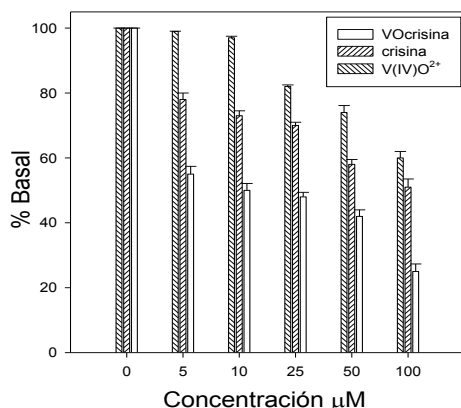


Figura 10. Efecto de VOcrisina , crisina y V(IV)O^{2+} sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH^\bullet por el método del ácido tiobarbitúrico. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar en 3 ensayos independientes.

Para silibinina, puede observarse que tanto silibinina como VOsilibinina (Figura 11) secuestran al radical OH^\bullet con un efecto dependiente de la dosis, mientras que el ligando libre inhibe la degradación de la desoxirribosa en un 24 %, el complejo lo hace en un 45 % a una concentración de 100 μM . La complejación mejora la capacidad antioxidante frente a este radical. Según Pascual y

³¹ P.C. Moorhouse, M. Grootveld, B. Halliwell, J.G. Quinlan, J.M.C. Guttetidge, FEBS Lett. (1987) 213:23-28.

colaboradores³², la silibinina es un agente secuestrante de radicales OH[•] pero solo a altas concentraciones.

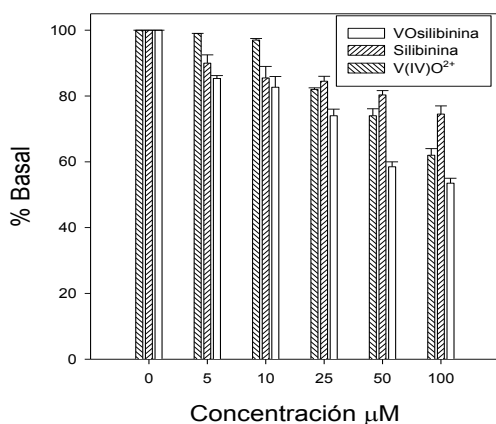


Figura 11. Efecto de VOsilibinina, silibinina y V(IV)O²⁺ sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH[•] por el método del ácido tiobarbitúrico. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

El ligando morina secuestra solo el 30% del radical, en contraste con el complejo que tiene una capacidad antioxidante más alta (60% de la degradación de los radicales a 100 μM) (Figura 12). Por lo tanto, morina no muestra una gran habilidad de secuestrar los radicales OH[•] lo cual está de acuerdo con los valores que se encuentran en la literatura³³. La unión del grupo 3-OH al metal y la formación de un sistema conjugado, mejora dicha actividad.

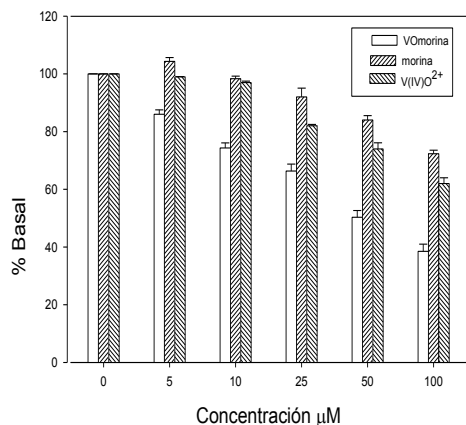


Figura 12. Efecto de VMorina, morina y V(IV)O²⁺ sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH[•] por el método del ácido tiobarbitúrico. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

3.2.4.1. Conclusiones

De acuerdo a los datos presentados con anterioridad, observamos que la complejación mejora, para todos los compuestos, la actividad anti radical OH[•] del ligando libre. Probablemente, en el caso de morina, la capacidad antioxidante es incrementada debido a la participación del grupo 3-OH y el carbonilo en C4 en la

³² C.Pascual, R. Gonz, J. Armesto, P. Muriel, Drug Develop. Res. (1993) 19:73-77.

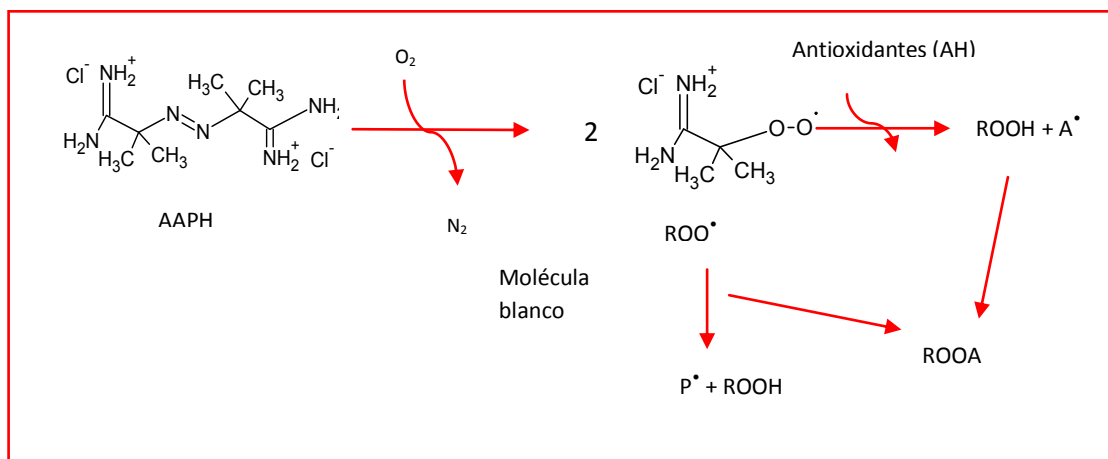
³³ O. Potterat, Current Organic Chem. (1997)1:415-440.

quelación del metal lo cual podría mejorar la deslocalización del electrón impar del anillo C por conjugación π del anillo B.

La presencia de grupos OH en posición 3' y 4' (anillo B) incrementa notablemente la capacidad de secuestro de radicales OH \cdot facilitando la deslocalización de electrones por la generación de un radical orto-semiquinona estable. Aquellos flavonoides como los presentados en este trabajo de tesis que carecen de la estructura 3', 4' catecol forman radicales relativamente inestables y por lo tanto son débiles depuradores de radicales hidroxilo. Por otro lado la sustitución de los grupos 3-OH por un grupo metilo o un grupo glicosilo anula completamente la actividad antioxidante de algunos flavonoides³⁴.

3.2.5. Ensayo de inhibición del radical peroxilo (ROO \cdot)

Este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes de secuestrar al radical peroxilo (ROO \cdot), el cual es generado por descomposición térmica del AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro) por término de 30 minutos a 37 °C (Esquema 5)^{35,36}. El AAPH fue elegido por su habilidad de generar radicales libres a un ritmo constante por largos períodos de tiempo (vida media, 175 hs). Se utilizaron dos métodos, uno espectrofluorométrico y otro espectrofotométrico los cuales varían solo en la sonda utilizada (señaladas como moléculas blanco en el Esquema 5), fluoresceína en el primer caso y piranina en el segundo caso.



Esquema 5. Representación del esquema competitivo para la determinación de la capacidad de secuestrar radicales peroxilo (generados a partir del AAPH en presencia de O_2).

Los datos pueden ser presentados como valores de ORAC (capacidad de absorción de radicales del oxígeno, para las medidas fluorescentes) o se puede medir la *fase lag* que corresponde al tiempo (en minutos) que transcurre antes de que exista una notable reducción en la absorbancia por consumo de la piranina,

³⁴ K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, J. Nutr. Biochem. (2002)13: 572-584.

³⁵ L.M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Anal. Chim. Acta (2008) 613:1-19.

³⁶ W.Y. Huang, K. Majumder, J. Wu, Food Chem. (2010) 123: 635-641.

debido a la interacción previa entre el radical y el complejo³⁷ (para las medidas espectrofotométricas). Estos últimos datos se presentan como valor de *fase lag* (min) en función de la concentración de los compuestos.

En la figura 13 se presenta un típico gráfico de decaimiento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo para distintas concentraciones de trolox. Con estos datos, se calcula el área bajo la curva (ABC) para las diferentes concentraciones ensayadas y se obtiene la curva de calibración:

$$y = 0,1907 x - 0,8865 \quad (r^2=0,996)$$

El valor de ORAC relativo fue calculado como:

$$\text{ORAC}_{\text{relativo}} = \frac{(\text{ABC}_{\text{muestra}} - \text{ABC}_{\text{blanco}})}{(\text{ABC}_{\text{trolox}} - \text{ABC}_{\text{blanco}})} * \frac{M_{\text{trolox}}}{M_{\text{muestra}}}$$

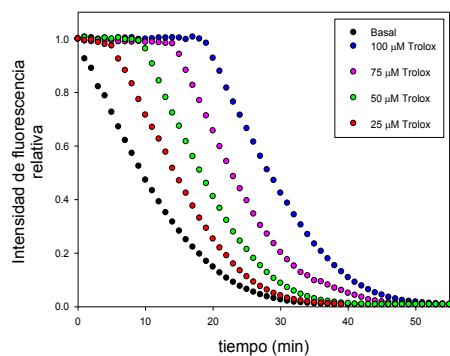


Figura 13.
Cambios en la intensidad de fluorescencia entre 0 y 50 min para distintas concentraciones de trolox.

Se obtuvieron los siguientes valores relativos para ORAC-fluoresceína: 11,90 para VOsilibinina y 5,03 para silibinina. Esto demuestra que la complejación mejora 2,37 veces la capacidad del ligando de secuestrar al radical ROO[•]. Silibinina presenta capacidad ORAC-fluoresceína algo menor que quercetina (7,28)³⁸.

Para el sistema con morina se observa que el tiempo de inducción aumenta con el incremento de la concentración de morina (*fase lag*=5,2 min), pero casi no varía con los distintos agregados de complejo (Figura 14). Esto indica que VOmorina (*fase lag*=1,8 min) no es eficaz eliminando radicales peroxilo (ROO[•]). Los datos reportados indican que existe una *fase lag* de 5,2 minutos para morina a 10 µM³⁹. Si comparamos dicho valor con el obtenido para quercetina (26,1 minutos) en las mismas condiciones de trabajo, podemos sugerir que tanto el ligando como el complejo con oxovanadio (IV) tienen menos capacidad de secuestrar al radical peroxilo. También, se puede observar en la Figura 14, que a la misma concentración, el trolox se comporta de manera menos efectiva.

³⁷ C.D. Hapner, P. Deuster, Y. Chen, Chem. Biol Interact. (2010) 186: 275-279.

³⁸ S. Kohri, H. Fujii, S. Oowada, N. Endoh, Y. Sueishi, M. Kusakabe, M. Shimmei, Y. Kotake, Anal. Biochem. (2009) 386:167-171.

³⁹ C.D. Hapner, P. Deuster, Y. Chen, Chem. Biol. Interact. (2010) 186:275-279

Las pendientes de las rectas de tiempo de inducción frente a concentración indican una mayor reactividad de morina frente a los radicales peroxilo en comparación con VOmorina.

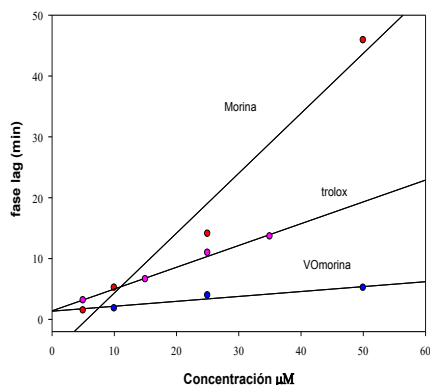


Figura 14. Efecto de VOmorina, morina y trolox sobre los radicales peroxilo generados por el AAPH. Los cambios fueron calculados como el tiempo de inducción (*fase lag*) en el consumo de piranina.

3.2.5.1. Conclusiones

Podemos concluir que la complejación en el caso de silibinina y mejora la capacidad de secuestrar radicales ROO^{\bullet} , pero en el caso de la morina, esta es un agente más eficaz que su complejo con oxovanadio(IV) para secuestrar dichos radicales.

Según Cao y colaboradores⁴⁰, los compuestos que contienen múltiples grupos OH en su molécula poseen una fuerte capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilo, y evidentemente, luego de la complejación, la presencia de grupos OH en posición meta no favorece la capacidad antioxidante con respecto al ligando libre.

3.2.6. Ácido clorogénico

Los polifenoles son definidos de acuerdo a la naturaleza del esqueleto carbonado como ácidos polifenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos⁴¹. Debido a que el ácido clorogénico, que es uno de los compuestos fenólicos no flavonoides presentes en la dieta, actúa como agente antioxidante⁴², incorporamos en este capítulo el estudio de las mismas capacidades antioxidantes que realizamos con la serie de flavonoides.

Cabe destacar que, al igual que con los otros ligandos, se realizaron los mismos ensayos con el complejo VOclorog para poder visualizar si la complejación mejora la capacidad antioxidante del ligando libre.

⁴⁰ G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Free Radical Biol. Med. (1997) 22:749-760.

⁴¹ M. Daglia, M. Racchi, A. Papetti, C. Lanni, S. Govoni, G. Gazzani, J. Agric. Food Chem. (2004) 52:1700-1704.

⁴² T Gao, Y. Ci, H. Jian, C. An, Vib. Spectrosc. (2000) 24:225-231.

3.2.6.1. Capacidades antioxidantes: ácido clorogénico

Con respecto a la capacidad de secuestrar el radical DPPH[•], el sistema con el ácido clorogénico, está en concordancia con lo encontrado en la literatura donde a una concentración de 50 μM el ácido clorogénico secuestra un 80% del radical DPPH[•] ⁴³ (84 % a la misma concentración, Figura 15). Puede verse, además, que a una concentración de 100 μM donde el ligando secuestra un 85% del radical DPPH[•], el complejo actúa como un agente secuestrante más eficiente secuestrando el 93% a la misma concentración. Otros reportes resultaron algo diferentes: $\text{Cl}_{50}=317 \mu\text{M}$ (el ácido clorogénico fue obtenido a partir de un extracto proveniente de una madre selva del sur de China⁴⁴) y $\text{Cl}_{50}=25 \mu\text{M}$ (utilizando un método de medida distinto¹⁶).

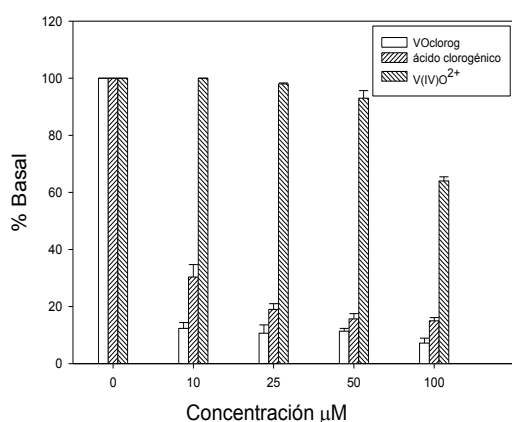


Figura 15. Efecto de VOclorog, ácido clorogénico y V(IV)O²⁺ sobre la reducción del radical DPPH[•]. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar en 3 ensayos independientes.

En la Figura 16 se muestra la capacidad que tienen los compuestos de secuestrar al catión radical ABTS^{•+} y puede observarse que a concentraciones altas (50 y 100 μM) el ácido clorogénico y su complejo con oxovanadio(IV) se comportan de la misma manera que el trolox, secuestrando casi el 95 % del catión radical ABTS^{•+}. A menores concentraciones (10 y 25 μM) el ligando se comporta como un agente secuestrante más eficiente que VOclorog. El valor de TEAC calculado para el ácido clorogénico de 1,18 está de acuerdo con los datos reportados (TEAC: 0,98⁴⁵ y 1,30⁴⁶) mientras que el valor de 1,66 obtenido para VOclorog demuestra que se encuentran en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, la complejación no mejora la actividad del ligando libre.

⁴³ M. Ohnishi, H. Morishita, S. Toda, Y. Yase, Ryo Kido, *Phytochem.* (1998) 47:1215-1218.

⁴⁴ Z. Xiang, Z. Ning, *LWT- Food Sci. Technol.* (2008) 41:1189-1203.

⁴⁵ A.S. Pannala, T.S. Chan, P.J. O'Brien, C.A. Rice-Evans, *Biochem. Bioph. Res. Co.* (2001) 282:1161-1168.

⁴⁶ J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.O. Defraigne, J. Dommes, *Food Chem.* (2009) 113:1226-1233.

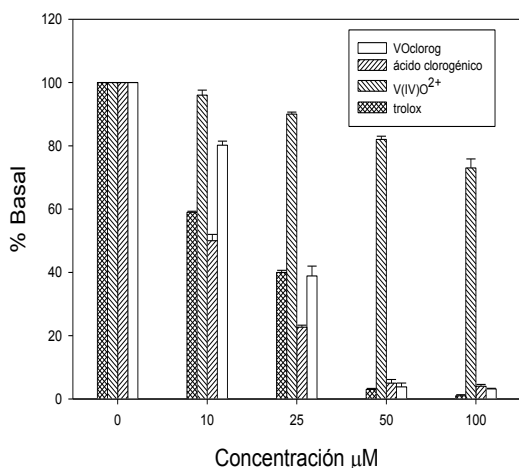


Figura 16. Actividad antioxidante total medida como la reducción del catión radical ABTS⁺ por agregado de VOclorog, ácido clorogénico, trolox o V(IV)O²⁺. Los valores son expresados como el promedio ± error estándar en 3 ensayos independientes.

En la Figura 17 se muestra la capacidad de los compuestos de dismutar al anión radical superóxido. Para el sistema con ácido clorogénico, la complejación mejora notablemente la capacidad de secuestrar al anión radical superóxido. La Cl₅₀ para VOclorog es 20,46 µM y para el ácido clorogénico Cl₅₀: 1035 µM.

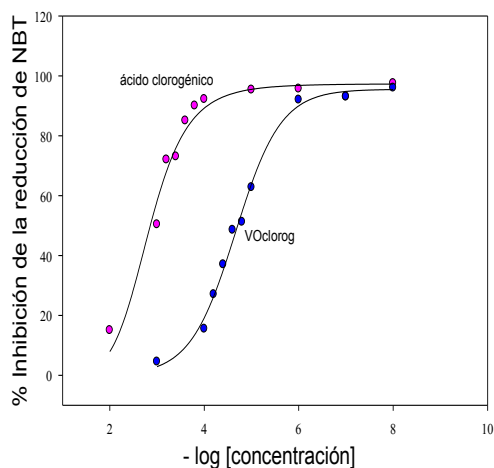


Figura 17. Efecto del VOclorog y el ácido clorogénico en la reducción de NBT por medio del anión radical superóxido generado por un método no enzimático.

En la literatura se encuentran datos de Cl₅₀ correspondientes al ligando medidos por otros métodos (Cl₅₀: 41,0±12 µM por el método MPEC (2-metil-6-metoxifeniletinilimidazopirazinona)⁴⁷, % de poder secuestrante del anión radical O₂⁻: 31,3 ± 3,3 a 50 µM⁴⁸ utilizando medidas de resonancia paramagnética electrónica o inhibición del 80 % a 100 µM generando el anión radical a través del sistema xantina-xantina oxidasa⁴⁹). El valor de *K* (ver conclusiones) para el ácido

⁴⁷ Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, Int. J. Pharm. (2011) 403:136-138.

⁴⁸ N. Nakatani, S. Kayano, H. Kikuzaki, K. Sumino, K. Katagiri, T. Mitani, J. Agric. Food Chem. (2000) 48:5512-5516.

⁴⁹ M. Ohnishi, H. Morishita, S. Toda, Y. Yase, R. Kido, Phytochem. (1998) 47:1215-1218

clorogénico ($1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es comparable con el valor ($1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) encontrado en la literatura⁵⁰.

Con respecto a la capacidad de secuestrar el radical OH^\bullet , para el sistema con el ácido clorogénico (Figura 18) se observa una relación dosis-respuesta tanto para el comportamiento del ácido como para su complejo con oxovanadio(IV). Puede verse que, mientras que el complejo secuestra 70% del radical a 100 μM el ligando secuestra solo un 30%, concluyendo entonces que la complejación mejora la actividad secuestrante del radical OH^\bullet .

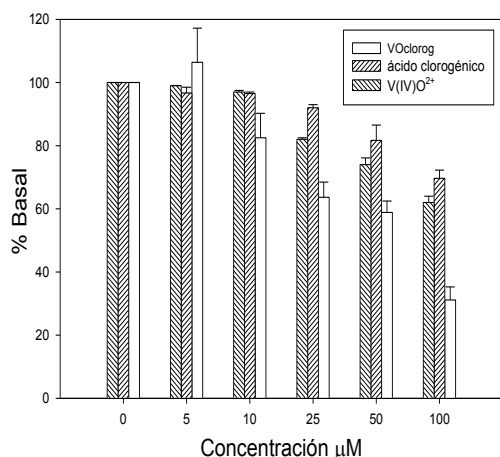


Figura 18. Efecto de VOclorog, ácido clorogénico y V(IV)O²⁺ sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH^\bullet por el método del ácido tiobarbitúrico. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar en 3 ensayos independientes

Cabe mencionar que en la literatura existen diversos datos con respecto a la actividad secuestrante del radical OH^\bullet por parte de éste que no concuerdan entre sí ni con nuestros valores. Xiang y Ning⁵¹ encontraron que el ácido clorogénico secuestra un 60% del radical OH^\bullet a 5650 μM (2mg/mL) utilizando nuestro mismo método. Zhang y colaboradores⁵² determinaron una $\text{CI}_{50}=1,2 \mu\text{M}$ para el ácido clorogénico pero utilizando un método luminiscente. Por otro lado, Gazzani y colaboradores determinaron que el ligando 5-cafeolquinico secuestra un 35 % del radical a 1300 μM , por el mismo método que utilizamos en nuestro laboratorio pero con algunas modificaciones⁴¹. Si bien los resultados reportados difieren bastante entre sí, pudimos demostrar que el ligando efectivamente secuestra los radicales hidroxilo y que, comparando en el mismo ensayo, dicha actividad se ve altamente favorecida por complejación.

⁵⁰ Y. Kono, K. Kobayashi, S. Tagawa, K. Adachi, A. Ueda, Y. Sawa, H. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* (1997) 1335:335-342.

⁵¹ Z.Xiang, Z. Ning, *LWT* (2008) 41:1189-1203.

⁵² J.Shi, J. Gong, J. Liu, X. Wu, Y. Zhang, *LWT-Food Sci. Technol.* (2009) 42:477-482.

En las figuras 19 y 20 se muestra el efecto de ácido clorogénico y su complejo con oxovanadio(IV) sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO^{\bullet} . En particular, se puede evidenciar que a todas las concentraciones ensayadas, VOclorog secuestró más eficientemente a los radicales ROO^{\bullet} que el ligando libre.

Además, esto puede ser evidenciado a través de un aumento de la fase lag (35 min) en comparación con el ligando libre (5,8 min).

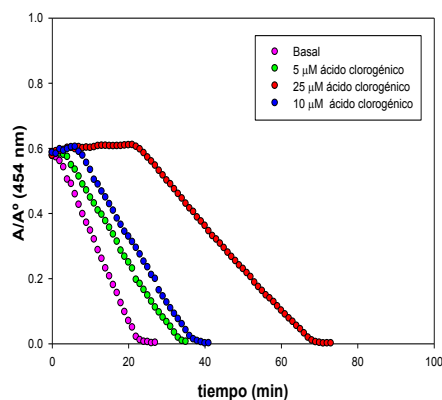


Figura 19.
Efecto del ácido clorogénico sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO^{\bullet} .

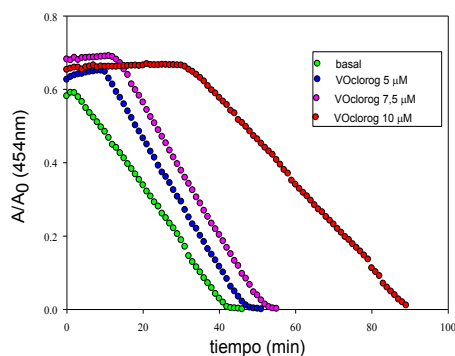


Figura 20.
Efecto de VOclorog sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO^{\bullet} .

En la Figura 21 se presenta los valores de la fase lag en función de la concentración de ácido clorogénico y su complejo con oxovanadio(IV). Se puede observar que la complejación mejora al ligando en la capacidad de secuestrar al radical peroxilo.

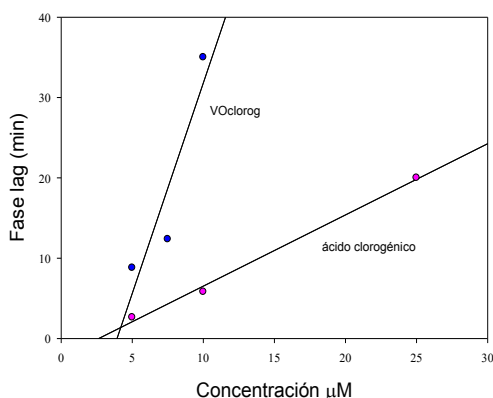


Figura 21.
Fase lag para el consumo de piranina producida por ácido clorogénico y VOclorog.

3.2.6.2. Conclusiones

La complejación mejora la capacidad antioxidante del ácido clorogénico frente a todos los radicales ensayados (excepto frente al catión radical $ABTS^{•+}$, donde ambos se comportan de la misma manera).

3.2.7. Resumen de las capacidades antioxidantes

Los tres flavonoides utilizados durante el transcurso de la tesis, el ácido clorogénico y sus complejos con el catión oxovanadio(IV) son buenos agentes antioxidantes frente al catión radical $ABTS^{•+}$. Con respecto a los ligandos libres, la morina y el ácido clorogénico son eficientes agentes secuestrantes del radical $DPPH^•$ y solo la silibinina actúa como un compuesto SOD mimético.

La complejación mejora la actividad de los ligandos libres frente a los radicales $DPPH^•$, $O_2^{•-}$, $OH^•$, $ROO^•$, excepto para la morina que es más eficaz que su complejo con oxovanadio(IV) en cuanto a su capacidad de secuestrar radicales peroxilo, probablemente debido a la disposición de los grupos OH sobre el anillo B.

Compuesto	DPPH ^{•a}	ABTS ^{•+}		O ₂ ^{•-b}	OH ^{•a}	ROO [•]
		TAA ^a	TEAC			
crisina	18	91	0,90	*	50	ND
VOcrisina	45	98	3,96	157	75	ND
silibinina	16	92	1,80	3,16	24	5,03 ^c
VOsilibinina	83	95	1,83	0,26	45	11,90 ^c
morina	88	95	2,05	66	30	5,2 ^d
VMorina	90	98	1,98	54	60	1,8 ^d
Ácido clorogénico	85	96	1,18	1035	30	5,8 ^d
VOclorog	93	97	1,66	20,46	70	35 ^d
V(IV)O ²⁺	37	27		15	38	
SOD _{nativa}				0,21		

^a (100-% basal) a 100 µM

^b Actividad SOD símil (CI₅₀ (µM))

^c ORAC_{relativo}

^d Fase lag (min)

* no presenta actividad

ND no determinado

3.3. Actividad biológica

3.3.1. Clivaje del ADN plasmídico

Se ha demostrado que algunos compuestos inorgánicos poseen actividad de clivaje del ADN y por eso han sido denominados “nucleasas inorgánicas”. La implicancia de estos compuestos se debe a que los mismos pueden ser utilizados como probables agentes quimioterapéuticos, como es el caso de compuestos de galio, rutenio, rodio, titanio y vanadio o como potenciales sustitutos para las enzimas nucleasas naturales en técnicas de manipulación genética¹.

El estudio de la actividad nucleasa consiste en determinar la capacidad que tienen las sustancias para escindir la cadena helicoidal de ADN. Por lo tanto, la capacidad que poseen los complejos de coordinación para cortar la doble hélice de ADN actuando como nucleasas químicas es de gran interés en el campo de la medicina y la biotecnología por el uso potencial de estos complejos metálicos como agentes antitumorales como mencionáramos anteriormente.

Estudios previos han demostrado que la quercetina se une al ADN de timo de ternero por atracción electrostática pero no cliva a este ácido nucleico² y su complejo con europio se intercala en el ADN y también se une a él por atracciones electrostáticas. Con el fin de estudiar los posibles efectos de clivaje del plásmido pA1 de ADN por silibinina y VOsilibinina se han realizado diversas experiencias usando la técnica de electroforesis en gel. El efecto de VOsilibinina sobre el ADN plasmídico en buffer MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) se muestra en la Figura 1.

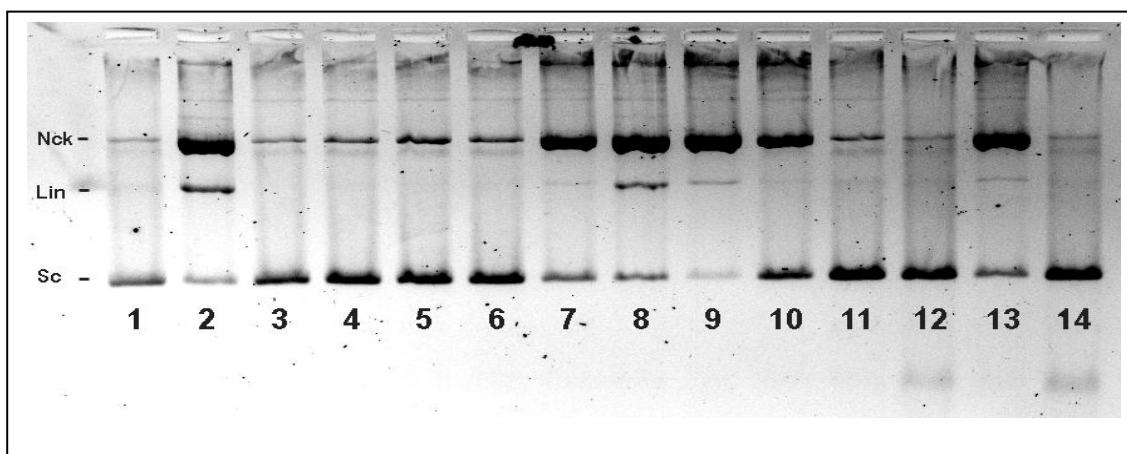


Figura 1. Clivaje del ADN por VOsilibinina en presencia de MPA y oxona en buffer MOPS. Calles 1, 2, 13, 14 - controles de ADN nativo y linearizado; 3 - VOsilibina 25 μM ; 4 - VOsilibina 50 μM ; 5 - VOsilibina 50 μM + MPA (ácido mercaptopropiónico); 6 - VOsilibina 50 μM + Oxona; 7 - VOSO₄ 50 μM ; 8 -VOSO₄ + MPA; 9 - VOSO₄ + Oxona; 10 - MPA; 11 - Oxona; 12 - Silibinina 100 μM . Nck: ADN mellado, Lin: ADN lineal, Sc: ADN superenrollado

¹ N. Butenko, A.I. Tomaz, O. Nouri, E. Escribano, V. Moreno, S. Gama, V. Ribeiro, J.P. Telo, J. Costa Pesssoa, I. Cavaco, J. Inorg. Biochem. (2009) 103:622-632.

² J. Kang, L. Zhuo, X. Lu, H. Liu, M. Zhang, H. Wu, J. Inorg. Biochem. (2004) 98:79-86.

El ácido mercaptopropiónico se agrega como agente activante reductor y la oxona, como oxidante. Estos agentes simulan las condiciones reductoras que se encuentran dentro de las células y las condiciones oxidantes que se encuentran en sangre o en contacto con aire. Entre las muestras que contienen concentraciones de 25 y 50 μM del complejo (calles 3 y 4) y aquellas donde se añadieron los agentes de activación (calles 5 y 6), no se presentan diferencias. El comportamiento es similar cuando la experiencia se realiza utilizando buffer fosfato pH 7 (Figura 2). Incluso en la concentración más alta, 100 μM , VOsilibinina no promueve ningún tipo de degradación del ADN. Se observa también que el VO_2SO_4 en las mismas condiciones, con la adición de MPA y oxona, produce clivaje de ADN (calles 7-9, Figura 1 y calles 12-14, Figura 2).

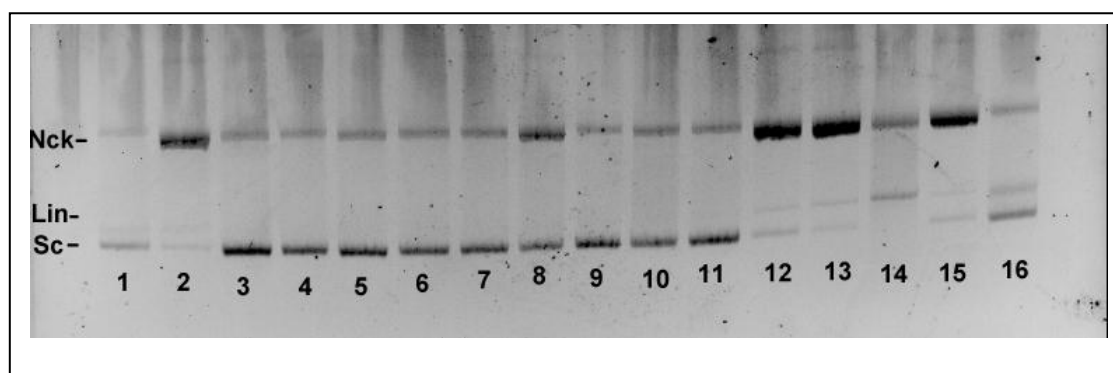


Figura 2. Clivaje del ADN por VOsilibinina en presencia de MPA y oxona en buffer fosfato. Calles 1, 2, 15, 16 – controles de ADN nativo y linealizado; 3 – VOsilibina 6 μM ; 4 – VOsilibina 12 μM ; 5 – VOsilibina 25 μM + MPA; 6 – VOsilibina 50 μM + Oxona; 7 – VOsilibinina 50 μM + MPA; 8 – VOsilibinina + Oxona; 9 – MPA; 10 – Oxona; 11 – VOsilibinina 100 μM ; 12- VO_2SO_4 50 μM ; 13 - VO_2SO_4 50 μM + MPA; 14 - VO_2SO_4 50 μM + Oxona. Nck: ADN mellado, Lin: ADN lineal, Sc: ADN superenrollado

Con fines comparativos se realizaron ensayos utilizando acetilacetato de oxovanadio(IV) ($\text{V(IV)O}(\text{acac})_2$). Este compuesto es bastante eficiente para linearizar el ADN a concentraciones tan bajas como 10 μM , según lo que se reporta en la literatura^{1,3}. Muestras digeridas con concentraciones 50 μM de $\text{V(IV)O}(\text{acac})_2$ se añadieron a cada gel y se observó una clara disminución en la intensidad de la banda de la forma de ADN superenrollado, así como un aumento en la intensidad de la banda de la forma de ADN mellado y la aparición de una banda procedente de la forma lineal, que son correspondientes a un intenso clivaje y linearización del ADN.

La ausencia de actividad nucleasa de VOsilibinina, aún en presencia de los agentes oxidantes, muestra que es un complejo seguro desde la perspectiva del clivaje del ADN. Además, tanto crisina como el complejo VOcrisina no presentaron actividad clivante o linearizante en el plásmido pA1 de ADN (estos últimos datos no se muestran).

³ J. Costa Pessoa, I. Cavaco, I. Correia, I. Tomaz, P. Adão, I. Vale, V. Ribeiro, M.M.C.A. Castro, C.C.F.G. Geraldes, J. Am. Chem. Soc. (2007) 974:340-351.

3.3.2. Modelos de células de tipo osteoblastos de origen murino

Las células en cultivo proveen un modelo simple para el estudio de una gran variedad de fenómenos biológicos.

La línea celular MC3T3E1, derivada de calvaria de ratón, es un modelo de preosteoblastos que pueden transformarse en osteoblastos maduros en cultivo. Los diferentes estadios de maduración en esta línea se parecen a los procesos fisiológicos que tienen lugar *in vivo*, proporcionando un sistema apropiado para estudios biológicos. De hecho, este sistema es utilizado para examinar los procesos de formación de la matriz extracelular así como también la respuesta a diferentes hormonas, drogas y metabolitos durante el crecimiento del hueso. Esas células presentan morfología fibroblástica en el estadio de proliferación y crecen en monocapa. Presentan núcleos ovales y se distinguen nucléolos y gránulos de cromatina. El citoplasma presenta expansiones laminares que conectan a cada célula con sus vecinas. Luego dichas células, se diferencian a osteoblastos expresando diferentes marcadores específicos y, finalmente, ellos mineralizan la matriz extracelular por síntesis de hidroxapatita *in vitro*⁴.

Durante la fase inicial de crecimiento (1 a 9 días de cultivo), las células MC3T3E1 se replican activamente como lo demuestra una alta tasa de síntesis de ADN y un incremento progresivo en su número, manteniendo una apariencia fusiforme; en ese estadio no expresan fosfatasa alcalina ósea ni acumulan matriz extracelular (MEC), dichas características son consistentes con osteoblastos inmaduros. Luego de ese tiempo de cultivo, las células muestran una morfología cuboidal, alcanzan la confluencia, y detienen su crecimiento. La regulación negativa de la replicación celular se asocia con la expresión de funciones osteoblásticas específicas. Luego de 2 semanas de cultivo puede detectarse la transformación de las células en osteoblastos a través de la expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo de osteoblastos maduros como producción de fosfatasa alcalina ósea, procesamiento del procolágeno a colágeno y aumento de la deposición de colágeno en la matriz extracelular. La mineralización de la matriz extracelular (relacionada con la expresión de osteocalcina y acumulación de calcio) comienza aproximadamente el día 16 del cultivo. El final del desarrollo del fenotipo osteoblástico se alcanza aproximadamente el día 30 con la mineralización de la matriz extracelular. Luego, las células comienzan a morir por apoptosis⁵.

