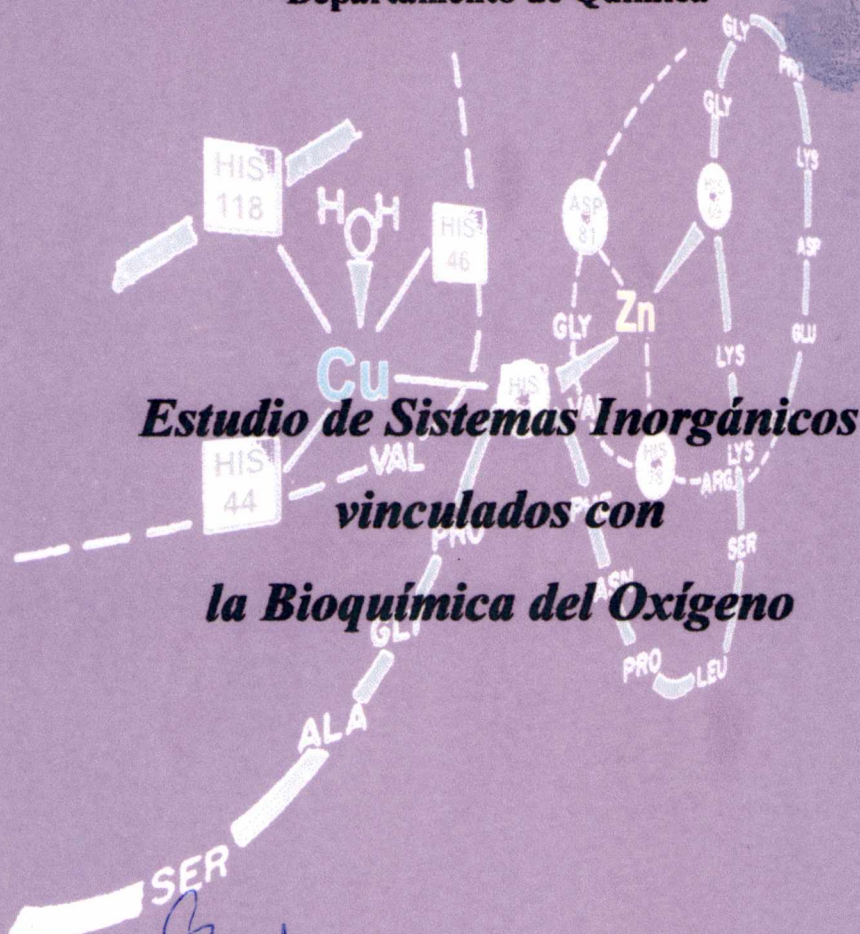




**Universidad Nacional de la Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Química**



TESIS  
pp 961

**Tesis Doctoral**

**Lic. Roxana María Tótaró**

~ 2002 ~

(043.2)  
TESIS  
00961

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1° aubueolo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-6077/79 int. 129



DEX-56990



**Universidad Nacional de la Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Química**

***Estudio de Sistemas Inorgánicos***  
***vinculados con***  
***la Bioquímica del Oxígeno***

TESIS N.º 961

**Tesis Doctoral**

***Lic. Roxana María Tótaró***

**~ 2002 ~**

*El presente trabajo, desarrollado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, CONICET / UNLP) y en el CERELA (Centro de Referencia para Lactobacilos, CONICET), bajo la dirección del Prof. Dr. Enrique J. Baran y la codirección de la Prof. Dra. María C. Apella, constituye la Tesis Doctoral que elevo a consideración de las autoridades correspondientes para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.*

*Para Auro y nuestros hijos:  
Mariana, Aurelio y Fernando  
A mi Madre y mis Hermanas  
A la memoria de mi Padre*

## ***Agradecimientos***

- Al Prof. Dr. Enrique J. Baran, por haber aceptado dirigir este trabajo de Tesis con dedicación y paciencia y contribuir con su vasta experiencia a mi formación científica. Le agradezco también la confianza depositada en mi persona.
- A la Dra. María Cristina Apella, por la posibilidad que me brindó de iniciarme en la investigación, al aceptar codirigir este trabajo, por su generoso e incondicional apoyo y por todo lo que me enseñó a lo largo de estos años tanto en lo profesional como en lo humano.
- A los Doctores Aída Pesce de Ruiz Holgado y Guillermo Oliver, por permitirme la posibilidad de realizar este trabajo en los laboratorios del CERELA y por sus atenciones y estímulos permanentes.
- A la Dra Silvia González de Elías, por su generosa y desinteresada ayuda. Su incondicional amistad, optimismo y experiencia fueron fundamentales para la realización de este trabajo.
- Al Dr Carlos Gusils, por su valiosa ayuda en la diagramación del manuscrito de esta Tesis.
- A Adriana y Mónica, por su incondicional amistad y darle calidez y alegría a las horas de trabajo.
- A mis compañeros del laboratorio de CERELA, Vilma, Gaby , Karina, Jorge y Carlitos, por brindarme su afecto y solidaridad durante todos estos años.
- A todo el personal del CERELA por todas las atenciones que de ellos recibí y por el cariño que me brindaron siempre.
- A la Dra Aída Ben Altabef, por su generosa y desinteresada ayuda.
- A la Dra Luz Alvares Funes, por sus acertados consejos y enseñanzas que recibí durante todos los años compartidos. Por su intermedio agradezco también a las autoridades de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán por las licencias otorgadas que hicieron posible la realización de este trabajo.
- A mis compañeras y amigas de la Cátedra de Química General e Inorgánica de la Facultad de Agronomía y Zootecnia, por las inolvidables horas de trabajo compartidas y por todo el apoyo y afecto que me brindaron todos estos años.

- A la Dra. Patricia A. M. Williams por su colaboración y ayuda en las mediciones cinéticas.
- Al Dr. Miguel A Blesa, por sus útiles sugerencias y valioso aporte científico.
- A todo el personal del CEQUINOR, en especial a Evelina (amiga de siempre), por todas las atenciones y ayudas que de ellos recibí y que contribuyeron a darle alegría a mis días de trabajo en ese centro.
- Al CONICET, por las becas concedidas que me permitieron realizar gran parte de este trabajo.
- Al CIUNT, por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.
- A mis amigas y compañeras de siempre María Eugenia, Fanny, Liz y Norita, por los hermosos años de amistad compartidos y por el incondicional apoyo que de ellas siempre recibí.
- A mi esposo y mis hijos, la gran alegría de mi vida, quienes fueron siempre los que me brindaron la mayor contención a través del amor, la comprensión y la infinita paciencia.
- A mi madre, hermanas y sobrinos les agradezco infinitamente por el cariño e incondicional apoyo recibido a lo largo de todos estos años.

## *Índice*

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<i>Bibliografía</i> .....	5

### **PRIMERA PARTE: Superóxido Dismutasa**

<i>Introducción</i> .....	7
<i>Origen y toxicidad del anión superóxido</i> .....	7
<i>Cu-Zn superóxido dismutasa</i> .....	9
<i>Propiedades estructurales y espectroscópicas</i> .....	9
<i>Características estructurales</i> .....	9
<i>Características espectroscópicas</i> .....	11
<i>Espectro electrónico</i> .....	11
<i>Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR)</i> .....	14
<i>Espectro de resonancia magnética nuclear</i> .....	15
<i>Mecanismo y actividad enzimática</i> .....	16
<i>Fe-superóxido dismutasa</i> .....	18
<i>Mn-superóxido dismutasa</i> .....	19
<i>Bibliografía</i> .....	23

### **CAPÍTULO 1: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa de una serie de sacarinos de metales de transición divalentes**

<i>1.1. Introducción</i> .....	27
<i>1.2. Características Estructurales</i> .....	28
<i>1.3. Parte Experimental</i> .....	29
<i>1.3.1. Síntesis de los complejos</i> .....	29
<i>1.3.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa</i> .....	30
<i>1.4. Resultados y discusión</i> .....	31
<i>1.5. Bibliografía</i> .....	36

### **CAPÍTULO 2: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa en complejos de cobre (II) con aminoácidos**

<i>2.1. Introducción</i> .....	39
<i>2.2. Características Estructurales</i> .....	40
<i>2.3. Parte Experimental</i> .....	41
<i>2.3.1. Síntesis de los complejos</i> .....	41
<i>2.3.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa</i> .....	41
<i>2.4. Resultados y Discusión</i> .....	41
<i>2.5. Bibliografía</i> .....	45

## *Indice*

### ***CAPÍTULO 3: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa de complejos de cobre (II) con salicilidén-derivados de aminoácidos***

3.1. Introducción.....	47
3.2. Características Estructurales.....	49
3.3. Parte Experimental .....	53
3.3.1. Síntesis de los complejos .....	53
3.3.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa.....	53
3.4. Resultados y Discusión.....	53
3.5. Bibliografía.....	57

### ***CAPÍTULO 4: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa del complejo de cobre (II) con carnosina***

4.1. Introducción.....	60
4.2. Síntesis del complejo.....	61
4.3. Propiedades estructurales y espectroscópicas.....	61
4.3.1. Características Estructurales.....	61
4.3.2. Características Espectroscópicas.....	62
4.3.2.1. Espectro infrarrojo.....	62
4.3.2.2. Espectro electrónico.....	65
4.4. Propiedades magnéticas .....	66
4.5. Comportamiento electroquímico.....	68
4.6. Determinación de la actividad superóxido dismutasa .....	71
4.7. Bibliografía.....	73

### ***CAPÍTULO 5: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa de algunos complejos ternarios de cobre (II)***

5.1. Introducción.....	76
5.2. Características estructurales .....	78
5.3. Parte experimental.....	81
5.3.1. Síntesis de los complejos .....	81
5.3.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa.....	81
5.4. Resultados y Discusión.....	81
5.5. Bibliografía.....	85



# Indice

## SEGUNDA PARTE: Haloperoxidasas

Introducción.....	87
Características generales.....	88
Propiedades espectroscópicas .....	89
Espectroscopia XANES y EXAFS.....	90
Estructura de Rayos X de las V-CIPO.....	91
Mecanismo de la reacción enzimática .....	94
Bibliografía .....	97

## CAPÍTULO 1: Peroxo complejos de Vanadio (V)

1.1. Aspectos generales.....	101
1.2. Propiedades estructurales y espectroscópicas.....	102
1.3. Formación de peroxo complejos de vanadio (V) en solución acuosa.....	103
1.4. Bibliografía .....	106

## CAPÍTULO 2: Síntesis y propiedades espectroscópicas de oxoperoxo complejos de vanadio (V)

2.1. Oxoperoxo(malato)vanadato (V) .....	110
2.1.1. Introducción .....	110
2.1.2. Características estructurales.....	111
2.1.3. Síntesis de los complejos .....	112
2.1.4. Resultados y Discusión.....	113
2.1.4.1. Espectros electrónicos.....	113
2.1.4.2. Espectros infrarrojos.....	114
2.2. Oxoperoxo(citrato)vanadato(V).....	119
2.2.1. Introducción .....	119
2.2.2. Características estructurales.....	120
2.2.3. Síntesis de los complejos .....	122
2.2.4. Resultados y Discusión.....	124
2.2.4.1. Espectros electrónicos.....	124
2.2.4.2. Espectros infrarrojos.....	125
2.3. Oxoperoxo(nitilotriacetato)vanadato (V).....	130
2.3.1. Introducción .....	130
2.3.2. Características estructurales.....	131
2.3.3. Síntesis del complejo .....	133
2.3.4. Resultados y Discusión.....	133
2.3.4.1. Espectros electrónicos.....	133
2.3.4.2. Espectros infrarrojo y Raman .....	135
2.4. Conclusiones .....	139

## Indice

2.5. Bibliografía .....	141
-------------------------	-----

### **CAPÍTULO 3: Síntesis y propiedades espectroscópicas de oxodiperoxo complejos de vanadio (V)**

3.1. Oxodiperoxo complejos de vanadio (V) .....	144
3.1.1. Introducción .....	144
3.1.2. Características estructurales.....	144
3.1.3. Síntesis de los complejos .....	146
3.1.4. Resultados y Discusión.....	146
3.1.4.1. Espectros electrónicos.....	146
3.1.4.2. Espectros infrarrojo y Raman .....	149
3.2. Oxodiperoxo complejos de vanadio (V) con ligandos bidentados .....	154
3.2.1. Introducción .....	154
3.2.2. Características estructurales.....	155
3.2.3. Síntesis de los complejos .....	155
3.2.4. Resultados y Discusión.....	156
3.2.4.1. Espectros electrónicos.....	156
3.2.4.2. Espectros infrarrojos.....	158
3.2.5. Conclusiones.....	164
3.2.6. Bibliografía .....	166

### **CAPÍTULO 4: Estudio de la actividad catalítica de peroxocomplejos de vanadio (V)**

4.1. Introducción.....	168
4.2. Parte experimental.....	169
4.3. Resultados y Discusión.....	169
4.3.1. Espectro infrarrojo.....	170
4.3.2. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN).....	170
4.4. Bibliografía.....	176

### **CAPÍTULO 5: Estudio de la bromación del rojo fenol mediada por peroxo complejos de vanadio (V)**

5.1. Reacción de bromación del rojo fenol mediada por peroxo complejos de vanadio (V).....	178
5.1.1. Introducción .....	178
5.1.2. Parte experimental .....	179
5.1.3. Resultados y Discusión.....	179
5.2. Estudio cinético de la bromación del rojo fenol mediada por peroxo complejos de vanadio (V) ...	180
5.2.1. Introducción .....	180
5.2.2. Parte experimental .....	181
5.2.2.1. Preparación de los complejos .....	181

## *Indice*

5.2.2.2. <i>Mediciones cinéticas</i> .....	181
5.2.3. <i>Resultados y Discusión</i> .....	184
5.2.3.1. <i>Reacción directa a pH 6,5</i> .....	184
5.2.3.2. <i>Reacción a pH 6,5 después de la incubación de las soluciones de vanadio a pH 1</i> .....	184
5.2.4. <i>Bibliografía</i> .....	184
<b><i>PARTE EXPERIMENTAL: Equipos y técnicas utilizadas</i></b> .....	195
<b><i>CONCLUSIONES GENERALES</i></b> .....	197
<b><i>PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES ORIGINADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS</i></b> .....	201

## *Introducción*

La vida se originó en una atmósfera libre de oxígeno, por lo tanto los primeros organismos que habitaron nuestro planeta, son considerados estrictamente anaeróbicos. El oxígeno molecular presente en la atmósfera es un producto de la reacción de fotosíntesis. Las cianobacterias, algas azul verdosas, son los organismos fotosintéticos mas primitivos que se conocen. Sus antecesores evolucionaron en un mundo donde la invasión progresiva de la biosfera por parte del oxígeno, obligó a las especies a adaptarse a ese gas singularmente reactivo o bien a protegerse en la profundidad de barros o de aguas estancadas. Indudablemente numerosas especies desaparecieron por no poseer la capacidad de adaptarse a la presencia del oxígeno [1]. Como consecuencia, las especies aeróbicas evolucionaron. Pero como nada es casual en la Naturaleza, debemos remarcar que la respiración aeróbica provee a los organismos mecanismos que hacen más eficiente el uso de nutrientes. Así, la mayoría de los organismos que se conocen en la actualidad son aeróbicos. Una de las principales causas de los efectos benéficos del oxígeno es su fuerte poder oxidante. Esta característica hace que el oxígeno se comporte como un eficiente aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Sin embargo, esta misma propiedad lo convierte en una amenaza para la supervivencia de los organismos. Pensar que el oxígeno es tóxico para los seres vivientes parece una extraña paradoja. Pero lo cierto es que las especies que deben adaptarse a una atmósfera oxigenada, deben poseer elaborados mecanismos de defensa contra la toxicidad del oxígeno.

Durante el transporte electrónico al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria mitocondrial, el oxígeno tiende a reducirse a agua, mediante un proceso redox que involucra la utilización de cuatro electrones. En efecto, la citocromo c oxidasa, una enzima que interviene en la mayoría de las oxidaciones celulares, transfiere los cuatro electrones de una sola vez, por lo tanto se produce una reducción total [2] de acuerdo a la siguiente ecuación:



Sin embargo, muchas veces esta reducción resulta incompleta y durante la misma se generan productos sumamente tóxicos, tales como el anión superóxido y el peróxido de

---

hidrógeno. Ambos son altamente reactivos y capaces de lesionar irreversiblemente a diversas biomoléculas y sistemas celulares [3].

Ahora bien, una célula capaz de tolerar la presencia de oxígeno debe estar provista de enzimas que le permitan consumir las especies químicas tóxicas anteriormente mencionadas. Ellas son:

1) **Superóxido-dismutasa**, que cataliza como su nombre lo indica la reacción de dismutación del anión superóxido:



Esta enzima se encuentra en dos formas, una en la mitocondria y otra en el citosol extramitocondrial. La superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial de los eucariotas es semejante a la superóxido dismutasa de muchas bacterias, en lo que se refiere a su contenido de  $\text{Mn}^{2+}$  y a la homología de sus secuencias aminoácidas [4]. La forma de la superóxido dismutasa del citosol tiene, por otra parte, una estructura completamente diferente, y contiene  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  [5]. Por último podemos mencionar que existe una tercera superóxido dismutasa que contiene hierro en su sitio activo y que se encuentra usualmente en células procariotas [6].

Estas enzimas se hallan presentes en concentraciones elevadas y son extraordinariamente activas, sugiriendo que los radicales superóxido se están produciendo continuamente durante la reducción enzimática del oxígeno, y son rápidamente eliminados.

El peróxido de hidrógeno formado por la superóxido dismutasa puede ser eliminado por dos tipos de enzimas:

2a) **Catalasa**, que cataliza la siguiente reacción:



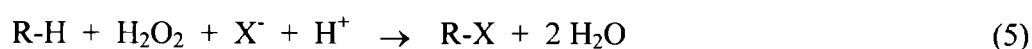
2b) **Peroxidasa**, que catalizan la oxidación de sustratos orgánicos por medio de agua oxigenada de acuerdo a la siguiente reacción:



donde  $\text{H}_2\text{R}$  es un compuesto orgánico.

Entre los sustratos biológicos típicos para las peroxidasas podemos mencionar ácidos grasos, aminas y fenoles.

Un grupo particular de peroxidasas ampliamente difundidas en la naturaleza lo constituyen las haloperoxidasas cuyos sustratos son los iones haluros. Estas enzimas catalizan la halogenación de sustratos orgánicos con ayuda de agua oxigenada, de acuerdo a la siguiente ecuación general:



Estas enzimas suelen clasificarse de acuerdo al rango de ion haluro,  $\text{X}^-$ , que pueden utilizar:

- 1) Cloroperoxidasas:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$
- 2) Bromoperoxidasas:  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$
- 3) Iodoperoxidasas:  $\text{I}^-$

Desde el punto de vista estructural, estas haloperoxidasas contienen generalmente Fe(III) incorporado a la protoporfirina IX [7].

Sin embargo, recientemente se han descubierto haloperoxidasas que contienen vanadio (V) en su sitio activo [8-10]. La primera y más estudiada fue descubierta en el año 1983 por Vilter y col. en el alga *Ascophillum nodosum* [8-10]. Más tarde se las encontraron presentes en otras algas marinas marrones [11], en algas rojas [12] y en líquenes terrestres [13].

La Química Bioinorgánica es una rama interdisciplinaria de la Química que se ocupa de una amplia gama de problemas ubicados en la interfase entre la Química y las Ciencias Biológicas.

Uno de los desafíos de la Bioinorgánica es la obtención de modelos que permitan simular el comportamiento de sistemas naturales, que por su complejidad resultan difíciles de caracterizar, de manera de poder lograr un conocimiento más profundo acerca de los mismos.

Si bien a través de estudios *in vitro*, por lo general no se puede reproducir exactamente el funcionamiento y las características de los complicados sistemas naturales,

el análisis de modelos ha aportado en muchos casos información clave para dilucidar los mecanismos a través de los cuales ocurren muchos procesos biológicos fundamentales.

El objetivo del presente trabajo es entonces sintetizar modelos que permitan simular o reproducir en forma parcial o total el comportamiento de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa así como bromoperoxidasas dependientes de vanadio y tratar de correlacionar la actividad biológica de un sistema inorgánico con las características estructurales, electrónicas y químicas del mismo.

Por este motivo el trabajo ha sido dividido en dos partes: La **primera parte** dedicada al estudio de modelos con actividad superóxido dismutasa y la **segunda parte** dedicada al estudio de modelos con actividad bromoperoxidasa.

## ***Bibliografía***

1. Asada, K., Yoshikawa, K., Takahashi, M.A., Maeda, Y. y Enmanji, K., *J Biol. Chem.* **250**, 2801 (1975).
2. Koppenol, W.H., Vroonland, C.A.J. y Braams, R., *Biochim. Biophys. Acta* **503**, 499 (1979).
3. Fridovich, I., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 239 (1983).
4. Keele, B.B., McCord, J.M. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **245**, 6176 (1970).
5. Carrico, R.J. y Deutsch, H.F., *J. Biol. Chem.* **245**, 723 (1970).
6. Yost, F.J. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **248**, 4905 (1973).
7. Baran, E.J., *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill / Interamericana de España S.A., Madrid. (1995).
8. Vilter, H. y Glombitza, K.W., *Bot. Mar.* **26**, 341 (1983).
9. Vilter, H., *Bot. Mar.* **26**, 429 (1983).
10. Vilter, H., *Bot. Mar.* **26**, 451 (1983).
11. De Boer, E., Tromp, M.G.M., Plat, H., Kreen, G.E. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 104 (1986).
12. Kreen, B.E., Plat, H., y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **912**, 287 (1987).
13. Plat, H., Kreen, B.E. y Wever, R., *J. Biochem.* **248**, 277 (1987).



# *Primera Parte*

---

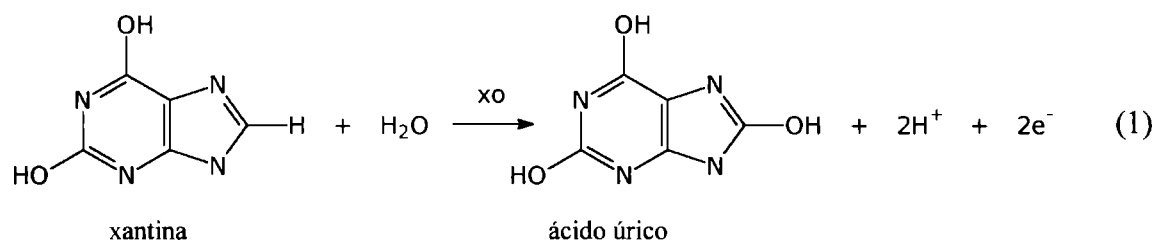
*Superóxido Dismutasa*

---

## Introducción

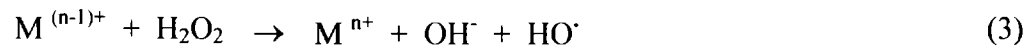
### Origen y Toxicidad del Anión Superóxido

Durante largo tiempo se trató de explicar la toxicidad del oxígeno por la formación de radicales libres. Recién en 1968 se reconoció a uno de los principales responsables de esa toxicidad: el anión superóxido ( $O_2^-$ ) [1]. En efecto, estudiando los ácidos  $\alpha$ -OH sulfónicos, se vió que al adicionarlos a un homogeneizado de hígado, se disociaban dando el ion sulfito, que era rápidamente oxidado a ion sulfato por enzimas presentes en el tejido hepático [2]. Trabajos posteriores [3], demostraron que la oxidación de sulfito a sulfato ocurría por dos vías, una de ellas muy rápida que tenía lugar aún a bajas concentraciones de iones sulfito (catalizada por la enzima sulfito oxidasa); la otra era una vía totalmente insólita, ya que la velocidad aumentaba a medida que aumentaba la concentración de sulfito, sin lograr saturación de enzima por sustrato como ocurre normalmente en las reacciones de tipo enzimático. Después de varios años [4], se postuló que una enzima del hígado, la xantina-oxidasa (XO), que interviene en la oxidación de xantina a ácido úrico (ec. 1), era la responsable de la producción de radicales superóxido, los que mediante una reacción en cadena oxidan a los iones sulfito.



La xantina oxidasa es una flavoproteína que contiene molibdeno en su sitio activo y la oxidación ocurre sobre el cofactor de molibdeno, en el cual el Mo(VI) pasa a Mo(IV), dado que la xantina es oxidada por dos electrones. El Mo(IV) es reoxidado por una transferencia electrónica interna. El oxidante, usualmente una molécula de oxígeno, extrae electrones de la enzima, para formar el anión superóxido, en un proceso que involucra un electrón. Este radical superóxido es una especie altamente tóxica en muchos sistemas biológicos especialmente en aquellos casos donde están presentes iones metálicos de transición.

El mecanismo más comúnmente aceptado para la toxicidad del anión se describe a través de la reacción de Haber-Weiss:



En el primer paso de este esquema, el anión superóxido reacciona con iones metálicos tales como Cu(II) o Fe(III), presentes en cantidades traza en las células para formar el correspondiente ion metálico reducido. En el segundo paso de la reacción, el peróxido de hidrógeno es reducido por el catión para dar ion hidróxido y un radical hidróxido. Esta última especie es deficiente en electrones y consecuentemente un poderoso oxidante, así como también un iniciador de reacciones por radicales libres. De esta manera la formación del radical hidróxido en la célula es algo que debe ser evitado.

En 1969 MC Cord y Fridovich [5] demostraron la existencia de una proteína que evitaba la formación de los peligrosos radicales superóxido, mediante una reacción de dismutación, y la llamaron superóxido dismutasa.

Sin embargo, esta enzima había sido reportada por primera vez ya en 1938 por Mann y Keilin [6], quienes la aislaron de eritrocitos de bovino. Estos autores no encontraron ninguna actividad enzimática para esta sustancia. El color azul verdoso sugería la presencia de iones  $Cu^{2+}$  y en efecto, se determinó que contenía un 0,34% de Cu y fue llamada hemocupreína. Posteriormente se aislaron de eritrocitos de humanos (eritrocupreína) [7,8], de cerebro humano (cerebrocupreína) [9], de hígado de bovinos [6] y equinos (hepatocupreínas) [10], todas con las mismas características que la hemocupreína. En 1970 se descubrió que el sitio activo de la proteína contenía además de iones  $Cu^{2+}$ , iones  $Zn^{2+}$  [11].

Aparte de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) que discutiremos a continuación, vale la pena mencionar que posteriormente Fridovich y col. identificaron y aislaron otros dos tipos de superóxido dismutasas, una conteniendo manganeso [12] y otra hierro [13] en sus sitios activos.

## ***Cu-Zn Superóxido Dismutasa***

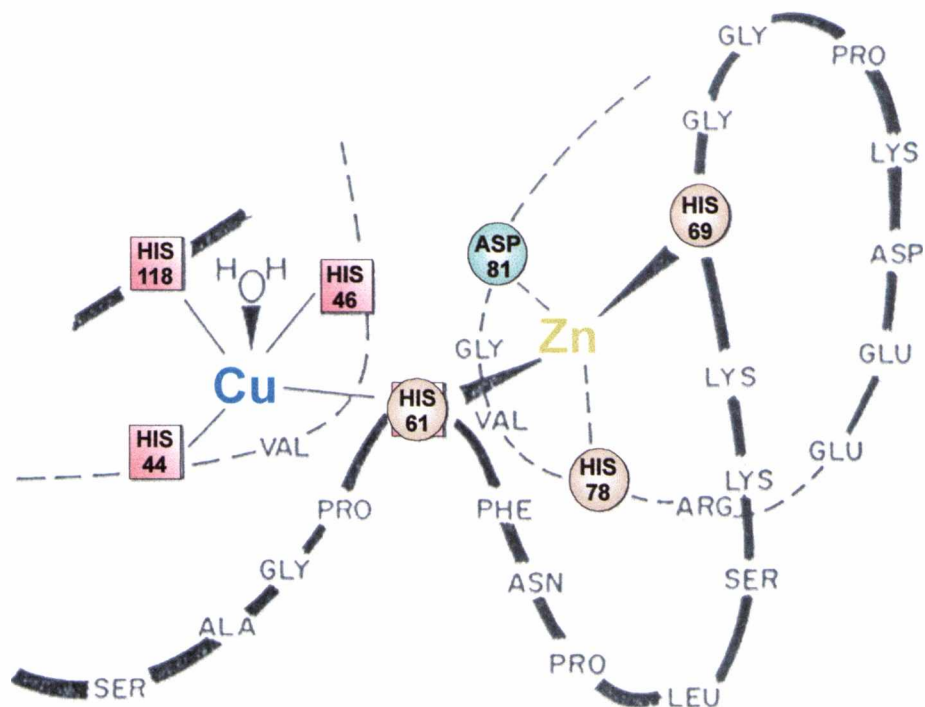
La SOD que contiene Cu-Zn en su sitio activo es una proteína particularmente atractiva para estudios bioinorgánicos [14]. Es abundante en casi todas las células eucariotas y es relativamente fácil de aislar. Es muy soluble y tiene una alta estabilidad térmica. Además tiene uniones de iones metálicos en una única e interesante configuración y la proteína libre de los metales o sea la apoproteína acepta fácilmente iones metálicos en el lugar de los iones nativos  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , lo que resulta sumamente útil para realizar estudios espectroscópicos [14].

### ***Propiedades Estructurales y Espectroscópicas***

#### ***Características Estructurales***

Richardson y colaboradores [15] determinaron por estudios de rayos X la estructura de la forma oxidada  $\text{Cu}^{2+}$  de la enzima de eritrocitos de bovinos con 2Å de resolución.

Posee un peso molecular de 34000 Dalton y está constituida por dos subunidades idénticas cada una de las cuales contiene un átomo de cobre y otro de zinc. El ion  $\text{Cu}^{2+}$  está unido a cuatro átomos de nitrógeno imidazolinico que provienen de los restos de histidina 44, 46, 61 y 118. Además, una molécula de agua coordina con el cobre dando al ion una geometría cuadrado plana distorsionada lo que seguramente aumenta la reactividad de este sitio. La esfera de coordinación del zinc está constituida por tres átomos de nitrógeno imidazolinico provenientes de los restos de histidina 61,69 y 78, así como también a un grupo carboxilato que proviene de un residuo de ácido aspártico 81, lo que le confiere una geometría de un tetraedro bastante regular. Ambos centros metálicos están unidos por un puente de imidazol deprotonado, el anillo de imidazol de la histidina 61, lo cual conduce a un complejo binuclear tal como se muestra en la Fig. 1.



**Figura 1.** Esquema del sitio bimetálico de la Cu-Zn SOD. Tomado de cita [16]

Hay numerosas evidencias que sugieren, con toda claridad, que el cobre es realmente el sitio activo donde ocurre la dismutación [17]. Por lo tanto el zinc debe desempeñar un papel meramente estructural ayudando a generar condiciones geométricas óptimas que faciliten la reacción. Durante la misma se supone que el anión superóxido llega al sitio activo a través de lo que se llama mecanismo de guía electrostática.

Los estudios de rayos X indican que las cadenas laterales cargadas positivamente de Arg 141, Lys 120 y Lys 134 están ubicadas del  $\text{Cu}^{2+}$  a una distancia de 5, 12 y 13 Å respectivamente. Estos residuos de aminoácidos cargados positivamente y ubicados tan cercanos al sitio activo serían los encargados de guiar al anión superóxido hacia dicho sitio. Una evidencia que soporta esta hipótesis es que la modificación química de estos residuos cargados positivamente resulta en una disminución de la actividad enzimática de la SOD. Esto explica también por qué ciertos aniones, de cargas elevadas, como el ortofosfato o los vanadatos, inhiben fuertemente a la enzima, bloqueando de alguna manera el transporte del sustrato [17]. Algunos otros ligandos pequeños tales como el fluoruro o el

cianuro, son también capaces de inhibir el sistema, aunque en este caso, probablemente, actúan bloqueando directamente el sitio activo [14].

## *Características Espectroscópicas*

### *Espectro Electrónico*

Los estudios de espectroscopía de absorción electrónica en la región UV-Visible han sido particularmente informativos acerca de la naturaleza de la región de las uniones metálicas [14].

Recordemos que el Cu(II) es un elemento de transición  $d^9$  y sus transiciones d-d generalmente ocurren en la región visible del espectro. Los complejos de coordinación que contienen Cu(II) coordinado con nitrógeno como ligando donador generalmente tienen una transición d-d en la región del espectro entre 500 y 600 nm y su centro de coordinación tiene una geometría tetragonal. En el caso de la enzima Cu-Zn SOD (Fig. 2A) se observa una banda de absorción a 680 nm ( $14.700 \text{ cm}^{-1}$ ), consistente con la coordinación del cobre por cuatro átomos de nitrógeno, pero el coeficiente de extinción ( $155 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), es relativamente elevado, sugiriendo una cierta asimetría de la esfera de coordinación [17]. Así, el espectro óptico de la enzima nativa es consistente con los resultados de la estructura cristalina discutidos anteriormente.

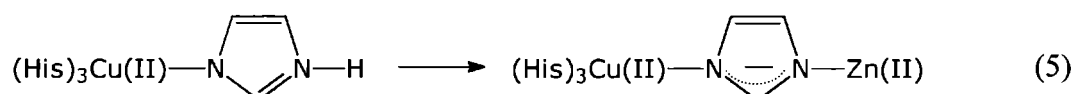
Esta espectroscopía ha aportado valiosos resultados cuando se estudió los espectros de los derivados de la enzima sustituida en uno o en los dos sitios metálicos por otros cationes [17].

Estos derivados pueden ser divididos en cuatro clases:

- 1)  $\text{Cu}_2 \text{M}_2 \text{ SOD}$ , donde  $\text{M} = \text{Zn, Co, Cd y Hg}$
- 2)  $\text{Cu}_2 \text{E}_2 \text{ SOD}$ , donde E significa sitio vacío.
- 3)  $\text{Ag}_2 \text{Cu}_2 \text{ SOD}$
- 4)  $\text{Cu}_2 \text{Cu}_2 \text{ SOD}$

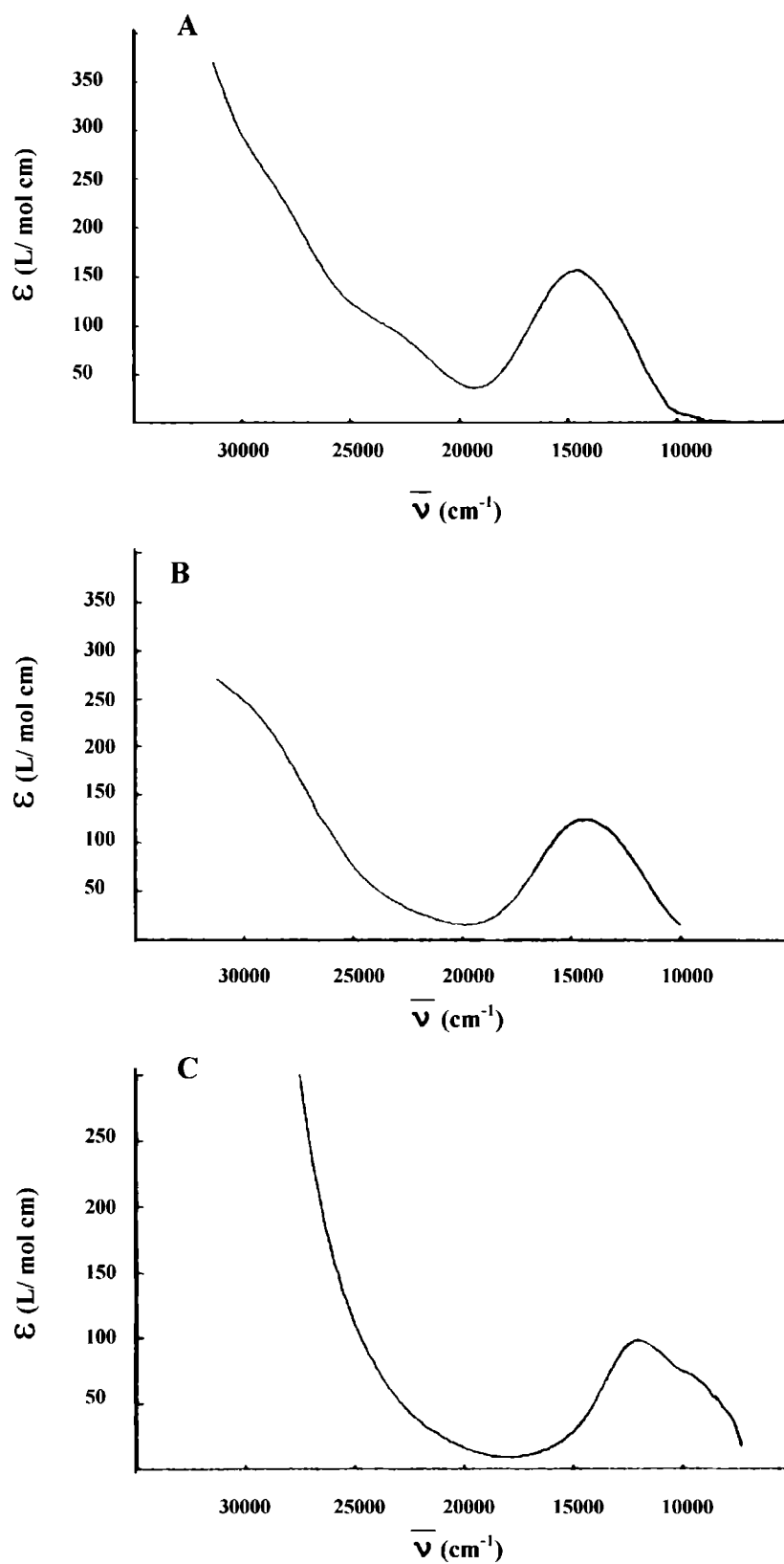
Todos los derivados de la clase 1 retienen la banda en aproximadamente 680 nm, sugiriendo que los diferentes metales M que reemplazan al Zn (II) no ocasionan cambios apreciables sobre el sitio del cobre. En cambio en la proteína libre de zinc (Fig. 2B), o sea los derivados de la clase 2, esa banda se desplaza a 700 nm ( $14.300 \text{ cm}^{-1}$ ),

presumiblemente debido a una pequeña variación en la fuerza del campo de ligandos, debido a la protonación del puente imidazolato (de la His 61) al extraer el zinc:



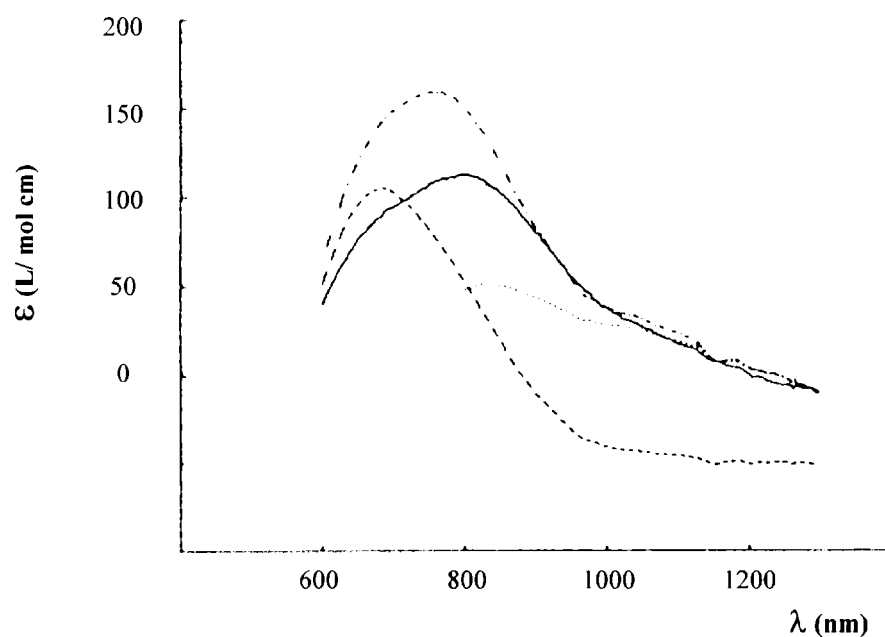
Otro cambio que ocurre en el espectro UV- Visible cuando el Zn (II) es removido, es la desaparición de un hombro a 417 nm ( $24.000 \text{ cm}^{-1}$ ). Este hombro está presente en todos los derivados de la clase 1 y se cree que es debido a una transición de transferencia de carga del imidazolato al cobre. Los derivados de la clase 3, en el cual el cobre pasa a ocupar el sitio del Zinc y su lugar es ocupado por Ag (I) (Fig. 2C), muestra que la típica banda del cobre (II) se desplaza fuertemente al IR cercano con un máximo en 820 nm ( $12.174 \text{ cm}^{-1}$ ), indicando que la geometría es prácticamente tetraédrica [17]. Finalmente los derivados de la clase 4, en los cuales ambos sitios están ocupados por cobre (II), muestran un espectro de dos bandas muy similar al obtenido sumando el espectro de la enzima nativa y el espectro de los derivados de la clase 3 (Fig. 3).

Todos estos resultados muestran, por un lado, que el Cu (II) en el sitio del cobre tiene una geometría definida diferente a la que tiene el sitio del Zn (II), y por otro lado, que estas diferentes geometrías no se alteran apreciablemente por sustituciones en el otro sitio metálico.



**Figura 2.** Espectro de absorción UV-Vis: (A) de la enzima nativa Cu-Zn SOD, (B) del derivado libre de Zn Cu(II)<sub>2</sub> E<sub>2</sub> SOD, (C) del derivado Ag(I)<sub>2</sub> Cu(II)<sub>2</sub> SOD. Tomado de cita [16]



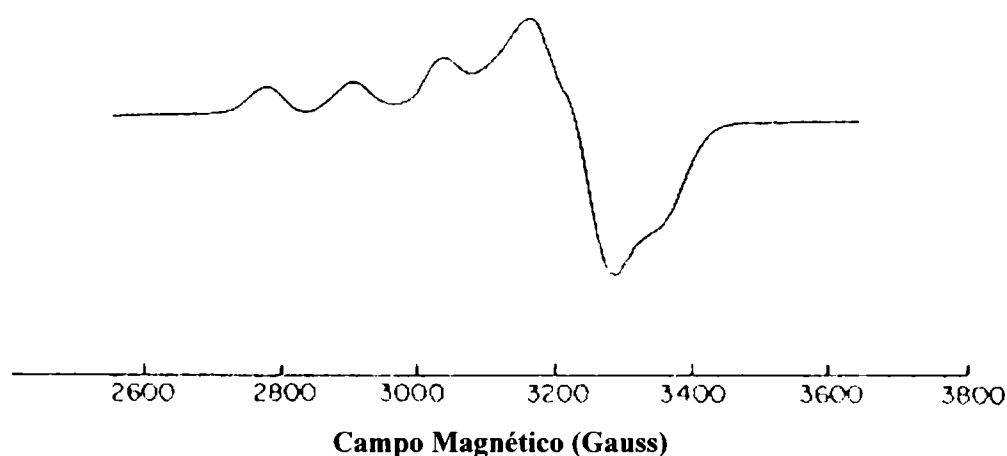


**Figura 3.** Comparación de los espectros de absorción visible de  $\text{Cu(II)}_2 \text{Cu(II)}_2 \text{SOD}$  (----) con el de la enzima nativa (—) y con el derivado  $\text{Ag(I)}_2 \text{Cu(II)}_2 \text{SOD}$  (.....). También se incluye el espectro obtenido al sumar el espectro de la enzima nativa y el derivado de la clase 3 (-.-.-). Tomado de cita [16]

### ***Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)***

Esta técnica también ha aportado valiosa información para la caracterización de la enzima [14]. El espectro de resonancia paramagnética electrónica correspondiente que se muestra en la Fig. 4 es consistente con los espectros UV-visible y de rayos X. El desdoblamiento de la resonancia de  $g \parallel$  es debido al acoplamiento de la estructura hiperfina entre el electrón desapareado del  $\text{Cu(II)}$  y el espín nuclear del cobre ( $I = 3/2$ ). El valor de  $A \parallel$  (130 G) es intermedio entre el valor más alto observado para el centro tetragonal en  $\text{Cu(II)N}_4$  y uno más bajo observado en las proteínas que contienen  $\text{Cu(I)}$  [17]. Estos valores intermedios se deben probablemente a la desviación relativamente grande de la geometría tetragonal observada en la estructura determinada por rayos X. El gran ensanchamiento de la línea observada en la región de  $g_{\perp}$  indica que el entorno del cobre es rómbico distorsionado.

Los derivados del tipo  $\text{Cu}_2\text{E}_2 \text{SOD}$ , obtenidos al remover el zinc de la enzima,



**Figura 4.** Espectro EPR de Cu-Zn SOD a 77 K. Tomado de cita [16]

tienen un espectro EPR que si bien es similar al de la enzima nativa, está mas cerca de los espectros típicos de  $\text{Cu(II)N}_4$ . Posiblemente estos cambios observados se deban a la relajación de algunos factores que ocasiona el cobre al estar en un entorno distorsionado lo cual le permite ajustar sus ligandos a una coordinación tetragonal más favorable, lo que muestra la importancia del zinc como factor estructural.

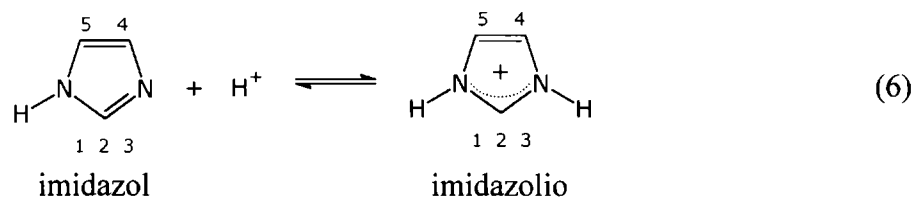
El espectro EPR debido al cobre en el sitio del zinc (derivado  $\text{Ag}_2\text{Cu}_2\text{SOD}$ ) indica que es rómbico, lo cual es consistente con las conclusiones obtenidas en el espectro visible que indican que el sitio del zinc es tetraédrico [17].

Por último el espectro del derivado  $\text{Cu}_2\text{Cu}_2\text{SOD}$  a 77K es completamente diferente de cualquiera de los otros derivados, porque los espines desapareados de los dos iones  $\text{Cu}^{2+}$  se acoplan magnéticamente a través del puente imidazolato resultando un espectro EPR triplete. En efecto, a temperatura ambiente este espectro desaparece completamente debido a la interacción de los dos centros paramagnéticos.

### ***Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN $H^1$ )***

Estos espectros han provisto también considerable información acerca de los derivados reducidos de la enzima que contienen Cu(I), ya que la proteína en la forma oxidada (Cu(II)), da espectros de RMN  $H^1$ , en los cuales la resonancia de la región de las

uniones metálicas se ensanchan debido al paramagnetismo del centro de Cu(II). Las resonancias de los protones de las histidinas son en general muy informativos por que ellos aparecen en una región relativamente despejada del espectro (entre 8,5 y 5,5 ppm), y también por que seis de las ocho histidinas por subunidad actúan como ligandos del ion metálico en la enzima nativa. Otra propiedad útil de los residuos de histidina es que la resonancia de los protones de los C2 y C4 son muy sensibles a la protonación del imidazol para dar imidazolio (ec. 6), reacción que en ausencia de iones metálicos unidos al imidazol ocurre con un pH alrededor de 7.

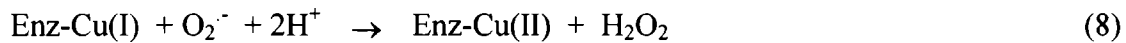
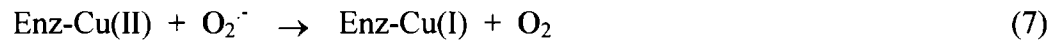


Consecuentemente la resonancia de un protón de histidina que proviene de un metal coordinado con imidazol puede ser distinguido de los imidazoles libres sobre la base de su comportamiento en las titulaciones ácido-base. Cass y col.[18] fueron capaces de asignar resonancias que provienen de histidina ligadas al cobre y al zinc al examinar el comportamiento de la enzima nativa y de la apoproteína frente a los cambios de pH.

### ***Mecanismo y actividad enzimática***

El radical superóxido es inestable en medio acuoso y se dismuta espontáneamente dando oxígeno y peróxido de hidrógeno a pH= 7,4, con una velocidad aproximada de  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [19]. Esta dismutación involucra la reacción directa de dos iones  $\text{O}_2^-$  y es impedida por la repulsión electrostática entre los dos aniones. La velocidad de dismutación *in vivo* sin catalizador también es afectada por la baja concentración del anión superóxido (menor de  $10^{-10} \text{ M}$ ) en el estado estacionario [19]. La enzima SOD resuelve este problema al alternar la reducción y la oxidación de la enzima durante sucesivos encuentros con el anión superóxido, catalizando así la transferencia electrónica entre dos aniones sin requerir interacción directa entre ellos.

La ecuación para el mecanismo de la catálisis ha sido determinada por radiólisis de pulso [20-22] y generalmente está de acuerdo con un compromiso de alternancia entre los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II) en el sitio activo de la proteína, lo cual puede ser descrito formalmente como sigue:



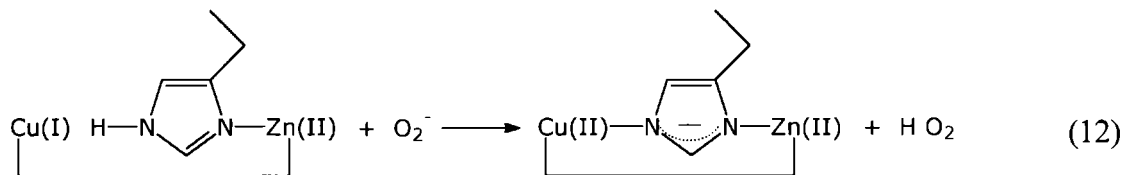
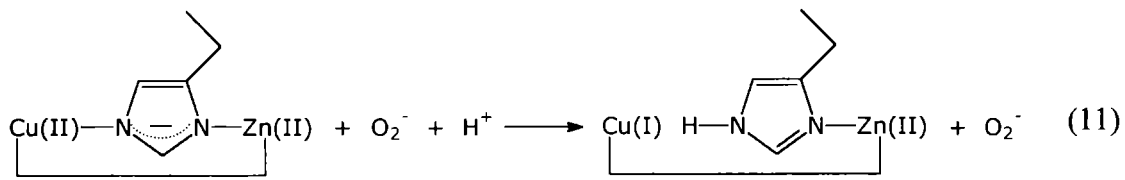
Fielden y col. [22] mostraron que la velocidad total de la reacción es  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y está limitada solamente por la difusión del anión  $\text{O}_2^-$  hacia el sitio activo de la proteína. Si comparamos la velocidad de dismutación espontánea con la de la reacción enzimática a pH fisiológico, se observa que la enzima incrementa la velocidad de la reacción sin catalizar en aproximadamente 10.000 veces.

Si observamos la ecuación 8 en la cual el Cu(I) es oxidado, parece lógico pensar que es necesario que primero se una el Cu(I) con el anión  $\text{O}_2^-$  antes de que se produzca la transferencia electrónica tal como se indica a continuación:



El anión peróxido formado en la reacción es extremadamente básico, por lo tanto debe adquirir un protón para poder disociarse de las proximidades del ion  $\text{Cu}^{2+}$ .

Mc Adam y col. [23] a través de un ingenioso experimento mostraron que el puente de imidazol se abre y se cierra durante cada ciclo catalítico y observaron que la apertura del puente durante la reacción ocurría a la misma velocidad con que el anión superóxido reducía al ion Cu(II) y se restauraba con la misma velocidad con la que el anión oxidaba al ion Cu(I). El mecanismo de la apertura y cierre del puente imidazol durante el ciclo catalítico se representa a través de las ecuaciones 11 y 12. Estos autores propusieron entonces que la histidina 61, es decir el puente de imidazol en la forma oxidada de la enzima, sea la fuente de ese protón.



La coordinación de un átomo de nitrógeno de la histidina con Zn(II) disminuye el  $pK_a$  de los otros átomos de nitrógeno de 14 a aproximadamente 7 a 10. Consecuentemente, el segundo átomo de nitrógeno preferirá unirse a un protón mas que a un ion  $\text{Cu}^+$ , lo cual conduce a la apertura del puente.

La reoxidación de Cu(I) a Cu(II) reformata el puente, lo cual conduce a la transferencia del protón al ion peróxido el cual es liberado como  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este mecanismo crea un sitio abierto en el centro de Cu(I) que puede unir al anión superóxido obviando de esta manera la necesidad de crear un estado de transición pentacoordinado, lo cual es desfavorable energéticamente. La protonación del ion superóxido en este segundo paso hace que ambas reacciones sean termodinámicamente factibles.

El potencial redox para la cupla  $\text{O}_2 / \text{O}_2^-$  es -0,33 V y para  $\text{O}_2^- / \text{H}_2\text{O}_2$  es + 0,89V. Así cualquier metal que tenga una química redox de un electrón entre estados  $\text{M}^{n+}$  y  $\text{M}^{(n+1)+}$ , y cuyos potenciales estén comprendidos entre  $-0,3 \leq E^\circ \leq + 0,9$  V, será termodinámicamente capaz de actuar como una superóxido dismutasa. Por este motivo no es sorprendente que además de la Cu-Zn SOD existan en la naturaleza otras dos superóxido dismutasas con sitio activo de hierro (Fe-SOD) y manganeso (Mn-SOD).

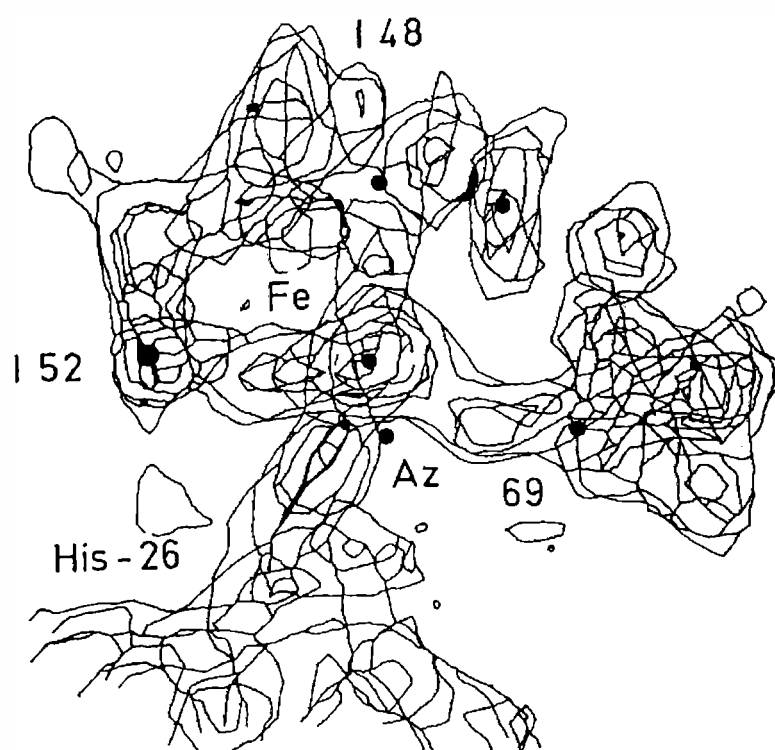
### ***Fe-superóxido dismutasa***

La estructura tridimensional de la superóxido dismutasa que contiene hierro en su sitio activo fue estudiada por Stallings y col. [24]. Esta enzima posee dos subunidades idénticas de peso molecular 20.000 D, y se encuentra usualmente en células procariotas. El hierro en coordinación tetraédrica, está ligado a cuatro cadenas proteicas a través de dos

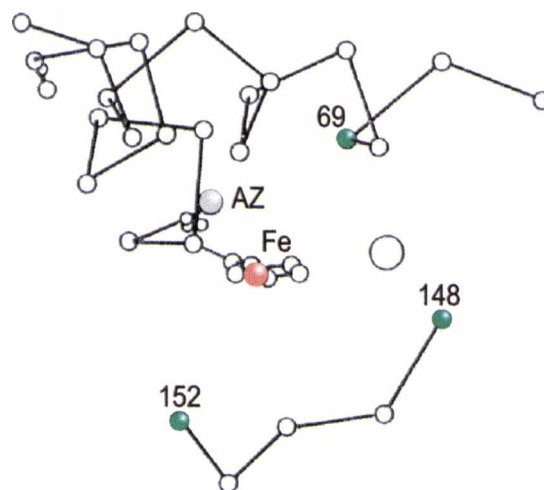
nitrógenos terminales de dos hélices entrecruzadas. La tercera y cuarta coordinación se realiza a través del carbono terminal de residuos de aminoácidos del principio y del final del enrollamiento  $\beta$ . Así, el sitio activo define una interfase del nitrógeno y carbono terminal como se muestra en la Fig. 5A. Aparentemente un lado del Fe (III) está parcialmente abierto y tiene facilidad para interactuar con ligandos adicionales. Como se muestra en la Fig. 5B este lado se encuentra por debajo del ion férrico y aparece expuesto al solvente y a la interfase del dímero. Medidas de resonancia magnética nuclear [25] realizadas a pH 7, indicaron que el agua se liga al Fe (III) pero a 3 Å de resolución no es posible distinguir con claridad si lo observado se debe realmente a agua ligada. Otros estudios [26,27] demostraron que el ion azida puede unirse a la cara abierta del Fe (III) por lo que estos autores propusieron que el ion superóxido se une en la misma región [28].

### ***Mn-superóxido dismutasa***

La tercera superóxido dismutasa conocida contiene manganeso en su sitio activo. De ella fueron aisladas dos tipos de metaloenzimas; una de ellas, de peso molecular 80.000 Dalton, con cuatro subunidades idénticas. Esta fue purificada a partir de *S. Cereviciae* [29] y de *Acholeplasma laidlawii* [30]. La otra, de peso molecular 40.000 Dalton, con dos subunidades idénticas fue aislada de *E. coli* [31]. Superóxido dismutasas que contienen manganeso se encuentran además en las mitocondrias de las células eucariotas. Esta clase de SOD posee la particularidad de no ser inhibida por el ion cianuro, contrariamente a lo que ocurre con la Cu/Zn SOD [32]. Estudios de espectroscopía de resonancia de espín electrónico (EPR), [12] sobre la enzima de *E. coli* que contiene manganeso, no permiten llegar a resultados concluyentes sobre el estado de oxidación del manganeso en la enzima nativa.



**Figura 5A.** Vista estereoscópica de la densidad electrónica del sitio activo de la Fe-SOD de *Escherichia coli* (69,148 y 152 residuos de aa coordinados al Fe). Tomado de cita [ 23]



**Figura 5B.** Vista estereoscópica del sitio activo de la Fe-SOD, mostrando la región de la azida. (69,148 y 152 residuos de aa coordinados al Fe). Tomado de cita [23]

El hecho que el Mn en la enzima nativa no da señal de EPR puede ser explicado en términos de que el metal podría estar presente como Mn(II) o Mn(III). Si se encontrara como Mn(III) podría ser reducido por desnaturalización de la enzima, dando la señal característica de Mn(II). Si bien el Mn(II) es una especie paramagnética, no necesita producir una señal si está fuertemente ligado a la proteína y por lo tanto inmovilizado dentro de su campo ligado. Un efecto sobre la señal de EPR de Mn(II) ligado se observó en el caso de la concanavalina A [33]. Una consideración adicional debida al cromóforo visible, lleva a la suposición que el Mn en la enzima nativa puede encontrarse como Mn(III). Esto está basado en la observación que el color rojo púrpura, que muestra esta metaloproteína, es más característico de los complejos de Mn(III) [34], que de los de Mn(II).

Estudios realizados de la enzima Mn SOD aislada de *T. thermophilus* [35], indican una estructura similar al de la enzima Fe SOD, con una disposición análoga del metal y los ligandos. Tanto el sitio activo de la enzima que contiene Fe como el de la que contiene Mn parecen tener cierta similitud con el sitio activo de la Cu/Zn SOD, en los siguientes aspectos: a) cuatro cadenas laterales de proteínas actúan como ligandos del metal y b) una molécula de agua ubicada en posición axial, actúa como el quinto ligando del metal. Así, la disposición general de los ligandos en las tres enzimas, alrededor del metal, origina una geometría cuadrado plano distorsionada, con una molécula de agua unida al mismo en posición axial. Estas similitudes nos permiten especular que estas enzimas pueden catalizar la reacción de dismutación del anión superóxido con un mecanismo similar al descrito para la enzima que contiene Cu(II) y Zn(II) en su sitio activo.

Como habíamos mencionado anteriormente cuando el oxígeno se reduce a lo largo del metabolismo celular aparecen componentes perjudiciales tales como radical anión superóxido, radical hidróxido y peróxido de hidrógeno, los cuales se ha demostrado que juegan un importante rol en una gran variedad de procesos patológicos [36-39] tales como inflamaciones, úlceras, procesos tumorales, artritis reumatoidea, envejecimiento precoz etc. Asimismo, se ha sugerido que estos procesos podrían estar relacionados con una disminución de la actividad de SOD, lo que trae como consecuencia un aumento de la concentración local de anión superóxido.

Uno podría esperar entonces que estos cuadros cedieran ante la administración de la enzima natural [40,41]. En efecto, la enzima Cu/Zn-SOD ha sido propuesta para usos clínicos pero desafortunadamente esto no es posible por dos motivos:



1) Inyectada en forma intravenosa desaparece de circulación en algunos minutos [42].

2) Tiene un peso molecular demasiado alto para atravesar la membrana celular [43] y puede solamente proveer protección extracelular [44].

Por estas razones surge la importancia de buscar compuestos de bajo peso molecular, que puedan atravesar la membrana celular, y que simulen la actividad de la enzima para su posterior aplicación farmacológica.

La presencia de Cu, Fe, o Mn en el sitio activo de esta enzima ha concentrado la atención en el uso de estos metales y sus quelatos de bajo peso molecular, como compuestos que sean capaces de sustituir eficientemente a la SOD.

En los últimos diez o quince años se ha evaluado la actividad antiinflamatoria, antiulcerosa, antitumoral, antiartrítica y anticonvulsionante de una gran cantidad de complejos de cobre con aminoácidos esenciales, o con otros ligandos sencillos (acetato, antranilatos, salicilato, D-penicilamina, citrato, tiomalato, tiourea, etc.) [45]. Especialmente interesante es la observación de que la actividad de este tipo de complejos de cobre es siempre superior a la de los ligandos aislados cuando estos de por sí la presentan (por ej. penicilamina, aspirina) y que generan esta actividad cuando el ligando solo no la posee (por ej. aminoácidos). Parece posible, que la actividad antiinflamatoria que poseen ciertos ligandos orgánicos podría tener su origen en la formación preliminar *in vivo* de los correspondientes complejos de cobre [46-49].