Por otro lado, la etapa de proliferación de las células MC3T3E1 es estimulada autócrina y parácrinamente por diferentes agentes específicos e inespecíficos. Se ha reportado previamente que esta línea celular secreta diferentes factores que regulan y promueven el crecimiento celular⁶.

Finalmente, se puntualiza que en este trabajo de Tesis doctoral, cuando mencionamos a la línea celular MC3T3E1 como línea normal hacemos referencia

⁴ H. Sudo, H.A Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, S. Kasai, J. Cell Biol. (1983) 96:191-198.

⁵ L.D. Quarles, D.A. Yohay, L.W. Lever, R. Caton, R.J. Wenstrup, J. Bone Miner. Res. (1992) 7:683-692.

⁶ D.A. Barrio, S.B. Etcheverry, Can. J. Physiol. Pharmacol. (2006) 84:677-686.

a que presenta inhibición por contacto, que es una de las características patognomónicas de las líneas celulares no transformadas.

Otro modelo utilizado en estudios *in vitro* de células de tipo osteoblastos murinos es la línea UMR106 derivada de un osteosarcoma de rata, inducido con ^{32}P , que fue preservada por trasplante en la misma colonia de ratas. Esta línea celular inmortalizada, a diferencia de la línea MC3T3E1, presenta un fenotipo de osteoblasto diferenciado que es incapaz de mineralizar. Estas células expresan altos niveles de fosfatasa alcalina y colágeno de tipo I; pero no expresan osteocalcina, ni osteonectina, ni forman mineral óseo en cultivo. Otra característica importante de esta línea es la expresión de receptores para insulina, factor de crecimiento y parathormona. Diversos autores sugieren que esta línea es un buen modelo para el estudio de los efectos mediados por hormonas y agentes similares en osteoblastos maduros^{6,7}. Estas células tumorales, se presentan morfología poligonal con núcleos de diferentes formas y tamaños y presencia de nucléolos.

3.3.3. Ensayo de viabilidad celular

3.3.3.1. Ensayo mitogénico

Este ensayo se basa en la incorporación del colorante vital cristal violeta a ciertas estructuras subcelulares (particularmente mitocondrias) de las células metabólicamente activas pero no de las células inactivas. De esta forma nos permite estimar el porcentaje de células que no murieron debido a la acción de los flavonoides y sus complejos con el catión oxovanadio(IV), ya que solo las células que están vivas incorporarán el colorante. Es decir, hablamos de inhibición de la proliferación celular por parte de los compuestos cuando la captación de colorante por parte de las células tratadas es menor que la captación del mismo por parte de las células sin tratar (condiciones basales).

Para todos los estudios de proliferación celular las células fueron incubadas en condiciones basales (ausencia de compuesto) o con diferentes concentraciones de compuesto a 37 °C durante 24 hs. Los valores basales son 8×10^4 células por pocillo para el caso de la línea MC3T3E1 y $3,8 \times 10^4$ células por pocillo para el caso de la línea UMR106⁸. Todos los resultados se expresan como porcentaje del basal y representan el promedio \pm SEM (n=12).

En la Figura 3 se muestra el % de proliferación con respecto al estado basal en función de la concentración μM ya sea del complejo, ligando o V(IV)O^{2+} libre. En dicha figura se observa que el efecto del ligando libre y el de oxovanadio(IV) sobre la proliferación de los osteoblastos “normales” es similar, inhibiendo un 30% del crecimiento celular, mientras que el complejo muestra un comportamiento más deletéreo pero solo a altas concentraciones (inhibe un 50% a 75 y 100 μM).

⁷ N.C. Partridge, D. Alcorn, V.P. Michelangeli, G. Ryan, T.J. Martin, Cancer Res. (1983) 43: 4308-4314.

⁸ A.M. Cortizo, S.B. Etcheverry, Mol. Cell Biochem. (1995) 145:97-102.

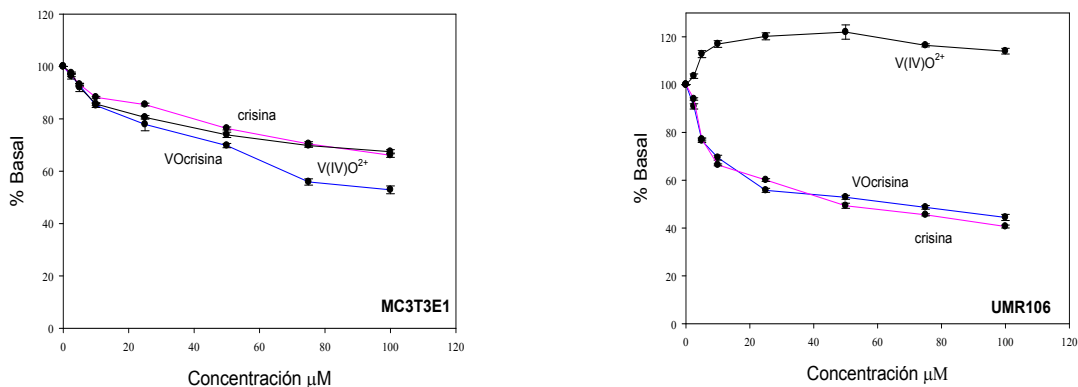


Figura 3. Efecto de VOcrisina, crisina y V(IV)O²⁺ sobre la proliferación de dos líneas celulares: MC3T3E1 y UMR 106. Todos los resultados son significativos con respecto al basal excepto para 2,5 μM en ambas líneas celulares (p < 0,01).

En la línea tumoral se observa que el ligando y el complejo se comportan de igual manera, inhibiendo 60% de la proliferación a 100 μM. En cambio el V(IV)O²⁺ libre no ejerce efectos citotóxicos sobre esta línea celular⁸. A 25 μM el comportamiento de crisina en la línea UMR106 es similar a los efectos reportados para la misma sobre otras líneas celulares como las células Hela⁹. Por lo tanto la complejación no mejora las potenciales propiedades farmacológicas del ligando en las células tumorales y por el contrario se aumenta ligeramente la citotoxicidad en las células osteoblásticas normales.

El efecto observado para silibinina, V(IV)O²⁺ y VOsilibinina sobre la proliferación celular en ambas líneas celulares se muestra en la Figura 4.

Tanto silibinina como VOsilibinina inhiben la proliferación de las células tumorales (40 % y 70 % del basal a una concentración de 100 μM respectivamente). El oxovanadio(IV) estimula la proliferación celular en todas las concentraciones ensayadas, como ya se había mencionado anteriormente, por lo tanto se puede concluir que la complejación con silibinina mejora la actividad antiproliferativa sobre la línea UMR106. A diferencia del ligando libre, el complejo tiene un comportamiento bifásico ya que por debajo de una concentración 25 μM estimula el crecimiento de éstas células.

Por otro lado, la silibinina actúa como un agente estimulador de la proliferación de las células osteoblásticas normales, pero el complejo y el V(IV)O²⁺ actúan como agentes antiproliferativos de éstas (inhibiendo 50 % y 30 % a una concentración 100 μM).

⁹ T. Zhang, X. Chen, L. Qu, J. Wu, R. Cui, X. Zhao, Bioorg. Med. Chem. (2004) 12:6097-6105.

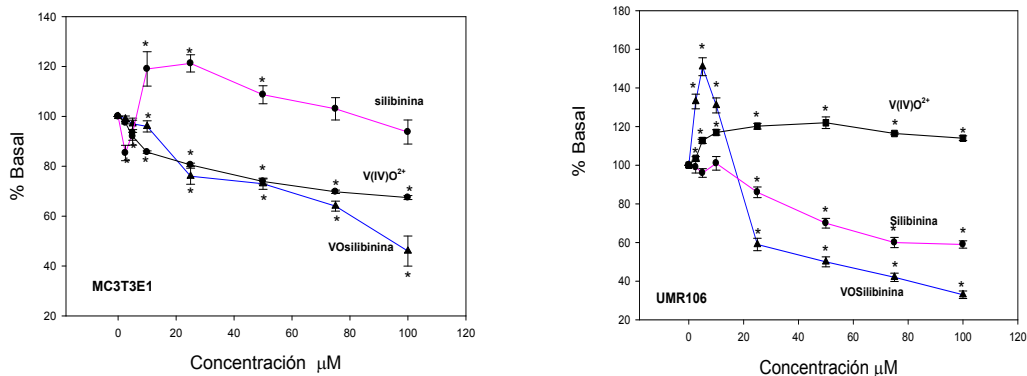


Figura 4. Efectos de VOsilibinina, silibinina y V(IV)O²⁺ sobre la proliferación de células MC3T3E1 y UMR106. * demuestran valores significativos con respecto al basal (p<0,01).

El efecto observado para morina, V(IV)O²⁺ y VOmorina sobre la proliferación celular en ambas líneas se muestra en la Figura 5.

Los resultados mostraron que los tres compuestos inhiben la proliferación de la línea celular MC3T3E1 de manera dosis-respuesta. Morina y oxovanadio(IV) se comportaron de la misma manera inhibiendo un 30 % de la proliferación a 100 µM, pero VOmorina se comportó como un agente más perjudicial (70% de inhibición a 100 µM).

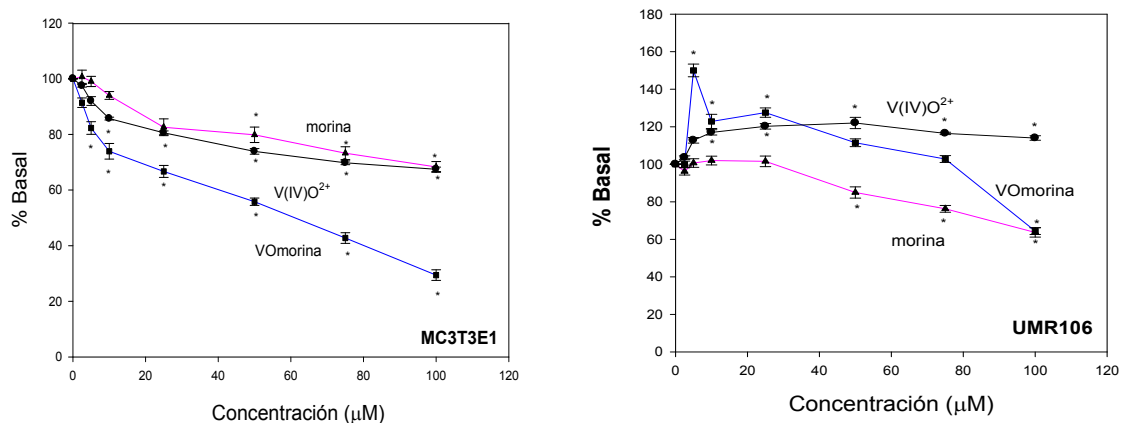


Figura 5. Efecto de VOmorina, morina y V(IV)O²⁺ sobre la proliferación celular de MC3T3E1 y UMR106. * demuestran valores significativos con respecto al basal (p<0,01).

En la línea celular UMR106 se observó que VOmorina estimula la proliferación celular hasta 75 µM pero a 100 µM, el complejo actúa como un agente nocivo. Por otro lado, morina inhibe la proliferación a partir de una concentración de 50 µM. Tanto morina como VOmorina inhiben 40% de la proliferación a 100 µM. Estos resultados indican que el efecto antitumoral de morina es eficaz a esa concentración, pero la complejación no mejora dicha actividad. El valor del porcentaje de inhibición se encuentra en el mismo orden de

magnitud que en reportes previos existentes de morina (35 % de inhibición del carcinoma escamoso oral (SCC) a 100 μM ¹⁰ o 30 % de muerte de las células del tumor ascítico de Erlich (a 150 μM)¹¹).

3.3.3.2. Conclusiones sobre el ensayo de viabilidad celular

Tanto los ligandos libres como sus complejos con oxovanadio(IV) se comportan como agentes citotóxicos para ambas líneas celulares (excepto silibinina que estimula la proliferación de los osteoblastos normales).

VOcrisina inhibe más que el ligando la proliferación de las células osteoblásticas normales pero se comportan de la misma manera frente a las células tumorales.

VOsilibinina es más deletéreo sobre la línea tumoral que sobre la normal, en cambio VOmorina inhibe más la proliferación de las células MC3T3E1 que la de las células UMR106.

3.3.4. Estudios morfológicos

Se investigó la habilidad de los complejos de inducir cambios morfológicos en ambas líneas celulares, los cuales nos podrían dar un indicio de un probable mecanismo de muerte celular.

Para el complejo de VOcrisina (Figura 6), luego de incubar los osteoblastos normales con una concentración 50 μM , se percibió una leve condensación del citoplasma y comenzó a distinguirse pérdida de conexiones entre células. El núcleo mantuvo su forma pero el número de células por campo disminuyó. A una concentración 100 μM se presenta la muerte de una gran cantidad de células. A pesar que los núcleos de estos osteoblastos mantuvieron su morfología, el citoplasma se presentó muy condensado y los bordes en muchos casos se vieron difusos.

Las células UMR106 tratadas con una concentración 50 μM del complejo se observaron más elongadas, con numerosas prolongaciones y se convirtieron en células más fusiformes. Se observó, además, un decrecimiento en el número de células por campo, con formación de lagunas. Cuando la concentración fue de 100 μM existió un número mucho menor de células, con lagunas aún mayores y también se observaron conexiones y pérdida de citoplasma. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos de proliferación celular. Es decir, se observa inhibición de la misma a medida que aumenta la concentración de complejo y consecuentemente se observa un menor número de células en las fotografías.

¹⁰J. Brown, J. O'Prey, P.R.Harrison, Carcinogenesis (2003) 24:171-177.

¹¹L.G. Menon, R. Kuttan, G. Kuttan, Cancer Lett. (1995) 95:221-225.

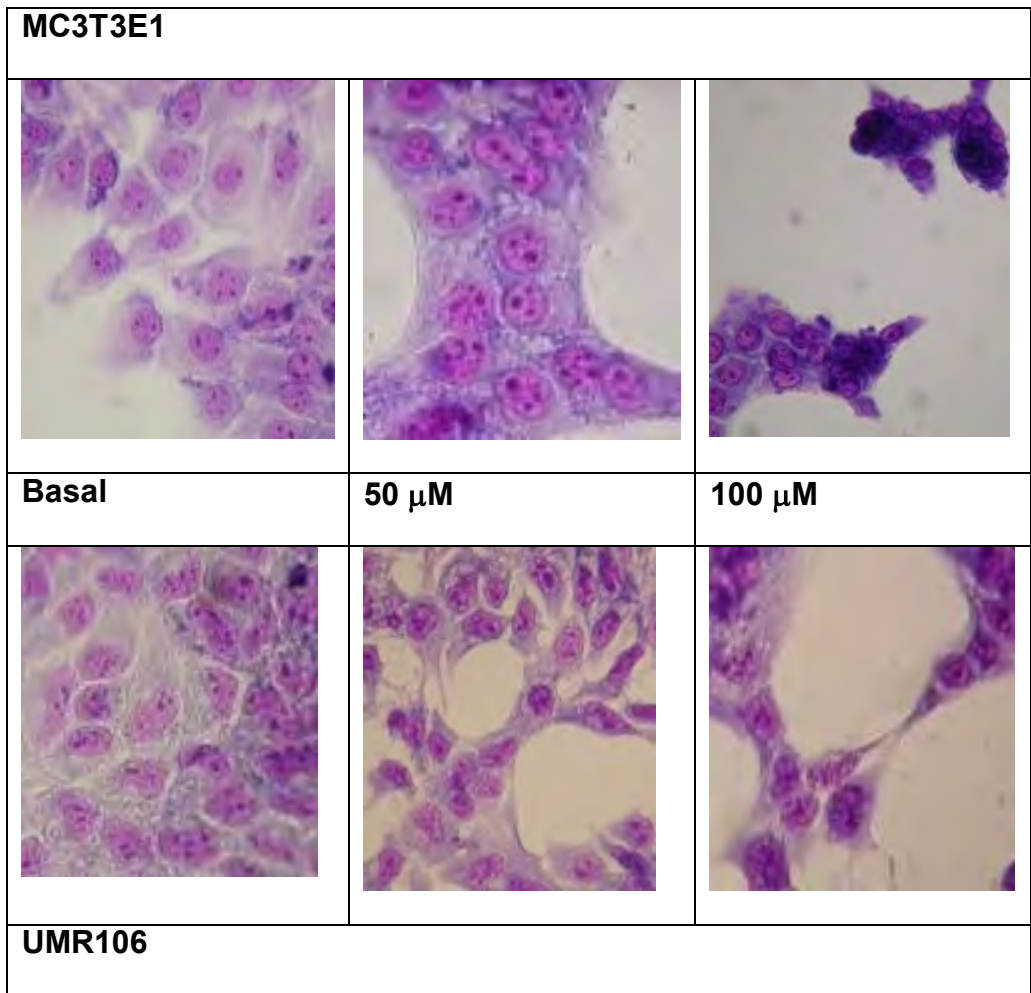


Figura 6. Efecto del complejo VOcrisina sobre la morfología de las líneas MC3T3E1 y UMR106. Estas células fueron incubadas en condiciones basales y con el agregado de 50 y 100 μM del complejo.

Los estudios con VOsilibinina mostraron que en el caso de las células MC3T3E1, a medida que aumentaba la concentración del complejo, se perdían las conexiones entre las células y el citoplasma se condensaba (Figura 7). Además se observó una disminución en el número de células por campo.

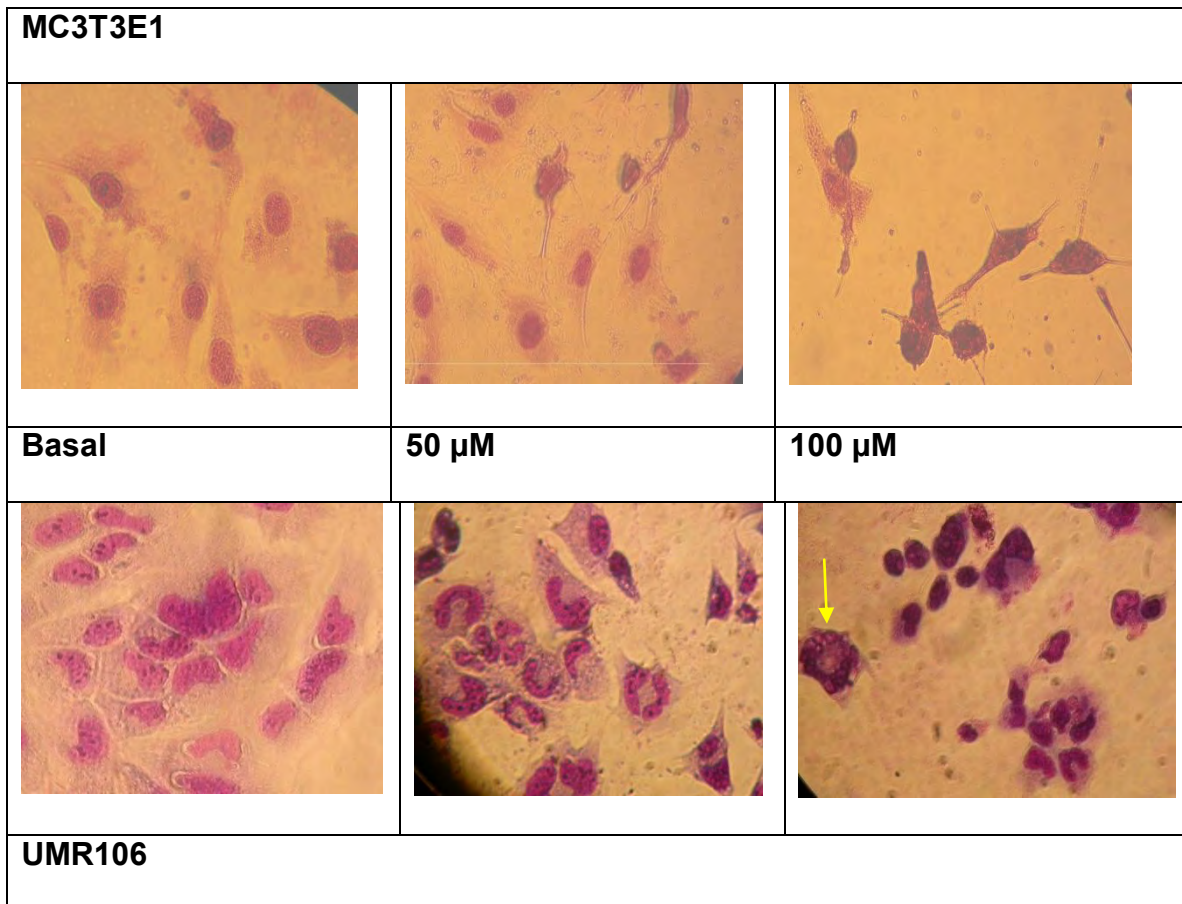


Figura 7. Efecto del complejo VOsilibinina sobre la morfología de las líneas MC3T3E1 y UMR106. Estas células fueron incubadas en condiciones basales y con el agregado de 50 y 100 µM del complejo.

Luego del tratamiento de las células tumorales con una solución de concentración 50 µM de VOsilibinina, se observó una disminución en el número de células pero no hubo cambios morfológicos significativos, manteniendo su morfología normal. A una concentración de complejo de 100 µM las células exhibieron cambios de forma de los núcleos, bordes difusos y pérdida de citoplasma. Los núcleos presentaron gránulos de cromatina densa y presencia de burbujas que indicaban un proceso activo de apoptosis (ver flecha en la Figura 7). La disminución en el número de células por campo coincidió con los datos de proliferación celular.

Para VOmorina, la incubación de los osteoblastos normales con 25 µM del complejo mostró una disminución en el número de células y una leve condensación del citoplasma con presencia de burbujas. Los núcleos mantuvieron su morfología. A una concentración 100 µM se observó un número mucho menor de células, los citoplasmas se condensaron aún más e incluso los bordes fueron difusos. Los núcleos cambiaron de forma y los nucléolos desaparecieron.

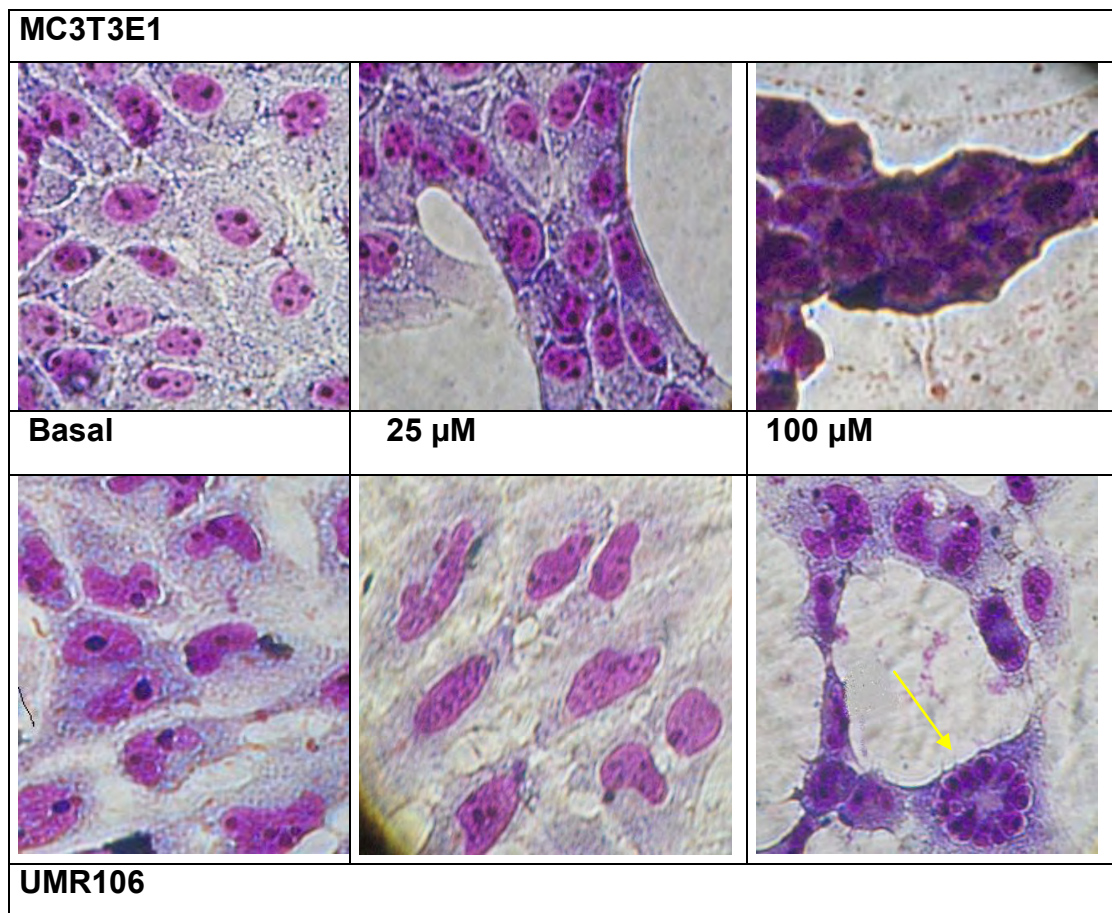


Figura 8. Efecto del complejo VOmorina sobre la morfología de las líneas MC3T3E1 y UMR106. Estas células fueron incubadas en condiciones basales y con el agregado de 25 y 100 µM del complejo.

Con respecto a las células tumorales, se observó que cuando se incubaron con una concentración 25 µM del complejo, mantuvieron su morfología y su tamaño y los núcleos fueron similares a los observados en condiciones basales. Cuando la concentración fue 100 µM, las células presentaron una disminución en su número, una leve condensación del citoplasma y la pérdida de conexiones entre ellas. También se observó la presencia de una célula cuyo núcleo se encontró fragmentado lo que mostraría la existencia de un proceso activo de apoptosis (flecha, Figura 8). Se observaron además células similares en otros campos.

3.3.4.1. Conclusiones estudios morfológicos

Cuando evaluamos la morfología celular encontramos que los tres complejos inducen alteraciones morfológicas en ambas líneas celulares, pero con distinta magnitud. En todos los casos estas alteraciones concuerdan con los cambios observados en los ensayos de viabilidad celular.

En la línea celular MC3T3E1, cuando es tratada con VOcrisina y VOsilibinina se observan ciertos cambios como condensación citoplasmática y

bordes difusos pero los núcleos mantienen su forma. Cuando son tratadas con VOmorina, además de las alteraciones anteriores, los núcleos cambian de forma y tamaño y se pierden las conexiones intercelulares, lo cual concuerda con lo observado para viabilidad celular (ver Figura 5). Con respecto a la línea tumoral las alteraciones son aún mayores con presencia de células en proceso de apoptosis.

Según Ding y colaboradores¹², en condiciones fisiológicas, el oxovanadio(IV) se oxida a vanadio(V) el cual es más tóxico, por lo cual se ha propuesto que este último sería el promotor e inductor de las transformaciones biológicas observadas en cultivos de células de mamíferos. Otras hipótesis¹³ sugieren que estas transformaciones son causadas por la producción de ROS generados por dos posibles mecanismos: el primero de ellos involucra el estrés oxidativo y el segundo mecanismo estaría mediado por p53, una proteína implicada en la regulación del ciclo celular (ver sección 1.6.1). Por lo tanto ambos caminos pueden conducir a la muerte celular por apoptosis.

Debido a que en la tinción con Giemsa mostrada anteriormente se observaron diversas alteraciones morfológicas podríamos concluir que en los mecanismos de citotoxicidad de estos complejos en concentraciones 100 μM podrían estar involucrados mecanismos apoptóticos.

3.3.5. Mecanismo de acción

3.3.5.1. Generación intracelular de ROS

A pesar que los mecanismos de toxicidad y carcinogénesis del vanadio no son conocidos en detalle, diversos estudios sugieren que la generación de especies reactivas del oxígeno mediadas por el mismo puede cumplir un papel importante sobre estos mecanismos de acción¹⁴. En este contexto se estudió la producción de ROS por los ligandos, complejos y el V(IV)O^{2+} en células osteoblásticas normales y tumorales. Como se menciona en materiales y métodos, para este ensayo se utilizó la sonda DHR123 que se localiza, fundamentalmente, en la mitocondria y en presencia de oxidantes, como el H_2O_2 ¹⁵ se oxida a RH 123, la cual es fluorescente.

Para el complejo de VOcrisina, los resultados obtenidos mostraron (Figura 9) que en las células MC3T3E1, no se produjo estimulación en la producción de ROS, siendo los valores menores que los registrados para el basal, a pesar de haber ejercido un efecto antiproliferativo débil en dicha línea celular. En la línea UMR106, VOcrisina se comportó de una manera diferente, estimulando la producción de ROS por encima de una concentración de 75 μM y el efecto inhibitorio de la proliferación celular fue superior en este caso.

¹² M. Ding, J.J. Li, S.S. Leonard, *Carcinogenesis* (1999) 20:663-668.

¹³ J. Ye, M. Ding, S.S. Leonard, V.A. Robinson, L. Millecchia, X. Zhang, V. Castranova, V. Vallyathan, X. Shi, *Mol. Cell. Biochem.* (1999) 202:9-17.

¹⁴ X. Shi, H. Jiang, Y. Mao, J. Ye, U. Saffiotti, *Toxicol.* (1996) 106:27-38.

¹⁵ M.A.M. Capella, L.S. Capella, R.C. Valente, M. Gefé, A.G. Lopes, *Cell Biol. Toxicol.* (2007) 23:413-420.

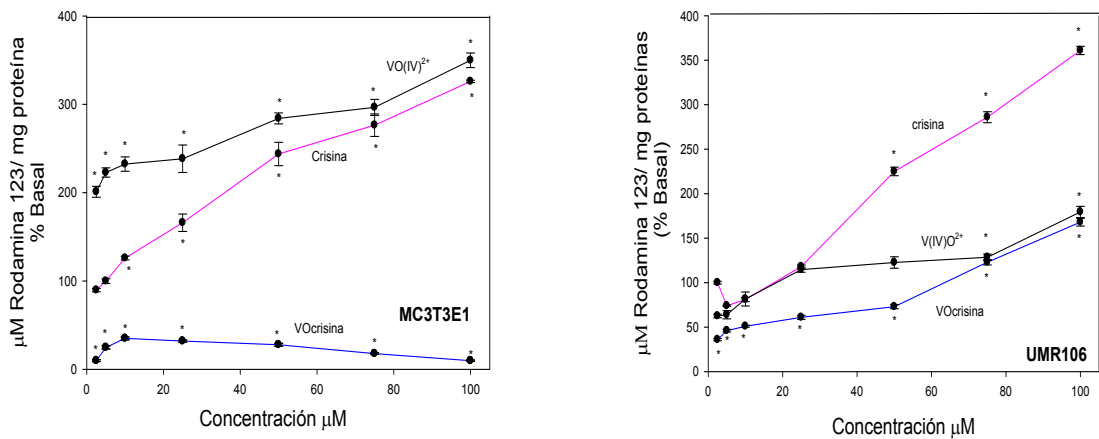


Figura 9. Efecto de VOcrisina, crisina y V(IV)O²⁺ en la oxidación de DHR 123 a rodamina 123. Las células fueron incubadas a 37 °C en presencia de 10 µM de DHR 123. Los valores son expresados como porcentaje del basal por oxidación de DHR 123 a Rodamina 123 y representan el promedio ± SEM (n=9), * demuestran valores significativos con respecto al basal (p<0,01).

Por su parte el flavonoide crisina incrementó los niveles de ROS con un efecto dependiente de la dosis en ambas líneas celulares. Se observó (Figura 9) un aumento en la producción de RH 123 que triplicó el valor del basal. La mayor producción de los radicales en la línea tumoral se correlaciona con el mayor efecto deletéreo en la proliferación de dicha línea. En los osteoblastos no transformados, el V(IV)O²⁺ registró un comportamiento similar al ligando, es decir, se observó un incremento de los ROS como fuera previamente reportado para altas concentraciones (1mM)¹⁶ y una disminución de la viabilidad de dicha línea celular en relación dosis respuesta. En la línea celular tumoral, la generación de especies reactivas del oxígeno por V(IV)O²⁺ fue baja, permitiendo la proliferación de esta línea celular.

En cuanto al sistema con silibinina, de acuerdo a las medidas realizadas se produce un aumento en la cantidad de ROS en una forma dependiente de la dosis en las células tumorales, pero el efecto sobre los osteoblastos no transformados es menos significativo (Figura 10). Es de destacar que la silibinina en las células MC3T3E1 genera un efecto proliferativo para concentraciones hasta 80 µM (Figura 4), y antiproliferativo en la línea celular UMR106, que concuerda con la alta generación de ROS en la misma.

El complejo de silibinina con oxovanadio(IV) no induce ROS hasta una concentración de 10 µM en las células tumorales, lo que va aparejado con inducción de la proliferación celular en esta zona. A partir de esa concentración, se generan ROS en relación dosis respuesta y concomitantemente disminuye la viabilidad celular. A una concentración de 100 µM los niveles de ROS son 370 %

¹⁶ A.M. Cortizo, L. Bruzzone, S. Molinuevo, S. Etcheverry, Toxicol. (2000) 147:89-99.

con respecto al basal y el efecto antiproliferativo es de un 70%. Los altos valores de ROS generados en los osteoblastos tumorales en comparación con el efecto sobre los osteoblastos normales podrían ser los responsables del mayor efecto antiproliferativo observado para VOsilibinina sobre las primeras células.

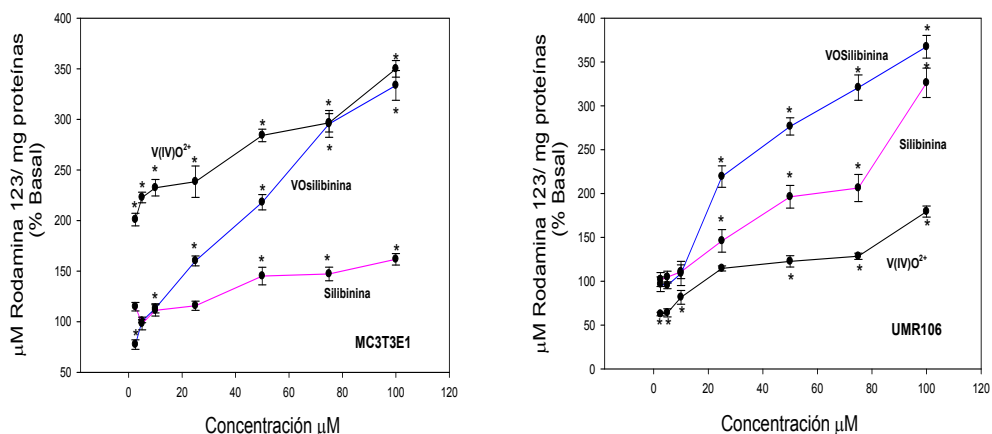


Figura 10. Efecto de VOsilibinina, silibinina y V(IV)O²⁺ en la oxidación de DHR 123 a rodamina 123. Las células fueron incubadas a 37 °C en presencia de 10 μM de DHR 123. Los valores son expresados como porcentaje del basal por oxidación de DHR 123 a Rodamina 123 y representan el promedio ± SEM (n=9), * demuestran valores significativos con respecto al basal (p<0,01).

Para morina, su complejo, y el catión V(IV)O²⁺, según lo muestra la Figura 11, todos estimulan la proliferación de ROS en la línea celular MC3T3E1.

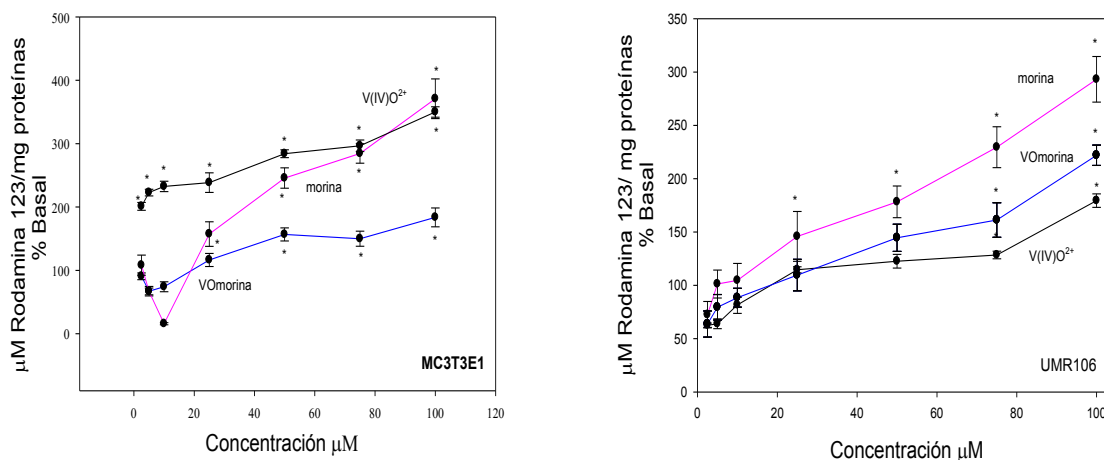


Figura 11. Efecto de VOMorina, morina y V(IV)O²⁺ en la oxidación de DHR 123 a rodamina 123. Las células fueron incubadas a 37 °C en presencia de 10 μM de DHR 123. Los valores son expresados como porcentaje del basal por oxidación de DHR 123 a Rodamina 123 y representan el promedio ± SEM (n=9), * demuestran valores significativos con respecto al basal (p<0,01).

En las zonas de bajas concentraciones, la producción de ROS para el ligando es baja y la proliferación celular coincide con el comportamiento basal. A partir de una concentración de 50 μM morina y el oxovanadio(IV) se comportan de la misma manera, ambos aumentan los niveles de ROS hasta un valor de 370 % con respecto al basal, en cambio, VOMorina lo hace hasta un valor de 200 % con respecto al basal. Sin embargo, el complejo ejerce un efecto deletéreo más alto en las células normales. En la línea tumoral, morina, el catión oxovanadio(IV) y el complejo VOMorina producen un incremento de la generación de ROS. El ligando morina produce el mayor aumento, llegando a un 280 % del basal, en cambio VOMorina produce un aumento del 220 % con respecto al basal. Hasta concentraciones de 80 μM el complejo tiene una generación de ROS baja asociado a la proliferación de la línea celular UMR106 y un aumento en la producción de ROS a mayores concentraciones está asociado con el marcado efecto antiproliferativo a altas concentraciones. El efecto antiproliferativo de morina es más notorio como una probable consecuencia de la generación de altos niveles de ROS aún a bajas concentraciones.