En el caso de las drogas conteniendo cobre, no se comprenden todavía con claridad los mecanismos de su acción terapéutica habiéndose sugerido, entre otras posibilidades, que los complejos sean capaces de inducir la actividad de la lisil-oxidasa [50] (una cuproproteína involucrada en la síntesis del colágeno y la elastina), como manera de recuperar el tejido afectado, o de modular la síntesis de la prostaglandina (la presencia de cobre parece reducir la síntesis de la prostaglandina-proinflamatoria, PGE<sub>2</sub>, aumentando concomitantemente la de la prostaglandina-antiinflamatoria PGF<sub>2α</sub>) [51-54]. Se ha sugerido entonces, que estos compuestos de cobre pueden reemplazar eficientemente a la SOD en aquellos procesos patológicos en los cuales la concentración local de anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> sea bastante alta.

## ***Bibliografía***

1. McCord, J.M. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **243**, 5773 (1968).
2. Heimberg, M., Fridovich, I. y Handler, P., *J. Biol. Chem.* **204**, 913 (1953).
3. Cohen, H.J., Fridovich, I. y Rajagopalan, K.V., *J. Biol. Chem.* **246**, 374 (1971).
4. Fridovich, I. y Handler, P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1836 (1961).
5. McCord, J.M. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
6. Mann, T. y Keilin, D., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **126**, 303 (1938).
7. Markowitz, H., Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M., *J. Biol. Chem.* **234**, 40 (1959).
8. Kimmel, J.R., Markowitz, H. y Brown, D.M., *J. Biol. Chem.* **234**, 46 (1959).
9. Porter, H. y Folch, J., *J. Neurochem.* **1**, 260 (1957).
10. Mohamed, M.S. y Greenberg, D.M., *J. Gen. Physiol.* **37**, 433 (1953).
11. Carrico, R.J. y Deutsch, H.F., *J. Biol. Chem.* **245**, 723 (1970).
12. Keele, B.B., McCord, J.M. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **245**, 6176 (1970).
13. Yost, F.J. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **248**, 4905 (1973).
14. Valentine, J.S. y Pantoliano, M.W., en Spiro, T.G. (Editor), *Copper Proteins*, John Wiley y Sons, New York, p 291 (1981).
15. Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Beem, K.M., Richardson, J.S. y Richardson, D.C., *J. Mol. Biol.* **160**, 181 (1982).
16. Valentine, J.S. y Mota de Freitas, D., *J. Chem. Educ.* **62**, 990, (1985).
17. Pantoliano, M.W., Valentine, J.S., Burger, A.R. y Lippard, S.J., *J. Inorg. Biochem.* **17**, 325 (1985).
18. Cass, A.E.G., Hill, H.A.O., Bannister, W.H., Hasemann, V. y Johansen, J.T., *Biochem. J.* **183**, 127 (1979).
19. Fridovich, I., *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 147 (1975).
20. Klug, D., Fridovich, I. y Rabani, J., *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 2786 (1973).
21. Klug, D., Rabani, J. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **247**, 4839 (1972).
22. Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D.J., Mautner, G.N., Rotilio, G. y Calabrese, L., *Biochem. J.* **139**, 49 (1974).
23. McAdam, M.E., Fielden, E.M., Lavelle, F., Calabrese, L., Cocco, D., y Rotilio, G., *Biochem. J.* **167**, 271 (1977).

24. Stallings, W.C., Bull, C., Patridge, K.A., Powers, T.B., Fee, J.A. y Ludwing, M.L., en: Bors, W., Saran, M. y Tait, D. (Editores), *Oxigen radicals in Chemistry and biology*, Walter de Gruyter: Berlín, p 779 (1984).
25. Villafranca, J.J., *Febs Letter* **62**, 230 (1976).
26. Ringe, D., Petsko, G.A., Yamakura, F., Susuki, K. y Ohmhorri, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3879 (1983).
27. Stallings, W.C., Powers, T.B., Patridge, K.A., Fee, J.A. y Ludwing, M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3884 (1983).
28. Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y. y Kusunose, M., *J. Biochem.* **80**, 1343 (1976).
29. Dilton, C. y Johanesen, J.T., *Carlsberg Res. Comm.* **47**, 71 (1982).
30. Reinards, R., Altdorf, R. y Ohlenbusch, H.D., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 577 (1984).
31. Steinman, H.M., *J. Biol. Chem.* **253**, 8708 (1978).
32. Weisiger, R.A. y Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* **248**, 3582 (1973).
33. Reed, G.H. y Cohn, M., *J. Biol. Chem.* **245**, 662 (1970).
34. Sastry, G.S., Hamm, R.E. y Pool, K.M., *Anal. Chem.* **41**, 857 (1969).
35. Stallings, W.C., Patridge, K.A., Stong, R.K. y Ludwig, M.L. *J. Biol. Chem.* **259**, 10695 (1984).
36. Fridovich, I., *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1 (1986).
37. Weiss, S.J., *Acta Physiol. Scand.* **548**, 9 (1986).
38. McCord, J.M., *New England J. Med.* **132**, 159 (1985).
39. Samuni, A., Chevion, M. y Czapski, G., *J. Radical Res.* **99**, 562 (1984).
40. Michelson, A.M., Jadot, G. y Puget, K., *Free Rad. Res. Comm.* **4**, 209 (1988).
41. Emerit, J., Pelletier, S., Tosoni-Verlignue, D. y Mollet, M., *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 145 (1989).
42. Giri, S.N., y Misra, H.P., *Mol. Biol.* **62**, 285 (1984).
43. Gärtner, A. y Weser, U., *Topics in Current Chemistry* **132**, 1 (1986).
44. Huber, W., Saifer, M.G. P. y Williams, L.D., en Bannister, W.H. and Bannister, J.V., (Editores), *Biological and Clinical Aspects of Superoxide Dismutase*, Elsevier, New York, **11B**, p 395 (1980).
45. Baran, E. J., *Acta Farm. Bonaerense* **4**, 125 (1985).
46. Whitehouse, M.W., Field, L., Denko, C.W. y Ryall, R., *Scand. J. Rheumat.* **4**, (Suppl. 8), 183 (1975).

47. Whitehouse, M.W., Field, L., Denko, C.W. y Ryall, R. *Agents Actions* **6**, 201 (1976).
48. Denko, C.W. y Whitehouse, M.W., *J. Rheum.* **3**, 54 (1976).
49. Whitehouse, M.W. y Walter, W.R., *Agents Actions* **8**, 85 (1978).
50. Harris, E.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **73**, 371 (1976).
51. Boyle, E., Freeman, P.C., Gaudie, A.C., Magan, F.R. y Thomson, M., *J Pharm Pharmacol.* **28**, 865 (1976).
52. Lee, R.E. y Lands, W.E.M. *Biochem. Biophys. Acta* **260**, 203 (1972).
53. Maddox, I.S., *Biochem. Biophys. Acta* **306**, 74 (1973).
54. Vargaftig, B.B., Tranier, Y. y Chignard, M., *Europ. J. Pharmacol.* **33**, 19 (1975).

# *Capítulo 1*

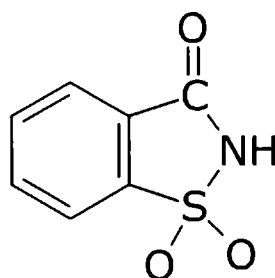
---

*Evaluación de la  
Actividad Superóxido Dismutasa  
de una Serie de Sacarinos de  
Metales de Transición Divalentes*

---

## 1.1. Introducción

La sacarina (o-sulfobenzimida, Fig. 1) es uno de los edulcorantes sintéticos más ampliamente difundidos y utilizado. Su química ha recibido muchísima atención, debido a la facilidad con que interacciona con prácticamente todos los biometales importantes y aún con muchos elementos considerados tóxicos para los organismos superiores. Y, por otra parte, durante mucho tiempo se sospechó que poseía actividad cancerígena [1-4] lo que generó e impulsó numerosos y variados estudios en torno a ella.



*Figura.1- Esquema de la estructura de la sacarina (o-sulfobenzimida)*

Hasta el presente, se ha logrado acumular una importante cantidad de información estructural en torno a los complejos metálicos de la sacarina [5]. Sin embargo, en este trabajo hemos restringido nuestra atención a algunos sacarinatos de cationes divalentes de la primera serie de transición, y entre ellos, solamente a los mononucleares, dado que existen algunos ejemplos de complejos de este tipo en los que el anión sacarinato actúa como puente (a través del átomo de N deprotonado y del oxígeno carboxílico) entre dos centros metálicos [6]. Se conoce toda la familia de complejos mononucleares, conteniendo el anión sacarinato (sac), de fórmula general  $[M^{(II)}(C_7H_4NO_3S)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ , con  $M^{(II)} = V$  [7], Cr [7], Mn [8], Fe [9], Co [9], Ni [9], Cu [9], Zn [10].

En el caso del complejo Cu(II) la estructura fue recientemente refinada por difracción de neutrones [11] y también se investigó su espectro de EPR en monocristales [12].

Para el compuesto análogo de Fe (II) se estudió el espectro Mössbauer de  $^{57}\text{Fe}$  [13] y se analizaron detalles de su comportamiento vibracional en base a medidas de espectros Raman y de resonancia Raman [14]. Y, por otra parte, para un gran número de complejos de este tipo se investigó también el comportamiento magnético en un amplio intervalo de temperaturas y se analizaron sus espectros electrónicos de absorción [15]. También lograron establecerse correlaciones de interés entre las características estructurales y el comportamiento espectroscópico-vibracional [16,17]. Más recientemente, fue investigado también su comportamiento térmico [18].

Para complementar todos estos estudios pareció interesante investigar la actividad superóxido dismutasa (SOD) de estos complejos y esa investigación constituye el tema de este primer capítulo de nuestro trabajo.

## 1.2. Características Estructurales

Todos los complejos de estequiometría  $[\text{M}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  conteniendo un catión divalente de la primera serie de transición pertenecen al sistema cristalino monoclinico  $\text{P}2_1/\text{c}$  y  $Z=2$  [7-10]. Los cationes metálicos se ubican en un centro de inversión cristalográfico y presentan una coordinación octaédrica distorsionada. Las cuatro moléculas de agua se ubican en el plano ecuatorial mientras que los dos aniones sacarinato se ubican en posición *trans* en las dos posiciones apicales de ese poliedro, coordinado a través de sus átomos de nitrógeno, como se muestra en la Fig. 2.

Las distancias M-N decrecen más o menos regularmente al pasar del V(II) al Cu(II) y luego aumentan un poco al pasar del Cu(II) al Zn(II), en buen acuerdo con las variaciones del tamaño iónico. Sólo en el Mn(II) (configuración electrónica  $d^5$ ) se observa una pequeña irregularidad [8]. En cuanto a las distancias M-O, en todos los casos se presentan dos enlaces ligeramente más cortos que los otros dos pero, en general, las magnitudes resultan comparables al pasar de un complejo a otro. Sólo en el caso del Cr(II) ( $d^4$ ) y del Cu ( $d^9$ ) las diferencias entre ambos pares de distancias son mucho más marcadas, seguramente como consecuencia de una fuerte distorsión de tipo Jahn-Teller.

Independientemente de estas diferencias menores, Cotton y col. ya habían llamado la atención sobre la excepcional flexibilidad que tiene esta estructura [7], admitiendo una importante variación de tamaño iónico sin colapsar. En este contexto, es interesante remarcar que también el Cd(II) que es mucho más voluminoso que los otros cationes divalentes mencionados, también adopta el mismo tipo estructural [10].

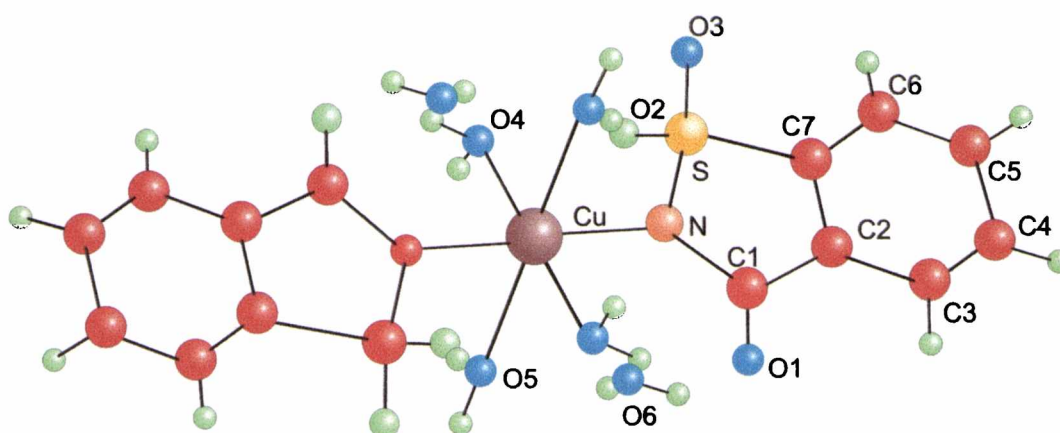


Figura 2. Estructura de  $[Cu^{II}(C_7H_4NO_3S)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$  Tomado y modificado de cita [9]

### 1.3. Parte Experimental

#### 1.3.1. Síntesis de los complejos

Estos compuestos se obtuvieron por reacción de soluciones acuosas de la sal sódica de la sacarina, con sales simples del metal ( $CH_3COO^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ , etc.), de acuerdo al procedimiento descrito por Haider y col. [19]. Los complejos fueron purificados por doble recrystalización a partir de agua y caracterizados por análisis químico, espectroscopía IR y electrónica [15].



### 1.3.2. Determinación de la actividad superóxido

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue ensayada por el método de Beauchamp y Fridovich [20] y modificado por Imanari y col. [21,22]. Este método está basado en que SOD inhibe la reducción del nitro-azul de tetrazolium (NBT) por el ion superóxido generado en el sistema xantina / xantina oxidasa. La mezcla de reacción contiene 0,1 mL de xantina 3,00 mM; 0,1 mL de NBT 0,75 mM; 0,1 mL de la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 3 mM; 0,1 mL de albúmina bovina 1,50 mg/mL; 1 mL de solución acuosa del complejo; se completa a volumen 3mL con buffer carbonato 0,05 M de pH 10,2. Luego de una preincubación de 10 minutos a 25 °C, se agrega 0,1 mL de xantina oxidasa adecuadamente diluida (0,01 U/mL). La mezcla es incubada durante 20 minutos a 28 °C. Para detener la reacción se agregó 0,1 mL de  $\text{CuCl}_2$  6mM. La absorción del NBT reducido se lee a una longitud de onda igual a 560 nm en un espectrofotómetro Gilford 250. Los valores de absorbancia son comparados con el control, el cual no contiene muestra. Los blancos de reacción utilizados no contienen NBT, xantina o xantina oxidasa.

Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50 % de inhibición de reducción del NBT. Para evitar la interferencia, sobre la acción enzimática, por la presencia de iones metálicos contaminantes, se usó agua bidestilada en la preparación de las soluciones y en el lavado del material de vidrio.

El EDTA se agrega comúnmente a los ensayos de este tipo para complejar el cobre inorgánico o débilmente unido que pudiera existir en el medio de reacción y evitar así que dismute al anión superóxido (el  $\text{Cu(II)}$  por si sólo tiene la propiedad de dismutar este anión), de manera que toda la actividad SOD medida corresponda al complejo estudiado. En efecto, el EDTA es un ligando multidentado capaz de ocupar todas las posiciones de coordinación del  $\text{Cu(II)}$  [23]. De esta manera al no existir posiciones disponibles, el anión superóxido no tiene posibilidades de interactuar con el centro metálico. El agregado de albúmina en el sistema de reacción tiene la finalidad de crear un medio semejante al plasma.

Los resultados obtenidos para los distintos complejos estudiados se comparan también con los obtenidos para la enzima SOD nativa, de eritrocitos de bovinos, ensayada en las mismas condiciones experimentales.

Todas las drogas usadas para estos ensayos fueron provistas por Sigma.

## 1.4. Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de inhibición en la reducción del NBT a distintas concentraciones para todos los complejos estudiados. El 100 % de actividad  $O_2^-$  corresponde al ensayo realizado en ausencia de complejo. En el caso de los compuestos de Fe(II) y Mn(II) se trabajó solamente hasta concentraciones del orden de  $9 \times 10^{-5}$  M, por que a concentraciones mayores estos metales se hidrolizan, haciendo imposible la determinación experimental de la actividad SOD.

Para determinar la concentración de complejo requerida para producir el 50 % de inhibición de la reacción ( $IC_{50}$ ), se graficó el porcentaje de inhibición en función del logaritmo de la concentración del metal tal como se muestra en la Fig. 3 para el caso del complejo de cobre (II). Los valores obtenidos están resumidos en la Tabla 2 en la cual también se incluye el  $IC_{50} = 1,02 \times 10^{-8}$  M de la enzima nativa y las relaciones entre los  $IC_{50}$  de M(II)-complejo y Cu(II)-SOD.

Como se mencionó, los datos experimentales para los complejos de hierro y manganeso cubren un rango de concentraciones más limitados que para los otros complejos, por lo tanto la extrapolación de  $IC_{50}$  de los gráficos correspondientes está sujeto a cierta incertidumbre.

Un aspecto interesante que se observa en los datos presentados en la Tabla 1 y es claro también en la Fig. 3 es el hecho de que hay una saturación del centro metálico por el sustrato cuando se aumenta la concentración de complejo.

Por otra parte, los datos de la Tabla 2 muestran claramente que el complejo Cu(II)-sacarinato es la especie con más alta actividad SOD. Esta actividad es prácticamente el doble que las encontradas para los respectivos sacarinos de Ni(II), Co(II) y Zn(II) y mucho más alta que las obtenidas para los de Fe(II) y Mn(II).

Estos resultados son interesantes por que muestran nuevamente que el Cu (II), posee una capacidad intrínseca para catalizar la dismutación del anión superóxido.

**Tabla 1.** Resultados de los ensayos de actividad SOD para los diferentes complejos  
 $[M^I(Sac)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$

<b>M(II)</b>	<b>Concentración (M)</b>	<b>% de Inhibición</b>
<b>Mn</b>	$7,00 \times 10^{-7}$	6,80
	$7,10 \times 10^{-6}$	13,44
	$7,14 \times 10^{-5}$	24,90
	$8,92 \times 10^{-5}$	49,04
<b>Fe</b>	$7,00 \times 10^{-7}$	10,75
	$7,10 \times 10^{-6}$	14,16
	$2,32 \times 10^{-5}$	35,93
	$3,21 \times 10^{-5}$	41,96
<b>Co</b>	$3,39 \times 10^{-5}$	42,50
	$7,00 \times 10^{-7}$	11,52
	$7,10 \times 10^{-6}$	14,16
	$7,14 \times 10^{-5}$	36,08
<b>Ni</b>	$1,25 \times 10^{-4}$	87,78
	$1,79 \times 10^{-4}$	91,90
	$3,57 \times 10^{-4}$	93,69
	$7,14 \times 10^{-4}$	94,26
<b>Cu</b>	$7,00 \times 10^{-7}$	14,30
	$7,10 \times 10^{-6}$	18,79
	$7,14 \times 10^{-5}$	43,40
	$1,25 \times 10^{-4}$	72,14
<b>Zn</b>	$1,79 \times 10^{-4}$	90,11
	$3,57 \times 10^{-4}$	91,00
	$7,14 \times 10^{-4}$	91,54
	$7,00 \times 10^{-7}$	10,90
<b>Cu</b>	$7,10 \times 10^{-6}$	19,21
	$3,16 \times 10^{-5}$	78,10
	$7,14 \times 10^{-5}$	94,08
	$1,07 \times 10^{-4}$	97,32
<b>Zn</b>	$1,79 \times 10^{-4}$	97,98
	$3,57 \times 10^{-4}$	98,41
	$7,14 \times 10^{-4}$	98,55
	$7,00 \times 10^{-7}$	7,21
<b>Zn</b>	$7,10 \times 10^{-6}$	17,96
	$7,14 \times 10^{-5}$	35,56
	$1,07 \times 10^{-4}$	66,39
	$1,79 \times 10^{-4}$	94,42
<b>Zn</b>	$3,57 \times 10^{-4}$	97,26
	$7,14 \times 10^{-4}$	97,84

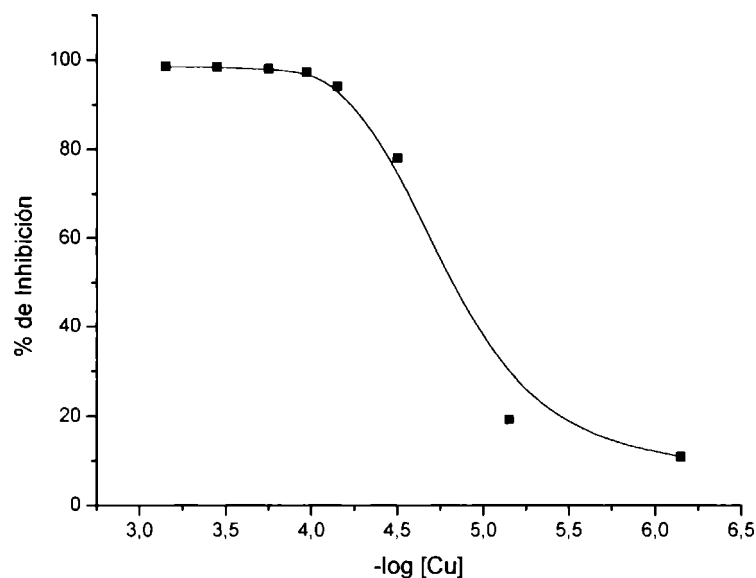


Figura 3. Representación gráfica del porcentaje de inhibición en la reducción del NBT vs. el log [Cu(II)].

Tabla 2. Concentración de M(II) requerida para producir el 50 % de Inhibición

M(II)	IC <sub>50</sub>	[M] <sub>complejo</sub> /[Cu] <sub>SOD</sub>
Mn	8,92 x 10 <sup>-5</sup>	8745
Fe	1,01 x 10 <sup>-4</sup>	9902
Co	3,98 x 10 <sup>-5</sup>	3902
Ni	3,16 x 10 <sup>-5</sup>	3098
Cu	1,25 x 10 <sup>-5</sup>	1225
Zn	2,95 x 10 <sup>-5</sup>	2892
Cu/SOD	1,02 x 10 <sup>-8</sup>	-

Debemos remarcar también que en el caso de los sistemas naturales que contienen manganeso o hierro con función SOD, estos metales están presentes en las respectivas metaloenzimas como cationes trivalentes [24]. Como los potenciales redox de las cuplas Cu(II)/Cu(I), Fe(III)/Fe(II), o Mn(III)/Mn(II) están aproximadamente entre aquellos de las cuplas O<sub>2</sub><sup>-</sup>/O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, todos estos sistemas son capaces de producir dismutación de anión superóxido.

Aunque hasta el presente el conocimiento de los aspectos mecanísticos de la dismutación de  $O_2^-$  por iones metálicos y complejos es muy limitado, algunas generalidades son aparentes [25]. En efecto, para que un complejo metálico catalice la dismutación del anión  $O_2^-$  debe cumplir con los siguientes requisitos:

- 1) El ligando o quelante debe permitir al anión superóxido tener acceso directo al ion metálico.
- 2) El ion metálico debe ser capaz tanto de ser oxidado como reducido por el anión superóxido.
- 3) El proceso anterior debe ocurrir a velocidades mayores que la velocidad espontánea de dismutación del anión superóxido.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación de la actividad SOD de los sacarinos metálicos es claro que el argumento establecido por el criterio 2 lo cumple mejor la cupla Cu(II)/Cu(I) que cualquiera de los otros pares redox investigados. Por consiguiente hemos tratado de encontrar un argumento estructural para el complejo de cobre que satisfaga el criterio 1. Indudablemente el cumplimiento de este criterio, influirá de alguna manera en el cumplimiento del criterio 3.

Las diferencias estructurales descritas en párrafos anteriores, efectivamente nos permiten especular que en el caso del complejo de cobre, que es la especie con más alta actividad SOD, las dos uniones Cu-OH<sub>2</sub> más largas podrían facilitar el contacto del anión  $O_2^-$  con el centro metálico al permitir un más fácil desplazamiento del ligando durante la reacción de dismutación.

Por otro lado, todos estos resultados permiten especular que probablemente sólo la interacción con Cu (II) produce una reacción tipo SOD mientras que los demás complejos sólo catalizarían, en cierta medida, la dismutación espontánea del superóxido. Este último aspecto estaría justificado en el hecho de que el complejo de Zn (II) que no tiene posibilidades de actuar como cupla redox, presenta una actividad comparable a los de Co(II) y Ni(II).

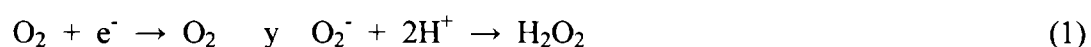
Finalmente, es interesante comentar que también se ha investigado el comportamiento electroquímico de todos estos sacarinos metálicos a efectos de obtener mayor información acerca de sus características redox y correlacionarlos con su posible actividad biológica [26].

Estos estudios se realizaron por medidas de voltametría cíclica, trabajando en soluciones de dimetilformamida y empleando un electrodo de carbón vítreo como

electrodo de trabajo. Tanto la oxidación como la reducción del centro de Cu(II) ocurren en etapas de un electrón y son quasi-reversibles. La transferencia del segundo electrón, durante el proceso de reducción, genera la descomposición del complejo con pérdida de ligando, junto con la electrodeposición de cobre.

Por su parte, el complejo de Zinc (II) no mostró actividad redox en el rango de potencial analizado (+1,3 a -1,9 V) mientras que la reducción de los sacaratos de Co(II), Fe(II) y Ni(II) ocurre a potenciales muy negativos.

Es bien sabido que las hemireacciones:



presentan potenciales normales de -0,45 V y +0,98 V, respectivamente y vale decir que cualquier par redox con un potencial intermedio entre esos dos valores podrá actuar como catalizador para promover actividad SOD [27,28]. El estudio electroquímico que comentamos mostró que sólo los complejos de Cu(II) y Fe(II) cumplen con esa condición [26].

## 1.5. Bibliografía

1. Allen, M.J., Bayland, E., Dukes, C.E., Horningand, E. S. y Watson, J.G., *Brit. J.Cancer* **11**, 212 (1957).
2. Price, J.M. Biava, C.G., Oser, B.L., Vogin, E.E., Steinfield, J. y Ley, H.J., *Science* **167**, 1131 (1970).
3. Bryan, J.T., Ertück y Yoshida, O., *Science* **168**, 1238 (1971).
4. Munro, J.C., Modic, C.A., Krewski, D. y Grise, H.G., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **32**, 513 (1975).
5. Naumov, P. y Jovanovski, G., *Struct. Chem.* **11**, 19 (2000).
6. Cotton, F.A., Falvello, L. R., Schwotzer, W., Murillo, C.A., y Valle Bourret, G., *Inorg. Chim. Acta* **190**, 89 (1991).
7. Cotton, F.A., Lewis, G.E., Murillo, C.A., Schwotzer, W. y Valle, G., *Inorg. Chem.* **23**, 4038 (1984).
8. Jovanovski, G. y Kamenar, B., *Cryst. Struct. Commun.* **11**, 257 (1982).
9. Haider, S.K., Malik, K.M.A., Ahmed, K.J., Hess, H., Rifel, H. y Hursthouse, S.K., *Inorg. Chim. Acta* **72**, 21 (1983).
10. Haider, S.Z., Malik, K.M.A., Das, S. y Hursthouse, M.B., *Acta Crystallogr.* **C40**, 1147 (1984).
11. Cotton, F.A., Falvello, L.R., Murillo, C.A. y Schultz, A.J., *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.* **29**, 31 (1992).
12. Brondino, C.D., Calvo, R. y Baran, E.J., *Chem Phys. Lett.* **271**, 51 (1997).
13. Rocha, A.L., Urretavizcaya, G. y Baran, E.J., *J. Inorg. Biochem.* **31**, 81 (1987).
14. Jubert, A.H., Pis-Diez, R., Etcheverry, S.B. y Baran, E.J., *J. Raman Spectr.* **23**, 15 (1992).
15. Baran, E.J., Williams, P.A.M., Saez Puche, R. y Soria, J., *Polyhedron*, **9**, 1383 (1990).
16. Jovanovski, G. y Soptrajanov, B., *J. Mol. Struct.* **174**, 467 (1988).
17. Jovanovski, G., Tanceva, S. y Soptrajanov, B., *Spectr. Lett.* **28**, 1095 (1995).
18. Icbudak, H., Yilmaz, V.T. y Olmez, H., *J. Thermal Anal.* **53**, 843 (1998).
19. Haider, S.K., Malik, K.M.A. y Ahmed, K.J., *J. Bangladesh Acad. Sci.* **5**, 81 (1951).
20. Beauchamp, C. y Fridovich, I., *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).

21. Imanari, T., Hirota, M., Miyazaki, M., Hayakawa, K. y Tamura, Z. *Igaku-No-Ayumi*. **101**, 496 (1977).
22. Iwamoto, Y. y Mifuchi, J., *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 237 (1982).
23. Bhat, T.R. y Krishnamurthy, M., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **25**, 1147 (1963).
24. Fraústo da Silva J.J.R. y Williams, R.J.P., "*The Biological Chemistry of the Elements*", Clarendon Press, Oxford (1991).
25. Fee, J.E., en H. Sigel (Editor), *Metal Ions in Biological Systems* vol 13, 11, M. Dekker, New York (1981).
26. Parajón-Costa, B.S. y Baran, E.J., *Monatsh. Chem.* **126**, 673 (1995).
27. Occhiali, E.J., "*Bioinorganic Chemistry*". Allyn R. Bacon, Boston, (1977).
28. Lian, Z., Lin, W., Jiang, J., Shi, J. y Lin, Ch., *J. Inorg. Biochem.* **55**, 165 (1994).



# *Capítulo 2*

---

*Evaluación de la  
Actividad Superóxido Dismutasa  
en Complejos de Cobre (II) con  
Aminoácidos*

---

## 2.1. Introducción

Se sabe desde hace mucho tiempo, que numerosos complejos de cobre con distintos ligandos, entre ellos los aminoácidos, poseen una efectiva actividad antirreumática y antiinflamatoria [1-3]. Por otra parte, también se ha demostrado, que algunos de estos complejos poseen una potente actividad SOD [1-3]. Varios investigadores, sugirieron que el anión superóxido y los radicales libres relacionados a él, pueden contribuir significativamente a la inflamación crónica al promover la degradación de los tejidos conectivos [4,5]. Un posible modo de acción de los complejos de cobre usados como drogas con actividad farmacológica, sería su actividad de una superóxido dismutasa que destruye radicales superóxido extracelulares [5].

Como parte de un proyecto de investigación que se está llevando a cabo conjuntamente en el CEQUINOR y en la Facultad de Química de la Universidad de la República (Montevideo) destinado a la síntesis y caracterización de compuestos de cobre con actividad farmacológica, hemos preparado una serie de complejos de Cu(II) con aminoácidos, a efectos de analizar sus propiedades fisicoquímicas generales [6-11] y algunos aspectos de su comportamiento biológico. En este capítulo de la Tesis, hemos analizado la actividad SOD de varios de estos complejos.

Recordemos que un aminoácido es, como su nombre lo indica, un compuesto que contiene a la vez un grupo amino y un grupo ácido. Desde el punto de vista biológico, los únicos aminoácidos importante son los llamados  $\alpha$ -aminoácidos de configuración L. Es decir, son aminoácidos en los que el grupo  $\text{NH}_2$  está unido al carbono vecino al grupo carboxilo y además son especies L desde el punto de vista de su configuración absoluta.