3.3.5.2. Conclusiones de la generación intracelular de ROS

Los ligandos crisina y morina producen un incremento de los niveles de ROS en los osteoblastos normales y estos datos se correlacionan bastante bien con los resultados de la proliferación celular. En el caso de silibinina la baja producción de ROS podría ser el factor de la baja toxicidad del flavonoide en las células normales. Es decir, podríamos asumir que el mecanismo de citotoxicidad de estos ligandos podría ser el estrés oxidativo generado fundamentalmente por el H_2O_2 que junto con otros radicales peroxo son los ROS detectados por la sonda utilizada en este ensayo.

Los complejos sintetizados se comportan de una manera diferente. Teniendo en cuenta estos resultados y comparándolos con los de la proliferación celular podríamos asumir que el mayor porcentaje de muerte celular en la línea normal podría estar vinculado a un estrés oxidativo causado por otros ROS no detectados con la sonda DHR123. Por ejemplo, para VOcrisina y VOMorina podría tratarse del radical superóxido ya que como fuera mostrado en la sección 3.2.3. dichos complejos no son buenos agentes SOD símil *in vitro*.

Con respecto a la línea UMR106 se puede observar que en todos los casos se produce un incremento de los ROS. Nuevamente, dichos datos se correlacionan con la inhibición de la proliferación celular. Las variaciones observadas pueden deberse, como se explicó con anterioridad, a que el mecanismo de cada compuesto puede estar mediado por ROS no detectados a través de este ensayo.

3.3.6. Comparación estructura-actividad

Los antioxidantes naturales del grupo de flavonoides pueden retrasar o inhibir la oxidación de los lípidos y otras moléculas mediante la inhibición de la iniciación o

propagación de la oxidación de las reacciones en cadena¹⁷. Aún no está establecido cómo ejercen su acción benéfica y además en algunos casos aquéllos con alta capacidad antioxidante como la quercetina, no son necesariamente los que tienen la mejor biodisponibilidad, estabilidad y efecto biológico. Se han establecido correlaciones directas entre la capacidad antioxidante y el poder antitumoral frente a líneas celulares de cáncer con compuestos fenólicos y flavonoides componentes del extracto de *Centella asiática*¹⁸ y de extracto seco de *guyanensis* *Maytenus*¹⁹

Además, se han realizado algunas correlaciones entre (i) la falta de los efectos citotóxicos y el poder antioxidante de los flavonoides extraídos de plantas medicinales²⁰ y (ii) la relación de la reducción de la citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno en fibroblastos humanos no inmortalizados por efecto de los extractos de *Phlomis persica* y las propiedades antioxidantes de los mismos²¹. Otros autores señalan que los flavonoides que contienen grupos OH, que confieren una mayor actividad antioxidante, presentaron mayor comportamiento citotóxico, sugiriendo un papel importante en el número de grupos OH en la citotoxicidad. Sin embargo, también señalan que aquéllos compuestos que presentan los grupos OH sustituidos con grupos -OCH₃ mostraron citotoxicidad relativamente alta²². Podría ser que la actividad antioxidante inherente de los flavonoides y otros polifenoles, que se relacionó directamente durante mucho tiempo con sus efectos en la salud, en particular con la prevención, retraso, o ayuda en la cura del cáncer, no tendría correlación directa con los efectos biológicos finales. Así, aunque la medición de actividades antioxidantes de productos naturales *in vitro* o por métodos basados en la capacidad de secuestrar radicales libres sean valiosos como métodos de referencia rápidos para detectar la presencia de polifenoles, se deben utilizar otras pruebas que implican mediciones biológicas, tales como la proliferación celular, para entender las respuestas biológicas finales.

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento antioxidante de los flavonoides mejoró por complejación en el caso de silibinina y crisina. La mejora en los efectos antitumorales se correspondió con este efecto. El complejo con morina presentó un TEAC algo menor que el ligando y menor capacidad de secuestrar radicales peroxilos, y este efecto se vio también reflejado en una menor actividad antitumoral sobre las células tumorales que la morina.

En la literatura se compara la relación estructura-actividad evaluando los efectos antioxidantes de los flavonoides a través de la actividad equivalente Trolox (TEAC). Podemos observar en nuestro estudio que la morina se comportó como el mejor agente antioxidante, seguido por silibinina y crisina, de conformidad con sus estructuras (presencia de 3-OH, 5-OH y 7-OH, la presencia de 2, 3-doble

¹⁷ J.F.S Ferreira, D.L. Luthria, T. Sasaki, A. Heyerick, *Molecules* (2010) 15:3135-3170.

¹⁸ U.F. Pittella, R.C. Dutra, D.D. Junior, M.T.P. Lopes, N.R. Barbosa NR, *Int. J. Mol. Sci.* (2009) 10:3713-3721.

¹⁹ P. Pohlit de Almeida Telles, C.N. Macari, A.M. Portela A M, *Acta Amazónica* (2006) 36:513 -518.

²⁰ R.J. Sharma, S.R. Chaphalkar, A.D. Adsool, *Int. J. Biotech.*, (2010) 2:1-5.

²¹ S. Moein, B. Farzami, S. Khaghani, M.R. Moein, B. Larijani, *DARU* (2008)15:83-88.

²² J.M. Jeong, S.K. Kang, I.H. Lee, J.Y. Lee, H.Jung, C.H.J. Choi, *Pharm. Pharmaceut. Sci.* (2007)10:537-546.

enlace pero los OH sobre el anillo B en posición meta; presencia de 3-OH, 5-OH y 7-OH, ausencia del 2, 3-doble enlace y los OH sobre el anillo B sustituidos; y presencia de 5-OH y 7-OH, de 2, 3-doble enlace y ningún OH sobre el anillo B, respectivamente). Sin embargo, estos resultados no se correlacionan cuando la actividad antioxidante se determina por su capacidad de eliminar otros radicales, por ejemplo superóxido.

Por otra parte, con la coordinación, el valor TEAC indica que existe una mejora de la actividad antioxidante para crisina (probablemente debido a la deslocalización electrónica generada por la coordinación a través del grupo C=O y el grupo 5-OH desprotonado) y muy poco para silibinina, pero las capacidades secuestrantes para superóxido, DPPH[•] y OH[•] mejoraron por la interacción de los tres flavonoides con el metal. Es importante tener en cuenta en esta etapa, que la coordinación de catión oxovanadio(IV) se produce a través del grupo ceto y el grupo 5-OH ó 3-OH de los flavonoides.

El efecto tóxico más pronunciado en las células tumorales de los flavonoides estudiados se observó para crisina, con menor capacidad secuestrante (TEAC), siendo similar para silibinina y morina (Figura12).

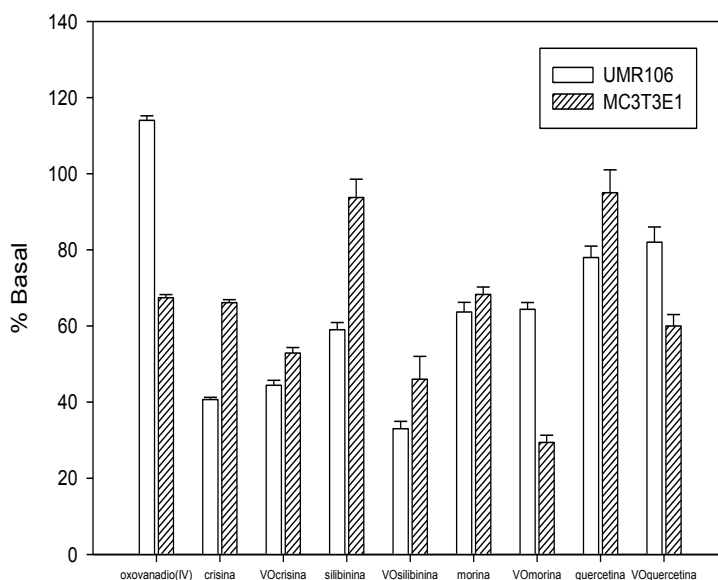


Figura 12. Comparación de la proliferación celular medida para los flavonoides y sus complejos con el catión oxovanadio(IV), y el complejo con quercetina previamente reportado²³ (a 100 μ M).

Por complejación se mantiene el efecto deletéreo en crisina (a pesar que el complejo tiene mayor capacidad total antioxidante) y es más deletéreo en el caso

²³ E.G. Ferrer, M.V. Salinas, M.J. Correa, L. Naso, D.A. Barrio, S.B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem., (2006) 11:791-801.

de VOsilibinina con un efecto antioxidante similar al ligando. En el caso de morina, el TEAC se mantiene con un valor similar por complejación y el comportamiento en células en concentración 100 μM es similar. En este último caso, el efecto antitumoral del complejo no se mejoró porque VOmorina ejerció un efecto más deletéreo sobre las células normales que en las tumorales, como había sido observado previamente para el complejo VOquercetina²³.

La comparación con la formación de especies reactivas del oxígeno dentro de las células, teniendo en cuenta que con la sonda utilizada se detectan fundamentalmente peróxidos (Figura 13) indica que en el caso de crisina nuevamente se observa menor producción de ROS en las células tumorales por complejación (mayor TEAC *in vitro*) pero los efectos deletéreos del flavonoide y de su complejo son comparables. Morina presenta una producción de ROS más alta que su complejo con un efecto deletéreo más alto en la proliferación celular en concentraciones menores que 100 μM . Recién en esa concentración se igualan sus capacidades para inhibir la proliferación celular. La capacidad antioxidante comparada con el Trolox es prácticamente la misma en ambos casos.

El flavonoide silibinina produce menor % de ROS que su complejo, con menor inhibición de proliferación (a partir de concentraciones 20 μM) aunque el valor del TEAC es comparable para ambos.

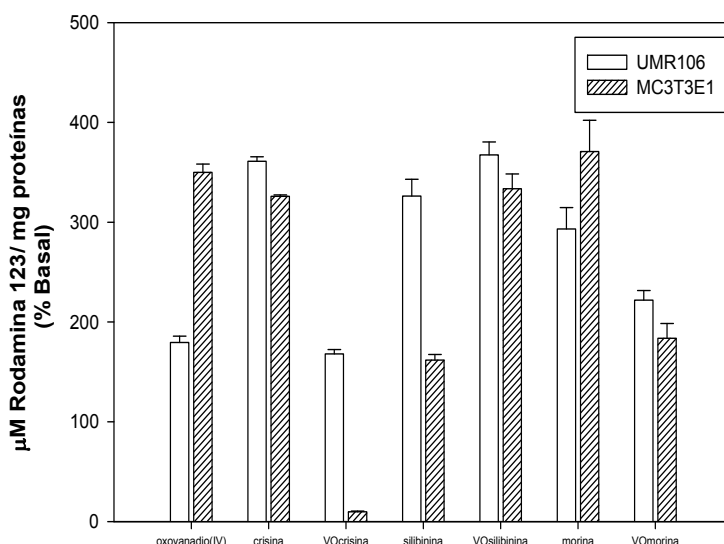


Figura 13. Comparación de la generación de las especies reactivas de oxígeno para el oxovanadio(IV), crisina, silibinina y morina y sus complejos de coordinación (a 100 μM).

En conclusión, podemos argumentar que los efectos quimiopreventivos de los flavonoides no sólo resultan de su capacidad para secuestrar radicales libres. Así, los efectos pro-oxidantes para las acciones contra el cáncer y la inducción de

la apoptosis^{24,25,26} pueden ser relevantes junto con otros mecanismos relacionados a las vías de señales celulares de transducción.

Además, entre los flavonoides estudiados se ha encontrado que el mejor candidato como agente antitumoral es silibinina debido a que no ejerce ningún efecto sobre la proliferación de las células normales, pero produce un efecto perjudicial sobre los osteoblastos tumorales. Por esta razón, es que hemos incluido en este estudio la comparación del comportamiento de las dos líneas celulares (normal y tumoral), que es de gran importancia y generalmente no se discute en la literatura.

3.3.7. Conclusiones generales

- Dentro de los ensayos biológicos se determinó la habilidad de silibinina, crisina y sus complejos con oxovanadio(IV) de clivar el ADN y se observó que ninguno de los dos poseen dicha capacidad. Por lo tanto, la interacción con el plásmido se descarta como mecanismo probable de inhibición de la proliferación.
- Se realizaron ensayos de proliferación celular, estudios morfológicos y determinación intracelular de ROS. De los tres complejos estudiados en el transcurso de esta tesis doctoral podemos concluir que VOsilibinina es el de mayor citotoxicidad sobre las células tumorales en comparación con los osteoblastos normales y que su mecanismo de acción puede estar mediado por radicales libres. Incluso se mostró en las fotografías que en la máxima concentración ensayada se encuentran células en proceso activo de apoptosis.
- Crisina y VOcrisina se comportan de la misma manera en lo que respecta a la inhibición de la proliferación de las células tumorales, por lo tanto la complejación no mejora los efectos antiproliferativos del ligando libre.
- VOmorina es más citotóxico sobre las células normales que sobre las células tumorales, debido a esto no es un buen candidato para seguir con los estudios de mecanismo de acción. Además, en las células UMR106 el efecto del ligando libre es mayor que el efecto de su complejo de coordinación con oxovanadio(IV).

²⁴ Galati G, O'Brien PJ (2004) Free Radic Biol Med 37: 287-303.

²⁵ Srinivasan P, Vadhanam MV, Arif JM, Gupta RC (2002) Int J Oncol 20:983-986.

²⁶ Tobi SE, Gilbert M, Paul N, McMillan TJ (2002) Int J Cancer 102:439-444.

Capítulo IV

4.1. Cobre

4.1.1. Generalidades

El cobre (Cu) es el tercer mineral traza más abundante en el cuerpo humano, luego del hierro y el zinc. Desde 1920 este elemento es reconocido como un nutriente esencial¹ ya que sus sales eran capaces de corregir anemias causadas por déficit alimentario². Se encuentra en todos los organismos vivos tanto en estado oxidado Cu(II) como en estado reducido Cu(I), es necesario para la supervivencia y actúa como un importante cofactor catalítico en la química de óxido-reducción de las proteínas que llevan a cabo funciones biológicas fundamentales requeridas para el crecimiento y el desarrollo de los individuos³. La dieta promedio de los humanos adultos contiene Cu en una concentración que varía entre 0,6 y 1,6 mg/día.

Mariscos, semillas, granos y nueces son los alimentos que poseen mayor concentración de Cu, mientras que frutas, verduras y carne (músculos) poseen menor concentración. Si se elimina el germen y el salvado de cualquier grano el contenido de cobre se reduce, como es el caso de la harina de trigo estándar⁴.

El agua dulce no contaminada contiene escasa concentración de Cu pero el agua de mar posee mayor cantidad y dicho valor aumenta con la profundidad, lo que explica la alta concentración de Cu en pescados y mariscos que habitan en el fondo oceánico⁵.

4.1.2. Absorción de cobre

En los seres humanos y los animales, el cobre dietario es absorbido a través de la membrana mucosa de las células que recubren el estómago y el intestino delgado. El cobre difunde a través de la capa que recubre la pared intestinal.

En aquellas personas que poseen una ingesta normal de cobre, éste se absorbe en el orden de un 55-75% y es reciclado activamente en el tracto digestivo, fluidos corporales y tejidos (particularmente el hígado). Así, el cobre dietario contribuye solo en una pequeña proporción al total reabsorbido desde saliva, jugos gástricos, bilis, fluidos pancreáticos y duodenales. Aproximadamente 1 mg de cobre se excreta por bilis diariamente, mientras que la excreción por otras vías es escasa.

El transporte de Cu(II) a través del borde en cepillo intestinal involucra dos mecanismos: utilizando un transportador saturable no dependiente de energía a concentraciones bajas del metal y por difusión activa que ocurre a altas concentraciones.

¹ E.B. Hart, H. Steenback, J. Waddell, J. Biol. Chem. (1928) 77:797-812.

² D. W. Cox, Br. Med. Bull. (1999) 55:544-555.

³ M.C. Linder, Biochemistry of copper. New York: Plenum Press (1991).

⁴ M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Am. J. Clin. Nutr. (1996) 63:797S-811S.

⁵ R. Dunham, H.E. Smith, Proc. Water Qual. Technol. Conf. (1992) 1991:341-352.

La velocidad de transporte de cobre aumenta durante el embarazo y en ciertas enfermedades como cáncer, por ejemplo, disminuye (al menos en ratas femeninas) luego de un tratamiento con estrógenos⁶.

El 80 % del cobre absorbido dentro de las células es retenido en el citosol, unido a glutatión, metalotioneínas (proteínas citosólicas de bajo peso molecular) y/o proteínas de tamaño similar.

4.1.3. Consumo y transporte de cobre

En la sangre portal y en los fluidos intestinales existen proteínas que presentan una alta afinidad y especificidad de unión al cobre. Aunque la albúmina es la proteína plasmática más abundante, solo un 10-12% del cobre plasmático se une a ella. En ratas y humanos se identificaron, además, otras dos proteínas: ceruloplasmina y transcupreína⁵. El cobre puede ser transportado en la sangre, también, por aminoácidos, péptidos y ácidos grasos, aunque estos complejos no son importantes en condiciones fisiológicas⁷. Una vez en el plasma, el cobre unido a la ceruloplasmina está disponible para ser absorbido por el resto de los tejidos del organismo⁸.

4.2. Enzimas dependientes de cobre

El cobre se encuentra asociado con varias enzimas intracelulares y extracelulares que están involucradas en diversos procesos metabólicos incluyendo: biosíntesis de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), transporte de hierro, síntesis de tejido conectivo y defensa antioxidante⁹.

Una de las enzimas más abundante es la Cu,Zn superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), involucrada en remover el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esta enzima omnipresente y altamente estable fue descubierta por Mann y Keilin a fines del año 1930. En primer lugar esta enzima fue aislada de eritrocitos bovinos y fue llamada "hemocupreína" y luego se aisló una proteína similar a partir de eritrocitos humanos que fue llamada "eritrocupreína"¹⁰. Ambas tienen un peso molecular de 32 kDa y consisten en dos subunidades. Cada subunidad tiene un ión Cu(II) en su sitio activo (Figura 1) y un ión Zn(II) que cumple una función estructural, estabilizando la estructura de la proteína y no participa de la actividad enzimática. Cada subunidad consiste en una estructura de hoja β -plegada formada por 8 hebras antiparalelas dispuestas como un cilindro aplanado con 3 lazos externos. El ión Cu(II) interacciona con 4 nitrógenos imidazólicos de restos de histidina en

⁶ H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, *Biomed. Pharmacother.* (2003) 57:386-398.

⁷ G. Crisponi, V.M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, *Coord. Chem. Rev.* (2010) 254:876-889.

⁸ M. C. Linder, L. Wooten, P. Cerveza, S. Cotton, R. Shulze, N. Lomeli, *Am. J. Clin. Nutr.* (1998) 67:965S-971S.

⁹ Etcheverry SB, Williams PAM. In: *New Developments in Medicinal chemistry. Medicinal chemistry of copper and vanadium bioactive compounds.* Editors: Marta P. Ortega and Irene C. Gil. Nova science publishers, inc., Hauppauge NY (2009) 5:105-129 (2009).

¹⁰ J.M. Mccords, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* (1969) 244:6049-6055.

el sitio activo¹¹. Uno de esos grupos coordina simultáneamente al Cu(II) y al Zn(II) formando un puente entre ellos. La esfera de coordinación del Zn(II) se completa con 2 N imidazólicos y un oxígeno proveniente de un grupo carboxilato perteneciente a un ácido aspártico.

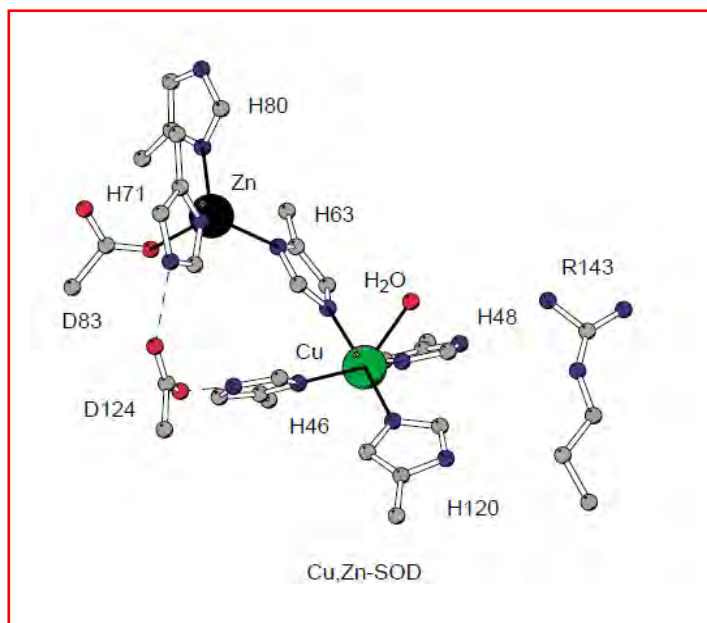


Figura 1. Esquema del sitio activo de la enzima Cu,Zn-SOD. La molécula de agua representa el sitio de unión al sustrato. Las líneas llenas indican uniones y las líneas punteadas indican puentes de hidrógeno.

En cerebro, hígado, eritrocitos, tiroides, corteza renal y glándulas adrenales se encuentran niveles particularmente altos de Cu,Zn-SOD¹².

Asimismo, existen otras isoenzimas. Una denominada EC-SOD (SOD extracelular), la cual tiene un peso molecular aproximado de 135 kDa y también contiene Cu y Zn, pero a diferencia de la anterior, esta enzima está formada por 4 subunidades y se encuentra en los espacios intersticiales de tejidos y en fluidos extracelulares.

Otra con Manganeseo (Mn-SOD), que es un homotetrámero de 96 kDa y contiene un ión de Mn(III) en cada subunidad. El ión metálico es capaz de cambiar su estado de oxidación desde Mn(III) a Mn(II), volviendo nuevamente a Mn(III), durante los dos pasos que constituyen la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ ¹³.

Otra isoenzima contiene un único ion Fe(III) (Fe-SOD) en su sitio activo, coordinado en una bipirámide trigonal, a tres nitrógenos de histidina, un grupo carboxilato proveniente de un residuo de aspartato (Asp^-) y una molécula de OH^-

¹¹ G. A.A. Ferns, D. J. Lamb, A. Taylor, *Atheroscl.* (1997) 133:139-152.

¹² J.W. Hartz, S. Funakoshi, H.F. Deutsch, *Clin. Chim. Acta* (1973) 46:125-132.

¹³ A.F. Miller, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2004) 8:162-168.

/H₂O. Se encuentra fundamentalmente en el citosol de procariotas y en algunas plantas verdes.

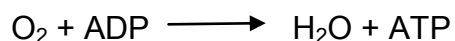
La otra isoenzima (Ni-SOD) contiene un ión de Ni(III) por monómero, pero existen informes contradictorios sobre si la enzima es tetramérica o hexamérica. La reacción de dismutación comprende dos etapas, en la primera, el Ni(III) se reduce a Ni(II) y en la segunda este último se vuelve a oxidar. Por lo tanto, en el sitio activo de la enzima existen ambos estados de oxidación que corresponden a los estados de oxidación formales del ión metálico. El Ni(III) se encuentra en un entorno de pirámide de base cuadrada coordinando a un grupo amino y un nitrógeno de un imidazol perteneciente a un residuo de histidina (His-1), un nitrógeno de una amida y un azufre de un grupo tiolato de un residuo de cisteína (Cys-2) y un azufre de un grupo tiolato de un residuo de cisteína (Cys-6). Luego de la reducción del ion metálico, el Ni(II) adquiere una geometría cuadrado plana por pérdida del ligando en posición axial (His-1)¹⁴.

Otras proteínas de Cu involucran la ceruloplasmina, la lisil oxidasa, la citocromo C oxidasa y la dopamina β-hidroxilasa.

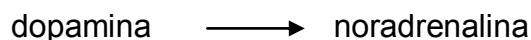
La ceruloplasmina es la proteína plasmática más abundante que contiene Cu. Se trata de una α-2-globulina con un peso molecular de 135 kDa y consiste en un péptido simple de 1050 aminoácidos, 3 oligosacáridos y 7 iones Cu(II) que pertenecen a 3 clases de coordinación¹⁵. Su papel fisiológico aún no está claro pero dependiendo de las condiciones puede actuar como antioxidante o pro-oxidante. Presenta actividad ferroxidasa (cataliza la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³) y está involucrada en el metabolismo del hierro⁵.

La lisil oxidasa es una aminooxidasa dependiente de cobre que inicia el ensamblaje covalente de las fibras de colágeno y elastina de la matriz extracelular. Esta enzima cataliza la desaminación oxidativa de residuos de lisina e hidroxilisina dando lugar a la formación de peptidil semialdehídos altamente reactivos que condensan entre sí formando enlaces tanto intramoleculares como intermoleculares. De este modo, la actividad de esta enzima determina las propiedades mecánicas de la matriz extracelular y asegura su integridad, su estabilidad y su correcto funcionamiento¹⁶.

Existen además otras enzimas de cobre que actúan catalizando diferentes reacciones. Así por ejemplo, la citocromo C oxidasa cataliza la siguiente reacción:



Y la enzima dopamina β-hidroxilasa cataliza la siguiente reacción:



¹⁴ J. Wuerges, Jin-Won Lee, Yang-In Yim, Hyung-Soon Yim, Sa-Ouk Kang, K. Djinovic Carugo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 23:8569-8577.

¹⁵ M. Herve, A. Garnier, L. Tosi, M. Steinbuch, Eur. J. Biochem. (1981) 116:177-183.

¹⁶ A. Guadall, O. Calvayrac, M. Orriols, J. Martínez-González, C. Rodríguez, Clin. Invest. Arterioscl. (2011) 23:168-174.

4.3. Cobre como pro-oxidante

La formación de ROS durante la exposición aguda de las células de hígado a la sobrecarga de Cu es considerada un evento crucial que conduce a la muerte celular.

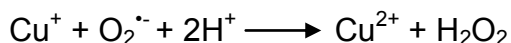
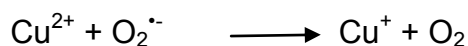
La utilidad biológica del cobre se deriva principalmente de su aptitud para cambiar entre la forma oxidada (Cu(II)) y la forma reducida (Cu(I)). Los efectos de los metales como cobre y hierro se caracterizan por los estados de oxidación variables que dependen notablemente de la forma predominante del metal, del potencial redox y el entorno de coordinación. La captación de cobre y los efectos oxidativos intracelulares son causados, principalmente, por el ión cúprico mientras que los efectos sobre el transporte de membrana son debidos al ión cuproso que probablemente se forma allí mismo, donde los grupos sulfhidrilo actúan como agentes reductores. Se supone que el Cu(I) se encuentra en la membrana celular y dentro de la célula y su potencial redox es más bajo que en sangre.

Los mecanismos bioquímicos y celulares por los cuales el cobre puede producir daño o necrosis celular aún se están debatiendo. Una de las hipótesis consiste en que un exceso de cobre podría disparar el daño celular peroxidativo por producción de ROS con el consecuente daño oxidativo.

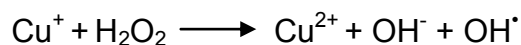
En hepatocitos incubados con altas concentraciones de Cu(II) se ha identificado a los lisosomas como principal sitio de producción de ROS mientras que otro estudio realizado con microscopio de barrido confocal indica que la producción de ROS ocurre en la mitocondria, la cual juega un papel fundamental en la muerte celular por apoptosis¹⁷.

El cobre puede participar en diversas reacciones radicalarias, incluyendo:

(i) conversión del anión radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (dismutación)



(ii) conversión de peróxido de hidrógeno en radical hidroxilo



(iii) conversión de tiol (R-SH) en radical tiol (RS[•])

Como ya hemos visto, la formación de estos radicales es responsable de la peroxidación lipídica de membranas, oxidación directa de proteínas, ruptura de ADN y ARN. Además de participar en la generación de ROS, el cobre puede manifestar su toxicidad a través del desplazamiento de otros cofactores metálicos de sus sitios de unión con ligandos naturales. Por ejemplo, el reemplazo de Cu(II)

¹⁷ G. Crisponi, V. Ma. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, Coord. Chem. Rev. (2010) 254:876-889.

por Zn(II) en los sitios de unión al ADN de los dedos de Zn pertenecientes a los receptores de estrógenos da lugar a una proteína defectuosa, alterando su papel en la vía de transducción de señales⁵.

4.4. Cobre y enfermedades asociadas

Se han identificado dos anormalidades genéticas relacionadas con el metabolismo del cobre:

-Enfermedad de Menkes: Es un desorden letal multisistémico recesivo ligado al cromosoma X, caracterizado por un déficit generalizado de cobre. Sus características clínicas derivan de la disfunción de varias enzimas dependientes de cobre. La enfermedad se debe a mutaciones en un gen (ATP-7A) que codifica una proteína intracelular transportadora de cobre (ATPasa de tipo P). Los síntomas incluyen retraso del crecimiento intrauterino y deterioro neurológico progresivo, con aparición de hipotonía axial, espasticidad, convulsiones e hipotermia, que aparecen durante los primeros meses de vida. Se llama también el “síndrome del cabello ensortijado” debido al aspecto del mismo¹⁸. Danks y colaboradores¹⁹ encontraron que los pacientes que padecen esta enfermedad presentan niveles reducidos de cobre hepático, urinario y sérico y disminución de la absorción de cobre pero la concentración de este elemento en eritrocitos es normal y presentan un correcto manejo del metal administrado por vía intravenosa.

-Enfermedad de Wilson: es un trastorno del metabolismo del cobre que se hereda de forma autosómica recesiva. Es causada por mutaciones en el gen ATP-7B que codifica para una ATPasa tipo P implicada en el transporte de cobre dentro del hepatocito, tanto al interior del aparato de Golgi para su incorporación a la apoceruloplasmina como en la excreción biliar del exceso de metal del organismo.

El defecto en la función de esta proteína da lugar a la acumulación progresiva de cobre, primero en el hígado y posteriormente en el encéfalo y en otros tejidos, con manifestaciones clínicas principalmente hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y oftalmológicas. En ausencia de tratamiento, esta enfermedad progresa hacia la muerte debido a los efectos tóxicos por daño oxidante²⁰.

Además de las enfermedades anteriormente vistas, un desbalance en el metabolismo del cobre puede dar lugar a enfermedades como cáncer (se encontró que la enzima lisil oxidasa es requerida para la metástasis inducida por hipoxia²¹), diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer²², defectos estructurales y funcionales cardiovasculares, desórdenes en el metabolismo de los huesos y enfermedades musculares²³.

¹⁸ Z. Turner, L. B. Møller, Eur. J. Hum. Genet. (2010) 18:511-518.

¹⁹ D.M. Danks, P.E. Campbell, B.J. Stevens, V. Mayne, E. Cartwright, Pediatr. (1972) 50:188-201.

²⁰ M. D. Hernández Villén, S. López Martínez, Rev. Lab. Clin. (2011) 4:102-111.

²¹ J.T. Erler, K.L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhöfer, C. Kong, Q-T. Le, J-T.A Chi, S.S. Jeffrey, A.J. Giaccia, Nature (2006) 440:1222-1226.

²² J. Kang, C. Lin, J. Chen, Q. Liu, Chem-Biol. Interact. (2004) 148:115-123.

²³ X. Ding, H. Xie, Y. James Kang, J. Nutr. Biochem. (2011) 22:301-310.

4.5. Complejos de cobre como probables agentes terapéuticos

El estudio de complejos de coordinación con Cu(II) resulta de interés en vista de sus potenciales aplicaciones para los mismos tanto como suplementos dietarios como su capacidad de actuar como agentes terapéuticos. Ejemplos de sus potenciales usos como agentes anticancerígenos los reportamos a continuación.

Se ha investigado, por ejemplo, el efecto del complejo [Cu(4-Mecdoa)(fen)₂] donde (fen=fenantrolina, 4-Mecdoa=4-metilcumarina-6,7-dioxacetato) sobre un par de líneas celulares tumorales y se encontró que inhibe la proliferación de: A-498 (adenocarcinoma de riñón humano, CI_{50} : 2,0 ± 1,2 μM) y Hep-G2 (carcinoma hepatocelular humano, CI_{50} : 1,3 ± 0,8 μM)²⁴.

El complejo [Cu(apcc)Cl₂] (apcc=N¹-(2-acetilpiridina)piridina-2-carboximidazona) es un potente agente antiproliferativo contra la línea B16F10 (melanoma de ratón, CI_{50} =6,8 μM)²⁵.

El complejo [Cu₂(μ-HL₁)₂μCl₂](HL₁)₂Cl₂] (L es 6-(2clorobencilamino)purina) es un potente inhibidor del crecimiento de varias líneas celulares tumorales: B16-F0 (melanoma de ratón, CI_{50} =8,20 μM), G361 (melanoma maligno humano, CI_{50} =20 μM), HOS (sarcoma osteogénico humano, CI_{50} =23 μM), MCF7 (adenocarcinoma de mama, CI_{50} =24 μM)²⁶.

Existen algunos complejos de Cu(I) como el tetra(N-metil-1,3,5-triazo-7-fosfoadamantanocobre(I) tetrafluoroborato que es un agente antiproliferativo efectivo contra las líneas tumorales HCT-15 (tumor de colon, CI_{50} =19,2 μM), HeLa (tumor de cérvix, CI_{50} =7,6 μM), A549 (tumor de pulmón, CI_{50} =8,5 μM)²⁷, HL60 (leucemia promielocítica, CI_{50} =4,8 μM)²⁸.

Los complejos de cobre(II) poseen, también, propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, el complejo Cu(L₁)₂Cl₂.H₂O (L: 1-bencil-2-aminobenzimidazol) es un agente antibacteriano más activo que el ligando libre sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.* y *Sarcina lutea* pero ambos son inactivos frente a la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*²⁹.

Por otro lado un complejo formado por Cu(II) y el antiinflamatorio diclofenac (compuesto sintético no esteroide) demostró una actividad antiinflamatoria mayor que el correspondiente ligando libre³⁰.

Existen complejos de cobre(II) que poseen propiedades antioxidantes, por ejemplo el complejo de Cu(II)-curcumina (1:1) es efectivo como agente SOD-simil

²⁴ B. Thati, A. Noble, B. S. Creaven, M. Walsh, K. Kavanagh, D. A. Egan, Eur. J. Pharmacol. (2007) 569:16-28.

²⁵ N. H. Gokhale, S. S. Padhye, S. B. Padhye, C. E. Anson, A. K. Powell, Inorg. Chim. Acta (2001) 319:90-94.

²⁶ Z. Trávníček, M. Maloň, Z. Sindelář, K. Doležal, J. Rolčík, V. Kryštof, M. Strnad, J. Marek, J. Inorg. Biochem. (2001) 84:23-32.

²⁷ M. Porchia, F. Benetollo, F. Refosco, F. Tisato, C. Marzano, V. Gandin, J. Inorg. Biochem. (2009) 103:1644-1651.

²⁸ C. Marzano, M. Pellei, S. Alidori, J. Inorg. Biochem. (2006) 100:299-304.

²⁹ S. O. Podunavac-Kuzmanović, S. L. Markov, L. S. Vojinovi, APTEFF (2004) 35:247-254.

³⁰ F.-Ur-Rehman, M. F. Khan, I. U. K. Marwat, G. M. Khan, H. Khan, J. Chem. Soc. Pak. (2010) 32:462-466.

($CI_{50}=6,7 \mu M$) y también inhibe la peroxidación lipídica (98%)³¹. Asimismo, el complejo formado por Cu(II) y 3-aminoquinoxalina-2-carbonitrilo N¹,N⁴-dióxido posee actividad superóxido-dismutasa similar ($CI_{50}=18 \mu M$)³². Además, son farmacológicamente activos los complejos de Cu(II) con aminoácidos ($CI_{50}=30,3-37,2 \mu M$)³³ y los complejos de Cu(II) con sulfonamidas ($CI_{50}=38-73 \mu M$)^{34,35}.

4.6. Algunos aspectos de la química del cobre

4.6.1. Estados de oxidación y estereoquímica

El cobre presenta una importante química de coordinación. El estado de oxidación varía desde 0 hasta +4, predominando el estado de oxidación +2. Aún no se ha confirmado la presencia de Cu(0) en compuestos estables, aunque podría aparecer como intermediario en algunas reacciones³⁶.

El ión cuproso, Cu(I), tiene una configuración electrónica d^{10} de capa llena. Se observa una gran variedad de geometrías en los complejos de coordinación que presentan este ión (Tabla 1).

Generalmente, en los complejos de coordinación, el cobre(II) se encuentra en un entorno de coordinación tetragonal, con 4 enlaces cortos en el plano ecuatorial y uno o dos enlaces más largos en el plano axial³⁷.

El Cu(III) es inestable y se forma por la reacción de Cu(II) en presencia de H₂O₂ o del anión ascorbato. Se ha demostrado que el Cu(III) está presente en reacciones relacionadas con procesos biológicos que involucran cuproenzimas y donde intervienen péptidos como ligandos³⁸.

El estado de oxidación +4 es raro, se conoce su presencia en la red cristalina Cs₂CuF₆³⁹.

El número de coordinación y la geometría de los complejos varían según el estado de oxidación. En la Tabla 1 se resumen los principales estados de oxidación y la estereoquímica del cobre.

³¹ A. Barik, B. Mishra, A. Kunwar, R. M. Kadam, L. Shen, S. Dutta, S. Padhye, A. K. Satpati, Hong-Yu Zhang, K. Indira Priyadarsini, *Eur. J. Med. Chem.* (2007) 42:431-439.

³² C. Urquiola, D. Gambino, M. Cabrera, M. L. Lavaggi, H. Cerecetto, M. González, A. López de Cerain, A. Monge, A. J. Costa-Filho, M. H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* (2008) 102:119-126.

³³ E.J. Baran, *Acta Farm. Bonaerense* (1985) 4:125-133.

³⁴ R.M. Tótaro, Torre, E. Friet, I. Viera, E. Kremer, E.J. Baran, *Acta Farm. Bonaerense* (1993) 12:73-78.

³⁵ E. Kremer, G. Facchin, E. Estévez, P. Alborés, E.J. Baran, J. Ellena, M.H. Torre, *J. Inorg. Biochem.* (2006) 100:1167-1175.

³⁶ F.A. Cotton and G. Wilkinson. "Advanced Inorg. Chem." 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York (1988).

³⁷ R.C. Conry, Copper: Inorganic & Coordination Chemistry, in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (2005).

³⁸ G. Hogarth, A. Pateman, S.P. Redmon, *Inorg. Chim. Acta* (2000) 306:232-236.

³⁹ C.E. Housecroft, A.G. Sharpe, "Inorg.Chem". 2nd Ed. Pearson Education Limited, Edimburgh (2005).

Estado de oxidación	Número de coordinación	Geometría
Cu(I) (d^{10})	2	Lineal
	3	Trigonal plana
	4	Tetraédrica
Cu(II) (d^9)	4	Tetraédrica distorsionada, Plano cuadrada
	5	Bipirámide trigonal, Pirámide cuadrada
	6	Octaédrica distorsionada
Cu(III) (d^8)	4	Plano cuadrada
	5	Bipirámide trigonal
	6	Octaédrica

Tabla 1. Estados de oxidación y estereoquímica del cobre.

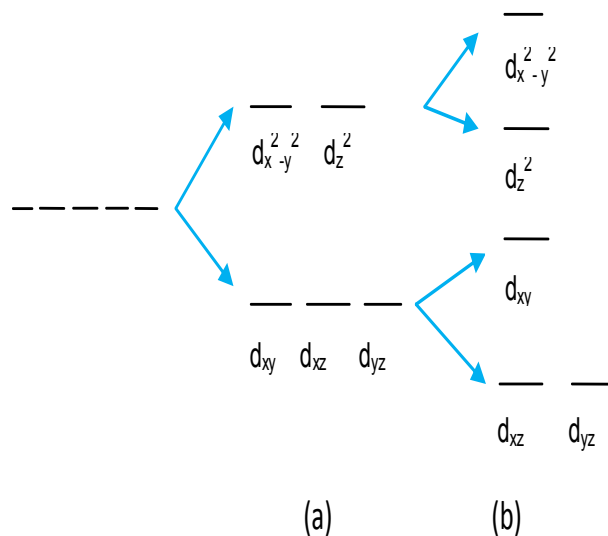
4.6.2. Espectros electrónicos característicos para cobre(II)

El Cu(II) posee la configuración electrónica $[Ar]3d^9$, que conduce a la existencia de un único término espectral (2D). En presencia de un campo de ligandos, este término se desdobra para dar distintos niveles, cuyo número y energía depende del tipo de ligandos, del número de coordinación y de la geometría adoptada por el complejo⁴⁰.

Así, para un campo de ligandos idealmente octaédrico, dicho término se desdobra en dos niveles: 2E_g y $^2T_{2g}$. Los 9 electrones d del cobre (Cu(II)) se distribuyen entre los 5 orbitales d, quedando un lugar vacío en uno de los orbitales de mayor energía. Debido a esta ocupación desigual de los orbitales eg, el complejo sufre una distorsión conocida como efecto de Jahn Teller, dando lugar a una elongación tetragonal a lo largo del eje z y a una contracción en el plano ecuatorial si el electrón desapareado se encuentra en el orbital dz^2 (o viceversa si el electrón impar se encuentra en el orbital dx^2-y^2)⁴¹ originando una geometría octaédrica elongada o comprimida del cubo, según el eje z respectivamente, generando un prisma tetragonal. En el esquema 1 se muestra el desdoblamiento de los orbitales d en un entorno tetragonal elongado según el eje z.

⁴⁰ B. J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* (1970) 5:143-207.

⁴¹ E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* (2006) 45:8012-8025.



Esquema 1: Desdoblamiento de orbitales d para (a) entorno octaédrico y (b) distorsión tetragonal.

En general todos los complejos que presentan Cu en su estructura son de color verde o azul debido a la presencia de una banda de absorción en la región entre 600-900 nm del espectro (Figura 2)⁴².

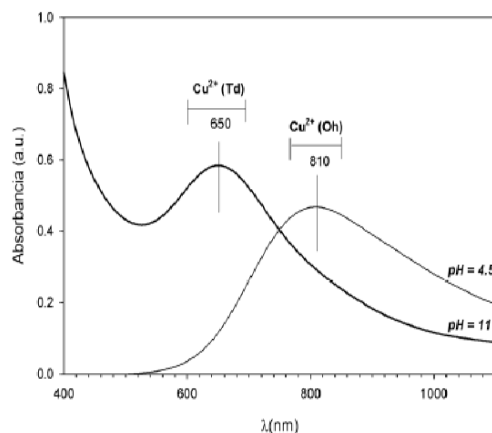


Figura 2 Espectro de absorción en el rango visible para una solución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a dos valores de pH (4,5 y 11). Tomado de Fournier y colaboradores⁴¹.

Los estados fisiológicamente más importantes del cobre son (I) y (II), siendo este último el más frecuente. Los distintos tipos de Cu(II) que podemos encontrar en los sistemas biológicos son⁴³:

⁴² M. Fournier, C. Louis, M. Che, M. Chaquin, P. Masure, P.J. Catal. (1989) 119:400-414.

⁴³ E. J. Baran, "Química bioinorgánica", McGraw-Hill Interamericana - 1ª Ed. (1994).

- (i) **Cobre de tipo 1:** presenta una banda de absorción muy intensa, alrededor de los 600 nm, con coeficiente de absorptividad molar unas trescientas veces más elevado que el de los complejos usuales de Cu (II). La banda de absorción se debe al color azul que caracteriza a las proteínas que contienen este tipo de cobre.
- (ii) **Cobre de tipo 2:** es paramagnético y posee el espectro electrónico típico de los complejos habituales de Cu(II).
- (iii) **Cobre de tipo 3:** está constituido por un par de iones Cu(II) sometidos a fuerte acoplamiento antiferromagnético, lo que convierte al sistema en diamagnético. Estos sistemas se caracterizan por presentar una banda de absorción muy intensa alrededor de los 300 nm. Este tipo de cobre no se detecta por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.

4.6.3. Espectro Infrarrojo (FTIR)

Además de las bandas características para cada tipo de ligando, cuando se analizan los complejos de Cu(II) interesa la identificación de frecuencias de estiramiento típico derivados del enlace del centro metálico al ligando.

Así por ejemplo, en la Tabla 2 se observan las frecuencias típicas para el modo de estiramiento de Cu(II) coordinado a diferentes átomos en algunos complejos de coordinación.

Compuesto	ν (cm ⁻¹)
[Cu(sac) ₂ (4-cianop) ₂ H ₂ O] ⁴⁴	451 (ν(Cu-O))
[Cu(sac) ₂ (4-aminop) ₂ H ₂ O] ³⁴	450 (ν(Cu-O))
CuCl ₂ (BAAPTS)H ₂ O ³²	420 (ν(Cu-N)), 310 (ν(Cu-S))
Cu-Quercetina ⁴⁵	603 (ν(Cu-O))
Cu(PBH) ₂ ⁴⁶	407(ν(Cu-N))

Tabla 2. Frecuencias de estiramiento típicas para cobre coordinado a diferentes átomos

sac: sacarinato, cianop:cianopiridina, aminop: aminopiridina,
BAAPTS: antipirentiosemicarbazona, HPBH: 2-piridincarboxaldehídobenzoilhidrazona

4.6.4. Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

El espectro EPR del cobre da información valiosa con respecto a estados de oxidación, tipo de ligando y simetría. Como se mencionó anteriormente, los datos experimentales que resultan de un espectro de EPR para Cu(II) son las componentes del tensor giromagnético ($g_{||}$ y g_{\perp} , para simetría axial, siendo $g_{iso}=1/3$

⁴⁴ E.G. Ferrer, N. Baeza, L.G. Naso, E.E. Castellano, O.E. Piro, P.A.M. Williams, J. Trace Elem. Med. Biol. (2010) 24:20-26.

⁴⁵ S. Birjees Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, M.I. Bhangar, Spectrochim. Acta Part. A (2009) 71:1901-1906.

⁴⁶ S. Banerjee, S. Mondal, W. Chakraborty, S. Sen, R. Gachhui, R. J. Butcher, A.M. Z. Slawin, C. Mandal, S. Mitra, Polyhedron (2009) 28:2785-2793.

($g_{\parallel} + 2g_{\perp}$); ó g_z , g_x y g_y para simetría rómbica y la constante de acoplamiento hiperfino (A_{\parallel} y A_{\perp} para simetría axial, $A_{iso} = 1/3(A_{\parallel} + 2A_{\perp})$; ó A_z , A_x y A_y para simetría rómbica) los cuales permiten deducir la simetría del entorno sobre el sitio magnético, el estado fundamental del ion metálico, el grado de deslocalización electrónica así como también la naturaleza de los ligandos.

El átomo de cobre tiene un espín nuclear $I = 3/2$ y la existencia de más de un isótopo (^{63}Cu y ^{65}Cu) genera un desdoblamiento hiperfino típico de esta especie debido a las interacciones de espín electrón-núcleo. Las reglas de selección ($\Delta M_s = \pm 1$; $\Delta M_l = 0$) conducen al registro de un espectro con un desdoblamiento hiperfino que resulta en 4 bandas anchas (isotópicamente puras) de intensidad 1:1:1:1 para los complejos de cobre (II). Para esta especie la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino es mayor en magnitud que la componente perpendicular y generalmente se encuentra bien resuelta en el espectro representada por la separación equidistante de los cuatro componentes en la región paralela del espectro (Figura 3).

A modo de ejemplo (Figura 3) se muestra el espectro EPR de una solución de 2,5 mM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (especie mayoritaria, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a pH 3,6) a 138 K y en presencia de glicerol 20 % (p/p) dando origen a los siguientes valores de los componentes del tensor g:

$$g_{\parallel} = 2,4198; g_{\perp} = 2,083 \text{ (espectro anisotrópico)}$$

y el espectro a temperatura ambiente dio da origen a un valor de g^{47} :

$$g_{iso} = 2,1948 \text{ (espectro isotrópico)}$$

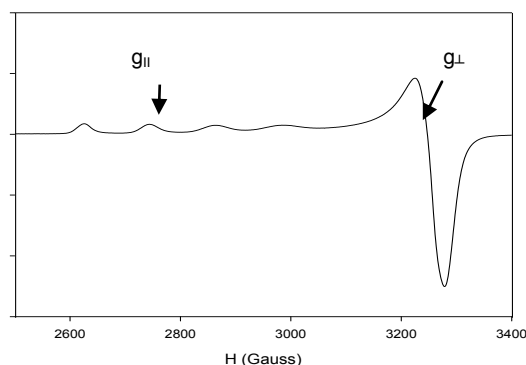


Figura 3. Típico espectro EPR de $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, en banda X. Tomado de Francois y colaboradores⁴⁴.

Mediante la simulación de los espectros experimentales podemos extraer los valores para los componentes del tensor g y de la constante de acoplamiento hiperfino A.

De manera ilustrativa, en la Tabla 3 se muestran dichos parámetros para algunos complejos de Cu(II).

⁴⁷ J. Francois, C. Heitz, M.M. Mestdagh, Polymer (1997) 38:5321-5332.

Compuesto	Sitio de coordinación	$g_{ }$	g_{\perp}	$A_{ }$ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	A_{\perp} ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)
$[\text{Cu}(\text{fen})_3]^{2+48}$ (e)	CuN_6	2,273	2,062	161	36
$[\text{Cu}(\text{ImH})_4]^{2+49}$	CuN_4	2,31	2,06	154	14,9
$\text{Cu}(\text{salen})^{50}$	CuO_4	2,212	2,050	195	30
$\text{CuPyt}_2\text{-en}^{51}$	CuN_2S_2	2,020	2,140	184	31

Tabla 3. Valores de g y A para algunos complejos de Cu(II).

fen: fenantrolina, ImH: imidazol, salen: N,N'-etilenebis(salicilidenaminato), Pyt: 1-fenil-3-formil-2(1H)-piridintiona, en: etilendiamina
(e): distorsión por elongación

A su vez puede también existir lo que se conoce como estructura superhiperfina en el espectro (que no necesariamente siempre es observada), esto ocurre cuando los electrones d están deslocalizados, en gran medida, sobre los ligandos y así, si los ligandos tienen por sí mismos espín nuclear (por ejemplo el átomo de nitrógeno tiene un espín nuclear de 1), se espera que su patrón de desdoblamiento hiperfino se superponga a estas bandas. En la Figura 4 se muestran los espectros EPR de dos complejos de cobre(II) que presentan una estructura superhiperfina en la región de g_{\perp} ⁵².

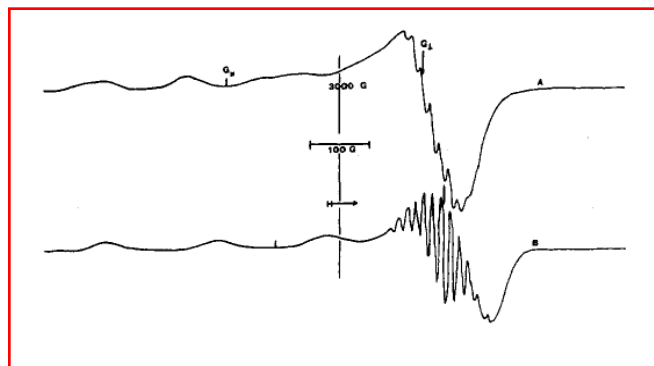


Figura 4. Espectro EPR de complejos Cu(II)-imidazol en una mezcla agua/DMSO (1:1) a 113 K.
A: $\text{Cu}(\text{imH})_4^{2+}$, $x = 4,0$; 9,070 GHz, B: $\text{Cu}(\text{imH})_5^{2+}$, $x = 10,0$, 9,073 GHz

Por otra parte es conocido el hecho que para complejos de Cu(II) donde los ligandos están dispuestos en un entorno octaédrico distorsionado, es decir cuatro ligandos dispuestos aproximadamente en un plano (que incluye al ión metálico) y otros dos ligandos dispuestos en una línea recta perpendicular al plano

⁴⁸ H.C. Allen, G.F. Kokoszka, R.G. Inskeep, J. Am. Chem. Soc. (1964) 86:1023-1025.

⁴⁹ S. Siddiqui, R.E. Shepherd, Inorg. Chem. (1986) 25:3869-3876.

⁵⁰ S. Deshpande, D. Srinivas, P. Ratnasamy, J. Catalysis (1999) 188:261-269.

⁵¹ S. Mandal, G. Das, R. Singh, R. Shukla, P. K. Bharadwaj, Coord. Chem. Rev. (1997) 160:191-235

(disposición axial) más alejados, éstos últimos se encuentran más débilmente unidos al centro metálico y por tanto presentan una influencia menor sobre las propiedades magnéticas y ópticas del complejo. Para estos complejos, la secuencia $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,00$ indica que el electrón desapareado del ion Cu(II) ocupará preferentemente el orbital $d_{x^2-y^2}$ ⁵³. A su vez, según Kivelson y Neiman⁵⁴, el valor de g_{\parallel} está sensiblemente relacionado con el grado de covalencia en la interacción metal-ligando, de modo que generalmente se cumple lo siguiente:

- entorno iónico: $g_{\parallel} > 2,3$.
- entorno covalente: $g_{\parallel} < 2,3$

Una forma de asegurarse la evaluación del grado de interacción entre los centros de Cu(II) y la geometría en los sólidos cristalinos es utilizar las siguientes relaciones:

- (i) Para dos valores de g , donde el menor valor de g sea $> 2,0$, se calcula

$$G = (g_{\parallel} - 2) / (g_{\perp} - 2)$$

y si el valor resulta entre 4,0-4,5 la interacción sería despreciable⁵⁵.

- (ii) Para tres valores de g , se calcula el parámetro

$$R = (g_2 - g_1) / (g_3 - g_2)$$
⁵⁶

siendo $g_3 > g_2 > g_1$, respectivamente. Si $R > 1$, entonces el estado fundamental sería predominante d_z^2 , mientras que si $R < 1$, el estado fundamental correspondería al orbital $d_{x^2-y^2}$.

⁵³ G. Verquin, G. Fontaine, E. Abi-Aad, E. Zhilinskaya, A. Aboukais, J.L. Bernier, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. (2007) 86:272-278.

⁵⁴ D. Kivelson, R. Neiman, J. Chem. Physics (1961) 35:149-155.

⁵⁵ B.J. Hathaway, D.E. Billing, Coord. Chem. Rev. (1970) 5:143-207.

⁵⁶ S. Chandra, L.K. Gupta, Spectrochim. Acta, Part A (2005) 61:269-275.

Capítulo V

5.1. Complejos de cobre(II) con los ligandos sacarina, 4-aminopiridina y 4-cianopiridina

5.1.1. Aspectos generales sobre sacarina, 4-aminopiridina y 4-cianopiridina

La sacarina (1,2 benzotiazol-3(2H)-ona 1,1 dióxido, H_{sac}) (Figura 1) es uno de los agentes endulzantes artificiales no calórico más conocido. Inicialmente los estudios de interacción de la sacarina con metales biológicamente relevantes se centraron en el hecho que se sospechaba que estos compuestos eran carcinogénicos, aunque esa teoría fue actualmente descartada¹.

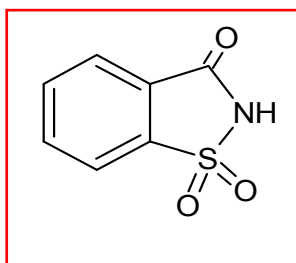


Figura 1. Estructura de la sacarina

La sacarina es un ligando polifuncional que presenta una química muy versátil. Puede comportarse como²:

- 1) un ion (coordinado o formando una sal con un catión)
- 2) un ligando que coordina a través de:
 - (i) el átomo de nitrógeno
 - (ii) el átomo de oxígeno perteneciente al grupo carbonilo
 - (iii) un átomo de oxígeno perteneciente al grupo sulfonilo
 - (iv) el átomo de nitrógeno y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo
- 3) una molécula neutra
- 4) varios modos anteriores en el mismo compuesto

En el marco del estudio de complejos de sacarina con actividades biológicas reconocidas, se han realizado varias investigaciones y, entre ellas, se

¹ E.J. Baran, Quimica Nova (2005) 28:326-328.

² G. Jovanovski, CCACAA (2000) 73:843-868.

ha encontrado que tanto la sacarina como sus derivados y los sacarinatos de algunos metales son inhibidores enzimáticos³. Los complejos de Zn(II) y Cu(II) ($[\text{Zn}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) muestran ciertos efectos inhibitorios, *in vitro*, sobre la enzima anhidrasa carbónica. Ese mismo complejo de Zn(II) con sacarina ha sido investigado como un posible aditivo terapéutico para dentífricos⁴.

Entre otras de las observaciones realizadas se encontró que ciertos complejos de fórmula general $[\text{M}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M=Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) presentan actividad superóxido dismutasa símil, siendo el complejo $[\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ el que presenta mayor actividad⁵.

También se han sintetizado y caracterizado una serie de compuestos de coordinación de oro con el ligando sacarinato ($\text{M}[\text{Au}(\text{sac})_2]$, donde M= Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $[(\text{PTA})\text{Au}(\text{sac})]$, donde PTA=1,3,5 triazo-7-fosfoadamantano, $\text{K}[\text{Au}(\text{sac})_3\text{Cl}]$ y $\text{Na}[\text{Au}(\text{sac})_4]$). Las propiedades antiproliferativas de estos compuestos fueron ensayadas frente a 2 líneas celulares de carcinoma de ovario humano (A2780S, sensible al cisplatino y A2780R, resistente al cisplatino). Se encontró que $\text{Na}[\text{Au}(\text{sac})_4]$ y $[(\text{PTA})\text{Au}(\text{sac})]$ son los complejos más potentes frente a ambas líneas celulares⁶.

Además, se prepararon 2 complejos de cobre con sacarina ($\text{Cu}(\mu\text{-OH})(\text{sac-N})(\text{deten})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\mu\text{-OH})(\text{sac-O})(\text{tmen})]_2$ (donde deten=*N,N*-dietiletilendiamina y tmen=*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina) y se investigaron sus propiedades antimicrobianas frente a algunas bacterias Gram(+), otras Gram(-) y frente a células eucariotas (*Aspergillus Niger* y *Cándida Albicans*). Se observó que ambos complejos poseen una débil actividad antibacteriana, no poseen actividad frente a *Aspergillus* y solo el primer complejo posee poca actividad frente a *Cándida*⁷.

Siendo la sacarina un ligando tan versátil desde el punto de vista de sus potenciales sitios de coordinación, existen varios complejos preparados con diversas características estructurales muy interesantes. En la literatura se citan varios ejemplos⁸, en especial nos centraremos en compuestos de coordinación ternarios, con geometría de pirámide de base cuadrada, donde el metal central coordina al átomo de nitrógeno del ligando sacarinato y a átomos de nitrógeno secundarios pertenecientes a ligandos como piridina, benzimidazol, nicotinamida, ácido nicotínico, propilpiridina, trietanolamino y biperidina.

Centrarse en esos ejemplos tiene como parte de nuestro trabajo el objetivo de sintetizar complejos en los que se pueda generar un sitio activo "modelo" similar al que posee el Cu(II) en la enzima superóxido dismutasa nativa para determinar si dichos compuestos presentan actividad SOD.

³ F. Adam, I. A. Hassan, M. M. Rosli, H.-K. Fun, Acta Cryst. (2007) (material suplementario).

⁴ E.J. Baran, V.T. Yilmaz, Coord. Chem. Rev. (2006) 250:1980-1999.

⁵ M.C. Apella, R. Totaro, E.J. Baran, Biol. Trace Elem. Res. (1993) 37:293-299.

⁶ L. Maiore, M.A. Cinellu, E. Michelucci, G. Moneti, S. Nobili, I. Landini, E. Mini, A. Guerri, C. Gabbiani, L. Messori, J. Inorg. Biochem. (2011) 105:348-355.

⁷ O.Z. Yesilel, C. Darcan, E. Sahin, Polyhedron (2008) 27:905-913.

⁸ E.J. Baran, V.T. Yilmaz, Coord. Chem. Rev. (2006) 250:1980-1999.

Con la finalidad de generar entornos nitrogenados alrededor del metal, hemos elegido los ligandos 4-aminopiridina y 4-cianopiridina.

La 4-aminopiridina (Figura 2) es un compuesto orgánico que se usa principalmente para bloquear canales de potasio⁹. Las aminopiridinas son ampliamente utilizadas como reactivos en química analítica y en aplicaciones farmacéuticas y médicas¹⁰.

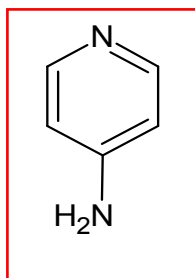


Figura 2. Estructura de la 4-aminopiridina.

La 4-cianopiridina (Figura 3) es un ligando de gran interés debido a que presenta 2 sitios de coordinación, el nitrógeno perteneciente al grupo ciano y el nitrógeno perteneciente a la piridina¹¹.

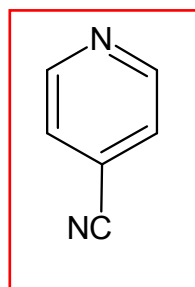


Figura 3. Estructura de la 4-cianopiridina.

5.1.2. Preparación de los complejos

-[Cu(sac)₂(4-cianopy)₂H₂O], (complejo 1): Se agregó una solución acuosa de sacarinato (sac) de sodio (2 mmoles, 5 ml) a una solución acuosa de Cu(NO₃)₂·3H₂O (1 mmol, 5 ml). Cuando se consiguió una mezcla homogénea, se agregó sobre ésta una solución etanólica de 4-cianopiridina (4-cianopy) (2 mmoles, 10 ml) formándose una solución azul la cual se agitó y calentó durante 10 minutos. La solución resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente y luego de una semana se obtuvieron cristales azules los cuales fueron filtrados, lavados varias veces con etanol frío y secados al aire para luego ser analizados por

⁹ Y. Buyukmurat, S. Akyuz, J. Mol. Struct. (2003) 651:653: 533-539.

¹⁰ S. Akyüz, J. Mol. Struct. (1999) 482-483:171-174.

¹¹ R.E. Clarke, P.C. Ford, Inorg. Chem. (1970) 9:495-499.

difracción de rayos X. Anal. Calc. para $C_{26}H_{18}O_7S_2N_6Cu$: C, 47,7; H, 2,8; N,12,8; S,9,8 %. Exp.: C, 47,6 H, 2,9; N,12,8; S,9,8 %. Rto. 75%.

-[Cu(sac)₂(4-aminopy)₂H₂O] (complejo 2): se preparó una solución metanólica de $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (1 mmol, 1 ml), la cual fue agregada a una solución metanólica compuesta por 4-aminopiridina (4-aminopy) (2 mmoles, 1,5 ml) y sacarinato de sodio (3 mmoles, 7 ml), bajo agitación continua. A los pocos minutos se formó en la solución un precipitado de color verde que fue inmediatamente filtrado y descartado. Asimismo, las aguas madres verde-azuladas obtenidas como producto de dicha reacción se dejaron en reposo y al cabo de una semana se observó la presencia de un sólido verde-azulado el cual se filtró y lavó con etanol frío y se dejó secar al aire. A pesar de haber realizado varios intentos por obtener cristales por diferentes métodos, no se obtuvieron monocristales adecuados para realizar el análisis estructural. Anal. Calc. para $C_{24}H_{22}O_7S_2N_6Cu$: C, 45,5; H, 3,6; N, 13,2; S, 10,1 %. Exp.: C, 45,5; H, 3,5; N, 13,2; S, 10,1 %. Rto. 50%.

5.1.3. Resultados

5.1.3.1 Estructura cristalina

Los cristales obtenidos para el complejo 1, fueron aptos para realizar la determinación estructural por medio de la difracción de rayos X. La estructura determinada puede verse en la Figura 1 (esquema de la estructura del complejo realizada con el programa ORTEP¹²) y en las tablas a continuación se muestran los valores para los diferentes parámetros. En base a la misma se puede describir el sitio de coordinación: es posible advertir que el ion cobre(II) se encuentra en un doble eje cristalográfico, en un entorno de pirámide de base cuadrada, coordinado a través de los átomos de nitrógeno del sacarinato en forma *trans* [$d(Cu-N)=2,011$ (3) Å] y a través de los átomos de nitrógeno de la piridina pertenecientes al ligando 4-cianopiridina [$d(Cu-N)=2,038$ (4) Å]. La quinta posición de coordinación se completa con una molécula de agua en el vértice de la pirámide [$d(Cu-Oa)=2,189$ (5) Å]. El átomo de cobre se encuentra levemente por encima de la base de la pirámide (a 0,2383 (3) Å) ubicado hacia la molécula de agua.

¹² Johnson CK . ORTEP-II. A Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program. Report ORNL-5318. Tennessee, USA: Oak Ridge National Laboratory (1976).

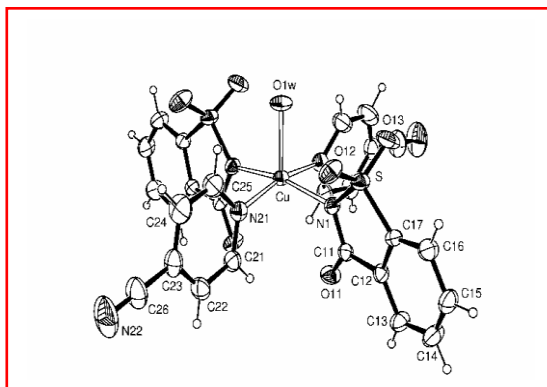


Figura 4. Gráfico molecular del complejo $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopyridina})_2(\text{H}_2\text{O})]$ designando los átomos distintos al hidrógeno y sus desplazamientos elipsoidales con un nivel de probabilidad de 30%. Las uniones entre el ion $\text{Cu}(\text{II})$ y los ligandos están representadas por líneas blancas.

Tanto el anión sacarinato como la 4-cianopiridina asumen una posición planar (los átomos de dichos ligandos se encuentran a 0,029 y 0,0156 Å con respecto a la base de la pirámide cuadrada) respecto al cobre (a 0,385 (4) y 0,180 (5) Å, respectivamente). Estos planos son casi perpendiculares entre sí (ángulo a 85,91 (8)°). Buscando en la literatura encontramos que la conformación del complejo y las distancias de unión Cu-ligandos se asemejan a las encontradas en el complejo $[\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{nic})_2\text{H}_2\text{O}]$ (nic: nicotinamida), también en un eje cristalográfico C_2 ¹³. Cuando comparamos la molécula de sacarina neutra (Hsac)¹⁴ con el anión sacarinato (sac^-) apreciamos que los mayores cambios en este último ocurren en el grupo funcional tioamídico. Luego de la desprotonación y la unión al $\text{Cu}(\text{II})$, se puede observar una deslocalización significativa de la unión N-C-S. De hecho, existe un acortamiento en la unión N-C (desde 1,375 Å en Hsac a 1,358 (5) Å en sac^-) y en la unión C-S (desde 1,663 Å en Hsac a 1,628 (3) Å en sac^-). Estos efectos de deslocalización son menos pronunciados que en aquellos aniones sacarinato sin coordinar (por ejemplo, longitud N-C de 1,354 y 1,339 (5) Å y distancias N-S de 1,596 y 1,606 (6) Å en el sacarinato de sodio¹⁵ y $[\text{Fe}(\text{o-fen})_3(\text{sacH})](\text{sac})_2$ ¹⁶, respectivamente (fen: fenantrolina).

El complejo adopta una conformación molecular en forma de paletas de rueda con los ligandos sac^- y 4-cianopiridina de manera alternada alrededor del eje C_2 y están ubicados en el cristal como capas paralelas al plano ab dando lugar a canales de aproximadamente 3 Å de diámetro a lo largo del eje como se muestra en el diagrama PLATON¹⁷ de la Figura 5.

¹³ B.S. Parajón Costa, E.J. Baran, O.E. Piro, E.E. Castellano, Z. Naturforschung B (2002) 57:43-56.

¹⁴ J.C.J. Bart, J. Chem. Soc. B (1968) 376-382.

¹⁵ G. Jovanovski, B. Kamenar, Cryst. Struct. Commun. (1982) 11:247-255.

¹⁶ P.A.M Williams, E.G. Ferrer, K.A. Pasquevich, E.J. Baran, E.E. Castellano, O.E. Piro, J. Chem. Crystallogr. (2000) 30:539-544.

¹⁷ Spek AL. In: PLATON. A multipurpose crystallographic tool. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University (1998).

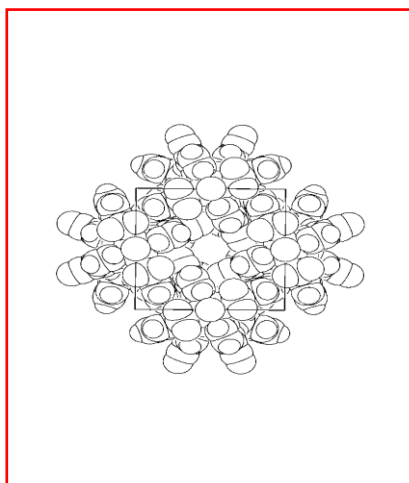


Figura 5. Ocupación espacial del empaquetamiento cristalino de $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2(\text{H}_2\text{O})]$ visto desde el eje c.

En la tabla 1 se resumen los datos del cristal ($[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$), así como los procedimientos para la colección de datos, los métodos para la determinación de la estructura y el método para la refinación de su estructura.

Fórmula empírica	$\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{CuN}_6\text{O}_7\text{S}_2$
Peso fórmula	654,12
Longitud de onda	0,71073 (Å)
Sistema cristalino, grupo espacial	Tetragonal, P4cc (#103)
Dimensiones de la celda unidad	
a=b	15,313(1) (Å)
c	13,240(1) (Å)
Volumen de la celda	3104,6(4) (Å ³)
Z, densidad calculada	4, 1,399(mg/m ³)
Coefficiente de absorción	0,889 (mm ⁻¹)
F(000)	1332
Tamaño del cristal	0,27 x 0,19 x 0,12(mm)
Color del cristal / forma	Azul / prisma
Rango θ para la colección de datos	3,99 a 25,99 (°)
Índice de rangos	$-12 \leq h \leq 18, -18 \leq k \leq 18, -16 \leq l \leq 15$
Reflexiones recolectadas/única	7848 / 2899 [R(int)=0,0397]
Completado hasta $\theta=25,99^\circ$	98,6 %
Reflexiones observadas [$I > 2\sigma(I)$]	2527
Transmisión máxima y mínima	0,9025 y 0,8073
Datos / restricciones / parámetros	2899 / 1 / 188
Mejora de ajuste en F^2	1,105
Pesos, w	$[\sigma^2(\text{F}_o^2) + (0,0961\text{P})^2 + 0,73\text{P}]^{-1}$ $\text{P} = [\text{Max}(\text{F}_o^2, 0) + 2\text{F}_c^2] / 3$
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$] ^a	R1=0,0497, wR2=0,1369
Índices R (todos los datos)	R1=0,0576, wR2=0,1481
Parámetros absolutos de estructura	-0,02(3)
Pico mayor y hueco	1,138 y -0,581 (e/Å ⁻³)

Tabla 1. Datos del cristal, métodos de solución de la estructura y resultados de refinamiento para $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2(\text{H}_2\text{O})]$. ^aR índices definidos como: $R_1 = \sum ||\text{Fo}| - |\text{Fc}|| / \sum |\text{Fo}|$, $wR_2 = [\sum w(\text{Fo}^2 - \text{Fc}^2)^2 / \sum w(\text{Fo}^2)]^{1/2}$

En la tabla 2 se presentan las distancias de enlace y los ángulos alrededor del metal en el complejo $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$.

Distancias de enlace	
Cu-N(1)	2,011(3)
Cu-N(21)	2,038(4)
Cu-O(1a)	2,189(5)
Ángulos de unión	
N(1')-Cu-N(1)	166,9(2)
N(1')-Cu-N(21)	88,5(1)
N(1)-Cu-N(21)	89,9(1)
N(21)-Cu-N(21')	166,1(2)
N(1)-Cu-O(1a)	96,6(1)
N(21)-Cu-O(1a)	97,0(1)

Tabla 2. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del ion cobre (II) en $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]^a$.

^a Átomos seleccionados y no seleccionados relacionados a través de una operación de simetría de ejes binarios: -x,-y+1,z

5.1.3.2. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

En las Figuras 6 y 7 se muestran los espectros FTIR de cada ligando y los complejos con cobre. El análisis de los espectros de infrarrojo de los complejos da cuenta de los siguientes resultados y asignaciones.

Las frecuencias de las bandas de absorción más significativas en el espectro FTIR de los complejos metálicos están dadas en la Tabla 3 y las asignaciones están basadas en comparaciones realizadas teniendo presentes los resultados previos^{18,19,20,21},

¹⁸ P. Naumov, G. Jovanovski, M.G.B. Drew, S.W. Ng, *Inorg. Chim. Acta* (2001) 314:154-162.

¹⁹ J.F Farha, R.T. Iwamoto, *Inorg. Chem.* (1965) 4:844-848.

²⁰ W. Zhang, J.R. Jeitler, M.M. Tumbull, C.P. Landee, M. Wei, R.D. Willett, *Inorg. Chim. Acta* (1997) 256:183-198.

²¹ Y. Buyukmurat, S. Akyüz, *J. Mol. Struct.* (2003) 651–653:533-539.

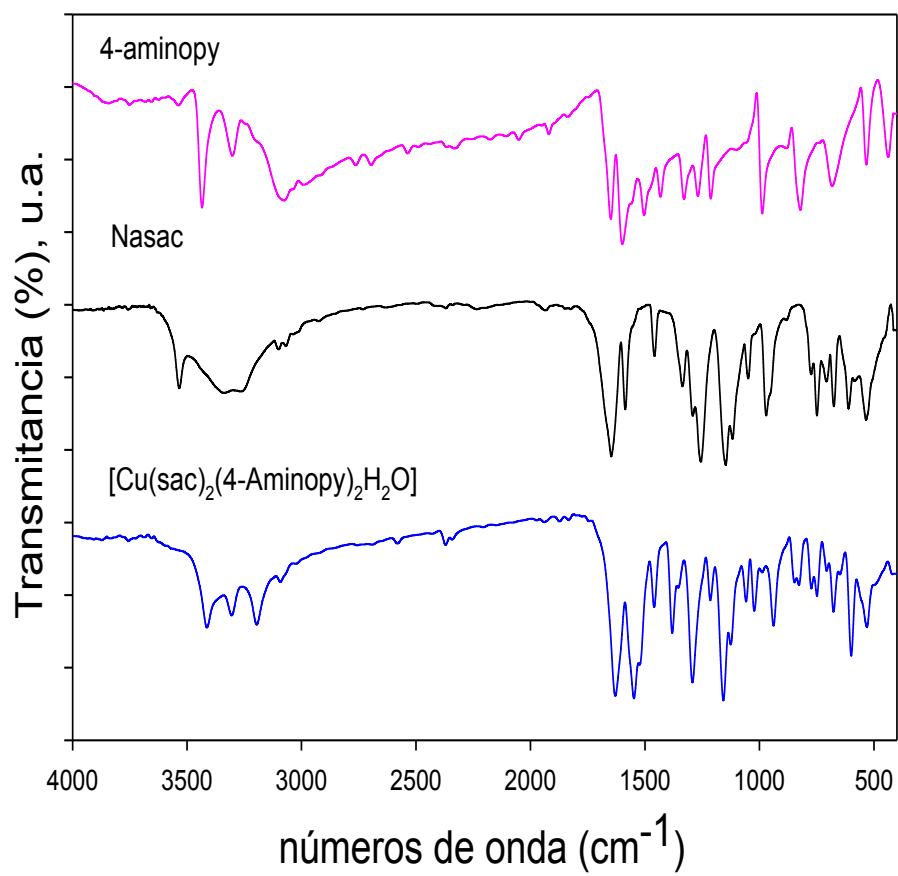


Figura 6. Espectros FTIR de 4-aminopiridina (4-aminopy), sacarinato de sodio (Nasac) y [Cu(sac)₂(4-aminopy)₂H₂O] (2) en el rango 4000–400 cm⁻¹.