Los complejos estudiados tienen una fórmula general del tipo  $\text{Cu}(\text{aa})_2$  o  $\text{Cu}(\text{aa})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , donde aa es un aminoácido que contiene un residuo (R) hidrofóbico: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile), o bien un residuo hidroxílico tal como: tirosina (Tyr), treonina (Thr), o serina (Ser), cuyas fórmulas están detalladas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Fórmulas de los distintos aminoácidos usados como ligandos

NH <sub>2</sub> -CHR-COOH	
Glicina (Gly)	R= H-
Alanina (Ala)	R= CH <sub>3</sub> -
Valina (Val)	R= (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-
Isoleucina (Ile)	R= C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -CH-CH <sub>3</sub> -
Serina (Ser)	R = HOCH <sub>2</sub> -
Tirosina (Tyr)	R = HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - CH <sub>2</sub> -
Treonina (Thr)	R = HOCH(CH <sub>3</sub> )-

## 2.2. Características Estructurales

Las características estructurales de la mayoría de los complejos estudiados son conocidas excepto para el complejo con L-valina. En este último caso, la información espectroscópica sugiere características estructurales similares a las del complejo Cu(Ala)<sub>2</sub> [8]. Toda esta información está sintetizada en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características estructurales de los complejos investigados

<b>Cu(Gly)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	Sistema: ortorómbico, grupo espacial P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , Z = 4. Disposición del aminoácido: cis. Entorno del cobre: aproximadamente octaédrico; CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> O'O'' (O' = átomo de oxígeno proveniente de la molécula de agua; O'' = interacción débil con un oxígeno de un grupo carboxílico adyacente [12].
<b>Cu(Ala)<sub>2</sub></b>	Sistema: monoclinico, grupo espacial P2 <sub>1</sub> , Z = 2. Disposición del aminoácido: trans. Entorno del cobre: aproximadamente octaédrico; CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ' (O' = interacción débil con un oxígeno de un grupo carboxílico vecino [13].
<b>Cu(Ile)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	Sistema: ortorómbico, grupo espacial P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , Z = 4. Disposición del aminoácido: cis. Entorno del cobre: pirámide de base cuadrada; CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> O' (O' = átomo de oxígeno proveniente de la molécula de agua) [14].
<b>Cu(Ser)<sub>2</sub></b>	Sistema: monoclinico, grupo espacial P2 <sub>1</sub> , Z = 2. Disposición del aminoácido: cis. Entorno del cobre: pirámide de base cuadrada; CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . El ligando apical es un oxígeno de un grupo carboxílico de la molécula de serina vecina [15].
<b>Cu(Tyr)<sub>2</sub></b>	Sistema: ortorómbico, grupo espacial P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , Z = 4. Disposición del aminoácido: trans. Entorno del cobre: pirámide de base cuadrada; CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . El ligando apical es un oxígeno de un grupo carboxílico de la molécula de tirosina vecina [16].

## **2.3. Parte Experimental**

### **2.3.1. Síntesis de los complejos**

Los complejos de cobre (II) con los aminoácidos Gly, Ala, Ser y Thr fueron obtenidos a partir de la mezcla de soluciones acuosas de por ej. 0,01 moles del aminoácido (en su forma L) con un exceso de carbonato básico de cobre, calentadas a ebullición por espacio de aproximadamente una hora. El exceso de  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$  fue separado por filtración, y la solución remanente de un intenso color azul fue concentrada sobre un baño de agua. Los complejos se obtuvieron por enfriamiento de la solución concentrada [17].

Los complejos con los aminoácidos Val, Ile, y Tyr fueron preparados disolviendo 0,01 moles del aminoácido correspondiente en 10 mL de una solución 0,1 M de NaOH, al que luego se le agregaron 25 mL de una solución 0,2 M de  $\text{CuSO}_4$  [17]. Estos complejos precipitan casi de inmediato.

Los complejos obtenidos, caracterizados por análisis químico, espectroscopía UV-visible e infrarroja [7-9,11] y estudios termogravimétricos [7], responden a las siguientes estequiometrías:  $\text{Cu(Gly)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu(Ala)}_2$ ,  $\text{Cu(Val)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu(Ser)}_2$ ,  $\text{Cu(Ile)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu(Tyr)}_2$ , y  $\text{Cu(Thr)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

### **2.3.2. Determinación de la actividad superóxido**

La actividad SOD se determinó usando la técnica detallada en el capítulo 1.

## **2.4. Resultados y Discusión**

En la Tabla 3 se presentan los resultados de los ensayos de actividad SOD realizados para los siete complejos, a distintas concentraciones de los mismos. En la misma se pueden apreciar los resultados de los porcentajes de inhibición de la reducción del NBT correspondientes a dichas concentraciones. El 100 % de actividad SOD corresponde al ensayo realizado en ausencia de complejo.

Para determinar la concentración de complejo requerida para producir el 50 % de inhibición de la reacción se graficó el porcentaje de inhibición vs. el logaritmo de la concentración del metal, tal como se muestra, a modo de ejemplo, en las Figuras 1 y 2 para los complejos de glicina y valina respectivamente.

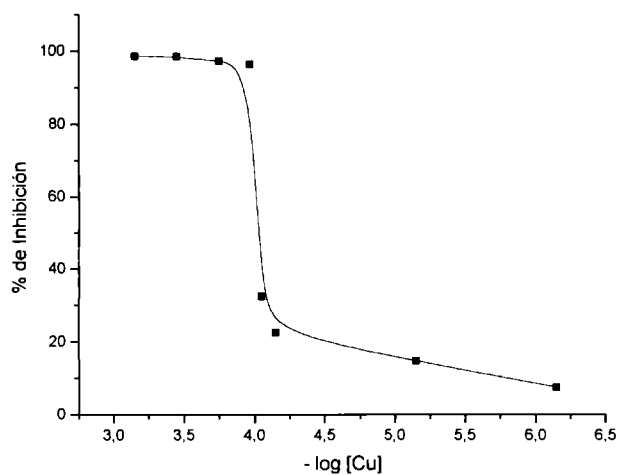
Estos gráficos permiten una simple y rápida determinación del valor de  $IC_{50}$ , los cuales están resumidos en la Tabla 4 en la cual también se incluye la concentración de Cu(II) de la enzima SOD nativa que produce el 50 % de inhibición de la reacción, ( $1,02 \times 10^{-8}$  M), así como también la relación entre las concentraciones ( $[Cu]_{\text{complejo}} / [Cu]_{\text{SOD}}$ ) que causan el 50 % de inhibición.

Todos los complejos estudiados presentan una actividad SOD importante y muy parecida entre ellas. Eso estaría de acuerdo con que prácticamente todos tienen características estructurales similares. Por otra parte a partir de los datos de la Tabla 4 no resultan claros los efectos de los diferentes ligandos sobre la actividad SOD. Esto sugiere la necesidad de investigar un número mayor de compuestos de este tipo, a efectos de alcanzar una mejor comprensión de sus posibles efectos y/o acerca de sus eventuales diferencias de actividad.

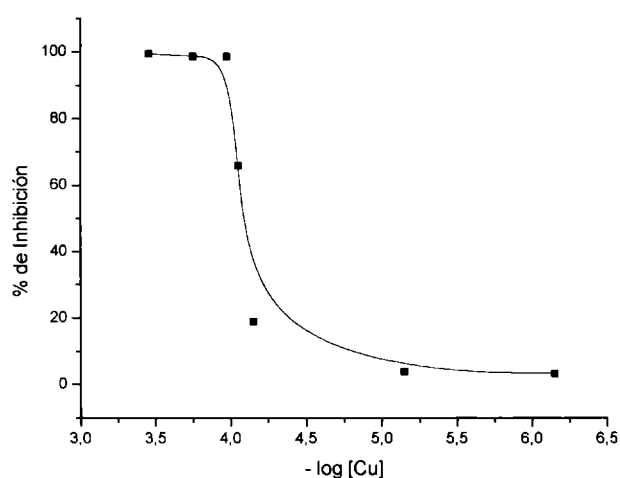
Por otro lado, en la utilización práctica de este tipo de complejos también habría que tener en cuenta otros factores, tales como su lipofilicidad. Algunos ensayos realizados en este sentido [6] mostraron que la lipofilicidad de estos sistemas aumenta aproximadamente con la complejidad del amino ácido empleado como ligando. Y, lo que es más interesante, la lipofilicidad de los complejos de cobre es generalmente muy superior a la de los ligandos libres.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de actividad SOD a diferentes concentraciones de los complejos

Complejo	Concentración (M)	% de Inhibición
<b>Cu(Gly)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	7,00 x 10 <sup>-7</sup>	7,39
	7,10 x 10 <sup>-6</sup>	14,64
	7,14 x 10 <sup>-5</sup>	22,53
	8,92 x 10 <sup>-5</sup>	32,50
	1,07 x 10 <sup>-4</sup>	96,40
	1,79 x 10 <sup>-4</sup>	97,19
	3,57 x 10 <sup>-4</sup>	98,48
<b>Cu(Ala)<sub>2</sub></b>	7,14 x 10 <sup>-4</sup>	98,55
	7,14 x 10 <sup>-7</sup>	5,53
	7,14 x 10 <sup>-6</sup>	14,79
	7,14 x 10 <sup>-5</sup>	26,72
	8,92 x 10 <sup>-5</sup>	98,09
	1,07 x 10 <sup>-4</sup>	98,19
<b>Cu(Val)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	7,14 x 10 <sup>-4</sup>	98,66
	7,00 x 10 <sup>-7</sup>	3,31
	7,10 x 10 <sup>-6</sup>	3,89
	7,14 x 10 <sup>-5</sup>	18,87
	8,92 x 10 <sup>-5</sup>	65,87
	1,07 x 10 <sup>-4</sup>	98,54
<b>Cu(Ile)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	1,79 x 10 <sup>-4</sup>	98,54
	3,57 x 10 <sup>-4</sup>	99,42
	7,00 x 10 <sup>-7</sup>	8,53
	7,10 x 10 <sup>-6</sup>	12,88
	7,14 x 10 <sup>-5</sup>	19,33
	8,92 x 10 <sup>-5</sup>	36,38
<b>Cu(Ser)<sub>2</sub></b>	1,07 x 10 <sup>-4</sup>	97,94
	1,79 x 10 <sup>-4</sup>	98,56
	7,14 x 10 <sup>-4</sup>	99,03
	4,43 x 10 <sup>-7</sup>	3,29
	4,43 x 10 <sup>-6</sup>	6,78
	4,43 x 10 <sup>-5</sup>	8,92
	6,64 x 10 <sup>-5</sup>	28,29
<b>Cu(Tyr)<sub>2</sub></b>	1,11 x 10 <sup>-4</sup>	97,29
	2,21 x 10 <sup>-4</sup>	99,42
	4,43 x 10 <sup>-4</sup>	99,45
	6,67 x 10 <sup>-7</sup>	3,79
	6,67 x 10 <sup>-6</sup>	5,15
	2,67 x 10 <sup>-5</sup>	9,24
	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	20,03
<b>Cu(Thr)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	4,00 x 10 <sup>-5</sup>	55,48
	6,00 x 10 <sup>-5</sup>	88,28
	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	92,05
	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	96,67
	1,67 x 10 <sup>-4</sup>	98,03
	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	98,48
	6,67 x 10 <sup>-7</sup>	3,72
<b>Cu(Thr)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	6,67 x 10 <sup>-6</sup>	8,55
	2,67 x 10 <sup>-5</sup>	18,50
	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	58,55
	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	94,76
	8,00 x 10 <sup>-5</sup>	96,72
	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	98,32
1,67 x 10 <sup>-4</sup>	98,51	



**Figura 1**  
Porcentaje de inhibición en la reducción NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo concentración de Cu(II) para el complejo Cu(Gly)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.



**Figura 2**  
Porcentaje de inhibición en la reducción NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo concentración de Cu(II) para el complejo Cu(Val)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O

**Tabla 4.** Concentraciones requeridas para producir el 50 % de inhibición.

Complejo	IC <sub>50</sub>	[M] <sub>complejo</sub> /[Cu] <sub>SOD</sub>
Cu(Gly) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	3,40 x 10 <sup>-5</sup>	3333
Cu(Ala) <sub>2</sub>	3,23 x 10 <sup>-5</sup>	3166
Cu(Val) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	3,03 x 10 <sup>-5</sup>	2970
Cu(Ile) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	3,31 x 10 <sup>-5</sup>	3245
Cu(Ser) <sub>2</sub>	3,72 x 10 <sup>-5</sup>	3647
Cu(Tyr) <sub>2</sub>	3,55 x 10 <sup>-5</sup>	3479
Cu(Thr) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	3,16 x 10 <sup>-5</sup>	3098
Cu/SOD	1,02 x 10 <sup>-8</sup>	-

## 2.5. Bibliografía

1. Sorenson, J.R.J (Editor), *Inflammatory Diseases and Copper*, Humana Press, Clifton (1982).
2. Sorenson, J.R.J., en H. Sigel (Editor) *Metal Ions in Biological Systems* Vol. 4, 77, M. Dekker, New York (1982).
3. Baran, E.J., *Acta Farm. Bonaerense* **4**, 125 (1985).
4. Halliwell, B., *Cell. Biol. Int. Rep.* **6**, 529 (1982).
5. Roberts, N.A. y Robinson, P.A., *Brit. J. Rheumatol.* **24**, 128 (1985).
6. Tótaró, R.M., Apella, M.C., Torre, M.H., Friet, E., Viera I., Kremer E. y Baran, E.J., *Acta Farm. Bonaerense* **12**, 73 (1993).
7. Cuevas, A., Viera, I., Torre, M. H., Kremer, E. y Baran, E.J. *Afinidad* **55**,183 (1998).
8. Cuevas, A., Viera, I., Torre, M. H., Kremer, E., Etcheverry, S. B. y Baran, E. J., *Acta Farm. Bonaerense* **17**, 213 (1998).
9. Cuevas, A., Viera, I., Torre, M. H., Kremer, E., Etcheverry, S. B. y Baran, E. J., *Afinidad* **51**, 263 (1999).
10. Baran, E.J., Wagner, C.C., Torre, M.H., Kramer, E. y Kögerler, P., *Acta Farm. Bonaerense* **19**, 231 (2000).
11. Torre, M. H., Tesis Doctoral, en redacción.
12. Freeman, H.C., Snow, M.R., Nitta, I. y Tomita, K., *Acta Crystallogr.* **17**, 1463 (1964).
13. Dijkstra, A., *Acta Crystallogr.* **20**, 588 (1996).
14. Weeks, C.M., Cooper, A. y Norton, D.A., *Acta Crystallogr.* **B25**, 443, (1969).
15. Van der Helm, D. y Franks, W.A., *Acta Crystallogr.* **B25**, 451, (1969).
16. Van der Helm, D. y Tatsch, C.E., *Acta Crystallogr.* **B28**, 2307, (1972).
17. Szabó-Plánka, T., *Acta Chim. Hungar.* **120**, 143 (1985).



# *Capítulo 3*

---

*Evaluación de la  
Actividad Superóxido Dismutasa  
de Complejos de Cobre (II) con  
Salicilidén-Derivados de Aminoácidos*

---



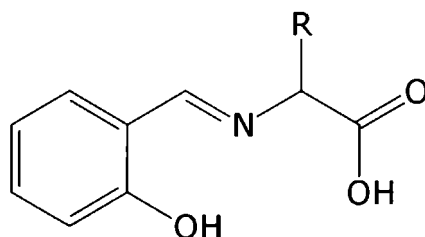
Con respecto a este último tipo de compuestos se conocen algunas estructuras cristalográficas de complejos de Cu(II) con bases de schiff con salicilaldehído y distintos aminoácidos tales como serina [14], glicina [5,15], treonina [16], triptófano [17] y metionina [18], así como también que los mismos exhiben actividad antimicrobial [19], antiinflamatoria [20] y antipirética [21].

El objetivo de este capítulo es estudiar la posible actividad SOD de algunos de estos complejos binarios de salicilidén- aminoácidos, a saber:

- 1) [Cu(Sal-L-Ser)H<sub>2</sub>O].H<sub>2</sub>O
- 2) [Cu(Sal-L-Trp)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]
- 3) [Cu(Sal-L-Met)(H<sub>2</sub>O)]
- 4) [Cu(Sal-L-Gln)H<sub>2</sub>O]

A continuación se detalla la estructura genérica de los distintos salicilidén aminoácidos que actuarán de ligando en los distintos complejos estudiados en este capítulo acompañados de sus correspondiente abreviaturas:

#### Salicilidén-aminoácidos



- 1- Salicilidén –Serinato = Salser (R = -CH<sub>2</sub>OH)
- 2- Salicilidén –Triptofanato = Saltrp (R = -CH<sub>2</sub>-Indol)
- 3- Salicilidén –Metioninato = Salmet (R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>)
- 4- Salicilidén –glutaminato = Salgln (R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>). Tomado de cita [13]

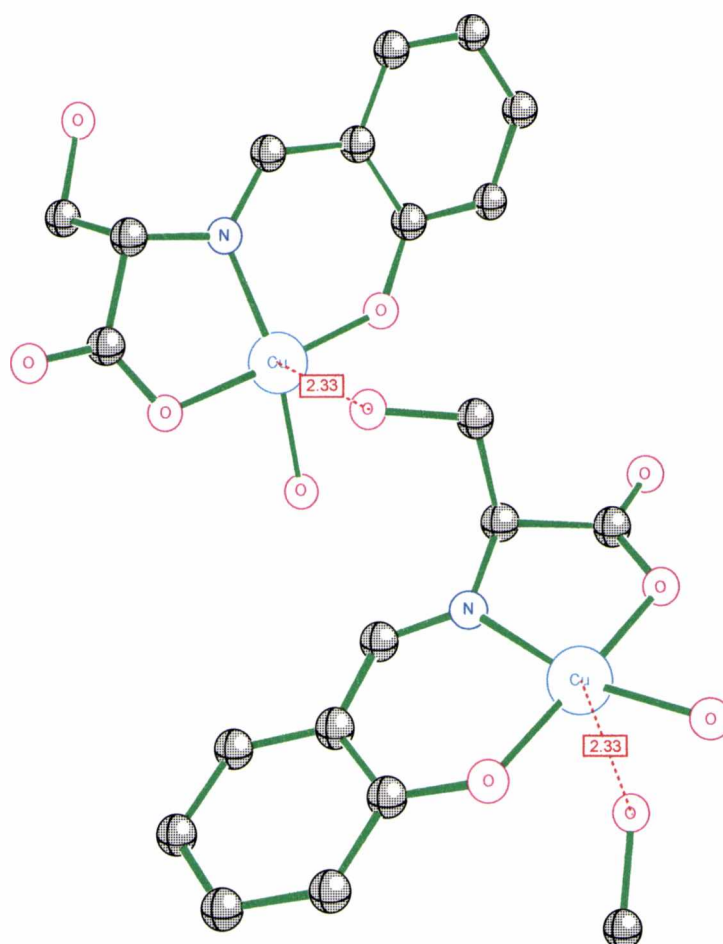
### 3.2. Características Estructurales

Las características estructurales de la mayoría de los complejos estudiados son conocidas excepto para el complejo con L-glutamina. Los tres complejos restantes cristalizan en el sistema ortorrómbico, grupo espacial  $P2_12_12_1$ , con  $Z = 4$ . A continuación haremos una breve descripción de las estructuras que adoptan los mismos.

#### 1) $[\text{Cu}(\text{Sal-L-Ser})\text{H}_2\text{O}]\cdot\text{H}_2\text{O}$

La Fig.2 muestra la estructura molecular del complejo binario N-salicilidén-L-serinatoacuocobre(II). Los estudios de rayos X [14] indican que el mismo posee una geometría de pirámide cuadrada en torno al ion Cu(II) con el grupo salicilidén-L-serinato tridentado y el átomo de oxígeno de una molécula de agua ocupando los vértices de un cuadrado. La esfera de coordinación alrededor del Cu(II) se completa apicalmente por un enlace más débil con el oxígeno del hidroxilo de la cadena lateral de una unidad compleja adyacente.

La estructura cristalina está constituida por cadenas poliméricas en las cuales el grupo  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  de la serina actúa como ligando de otra unidad compleja, dando lugar a cadenas largas dispuestas en zig-zag donde la distancia entre dos iones Cu(II) adyacentes es de 6,48 Å. Asimismo, existe una leve distorsión en el entorno piramidal del cobre indicada por los ángulos de enlace observados, que varían desde 83,6 a 93,6°.



**Figura 2.** Estructura molecular del complejo  $[Cu(Sal-L-Ser)H_2O].H_2O$  Tomado de cita [14]

## 2) $[Cu(Sal-L-Trp)(H_2O)_2]$

La estructura molecular del complejo N-salicilidén-L-triptofanodiacuocobre(II),  $[Cu(Sal-Trp)(H_2O)_2]$ , se muestra en la Fig.3.

Los estudios de rayos X, muestran [17], que la coordinación geométrica alrededor del cobre es una pirámide de base cuadrada con el grupo salicilidén-L-triptofanato tridentado y el átomo de oxígeno de una molécula de agua ( $O_1$ ) ocupando los vértices de un cuadrado. La esfera de coordinación alrededor del Cu(II) se completa con una unión axial con el oxígeno de la otra molécula de agua ( $O_2$ ), la cual se encuentra ubicada del mismo lado del anillo de indol, con una distancia Cu- $O_2$  igual a 2,25 Å.

Al igual que en el caso del complejo con serina también se observa una leve distorsión en el entorno piramidal del cobre indicada por los ángulos de enlace observados que varían desde 84,5 a 96,9°.

Aunque la mayoría de las estructuras de complejos de bases de Schiff derivados del salicilaldehído y aminoácidos consiste en unidades complejas diméricas [16,22,23] o bien cadenas poliméricas [18,24,25], la estructura cristalina de este complejo revela la existencia de unidades monoméricas las cuales forman una red a través de uniones hidrógenos.

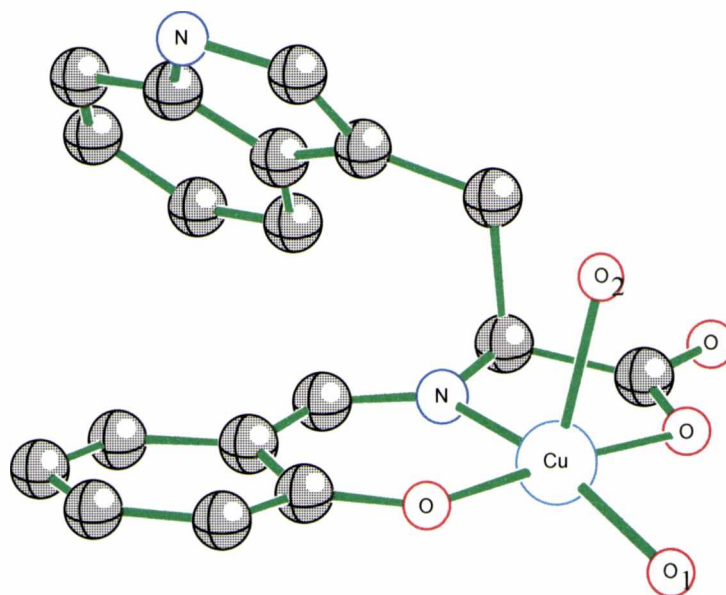


Figura 3. Estructura molecular del complejo  $[Cu(Sal-L-Trp)(H_2O)_2]$ . Tomado de cita [17]

### 3) $[Cu(Sal-L-Met)(H_2O)]$

La estructura molecular del complejo N-salicilidén-L-metioninatodiacuocobre(II),  $[Cu(Sal-L-Met)(H_2O)_2]$ , se muestra en la Fig.4.

La unidad dimérica asimétrica consiste en dos átomos de cobre y dos grupos N-Salicilidén-L-metioninato (SALMET) [18]. Cada átomo de cobre está directamente unido a un grupo SALMET y a su vez están unidos entre si a través de un átomo de oxígeno carboxílico O1'. El primero de los dos átomos de cobre, Cu(1), tiene una geometría de coordinación (4+2) de un octaedro tetragonalmente elongado.

El átomo de Cu (1) está unido al O(1), O(3) y N(1) del grupo SALMET y a un átomo de oxígeno, O(W) de una molécula de agua. La esfera de coordinación alrededor del cobre se completa con la unión a dos átomos de oxígeno carboxílicos, uno de los cuales

O(2), pertenece a una unidad dimérica asimétrica adyacente, mientras que el otro átomo de oxígeno carboxílico O(1') pertenece al grupo SALMET que está directamente unido al segundo átomo de cobre.

El segundo átomo de Cobre, Cu(1'), en la unidad asimétrica, tiene una geometría de coordinación (4+1) de una pirámide cuadrada tetragonalmente elongada. Tres de los sitios de coordinación están ocupados por el ligando tridentado SALMET, uno de los cuales corresponde al átomo de oxígeno carboxílico, O(1'), anteriormente mencionado. De esta manera resulta que el átomo de oxígeno O(1') está coordinado a los dos átomos de cobre de la unidad asimétrica, dando como resultado que los dos grupos SALMET permanecen unidos a través del puente Cu(1)—O(1')---Cu(1'). La esfera de coordinación alrededor del segundo átomo de cobre, se completa con la unión a dos átomos de oxígeno carboxílico, que pertenecen a un grupo SALMET de una unidad asimétrica adyacente.

La estructura cristalina está constituida por unidades discretas poliméricas que están unidas entre sí a través de unidades asimétricas adyacentes, tal como se describió.

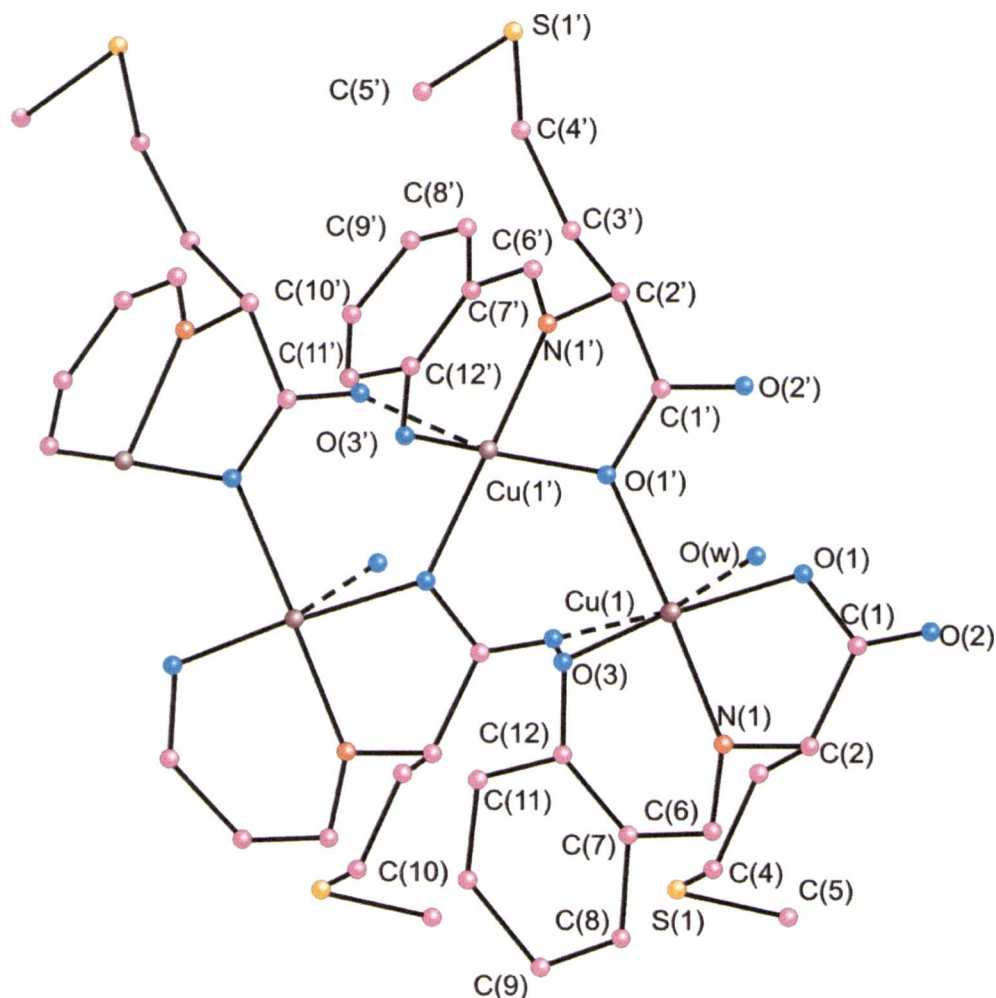


Figura 4. Estructura molecular del complejo [Cu(Sal-L-Met)(H<sub>2</sub>O)]. Tomado de cita [18]

### **3.3. Parte Experimental**

#### **3.3.1. Síntesis de los complejos**

Estos complejos fueron sintetizados y caracterizados espectroscópicamente y estructuralmente por el grupo de trabajo del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares en el marco del proyecto “Complejos de Metales de Transición con moléculas que presenta actividad Biológica y/o Farmacológica”, siguiendo la técnica descrita en la bibliografía, que se indica a continuación.

- 1)  $[\text{Cu}(\text{Sal-L-Ser})\text{H}_2\text{O}]\cdot\text{H}_2\text{O}$  [14]
- 2)  $[\text{Cu}(\text{Sal-L-Trp})(\text{H}_2\text{O})_2]$  [17]
- 3)  $[\text{Cu}(\text{Sal-L-Met})(\text{H}_2\text{O})]$  [18]
- 4)  $[\text{Cu}(\text{Sal-L-Gln})\text{H}_2\text{O}]$  [26].

#### **3.3.2. Determinación de la actividad superóxido**

La actividad SOD se determinó usando la técnica detallada en el capítulo 1

### **3.4. Resultados y Discusión**

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los ensayos de actividad SOD realizados a distintas concentraciones de los cuatro complejos estudiados. En la misma se pueden apreciar los resultados de los porcentajes de inhibición de la reducción del NBT correspondientes a dichas concentraciones. El 100 % de actividad SOD corresponde al ensayo realizado en ausencia de complejo.

Para determinar la concentración de complejo requerida para producir el 50 % de inhibición de la reacción ( $\text{IC}_{50}$ ) se graficó el porcentaje de inhibición vs. el logaritmo de la concentración del metal, tal como se muestra, a modo de ejemplo, en las Figs. 5 y 6 para los complejos de serina y triptofano respectivamente.