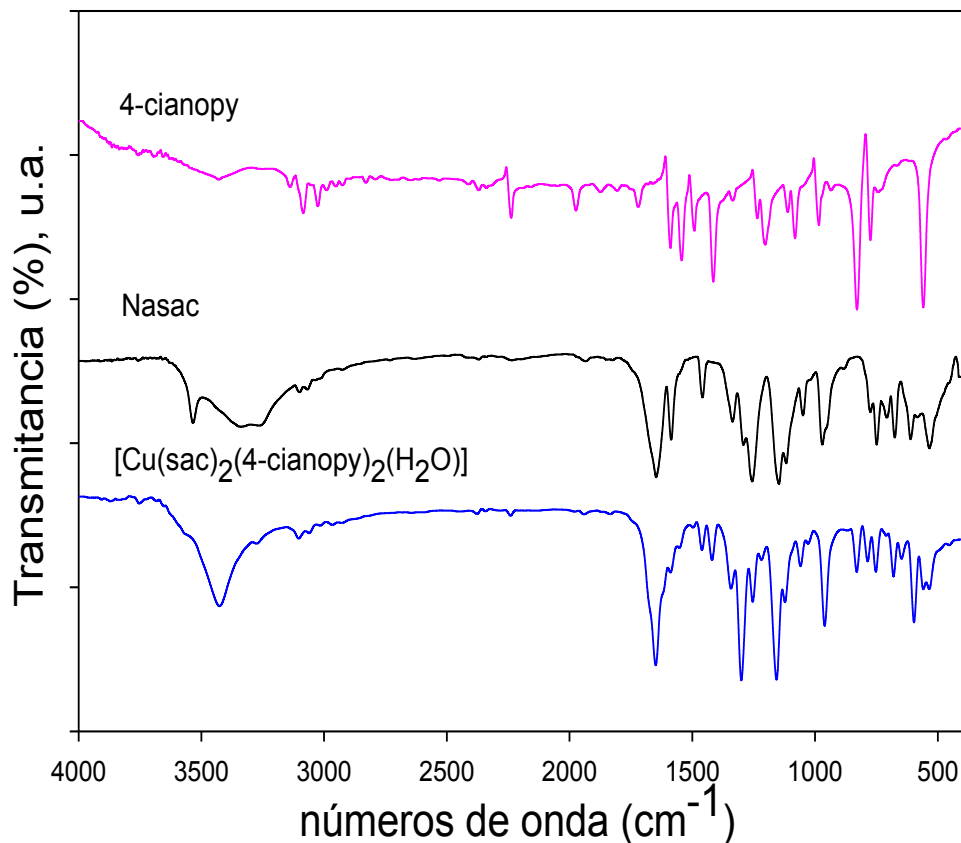


Figura 7. Espectros FTIR de 4-cianopiridina (4-cianopy), sacarinato de sodio (Nasac) y $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (1) en el rango 4000–400 cm^{-1} .

Las bandas que se observan en el rango 3550-3400 cm^{-1} son atribuidas al estiramiento correspondiente al modo $\nu(\text{OH})$ de las moléculas de agua.

De la observación de los espectros surge que la frecuencia de estiramiento del grupo $\nu(\text{N-H})$ en el complejo 2 no se modifica como resultado de la complejación, por lo que se puede concluir que el átomo de nitrógeno del grupo amino perteneciente a la 4-aminopiridina no estaría involucrado en la coordinación al centro metálico. Tampoco se modifica la frecuencia de estiramiento $\nu(\text{C-N})$ de la 4-cianopiridina (complejo 1), por lo tanto, al igual que en el caso anterior, se deduciría que este grupo no participa en la coordinación.

Comparando la posición de la banda relacionada a la frecuencia de estiramiento del grupo carbonilo en el sacarinato de sodio (1642 cm^{-1}) (ver Figuras 6 y 7) con la banda asociada al estiramiento del grupo $\nu(\text{CO})$ de la sacarina en los

complejos, puede observarse que en el complejo 1 ésta aparece a mayor número de onda mientras que en el complejo 2 se observa un corrimiento hacia la región roja del espectro.

Nasac	4-cianopy	[Cu(sac) ₂ (4-cianopy) ₂ H ₂ O] (1)	4-aminopy	[Cu(sac) ₂ (4-aminopy) ₂ H ₂ O] (2)	Asignaciones
3534 f		3426 f	3537 f		v(OH)
			3434 f	3412 m	v(OH), v(NH ₂ , aminopy)
			3300 m	3305 m	v(NH ₂ , aminopy)
	2240 d	2240 d			v(CN, cianopy)
		1671 h			
1642 mf		1648 mf		1629 mf	v(C=O)
			1648 f	superpuestas	δ(NH ₂ , aminopy)
		1615 h			
1590 f	1591 m	1604 d	1602 mf, 1590 h		v(CC), v(CH)
	1490 d, 1535 m	1550 d, 1516 d	1506 f	1547 mf, 1520 m	v(CC), v(CH)
1460 m	1408 f	1460 d, 1420 d	1440 m	1459 m, 1380 m	v(CC), v(CH)
1336 m	1335 d	1340 m	1333 m	1356 d	v _s (NCS)
1258 mf		1301 mf		1293 mf	v _{as} (SO ₂)
			1268 m		v(C-NH ₂ , aminopy)
		1252 m			
		1217 d	1215 m	1214 d	δ(CH) en el plano
1150 mf		1155 mf		1157 mf	v _s (SO ₂)
	1078 m	1121 m	1055 m	1057 m	Respiración del anillo
	985 m	1059 m	991 f	1022 m, 988 d	Respiración del anillo
		961 f		938 m	v _{as} (CNS)
			950 d		γ _{op} CH
	829 f	830 m	842 d, 822 f	848 d, 826 d	v(C-NH ₂) + δ _{anillo} + v(CC)
610 m		596 m		600 f	τ(SO ₂)
	560 f	560 m			
		553 m	536 m	532 m	v(CN) + γ _{anillo} + δ _{anillo} + NH ₂ balanceo
		451 md		450 h, d	v(CuO)

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

Tabla 3. Asignaciones tentativas del espectro FTIR del sacarinato de sodio (Nasac), 4-cianopiridina (4-cianopy), 4-aminopiridina (4-aminopy) y sus complejos con Cu(II) (posición de las bandas en cm⁻¹).

Diversos estudios se realizaron con la finalidad de encontrar una correlación entre la frecuencia de estiramiento v(CO) y las uniones metal-sacarinato en los diferentes tipos de complejos. Se estudiaron por ejemplo las relaciones empíricas para órdenes de enlace y se cuantificaron las relaciones entre el estiramiento CO y la unión metal-sacarinato, entre otros. Estos estudios presentan una buena correlación sólo para el caso de complejos en los cuales la sacarina coordina *vía* el átomo de nitrógeno. Se sabe que cuando la banda debida al estiramiento CO en los sacarinos N-coordinados se encuentra a mayores frecuencias, la sacarina coordinaría por el nitrógeno^{23,22,23}. Esta situación sería equivalente a la que ocurre en nuestro caso para el complejo 1.

²² P. Naumov, G. Jovanowski, J. Mol. Struct. (2001) 563-564:335-339.

²³ O.Z. Yes-ilel, C. Darcan, E. Sahin, Polyhedron (2008) 27:905-913.

De esos mismos estudios surge que cuando por el contrario, la banda de estiramiento del grupo CO se desplaza a menores frecuencias estaría indicando que este grupo participa en la coordinación al metal, debilitando en consecuencia el enlace carbono-oxígeno. El desplazamiento hacia el rojo de la posición de la banda relacionada al modo de estiramiento del grupo CO se asigna a la contribución de la forma resonante de lactima a la estructura aniónica, tal como fuera observado en estudios de deformación geométrica en anillos de 5 miembros. La coordinación a través del oxígeno puede conducir a una disminución en 12 cm^{-1} de la frecuencia de estiramiento del grupo CO con respecto a la posición del mismo en el anión sacarinato no coordinado como fuera demostrado en otros complejos reportados: Tetraquis(pirazol)bis[1,2-benzisotiazolil-3-olato-1,1-dióxido] de cobre(II) y aquo(di-2-piridilamina) [1,2-benzisotiazolil-3-olato1,1-dióxido](o-sulfobenzimidato-N) de cobre(II)²³.

Otro grupo característico de la molécula de sacarina es el SO_2 . Existen para el mismo dos bandas representativas: las bandas de estiramiento correspondientes al modo antisimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$ aparecen en 1293 y 1301 cm^{-1} y la otra correspondiente al modo simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$ aparece en 1155 cm^{-1} .

Otras bandas adicionales observadas en los rangos 1330 - 1350 y 930 - 960 cm^{-1} son atribuidas a los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo CNS de la sacarina, respectivamente.

Respecto a los otros ligandos, el modo de respiración del anillo observado en 991 cm^{-1} en el ligando 4-aminopiridina libre se asigna a la banda que se encuentra en 1022 cm^{-1} en el complejo 2. El cambio a mayores frecuencias de este modo se sabe que ocurre cuando el par de electrones solitario del nitrógeno endocíclico del anillo de piridina coordina con el centro metálico. Por lo tanto se puede concluir que el átomo de nitrógeno se une al cobre de acuerdo con lo observado en el análisis estructural. En el complejo 1 se puede observar que las bandas correspondientes al primer y segundo modo de respiración del anillo cambian hacia la región azul del espectro por complejación indicando que la coordinación al metal es a través del nitrógeno de la piridina. La misma conclusión puede ser obtenida comparando las 4 bandas principales de la piridina en el rango de 1430 - 1600 cm^{-1} . Ambos complejos muestran una modificación de esas bandas hacia mayores frecuencias lo que estaría confirmando la coordinación del metal a la misma.

Respecto a las frecuencias de estiramiento metal-oxígeno, las bandas de débil intensidad que aparecen a 450 y 451 cm^{-1} fueron asignadas a la frecuencia de estiramiento $\nu(\text{Cu-O})$ ²⁴.

5.1.3.3. Espectroscopía electrónica

Como se sabe, el espectro electrónico de un complejo tanto en estado sólido (reflectancia difusa) como en solución es una buena herramienta para sugerir el

²⁴ Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 4th ed. New York: John Wiley (1986).

entorno de coordinación de un centro metálico como el Cu(II). Por ejemplo, en los espectros electrónicos de compuestos donde existe presencia de cromóforos del tipo Cu(II)N₄O y Cu(II)N₂O₃ que a su vez presentan una geometría de pirámide de base cuadrada se observa una banda ancha y la mayor intensidad de absorción ocurre a altas energías²⁵, en contraste con lo que ocurre para los compuestos que presentan coordinación de bipirámide trigonal.

En el caso de nuestros complejos, los espectros de reflectancia difusa se muestran en la Figura 8. En los mismos se observan las bandas típicas correspondientes a los tránsitos d-d del centro metálico.

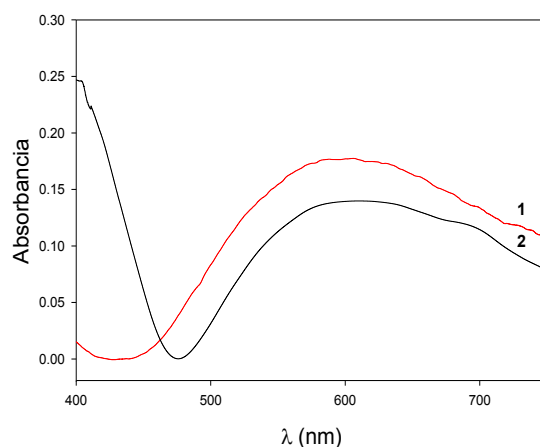


Figura 8. Espectro de reflectancia difusa para [Cu(sac)₂(4-cianopy)₂H₂O] (1) y [Cu(sac)₂(4-aminopy)₂H₂O] (2).

En el complejo 1, que presenta el cromóforo CuN₄O, dichas bandas están centradas en 595 y 675 (hombro) nm mientras que en el complejo 2 (cromóforo CuN₂O₃) se presentan en 611 y 690 nm. En ambos casos, la banda espectral más intensa se ubica hacia la región donde ocurren las transiciones de mayor energía. Para estos complejos que presentan coordinación piramidal de base cuadrada el esquema posible del diagrama de niveles de energía (para un grupo de simetría idealizado C_{4v}) indica el orden $d_{x^2-y^2} > d_z^2 > d_{xy} > d_{xz}, d_{yz}$ por lo que la banda de mayor energía puede asignarse a la transición $(d_{xy}) \rightarrow (d_{x^2-y^2})$ y la de menor energía a $(d_z^2) \rightarrow (d_{x^2-y^2})$. Las otras bandas d-d estarán enmascaradas por transiciones intensas $\pi \rightarrow \pi$ ³⁸.

El corrimiento hacia menores energías que se presenta en la banda de absorción del complejo 2, sugiere como ya había sido determinado por espectroscopia FTIR, que la coordinación con la sacarina se produce a través del átomo de oxígeno. Esta hipótesis se reafirma teniendo presente la serie espectroquímica²⁶ en la cual el ligando N-sacarinato se ubica hacia la derecha (por

²⁵ Lever ABP. In: Inorganic electronic spectroscopy, 2nd ed. The Netherlands: Elsevier (1984).

²⁶ V. Shivaiah, S.K. Das, Inorg. Chem. (2005) 44:8846-8854.

tanto en la región de mayor Δ y menor longitud de onda) en comparación con el O-sacarinato.

Con la finalidad de evaluar lo que ocurre con el entorno de coordinación cuando los complejos se disuelven en metanol, se midieron los espectros UV-visible de los mismos (Figura 9). En el caso del complejo 2 tanto el espectro de reflectancia difusa como el espectro en solución muestran una tendencia similar, presentando ambos una banda amplia en 650 nm ($\epsilon=95 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), sugiriendo de esta manera que la coordinación alrededor del centro metálico es la misma que en el complejo sólido.

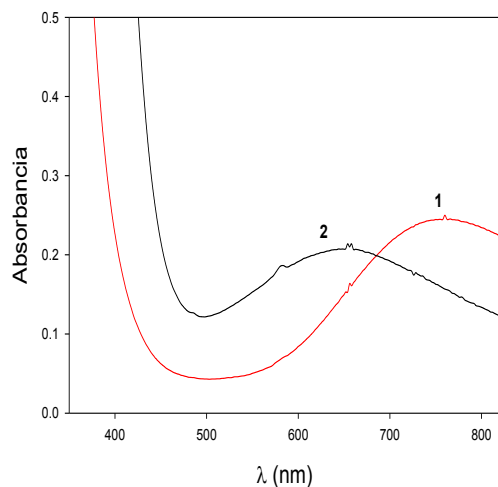


Figura 9. Espectros electrónicos (solución metanólica) para $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$ (1) (4,3 mM) y $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-aminopy})_2\text{H}_2\text{O}]$ (2) (2,2 mM).

En el caso del complejo 1, se encontraron diferencias significativas entre el espectro del complejo disuelto en metanol y el sólido. El máximo de la banda del complejo en solución se desplaza hacia el rojo (760 nm, $\epsilon=58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Esto demuestra que ambas geometrías son distintas y en el caso del complejo en solución probablemente ocurra la incorporación de una molécula de solvente (metanol) en la esfera de coordinación. Este desplazamiento hacia el rojo se asocia con un cambio en el número de coordinación pasando de 5 a 6 y generando un octaedro tetragonalmente distorsionado. Por lo tanto, esta nueva coordinación que presenta el complejo 1 luego de la disolución, es la que se considera como la especie activa en la evaluación de los ensayos enzimáticos.

5.2. Complejos de cobre(II) con los ligandos ácido tricarbálico e imidazol

5.2.1. Aspectos generales del ácido tricarbálico e imidazol

El ácido tricarbálico (H_3ATC) (Figura 10) (ácido 1,2,3 propanotricarboxílico) es un tipo de ácido alifático simple. Se encuentra como fragmento de varias micotoxinas naturales como la Fumonisina B₁, Fumonisina B₂, toxina AAL TA y también

formando parte de un ácido policarboxílico macrocíclico, el cual es un inhibidor de la Ras-farnesil proteína transferasa²⁷.

Estas toxinas son producidas por el patógeno *fusarium moniliforme* el cual afecta, fundamentalmente, a las plantas de maíz. Este hongo filamentoso está relacionado con la incidencia de cáncer esofágico en algunas regiones de China y el sur de África²⁸.

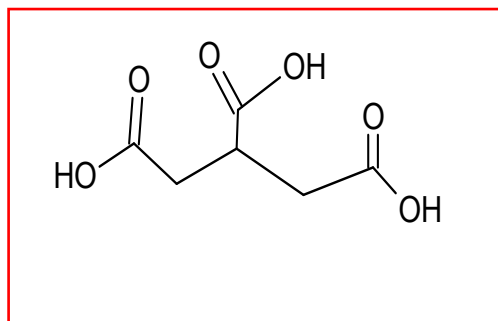


Figura 10. Estructura del ácido tricarbálico.

Las fumonisinas, además, están implicadas en un gran número de enfermedades que afectan a animales como leucoencéfalomalacia equina, edema pulmonar en cerdos, cáncer en ratas y cardiotoxicosis en especies aviares²⁹.

El ácido tricarbálico es producido en grandes cantidades por las vacas. La mezcla de bacterias presentes en el rumen de las mismas es capaz de convertir, a través de una reducción simple, al trans-aconitato en ácido tricarbálico³⁰ y ciertos estudios en ratas demostraron que aumenta la excreción de magnesio y otros metales divalentes por formar compuestos quelato con el magnesio sanguíneo³¹.

Los carboxilatos alifáticos y aromáticos son empleados frecuentemente para preparar complejos con cadenas en 1 dimensión, capas en dos dimensiones y estructuras en 3 dimensiones³². Estas últimas estructuras (denominadas MOF, del inglés metal-organic framework materials) son importantes debido a sus potenciales aplicaciones en catálisis, intercambio de iones y separación molecular³³.

Los pocos estudios existentes en relación a la química de coordinación del ácido tricarbálico están limitados a la caracterización estructural de los complejos

²⁷ S. Abdel-Sattar, E. Hamad, *Molecules* (2000) 5:665-673.

²⁸ C. Mazzani, O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos, P. Quijada, *Rev. Fac. Agron.* (2000) 17:185-195.

²⁹ S. Abdel-Sattar, H. Elgazwy, *Current Org. Chem.* (2004) 8:1405-1423.

³⁰ J.B. Russell, N. Forsberg, *British J. Nutr.* (1986) 56:153-162.

³¹ G.M. Cook, J.E Wells, J.B Russell, *Appl. Environ. Microbiol.* (1994) 60:2533-2537.

³² M.S. Wang, G.C. Guo, L.Z. Cai, W.T. Chen, B. Liu, A.Q. Wu, J.S. Huang, *Dalton Trans.* (2004) 2230-2236.

³³ L. Cañadillas-Delgado, O. Fabelo, J. Pasán, F.S. Delgado, M. Déniz, E. Sepúlveda, M.M. Laz, M. Julve, C. Ruiz-Pérez, *Crystal Growth Des.* (2008) 8:1313-1318.

con algún metal de transición y algunos lantánidos. Por ejemplo existen reportes de polímeros de coordinación con Ce(III) donde el tricarbailato actúa como ligando puente³⁴. Gupta y Powel sintetizaron complejos con lantánidos de fórmula general Ln(ATC).4H₂O obteniendo para el de lantano la siguiente estequiometría: La(ATC).5H₂O^{35,36}; también fue sintetizado el cristal [Ce(ATC)(H₂O)₂]_n bajo condiciones de síntesis hidrotermales³⁷. En la literatura se encuentra, además, la descripción de la síntesis y la caracterización de los complejos de Cr(III), Ni(II) y Eu(III) con ácido tricarbálico.³⁸

Conjuntamente, el residuo de imidazol (Imz, Figura 11) es uno de los sitios de unión más versátiles en las proteínas, capaz de someterse a interacciones que involucren solapamiento con otros restos aromáticos e incluso se puede unir a iones metálicos³⁹ y aminas biogénicas⁴⁰.

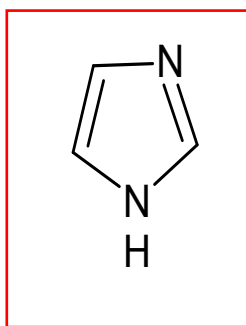


Figura 11. Estructura del imidazol.

Por ese motivo esta base ha sido sistemáticamente utilizada como ligando en la síntesis de sistemas biomiméticos, en especial de aquellos que simulan la acción de la enzima superóxido dismutasa.

Existen en la literatura varios reportes de complejos de coordinación de cobre(II) sintetizados con derivados de imidazol y sulfatiazol o ligandos macrocíclicos que presentan actividad superóxido dismutasa similar a pH fisiológico⁴¹. Se encuentran además, varios complejos bimetálicos tanto de cobre(II), como de cobre(II) y cinc(II), como por ejemplo los de fórmula [Cu(imz)Zn(mbc)]³⁻, [Cu(imz)Cu(mbc)]³⁻ (mbc= 1,4,12,15,18,26,31,39-octaazapentaciclo[13.13.13.1.1.1] tetratetracontano-6,8,10,22,24,33,35,37-

³⁴ I. Vlahou, N. Kourkoumelis, A. Michaelides, S. Skoulika, J.C. Plakatouras, *Inorg. Chim. Acta* (2006) 359:3540-3548.

³⁵ A.K. Gupta, J.E. Powel, USAEC Report IS 657 (1963).

³⁶ A.K. Gupta, J.E. Powel, USAEC Report IS 825 (1964).

³⁷ J.A. Armstrong, J.C. Barnes, *Acta Cryst.* (2004) 60:791-793.

³⁸ S. Abdel-Sattar, H. Elgazwy, M.H. Khalil, E. Hamed, *Synth. React. Inorg. Metal Org. Nano-Metal Chem.* (2010) 39:734-745.

³⁹ L.E. Kapinos, B. Song, H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta* (1998) 280:50-56.

⁴⁰ H. Sigel, A. Saha, N. Saha, P. Carloni, L.E. Kapinos, R. Griesser, *J. Inorg. Biochem.* (2000) 78:129-137.

⁴¹ J. Casanova, G. Alzuet, S. Ferrer, J. Latorre, J. A. Ramírez, J. Borrás, *Inorg. Chim. Acta* (2000) 304:170-177.

nonaeno), donde el imidazol actúa como ligando puente⁴², los preparados por Patel y colaboradores, [(Bipy)₂Cu-Im-Cu(Bipy)₂](ClO₄)₃.CH₃OH, [(fen)₂Cu-Im-Cu(fen)₂](BF₄)₃.2CH₃OH, [(Bipy)₂Cu-Im-Zn(Bipy)₂](BF₄)₃, y [(fen)₂Cu-Im-Zn(fen)₂](BF₄)₃, (Bipy= 2,2-Bipiridilo, fen= 1-10-fenantrolina e Im= ion imidazolato)⁴³ así como [(PMDT)Cu-Im-Cu(PMDT)](ClO₄)₃, [(PMDT)Cu-Im-Zn(PMDT)](ClO₄)₃, [(PMDT)Cu-Im-Ni(PMDT)](ClO₄)₃ (PMDT= pentametildietiltrimina; Im=ion Imidazolato)⁴⁴ y [(Salala)Cu-Im-Cu(Salala)]Na, [(Salala)Cu-Im-Zn(Salala)]Na y [(Salala)Cu-Im-Ni(Salala)]Na (Salala= Salicildenealiniato, Im= ion Imidazolato)⁴⁵, entre otros^{46,47,48}.

Nuestro interés particular en preparar y estudiar complejos de coordinación con el ácido tricarbálico y el imidazol como ligandos, estuvo centrado en la posibilidad de preparar polímeros de coordinación que pudieran ser: mono, di o tridimensionales, formando un mallado estructural con la presencia de poros, y que a su vez pudieran comportarse como sistemas biomiméticos de la enzima superóxido dismutasa.

5.2.3. Preparación de los complejos

-CuHATC.3H₂O: El complejo fue obtenido mezclando soluciones acuosas de CuCl₂.2H₂O (1mmol, 10 ml) con ácido tricarbálico, H₃ATC (1mmol, 10 ml) bajo agitación constante. El pH fue ajustado en un valor de 4 con pequeñas alícuotas de NaOH 1M. La solución se agitó por 20 minutos obteniéndose un sólido azul que se descartó por filtración (ya que se detectó más de una especie por espectroscopía EPR). La solución resultante se dejó al aire y luego de 2 días se obtuvo un precipitado azul verdoso que se filtró, se lavó varias veces con agua y etanol y se secó al vacío. Anal. Calc. para C₆H₁₂O₉Cu: C, 24,69; H, 4,11 %. Exp.: C, 24,31 H, 3,56 %. Rto. 65%.

-CuHATCImz.2H₂O: Una solución etanólica de CuCl₂.2H₂O (0,5 mmol, 10 ml) se agregó gradualmente a una solución etanólica concentrada (20 ml) de imidazol (Imz) (1mmol) y de ácido tricarbálico, H₃ATC (0,5 mmol). El pH de la mezcla resultante se ajustó a un valor de 6 por adición de una solución de metóxido de sodio. Este procedimiento produce la formación de una suspensión la que fue filtrada obteniéndose un sólido azul que fue lavado con agua y etanol y secado al

⁴² J.L. Pierre, P. Chautemps, S.R.C. Beguin, A. El Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, J. Am. Chem. Soc. (1995)117:1965-1973.

⁴³ Nripendra Singh, K.K. Shukla, V.L.N. Gundla, U.K. Chauhan, J. Inorg. Biochem. (2005) 99:651-663.

⁴⁴ R.N. Patel, Subodh Kumar, K.B. Pandeya, J. Inorg. Biochem. (2002) 89:61-68.

⁴⁵ R.N. Patel, Spectrochim. Acta Part A (2003) 59:713-721.

⁴⁶ D.X. Yang, S.A. Li, D.F. Li, M. Chen, J. Huang, W.X. Tang, Polyhedron (2003) 22:925-932.

⁴⁷ R.N. Patel, Nripendra Singh, K.K. Shukla, V.L.N. Gundla, Spectrochim. Acta Part A (2005) 61:1893-1897.

⁴⁸ R.N. Patel, Nripendra Singh, V.L.N. Gundla, Polyhedron 25 (2006) 25:3312-3318.

vacío. Anal. Calc. para $C_9H_{14}O_8N_2Cu$: C, 32,19; H, 3,98; N, 8,19 %. Exp.: C, 31,62 H, 4,09; N, 7,96 %. Rto. 82%.

5.2.3. Resultados

5.2.3.1. Caracterización de los complejos sólidos

5.2.3.1.1. Análisis termogravimétrico

En la descomposición térmica del $CuHATC \cdot 3H_2O$ (Figura 12) se observaron dos etapas: la primera etapa se correspondería con la pérdida de 3 moléculas de agua y ocurre en el rango de temperatura 20-100°C ($\Delta m_{exp.} = 19,32\%$; $\Delta m_{calc.} = 18,52\%$).

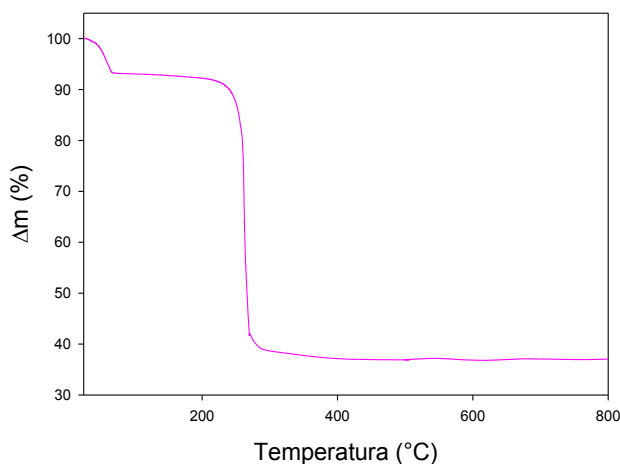


Figura 12.
Curva termogravimétrica
(TGA) de $CuHATC \cdot 3H_2O$
en atmósfera de O_2 .

En la segunda etapa se observa una pérdida de peso de 28,01%, que estaría de acuerdo con el valor calculado (27,27%) y el producto formado, CuO , el que se identifica mediante espectroscopía FTIR.

Reacción de descomposición:



En el caso de $CuHATCImz \cdot 2H_2O$ (Figura 13) también se exhiben dos etapas de pérdida de peso: la primera pérdida ocurre en un rango de temperatura de 20-100°C y se correspondería razonablemente bien con la pérdida de 2 moléculas de agua ($\Delta m_{exp.} = 11,05\%$; $\Delta m_{calc.} = 10,54\%$).

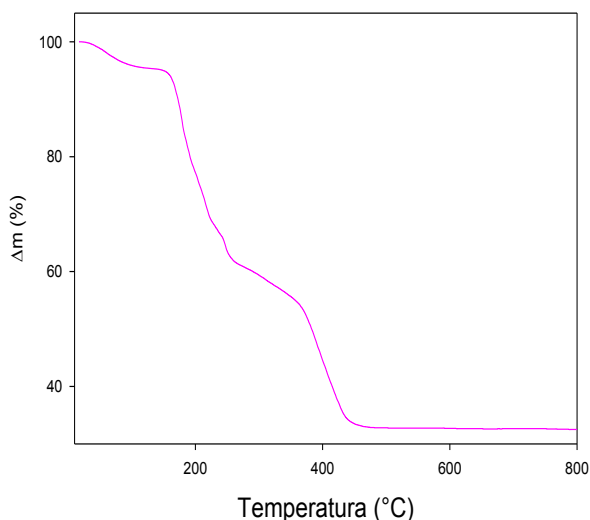
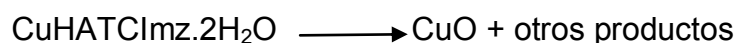


Figura 13.
Curva termogravimétrica (TGA)
de CuHATClmz.2H₂O en
atmósfera de O₂.

La segunda pérdida ocurre en el rango 100-800°C e indicaría la descomposición final del complejo donde nuevamente se obtiene CuO como producto final, el cual fue confirmado por espectroscopía FTIR.

Reacción de descomposición:



5.2.3.1.2. Espectroscopía de reflectancia difusa

Los espectros de reflectancia difusa muestran las bandas características para complejos de Cu(II). Para CuHATC.3H₂O se ven 2 bandas anchas localizadas a 710 y 375 nm, mientras que para CuHATClmz.2H₂O se observan 3 bandas localizadas a >800, 660, y 365 nm. En ambos complejos, la banda ancha observada a valores bajos de energía (450-830 nm) se corresponde la banda característica (tránsitos d-d) para Cu(II) en tanto que la posición concuerda con la presencia de átomos de oxígeno (en el primer caso) y de oxígeno y nitrógeno (en el segundo caso) en la esfera de coordinación de los complejos⁴⁹.

5.2.3.1.3. Espectroscopía Infrarroja

Las bandas características del ligando libre (H₃ATC) aparecen en 1731, 1722 y 1703 cm⁻¹ y son asignadas al modo de estiramiento ν(C=O) del grupo carboxilo (-

⁴⁹ A.B.P. Lever, Inorganic Electronic Spectroscopy, 2nd ed., Elsevier, The Netherlands, (1984).

COOH). Para éste ácido las bandas son tres, debido a la presencia de tres grupos carboxílicos en la molécula del mismo. Siendo un comportamiento típico de las mismas, éstas desaparecen luego de la desprotonación y formación de los grupos carboxilato ya que cada una de ellas se desdobra en dos bandas correspondientes a los modos de estiramiento asimétrico (a mayores frecuencias) y simétrico (a menores frecuencias) respectivamente.

Con fines comparativos se preparó la sal de sodio (Na_3ATC). Cuando se realizó el espectro FTIR de la sal (Figura 14 (1)) se observó dicho efecto: una banda ancha y fuerte localizada en 1573 cm^{-1} asignada al modo de estiramiento ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) y la otra banda localizada en 1406 cm^{-1} asignada en este caso al modo de estiramiento ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$)²⁴. En la región de $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ se observa una banda amplia, que por su posición se asigna tentativamente al modo de deformación $\delta(\text{H}_2\text{O})$ de la molécula de agua⁵⁰.

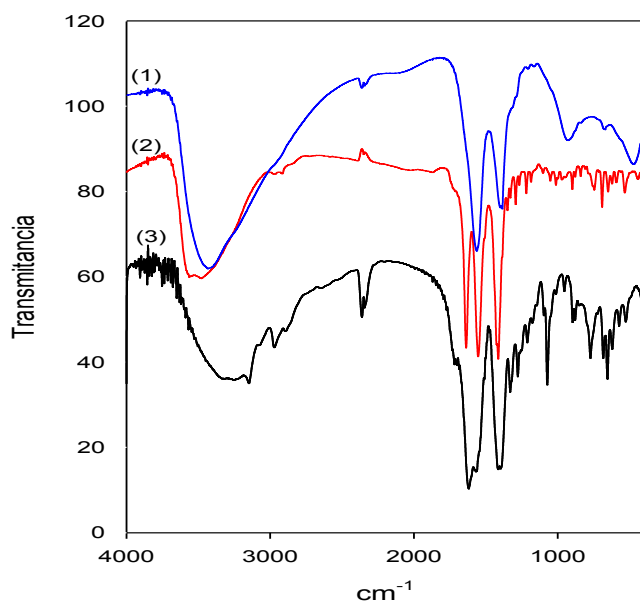


Figura 14. Espectros FTIR de (1) Na_3ATC , (2) $\text{CuHATC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (3) $\text{CuHATCImz}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

En el caso del complejo $\text{CuHATC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Figura 14 (2)) se observan los siguientes cambios: (i) una banda probablemente relacionada a la frecuencia de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ permanece sin cambio (aparece en 1710 cm^{-1}); (ii) a menores frecuencias desaparecen las dos bandas relacionadas con los modos de estiramiento del grupo carboxilato $-\text{COOH}$ y aparecen un conjunto de nuevas bandas de muy fuerte intensidad en 1636 , 1553 , 1424 y 1413 cm^{-1} , las cuales confirmarían la participación de dos grupos carboxilato en la esfera de

⁵⁰ E.G. Ferrer, P.A.M. Williams, E.J. Baran, J. Inorg. Biochem. (1993) 50:253-262.

coordinación del centro metálico. En consecuencia es posible asumir que el desdoblamiento del espectro estaría causado por la presencia de grupos carboxilato que coordinan al centro de Cu(II) de manera no equivalente⁵¹.

En el complejo ternario CuHATCImz.2H₂O (Figura 14 (3)) se observan cambios similares y las bandas relacionadas a los grupos carboxilato libres aparecen en 1619, 1571, 1413 y 1394 cm⁻¹. La presencia de imidazol en este complejo se demuestra por la presencia de una banda típica de éste ligando localizada en 936 cm⁻¹ la cual se desplaza a una mayor frecuencia (953 cm⁻¹) luego de la coordinación⁵². Además, la aparición de nuevas bandas en 3150, 1071 y 1278 cm⁻¹ que fueron asignadas tentativamente a los modos de estiramiento $\nu(\text{NH})$, deformación $\delta(\text{CH})$ en el plano y $\delta(\text{anillo})$ respectivamente, refuerzan la presencia del ligando imidazol en la esfera de coordinación del metal⁵³.

5.2.3.1.4. Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

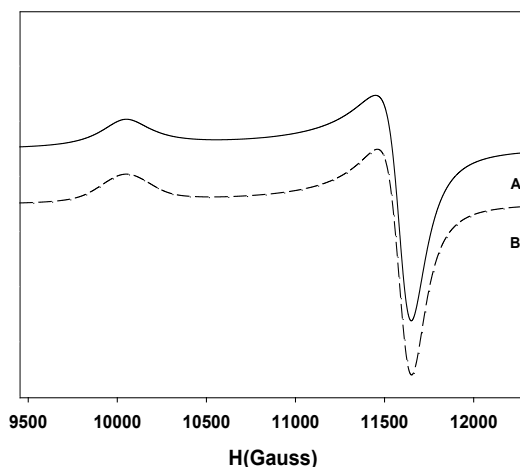
Los complejos también fueron caracterizados mediante espectroscopía de EPR. Para ellos, se midieron los espectros a temperatura ambiente y a 140 K tanto en banda Q como banda X.

El espectro EPR para el complejo CuHATC.3H₂O muestra una mejor resolución en banda Q (Figura 15).

⁵¹ T.J. Strathmann, S.C.B. Myneni, Geochim. Cosmochim. Acta (2004) 68:3441-3458.

⁵² P.A.M. Williams, E.G. Ferrer, M.J. Correa, E.J. Baran, E.E. Castellano, O.E. Piro, J. Chem. Crystallogr. (2004) 34:285-290.

⁵³ E.J. Baran, B.S. Parajón-Costa, E.G. Ferrer, L. Lezama, T. Rojo, J. Inorg. Biochem. (1996) 63:19-27.