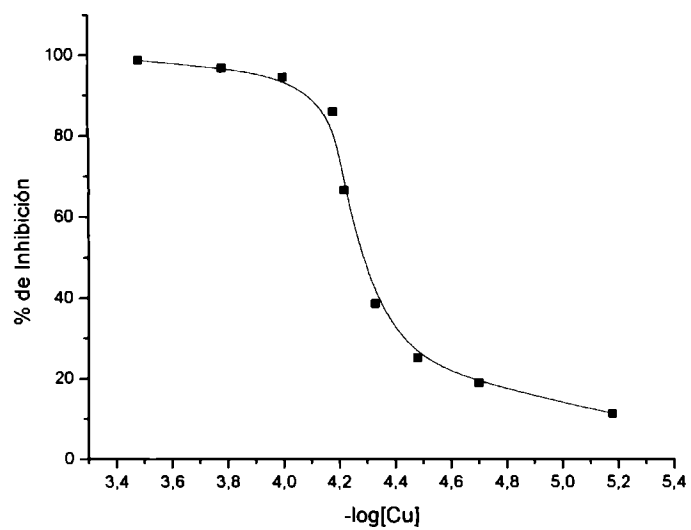
Estos gráficos permiten una simple y rápida determinación del valor de  $\text{IC}_{50}$ , los cuales están resumidos en la Tabla 2 en la cual también se incluye la concentración de



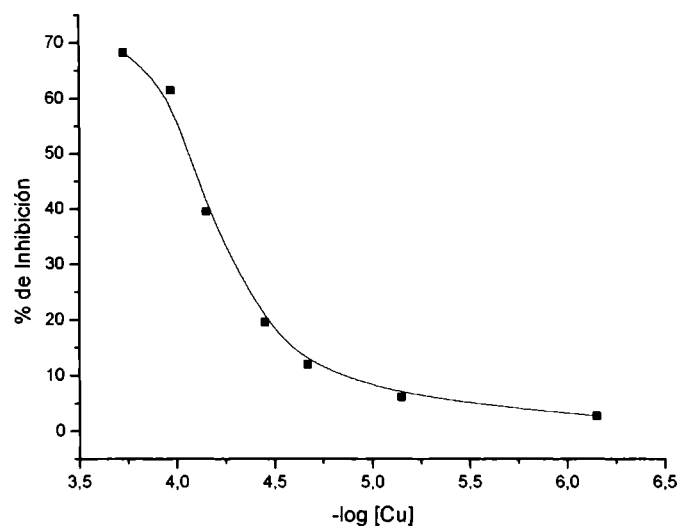
Cu(II) de la enzima SOD nativa que produce el 50 % de inhibición de la reacción, ( $1,02 \times 10^{-8}$  M), así como también la relación entre las concentraciones ( $[Cu]_{\text{complejo}} / [Cu]_{\text{SOD}}$ ) que causan el 50 % de inhibición.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de actividad SOD para los diferentes complejos

Complejo	Concentración (M)	% de Inhibición
<b>[Cu(Sal-L-Ser)H<sub>2</sub>O].H<sub>2</sub>O</b>	$6,67 \times 10^{-6}$	11,25
	$2,00 \times 10^{-5}$	22,81
	$3,33 \times 10^{-5}$	25,11
	$4,67 \times 10^{-5}$	38,57
	$6,00 \times 10^{-5}$	66,58
	$6,67 \times 10^{-5}$	85,95
	$1,00 \times 10^{-4}$	94,50
	$5,00 \times 10^{-4}$	96,70
<b>[Cu(Sal-L-Trp)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]</b>	$7,14 \times 10^{-7}$	2,76
	$7,14 \times 10^{-6}$	13,19
	$2,14 \times 10^{-5}$	17,02
	$3,57 \times 10^{-5}$	19,57
	$7,14 \times 10^{-5}$	39,57
	$1,07 \times 10^{-4}$	61,49
	$1,85 \times 10^{-4}$	68,30
<b>[Cu(Sal-L-Met)(H<sub>2</sub>O)]</b>	$7,14 \times 10^{-7}$	9,49
	$7,14 \times 10^{-6}$	11,86
	$1,79 \times 10^{-5}$	16,32
	$7,14 \times 10^{-5}$	30,83
	$1,07 \times 10^{-4}$	68,18
	$1,79 \times 10^{-4}$	90,12
<b>[Cu(Sal-L-Gln)H<sub>2</sub>O]</b>	$6,67 \times 10^{-7}$	7,03
	$2,00 \times 10^{-5}$	14,00
	$3,33 \times 10^{-5}$	20,87
	$4,67 \times 10^{-5}$	32,75
	$6,00 \times 10^{-5}$	47,50
	$6,67 \times 10^{-5}$	65,25
	$1,00 \times 10^{-4}$	84,88
	$1,67 \times 10^{-4}$	91,28



**Figura 5.** Porcentaje de inhibición en la reducción del NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo  $[Cu(Sal-L-Ser)H_2O].H_2O$



**Figura 6.** Porcentaje de inhibición en la reducción del NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo  $[Cu(Sal-L-Trp)(H_2O)_2]$

**Tabla 2.** Concentraciones requeridas para producir el 50 % de inhibición

<b>Complejo</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>[M]<sub>complejo</sub>/[Cu]<sub>SOD</sub></b>
[Cu(Sal-L-Ser)H <sub>2</sub> O].H <sub>2</sub> O	4,81 x 10 <sup>-5</sup>	5118
[Cu(Sal-Trp)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	7,02 x 10 <sup>-5</sup>	6879
[Cu(Sal-L-Met)(H <sub>2</sub> O)]	5,46 x 10 <sup>-5</sup>	5353
[Cu(Sal-L-Gln)H <sub>2</sub> O]	6,70 x 10 <sup>-5</sup>	6569
<b>Cu-SOD</b>	1,02 x 10 <sup>-8</sup>	-

Como puede observarse de los resultados presentados en la Tabla 2, todos estos complejos muestran una actividad SOD relativamente pequeña y bastante menor que la que se determinó en los complejos de Cu(II) con aminoácidos (ver Tabla 4, del capítulo precedente).

Esta menor reactividad seguramente se deriva de las peculiaridades estructurales de todos los complejos analizados en este capítulo y sugieren que en ellos el centro metálico está menos disponible para interactuar con el sustrato.

### 3.5. Bibliografía

1. Longenecker, J. B. y Snell, E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 142 (1956).
2. Snell, E. E., Fasella, P. M., Braunstein, A., y Ross-Fanelli, A., en McMollan (Editor), *Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, New York (1963).
3. Snell, E. E., Braunstein, A., Severin, E. S. y Torchinsky, V.M., *Pyridoxal Catalysis: Enzymes and Model Systems*. Wiley, New York (1968).
4. Doctor, V. M. y Oro, J., *Biochem. J.* **112**, 691, (1969).
5. Bkouche-Waksman, I., Barbe, J. M., y Kwick, A., *Acta Crystallogr.* **B44**, 595 (1988).
6. Krätšmar-Smogrovic, J., Blahová, M. y Kettmann, V., *Chirality* **3**, 503 (1991).
7. Casella, L. y Gullotti, M., *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 803 (1983).
8. Weinstein, G. N., O'Connor, M. J. y Holm, R. H., *Inorg. Chem.* **9**, 9 (1970).
9. Casella, L. y Gullotti, M., *J. Am. Chem. Soc.* **25**, 1294 (1986).
10. Heinert, D. y Martell, A. E., *Tetrahedron* **3**, 49 (1958).
11. Heinert, D. y Martell, A. E., *Org. Biolog. Chem.* **84**, 3257 (1962).
12. Koh, L. L., Ranford, J. O., Robinson, W., Svensson, J. O., Choo Tan, A. L. y Daping, W., *Inorg. Chem.* **35**, 6466 (1996).
13. López Zafra, A, *Tesis doctoral*, (2001).
14. García-Raso, A., Fiol, J. J., López-Zafra, A., Cabrero, A., Mata, I. Y Molins, E., *Polyhedron* **18**, 871 (1999).
15. a) Ueki, T., Ashida, T., Sasada, V. y Kakudo, K., *Acta Crystallogr.* **B25**, 328 (1969). b) Ueki, T., Ashida, T., Sasada, V. y Kakudo, K., *Acta Crystallogr.* **22**, 870 (1967).
16. Koronen, K., Hämäläinen, R. y Turpeinen, U., *Acta Chem. Scand.* **B37**, 829 (1981).
17. García-Raso, A., Fiol, J. J., Bádenas, F. y Quirós, M., *Polyhedron* **15**, 4407 (1996).
18. Palacios, M. S., Medina, E., Manrique, F. G., Gambardella, M. T. do P., Santos, R. H. de A., Rodriguez, M. L. y Dance, J. M., *Polyhedron* **8**, 2131 (1989).
19. a) Plesch, G., Friebel, C., Svajlenova, O., Krätšmar-Smogrovic, J. y Mlynarcik, *Inorg. Chim. Acta* **151**, 139 (1988); b) Blahová, M., Sokolik, J., Sedláčková, S., Burianová, E. y Mlynarcik, D., *Ceskoslovenská Farmacie*, **XLII**, 137 (1993).

20. a) Sykora, J., Sokolik, J., Tumová, I., Svec, P. y Krätsmar-Smogrovic, J., *Pharm. Obzor*, **LXII**, 349 (1993); b) Sorenson, J. R. J. en Sigel, H (Editor), *Metal Ions in Biological Systems*. Vol 14, 4. Marcel Dekker, New York, (1982).
21. Sykora, J., Tumová, I., Sokolik, J., Svec, P. y Krätsmar-Smogrovic, J., *J. Pharm. Obzor*, **LXII**, 301 (1993).
22. Werner, P.E., Valent, A., Adelskold, V. y Svajlenová, O., *Acta Chem. Scand.* **A37**, 51 (1983).
23. Koronen, K., Hämäläinen, R., *Acta Chem. Scand.* **A33**, 569 (1979).
24. Hämäläinen, R., Ahlgrén, M., Turpeinen, U. y Rantala, M., *Acta Chem. Scand.* **A32**, 235 (1978).
25. Koronen, K., Hämäläinen, R. y Turpeinen, U., *Acta Chem. Scand.* **C40**, 1175 (1984).
26. López Zafra, A., comunicación personal (datos no publicados).

# *Capítulo 4*

---

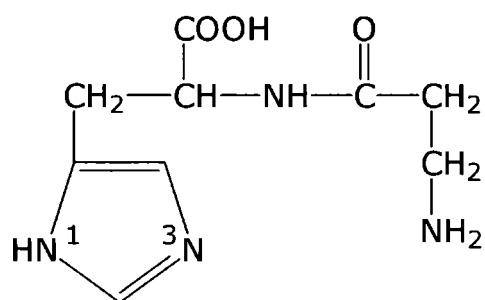
*Evaluación de la  
Actividad Superóxido Dismutasa  
del Complejo de Cobre (II) con  
Carnosina*

---

## 4.1. Introducción

Después de haber investigado la actividad SOD de complejos de Cu(II) con aminoácidos, pareció útil estudiar también esa actividad en algunos complejos que ese metal forma con péptidos. Y, en este contexto pareció interesante utilizar el complejo que el cobre (II) forma con la carnosina (el dipéptido  $\beta$ -alanil-L-histidina, Fig. 1).

Esta molécula, descubierta hace exactamente 100 años [1], se encuentra abundantemente distribuida en los músculos esqueléticos y en algunas regiones del cerebro. Sus posibles funciones han sido largamente discutidas, habiéndose finalmente determinado que cumple una importante función como buffer biológico y además parece poseer un efectivo poder protector de los sistemas celulares frente a situaciones de estrés oxidativo [2].



*Figura 1. Estructura de la carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina)*

Como lo muestra la Fig. 1, la carnosina ofrece también interesantes posibilidades de interacción con cationes metálicos a través del grupo carboxilato, el grupo amino y el nitrógeno imidazólico. Asimismo, en ciertas condiciones también resulta posible desprotonar el grupo amido [3]. La carnosina aparece también como una importante fuente de  $\beta$ -alanina [2] y, por lo tanto, su hidrólisis tiene una gran importancia metabólica [2,3]. En el organismo humano esa hidrólisis es catalizada por la enzima carnosinasa [3], una metaloproteína dependiente de zinc, la que además resulta estabilizada por otros cationes metálicos divalentes y, por otra parte, su actividad también se mantiene cuando el Zn (II) se reemplaza por otros cationes [3-6].

Entre sus complejos metálicos, el de cobre (II) ha sido investigado ampliamente, seguramente por la facilidad con la que puede obtenerse información sobre el mismo a través de las técnicas de resonancia de espín electrónico [3]. Por otra parte, el interés en relación al complejo de zinc (II) se ha intensificado recientemente, debido a su interesante y muy amplia actividad farmacológica [3,7].

Los estudios sobre el complejo de cobre abarcan aspectos muy variados y han permitido obtener un panorama muy completo sobre sus características generales [3,8-14]. La mayoría de los estudios más viejos fueron realizados en solución y en 1967 Freeman y Szymanski lograron determinar la estructura del complejo cristalino lo que, inesperadamente mostró la presencia de un sistema dimérico [9]. A efectos de complementar y ampliar los estudios previos pareció interesante encarar una serie de estudios sistemáticos en torno al complejo sólido, incluyendo el de su posible actividad SOD.

## ***4.2. Síntesis del Complejo***

Este complejo fue obtenido al mezclar cantidades equimoleculares de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  (Merck) y carnosina (Sigma) en agua. La solución resultante se calienta suavemente y se ajusta el pH a 8 con una solución diluida de KOH. Los cristales, de color azul profundo, se separan por filtración y se lavan con agua fría y éter etílico frío y finalmente se secan al vacío durante dos días [14]. La composición del complejo fue confirmada por análisis elemental y contenido de cobre.

## ***4.3. Propiedades Estructurales y Espectroscópicas***

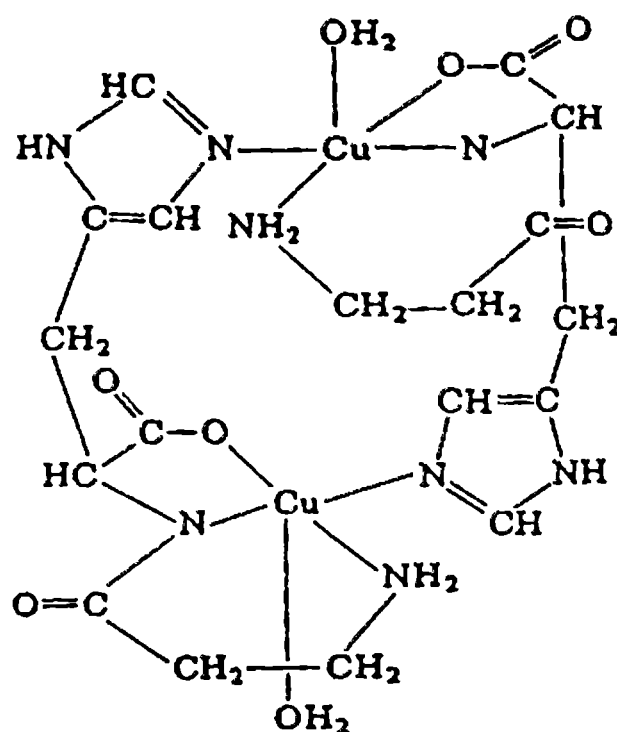
### ***4.3.1. Características Estructurales***

El complejo dihidratado de  $\beta$ -alanil-L-histidinato de cobre (II), cuya estructura se muestra en la Fig. 2, pertenece al grupo espacial trigonal  $P3_12$  con  $Z=6$ . El complejo es un dímero en el cual cada ion  $\text{Cu}(\text{II})$  presenta un número de coordinación 5 y está unido a un nitrógeno del grupo amino terminal, a un nitrógeno peptídico, a un oxígeno del grupo



carboxilato de una molécula de carnosina y al N(3) del anillo de imidazol de la segunda molécula de carnosina del dímero.

Resulta así una estructura en donde cada molécula de carnosina está unida a dos centros diferentes de cobre. El quinto ligando de cada ión cobre es una molécula de agua [9], generando alrededor del cobre un entorno piramidal cuadrado. El dímero muestra una unión hidrógeno que involucra a la segunda molécula de agua por fórmula [9].

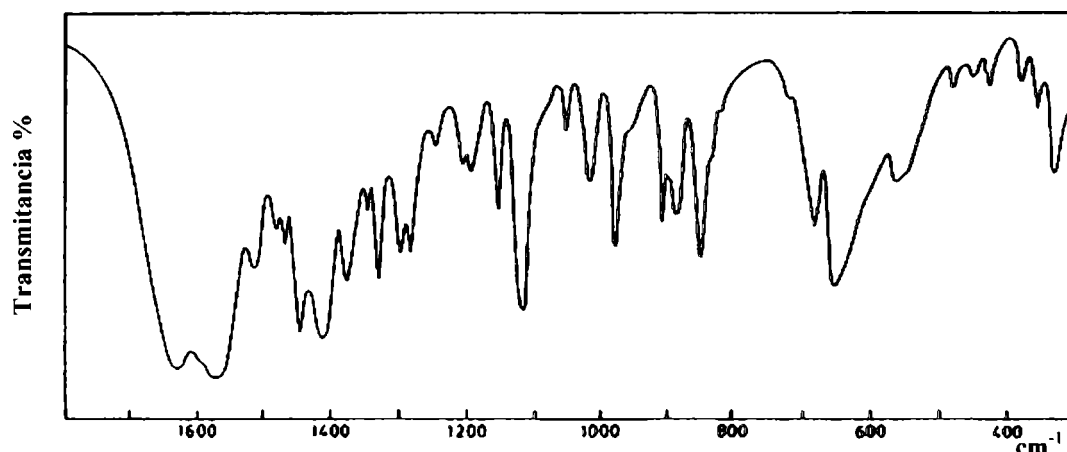


**Figura 2.** Estructura esquemática del complejo dihidratado de  $\beta$ -alanil-L-histidinato de cobre (II). Tomado de cita [9]

## 4.3.2. Características Espectroscópicas

### 4.3.2.1. Espectro Infrarrojo

La Fig. 3 muestra el espectro IR del complejo en la región comprendida entre 1800 y 250  $\text{cm}^{-1}$ . Por comparación con el espectro de la carnosina libre, fue posible proponer las asignaciones para las vibraciones más importantes, por ej., para aquellos grupos involucrados directamente en la coordinación. Las asignaciones se muestran en la Tabla 1 y a continuación serán brevemente discutidas.



**Figura 3.** Espectro IR del complejo de Cu(II)/Carnosina en la región entre 1800 y 300  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Asignaciones de las vibraciones características de la carnosina y su complejo de Cu(II). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

Carnosina	Cu(II)-complejo	Asignación
3238 m	—	$\nu(\text{N-H})$ amida
1646 mf	1619 mf	$\nu(\text{C=O})$ amida I
1590 f	—	$\delta(\text{NH}_3)$
1568 mf	1565 mf	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1405 mf	1402 mf	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$
1514 m	—	$\delta(\text{N-H})$ amida II
1163 f	1140 f	$\delta(\text{NH})$ imidazol
1279 h	1288 f	$\nu$ (anillo) imidazol
/1272 mf	/1273 f	$\nu$ (anillo) imidazol
1093 f	1109 mf	$\nu(\text{C-N})$ (ver texto)
933 f	/1102 mf	$\nu$ (anillo) imidazol
626 mf	943 h	$\delta(\text{COO}^-)$
	653 f	

En la región de alta frecuencia, resulta muy difícil diferenciar entre las vibraciones C-H y N-H, no obstante la frecuencia del estiramiento N-H de la unión peptídica puede ser claramente identificada como una banda de intensidad media en el ligando libre, la cual está ausente en el complejo, lo que está de acuerdo con la participación de este átomo de nitrógeno deprotonado en la formación del complejo.

El comportamiento de las frecuencias de estiramiento de los grupos carboxilatos resulta también muy interesante. Como se puede ver en la Tabla 1 estas bandas permanecen prácticamente sin cambios después de que se ha formado el complejo. Un

comportamiento similar fue encontrado en varios complejos de Cu(II) con aminoácidos y péptidos pequeños [9,15-16], lo cual probablemente sugiera un cierto grado de carácter iónico del enlace Cu-O. Por otra parte, la participación de los grupos carboxilato en la coordinación se hace también evidente en el desplazamiento del modo  $\delta(\text{COO}^-)$  hacia valores mayores de frecuencia después de la coordinación.

En cuanto a la banda amida I, un importante desplazamiento hacia valores de menores frecuencias se observa en el complejo, a pesar de que este grupo carbonilo no está directamente involucrado en la coordinación. Esto está de acuerdo con lo explicado por Freeman y Szymanski [9], quienes observaron que los grupos peptídicos cuyos átomos de N están involucrados en uniones metálicas tienen una longitud de enlace C=O más larga y la C-N más corta que en los péptidos libres.

La participación del grupo amina primaria en la coordinación también está soportado por la ausencia de la típica banda correspondiente al modo  $\delta(\text{NH}_3)$  en el complejo y en el desplazamiento hacia frecuencias más altas del modo de estiramiento (C-N) de la unión  $-\text{H}_2\text{C}-\text{NH}_2$ .

Si bien resulta muy difícil establecer una correlación entre las bandas del anillo de imidazol y el entorno de este grupo en la coordinación, se ha encontrado a las vibraciones características del anillo localizadas a  $933 \text{ cm}^{-1}$ , y tal como era de esperar [17], ligeramente desplazada hacia número de ondas más altos después de la coordinación y con una intensidad mucho más baja. Algunas otras vibraciones del anillo también se encuentran desplazadas hacia mayores frecuencias después de la formación del complejo, tal como se puede ver en la Tabla 1

Las vibraciones de las moléculas de agua no son claramente identificables. Los modos de estiramiento aparecen en la forma de una banda ancha centrada alrededor de  $3410 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que los modos de deformación se superponen con las dos bandas anchas e intensas de C=O localizadas en  $1619$  y  $1560 \text{ cm}^{-1}$

Un análisis cuidadoso de la región de bajas frecuencias permitió identificar algunas de las vibraciones metal-ligando. Un doblete, localizado a  $328 / 288 \text{ cm}^{-1}$ , puede ser asignado tentativamente al estiramiento Cu-N, mientras que dos bandas de intensidad media a  $547 \text{ cm}^{-1}$  (con un hombro a  $526 \text{ cm}^{-1}$ ) y  $471 \text{ cm}^{-1}$  pueden ser relacionadas con el estiramiento del enlace Cu-O.

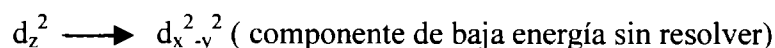
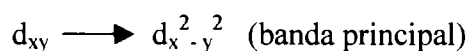
### 4.3.2.2. Espectro Electrónico

El espectro electrónico (reflectancia) del complejo se muestra en la Fig. 4, donde se observa una banda muy asimétrica, ancha y poco definida con un máximo a 630 nm (15,9kK). Esto sugiere la presencia de una componente de baja energía que no está resuelta. Este patrón espectral es característico de las transiciones d-d para el cobre (II) en un entorno cuadrado piramidal [18-20]. Una segunda banda localizada a 310 nm (32,3kK), se asigna a una transición de transferencia de carga [21].

Si consideramos al Cu (II) en un entorno cuadrado piramidal y de acuerdo a los resultados de ESR (próxima sección), se puede proponer la siguiente secuencia energética para los orbitales d del metal:

$$(d_{xy} = d_{yz}) < d_{xy} < d_z^2 < d_x^2 - y^2$$

y por lo tanto las dos transiciones d-d observadas pueden ser asignadas de la siguiente manera:



Resulta interesante resaltar que el espectro obtenido es muy parecido [22] al del complejo de glicil glicinato- acuo- imidazol cobre(II) [23], en el que el cobre presenta un entorno similar al observado en el complejo de carnosina [24].

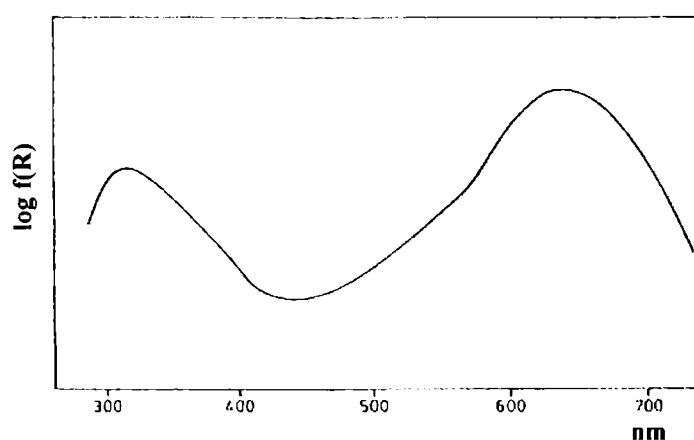
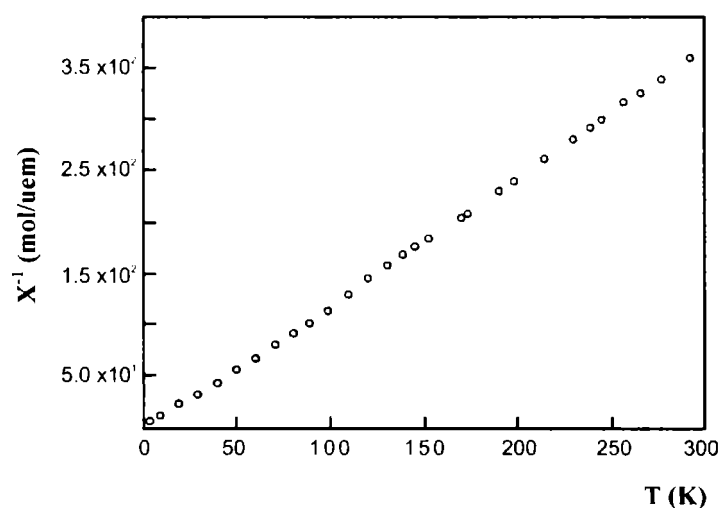


Figura 4. Espectro electrónico (reflectancia) del complejo de Cu(II)/Carnosina

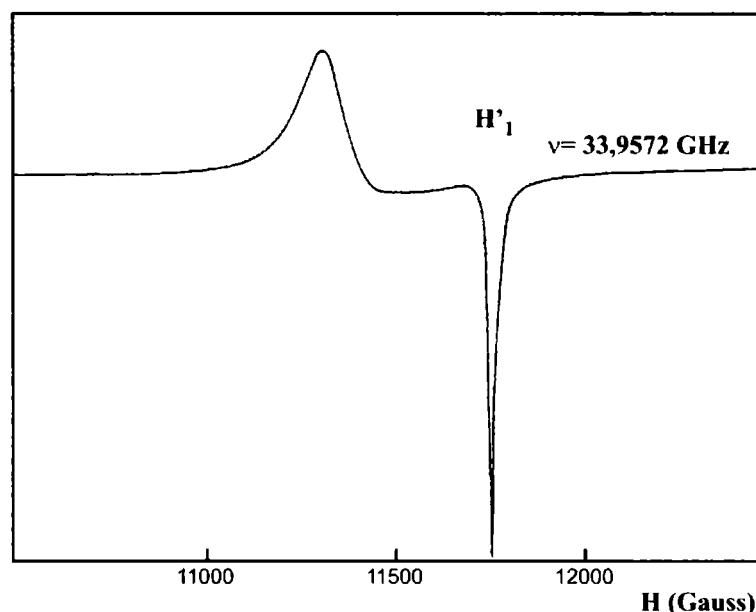
#### 4.4. Propiedades Magnéticas

La variación de la susceptibilidad magnética en función de la temperatura se muestra en la Fig. 5. La misma obedece la ley de Curie-Weiss,  $\chi = 0,37 / T + 4,5$  en todo el rango de mediciones ( 4,2-300K). El momento magnético obtenido de 1,79 MB está de acuerdo con el esperado para un ion Cu(II) aislado, sin tener en cuenta cualquier tipo de interacciones.

El espectro ESR, medido en banda Q, permanece prácticamente constante con la temperatura y se muestra en la Fig. 6. Los resultados obtenidos muestran un tensor g axial invertido, con  $g_{\perp} = 2,133 > g_{\parallel} = 2,064$  y  $\langle g \rangle = 2,11$ . El bajo valor de g (2,064) obtenido, que es significativamente más alto que 2,04 pone de manifiesto la existencia de un estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$  [15], lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos del espectro electrónico. Por consiguiente el origen de esta inversión espectral puede ser explicado, como en otros casos similares [22], por la existencia de un mecanismo de intercambio entre dos iones cobre(II) ( $Cu_A$  y  $Cu_B$ ) que son cristalográficamente pero no magnéticamente equivalentes.



**Figura 5.** Variación de la susceptibilidad magnética con la temperatura para el complejo de Cu(II)/carnosina



**Figura 6.** Espectro ESR a temperatura ambiente del complejo de Cu(II)/ carnosina

En estos casos, el espectro observado no representa las características de los tensores moleculares, sino los de aquellos tensores de intercambio, los cuales son la razón aritmética de los tensores moleculares, por ej.,  $(g_A + g_B) / 2$ .

Una inspección de las características moleculares muestra que el ángulo entre el eje tetragonal de los dos iones cobre que forman la unidad dimérica es muy pequeño ( $13^\circ$ ) [9], lo que soporta la equivalencia magnética y excluye un mecanismo de acoplamiento intradimérico. Por consiguiente el fenómeno de intercambio supuesto anteriormente es, probablemente muy débil, involucrando dos dímeros diferentes en la celda unidad, separados por ej. por  $10 \text{ \AA}$  [9], y tiene lugar a través de uniones hidrógenos.

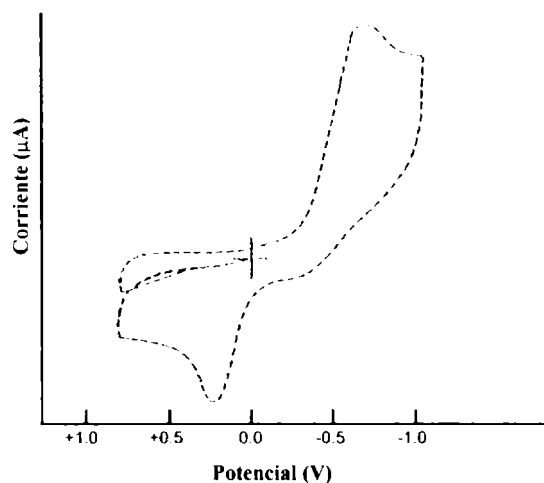
Usando las ecuaciones estándar [25] y un valor de  $118^\circ$  para el ángulo generado entre los dos planos que contienen los dímeros [9], se obtuvieron los siguientes valores para los tensores moleculares:  $g_{\perp} = 2.064$  y  $g_{\parallel} = 2,313$ , los cuales reflejan claramente la geometría piramidal cuadrada del centro de Cu(II) en este complejo.

Aunque tal intercambio intradimérico sea probablemente muy débil, de acuerdo con los resultados obtenidos de las mediciones de susceptibilidad magnética, no puede dejar de tenerse en cuenta [26], ya que como hemos visto, este fenómeno es satisfactoriamente explicado por los resultados obtenidos en los estudios de espectroscopía de ESR.

### 4.5. Comportamiento Electroquímico

Se investigó el comportamiento redox del complejo usando voltametría cíclica en una solución 0,5M de  $\text{LiClO}_4$ .

Cuando se examinó el potencial partiendo de 0,0V en dirección negativa, el voltamograma cíclico (CV) obtenido a una velocidad de 0,1V/s, exhibe un pico de reducción irreversible a -0,7V y un pico de oxidación irreversible a + 0,25V, tal como se muestra en la Fig. 7A.



**Figura 7a.** Experimentos de voltametría cíclica con el complejo de Cu(II)/carnosina

Sin embargo, no se observa la onda anódica cuando el potencial se inicia en 0,0V en dirección positiva. Este comportamiento indica que el proceso de oxidación es dependiente de la naturaleza de las especies generadas a -0,7 V.

Para poder identificar estas especies y obtener un conocimiento de los diferentes procesos que ocurren en los electrodos, se realizaron experiencias adicionales.

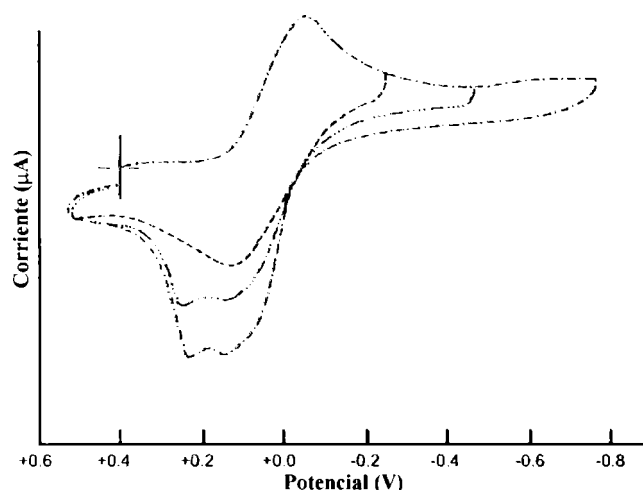
Primero se estudió el voltamograma cíclico de una solución  $10^{-3}\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  en solución 0,5M de  $\text{LiClO}_4$ , a una velocidad de 0,1V/s entre +0,4 y -0,75V. Los resultados indican dos picos de reducción a -0,05 y -0,14 V y un pico agudo de oxidación a +0,04 V. Las dos ondas catódicas corresponden a la reducción de Cu(II) a Cu(I) y de Cu(I) a Cu metálico. El agudo pico anódico es típico para la desorción de especies desde la superficie del electrodo.

De la forma de la rama catódica del voltamograma resulta evidente que sobre la superficie del electrodo no tiene lugar una nucleación tridimensional seguida de un subsecuente crecimiento de los granos. Por esa razón, el bien definido pico anódico está evidentemente relacionado a la electrodesorción de  $\text{Cu}^0$  a Cu(II) de la superficie del

electrodo. Restringiendo el límite catódico de barrido de potencial a  $-0,1$  v, se pudo observar la cupla quasi-reversible Cu(II)/Cu(I).

Otras mediciones fueron realizadas en soluciones  $0,5$  M de  $\text{LiClO}_4$  conteniendo  $10^{-3}$  M de  $\text{CuSO}_4$  y diferentes cantidades de carnosina, en relación ligando-metal entre 1 y 10. La formación del complejo en estas soluciones está soportada por el hecho de que después de cada adición de carnosina, los cambios de color son evidentes.

Cuando la relación carnosina a cobre es igual a uno, el CV muestra un pico catódico que esta relacionado al proceso de reducción Cu(II) a Cu(I) a  $-0,05$  V y otra pequeña onda enre  $-0,6$  y  $-0,75$  V (Fig. 7B). Durante el barrido anódico, se observó un ancho pico con tres contribuciones que son dependientes del potencial de corte.



**Figura 7b.** Experimentos de voltametría cíclica con el complejo de Cu(II)/carnosina

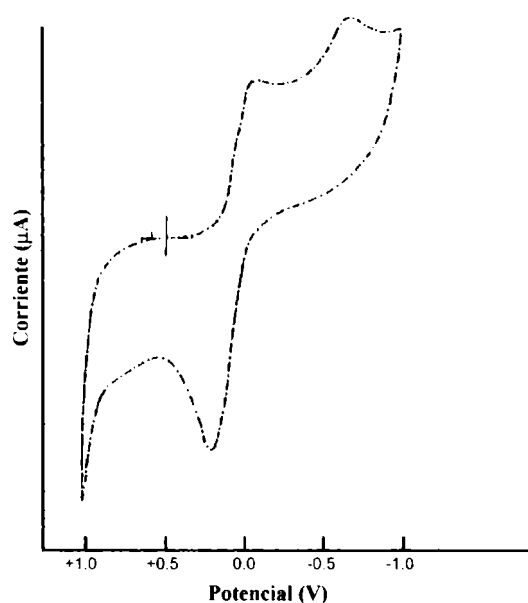
Al principio de las mediciones, tanto el cobre “libre” como el cobre complejado están presentes en la solución. El pico catódico observado a  $-0,05$  V puede ser relacionado con la reducción del catión “libre” a Cu(I); una parte de esta especie reducida puede también ser complejada con carnosina. Por consiguiente, el hombro observado a ca.  $+0,05$  V puede involucrar la electrodesorción de una pequeña fracción de Cu cero adsorbida en el electrodo y seguramente generada con una parte de la pequeña fracción de Cu(I) no complejado, formado a partir del Cu(II) “libre” a  $-0,05$  V. La otra contribución a  $+0,13$  V involucra la oxidación del Cu(I) libre remanente a Cu(II), y finalmente el pico en  $+0,23$  V corresponde a la oxidación de una nueva especie compleja, generada a ca.  $-0,7$  V durante el ciclo de reducción.

De la Fig 7B, se puede observar que esta última contribución a  $+0,23$  V está presente aún cuando el recorrido del potencial se revierte a  $-0,55$  V , lo que confirma la



formación de un complejo de Cu(I)/carnosina por reacción entre el ion Cu(I) producido primero y el ligando libre. Esta especie puede ser igual a una de las formadas a -0,7 V por reducción directa del complejo Cu(II)/carnosina porque el pico de oxidación ocurre a +0,23 V independientemente de la inversión del potencial. Philip y col. mostraron que en presencia de baja concentración de ligando, múltiples picos aparecen en los experimentos de voltametría cíclica [27,28].

Cuando la relación metal / ligando se incrementa, se observan importantes cambios en las curvas corriente / potencial. La altura del pico catódico a -0,05 V está deprimida con respecto a aquél registrado con solución de CuSO<sub>4</sub> y con soluciones que tienen una relación metal / ligando = 1, mientras que la altura de la corriente del pico de reducción a -0,7 V resulta incrementada. Este comportamiento se ilustra en la Fig. 7C para soluciones con una relación ligando / metal = 2. en este caso el hombro a +0,05 V no se observa durante el barrido anódico. Esto indica que cuando se incrementa la concentración de carnosina, se producen más altas concentraciones del complejo Cu(II)/carnosina.



**Figura 7c.** Experimentos de voltametría cíclica con el complejo de Cu(II)/carnosina

Igualmente, la pequeña fracción de Cu(I) que puede ser generada a partir de la pequeña fracción de Cu(II) “libre” es fácilmente complejada. Por consiguiente, la posibilidad de reducción del cobre metálico resulta escalonadamente inhibida. Para una relación metal / ligando = 10, el voltagrama exhibe solamente un pico de reducción a -0,7 V con un hombro muy pequeño a -0,05V. Cuando se invierte el potencial, se observa un solo pico a +0,23 V.

En conclusión, el estudio del comportamiento electroquímico muestra que en el complejo de Cu(II) / carnosina, el centro metálico es reducido a Cu(I) a -0,7 V, indicando una importante estabilidad redox del complejo. La reducción de una solución acuosa de Cu(II) investigada bajo las mismas condiciones experimentales ocurre a - 0,05 V, seguido de una reducción a cobre metálico a - 0,14 V.

Finalmente, es interesante mencionar que el complejo modelo [Cu(glygly)(imidazol)(H<sub>2</sub>O)].1.5H<sub>2</sub>O muestra un comportamiento electroquímico muy similar [22], sugiriendo que el complejo de Cu(II) / carnosina aquí investigado también debe existir en forma monomérica en solución, un hecho que resulta totalmente razonable teniendo en cuenta las muy bajas concentraciones de complejo que se utilizan en estas medidas (alrededor de 10<sup>-3</sup> M) [3].

#### 4.6. *Determinación de la Actividad Superóxido Dismutasa*

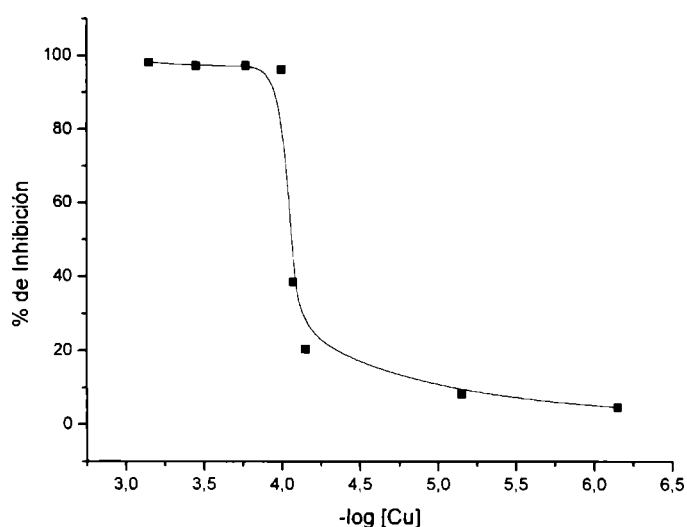
La actividad SOD del complejo se determinó usando la técnica detallada en el capítulo 1.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del ensayo realizado a diferentes concentraciones del complejo. En la misma se muestra el porcentaje de inhibición en la reducción del NBT correspondientes a dichas concentraciones. El 100 % de actividad superóxido corresponde al ensayo realizado en ausencia de complejo.

**Tabla 2.** Resultados de los ensayos de actividad SOD para diferentes concentraciones del complejo de Cu(II)/Carnosina

<i>Concentración (M)</i>	<i>% de Inhibición</i>
3,57 x 10 <sup>-7</sup>	4,64
3,57 x 10 <sup>-6</sup>	8,25
3,57 x 10 <sup>-5</sup>	20,36
4,28 x 10 <sup>-5</sup>	38,40
5,00 x 10 <sup>-5</sup>	96,13
8,55 x 10 <sup>-5</sup>	97,16
1,78 x 10 <sup>-4</sup>	97,16
3,57 x 10 <sup>-4</sup>	98,06

Para poder determinar el  $IC_{50}$  se graficó el porcentaje de inhibición vs el logaritmo de la concentración del metal tal como se muestra en la Fig. 8. A partir de este gráfico el valor obtenido resultó ser de  $8,65 \times 10^{-5}$  M, el cual, al ser comparado con el  $IC_{50}$  de la enzima nativa SOD ( $1,02 \times 10^{-8}$  M), da una relación  $[Cu]_{\text{complejo}} / [Cu]_{\text{SOD}} = 8480$ . Este valor indica una muy baja actividad SOD cuando es comparado por ej. con los valores reportados anteriormente para los complejos de  $Me(II)$  / Sacarinato o con los complejos de  $Cu(II)$  con aminoácidos esenciales. Por consiguiente se puede considerar que este complejo no presenta este tipo de actividad. De todas maneras este resultado es un tanto inesperado, ya que si se admite que el complejo existe en solución en forma monomérica, tendríamos un ión  $Cu(II)$  en coordinación cinco o,



**Figura 8.** Porcentaje de inhibición en la reducción de NBT en función del logaritmo de la concentración de  $Cu(II)$  para el complejo de  $Cu(II)$ /carnosina.

eventualmente, en coordinación octaédrica con dos acuo-ligandos axiales relativamente lábiles, como consecuencia del efecto Jahn-Teller.

De estas posibles estructuras se podría esperar una buena actividad SOD, debido a la accesibilidad que el centro metálico proveería al sustrato. El hecho de que el complejo no presente esa actividad, está seguramente relacionado con la importante estabilidad redox del mismo, demostrada a través del estudio electroquímico.

## 4.7. Bibliografía

- 1- Skulachev, V.P., *Biochemistry* (Moscú) **65**, 749 (2000).
- 2- Boldyrev, A.A., *Biochemistry* (Moscú) **65**, 751 (2000).
- 3- Baran, E.J., *Biochemistry* (Moscú) **65**, 789 (2000).
- 4- Rosenberg, A., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 297 (1960).
- 5- Rosenberg, A., *Ark. Kemi* **17**, 25 (1961).
- 6- Rosenberg, A., *Archiv Biochim. Biophys.* **88**, 83 (1960).
- 7- Matsukura, T. y Tanaka, H., *Biochemistry* (Moscú) **65**, 817 (2000).
- 8- Sundberg, R. J. y Martin, R. B., *Chem. Rev.* **74**, 471 (1974).
- 9- Freeman, H. C. y Szymanski, J. T., *Acta Crystallogr.* **22**, 406 (1967).
- 10- Dobbie, H. y Kermack, O. *Biochem. J.* **59**, 254 (1955).
- 11- Martin, R. B. y Edsall, J. T., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1107 (1960).
- 12- Lenz, G. R. y Martell, A. E., *Biochemistry* **3**, 750 (1964).
- 13- Viola, R. E., Hartzell, Ch. R. y Villafranca, J. J., *J. Inorg. Biochem.* **10**, 281 (1979).
- 14- Viola, R. E., Hartzell, Ch. R. y Villafranca, J. J., *J. Inorg. Biochem.* **10**, 293 (1979).
- 15- Rosenberg, A., *Acta Chem. Scand.* **10**, 840 (1956).
- 16- Rosenberg, A., *Acta Chem. Scand.* **11**, 1390 (1957).
- 17- Davis, W. J. y Smith, J., *J. Chem. Soc.* **A1971**, 317.
- 18- Hathaway, B. J. y Tomlinson, A. A. G., *Coord. Chem. Rev.* **5**, 1 (1970).
- 19- Antolini, L., Marcotrigiano, G., Menabue, L. y Pellacani, G. C., *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 1303 (1980).
- 20- Baran, E. J. y Cicileo, G. P., *J. Mater. Sci. Lett.* **9**, 1 (1990).
- 21- Hathaway, B. J. y Billing, D. E., *Coord. Chem. Rev.* **5**, 143 (1970).
- 22- Baran, E. J., Parajón-Costa, B.S., Ferrer, E.G., Lezama, L. y Rojo, T., *J. Inorg. Biochem.* **63**, 19 (1996).
- 23- Driver, R. y Walker, W. R., *Austr. J. Chem.* **21**, 671 (1968).
- 24- Bell, J. D., Freeman, H. C., Wood, A. M., Driver, R. y Walker, W. R., *Chem. Comm.* **1969**, 1441.
- 25- Estes, W. E., Gavel, D. P., Hatfield, W. E. y Hodgson, D. J., *Inorg. Chem.* **17**, 1415 (1978).
- 26- Coffman, R. E. y Buettner, G. R., *J. Phys. Chem.* **83**, 2387 (1979).

- 27- Spell, J. E. y Philip, Jr., *Electroanal. Chem.* **112**, 281 (1980).  
28- Killa, H. M. y Philip, Jr., *Electroanal. Chem.* **175**, 223 (1984).

# *Capítulo 5*

---

*Evaluación de la  
Actividad Superóxido Dismutasa  
en algunos  
Complejos ternarios de Cobre (II)*

---

## 5.1. Introducción

Para extender los estudios del capítulo precedente a esferas de coordinación aún un poco más complejas, se decidió investigar también algunos sistemas ternarios conteniendo un dipéptido junto a un ligando simple adicional.

El estudio de las interacciones entre el Cu(II) y péptidos sencillos como modelo de interacciones más complejas existentes *in vivo*, ha sido objeto de numerosas publicaciones en donde se pone de manifiesto que un dipéptido se coordina involucrando los grupos NH<sub>2</sub> y COO<sup>-</sup> terminales y el N peptídico [1]. La esfera de coordinación se suele completar con moléculas de disolvente generando complejos de índice de coordinación 4 (plano cuadrados distorsionados) o 5 (pirámide cuadrada). Estas moléculas de disolvente pueden, asimismo, sustituirse por otros ligandos generando complejos ternarios, Cu(II) — péptido—base nitrogenada.

Estos complejos ternarios desempeñan un rol muy importante en diversos sistemas biológicos [2]. Se conoce que los iones metálicos promueven interacciones específicas entre los ácidos nucleicos y las proteínas a través de la formación de complejos ternarios [3]. Durante la replicación del DNA se forman complejos del tipo ácido nucleico-enzima con cationes Me(II), mientras que los iones Cu(II) intervienen en las interacciones polipéptidos-polinucleótidos [4]. Por otra parte los iones Cu(II), al igual que otros iones metálicos, desestabilizan la configuración normal de la doble hélice del DNA, pero difiere de los otros en que es capaz de ayudar a la regeneración de la doble banda desnaturalizada térmicamente [5]. Su habilidad de unirse fuertemente a nitrógenos heterocíclicos de las bases nucleicas y con menos fuerza a los oxígenos de los grupos fosfodiéster, podría ser la responsable de la capacidad de este metal de promover la regeneración del DNA [6].

El estudio de este tipo de compuestos, resulta de esta manera adicionalmente interesante, ya que constituyen modelos bioinorgánicos de la interacción entre moléculas biológicas e iones metálicos

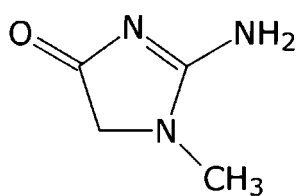
Por otra parte, el estudio de la actividad anticancerígena de complejos de Cu(II) se ha desarrollado enormemente debido a su especial relevancia. Parece ser que la acción antitumoral de complejos de cobre (II) está relacionada con su interacción directa con el DNA y con la actividad superóxido dismutasa que poseen [7]. Por todo lo expuesto anteriormente nos pareció interesante realizar el estudio de actividad SOD de complejos de Cu(II) con el péptido glicilglicina (gg) y que contengan como ligando adicional las bases

nitrogenadas creatinina (creat), benzimidazol (bzim), isocitosina (isocyt) y 6-metilisocitosina (misocyt)

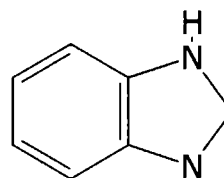
Los complejos estudiados tienen las siguientes fórmulas.

- 1)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{H}_2\text{O})(\text{creat})] \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$
- 2)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{bzim})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 3)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{isocyt})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 4)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{misocyt})] \cdot \text{H}_2\text{O}$

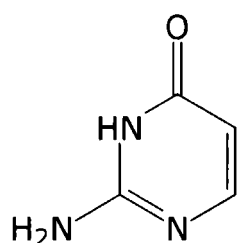
Las fórmulas de los distintos ligandos utilizados se muestran a continuación:



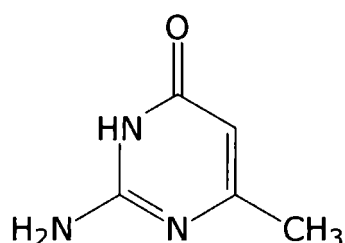
**creatinina**



**benzimidazol**



**isocitosina**



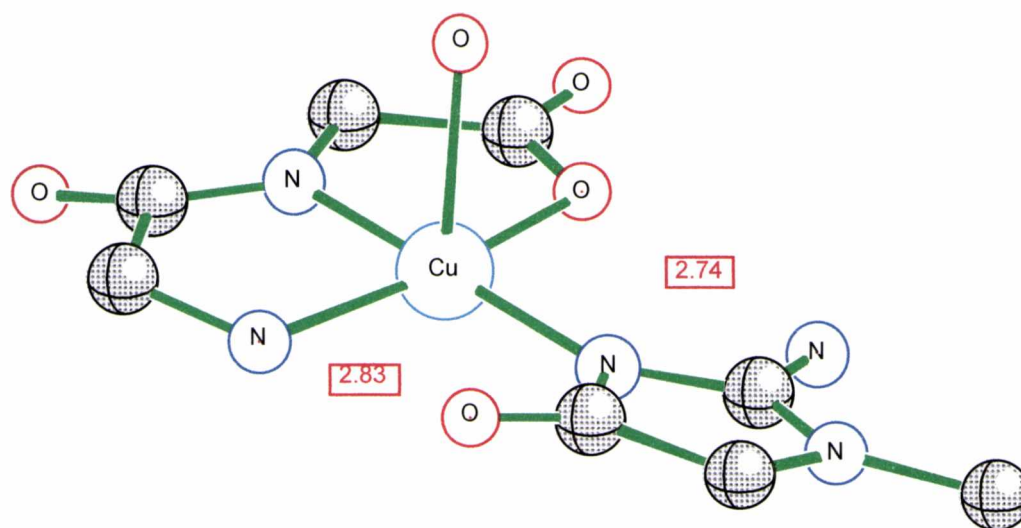
**6-metilisocitosina**



## 5.2. Características Estructurales

### 1) $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{H}_2\text{O})(\text{creat})] \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$

Los estudios de rayos X [8] indican que este compuesto cristaliza en el sistema triclinico, grupo espacial  $P-1$  con  $Z = 2$ . La estructura molecular del mismo se muestra en la Fig.1. La coordinación alrededor del ion  $\text{Cu}(\text{II})$  es aproximadamente la de una pirámide cuadrada con el dianión glicilglicinato tridentado y el nitrógeno de la creatinina ocupando los vértices de un cuadrado. La esfera de coordinación alrededor del  $\text{Cu}(\text{II})$  se completa con una molécula de agua que ocupa la posición axial de la pirámide. Otra molécula de agua extiende cualitativamente la coordinación geométrica alrededor del cobre a un octaedro. Por ultimo una tercera molécula de agua está localizada entre dos unidades complejas. La estructura cristalina completa se mantiene unida a través de uniones hidrógenos en la cual están involucradas tres tipos de moléculas de agua.

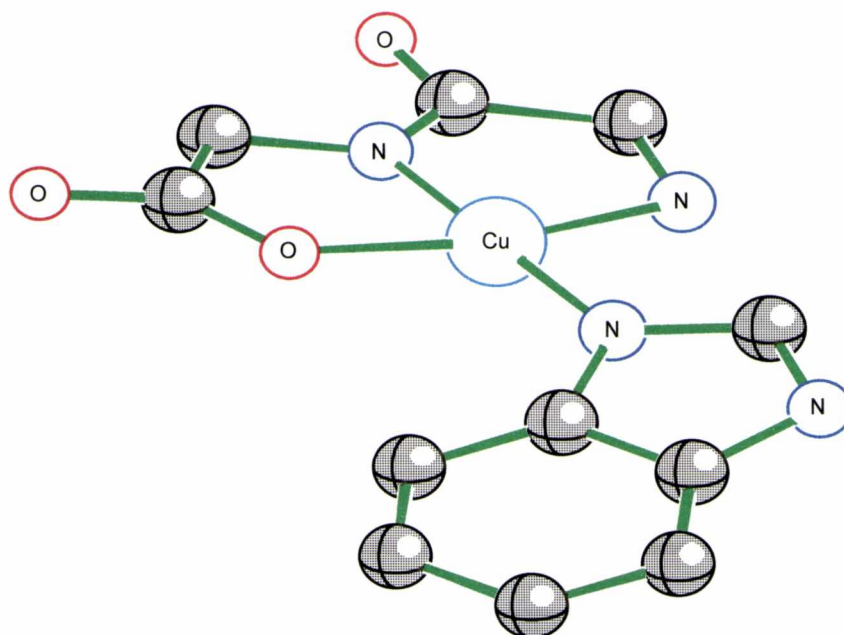


**Figura 1.** Estructura molecular del complejo  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{H}_2\text{O})(\text{creat})] \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ . Tomado de cita [8]

### 2) $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{bzim})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Los estudios de Rayos X [9] indican que este compuesto cristaliza en el sistema ortorómbico, grupo espacial  $P2_1cn$  con  $Z = 4$ . La estructura molecular del mismo se muestra en la Fig.2. La geometría de coordinación alrededor del ion  $\text{Cu}(\text{II})$  es aproximadamente plano cuadrada con el dianión glicilglicinato tridentado y el nitrógeno

del ligando benzimidazol ocupando los vértices de un cuadrado. Asimismo, existe una leve distorsión en el entorno plano cuadrado del cobre indicada por los ángulos de enlace observados, que varían desde 82,9 a 98,4°.



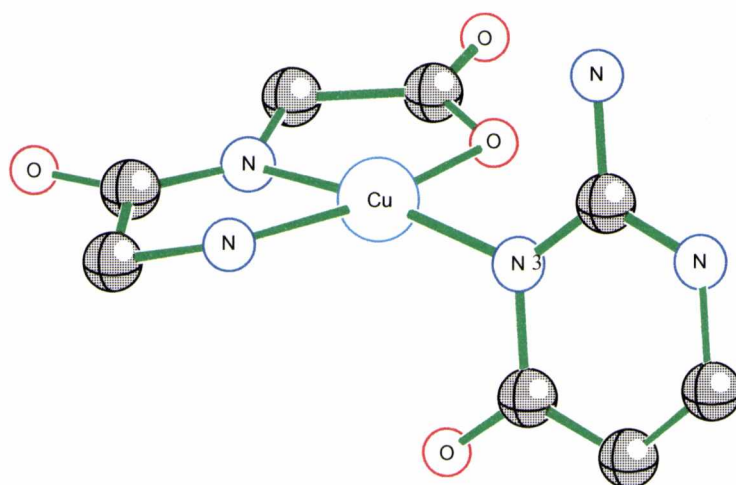
**Figura 2.** Estructura molecular del complejo  $[Cu(gg)(bzim)].3H_2O$ . Tomado de cita [9]

### 3) $[Cu(gg)(isocyt)].2H_2O$ y $[Cu(gg)(misocyt)].H_2O$

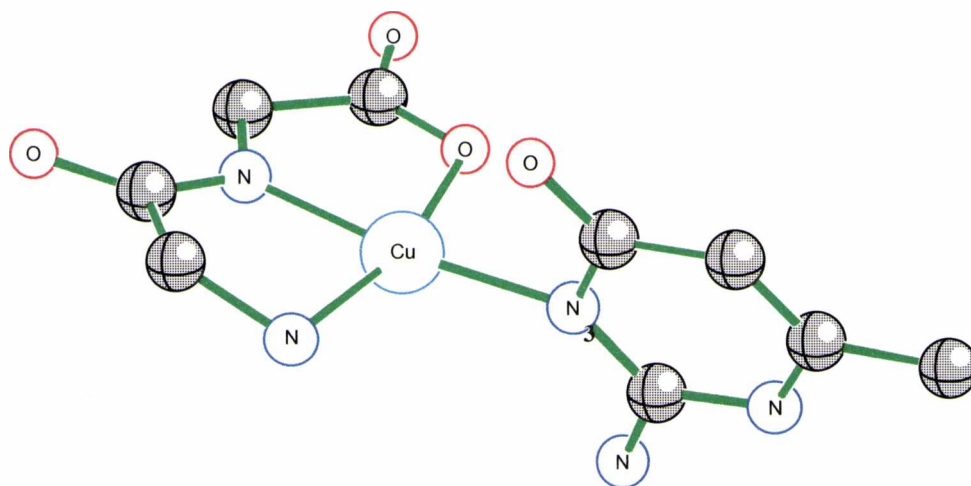
Los estudios de Rayos X [10] indican que ambos complejos cristalizan en el sistema monoclinico, grupo espacial  $P2_1/n$  con  $Z=4$ . La estructura cristalina del complejo con isocitosina se muestra en la Fig.3, mientras que la del complejo con metil isocitosina se muestra en la Fig.4.

La geometría de coordinación alrededor del ion cobre (II) en ambos complejos es la de un plano cuadrado ligeramente distorsionado. Los cuatro sitios de coordinación están ocupados por el ligando tridentado glicilglicina y el N(3) de la base. Existe además, una interacción axial entre el oxígeno de una molécula de agua y el átomo de cobre. En ambos casos se observa además, una interacción entre el péptido y el ligando pirimidina. Para el complejo con isocitosina se verifica también una unión hidrógeno adicional entre unidades

complejas que estabilizan al cristal, efecto que está ausente en el complejo con metilisocitosina.



**Figura 3.** Estructura molecular del complejo  $[Cu(gg)(isocyt)].2H_2O$ . Tomado de cita [10]



**Figura 4.** Estructura molecular del complejo  $[Cu(gg)(misocyt)].2H_2O$ . Tomado de cita [10]

### **5.3. Parte Experimental**

#### **5.3.1. Síntesis de los complejos**

Estos complejos fueron sintetizados y caracterizados espectroscópicamente y estructuralmente por el grupo de trabajo del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares en el marco del proyecto “Complejos de Metales de Transición con moléculas que presenta actividad Biológica y/o Farmacológica”, siguiendo la técnica descrita en la bibliografía, que se indica a continuación.

- 1)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{H}_2\text{O})(\text{creat})] \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$  [8]
- 2)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{bzim})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  [9]
- 3)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{isocyt})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [10]
- 4)  $[\text{Cu}(\text{gg})(\text{misocyt})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  [10]

#### **5.3.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa**

La actividad SOD se determinó usando la técnica detallada en el capítulo 1

### **5.4. Resultados y Discusión**

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los ensayos de actividad SOD realizados para los cuatro complejos estudiados, a distintas concentraciones. En la misma se pueden apreciar los resultados de los porcentajes de inhibición de la reducción del NBT a dichas concentraciones. El 100 % de actividad SOD corresponde al ensayo realizado en ausencia de complejo.

Para determinar la concentración de complejo requerida para producir el 50 % de inhibición de la reacción ( $\text{IC}_{50}$ ) se graficó el porcentaje de inhibición vs. el logaritmo de la

concentración del metal, tal como se muestra, a modo de ejemplo, en las Figs. 5 y 6 para los complejos con creatinina y benzimidazol respectivamente.

Estos gráficos permiten una simple y rápida determinación del valor de IC<sub>50</sub>, los cuales están resumidos en la Tabla 2 en la cual también se incluye la concentración de Cu(II) de la enzima SOD nativa que produce el 50 % de inhibición de la reacción, (1,02 x 10<sup>-8</sup> M), así como también la relación entre las concentraciones ( [Cu]<sub>complejo</sub> / [Cu]<sub>SOD</sub>) que causan el 50 % de inhibición.

**Tabla 3.** Resultados de los ensayos de actividad SOD a diferentes concentraciones de los complejos

Complejo	Concentración (M)	% de Inhibición
[Cu(gg)(H <sub>2</sub> O)(creat)]1,5 H <sub>2</sub> O	7,14 x 10 <sup>-7</sup>	1,96
	7,14 x 10 <sup>-6</sup>	3,36
	2,14 x 10 <sup>-5</sup>	8,96
	3,57 x 10 <sup>-5</sup>	17,60
	7,14 x 10 <sup>-5</sup>	40,89
	8,57 x 10 <sup>-5</sup>	89,91
	2,68 x 10 <sup>-4</sup>	98,88
[Cu(gg)(bzim)].3H <sub>2</sub> O	6,67 x 10 <sup>-7</sup>	4,42
	6,67 x 10 <sup>-6</sup>	5,78
	2,00 x 10 <sup>-5</sup>	14,08
	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	28,07
	5,00 x 10 <sup>-5</sup>	62,17
	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	85,34
	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	94,60
[Cu(gg)(isocyt)].2H <sub>2</sub> O	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	98,98
	6,67 x 10 <sup>-7</sup>	3,20
	6,67 x 10 <sup>-6</sup>	5,58
	2,00 x 10 <sup>-5</sup>	9,02
	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	14,52
	4,67 x 10 <sup>-5</sup>	21,16
	6,00 x 10 <sup>-5</sup>	31,34
[Cu(gg)(misocyt)].H <sub>2</sub> O	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	70,06
	8,33 x 10 <sup>-5</sup>	88,02
	1,67 x 10 <sup>-4</sup>	97,20
	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	99,32
	6,67 x 10 <sup>-7</sup>	3,02
	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	6,46
	2,00 x 10 <sup>-5</sup>	13,75
[Cu(gg)(misocyt)].H <sub>2</sub> O	3,33 x 10 <sup>-5</sup>	23,50
	4,67 x 10 <sup>-5</sup>	32,25
	6,00 x 10 <sup>-5</sup>	43,50
	6,67 x 10 <sup>-5</sup>	65,50
	1,00 x 10 <sup>-4</sup>	89,90
	1,67 x 10 <sup>-4</sup>	95,70
	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	98,28

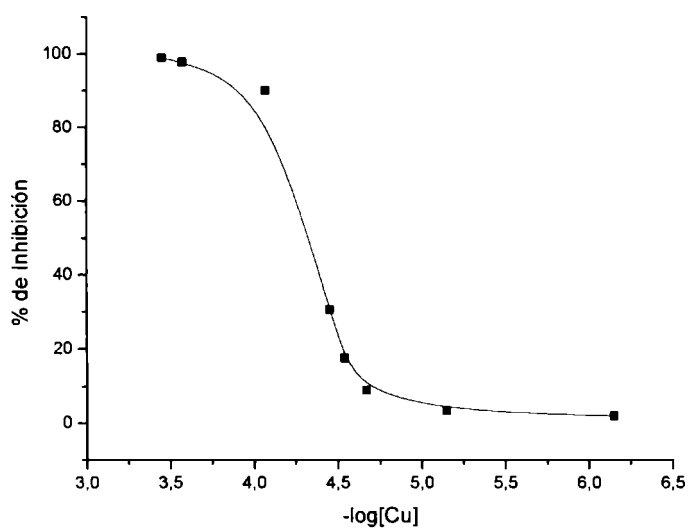


Figura 5. Porcentaje de inhibición en la reducción del NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo  $[Cu(gg)(H_2O)(creat)]1,5 H_2O$

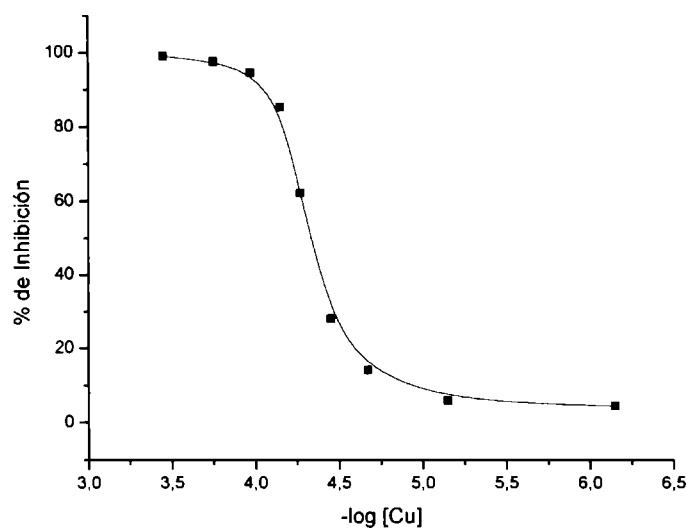


Figura 5. Porcentaje de inhibición en la reducción del NBT en función del logaritmo de la concentración de Cu(II) para el complejo  $[Cu(gg)(bzim)].3H_2O$

**Tabla 5.** Concentraciones requeridas para producir el 50 % de inhibición.

<b>Complejo</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>[M]<sub>complejo</sub>/[Cu]<sub>SOD</sub></b>
[Cu(gg)(H <sub>2</sub> O)(creat)]1,5 H <sub>2</sub> O	4,39 x 10 <sup>-5</sup>	4303
[Cu(gg)(bzim)].3H <sub>2</sub> O	4,30 x 10 <sup>-5</sup>	4216
[Cu(gg)(isocyt)].2H <sub>2</sub> O	5,87 x 10 <sup>-5</sup>	5755
[Cu(gg)(misocyt)].H <sub>2</sub> O	5,64 x 10 <sup>-5</sup>	5529
<b>Cu-SOD</b>	1,02 x 10 <sup>-8</sup>	-

También en estos casos, la actividad de SOD es relativamente baja, aunque algo mayor que la observada para el complejo con carnosina. Esto es bastante llamativo, ya que las características estructurales de estos complejos, con el centro metálico relativamente expuesto hacían prever una actividad más importante. Probablemente también en estos casos se generen complejos que presenten una elevada estabilidad redox.