**Figura 15. (A) Espectros EPR de CuHATC.3H₂O (300 K)
(B) Simulación del espectro A con el programa
WINEPR SimFonia.**

A través de la simulación del espectro mediante el cual se obtienen los valores para los parámetros del Hamiltoniano de Spin, se puede predecir que el complejo exhibe una señal correspondiente a un monómero y presenta simetría axial.

$$g_{\parallel} = 2,416 ; g_{\perp} = 2,091$$

Estos valores son típicos a los encontrados para complejos de Cu(II) con geometría de pirámide de base cuadrada y con estado fundamental $d_{x^2-y^2}^2$. Como se mencionó con anterioridad (ver sección 4.8.4.), en una simetría axial la relación de valores de g (G) proporciona información sobre la magnitud del intercambio entre los centros de cobre y el sólido policristalino. En nuestro caso se observa una valor de $G = 4,57$ sugiriendo que no hay interacción entre los centros de cobre.

También para el complejo CuHATCImz.2H₂O (Figura 16) el espectro de EPR se resuelve mejor en banda Q.

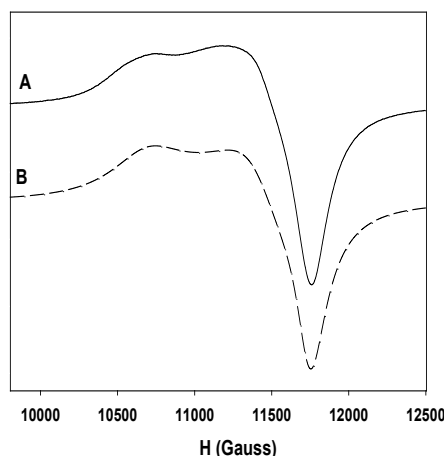


Figura 16. (A) Espectros EPR de CuTCAHmz.2H₂O a 300 K. (B) Simulación del espectro A con el programa WINEPR SimFonia.

El espectro simulado muestra simetría rómbica con los siguientes valores de g :
 $g_1 = 2,069$; $g_2 = 2,122$ y $g_3 = 2,272$

En este caso nuestros datos coinciden con lo esperado para complejos que posean Cu(II) y presenten simetría rómbica elongada para los cuales se ha observado, experimentalmente, que el menor valor de g debe ser $>2,04$ ⁵⁴.

Asimismo, con la finalidad de una verificación alternativa de la geometría, se calculó el parámetro R teniendo en cuenta la relación $g_3 > g_2 > g_1$ ⁵⁵. En nuestro caso, el valor de $R = 0,33$ indica que el electrón desapareado está localizado principalmente en el orbital $d_{x^2-y^2}$ del ion Cu(II) y se relaciona con una estereoquímica de pirámide de base cuadrada²⁷.

5.2.3.2. Estudios de los sistemas en solución

5.2.3.2.1. Constantes de estabilidad y medidas de resonancia paramagnética electrónica

Como venimos realizando con nuestros sistemas en estudio, siempre que es posible (en general limitados por la solubilidad en agua de los ligandos utilizados) estudiamos la formación de las diferentes especies complejas en solución con el objetivo de ser posible la identificación a posteriori de las especies bioactivas.

En este caso, el modelo propuesto para realizar los diagramas de especiación para el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{-3}/\text{Imz}/\text{H}^+$, así como las correspondientes

⁵⁴ B.J. Hathaway, D.E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* (1970) 5:143–207

⁵⁵ S. Chandra, L.K. Gupta, *Spectrochim. Acta Part A* (2005) 61:269-275.

constantes de formación calculadas se muestran en la Tabla 4. Bajo las mismas condiciones experimentales fueron investigados todos los subsistemas conteniendo los ligandos libres y la combinación de cada uno de ellos con Cu(II).

Aunque se han estudiado extensivamente los equilibrios acuosos de los ligandos, las constantes de desprotonación fueron recalculadas a partir de un conjunto de titulaciones utilizando el programa de cálculo Best⁵⁶. Los datos calculados para H₃ATC (pK₁ = 3,4, pK₂ = 4,43, pK₃ = 5,61) e imidazol (pK = 7,24) están de acuerdo con los datos reportados en la literatura^{29,57} (Tabla 1).

Para determinar las constantes de formación de ambos sistemas se colectaron datos a partir de varios conjuntos de titulaciones y se analizaron con los programas de cálculos Best y Superquad²⁹.

Las determinaciones experimentales fueron realizadas en condiciones ácidas hasta pH 6 ya que por encima de ese valor de pH se produce la precipitación de estos compuestos, lo cual ocurre aún utilizando concentraciones bajas de Cu²⁺ (2,5 mM). Los resultados para ambos sistemas, Cu²⁺/Imz/H⁺ y Cu²⁺/ATC³⁻/H⁺ coinciden con los encontrados en la literatura⁵⁸.

En un primer intento, la evaluación de los datos de la titulación obtenidos para el sistema Cu²⁺/ATC³⁻/H⁺ fueron analizados asumiendo solo complejos mononucleares en solución: [CuLH₂]⁺, [CuLH], [CuL]⁻ y [CuL(OH)]²⁻ (L denota al ligando completamente desprotonado). El ajuste mejora si se incluye en el modelo a la especie dinuclear Cu₂L⁺.

⁵⁶ A.E. Martell, R.J. Motekaitis, Determination and Use of Stability Constants, 2nd ed., VCH Publishers Inc., New York (1992).

⁵⁷ E. Campi, G. Ostacoli, M. Meironi, G. Saini, J. Inorg. Nucl. Chem. (1964) 26:553-564.

⁵⁸ A. Martell, R.M. Esmith, Critical Stability Constants, Plenum Press, New York (1974).

Especies pqrs	Fórmula ^a	log β
0011	AH ⁺	7,24
0101	LH	5,61
0102	LH ₂ ⁻	10,04
0103	LH ₃	13,44
1010	[CuA] ²⁺ (VIII)	4,43
1020	[CuA ₂] ²⁺ (IX)	7,77
1030	[CuA ₃] ²⁺	10,95
1040	[CuA ₄] ²⁺	12,60
1102	[CuLH ₂] ⁺ (I)	11,55
1101	[CuLH] (II)	7,82
1100	[CuL] ⁻ (III)	3,27
2100	[Cu ₂ L] ⁺ (IV)	5,60
110-1	[CuLOH] ²⁻ (V)	-3,70
1120	[CuLA ₂] ⁻ (VI)	10,95
1110	[CuLA] ⁻ (VII)	6,68

Tabla 4. Composición, notación y constantes de formación (β) para Cu²⁺/ATC³⁻(L) y para el sistema Cu²⁺/ATC³⁻(L)/Imz(A)/H⁺ (0,150 M NaCl, 25 °C).

^a Entre paréntesis, identificación de las especies en el diagrama de distribución

Una vez que se logra un ajuste óptimo, se procede a calcular el diagrama de distribución de especies en función del pH (en el rango de pH 2 a 6) con el programa SPECIES, el cual se presenta en la Figura 17 para el sistema Cu²⁺-ATC y en la Figura 18 para el sistema Cu²⁺-ATC-Imz. Las especies que presentan los dos ligandos [CuLA]⁻ y [CuLA₂]⁻ se forman, probablemente, por el agregado de una o dos moléculas de imidazol respectivamente, al complejo mayoritario preexistente en solución [CuL]⁻.

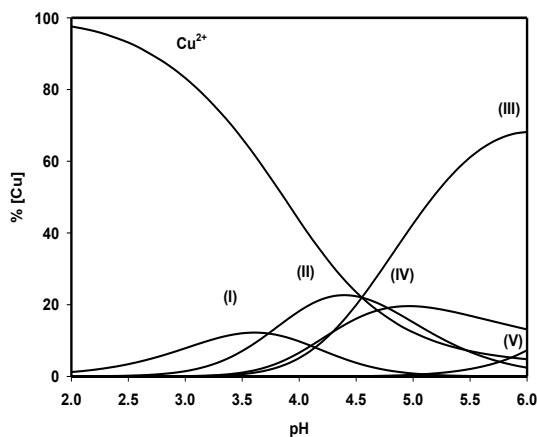


Figura 17. Distribución de especies para el sistema Cu²⁺/ATC³⁻/H⁺ en función del pH. Concentración total de Cu²⁺: 10 mM, H₃ATC: 20 mM, 25 °C, I=0,150 M NaCl. [CuLH₂]⁺ (I), [CuLH] (II), [CuL]⁻ (III), Cu₂L⁺ (IV) y [CuL(OH)]²⁻ (V).

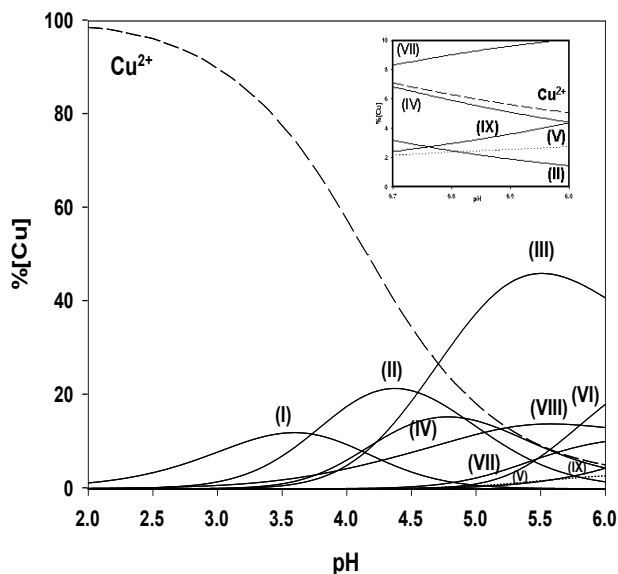


Figura 18. Distribución de especies para el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{3-}/\text{Imz}/\text{H}^+$ en función del pH. Concentración total de Cu^{2+} : 5 mM, H_3ATC : 10 mM, Imz : 5 mM, 25 °C, $I=0,150$ M NaCl. $[\text{CuLH}_2]^+$ (I), $[\text{CuLH}]$ (II), $[\text{CuL}]^-$ (III), Cu_2L^+ (IV), $[\text{CuL}(\text{OH})]^{2-}$ (V), $[\text{CuLA}_2]^-$ (VI), $[\text{CuLA}]^-$ (VII), $[\text{CuA}]^{2+}$ (VIII), $[\text{CuA}_2]^{2+}$ (IX). En el gráfico interno se observa, ampliada, la región comprendida entre pH 5,7 y 6.

Con la finalidad de identificar con mayor precisión las especies propuestas mediante los cálculos realizados, así como las correspondientes geometrías, en particular, el conjunto de ligandos donores ecuatoriales y también la carga general, (en las mismas condiciones de las titulaciones potenciométricas) se realizaron los espectros de EPR de las soluciones acuosas a 140 K.

En la Figura 19 se muestra la variación del espectro de EPR en función del pH y en la Tabla 5, los parámetros asociados a los datos obtenidos de los espectros de EPR para el estudio en solución del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{3-}/\text{H}^+$. Como puede observarse, existe, en los datos experimentales, una tendencia al aumento en el valor de $A_{||}$ y una disminución en los valores de $g_{||}$ y $g_{x,y}$ en comparación con los valores obtenidos para $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ⁵⁹ a medida que el pH aumenta. Estas modificaciones estarían de acuerdo con la presencia de un campo de ligandos con átomos fuertemente donores cargados negativamente que reemplazan a los átomos de oxígeno pertenecientes a moléculas de agua. Este efecto también se relaciona con un aumento en la energía de la transición $d_{xy}^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}^2$ que produce una disminución en el valor de $g_{||}$ y consecuentemente en el valor de g_{iso} .

⁵⁹ J.L. Miranda, J. Felcman, Polyhedron (2003) 22:225-233.

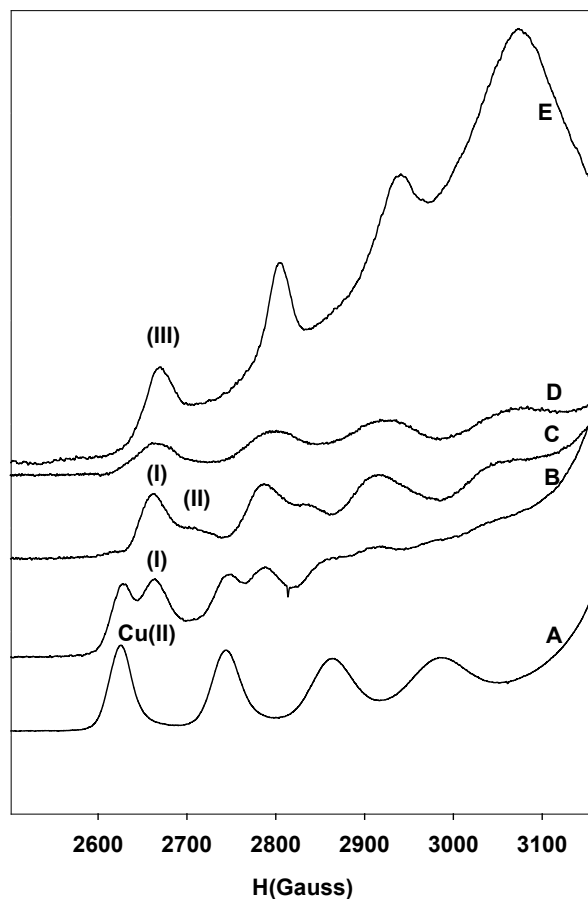


Figura 19. Espectros de EPR en banda X (región A_{II}) de soluciones de Cu(II)/ATC (140 K) en proporción R=2, (A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ libre, (B) pH=3, (C) pH=3, diferencia de espectros, (D) pH=4,6 diferencia de espectros y (E) pH=6. Concentración total Cu^{2+} :10 mM, H_3ATC :20 mM.

	$g(x)$	$g(y)$	$g(z)$ o g_{II}	g_{iso}	$A(x)$	$A(y)$	$A(z)$ o $A_{II}(\text{cm}^{-1})$	A_{iso}	$f = g_{II} / A_{II}$ (cm^{-1})
Cu(II)	2,085	2,085	2,418	2,196	7	7	135	49,66	179
$[\text{CuLH}_2]^+$ (I)	2,076	2,076	2,380	2,177	16	16	138	56,66	172
$[\text{CuLH}]$ (II)	2,074	2,074	2,335	2,161	10	10	142	54,00	164
$[\text{CuL}]^-$ (III)	2,085	2,085	2,360	2,176	30	30	150	70,00	157

Tabla 5: Parámetros de EPR para el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_3\text{ATC}(\text{H}_3\text{L})$.

Como se sabe, la coordinación axial de un grupo de ligandos ejerce efectos menores sobre g_{iso} ⁶⁰ por lo que, en general, los cambios observados se asocian al efecto de los ligandos coordinados ecuatorialmente al centro metálico. En la Figura 19 (curva A) se muestra la señal típica de EPR para el ion $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. A medida que el pH aumenta (pH=3, curva B), se observan dos señales típicas con un patrón de 4 bandas correspondientes a un tensor g axial con desdoblamiento hiperfino debido al espín nuclear del Cu(II) ($I=3/2$). La primer señal se corresponde con la existencia de la especie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ libre⁶¹ (Tabla 2) y la otra señal estaría indicando la formación de una nueva especie paramagnética. De acuerdo al diagrama de distribución, esta nueva señal se correspondería con la presencia de la especie postulada como $[\text{CuLH}_2]^+$ (I), ya que la complejación comienza a bajos valores de pH en las condiciones experimentales.

Teniendo en cuenta los parámetros de EPR y la aproximación de Blumberg–Peisach⁶², $f = g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm^{-1}) (siendo f el factor de distorsión tetragonal), las especies podrían ser interpretadas asumiendo ligandos ecuatoriales interaccionando a través de los grupos carboxílicos pertenecientes al ligando ($-\text{COO}^-$), con 4 átomos de oxígeno en el plano y una carga total de +1, lo cual estaría de acuerdo con las estequiometrías propuestas por los estudios potenciométricos.

A medida que aumenta el valor del pH, se inducen importantes variaciones en el espectro de EPR del ion cobre (curva A); aparecen dos nuevas líneas de resonancia pero aún hay señal de Cu(II) libre (curva B). Con el objetivo de identificar de manera más rigurosa las especies, se llevó a cabo la diferencia de espectros (curva C). El espectro, por lo tanto, permite identificar nuevamente la especie $[\text{CuLH}_2]^+$ (I) que se encuentra en cantidades significativas y una nueva especie postulada como $[\text{CuLH}]$ (II) basada en la relación $g_{\parallel}/A_{\parallel}$. En esta última especie dos grupos ácido carboxílico del ligando se desprotonarían pudiendo actuar tanto como monodentado ó como bidentado por coordinación con el metal.

Un posterior aumento de pH produce señales más anchas y menos intensas (curva D). Probablemente, la presencia de una especie dinuclear (Cu_2L^+) (IV) que comienza a ser predominante conduce a la desaparición de la señal debido a la interacción de los centros paramagnéticos de Cu(II)⁶³. Las transiciones prohibidas $\Delta M_s = \pm 2$ se esperan que aparezcan en la mitad del campo, sin embargo, debido a que se utilizaron bajas concentraciones estas no fueron observadas. De acuerdo con los complejos dinucleares con carboxilatos reportados³⁴, el modo de unión de esas especies posiblemente involucre, puentes carboxilatos. A altos valores de pH (curva E) se detecta como especie mayoritaria la propuesta como $[\text{CuL}]^-$ (III) en el modelo de especiación y como especie

⁶⁰ N.V. Nagy, T. Szabó-Plánka, G. Tircsó, R. Király, Z. Árkosi, A. Rockenbauer, E. Brücher, J. Inorg. Biochem. (2004) 98:1655-1666.

⁶¹ C. Menidiatis, C. Methenitis, N. Nikolis, G. Pneumatikakis, J. Inorg. Biochem. (2004) 98:1795-1805.

⁶² J. Peisach, W.E. Blumberg, Arch. Biochem. Biophys. (1974) 165:691-708.

⁶³ D. Hollender, T.S. Jakusch, A. Buhsina, E. Aboukais, T. Abi Aad, T. Kiss, J. Inorg. Biochem. (2001) 85:245-251.

minoritaria, la presencia del hidroxilo complejo $[\text{CuLOH}]^{2-}$ (V). Sin embargo, debido a la superposición con el complejo cúprico que predomina en condiciones experimentales, no se detecta por EPR. En general, la tendencia de la relación $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ está de acuerdo con lo que se espera para el aumento de la carga negativa en un campo cúbico de ligandos³⁴.

El comportamiento del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{-3}/\text{Imz}/\text{H}^{+}$ se observa en la Figura 20. A bajos valores de pH la secuencia de formación de las especies es similar al observado en el sistema anterior. Las pequeñas diferencias pueden ser atribuidas a distintas concentraciones relativas de las especies presentes en solución.

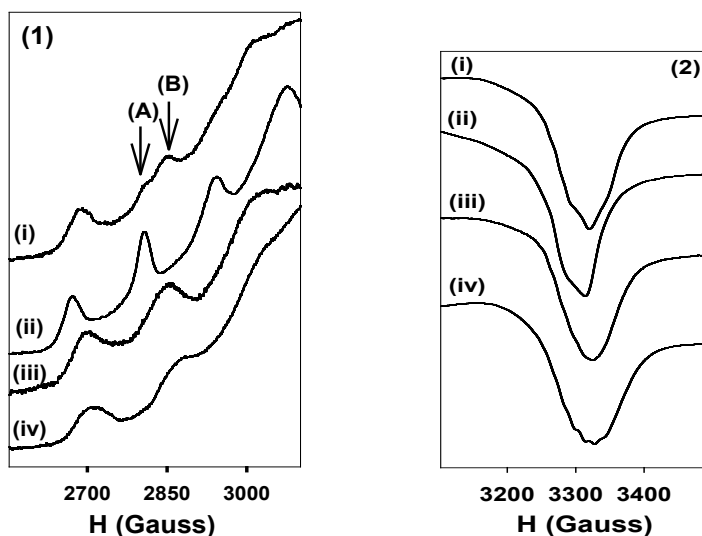


Figura 20. Espectros de EPR en banda X del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}/\text{Imidazol}$ (140 K) (1) Región A_{\parallel} amplificada, (2) región a campo magnético alto, (i) pH=5,3; (ii) especie CuL^{-} (III), diferencia de espectros; (iii) pH=5,5, diferencia de espectros; (iv) pH=6, diferencia de espectros. Concentración total de $\text{Cu}^{2+} = 5 \text{ mM}$, $\text{H}_3\text{ATC} = 10 \text{ mM}$, $\text{Imz} = 5 \text{ mM}$.

En la Figura 20 (1) se observa la aparición de dos nuevas señales a pH=5,3: una de ellas se relaciona a la especie propuesta como CuL^{-} (III) denotada como (1)(i)(A) y se muestra una nueva especie química en solución identificada como (B) en la curva (i). Esa nueva señal se observa aislada en la curva (iii) y en su origen probablemente estén involucrados los equilibrios de especies que contienen átomos de nitrógeno en la esfera de coordinación. Esas especies están presentes a valores de pH altos tanto en los diagramas de especies como en el espectro registrado a pH 6 (curva (iv)) que muestran la existencia de una estructura superhiperfina de nitrógeno, la cual no se resuelve correctamente a valores de campo alto. En condiciones experimentales no se detectan las señales individuales relacionadas con las especies químicas predichas por el modelo de especiación a pH = 5,3. Las señales observadas en el espectro pueden ser atribuidas a una superposición de señales individuales de especies con

parámetros muy similares y con modos de coordinación comparables. Se asume coordinación por átomos de nitrógeno ya que el mejor ajuste del espectro ($g_{||} = 2,320$; $A_{||} = 165 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) se obtuvo considerando la interacción del átomo central con átomos de nitrógeno⁶⁴.

Resulta interesante remarcar que la relación metal/ligando en el compuesto sólido coincide con la especie de menor proporción presente (1110) en solución acuosa.

5.3. Actividad enzimática

5.3.1. Aspectos generales

Como ya se ha mencionado en el capítulo II correspondiente a los flavonoides, el estrés oxidativo está implicado en diversos procesos patológicos como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, procesos inflamatorios, desórdenes neurodegenerativos y cardiovasculares, cáncer, entre otros^{65,66}. El radical superóxido es el principal ROS involucrado en dichos procesos, siendo un importante regulador de la muerte celular. A pesar que la enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación de dicho radical, su utilización como suplemento dietario en pacientes que presentan desórdenes inflamatorios y oxidativos se encuentra limitada. Esto se debe no solo al alto costo del tratamiento, sino también al alto peso molecular de la enzima, su baja estabilidad, su falta de biodisponibilidad por vía oral y también debido a su incapacidad para acceder al espacio intracelular⁶⁷. Por otro lado, los principales resultados clínicos en humanos se obtuvieron con el medicamento llamado Orgotein[®] (Cu,Zn-SOD de origen bovino), pero el principal problema se deriva en el hecho que esta enzima no es de origen humano sino bovino, lo cual conlleva a una variedad de problemas inmunológicos⁶⁸.

Por todo lo expuesto, el objetivo de muchos investigadores es la búsqueda de compuestos que mimeticen la acción de la enzima superóxido dismutasa pero que sean de bajo peso molecular, estables, no tóxicos, que atraviesen las membranas para llegar fácilmente al sitio donde se encuentran los radicales y que se puedan administrar por vía oral. También se busca que el costo del tratamiento no sea alto. En este contexto realizamos parte de nuestros estudios.

5.3.2. Resultados

⁶⁴ J.E. Gairin, H. Mazarguil, P. Sharrock, R. Haran, *Inorg. Chem.* (1982) 21:1846-1854.

⁶⁵ J.S. Pap, B. Kripli, T. Váradi, Michel Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.* (2011) 105:911-918-

⁶⁶ A.C. Gonzalez-Baró, R. Pis-Diez, C.A. Franca, M.H. Torre, B.S. Parajón-Costa, *Polyhedron* (2010) 29:959-968.

⁶⁷ M.A. Agotegaray, M. Dennehy, M.A. Boeris, M.A. Grela, R. A. Burrow ,O. V. Quinzani, *Polyhedron* (2012) 34:74-83.

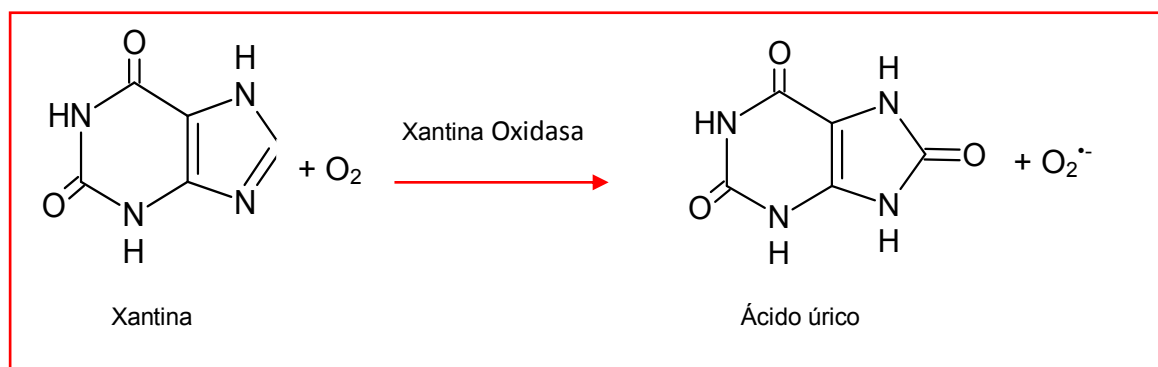
⁶⁸ D. Salvemini, C. Muscoli, D.P. Riley, S. Cuzzocrea, *Pulm. Pharmacol. Therapeut.* (2002) 15:439-447.

Dada la estructura de la enzima superóxido dismutasa (ver capítulo 4.4.), como ya fuera comentado, es conocido el hecho que la presencia de complejos de Cu(II) con sitios de coordinación que contengan anillos heteroaromáticos tales como imidazol, piridina y pirazol son importantes para una alta actividad SOD⁶⁹. En los complejos descritos en este capítulo hemos seleccionado los ligandos 4-cianopiridina y 4-aminopiridina, sacarina (que también contiene nitrógeno) e imidazol para generar un sitio activo similar al de cobre en la enzima nativa.

Además, en la determinación de la capacidad de imitar la acción enzimática, las concentraciones de complejo utilizadas (1000 μM -0,1 μM) incluyen la concentración de Cu,Zn-SOD en los eritrocitos (células rojas sanguíneas) (20 μM)⁷⁰.

Para medir la actividad SOD mimética de los complejos de cobre se utilizó el método no enzimático (ver sección 3.2.3.) y en el caso de los complejos de Cu(II) con ATC también se utilizó un método enzimático.

Este último método consiste en generar el radical superóxido a través del sistema xantina/xantina oxidasa (Esquema 1)^{71,72}. Al igual que en el método no enzimático, esos radicales son capaces de reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán, observando un incremento en el espectro de absorción en la zona de 560 nm.



Esquema 1. Mecanismo de generación de radicales superóxido por el sistema xantina-xantina oxidasa.

En las Figuras 21 y 22 se muestra el porcentaje de inhibición de la reducción de NBT en función de -logaritmo de la concentración de los compuestos testeados. A partir de dichos gráficos obtuvimos los valores de CI₅₀.

Como puede observarse en la Figura 21, ambos compuestos exhiben una fuerte actividad secuestrante frente al anión radical superóxido. El complejo 2

⁶⁹ E. Bienvenue, S. Choua, M.A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago, J. Inorg. Biochem. (1995) 57:157-168.

⁷⁰ A. Romeo, J.A. Capobianco, A.M. English, JACS (2003) 25:14370-14378.

⁷¹ I. Iwamoto, I. Mifuchi, Chem. Pharm. Bull (1982) 30:237-241.

⁷² C. Beauchamp, I. Fridovich, Anal. Biochem. (1971) 44:276-287.

presenta un CI_{50} de 2,88 μM mientras que el complejo 1 posee una CI_{50} de 3,98 μM .

Como ya se mencionara, en las mismas condiciones experimentales, la enzima SOD extraída de eritrocitos bovinos ejerce una inhibición de 50% a 0,21 μM (al menos 10 veces mejor que los complejos), pero aún así estos complejos pueden ser considerados como imitadores SOD activos, dado que como límite superior se considera una concentración de 20 μM ⁷³. Como durante el proceso catalítico de dismutación del anión superóxido no solo cambia el estado de oxidación del cobre(II) sino que también se modifica la geometría alrededor del metal, la geometría con mayor distorsión que posee el complejo 2 (pirámide cuadrada) frente al complejo 1 (octaédrica) podría favorecer el cambio estructural que es esencial para producir la catálisis. Así mismo, el complejo 2 ofrece un sexto sitio de coordinación desocupado para poder interactuar con el anión superóxido⁷⁴.

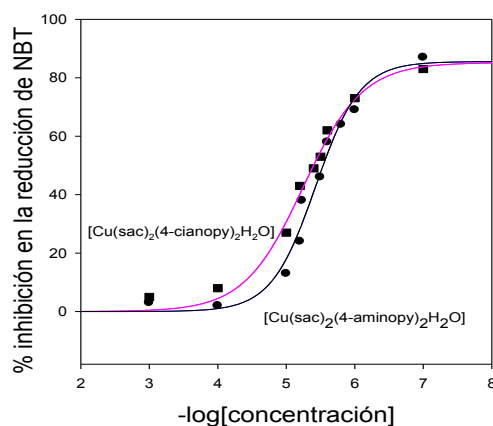


Figura 21. Efecto de $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$ (1) y $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-aminopy})_2\text{H}_2\text{O}]$ (2) en la reducción del NBT por el método no enzimático.

Los siguientes datos fueron obtenidos por generación del radical anión superóxido a través del sistema xantina/xantina oxidasa en el cual, concentraciones de $\text{Cu}(\text{II})$ mayores a 1000 μM interfieren en las medidas experimentales.

De acuerdo a publicaciones de referencia, se requiere una concentración de 0,085 μM de enzima SOD nativa para inhibir el 50 % de la reacción⁷⁵. Según nuestras determinaciones, el valor obtenido de CI_{50} para $\text{CuATC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ es de 468

⁷³ N.A. Roberts, P.A. Robinson, Brit. J. Rheumatol. (1985) 24:128-136.

⁷⁴ R.N. Patel, N. Singh, K.K. Shukla, U.K. Chauhan, J. Nicolás-Gutiérrez, A. Castiñeira, Inorg. Chim. Acta (2004) 357:2469-2476.

⁷⁵ S.B. Etcheverry, E.G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A.M. Williams, J. Biol. Inorg. Chem. (2008) 13:435-447.

μM y para $\text{CuHATCImz}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es de $339 \mu\text{M}$, y esto indicaría para ambos, una baja actividad SOD-símil (Figura 22 A). Teniendo en cuenta que se genera una pequeña cantidad de anión radical⁷⁶ a través de este método, se realizó además el ensayo no enzimático.

Para este último método, el valor medido de CI_{50} para $\text{CuHATC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ es $5,1 \mu\text{M}$ y para $\text{CuHATCImz}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es de $7,2 \mu\text{M}$ (Figura 22 B). En ambos casos los valores obtenidos son comparables al de las sales simples de Cu(II) ($2,1 \mu\text{M}$).

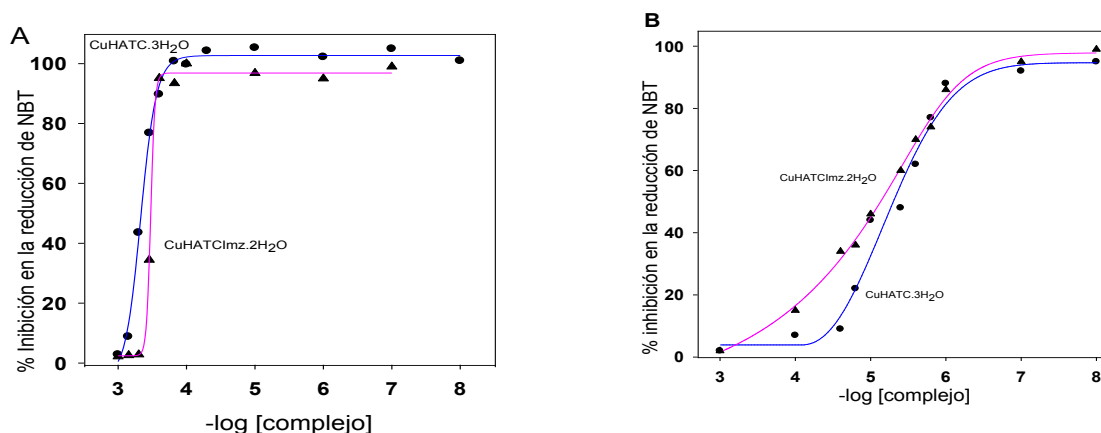


Figura 22. Porcentaje de inhibición de la reducción de NBT en función de -logaritmo de la concentración de complejo. (A) Ensayo enzimático (pH=10,4) , (B) Ensayo no enzimático (pH=7,5)

Debido a que los compuestos precipitan a un pH por encima de 6 y a concentración milimolar (mM), las titulaciones potenciométricas solo fueron realizadas hasta ese valor de pH. Sin embargo, teniendo en cuenta que para los ensayos enzimáticos se utilizan concentraciones micromolares, la distribución de especies puede ser extrapolada a mayores valores de pH. A concentraciones más bajas, el grado de complejación es menor para ambos sistemas estudiados. Por lo tanto, el análisis de especiación predice una complejación parcial y la coexistencia de varias especies en solución en las condiciones experimentales del ensayo no enzimático a pH fisiológico. De hecho, la actividad SOD símil puede ser atribuida a las distintas especies, incluso al Cu(II) libre.

5.4. Conclusiones

⁷⁶ I. Schepetkin, A. Potapov, A. Khlebnikov, E. Korotkova, A. Lukina, G. Malovichko, L. Kirpotina, M.T. Quinn, J. Biol. Inorg. Chem. (2006) 11:499-513.

-Se prepararon 4 complejos de Cu(II) en intento de simular el entorno del sitio activo de la enzima superóxido dismutasa: $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-aminopy})_2\text{H}_2\text{O}]$, $\text{CuHATC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuHATCImz}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

-Solo para el complejo $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-cianopy})_2\text{H}_2\text{O}]$ pudieron obtenerse cristales que permitieron determinar su estructura cristalocómicamente.

-Como no se obtuvieron cristales de los otros tres complejos, se emplearon técnicas espectroscópicas, de estabilidad térmica y análisis elemental para determinar la posible coordinación de los ligandos al centro metálico en los complejos sólidos.

Para $[\text{Cu}(\text{sac})_2(4\text{-aminopy})_2\text{H}_2\text{O}]$, desde el punto de vista de lo analizado por su espectro FTIR, pudo verse que al no modificarse las frecuencias de estiramiento del grupo $\nu(\text{N-H})$ y SO_2 (ν_{as} , ν_{s}) se descartó la interacción de esos grupos del sacarinato a través de los mismos. Por otro lado los cambios presentados en el modo de estiramiento del grupo CO y en el anillo de 4-aminopy indican interacción de esos restos con el centro metálico lo que infiere contará con un entorno de oxígenos y nitrógenos en su esfera próxima de coordinación. También el espectro de reflectancia difusa, con el corrimiento de la banda hacia menores energías sostiene la presencia de un cromóforo del tipo CuN_2O_3 .

En cuanto a las especies bioactivas de ambos complejos, de la comparación de sus espectros electrónicos en solución metanólica con los correspondientes de reflectancia difusa surge que, solamente para el complejo con 4-aminopy, se mantiene la esfera de coordinación del Cu(II) mientras que para el otro complejo el corrimiento de la banda típica de Cu(II) estaría indicando el ingreso del solvente a la coordinación del mismo.

En el caso de los complejos preparados con ácido tricarbálico, para $\text{CuHATC}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pudo en principio estimarse por termogravimetría la presencia de las tres moléculas de agua propuestas. A su vez, la posición de la banda típica de Cu(II) en el espectro electrónico en la región de alta energía se corresponde con la presencia de átomos de oxígeno en el entorno de coordinación. Esta suposición se refuerza con los cambios observados en el espectro FTIR que indicarían la participación de los grupos carboxilato de forma no equivalente en la coordinación con el centro metálico. Finalmente el EPR indica presencia de Cu(II) con una geometría de pirámide de base cuadrada, con lo que se sugiere para el complejo una coordinación representada por oxígenos provenientes de dos grupos carboxilatos y de moléculas de agua.

Del mismo modo para $\text{CuHATCImz}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pudo establecerse la presencia de dos moléculas de agua, y se vieron cambios similares en su espectro FTIR indicando coordinación vía grupos carboxilato a la vez que la presencia de imidazol en la esfera de coordinación pudo ser comprobada por el desplazamiento a mayor frecuencia de la banda típica de este ligando. Asimismo, el espectro de EPR revela una mayor distorsión en la geometría de pirámide de base cuadrada alrededor del centro de Cu(II). De esta forma se propone un entorno que contiene

dos oxígenos provenientes de dos grupos carboxilato, un nitrógeno del resto imidazol y otros dos oxígenos provenientes de las moléculas de agua.

-En el caso de los complejos de Cu(II) con ácido tricarbálico se realizaron, además, estudios en solución. A través de la titulación potenciométrica y medidas de EPR pudimos describir cuales son las especies presentes en solución acuosa.

-En cuanto a la actividad enzimática de estos complejos que poseen nitrógeno y oxígeno en su esfera de coordinación pudimos determinar que los 2 complejos de Cu(II) con sacarina son buenos agentes SOD miméticos ya que su CI_{50} es $< 20 \mu\text{M}$. Por otro lado, en el caso de los complejos de Cu(II) con ATC la actividad SOD símil no puede atribuirse a una sola especie en solución, ya que los diagramas de especiación indican la coexistencia de varias especies, incluso la presencia de Cu(II) libre en las condiciones del ensayo.