## 5.5. Bibliografía

1. Manyak, A. R., Murphy, C. B. y Martell, A. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 373 (1955).
2. a) Sigel, H. (Editor), *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, (1973) b) Vol. 12, (1981) c) Vol. 13, (1981).
3. a) Eichhorn, G. L., en Sigel, H., (Editor) *Metal Ions in Biological Systems* Vol. 10, p 1-21. Marcel Dekker, New York, (1980) b) Helene, C., *Nucl. Acid Res.* **2**, 961 (1975) c) Helene, C. y Maurizot, J. C., *CRC Crit. Rev. Biochem*, **10**, 213 (1981).
4. Bere, A. y Helene, C., *Biopolymers* **18**, 2659 (1979) b) Koren, R. y Mildvan, A. S., *Biochemistry* **16**, 241 (1977) c) Bean, B. L., Koren, R. y Mildvan, A. S., *Biochemistry* **16**, 3322 (1979).
5. Eichhorn, G. L., y Shin, Y. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7323 (1968).
6. Shin, Y. A. y Eichhorn, G. L., *Biochemistry* **7**, 1026 (1968).
7. Sigel, H. (Editor), *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 14 Marcel Dekker, New York, (1982).
8. García-Raso, A., Terrón, A., Fiol, J. J., Molins, E. y Miravittles, C., *Polyhedron* **00**, 1 (1995).
9. García-Raso, A., Fiol, J. J., Adrover, B., Molins, E. y Miravittles, C., *Polyhedron* **15**, 1829 (1996).
10. García-Raso, A., Fiol, J. J., Adrover, B., Moreno, V., Molins, E. y Mata, I., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1031 (1998).



# *Segunda Parte*

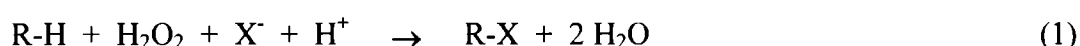
---

*Haloperoxidasas*

---

## Introducción

La evolución de los sistemas biológicos, a través del tiempo, condujo a la producción de enzimas llamadas haloperoxidasas, las cuales catalizan la halogenación de sustratos orgánicos con ayuda de peróxido de hidrógeno, de acuerdo a la siguiente ecuación:



Las haloperoxidasas suelen clasificarse de acuerdo al rango de iones haluros,  $\text{X}^-$ , que pueden utilizar:

cloroperoxidasas:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$

bromoperoxidasas:  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$

iodoperoxidasas:  $\text{I}^-$

Hasta 1950, sólo se conocían tres haloperoxidasas: la peroxidasa extraída de la raíz del rábano rústico, la lactoperoxidasa, presente en leche y saliva y la mieloperoxidasa de los glóbulos blancos de la sangre. En 1960 se agregaron otras tres: la peroxidasa tiroidea, una cloroperoxidasa extraída del hongo *Caldariomyces fumago* y la eosinil peroxidasa, obtenida también de los glóbulos blancos de la sangre. A partir de 1970, el número aumenta considerablemente, agregándose, primero, unas cincuenta bromoperoxidasas aisladas de diversas familias de algas y luego un número igualmente importante de cloroperoxidasas extraídas de hongos [1].

La presencia de actividad iodoperoxidasa y bromoperoxidasa en algas marinas fue detectada ya a comienzos del siglo XX [2-4]. Sin embargo, el interés de los investigadores en este tipo de enzimas recién comenzó en los años ochenta. La mayoría de los científicos asumieron que estas peroxidases eran hemoproteínas similares a las encontradas en los granulocitos, glándula tiroidea, leche y hongos [5]. La razón de ello fue que tanto las algas marinas rojas *Bonnemaisonia hamifera* [6] y *Cystoclonium purpureum* [7] como la especie alga marina verde *Penicillus capitatus* [8] contenían una bromoperoxidasa con un grupo prostético hemo.

Una nueva clase de haloperoxidasa, en la cual el grupo hemo estaba ausente fue detectada por Vilter y col. [9-11], quienes determinaron que el centro activo de estas enzimas está constituido por vanadio (V), como metal esencial para su funcionamiento. Se trata, fundamentalmente de vanadio bromoperoxidasas (V-BrPO) aisladas de algas marrones (*phaeophytae*) *Ascophyllum nodosum* [12,13], roja (*rhodophytae*) *Ceramium rubrum* [14], así como también de un organismo terrestre, el líquen *Xanthoria parietina* [15], a las que se agregaron recientemente algunas iodoperoxidasas identificadas también en algas marrones [13].

Si bien no se conoce con exactitud el rol de estas enzimas en las algas marinas, se piensa que desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis de bromometabolitos [16]. Las algas marinas son una fuente inagotable de una gran diversidad de estos metabolitos [17], tales como indoles, terpenos, fenoles, etc, los cuales tienen una importante actividad biológica, como por ej. propiedades antimicrobianas y conservantes alimenticios [18]. También se conoce que la especie marina *A. nodosum* produce grandes cantidades de compuestos volátiles halogenados tales como  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ,  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$  y  $\text{CHBr}_3$  [19], los cuales tienen importantes aplicaciones farmacológicas y seguramente también, un fuerte impacto ambiental.

### ***Características generales***

Las V-BrPO son proteínas ácidas [20,21] con una composición similar de aminoácidos y un peso molecular de 65000 Dalton por subunidad [15,21,22]. Si bien no se conoce con exactitud la estructura de las V-BrPO, se pudo determinar que cada subunidad contiene un sitio activo de vanadio (V) [13,20,23]. El vanadio puede ser fácilmente extraído por diálisis utilizando EDTA en un buffer de citrato / fosfato, con lo que la enzima se torna inactiva. Posterior incubación de la misma con  $\text{VO}_4^{3-}$  a pH neutro, permite recuperar la actividad totalmente. Esta actividad enzimática, sin embargo no se recupera utilizando hierro u otros iones metálicos [24]. Esta observación fue confirmada [13] y es compatible con la idea de que el vanadio es un elemento traza esencial para las algas y otros organismos [25-30]. La reactivación de la enzima por vanadato es inhibida por fosfato [31,32] y esto es debido a la similitud estructural de estas especies. Este fue el primer estudio que mostró un rol esencial para el vanadio en la actividad de una enzima [33].

Algunas V-BrPO, tales como la del alga *A. nodosum* (la más estudiada) exhiben una marcada estabilidad química [12,22,34]. Por ej. esta enzima retiene totalmente su actividad en un medio que contiene cantidades apreciables de metanol, etanol, propanol o butanol (hasta 60 % v/v). Todas estas enzimas que contienen vanadio tienen un pH óptimo que va desde 5,5 para la enzima extraída de liquen *X. parietina* hasta 7,4 para la enzima de alga marina roja *C. rubrum* [14]. Estudios realizados por De Boer y Wever [35] mostraron que la inhibición de la actividad enzimática a bajo pH se debe a la protonación de un grupo ionizable, y que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es incapaz de unirse a la enzima nativa cuando este grupo está protonado. El pK<sub>a</sub> para el grupo funcional que controla la unión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (constante de velocidad de 2<sup>do</sup> orden =  $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pH > 6) es de 5,7 y corresponde al residuo de histidina.

### ***Propiedades espectroscópicas***

Estudios realizados por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) demostraron que la forma reducida de estas enzimas contienen el ion oxovanadio (IV), lo que confirma que la especie activa debe contener vanadio (V) [36].

Como se puede ver de la Tabla 1 las enzimas de varias especies diferentes muestran los mismos parámetros EPR, lo que indica que la estructura y los ligandos que coordinan con el V (IV) en las distintas especies son similares. Se ha demostrado que los espectros EPR dependen del pH; en efecto, los parámetros  $g_{\parallel}$  y  $g_{\perp}$  prácticamente no varían, pero  $A_{\parallel}$  y  $A_{\perp}$  muestran un considerable aumento o disminución con la variación de pH. Puesto que estos dos últimos parámetros son medidas sensibles del entorno de coordinación de vanadio(IV) [37-40], se pudo concluir que el pH afecta la coordinación del vanadio (IV).

A partir de datos obtenidos usando esta técnica espectroscópica también se pudo estimar que el entorno de coordinación del vanadio estaría formado por átomos donores de oxígeno, tales como carboxilatos de glutamato o aspartato o hidroxilos de tirosina o serina y / o de nitrógenos, tales como la histidina [37-40].

**Tabla 1. Parámetros EPR de la enzima bromoperoxidasa reducida**

<i>Especies</i>	<i>Condiciones experimentales</i>	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$g_0$	$A_{\parallel}$	$A_{\perp}$	$A_0$	<b>Ref</b>
<i>L. Saccharina</i>	0,1M tris-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (pH 8,3)	1,948	1,979	1,969	164,5	53,6	90,7	20
<i>X.Parietina</i>	0,1M tris-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (pH 8,3)	1,945	1,979	-	165,4	54,2	-	59
<i>A.nodosum</i>	0,1M Na-citrato (pH 8,3)	1,948	1,979	1,969	160,1	50,2	86,6	35
<i>A.nodosum</i>	0,1M Na-acetato (pH 4.2)	1,953	1,981	1,967	165,7	54,2	91,6	35

De Boer y col. [36] calcularon a partir de estos estudios de EPR dependientes del pH un pKa de 5,7, lo cual sugiere una protonación ya sea en el residuo de histidina o aspartato / glutamato cerca del sitio metálico. También observaron un decrecimiento significativo en el ancho de las líneas hiperfinas, cuando la enzima fue disuelta en D<sub>2</sub>O y en H<sub>2</sub><sup>17</sup>O con lo cual demostraron que el agua forma parte del entorno de coordinación del vanadio (IV). El hecho de que los protones tengan acceso al ion oxovanadio (IV) en la bromoperoxidasa reducida también fue demostrado por espectroscopía ESSEM [41]. En efecto, estos espectros muestran una modulación de <sup>1</sup>H a 13,8 Mhz, la cual es reemplazada por modulación de deuterio cerca de 2 Mhz cuando el experimento se llevó a cabo en D<sub>2</sub>O. Usando este tipo de espectroscopía también se ha concluido [41] que el nitrógeno está presente en el plano ecuatorial del oxovanadio(IV) de la bromoperoxidasa reducida. Sin embargo la posibilidad de que la modulación nuclear observada sea debida al acoplamiento de un átomo de nitrógeno cercano con un centro paramagnético a través de un oxígeno coordinante no puede ser excluida.

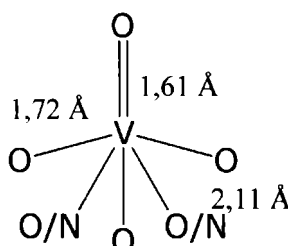
### ***Espectroscopia XANES y EXAFS***

A partir de estos estudios, al igual que con espectroscopía EPR, se pudo concluir que la forma oxidada de la enzima contiene vanadio (V), mientras que la reducida vanadio (IV) [42-44]. También se realizaron ensayos en los cuales se agregó a la enzima los sustratos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Br<sup>-</sup> [42-44]. Para la enzima tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó un pequeño

decrecimiento en la carga del metal, lo cual sugiere la coordinación del  $H_2O_2$  con el vanadio. Hormes y col. [42] llegaron a la conclusión de que el vanadio en la enzima nativa está solamente coordinado por átomos de oxígenos donores y que la esfera de coordinación tiene una simetría de octaedro distorsionado.

Estudios EXAFS, tanto de la enzima reducida como de la nativa, permitieron a Arber y col. [43] proponer estructuras más detalladas. Los espectros EXAFS de ambas especies difieren considerablemente lo que sugiere que junto con la reducción deben producirse cambios significativos en la esfera de coordinación del metal. Los datos de EXAFS para la bromoperoxidasa nativa son consistentes con un oxígeno a 1,61 Å, tres átomos de oxígeno a 1,72 Å y dos átomos de nitrógeno a 2,11 Å. Puesto que la técnica de EXAFS no puede discriminar entre nitrógeno y oxígeno, también puede suceder que uno o dos átomos de oxígeno en vez de nitrógeno estén presentes a 2,11 Å. También es posible que uno de estos átomos de oxígeno provenga del agua. La distancia más corta V-O es similar a aquellas vistas en los sistemas vanadatos o alcoxi-vanadio (V) [45,46].

La Fig. 1 muestra la estructura del sitio activo en las bromoperoxidasas, propuesta originalmente por Arber y colaboradores.



**Figura 1.** Estructura del sitio activo de las V-BrPO

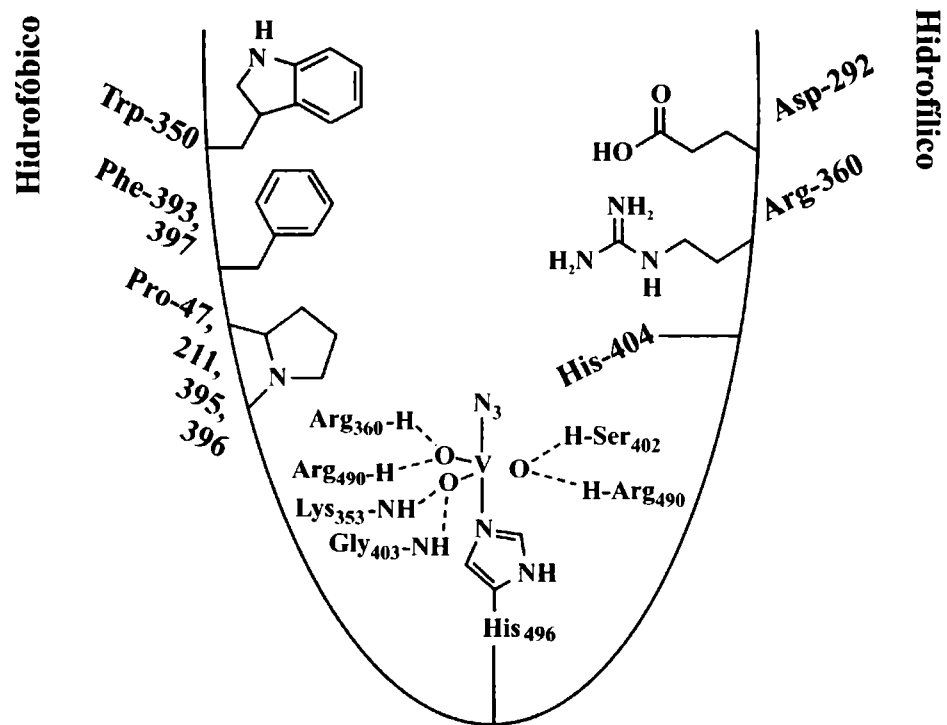
### ***Estructura de Rayos X de las V-CLPO***

Un avance importante en el estudio y caracterización de estos sistemas se logró en 1996, año en que Messerschmidt y Wever lograron realizar un estudio cristalográfico de mediana resolución del sitio activo de la cloroperoxidasa del hongo *Curvularia inaequalis* [47]. Este estudio mostró que la proteína es cilíndrica con dimensiones aproximadas de 80 x 55 Å. Dos estructuras de cuatro hélices conforman la estructura principal  $\alpha$  helicoidal. El sitio del vanadio se encuentra en el extremo de esta estructura alineado hacia un lado

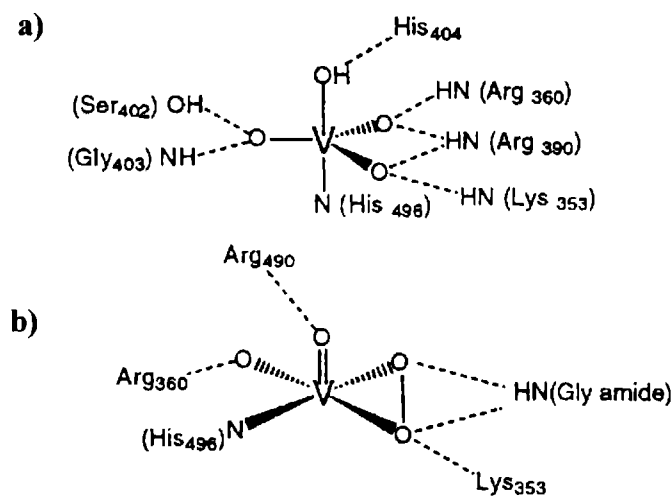
con residuos predominantemente polares incluyendo un par iónico entre Arg 360 y Asp 292 y varias cadenas principales que contienen oxígenos carbonílicos, tal como se muestra en la Fig. 2. Hacia el otro lado el residuo es hidrofóbico y contiene Pro-47, Pro-211, Tyr-350, Phe-393, Pro-396 y Phe-397. El sitio metálico es notablemente simple y se muestra en la Fig. 3a. El vanadio (V) está coordinado a un nitrógeno proveniente de un residuo de proteína, His 496, tres átomos de oxígeno no proteicos en el plano ecuatorial, y un átomo de oxígeno apical proveniente de un ligando hidróxido [48]. Todos los átomos de oxígeno están unidos a hidrógenos de las cadenas laterales de aminoácidos, lo cual reduce la carga negativa alrededor del centro metálico. Cabe aclarar que la estructura de rayos X de V-CIPO fue resuelta para el derivado coordinado con azida, el cual se obtuvo de la cristalización de la proteína a partir de un buffer que contiene ese anión. En esta estructura se encontró que el grupo azida coordina en una posición axial tal como se muestra en la Fig. 2.

La estructura de rayos X del derivado de V-CIPO que contiene un grupo peróxido unido al vanadio, se muestra en la Fig. 3b [47]. La geometría en torno del vanadio es la de una bipirámide trigonal distorsionada. El vanadio está coordinado en el plano ecuatorial con el grupo peróxido junto con un átomo de oxígeno y un nitrógeno proveniente de la His 496. Un ligando óxido unido axialmente completa la geometría piramidal [49-51].

Si bien la estructura de rayos X para las V-BrPO no ha sido resuelta hasta la fecha, estudios estructurales preliminares de estas enzimas han permitido determinar que existe una fuerte homología en la secuencia de aminoácidos particularmente en la región del sitio del vanadio [49-51].



**Figura 2.** Estructura de rayos X de V-CIPO (*C. Inaequalis*). El grupo azida coordinado al vanadio proviene del buffer en el cual se hizo la cristalización. Tomado de cita [52]

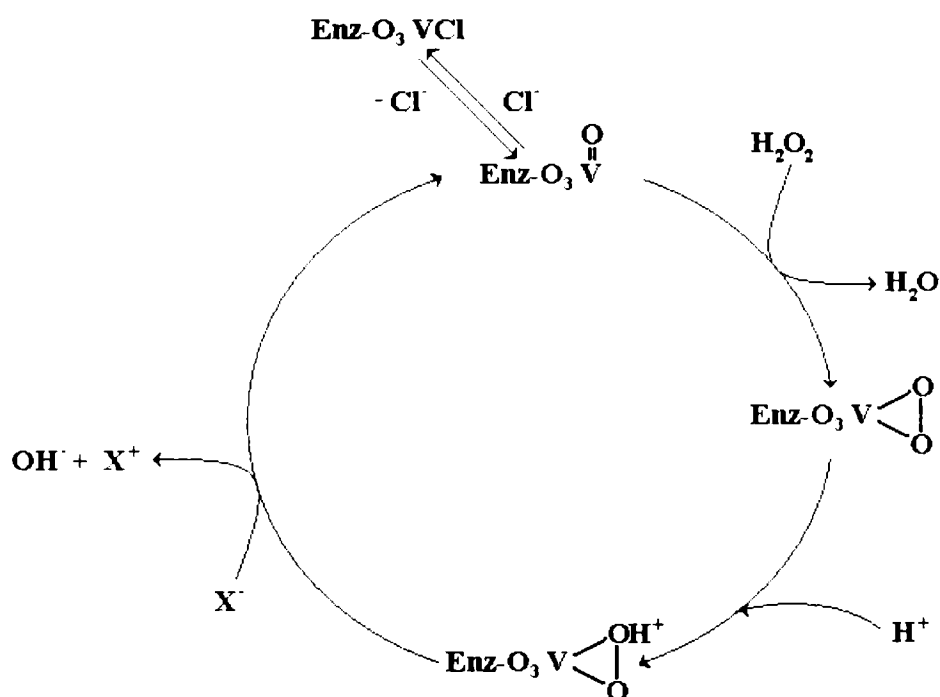


**Figura 3:** a) Estructura del sitio nativo de V-CIPO b) Estructura del derivado de V-CIPO que contiene un grupo peróxido unido a vanadio. Tomado de cita [52]



### Mecanismo de la reacción enzimática

Las V-BrPO desempeñan un papel muy importante en la síntesis natural de especies bromadas [16]. Basado en numerosos estudios enzimológicos, así como en estudios con modelos de diverso tipo, se ha propuesto un mecanismo general para la oxidación de haluros catalizada por vanadio-haloperoxidasas [53] y que se muestra en la Fig. 4.

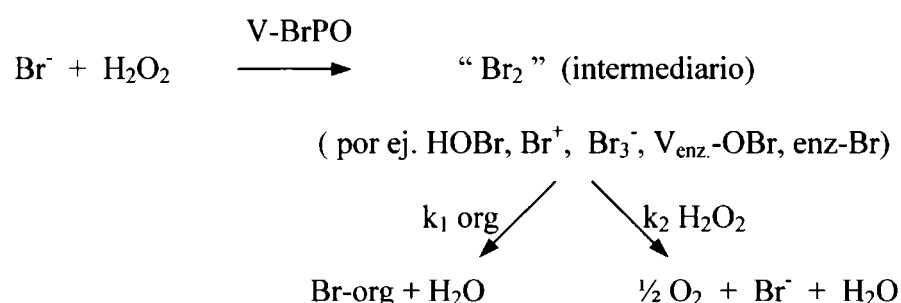


**Figura 4.** Mecanismo general para la oxidación de haluros catalizada por vanadio-haloperoxidasas

Las velocidades de reacción de cloruro y bromuro han mostrado ser altamente dependientes del pH. La protonación del residuo de His.404 aparece como muy importante para la activación del complejo de peroxovanadio, ya que la protonación del complejo parece ser esencial para la actividad catalítica.

El modo de acción más comúnmente aceptado para las V-BrPO involucra la catálisis de la oxidación del ion bromuro por peróxido de hidrógeno para formar un intermediario oxidado en dos electrones, "equivalente al bromo", sólo por llamarlo de alguna manera, ya que la naturaleza real de tal intermediario es aún bastante oscura [54]. Tal intermediario [35,54,55] puede bromar sustancias orgánicas (org) o reaccionar con otra

molécula de peróxido de hidrógeno para formar oxígeno (es decir, con actividad tipo catalasa), según se muestra en el siguiente esquema [56,57]:



Los parámetros cinéticos del estado estacionario de estas dos reacciones coinciden en un factor de dos, lo cual implica que ambos caminos proceden a través de un intermediario común, siendo este paso el que tiene la velocidad limitante [58].

Si bien no se conoce con exactitud el rol del vanadio en las V-BrPO, se ha sugerido, en base a los estudios espectroscópicos, que durante la catálisis el vanadio no sufre cambios redox y se ha propuesto para el mismo una función de ácido de Lewis [59], lo cual difiere de la mayoría de las peroxidasas cuyo sitio activo está formado por un grupo Hemo [60]. La forma reducida de la enzima (vanadilo) es inactiva y no puede ser reactivada por adición de peróxido y / o bromuro [36]. Por otra parte, hasta la fecha, no hay ninguna evidencia que sugiera que la enzima pueda contener V(III). La función de ácido de Lewis es consistente con las observaciones realizadas durante el ciclo catalítico de la enzima. Por ej. el espectro UV de las V-BrPO cambia con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se restablece cuando se agrega bromuro [31]. Sobre la base de estas observaciones, De Boer y Wever [35] sugirieron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se une a la enzima antes que el bromuro sea oxidado [25] y propusieron entonces que las V-BrPO ejercen su efecto catalítico al formar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **un peroxo complejo de vanadio**, el cual es un oxidante más efectivo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este complejo reacciona luego con el ion Br<sup>-</sup> oxidándolo a un intermediario, el cual sería finalmente el encargado de bromar el sustrato orgánico.

En relación con estos descubrimientos y teniendo en cuenta los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral se intentó obtener diversos modelos sencillos que permitan simular la actividad de este tipo de sistemas naturales y nos acerquen a una más clara comprensión acerca de su funcionamiento y propiedades generales.

Varios de los bien conocidos peroxo complejos de vanadio se presentan como una buena alternativa para ser usados como modelos funcionales de estas enzimas, y algunos de ellos serán estudiados en los capítulos siguientes.

## **Bibliografía**

1. Baran, E.J., *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill, Interamericana de España S.A., Madrid (1995).
2. Arber, J.M., Dobson, B.R., Eady, R.R., Hasnain, S.S., Garner, C.D., Matsushita, T., Namura, M. y Smith, B.E., *Biochem. J.* **258**, 733 (1989).
3. Atkins, W.R.G., *Scient. Proc. R. Dublín Soc.* **14**, 199 (1914).
4. Reed, G. B., *Bot. Gaz.* 407 (1915).
5. Dunford, H.B. y Stillman, J.S., *Coord. Chem. Rev.* **19**, 187 (1976).
6. Theiler, R. F., Siuda, J.S. y Hager, L.P. en P.N. Kaul y C.J. Sindermann, (Editores) *Drugs and Food from the Sea, Myth or Reality*, 153. The University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, (1978).
7. Pedersen, M., *Physiol. Plant.* **37**, 6 (1976).
8. Manthey, J.A. y Hager, L.P., *J. Biol. Chem.* **256**, 11232 (1981).
9. Vilter, H. y Glombitza, K.W. *Bot. Mar.* **26**, 341 (1983).
10. Vilter, H., *Bot. Mar.* **26**, 429 (1983).
11. Vilter, H., *Bot. Mar.* **26**, 451 (1983).
12. Wever, R., Plat, H. y De Boer, E., *Biochim. Biophys. Acta* **830**, 181 (1985).
13. De Boer, E., Van Kooyk, Y., Tromp, M.G.M., Plat, H. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 48 (1986).
14. Krenn, B.E., Plat, H. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **912**, 287 (1987).
15. Plat, H., Krenn, B.E. y Wever, R., *J. Biochem.* **248**, 277 (1987)
16. Butler, A., en Reedijk, J., (Editor), *Bioinorganic Catalysis*, Marcel Dekker, New York, p 425 (1992).
17. Neidleman, S. L., y Geigert, J., *Biohalogenation: Principles, Basic roles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, (1986).
18. Butler, A. y Walker, J.V., *Chem. Rev.* **93**, 1937 (1993).
19. Geschwend, P.M., Macfarlane, J.K. y Newman, K.A., *Science* **227**, 1033 (1985).
20. Krenn, B.E., Tromp, M.G.M. y Wever, R., *J. Biol. Chem.* **264**, 19287 (1989).
21. De Boer, E., Tromp, M.G.M., Plat, H., Krenn, B.E. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **872**, 104 (1986).

22. Wever, R., Krenn, B.E., De Boer, E., Offenberg, H. y Plat, H. *Prog. Clin. Biol. Res.* **274**, 477 (1988).
23. Soedjak, M.S. y Butler, A. *Biochemistry* **29**, 7974 (1990).
24. Vilter, H., *Phytochemistry* **23**, 1387 (1984)
25. Fries, L., *Planta* **154**, 393 (1982).
26. Meisch, H.U. y Bielig, H. J., *Arch. Microbiol.* **105**, 77 (1975).
27. Meisch, H.U., Benzschawel, H. y Bielig, H. J., *Arch. Microbiol.* **114**, 67 (1977).
28. Meisch, H.U. y Benzschawel, H. *Arch. Microbiol.* **116**, 91 (1978).
29. Meisch, H.U. y Bauer, J., *Arch. Microbiol.* **117**, 49 (1978).
30. Nielsen, F.H. y Uthus, E.O. en Chasteen, N.D. (Editor) *Vanadium in Biological Systems: Physiology and Biology*, Kluwer Academic, Publishers Dordrecht, p 51 (1990).
31. Tromp, M.G.M., Olafsson, G., Krenn, B.E. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 192 (1989).
32. Tromp, M.G.M. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 53 (1991).
33. Chasteen, N.D., en Chasteen, N.D. (Editor) *Vanadium in Biological Systems: Physiology and Biology*, Kluwer Academic, Publishers Dordrecht, p 7 (1990).
34. De Boer, E., Plat, H., Tromp, M.G.M., Franssen, M.C.R., Van der Plas, H.C., Meijer, E.M., Schoemaker, H.E. y Wever, R., *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 607 (1987).
35. De Boer, E. y Wever, R., *J. Biol. Chem.* **263**, 12326 (1988).
36. De Boer, E., Boon, K. y Wever, R., *Biochemistry* **27**, 1629 (1988).
37. Chasteen, N.D., en L. Berliner y J. Reuben, (Editores) *Biological Magnetic Resonance*, Vol 3, 53, Plenum Press, New York (1981).
38. Boucher, L. J., Tyn, E. C. y Yen, T.F., en T. F. Yen, (Editores), p 11, Plenum Press, New York, (1969)
39. Sakurai, H., Hirata, J. y Murray, K. S., *Inorg. Chim. Acta* **152**, 177 (1988).
40. Dutton, J.C., Fallon, G.D. y Murray, K. S., *Inorg. Chem.* **27**, 34 (1988).
41. De Boer, E., Keijzers, C.P., Klaasen, A. A. K., Reijerse, E. J., Collison, D., Garnet, C.D. y Wever, R., *FEBS. Lett.* **235**, 93 (1988).
42. Hormes, J., Kuetgens, O., Chauvistre, R., Schreiber, W., Anders, N., Vilter, H., Rehder, D. y Weidemann, C., *Biochim. Biophys. Acta* **9561**, 293 (1988).