Capítulo VI

Anexo

6.1. Zn: Generalidades

El Zn es un elemento que se encuentra en la naturaleza pero en forma moderada. Es el segundo metal traza esencial para humanos, animales, plantas y microorganismos, luego del hierro pero se diferencia de este último en que presenta solo un estado de oxidación¹. El cuerpo humano tiene entre 2 y 3 g de este metal por 70 kg de peso. Se requieren entre 10 y 20 mg diarios de cinc en la dieta aunque las mujeres embarazadas y aquéllas en período de lactancia requieren una ingesta algo mayor. Se encuentra ampliamente distribuido en distintos tipos de alimentos, sobre todo en los derivados del reino animal, el pan integral, las legumbres secas y, en particular, en los mariscos².

Las distintas funciones que cumple el cinc (catalítica, estructural y de regulación) definen el papel biológico que desempeña el mismo.

Se conoce que, aproximadamente 300 enzimas requieren del cinc (ácido de Lewis fuerte) para su actividad metabólica (función catalítica).

Además, este elemento desempeña funciones estructurales en las metaloproteínas, por ejemplo, en la enzima CU,Zn-SOD (como fuera referido en el capítulo V)

Por otro lado, el Zn se une a un complejo tetraédrico con cuatro cisteínas tomando una disposición estructural que se ha dado en llamar “*dedos de zinc*” de suma importancia pues se han localizado en muchos receptores de membrana y en factores de transcripción. El alto interés por las proteínas con dedos de zinc radica en su capacidad para constituir objetivos potenciales para terapéuticos farmacológicos y además por estar involucrado en la función de la membrana celular. Es importante en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y en la división celular.

Las nucleoproteínas lo contienen en una gran cantidad, las cuales, probablemente, están involucradas en la expresión genética de varias proteínas (función reguladora)^{3,4,5}.

Por otro lado se sabe que el Zn posee un importante papel en el sistema inmune^{6,7}. Al cumplir un papel tan importante en el metabolismo, su déficit provoca múltiples complicaciones. En las últimas décadas ha ido aumentando el uso de cinc como uno de los posibles medicamentos para combatir los desórdenes de crecimiento debido a la malnutrición. La deficiencia de cinc puede ocasionar

¹ H.C. Freake, Encyclopedia of Human Nutrition, 2nd ed. (2005) 447-454.

² J. Casas Fernandez, V. Moreno, A. Sánchez, J.L. Sánchez y J. Sordo, "Química Bioinorgánica", Madrid, España. Ed. Síntesis (2002)

³ A.S. Prasad. J. Am. Coll. Nutr. (1996) 15:113-120.

⁴ A.S. Prasad, Nutr. (1995) 11:93-99.

⁵ R.J. Cousins, E.E. Ziegler, L.J. Filer, Conocimientos actuales sobre nutrición. Séptima Edición. Washington: International Life Sciences Institute, (1999) 312-327.

⁶ A.S. Prasad, Clin. Endocrinol. Metab. (1985) 14:567-589.

⁷ A.S. Prasad, J. Am. Coll. Nutr. (1985) 4:65-72.

también mala cicatrización de las heridas, enanismo, malformaciones fetales y desórdenes en el sistema inmunológico. Algunas personas padecen anorexia y dificultades fisiológicas por esta deficiencia; los síntomas pueden aliviarse por consumo de cinc⁸. Como todo elemento esencial su exceso se ha asociado con bajos niveles de cobre, alteraciones en la función del hierro y disminución de la función inmunológica y de los niveles del colesterol bueno.

Como parte del estudio de las interacciones de los biometales con moléculas “modelo” que generen sitios similares a los sitios enzimáticos, se comenzó con el estudio de la interacción del Zn con ligandos que contengan oxígeno en su esfera de coordinación. Para ello se eligió el compuesto ácido tricarbálico, generando cristales que fueron estudiados en detalle por su arreglo como polímeros de coordinación (Metal organic framework, MOF).

Como fuera reportado en capítulo del cobre, los carboxilatos aromáticos y alifáticos, frecuentemente, son empleados para preparar complejos con cadenas en 1 dimensión, capas en dos dimensiones o estructuras en 3 dimensiones. Ciertos compuestos como el benceno dicarboxilato, benceno tricarboxilato, ciclohexanotricarboxilato, metanotetrabenzoato y adamantanotetracarboxilato han sido ampliamente investigados para el diseño y la síntesis de compuestos con estructuras abiertas. Por otro lado, también se han sintetizado policarboxilatos de cadena abierta como ácido maleico, ácido succínico, ácido fumárico y especialmente aquellos con más de dos grupos carboxilato como el ácido tricarbálico⁹. Existe en la literatura una gran variedad de complejos multicarboxilatos de Zn tanto monoméricos como poliméricos con diferentes composiciones, topologías, formas, funcionalidad y simetría^{10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21}. Además, se han reportado pocos estudios enfocados en las estructuras de ligandos carboxilato flexibles. Se sintetizaron dos complejos monoméricos de Zn con betaína (bet= $\text{Me}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$), $[\text{Zn}(\text{bet})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}](\text{ClO}_4)$ y $[\text{Zn}(\text{bet})_3(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, donde los grupos carboxilato se

⁸ C.C. Pfeiffer, “Neurobiology of the trace metals zinc and copper”. Academic Press, New York (1972).

⁹ I. Vlahou, N. Kourkoumelis, A. Michaelides, S. Skoulika, J.C. Plakatouras, *Inorg. Chim. Acta* (2006) 359:3540-3548.

¹⁰ S.V. Ganesan, P. Lightfoot, S. Natarajan, *Solid State Sci.* (2004) 6:757-762.

¹¹ K.O. Kongshaug, H. Fjellva, J. *Solid State Chem.* (2004) 177:1852-1857.

¹² K. Hanson, N. Calin, D. Bugaris, M. Scancella, S.C. Sevov, J. *Am. Chem. Soc.* (2004) 126:10502-10503.

¹³ R. Murugavel, D. Krishnamurthy, M. Sathiyendiran, J. *Chem. Soc., Dalton Trans.* (2002) 34-39.

¹⁴ (a) F. Dejehet, R. Debuyst, B. Ledieu, J.P. Declercq, G. Germain, M. van Meerssche, *Inorg. Chim. Acta* 30 (1978) 197-204.

(b) H. Grewe, M.R. Udupa, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta* 63 (1982) 119-124.

¹⁵ F. Wiesbrock, H. Schmidbaur, J. *Chem. Soc. Dalton Trans.* (2002) 186:3201-3205.

¹⁶ J. Kim, B. Chen, T.M. Reineke, H. Li, M. Eddaoudi, D.B. Moler, M. O’Keeffe, O.M. Yaghi, J. *Am. Chem. Soc.* (2001) 123:8239-8247.

¹⁷ G. Micera, L.S. Erre, P. Piu, F. Cariati, G. Ciani, A. Sironi, *Inorg. Chim. Acta* (1985) 107:223-227.

¹⁸ H. Hosomi, S. Ohba, Y. Ito, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* (2000) 56:e123-e:124.

¹⁹ O.R. Evans, Wenbin Lin, *Cryst. Growth Des.* (2001) 1:9-11.

²⁰ R. Baggio, D. Stoilova, G. Polla, G. Leyva, M.T. Garland, J. *Mol. Struct.* (2004) 697:173-180.

²¹ A.S. Lipton, M.D. Smith, R.D. Adams, P.D. Ellis, J. *Am. Chem. Soc.* (2002) 124:410-414.

unen de manera monodentada al metal y los complejos adquieren una geometría tetraédrica distorsionada²². También se utilizó al ácido hexanoico, ácido carboxílico flexible con una cadena alquílica, para obtener un polímero anhidro de carboxilato de Zn(II)–en el que el metal se une tetraédricamente a 4 restos carboxilato de 4 ácidos hexanoicos²³. La misma estructura fue obtenida por el sistema Zn(II)-propionato²⁴.

Por otro lado, se describieron otros complejos poliméricos de Zn(II) de coordinación tetraédrica con propionato, con los metales centrales vinculados entre sí por los ligandos²⁵ y se han obtenido compuestos con la misma coordinación alrededor de dos centros metálicos con grupos carboxilato como puente²⁶ o con coordinación bidentada a través de grupos carboxilato terminales²⁷. Se reportaron pocos ejemplos de complejos de cadenas abiertas alifáticas saturadas con dichos ligandos, los que se comportan como ligandos espaciadores flexibles y ofrecen una gran variedad de motivos: entornos octaédricos simples²⁸, polímeros en dos dimensiones²⁹, polímeros complejos como $Ba[Zn(C_3H_2O_4)_2(H_2O)_4]_n$ con entorno octaédrico distorsionado³⁰ y complejos poliméricos en tres dimensiones como $\{Na_2[Zn(C_3H_2O_4)_2] \cdot 2H_2O\}_n$ ³¹. También se han reportado complejos con succinato³², fluorsuccinato³³ y glutarato³⁴ que involucran puentes carboxilato. El ácido *trans*-propeno-tricarbalílico ha sido utilizado para construir complejos con Zn(II) con cadenas en forma de cintas en 1 dimensión, red romboidal en 2 dimensiones, capas en forma de espiga y estructuras abiertas en 3 dimensiones no interpenetradas³⁵. Existen en general pocos ejemplos de sistemas con ácidos carboxílicos flexibles, en particular con este ligando existen sistemas reportados para Ce(III), UO_2^+ , La(III), Gd(III), Eu(III) y Mn(III)^{36,37,38} siendo éste último junto con los de Cu(II) preparados por nosotros los únicos con metales de transición. Por tanto, el objetivo de este estudio es describir la etapa de síntesis y caracterización

²² X.M. Chen, X.C. Huang, M.-L. Tong, Y.X. Tong, S.W. Ng, Aust. J. Chem. (1997) 50:865-868.

²³ P. Segedin, N. Lah, M. Zefran, I. Leban, L. Golic, Acta Chim. Slov. (1999) 46:173-184.

²⁴ E. Goldschmied, A.D. Rae, Acta Cryst. B (1977) 33:2117-2120.

²⁵ W. Clegg, I.R. Little, B.P. Straughan, Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. (1987) 43:456-457.

²⁶ Y.Q. Zheng, A.Y. Pan, J.L. Lin, Z. Kristallogr. New Cryst. Struct. (2001) 216:267-281.

²⁷ J. Cai, L.-S. Long, L.S. Zheng, Main Group Met. Chem. (2002) 25:517-528.

²⁸ G.A. Kiosse, I.G. Filippova, A.Y. Leont'ev, G.A. Popovich, T.I. Malinovskii, Y.V. Yablokov, N.V. Gerbeleu, Proc. Natl. Acad. Sci. USSR 304 (1989) 607-614.

²⁹ X.C. Fu, M.T. Li, X.Y. Wang, C.G. Wang, X.T. Deng, Acta Crystallogr. C. (2006) 62:m258-m260

³⁰ M.L. Guo, C.H. Guo, Acta Crystallogr. C. (2006) 62:m7-m9.

³¹ D.D. Lin, L. Zhang, D.J. Xu, Acta Cryst. E (2003) 59:m1010-m1012.

³² T.A. Bowden, H.L. Milton, A.M.Z. Slawin, P. Lightfoot, Dalton Trans. (2003) 936-939.

³³ A. Karipides, Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. (1980) 36:1659-1662.

³⁴ Y.Q. Zheng, J.-L. Lin, H.-L. Zhang, Z. Kristallogr. New Cryst. Struct. (2000) 215:535-536.

³⁵ M.S. Wang, G.C. Guo, L.Z. Cai, W.T. Chen, B. Liu, A.Q. Qu, J.S. Huang, Dalton Trans. (2004) 2230-2236.

³⁶ J.A. Armstrong, J.C. Barnes, Acta Crystallogr. (2004) E60:m791-m793.

³⁷ P. Thuéry, Chem. Commun. (2006) 853-855.

³⁸ L. Cañadillas-Delgado, O. Fabelo, J. Pasán, F.S. Delgado, M. Del Déniz, E. Sepúlveda, M.M. Laz, M. Julve, C. Ruiz-Pérez, Cryst. Growth Des. (2008) 8:1313-1318.

de un nuevo complejo con Zn y ácido tricarbálico que presenta una interesante arquitectura con un ensamble poco común.

6.2. Preparación de $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]$

La síntesis del complejo fue realizada bajo condiciones solvotermales. A una solución metanólica de 1mmol de ácido tricarbálico (H_3ATC) y 1 mmol de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se le agregó NaOH 1M hasta que se formó un precipitado blanco que fue filtrado, lavado varias veces con agua destilada y secado al aire. Luego, se agregaron 2 mmoles de 4-cianopiridina al sólido blanco obtenido y se adicionaron 8 ml de metanol. Esa mezcla se colocó en una bomba de teflón de 23 ml y fue calentada a 130 °C por 3 días la que finalmente fue enfriada lentamente hasta temperatura ambiente. El sistema de reacción se mantuvo bajo una lenta evaporación a temperatura ambiente. Luego de 5 meses se obtuvieron, a partir de las aguas madres, un pequeño número de cristales en forma de agujas simples, adecuados para el análisis por difracción de rayos X. El agregado de una base de Lewis como la 4-cianopiridina al medio de reacción favoreció la formación de los cristales. Anal. Calc. para $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{ZnNa}$: C, 22,83; H, 3,49 %. Exp.: C, 22,78 H, 3,47 %. Rto. 18 %.

6.3 Resultados

6.3.1. Estructura cristalina

Los cristales obtenidos para el complejo permitieron la determinación estructural mediante la técnica de difracción de rayos X.

Los datos recolectados y los detalles experimentales junto con las constantes de celda fueron resumidos en la Tabla 1.

El sistema se describe como un polímero de coordinación ($[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]_n$) que consiste en una estructura abierta donde el centro de Zn se une a 3 grupos carboxilato pertenecientes al anión tricarbálico. La conformación de este anión y los modos de unión son observados en la Figura 1. y las conformaciones posibles son resumidas en el Esquema 1. Algunas características relevantes del ligando se encuentran en la Tabla 2^{39,40,41,42}. En la Figura 2 se muestra la esfera de coordinación de los metales y en la Tabla 3 algunos ángulos y distancias seleccionados.

³⁹ J.A. Armstrong, J.C. Barnes, Acta Crystallogr. (2004) 60: m791-m793.

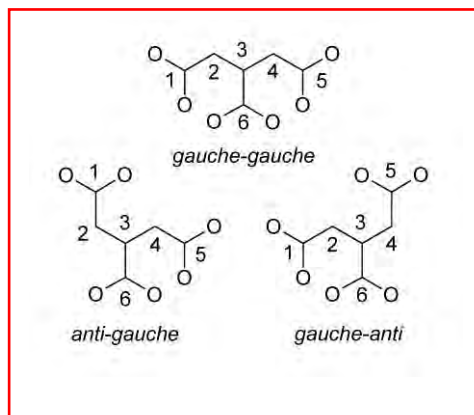
⁴⁰ P. Thuéry, Chem. Commun. (2006) 42:853-855.

⁴¹ L. Cañadillas-Delgado, O. Fabelo, J. Pasán, F.S. Delgado, M. Del Déniz, E. Sepúlveda, M.M. Laz, M. Julve, C. Ruiz-Pérez, Cryst. Growth Des. (2008) 8:1313-1318.

⁴² H.H. Zou, S.H. Zhang, M.H. Zeng, Y.L. Zhou, H. Liang, J. Mol. Struct. (2008) 885:50-55.

Fórmula empírica	$C_6H_{11}NaO_9Zn$
Peso fórmula	315,51
Temperatura	293(2) [K]
λ [Cu(K α)]	1,54184 (Å)
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Parámetros de celda	
a	10,885(2) (Å)
b	13,219(3) (Å)
c	15,299(5) (Å)
α	90 (°)
β	02,23(2) (°)
γ 90 (°)	
Volumen de la celda	2151(1) (Å ³)
Densidad	
1,948 (g/cm ³)	
Moléculas por celda Z	8
Coefficiente de absorción lineal μ [Cu(K α)]	3,983 (mm ⁻¹)
F(000)	1280
Tamaño cristal	0,08 x 0,11 x 0,23 (mm)
Rango θ para la recolección de datos ()	
5,34 – 69,91	
Límites de los índices	-13 \leq h \leq 0
-16 \leq k \leq 2	
-18 \leq l \leq 18	
Reflexiones recolectadas/única con $I > 2\sigma(I)$	2217 / 1940
Completado hasta $\theta = 69,91$	95.0 %
Datos / restricciones / parámetros	1940 / 0 / 151
Mejora de ajuste en F^2	
1,036	
R	0,0383
R _w	0,0939
$(\Delta\rho)_{max} / (\Delta\rho)_{min}$ (e/Å ⁻³)	0,394 / -0,621

Tabla 1. Datos del cristal y determinación estructural para $[NaZn(C_6H_5O_6)(H_2O)_3]_n$.



Esquema 1. Diagrama de las conformaciones del anión tricarbálico, donde el átomo de hidrógeno está unido al átomo de carbono central (átomo 3) que apunta hacia afuera de la hoja.

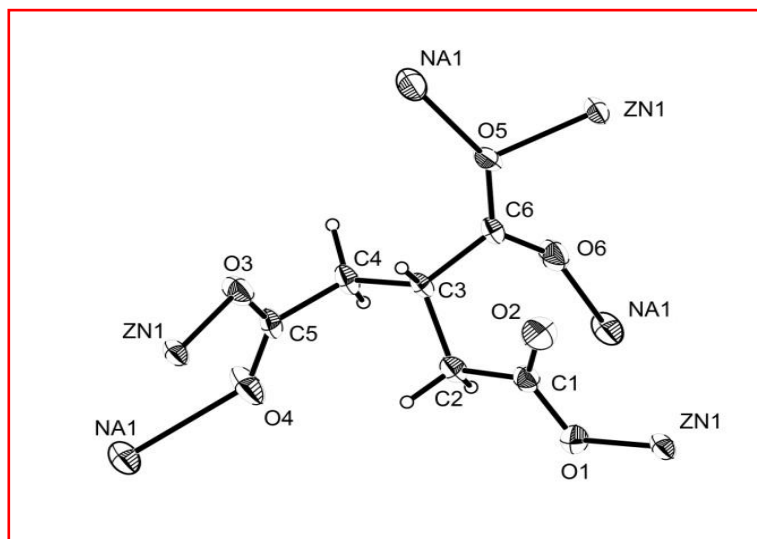


Figura 1. Diagrama ORTEP⁴³ del anión tricarbaliato mostrando la conformación del ligando, la coordinación al centro metálico y el esquema de átomos seleccionados etiquetados. Los desplazamientos elipsoidales de los átomos diferentes al hidrógeno son graficados con un nivel de probabilidad del 50 %.

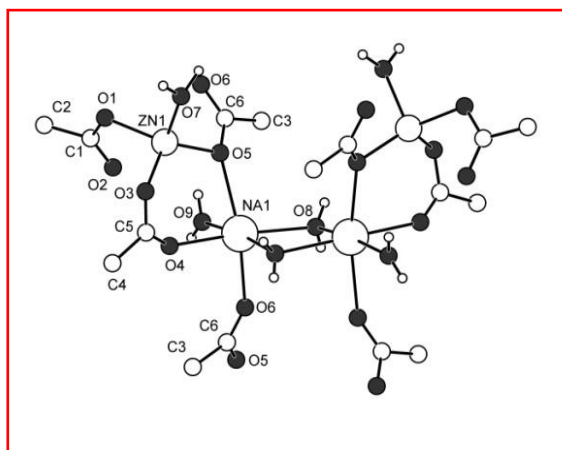


Figura 2. Diagrama de la esfera de coordinación para Na y Zn. Sólo se incluyen fragmentos de carboxilato y agua coordinados al ión central.

Se puede observar que el catión Zn(II) posee una coordinación tetraédrica distorsionada que involucra 3 átomos de oxígeno provenientes del anión carboxilato y un átomo de oxígeno proveniente de una molécula de agua coordinada. Por otro lado el ion Na(I) se encuentra en un entorno octaédrico, unido a 3 átomos de oxígeno provenientes del anión carboxilato y a 3 moléculas de agua. Dos átomos de oxígeno provenientes de aguas, relacionados por un eje binario,

⁴³ M. Nardelli, J. Appl. Cryst. (1995) 28:659-1142.

están involucrados en la construcción de puentes que involucran los átomos de sodio (Na-(μ_2 -OH₂)-Na) que comparten bordes formando dímeros de estructuras octaédricas (La distancia Na \cdots Na fue 3,621 (2) Å).

Metales	C1-C2-C3-C6	C6-C3-C4-C5	Conf. ^(a)
Mn	161.1(1)	-53.8(2)	ag
Zn, Na ^(b)	57.50(2)	170.44(1)	ga
La	172.5(5)	-71.1(6)	ag
	69.3(6)	-172.0(5)	ga
Ce	164.(3)	-61.6(4)	ag
Eu	67.4(9)	-169.7(7)	ga
Gd	66(1)	-169(1)	ga
U, Na	71(1)	-58(1)	gg

Tabla 2. Ángulos de torsión seleccionados (°) describiendo las conformaciones del anión tricarbilato.

^(a) a: anti; g: gauche, ^(b) nuestro cristal

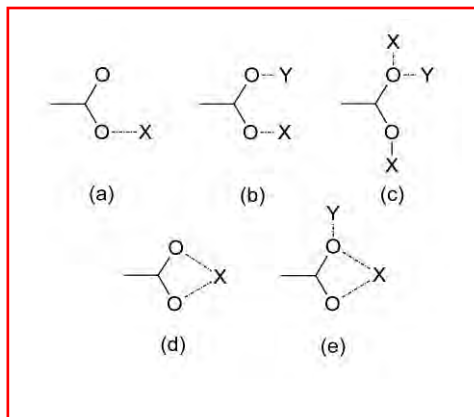
(a)					
Zn1 - O7	2,010(2)	Na1 - O6 ⁱⁱ	2,405(2)	Na1 - O8	2,369(2)
Zn1 - O3	1,947(2)	Na1 - O8 ⁱ	2,420(2)	Na1 - O4	2,317(3)
Zn1 - O5	1,954(2)	Na1 - O5	2,473(2)	O8 - Na1 ⁱ	2,420(2)
Zn1 - O1	1,998(2)	Na1 - O9	2,501(3)	Na1 - Na1 ⁱ	3,621(2)
Zn1 - Na1	3,684(1)	Na1 - Na1 ⁱ	3,621(2)	O4 - C5	1,220(4)
O3 - C5	1,291(3)	C6 - O6	1,237(3)	O5 - C6	1,282(3)
O3 - Zn1 - O5	115,76(9)	O6 ⁱⁱ - Na1 - O5	156,00(9)		
O3 - Zn1 - O1	99,63(9)	O8 ⁱ - Na1 - O5	108,00(8)		
O5 - Zn1 - O1	132,11(8)	O4 - Na1 - O9	88,2(1)		
O3 - Zn1 - O7	99,53(9)	O8 - Na1 - O9	99,68(9)		
O5 - Zn1 - O7	105,32(9)	O6 ⁱⁱ - Na1 - O9	78,11(8)		
O1 - Zn1 - O7	99,02(8)	Na1 - O8 - Na1 ⁱ	98,21(7)		
O4 - Na1 - O6 ⁱⁱ	94,65(8)	C6 - O5 - Na1	136,6(2)		
O8 - Na1 - O6 ⁱⁱ	84,10(7)	C6 - O6 - Na1 ⁱⁱⁱ	150,0(2)		
O4 - Na1 - O8 ⁱ	90,48(9)	O6 - C6 - O5	122,1(2)		
O8 - Na1 - O8 ⁱ	81,32(7)	Zn1 - O5 - Na1	112,11(9)		
O6 ⁱⁱ - Na1 - O8 ⁱ	96,00(8)	C5 - O4 - Na1	140,0(2)		
O4 - Na1 - O5	85,53(8)	C5 - O3 - Zn1	120,9(2)		
O8 - Na1 - O5	99,04(7)	O4 - C5 - O3	124,0(3)		
(b)					
	D - H	H \cdots A	D \cdots A	D - H \cdots A	
O7 - H71 \cdots O1 ^{iv}	0,82	1,91	2,727(3)	173	
O7 - H72 \cdots O9 ^v	0,97	1,79	2,763(4)	174	
O8 - H81 \cdots O1 ^{vi}	0,71	2,23	2,935(3)	170	
O8 - H82 \cdots O3 ^{vii}	0,93	1,85	2,770(3)	170	
O9 - H91 \cdots O2 ^{viii}	0,90	1,86	2,764(3)	176	
O9 - H92 \cdots O9 ^{viii}	0,87	2,50	2,943(3)	112	

Tabla 3. (a) Distancias de unión seleccionadas (Å) y ángulos (°) para [NaZn(C₆H₅O₆)(H₂O)₃]_n, (b) Contactos no unidos seleccionados (Å) y ángulos (°).

Códigos de simetría: (i) -x, y, 1/2-z; (ii) 1/2-x, -1/2-y, 1/2-z; (iii) 1/2-x, 1/2+y, 1/2-z; (iv) 1/2-x, 1/2-y, -z; (v) 1/2-x, 1/2+y, 1/2-z; (vi) 1/2-x, -1/2+y, 1/2-z; (vii) x, -y, 1/2+z; (viii) 1-x, y, 1/2-z

Varios autores han estudiado los modos de unión entre metales y los átomos de oxígeno del anión carboxilato^{44,45,46,47,48,49,50}.

En el esquema 2 se resumen modos de unión para el anión tricarbaliato encontrados en la literatura y también obtenidos por nosotros.



Esquema 2. Modos de unión para el anión tricarbaliato.

La fracción del anión carboxilato esquematizada con la denominación O5-C6-O6 muestra un modo de unión triple que no se observa en otros aniones tricarbaliato (esquema 2c) uniendo dos cationes sodio a través de un puente *trans-trans* Na-O-C-O-Na (las distancias O5-Na1 y O6-Na1 son 2,473(2) y 2,405(2) Å, respectivamente) y un catión Zn (distancia O5-Zn1:1,954(2) Å). En esta disposición el átomo de oxígeno O5 actúa como puente entre el catión sodio y el catión Zn (Na-(μ_2 -O)-Zn). Además, el centro metálico se vincula en forma de puente por el grupo carboxilato denominado O3-C5-O4 con simetría *syn-syn* Zn-O-C-O-Na (esquema 2b), siendo las distancias, entre los átomos de oxígeno y los metales de O3-Zn1 y O4-Na1, 1,947(2) y 2,317(3) Å para O3-Zn1 y O4-Na1, respectivamente. El ángulo que forman los átomos denominados O3-C5-O4 es de 124,0(3)° y se corresponde con el mayor valor O-C-O presente en el cristal. El grupo de átomos O1-C1-O2 está unido al catión Zn de forma monodentada a través del átomo O1 terminal. La distancia Zn1-O1 calculada es 1,998(2) Å (esquema 2a).

En la Figura 3 se muestran 3 empaquetamientos cristalinos. El catión sodio en un entorno octaédrico está conectado al anión carboxilato (O5-C6-O6) a través del puente *trans-trans* Na-O-C-O-Na formando cadenas infinitas en zig-zag a lo largo del eje b (Figura 3a).

⁴⁴ M. Bera, G. T. Musie, D. R. Powell, Inorg. Chem. Comm. (2008) 11:293-299.

⁴⁵ D.Y. Ma, G.H. Deng, Acta Cryst. (2008) C64:m271-m273.

⁴⁶ L.Z. Zhang, P. Cheng, W. Shi, D.Z. Liao, Y. Xiong, G.Q. Tang, Inorg. Chem. Commun. (2002) 5:361-365.

⁴⁷ A.D. Burrows, K. Cassar, R.M.W. Friend, M.F. Mahon, S.P. Rigby, J.E. Warren, Cryst. Eng. Commun. (2005) 7:548-550.

⁴⁸ J. Sun, Y. Zhou, Q. Fang, Z. Chen, L. Weng, G. Zhu, S. Qiu, Inorg. Chem. (2006) 45:8677-8684

⁴⁹ H. Xu, R. Wang, Y. Li, J. Mol. Struct. (2004) 688:1-3.

⁵⁰ E. Biemmi, T. Bein, N. Stock, Solid State Sci. (2006) 8:363-370.

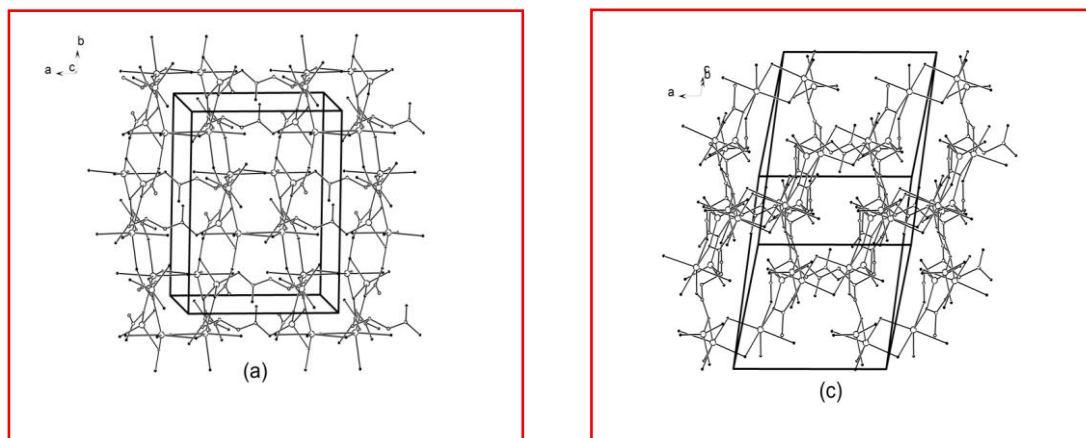


Figura 3. Diagrama del empaquetamiento del complejo $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ mostrando la proyección de la celda unidad en los ejes (a) c, (b) a y en la dirección (c) $[0\ 0\ 1]$. Los átomos de hidrógeno son omitidos para una mayor claridad.

Las cadenas relacionadas por dos ejes están vinculadas por dímeros de sodio octaédricos compartiendo bordes dando lugar a una estructura en dos dimensiones que consiste en una capa polimérica orgánica-inorgánica paralela $(0\ 0\ 1)$ al plano cristalográfico (Figura 3b). Esas capas poliméricas se describieron como una red de pared de ladrillo ondulada⁵¹. Los aniones tricarbaliatos están organizados entre capas poliméricas con conexión a lo largo de el eje c, a través de los modos de unión carboxilato correspondientes a los grupos O3-C5-O4 y O1-C1-O2. Ellos ayudan al desarrollo de una estructura abierta con canales paralelos a la dirección $[0\ 1\ -1]$, donde se localizan las aguas de coordinación (Figura 3c). Las moléculas de agua ubicadas dentro de los canales son, además, estabilizadas por una red de puentes de hidrógeno $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ involucrando átomos de oxígeno del anión carboxilato y moléculas de agua (ver tabla 3).

6.3.2. Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Con el fin de obtener una caracterización más precisa de las estructuras cristalinas obtenidas, se realizó el estudio espectroscópico del cristal por espectroscopía FTIR y Raman. Resulta en ese sentido interesante poder asignar y diferenciar los grupos carboxilato presentes en el complejo.

Las asignaciones de las bandas observadas están basadas en valores reportados previamente para complejos entre el cinc y ligandos con grupos carboxilato^{52,53} y en los trabajos previos realizados con Cu(II) (ver capítulo V). En la Tabla 4 se muestran las frecuencias de estiramiento y las asignaciones para el ácido tricarbaliático, su sal de sodio y el complejo $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ y en la Figura 4 se muestra el espectro infrarrojo.

⁵¹ A. Erxleben, *Coord. Chem. Rev.* (2003) 246: 203-228.

⁵² C. Dendrinoud-Samara, G. Tsotsou, L.V. Ekateriniadou, A.H. Kortsaris, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, D.A. Kyriakidis, D.P. Kessissoglou, *J. Inorg. Biochem.* (1998) 71:171-179.

⁵³ (a) K. Nakamoto (Ed.), *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th ed., John Wiley, New York, 1986.

(b) E.J. Baran, *J. Coord. Chem.* (2001) 54:215-224.

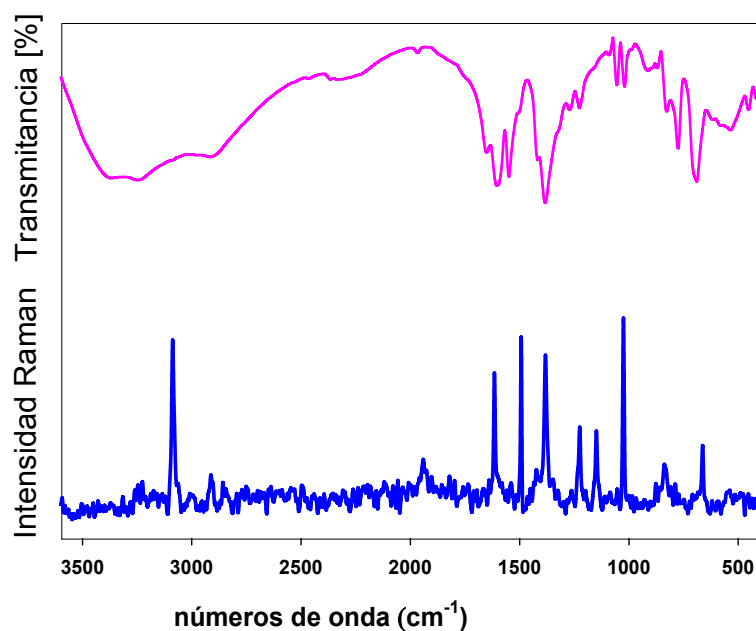


Figura 4. Espectro FTIR y Raman de $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ en el rango de $400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$.

Uno de los enfoques utilizados para la determinación del modo de unión del grupo carboxilato⁵⁰ está basado en la magnitud de la separación entre los valores de frecuencia obtenido para los modos de estiramientos antisimétrico y simétrico del grupo carboxilato, $\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Por otra parte, existe una manera de correlacionar esos valores con los diferentes modos de unión típicos de este grupo, así por ejemplo en general se cumple la tendencia: $\Delta\nu(\text{quelante}) < \Delta\nu(\text{puente}) < \Delta\nu(\text{iónico}) < \Delta\nu(\text{monodentado})$ ⁵⁴. Con la finalidad de complementar este estudio se utilizó la conocida ecuación de Nara que propone una relación entre los valores de la diferencia de frecuencia $\Delta\nu$ y la información estructural de los compuestos conteniendo grupos carboxilato:

$$\Delta\nu = 1818,1 \delta r + 16,47 (\theta_{\text{OCO}} - 120) + 66,8 \quad (\text{ecuación de Nara}^{55})$$

(δr =diferencias entre las longitudes de unión CO (Å), ángulo ($^\circ$) $\theta_{\text{OCO}} = \text{OCO}$)

⁵⁴ G.B. Deacon, R.J. Phillip, *Coord. Chem. Rev.* (1980) 33:227-250.

⁵⁵ M. Nara, H. Torii, M. Tasumi, *J. Phys. Chem.* (1996) 100:19812-19817.

H ₃ TCA		Na ₃ TCA		[NaZn(C ₆ H ₅ O ₆)(H ₂ O) ₃] _n		Asignaciones propuestas
FTIR	Raman	FTIR ^a	Raman	FTIR	Raman	
3050a, mf		3420a, mf		3378, 3247mf		v(OH)
	2999m				3087f	v _{as} (CH ₂)
	2975m		2975m			v _{as} (CH ₂)
	2941mf		2945d			v _s (CH ₂)
	2929 f		2926mf	2916m	2911m	v _s (CH ₂)
					1944m	Cadena carbonada lineal
1731mf	1668f					v(COOH)
1722mf						
1703mf						
		1573mf, a	1599d	1602mf		v _a (COO ⁻)
			1491d	1548f	1592d	
1439m	1447m	1452f	1438f	1502m	1496mf	δ _s (CH ₂)
1421m	1422m					
		1406mf	1382m	1417m	1390h	v _s (COO ⁻)
				1383mf	1384f	
1120d	1119m		1095d		1114m	v _s (CC)
1055d	1051d		1046d		1021mf	v _s (CC)
933h	933m		943m			v _s (CC)
	865m		865f	826d	830m	δ(CC)
				453d	454d	v(Zn-O) _{COO-}
					421d	v(Na-O) _{COO-}
					239d	v(Zn-O _a)
					220d	v(Na-O _a)

Tabla 4. Asignaciones de las bandas características FTIR y Raman (cm⁻¹) del ácido tricarbálico, su sal de sodio y el complejo [NaZn(C₆H₅O₆)(H₂O)₃]_n.

mf: muy fuerte, f: fuerte, m: medio, d: débil, h: hombro, a: ancha, O_a: átomo de oxígeno perteneciente a la molécula de agua. ^a Ref. ⁵¹

De nuestras observaciones (Tabla 4) surge que, las bandas típicas de absorción del grupo carboxílico no disociado del ácido tricarbálico próximas a 1700 cm⁻¹ se desplazan a menores frecuencias luego de la desprotonación (sal de sodio) o coordinación (complejo de Zn). En un trabajo previo⁵¹ presentamos la asignación del espectro infrarrojo de la sal de sodio que muestra dos nuevas bandas localizadas a 1573 cm⁻¹ (v_{as}(COO⁻)) y 1406 cm⁻¹ (v_s(COO⁻)) con un valor de Δν=167 cm⁻¹. En el nuevo complejo las bandas surgidas del modo de estiramiento antisimétrico de los grupos carboxilato se asignan en 1602 cm⁻¹ y 1548 cm⁻¹ y las derivadas del modo de estiramiento simétrico del grupo carboxilato se asignan a las bandas localizadas en a 1417 cm⁻¹ y 1383 cm⁻¹. Los análisis cristalográficos revelan 3 tipos diferentes de modos de coordinación derivados de los grupos carboxilato del ligando tricarbálico. El grupo denominado O1-C1-O2 se une al Zn1 en modo monodentado vía el átomo O1, el grupo designado O3-C5-O4 se une al Zn1 y al Na1 de manera bidentada a través de un puente *syn-syn* y el grupo identificado

como O5-C6-O6 se une a Zn1 y Na1 en modo de unión triple en donde se involucran dos átomos de oxígeno. Con el fin de asignar los valores experimentales de las diferencias de frecuencia $\Delta\nu$ a los diferentes tipos de unión, la misma fue calculada sustituyendo los datos estructurales en la ecuación de Nara. De acuerdo con los resultados de la estructura cristalina, el valor $\Delta\nu$ calculado para el grupo asignado como O1-C1-O2 (211 cm^{-1}) fue mayor que para la sal de sodio y el indicado para la coordinación monodentada en el complejo. Ese valor $\Delta\nu$ está cercano al valor experimental (219 cm^{-1}) calculado usando las bandas a 1602 cm^{-1} y 1383 cm^{-1} respectivamente (Tabla 4). La ecuación de Nara no puede ser aplicada para el caso del puente carboxilato *syn-syn* (O3-C5-O4) el cual no presenta simetría para el grupo carboxilato denominado como O5-C6-O6 que involucra una coordinación monodentada y monoatómica. Sin embargo, teniendo en cuenta que el valor $\Delta\nu$ experimental (131 cm^{-1}) obtenido para las bandas 1548 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) y 1417 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$) fue menor que el obtenido para el grupo carboxilato monodentado en la sal de tricarbálato de sodio, se puede proponer un modo de coordinación puenteado usando la regla empírica obtenida por Deacon y Phillips⁵². Desafortunadamente no se observaron otras bandas relacionadas con las vibraciones del grupo COO^- tanto simétricas y/o antisimétricas debido a que probablemente se encuentren superpuestas con otros modos vibracionales.

En el espectro Raman (Figura 4) la banda correspondiente al modo de estiramiento simétrico del grupo carboxilato fue identificada en 1384 cm^{-1} la cual contiene un hombro sobre el lado de mayor frecuencia ubicado en 1390 cm^{-1} , siendo además su intensidad muy fuerte como era lo esperado para reforzar su asignación⁵⁰.

En el espectro FTIR, el complejo también exhibe bandas típicas debidas a los modos de vibración del ligando. Por ejemplo, la banda que aparece a 1502 cm^{-1} podría ser asignada tanto al grupo metileno como al modo de estiramiento $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$. Comparando el espectro Raman con el espectro infrarrojo del ácido tricarbálico y la sal de sodio, podemos asignar la banda al modo “bending” (deformación) del grupo metileno que aparece a 1496 cm^{-1} en el espectro Raman⁵⁶.

Las bandas localizadas en 3378 cm^{-1} y 3247 cm^{-1} se deben, probablemente, al modo de estiramiento de las moléculas de agua coordinadas⁴⁷.

Los modos de estiramiento antisimétrico y simétrico del grupo CH_2 fueron asignadas a las bandas entre $2995\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ y $2925\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, siendo esta última de gran intensidad espectro Raman⁵⁰. Otro rasgo característico del espectro Raman es la aparición de una banda cerca de 2000 cm^{-1} que puede ser asignada a la cadena lineal de átomos de carbono del ligando (Tabla 4 y Figura 4)⁵⁷.

El modo de estiramiento Na-O podría ser asignado mediante espectroscopía Raman (Tabla 4). Las bandas derivadas del modo de estiramiento M-O (átomos de oxígeno derivados del grupo carboxilo) son observados en general en el rango entre $400\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ y el modo de estiramiento para M-OH_2 aparece usualmente por

⁵⁶ E.V. Bruseau, G.E. Narda, J.C. Pedregosa, G. Etcheverria, G.M. Punte, J. Solid State Chem. (1999) 143:174-181.

⁵⁷ J. Kiirti, C. Magyar, A. Balázs, P. Rajczy, Synth. Metals (1995) 71:1865–1866.

debajo de 400 cm^{-1} ,^{58,59}. El espectro Raman muestra que aparecen dos nuevas bandas en el complejo en 454 y 421 cm^{-1} . A partir del resultado de rayos X se puede concluir que la distancia Zn-O es menor que la distancia Na-O (Tabla 3), por tanto, el modo de estiramiento de enlace Zn-O podría ser observado a mayor número de onda que para el enlace Na-O. Teniendo en cuenta la distancia de unión M-O y el hecho que esas bandas no son observadas en el espectro infrarrojo del ácido tricarbálico ni en el de la sal de sodio, nosotros asignamos la banda a 454 cm^{-1} a las vibraciones de estiramiento para la unión Zn-O y a la banda en 421 cm^{-1} al modo de estiramiento para la unión Na-O⁵⁷. Las nuevas bandas Raman ubicadas por debajo de 400 cm^{-1} podrían ser asignadas a las vibraciones $\nu(\text{Zn-O}_w)$ (239 cm^{-1}) y $\nu(\text{Na-O}_w)$ (220 cm^{-1}).

6.3.3. Estabilidad térmica

Los estudios termogravimétricos nos permiten estudiar el comportamiento de las aguas de coordinación y evidenciar su pérdida en relación a los datos estructurales. Como se observa en la Figura 5, la curva termogravimétrica se divide en 3 pasos.

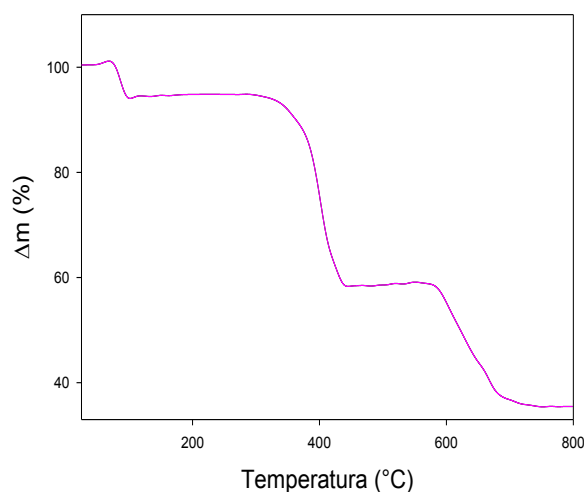


Figura 5. Curva termogravimétrica (TGA) de ZnATC en atmósfera de O₂.

El proceso comienza con una pérdida de peso (11,2%) que ocurre en el rango de temperatura 70-206 °C y puede ser atribuida a la pérdida de dos moléculas de agua de coordinación (valor calculado 11,4%). Teniendo en cuenta que el ion Zn(II) presenta un efecto de polarización mayor que el sodio sobre el oxígeno y que la distancia Zn-O es menor que la distancia Na-O en el cristal, podemos asumir que la primera pérdida de peso corresponde a las moléculas de agua coordinadas al sodio. Probablemente debido a la pérdida del efecto de

⁵⁸ B. Morzyk-Ociepa, *Vibr. Spectrosc.* (2009) 49:68-79.

⁵⁹ B. Morzyk-Ociepa, *Vibr. Spectrosc.* (2008) 46:115-127.

estabilización del ion sodio en la estructura, la descomposición tiene lugar inmediatamente después. La segunda etapa ocurre en el rango de temperatura 206-487 °C (36,4%) y la tercera etapa ocurre por encima de 488 °C y probablemente se deba a la descomposición del ligando orgánico. La descomposición completa ocurre a una temperatura > 739 °C. El producto final, resulta una mezcla de ZnO y Na₂O, y la formación de ZnO fue identificada por espectroscopía FTIR. El valor del residuo experimental ($\Delta m_{\text{exp}}=35,9\%$) está de acuerdo con el valor calculado ($\Delta m_{\text{calc.}}=35,6\%$).

6.4. Conclusiones

-Se sintetizó en condiciones solvotermales un nuevo polímero de coordinación en 3 dimensiones de fórmula general $[\text{NaZn}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]_n$.

- El compuesto cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial C2/c centrosimétrico ($a=10,885(2)$; $b=13,219(3)$; $c=15,299(5)$ Å, $\beta=102,23(2)^\circ$, $V=2151(1)$ Å³, $Z=8$).

- La estructura cristalina del polímero consiste en una estructura abierta donde el catión Zn(II) posee una coordinación tetraédrica distorsionada que involucra 3 átomos de oxígeno provenientes del anión carboxilato y un átomo de oxígeno proveniente de una molécula de agua coordinada. Por su parte el ion Na(I) se encuentra en un entorno octaédrico, unido a 3 átomos de oxígeno provenientes de grupos carboxilato y a 3 moléculas de agua.

-A través del análisis termogravimétrico se pudo observar que 2 de las 3 moléculas de H₂O están asociadas, probablemente, a la esfera de coordinación del Na(I). También se determinó que el residuo final de la descomposición del polímero consiste en ZnO (confirmado a través de espectroscopía FTIR) y Na₂O.

-Cabe mencionar que el conocimiento de los datos estructurales obtenidos mediante rayos X fueron decisivos en las asignaciones realizadas tanto por FTIR y Raman como por termogravimetría.

Capítulo 7

7. Materiales y Métodos

7.1. Caracterización fisicoquímica

7.1.1. Análisis elemental

Para el análisis elemental de C, H y N se usó un analizador Carlo Erba EA 1108. La determinación de vanadio se realizó utilizando una técnica espectrofotométrica UV-vis puesta a punto en nuestro laboratorio. La misma está basada en la formación del ácido tungstosfosvanádico (400 nm), por el agregado de ácido fosfórico y tungstato de sodio a una solución ácida conteniendo vanadio(V)¹.

Para determinar la concentración de Na se utilizó un fotómetro de llama (J.R. Technology).

7.1.2. Análisis termogravimétrico (TG) y térmico diferencial (DTA)

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizó mediante el empleo de un sistema termoanalítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50. Se trabajó en atmósfera de O₂ con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El rango de muestra utilizado fue entre 10 y 20 mg. Se empleó Al₂O₃ como estándar para el DTA. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa TASYs.

7.1.3. Espectros electrónicos (UV-vis) y titulaciones espectrofotométricas

Las medidas espectrales se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos) 8453 con arreglo de diodos, empleando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. La estequiometría de los sistemas estudiados en solución fue establecida por titulación espectrofotométrica mediante el método de la razón molar por el cual se registran los cambios de absorbancia en función de la relación metal:ligando a un valor constante de longitud de onda. En general, para determinar los espectros se usó la solución del ligando en estudio (en el solvente adecuado y al pH de síntesis) con el agregado de una solución de VOSO₄·5H₂O cubriendo un rango de concentraciones metal:ligando desde 10:1 hasta 0,5:1, bajo atmósfera de nitrógeno.

7.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR)

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4000 a 400 cm⁻¹ bajo la

¹ M. Onishi, Photometric Determination of Traces of Metals, Part II. 4th ed., J.Wiley, New York (1989).

forma de pastillas de KBr. La resolución espectral fue de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa OPUS.

7.1.5. Espectros Raman

Los espectros Raman fueron medidos en un espectrofotómetro Bruker IFS 113 FTIR con un accesorio Raman NIR. Para la excitación se utilizó la radiación de un láser de estado sólido Nd:YAG (1064 nm), en el rango entre 3600 y 100 cm^{-1} . La resolución espectral fue de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.

7.1.6. Espectros de Reflectancia Difusa

Los espectros de reflectancia difusa UV-vis fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-300 utilizando el accesorio correspondiente y MgO como estándar.

7.1.7. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Con el objetivo de registrar los espectros a distintas temperaturas, se utilizó un espectrofotómetro Bruker ESP300 que opera en banda X (frecuencia=9,5GHz, 3400 Gauss) y banda Q (frecuencia=35GHz, 12500 Gauss) y que está equipado con un estándar de dispositivos de baja temperatura de Oxford (ESR900/ITC4).

La ventaja del uso de la banda Q la mejor resolución de sistemas con valores de tensores g similares, la reducción de los efectos de segundo orden en las interacciones hiperfinas, y la observación de transiciones prohibidas, entre otras.

Se obtuvo la simulación computarizada de los espectros EPR mediante el programa Simfonia (WINEPR Simfonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, 1996).

7.1.8. Susceptibilidad magnética

Para realizar las medidas magnéticas se utilizaron muestras policristalinas en un rango de temperatura entre 4.2 y 300 K, usando un magnetómetro SQUID que opera con un campo magnético de 0,1 T donde la curva de magnetización versus campo magnético es lineal, incluso a 4,2 K.

7.1.9. Determinación de la estructura cristalina

Las medidas fueron realizadas en un difractómetro automático de 4 círculos Enraf-Nonius CAD-4 equipado con un generador de ánodo giratorio usando un monocromador de grafito con radiación Cu-K α . Cada estructura fue resuelta por método directo con SHELXS-97² y cada modelo molecular fue refinado por el

² Sheldrick GM. SHELXS-97. Program for crystal structure resolution. Göttingen, Germany: University of Göttingen (1997).

procedimiento en matriz completa por el método de cuadrados mínimos con respecto a F^2 con SHELXS-97³.

7.2. Estudios en solución

7.2.1. Estudios de estabilidad en solución

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos en solución, es decir, para asegurar que los mismos fueran agregados a las células (en los diversos ensayos biológicos) sin descomposición, se disolvieron los compuestos en el solvente adecuado y se mantuvieron a 25 °C. El estudio se llevó a cabo registrando la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo.

7.2.2. Titulación potenciométrica

Para la preparación de las soluciones se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- El NaCl (Merck) se secó hasta peso constante y se almacenó en desecador con CaCl_2 como agente desecante. Todas las soluciones fueron preparadas con agua tridestilada en atmósfera de nitrógeno.

- Se utilizaron soluciones frescas (recientemente preparadas) antes de cada medida realizada.

- Las soluciones de HCl (Merck) se estandarizaron contra TRISMA (Hidroximetilaminoetano) (Anedra).

- Las soluciones de NaOH se prepararon a partir de una solución saturada de NaOH (Merck) y se estandarizaron contra HCl (patrón secundario).

- El $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) comercial se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante, se recalculó su fórmula ($\text{VOSO}_4 \cdot 4,8\text{H}_2\text{O}$; $\text{PM}=250,12$) en base a su análisis termogravimétrico (TG).

- Las soluciones stock de Cu(II) fueron estandarizadas con EDTA⁴ La contaminación con carbonato se evaluó mediante el método de Gran⁵.

Las medidas potenciométricas se realizaron en un titulador Mettler Toledo DL50 Graphics. Las titulaciones se llevaron a cabo en una celda termostaticada a $25 \pm 0,1$ °C sobre alícuotas de 25 ml. La fuerza iónica fue ajustada a 150 mM NaCl. El electrodo se calibró respecto a un conjunto de soluciones reguladoras de referencia (pH= 2,2 ; 4,0 y 7,0).

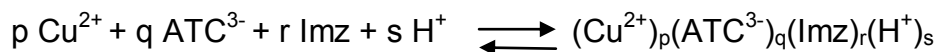
³ Sheldrick GM. SHELXL-97. Program for crystal structures analysis. Göttingen, Germany: University of Göttingen (1997).

⁴ I.M. Kolthoff, E.B. Sandell, E.J. Meehan, S. Bruckenstein, Análisis Químico Cuantitativo, Librería y editorial Nigar, Buenos Aires, 1979.

⁵ G. Gran, Analyst (1952) 77:661-671.

-Sistema Cu-ATC

Las constantes de formación (β_{pqrs}) corresponden a la notación general:



Se asume $pK_w=13,76$ (correspondiente al $\log \beta_{000-1}=-13,76$) para las condiciones experimentales ($T = 25^\circ\text{C}$, $I = 150 \text{ mM}$).

Las constantes de disociación para H_3ATC (pK_a) fueron determinadas a partir de 2 soluciones de distinta concentración de ligando (5 y 10 mM) en el rango de pH de 2 a 11 de acuerdo con los datos reportados con anterioridad⁶.

La constante ácida para HImz^+ junto con las constantes de formación para el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{Imz}/\text{H}^+$ fueron determinadas previamente en las mismas condiciones experimentales y se toman de referencia para este trabajo⁷.

Para determinar las constantes de formación del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{3-}/\text{H}^+$, se realizaron 4 conjuntos de titulaciones en el rango de pH de 2-6. Las concentraciones totales de cobre fueron 2,5; 5,0 y 10,0 mM y la relación metal/ligando osciló entre 1:1 y 1:4. Para el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{ATC}^{3-}/\text{Imz}/\text{H}^+$ se realizaron 4 titulaciones, utilizando una concentración de Cu(II) de 2,5 mM. La relación de concentraciones fue 1:1:2 y 1:2:1, respectivamente. En este caso el rango de pH también fue de 2-6.

-Sistema L^{3-}/H^+ (L: ácido clorogénico)

La determinación de las constantes de disociación del ácido clorogénico (H_3L) se realizó mediante dos grupos de titulaciones utilizando el programa BEST y pK_a s:

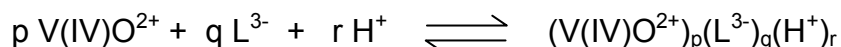
- Ácido clorogénico 2,5 mM / HCl 2,5 mM con NaOH 10 mM (pH: 2,7 – 11,0).
- Ácido clorogénico 5 mM / HCl 5mM con NaOH 20 mM (pH: 2,4 -11,2).

- Sistema $\text{V(IV)O}^{2+}/\text{L}^{3-}/\text{H}^+$

También en este caso se realizaron dos series de titulaciones en un rango aproximado de pH 2,4 - 8,0.

- oxovanadio(IV) 2,5 mM / ácido clorogénico 5 mM / HCl 5 mM con NaOH 30 mM.
- oxovanadio(IV) 1,25 mM / ácido clorogénico 5 mM / HCl 5mM con NaOH 30 mM.

Las constantes de formación de las especies (β_{pqr}) se expresan según la notación:



⁶ E. Campi, G. Ostacoli, M. Meironi, G. Saini, J. Inorg. Nucl. Chem. (1964) 23:553-564.

⁷ E.G. Ferrer, A.C. González Baró, E.E. Castellano, O.E. Piro, P.A.M. Williams, J. Inorg. Biochem. (2004) 98:413-421.

Para las condiciones experimentales ($T = 25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 150 \text{ mM}$) se asume un valor de $pK_w = 13,76$ (correspondiente a $\log \beta_{00-1} = -13,76$).

Las constantes de formación se calcularon mediante el programa BEST. La distribución de especies como función del pH se obtuvo con el programa ESPECIES. El criterio de selección del modelo de especiación fue el usual para este tipo de programas (CHI y valores de R y de desviación estándar). Los resultados fueron comparados con medidas espectroscópicas.

7.2.3. Resonancia paramagnética electrónica (EPR) en solución

En forma general, los espectros en solución se determinan en banda X a 140K luego del agregado de 5% de dimetilsulfóxido para asegurar una buena resolución espectral a la concentración deseada.

Las titulaciones espectrofotométricas (para el caso de los ligandos crisina y morina) fueron seguidas por EPR para identificar las especies formadas a las diferentes relaciones ligando/metal.

Para los diagramas de distribución de especies, con la finalidad de convalidar el modelo propuesto para las especies en solución, los espectros de EPR se midieron en condiciones experimentales similares a las de las titulaciones potenciométricas. Los estudios realizados en solución acuosa consistieron en una serie de medidas a diferentes relaciones metal:ligando. Para cada una de ellas, el pH se fue ajustando en forma gradual mediante el agregado paulatino de NaOH 1M en un rango aproximado de 2-8, lo que permitió observar la formación de diferentes especies. Luego se procedió al ajuste de la manera indicada en la sección 3.3.4.

7.3. Medidas de las capacidades antioxidantes

7.3.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil

La actividad superóxido dismutasa símil fue evaluada a través de dos métodos:

-Método no enzimático:

Este método consiste en generar el radical superóxido a través del sistema fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Esos radicales son capaces de reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. Por lo tanto se determina la habilidad que tienen los complejos, sus ligandos libres o los cationes $V(IV)O^{2+}$ y $Cu(II)$ de inhibir dicha reducción.

La mezcla de reacción contiene 0,5 ml de muestra (en distintas concentraciones), 0,5 ml de NADH (140 mM) y 0,5 ml de NBT (300 μM) en buffer fosfato 0,1M ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,4). Se incuban los tubos a 25 $^\circ\text{C}$ por 15 min y se inicia la reacción agregando 0,5 ml de PMS (120 μM), luego de 5 min se lee la absorbancia a 560 nm y se compara con el blanco⁸. La concentración de complejo que produce un 50 % de inhibición (CI_{50}) fue obtenida a partir de la construcción

⁸ C.C. Kuo, M. Shih, Y. Kuo, W. Chiang, J. Agric. Food Chem. (2001) 49:1654-1570.

del gráfico de porcentaje de inhibición de la reducción de NBT versus $-\log$ de la concentración de los compuestos testeados⁹ utilizando un asistente de regresión sigmoideo provisto por el programa Sigma Plot.

-Método enzimático

Este método consiste en generar el radical superóxido a través del sistema xantina/xantina oxidasa a pH 10,2 (0,05 M de buffer $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$)^{10,11}. La mezcla de reacción contiene diferentes concentraciones de los ligandos, del metal y de los complejos. La reacción se inicia por el sistema xantina-xantina oxidasa en una concentración necesaria para producir un cambio de absorbancia entre 0,2 y 0,4. Se agrega una solución acuosa 0,2 mM de cloruro de cobre(II) para frenar la reducción de NBT. Como el ion cobre(II) libre puede interactuar con el anión superóxido produciendo su dismutación, se incluye en el medio ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) 0,1M, para formar el complejo de cobre (CuEDTA) que carece de actividad SOD. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado y al menos tres experimentos independientes se realizaron en cada caso. Finalmente se obtienen los valores de CI_{50} para cada uno de los compuestos ensayados, operando como en el método no enzimático.

7.3.2 Ensayo de la actividad anti radical DPPH'

A una solución metanólica de DPPH (4 ml, 4 ppm) se le agrega 1 ml de las soluciones de ligandos, complejos ó V(IV)O^{2+} diluidos en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 7,1). Luego de incubar 1 hora en oscuridad se mide la absorbancia de las distintas muestras a 517 nm y se las compara con un control al que se le asigna un valor arbitrario de 100%, que fue preparado con el radical y el buffer.

Con fines comparativos, se utilizó ácido ascórbico como antioxidante de referencia, el cual provoca una decoloración inmediata del color violeta inicial, lo que indica su fuerte actividad anti radical DPPH'.

7.3.3. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS⁺⁺

Para realizar esta técnica se incubó por 16 hs una solución acuosa de ABTS (2,5mM) y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0,4M), luego se diluyó 10 veces en buffer 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 4). Posteriormente, se le agregan a 990 μl de la mezcla, 10 μl de complejo, ligando, oxovanadio(IV) o trolox en buffer fosfato en concentraciones que van desde 0 a 100 μM . Luego de incubar la mezcla de reacción durante 6 min y a 25 °C, se registra la reducción del catión radical ABTS⁺⁺. Se asigna un valor de 100 % a la condición basal, donde no se agregó antioxidante y se registra, luego, la disminución porcentual de la absorbancia a 734 nm como función de las distintas concentraciones de muestras utilizadas, obteniendo de este modo, la actividad total antioxidante. Los resultados también se expresan como la concentración mM de Trolox (TEAC) equivalente a la actividad de una solución 1 mM del compuesto

⁹ M.N. Patel, D.S. Gandhi, P.A. Parmar, Inorg. Chem. Communications (2011) 14:128-132.

¹⁰ I. Iwamoto, I. Mifuchi, Chem. Pharm. Bull (1982) 30:237-241.

¹¹ C. Beauchamp, I. Fridovich, Anal. Biochem. (1971) 44:276-287.

testado. Dicho valor se calcula con la pendiente del gráfico del porcentaje de inhibición de la absorbancia en función de las concentraciones usadas dividido por la pendiente del gráfico del Trolox (sección 3.2.2.).

7.3.4 Actividad secuestrante del radical OH[•]

El radical OH[•] fue generado por el sistema ascorbato/Fe/H₂O₂. La mezcla de reacción contiene 3,75 mM de 2-desoxirribosa, 2,0 mM de H₂O₂, 100 μM de FeCl₃ y 100 μM de EDTA más los compuestos de interés en buffer KH₂PO₄-KOH (20 mM, pH 7,4). La reacción comienza por el agregado de 100 μl de ácido ascórbico (100 μM) a la mezcla incubando los tubos a 37°C durante 30 min.

Finalmente la degradación de la desoxirribosa por los radicales OH[•] se mide por el método del ácido tiobarbitúrico (ATB): la reacción del producto formado con el ATB en caliente y bajo condiciones ácidas (en presencia de ácido tricloroacético (TCA)) da como resultado la formación de un cromógeno color rosa (532 nm)^{12,13}.

7.3.5. Inhibición del radical ROO[•] por un método fluorescente (ORAC-fluoresceína)

Brevemente, se preparó una solución stock de fluoresceína (44 mg disueltos en 100 ml de buffer fosfato (75 mM, pH 7)), y se almacenó bajo condiciones de oscuridad y refrigeración. La solución de trabajo (78 nM) se prepara diariamente por dilución (0,167 ml en 25 ml de buffer). La solución de AAPH (300 mM) también se prepara fresca para cada ensayo. Como este método es extremadamente sensible, los reactivos deben ser diluidos apropiadamente antes del análisis para evitar interferencias. La mezcla de reacción contiene 1000 μl de fluoresceína (78 nM), 1000 μl de muestra, buffer fosfato salino (PBS) o trolox y 500 μl de AAPH (300 mM). La celda fue termostatzada a 37°C. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS 50B) cada 1 min a una λ_{emisión}: 512 nm y λ_{excitación}: 488nm^{14,15}. En primer lugar, se grafica el decaimiento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo para distintas concentraciones de trolox. Luego, con esos datos, se calcula el área bajo la curva (ABC) para las diferentes concentraciones ensayadas y se obtiene una curva de calibración. Luego se procede de la misma manera con las muestras a testear y, finalmente, se calcula el valor de ORAC relativo:

$$\text{ORAC}_{\text{relativo}} = \frac{(\text{ABC}_{\text{muestra}} - \text{ABC}_{\text{blanco}})}{(\text{ABC}_{\text{trolox}} - \text{ABC}_{\text{blanco}})} * \frac{M_{\text{trolox}}}{M_{\text{muestra}}}$$

¹² B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, FEBS Lett. (1981) 128:347-352.

¹³ B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, O.I. Auroma, Anal. Biochem. (1987) 165:215-219.

¹⁴ A. Tijerina Sáenz, I. Elisia, S.M. Innis, J.K. Friel, D.D. Kitts, J. Food Compost Anal. (2009) 22:694-698.

¹⁵ A. Zulueta, M.J. Esteve, A. Frígola, Food Chem. (2009) 114:310-316.

7.3.6 Inhibición del radical ROO[•] por un método espectrofotométrico

El radical peroxilo fue generado por descomposición térmica del AAPH, de la misma manera que para el ensayo anterior¹⁶. La mezcla de reacción contiene AAPH (50 mM), piranina (50 μM) y distintas concentraciones de los compuestos testeados o buffer (para el caso de la condición basal). El consumo de piranina fue seguido espectrofotométricamente por la disminución en su absorbancia a 454 nm en una celda termostaticada a 37°C.

Experimentalmente se mide la fase *lag* que corresponde al tiempo (en minutos) que transcurre antes de que exista una notable reducción en la absorbancia por consumo de la piranina, por interferencia del complejo, debida a su interacción previa con el radical¹⁷.

7.4. Clivaje de ADN plasmídico en gel de agarosa

Para los experimentos de electroforesis en gel de agarosa se utilizó el ADN plasmídico pA1. Éste es un ADN complementario de cadena larga de citocromo P450 (CYP3A1) insertado en el vector plasmídico PBS ((pBluescribe, Stratagene, UK) que fue descrito por Fisher y col.¹⁸. El ADN plasmídico fue amplificado en *Escherichia Coli* DH5a y purificado utilizando el sistema miniprep Pure Yield™ de Promega. El ADN lineal fue obtenido por digestión del pA1 con la enzima *Hind III* y usado como referencia en la electroforesis. A veces se utiliza como referencia de la forma lineal del ADN, una muestra de ADN plasmídico digerida con 50 μM de acetilacetato de vanadilo(IV) (VO(acac)₂). Se determinó la concentración de ADN por cada par de bases de nucleótidos (pb) por absorción UV a 260 nm utilizando el coeficiente de extinción de 13200 M⁻¹ cm⁻¹ pb⁻¹.

Para cada experimento se prepara una solución 200 μM de los complejos de vanadio en agua Milli-Q desionizada. La estabilidad de la solución acuosa se sigue por espectroscopía. La actividad de clivaje del ADN se monitorea mediante la conversión del ADN plasmídico superenrollado en ADN circular mellado (roto) y lineal. La mezcla de reacción contiene 6 μl de agua, 2 μl (0,2 μg) de ADN plasmídico superenrollado (pA1), 2 μl de una solución buffer (ácido 3-(N-morfolino propanosulfónico (MOPS)/ NaOH y PO₄³⁻/ HNO₃) (100 mM, pH 7) y 10 μl de una solución acuosa del complejo de interés. El volumen final de reacción es de 20 μl y las concentraciones testeadas fueron 6, 12, 25, 50 y 100 μM, que corresponden a diferentes relaciones metal-ADN (pb): 0,2, 0,4, 0,8, 1,7 y 3,3. La concentración final del buffer fue 10 μM. El ácido mercaptopropiónico (MPA) y la oxona (KHSO₅) fueron elegidos como agentes activantes reductores y oxidantes respectivamente. Su concentración final fue 200 μM. Las muestras control de agentes activantes se preparan en ausencia de complejos metálicos. Con fines comparativos, se preparó también VOSO₄·5H₂O con y sin agentes de activación.

¹⁶ W.Y. Huang, K. Majumder, J. Wu, *Food Chem.* (2010) 123: 635–641.

¹⁷ C.D. Hapner, P. Deuster, Y. Chen, *Chem. Biol Interact.* (2010) 186: 275–279.

¹⁸ M.B. Fisher, S.J. Thompson, V. Ribeiro, M.C. Lechner, A. Rettie, *Arch. Biochem. Biophys.* (1998) 356:63-70.

Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 1 hora a 37°C, envueltas en papel de aluminio.

Después de la incubación, se añadieron 5 µL de buffer de carga (loading buffer) (0,25 % de azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol y 30% de glicerol en agua) a cada tubo y luego se colocó dicha solución en 1% de gel de agarosa en un buffer 89 mM TRIS-borato y 1 mM de EDTA, pH 8,3, conteniendo bromuro de etidio (1 µg/ml). Los controles de plásmidos no incubados y linealizados se incluyeron en los dos extremos de una placa de 16 pocillos. La electroforesis se llevó a cabo durante 3 horas a 100 V. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta y fueron fotografiadas utilizando el equipo AlphaImager (Alpha Innotech).

7.5. Actividad biológica

7.5.1. Cultivos de osteoblastos

Se utilizaron dos líneas clonadas de células osteoblasto-símil: MC3T3E1 (línea de células no transformadas, derivadas de calvaria de ratón) y UMR106 (línea derivada de osteosarcoma de rata).

Ambas líneas fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm² a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO₂, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10 % de suero fetal bovino (SFB). Luego, cuando las células en cultivo llegaron a 70-80 % de confluencia fueron cosechadas utilizando 0,1% de tripsina en PBS-EDTA (11 mM KH₂PO₄, 26 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH:7,4) para resuspenderlas. Una fracción de esas células fue diluida 1:10 en DMEM con 10 % de SFB para continuar el cultivo y con la otra fracción se siguieron los experimentos. Para estos últimos se utilizaron microplacas donde se cultivaron las células hasta que llegaron a la confluencia requerida para cada ensayo, luego se lavaron con medio de cultivo y finalmente se incubaron con DMEM y los compuestos de interés en distintas concentraciones.

7.5.2. Ensayos de viabilidad celular

7.5.2.1. Ensayo mitogénico

Para determinar la proliferación celular se utilizó el ensayo de cristal violeta descrito por Okajima y colaboradores¹⁹ con algunas modificaciones. El fundamento del método consiste en que el colorante vital, cristal violeta, se incorpora a estructuras subcelulares (principalmente mitocondrias) de células metabólicamente activas pero no penetra en células inactivas.

Se utilizaron microplacas de 48 pocillos para el ensayo. Una vez que las células llegaron a 70-80 % de confluencia, se lavó la monocapa con DMEM. Luego se incubaron las mismas con DMEM en el caso del basal y con distintas

¹⁹ T. Okajima, K. Nakamura, H. Zhang, N. Ling, T. Tanabe, T. Yasuda, R.G. Rozenfeld, *Endocrinol.* (1992) 130:2201-2212.

concentraciones (0-100 μM) de V(IV)O^{2+} , ligandos y complejos diluidos en medio de cultivo durante 24 hs, a 37°C y con atmósfera de CO_2 . Posteriormente, se lavan las células con PBS, se fijan con glutaraldehído 5 % y se tiñen con cristal violeta por 10 min. Finalmente, se lavan varias veces con agua para eliminar el exceso de colorante, se extrae el mismo de las células osteoblásticas con un buffer de pH adecuado (buffer glicina, pH 3) y realizando la dilución adecuada con agua, se lee la absorbancia a 540 nm. Previamente se realizó una correlación lineal para determinar el número de células en función de la absorbancia medida²⁰.

7.5.3. Estudio morfológico

7.5.3.1. Tinción con Giemsa

A través de la técnica de tinción con Giemsa, se pueden observar características morfológicas del citoplasma y el núcleo. Se cultivan las células en placas de 6 pocillos, al llegar a 60-70% de confluencia se las incuba con distintas concentraciones de complejo por 24 hs a 37°C . Luego se lavan con PBS, se fijan 5 min con metanol y posteriormente se tiñen con Giemsa diluido 1:10, por 10 min²¹. Finalmente se lava la monocapa varias veces con agua para eliminar el exceso de colorante y se observan las células al microscopio óptico (Olympus TH4-200). Se adapta una cámara de fotos al mismo y se registran las imágenes.

7.5.4. Mecanismos de acción

7.5.4.1. Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)

La generación intracelular de ROS fue medida espectrofotométricamente mediante la sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123), la cual es oxidada por los mismos a rodamina 123 (RH), que es una molécula fluorescente. En primer lugar, las células fueron incubadas con distintas concentraciones de complejo, ligando o V(IV)O^{2+} por 24 hs a 37°C , luego se lavaron con solución salina tamponada de Hank (HBSS) y posteriormente se incubaron con DHR (10 mM) en HBSS permitiendo el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación²². La monocapa fue lavada con PBS y lisada con 1 ml de Triton-X100 (0,1%). Los extractos celulares fueron analizados espectrofluorométricamente ($\lambda_{\text{excitación}} = 500$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 536$ nm). Se usó como estándar (RH) $0,5 \mu\text{M}$ ²³.

Para normalizar los datos por mg de proteínas, a una alícuota de cada extracto, se le realizó una determinación de proteínas por el método de Bradford (1976)²⁴.

²⁰ A.M. Cortizo, S.B. Etcheverry, Mol. Cell Biochem. (1995) 145:97-102.

²¹ V.C. Sálice, A.M. Cortizo, C.L. Gómez Dumm, S.B. Etcheverry, Mol. Cell Biochem. (1999) 198:119-128.

²² C.M. Krejsa, S.G. Nadler, J.M. Esselstyn, T.J. Kavanagh, J.A. Ledbetter, G.L. Schieven, J. Biol. Chem. (1997) 272:11541-11549.

²³ A.M. Cortizo, L. Bruzzone, S. Molinuevo, S.B. Etcheverry, Mol. Cell. Biochem. (2000) 145:89-99

²⁴ M. Bradford, Anal. Biochem. (1976) 72:248-254.

7.6. Técnicas auxiliares

7.6.1. Determinación de proteínas por el método de Bradford

Se confeccionó una curva de calibración usando albúmina sérica bovina, con un rango de validez de 5 a 50 µg de proteína por tubo. Se registró la absorbancia a 595 nm de una mezcla de muestra con reactivo de Bradford (10 mg Coomassie Blue G250, 10 ml H₃PO₄ 88 %, 4,7 ml etanol absoluto)

Los resultados se expresaron mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol RH / mg proteína (\%Basal)} = (\mu\text{mol RH / mg proteína})_x / (\mu\text{mol RH / mg Proteína})_c * 100$$

Donde: x = condición experimental y c =condición control (sin el agregado de complejos de vanadio)

7.6.2. Análisis estadístico

Para todos los ensayos biológicos se realizaron 3 experimentos independientes por cada condición. Los resultados se expresan como la media ± SEM (error estándar de la media). Para realizar el análisis estadístico (análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Fisher (LSD) para comparar medias) se utilizó el programa Statgraphics PLUS 5.1.

Este trabajo de tesis dio lugar a 5 publicaciones en revistas científicas:

- 1) L. Naso, A.C. González Baró, L. Lezama, T. Rojo, P. A. M. Williams, E.G. Ferrer. "Synthesis, Chemical Speciation and SOD Assays of Tricarballic acid-Copper (II) and Imidazol-Tricarballic acid-Copper(II) complexes". *J. Inorg. Biochem.*, 103:219-226 (2009).
- 2) E.G. Ferrer, N. Baeza, L.G. Naso , E.E. Castellano, O. E. Piro , P.A.M. Williams."Superoxidedismutase-mimetic Copper (II) complexes containing saccharinate and 4-aminopyridine/4-cyanopyridine". *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 24: 20-26 (2010).
- 3) P.A.M. Williams, L.G. Naso, G.A. Echeverría , E.G. Ferrer. Synthesis, vibrational spectroscopy and crystal structure of zinc and sodium tricarboxylate coordination polymers with the flexible ligand tricarballic anion (TCA^{3-}). *J. Mol. Struct.* 978:124-130 (2010).
- 4) L.Naso, E.G. Ferrer, L. Lezama, T. Rojo, S.B. Etcheverry, P.A.M. Williams. "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." *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15:889-902 (2010).
- 5) Naso LG, Ferrer EG, Butenko N, Cavaco I, Lezama L, Rojo T, Etcheverry SB, Williams PA. "Antioxidant, DNA cleavage, and cellular effects of silibinin and a new oxovanadium(IV)/silibinin complex". *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16:653–668 (2011).