43. Arber, J.M., De Boer, E., Garner, C.D., Hasnain, S.S. y Wever, R., *Biochemistry* **28**, 7968 (1989).
44. Arber, J. M., De Boer, E., Eady, R. R., Garner, C.D., Hasnain, S. S., Smith, B.E. y Wever, R., *The Second Intern. Conference on Biophysics and Synchrotron Radiation*, p 72, Chichester, U.K., 4-8 July, (1988).
45. Scheidt, W.R., *Inorg. Chem.*, **12**, 1758 (1973).
46. Caughalan, C.N., Smith, H.M. y Waterpugh, K. *Inorg. Chem.* **5**, 2131 (1966).
47. Messerschmidt, A. y Wever, R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 329 (1996).
48. Messerschmidt, A., Prade, L. y Wever, R., *Biol. Chem.* **378**, 309, (1997).
49. Vilter, H. en H. Sigel (Editor) *Metal Ions in Biological Systems* **31**, 325 (1995).
50. Vreeland, V., Epstein, K. Ng. L., *DDBJ / EMBL / Gen Bank Data Bank*, Accession number AF0534 11 (1998).
51. Shimonishi, M., Kuwamoto, S., Inoue, H., Wever, R., Ohshiro, Y., Izumi, Y. y Tanabe, T., *FEBS. Lett.* **428**, 105 (1998).
52. Butler, A., *Coordination Chemistry Reviews* **187**, 17 (1999)
53. Slobodnick, C., Hamstra, B.J. y Pecoraro, V.L., *Struct. Bonding* **89**, 51 (1977).
54. Hager, L. P., Morris, D. R., Braun, F.S. y Eberwein, H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1769 (1966).
55. Clague, M. J., Keder, N. L. y Butler, A., *Inorg. Chem.* **32**, 4754 (1993).
56. Everett, R.R., Kanofsky, J.R. y Butler, A., *J. Biol. Chem.* **265**, 4908 (1990).
57. Soedjak, H.S. y Butler, A., *Biochemistry* **29**, 7974 (1990).
58. Everett, R.R. y Butler, A., *Inorg. Chem.* **28**, 393 (1989).
59. Butler, A. y Carrano, C.J., *Coord. Chem. Rev.* **109**, 61 (1991).
60. Dawson, J.H., *Science* **240**, 433 (1988).

# *Capítulo 1*

---

*Peroxo Complejos de  
Vanadio (V)*

---

## 1.1. Aspectos Generales

Se conoce desde hace mucho tiempo que el anión peróxido es un excelente ligando para el vanadio (V), formando distintos tipos de peroxovanadatos [1,2], siendo las especies más importantes los monoperoxovanadatos y los diperoxovanadatos [2]. Los peroxovanadatos son complejos muy estables lo cual ha permitido en muchos casos su caracterización estructural. La reactividad de este tipo de complejos es rica y variada ya que participan en un gran número de reacciones de oxidación entre los que podemos citar:

- 1) Los alquenos y alcoholes alílicos pueden ser epoxidados e hidroxilados en presencia de estos complejos [3-11].
- 2) Los sulfuros pueden ser oxidados a sulfóxidos y sulfonas [11-15].
- 3) Alcoholes primarios y secundarios son oxidados a aldehídos o cetonas [16,17].
- 4) El ácido nicotínico en presencia de este tipo de complejos da una inusual reacción de sustitución en el carbono 6 generando ácido 6-(1-hidroxiethyl) nicotínico [18], etc.

Tanto los monoperoxo como los diperoxovanadatos pueden formar complejos con un gran número de ligandos. Entre los ligandos de interés podemos citar policarboxilatos [19,20], aminopolicarboxilatos [21,22], 2,2' bipyridina y o-fenantrolina [23], ácidos  $\alpha$  hidroxipolicarboxílicos [20], citratos [19], etc. Una característica fundamental de la química de coordinación del vanadio es la relativa facilidad con que puede modificar su geometría de coordinación, así como también el estado de oxidación del vanadio central, dependiendo de los ligandos a los que se encuentra asociado. Esta importante característica (estereoquímica no rígida del vanadio) y la presencia en la esfera de coordinación del grupo peroxo junto con otros ligandos puede modificar el potencial redox de la cupla V(V)/V(IV) y por lo tanto la transferencia de un electrón intramolecular puede generar o barrer los peligrosos radicales libres derivados de la molécula de oxígeno, lo cual puede producir efectos tóxicos o beneficiosos [24,25]. En efecto, se ha encontrado que este tipo de compuestos tiene una importante actividad farmacológica [26] por ejemplo, en el tratamiento de algunos tipos de leucemia [27], así como también propiedades antibacterianas [24,25], antifúngicas [24,25], actividad insulínica tanto *in vivo* como *in vitro* [28-30] y actividad bromoperoxidasa [31,32].





## 1.2. Propiedades Estructurales y Espectroscópicas

El grupo peroxo es bidentado triangular en todos los casos conocidos, tal como se observa en la Fig. 1.

Los complejos monoméricos de oxo peroxo vanadio (V) tienen uno o dos grupos peroxos unidos en el plano ecuatorial relativo al ligando axial oxo. En la mayoría de los complejos, la estructura de los mismos es la de una pirámide pentagonal. Sin embargo, en algunos casos donde la geometría es una bipirámide pentagonal, el ligando oxo de otra molécula puede servir como séptimo ligando en una unión axial más larga con el centro metálico.



**Figura 1.** Coordinación geométrica de los mono y diperoxo complejos de vanadio (V)

La diferencia fundamental en la coordinación del grupo peroxo entre los complejos mono y diperoxo es la variación en la longitud de enlace de la unión peroxo O-O.

En general, se observa que esta unión es más larga en los complejos diperoxo, que en los complejos monoperoxo. Además en estos últimos, el peroxo está simétricamente coordinado, mientras que en los diperoxo complejos la unión V-O<sub>trans</sub> es ligeramente más larga que la unión V-O<sub>cis</sub>, donde V-O<sub>trans</sub> y V-O<sub>cis</sub> están definidos en la Fig. 1.

Los estudios espectroscópicos IR y Raman, también han provisto considerable información acerca de la estructura de estos compuestos [33]. En efecto, los modos de coordinación del peroxo se pueden establecer usando estas técnicas.

La coordinación bidentada del grupo peróxido crea un entorno local C<sub>2v</sub>, el cual tiene tres modos activos en IR y Raman (2A<sub>1</sub> + B<sub>1</sub>).

- 1) Estiramiento O-O, aproximadamente en  $880\text{ cm}^{-1}$  de simetría  $A_1$
- 2) Estiramiento antisimétrico V-O, aproximadamente en  $600\text{ cm}^{-1}$  de simetría  $B_1$
- 3) Estiramiento simétrico V-O, aproximadamente en  $500\text{ cm}^{-1}$  de simetría  $A_1$

Debe mencionarse que los estiramientos metal-peroxo (V-O) no son siempre claramente distinguibles [33]. Sin embargo en ausencia de ligandos que interfieran, se pueden determinar a partir de estos estiramientos, importantes diferencias estructurales. Por ej. en los monoperoxo complejos estas vibraciones prácticamente se superponen alrededor de  $560\text{ cm}^{-1}$ .

Un ligando monodentado en un complejo diperoxo origina una separación de estas bandas de aproximadamente  $100\text{ cm}^{-1}$  y las dos bandas aparecen cerca de  $630$  y  $520\text{ cm}^{-1}$ . En cambio un ligando bidentado causa una separación de aproximadamente  $40\text{ cm}^{-1}$ , y las bandas aparecen entre  $625$  y  $585\text{ cm}^{-1}$  [34].

### **1.3. Formación de Peroxo Complejos de Vanadio (V) en Solución Acuosa**

En solución acuosa el peróxido coordina fácilmente con el vanadio (V), formando monoperoxo, diperoxo, triperoxo y aun tetraperoxo complejos (1,2).

El equilibrio de distribución de estos complejos es altamente dependiente del pH, aunque en general, se necesitan condiciones de pH elevado para promover la coordinación de múltiples ligandos peroxo ( $\geq 2$ ) [35].

En solución acuosa el vanadio (V) forma distintas especies de oxovanadio (V), cuya abundancia depende de la concentración, pH, fuerza iónica, temperatura y de la presencia de otras sustancias. En la Fig. 2 se muestran las principales especies mononucleares de vanadato en función del pH.

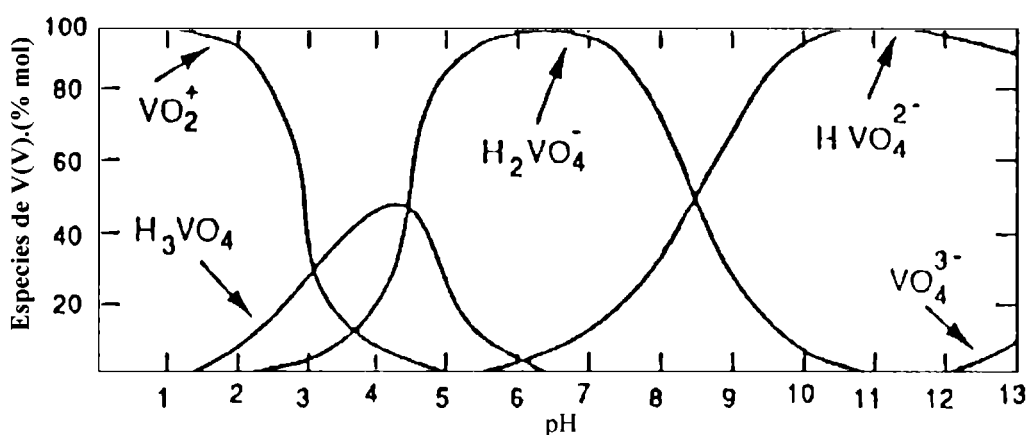
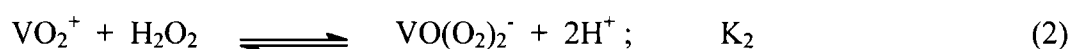
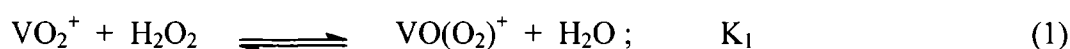


Figura 2. Principales especies mononucleares de vanadato en función del pH.

Como puede verse, en el intervalo de pH entre 4 y 12, el vanadio (V) existe principalmente como un oxoanión monomérico ( $\text{VO}_4^{3-}$ ,  $\text{HVO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) [36,37], mientras que bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} < 2$ ), la especie predominante es *cis*  $\text{VO}_2^+$  [38]. Bajo condiciones neutras y básicas la coordinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con vanadato da peroxovanadatos aniónicos con uno a cuatro ligandos peróxidos coordinados y peroxodivanadatos [39-41]. Bajo condiciones ácidas, la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{VO}_2^+$  puede dar una especie roja de oxomonoperoxo,  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  y una especie amarilla de oxidiperoxo,  $\text{VO}(\text{O}_2)_2^-$  tal como se describe a continuación:



En base a mediciones espectrofotométricas, se determinaron las constantes de equilibrio  $K_1$  y  $K_2$  cuyos valores son:

$K_1 = 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $K_2 = 1,3 \text{ M}$  a  $1,0 \text{ M}$  de fuerza iónica y  $25^\circ$  [42] y  $K_1 = 3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $K_2 = 0,6 \text{ M}$  a  $0,3 \text{ M}$  de fuerza iónica y  $25^\circ$ , lo que demuestra que  $K_2$  pero no  $K_1$  es sensible a la fuerza iónica [43].

La coordinación del primer equivalente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con  $\text{VO}_2^+$  es independiente del ácido. Cuando coordina el segundo equivalente de peróxido, se liberan dos equivalentes de

ácido. Consecuentemente, la concentración relativa de  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  y  $\text{VO}(\text{O}_2)_2^-$  depende de la concentración de ácido así como también de la concentración de peróxido de hidrógeno. La formación del anión  $\text{VO}(\text{O}_2)_2^-$  se ve favorecida en un medio con baja concentración de ácido y alta concentración de peróxido, mientras que la formación del catión  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  se ve favorecida en un medio con alta concentración de ácido y baja concentración de peróxido.

## 1.4. Bibliografía

1. Harrison, A. T. y Howarth, O.W., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1173 (1985).
2. Jaswall, J. S. y Tracey, A.S., *Inorg. Chem.* **30**, 3718 (1991).
3. Talsi, E. P., Chinakov, V. D., Babenko, V.P. y Zamaraev, K.I., *React. Kinet. Catal. Lett.* **44**, 257 (1991).
4. Talsi, E. P., Chinakov, V. D., Babenko, V.P. y Zamaraev, K.I., *J. Mol. Catal.* **81**, 235 (1993).
5. Sharpless, K. B. y Michaelson, R.C., *J. Am. Chem Soc.* **95**, 6136 (1973).
6. Michaelson, R.C., Palermo, R.E. y Sharpless, K. B., *J. Am. Chem Soc.* **99**, 1990 (1977).
7. Sharpless, K. B. y Verhoeven, T. R., *Aldrich Chemica Acta* **12**, 63 (1979).
8. Mimoun, H., Saussine, L., Daire, E., Postel, M., Fischer, J. y Weiss, R., *J. Am. Chem Soc.* **105**, 3101 (1983).
9. Mimoun, H., Chaumette, P., Mignard, M., Saussine, L., Fischer, J. y Weiss, R., *Nouv. J. Chim.* **7**, 467 (1983).
10. Mimoun, H., Mignard, M., Brechot, P. y Saussino, L., *J. Am. Chem Soc.* **108**, 3711 (1986).
11. Bortolini, O., Di Furia, F., Scrimin, P. y Modena, G., *J. Mol. Catal.* **7**, 59 (1980).
12. Nakajima, K., Kojima, M., Toriumi, K., Saito, K. y Fujita, J., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **62**, 760 (1989).
13. Ballistreri, F. P., Tomaselli, G. A., Toscano, R. M., Conte, V. y Di Furia, F., *J. Am. Chem Soc.* **113**, 6209 (1989).
14. Bortolini, O., Di Furia, F., Scrimin, P. y Modena, G., *J. Mol. Catal.* **16**, 61 (1982).
15. Bonchio, M., Conte, V., Di Furia, F., Modena, G., Padovani, C. y Sivak, M., *Res. Chem. Intermed.* **12**, 111 (1989).
16. Bortolini, O., Conte, V., Di Furia, F. y Modena, G., *Nouv. J. Chim.* **9**, 147 (1985).
17. Conte, V., Di Furia, F. y Modena, G., *J. Org. Chem.* **53**, 1665 (1988).
18. Puryear, B. C., Abelt, C. J. and Djordjevic, C., *Inorg. Chim. Acta* **149**, 15 (1988).

19. Djordjevic, C., Lee, M. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **28**, 719 (1989).
20. Djordjevic, C., Lee, M. y Sinn, E., *Inorg. Chim. Acta* **233**, 97 (1995).
21. Djordjevic, C., Craig, S. A. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **24**, 1281 (1985).
22. Djordjevic, C., Wilkins, P. L., Sinn, E. y Butcher, R. J., *Inorg. Chim. Acta* **230**, 241 (1995).
23. Vuletic, N. y Djordjevic, C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans* 1137 (1973).
24. Fridovich, I. en G. L. Eichhorn y L. G. Marzilli, (Editores) *Advances in Inorganic Biochemistry*, Vol 1, Elsevier, New York, p 67 (1979).
25. Floyd, R. A., *Free Radicals and Cancer*, Marcel Dekker, New York, (1982).
26. Baran, E. J., *Acta Farm. Bonaerense* **16**, 43 (1997).
27. Djordjevic, C. y Wampler, G. L., *J. Inorg. Biochem.* **25**, 51 (1985).
28. Shaver, A., Ng., J. B., Hall, D. A., Loon, B. S. y Posner, B. I., *Inorg. Chem.* **32**, 3109 (1993).
29. Thompson, K.H., Mc Neill, J.H. y Orvig, C., en Clarke, M.J. y Sadler, P.J., (Editores) *Metallopharmaceuticals II*, Springer Verlag, Berlín; p 139, (1999).
30. Thompson, K.H. y Orvig, C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2885 (2000).
31. Wever, R. y Kustin, K., *Adv. Inorg. Chem.* **35**, 81 (1990).
32. Djordjevic, C., Lee, M., Jacobs, B. A. y Puryear, B. C., *J. Inorg. Biochem.* **36**, 239 (1989).
33. Griffith, W. y Wickins, T. D., *J. Chem. Soc. A* **1968**, 397.
34. Schwendt, P., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **48**, 248 (1983).
35. Butler, A., Clague, M. J. y Meister, G. E., *Chem. Rev.* **94**, 625 (1994).
36. Gresser, M. J. y Tracey, A. S., *J. Am. Chem Soc.* **107**, 4215 (1985).
37. Harnung, S. E., Larsen, E. y Pedersen, E. J., *Acta Chem. Scand.* **47**, 674 (1993).
38. Pope, M. T. y Dale, B. W., *Q. Chem. Soc. Rev.* **22**, 527 (1968).
39. Howarth, O. W. y Hunt, J. R., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1388 (1979).
40. Harrison, A. T. y Howarth, O. W., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1173 (1985).
41. Campbell, N. J., Dengel, A. C., y Griffith, W. P., *Polyhedron*, **8**, 1379 (1989).
42. Secco, F., *Inorg. Chem.* **19**, 2722 (1980).

43. Orhanovic, M. y Wilkins, R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 278 (1967).

# *Capítulo 2*

---

*Síntesis y Propiedades  
Espectroscópicas de  
Oxoperoxo Complejos de  
Vanadio (V)*

---

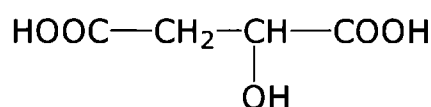


## 2.1. Oxoperoxo(malato)vanadato (V)

### 2.1.1. Introducción

Los peroxo complejos de vanadio (V) con bio-heteroligandos tales como el ácido málico (HOOC-CHOH-CH<sub>2</sub>-COOH), cuya estructura se esquematiza en la Fig. 1, representan una interesante clase de compuestos [1,2,3], que desempeñan un importante papel como intermediarios de vida corta en un gran número de bioprocesos que involucran especies derivadas de la molécula de oxígeno. Los ligandos coordinados con el vanadio, además del grupo peroxo, a los que usualmente nos referimos como heteroligandos, determinan la reactividad de los grupos peróxidos y ponen a punto el potencial redox de la cupla V(V)/V(IV) en la biomateria, tal como se observa en numerosas oxidaciones catalíticas [4,5]. La estereoquímica no rígida del vanadio (V) permite interacciones reversibles con pequeñas o grandes moléculas del entorno biológico, las cuales gobiernan junto con el proceso de intercambio redox V(V)/V(IV) numerosas funciones beneficiosas o tóxicas del vanadio en mamíferos y plantas [6,7]. Este tipo de complejos, efectivamente han demostrado una actividad antitumoral contra ciertos tipos de leucemia [3].

El ácido málico desempeña un importante papel en el metabolismo, ya que forma parte del ciclo del ácido cítrico, de la interconversión malato-aspartato, etc. Por su parte el vanadio se encuentra en alta concentración en la mitocondria, y la deficiencia de vanadio se ha encontrado que provoca disturbios como por ej. en el metabolismo de los lípidos [1,8,9].



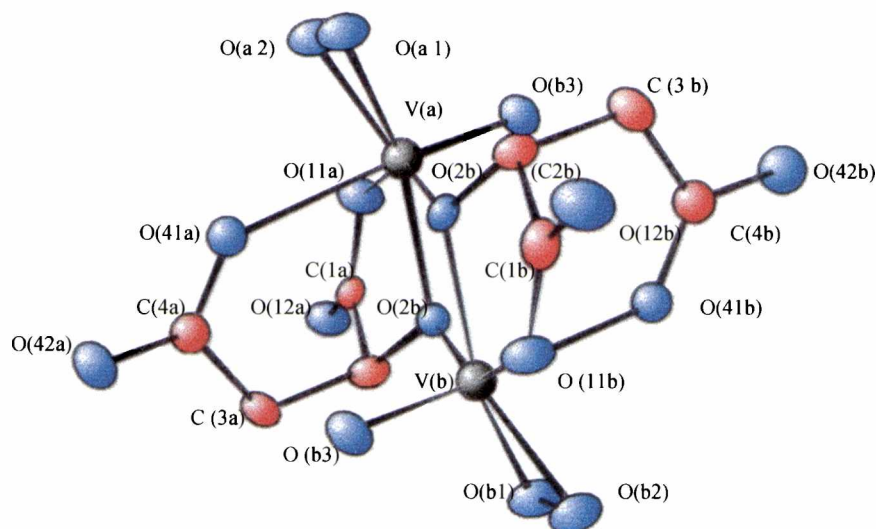
*Figura 1. Esquema de la molécula de ácido málico*

Los peroxo(malato)vanadatos (V) que estudiaremos en este capítulo representan una interesante clase de peroxo-hidroxilcarboxilato vanadatos (V), en los cuales el ion malato puede actuar como un ligando bidentado o tridentado y puede perder uno, dos o tres protones.

Por todo lo expuesto anteriormente nos pareció interesante realizar la síntesis y estudio espectroscópicos de estos compuestos de fórmula  $M(I)[VO(O_2)(C_4H_4O_5)] \cdot H_2O$  donde  $M(I) = Na^+, K^+, NH_4^+$  y  $Cs^+$

### 2.1.2. Características Estructurales

Los complejos con ácido málico,  $M(I)[VO(O_2)(C_4H_4O_5)] \cdot H_2O$  donde  $M(I) = Na^+, K^+, NH_4^+$  y  $Cs^+$ , adoptan la estructura del anión dimérico presentado en la Fig. 2. La estructura de rayos X [10] revela la existencia de una unión tridentada del ligando ácido málico con el vanadio. La coordinación alrededor de cada átomo de vanadio es esencialmente la de una bipirámide pentagonal distorsionada tal como se observa en la mayoría de los oxo peroxo vanadatos [3,11,12].



**Figura 2.** Estructura del anión dimérico  $[VO(O_2)(C_4H_4O_5)]_2^{2-}$  Tomado y modificado de cita [10]

El dímero está unido por oxígenos hidroxílicos los cuales forman un plano rómbico perfecto con los dos átomos de vanadio. Este plano está ligeramente inclinado ( $11^\circ$ ) respecto del plano ecuatorial de la bipirámide que contiene los dos oxígenos del grupo peroxo (coordinación bidentada), y un átomo de oxígeno del grupo carboxilato vecino (por ej.,  $V_a-O_{11a}$ ). Las posiciones axiales están ocupadas por el grupo oxo y un átomo de oxígeno del otro grupo carboxilato (por ej.,  $V_a-O_{41a}$ ). Como es usual [3,11,12] en este tipo de compuestos, el átomo de vanadio está desplazado aproximadamente  $0,30 \text{ \AA}$  del plano ecuatorial hacia el grupo oxo terminal. El ion malato tridentado tiene dos cargas negativas y retiene un protón el cual se cree que está deslocalizado y formando una unión hidrógeno

con oxígenos adyacentes. Los estudios de rayos X revelan también una unión hidrógeno en red a través de la molécula de agua de cristalización alrededor del dímero. Las uniones V-O del puente son mucho más cortas que las usuales y no muy diferentes entre sí, lo que indica que los oxígenos hidroxílicos de dicho puente están deprotonados [3].

### 2.1.3. Síntesis de los complejos

Los complejos se prepararon siguiendo la técnica descrita por Djordjevic y col. [10], de la siguiente manera:

#### 1) Oxoperoxo(malato)vanadato (V) de potasio: $\text{K}[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5)] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Se disuelve 1 g de  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 20 mL de agua destilada que contiene 0,6 g de KOH, con calentamiento a  $40^\circ\text{C}$ , bajo constante agitación. La solución resultante se filtra y se enfría en un baño de hielo. Se agrega a esta solución lentamente 1,5 g de ácido málico DL disueltos en 5 mL de agua destilada. Se obtiene una solución de color naranja claro a la cual se le agregan 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % gota a gota y con agitación hasta obtener una solución roja oscura cuyo pH final es 4,5. La precipitación se induce con el agregado de etanol al 95 % hasta turbidez permanente. La mezcla de reacción se deja toda la noche a  $5^\circ\text{C}$ . Se obtienen cristales rojos que se filtran y se lavan con etanol al 50 %, 75 % y finalmente con etanol absoluto.

#### 2) Oxoperoxo(malato)vanadato (V) de cesio: $\text{Cs}[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5)] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Se sigue el mismo procedimiento anterior hasta la obtención de la solución roja con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se disuelve 1,98 g de CsCl en una mínima cantidad de agua destilada y se agrega a la mezcla anterior agitando vigorosamente. Se deja la mezcla a una temperatura de  $5^\circ\text{C}$  toda la noche y se obtienen cristales rojos que se filtran y se lavan como en el caso anterior.

#### 3) Oxoperoxo(malato)vanadato (V) de sodio: $\text{Na} [\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5)] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Se disuelven 0,5 g de  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 10 mL de agua destilada que contiene 0,22 g de NaOH mediante agitación y suave calentamiento hasta obtener una solución clara (filtrar si

es necesario). Luego se continúa tal como se describe en la preparación del complejo de potasio y se obtienen cristales rojos anaranjados.

#### 4) Oxoperoxo(malato)vanadato (V) de amonio: $\text{NH}_4 [\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5)] \cdot \text{H}_2\text{O}$

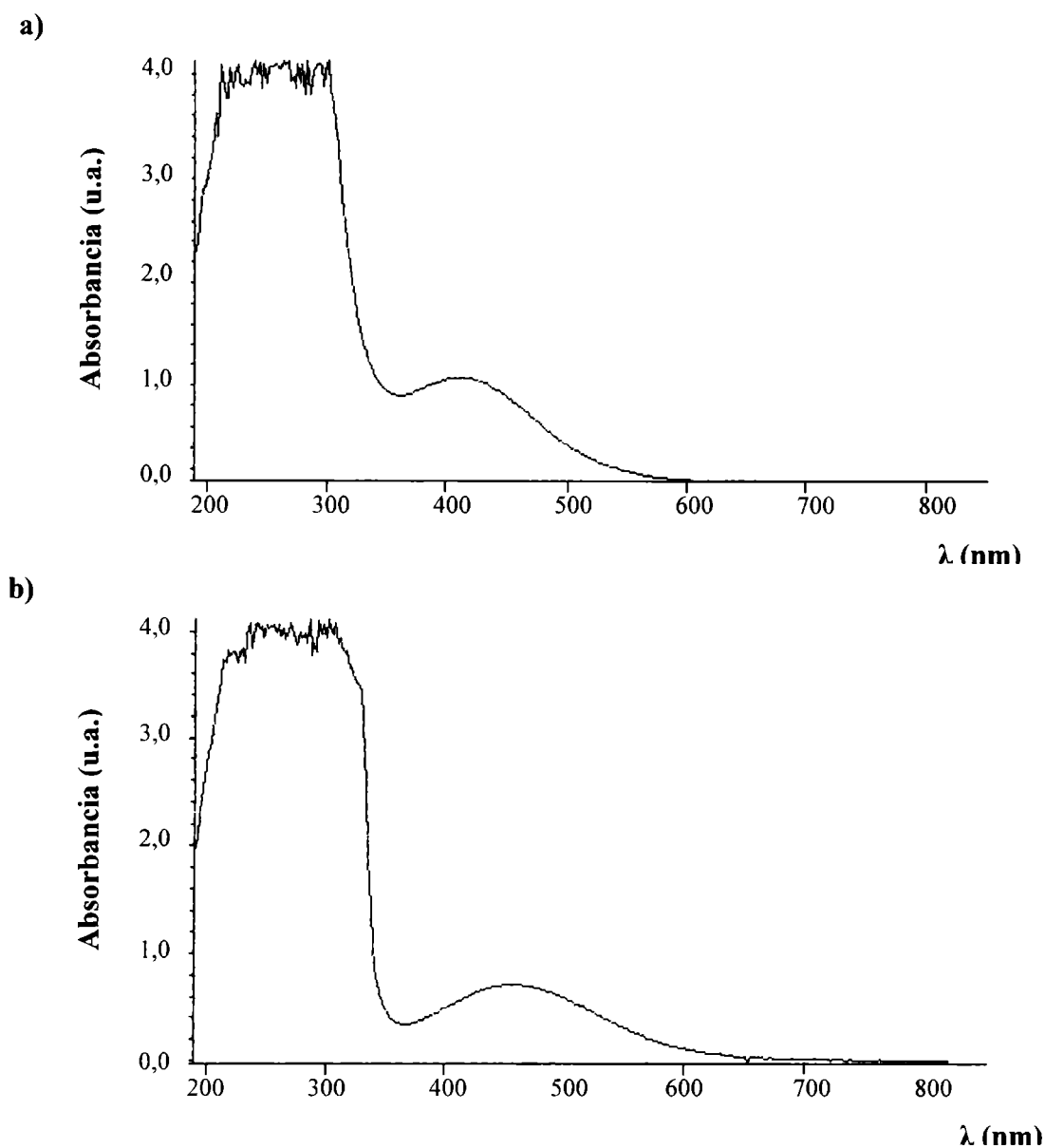
Se disuelven 1,2 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 20 mL de agua destilada y se calienta suavemente a  $40^\circ\text{C}$ . Se agregan 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y 0,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , lentamente y bajo constante agitación. Después de aproximadamente 15 min se obtiene una solución clara de color amarillo anaranjado, que se enfría en un baño de hielo. Se disuelven 1,5 g de ácido málico en 5 mL de agua destilada y se agregan a la solución anterior. Se obtiene una solución de color rojo y  $\text{pH} = 4$ . Se agrega etanol al 95 % gota a gota y con agitación hasta que la solución permanece turbia. La mezcla de reacción se deja toda la noche en heladera, y al día siguiente se obtienen cristales de color rojo que se lavan y secan tal como se describió para el complejo de potasio.

Todos los complejos sintetizados son solubles en agua y estables en aire por espacio de una semana. Luego comienzan a descomponerse gradualmente, al perder peróxido y en este proceso cambian de color al borgoña, marrón oscuro y finalmente al negro.

### 2.1.4. Resultados y Discusión

#### 2.1.4.1. Espectros electrónicos

La Fig. 3a muestra el espectro electrónico de una solución acuosa ( $3,5 \times 10^{-3}$  M) de la sal de potasio. La banda de absorción con máximo en 420 nm y  $\epsilon = 300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  corresponde a una transferencia de carga del ligando al metal (peroxo-vanadio) la cual es característica de los monoperoxovanadatos [3,11,12]. La Fig. 3b muestra el espectro electrónico de una solución ácida ( $\text{pH} 1$ ) del complejo; el máximo de esta banda, tal como es esperado, se desplaza a 450 nm debido a la presencia del ión  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  [11,13, 14].



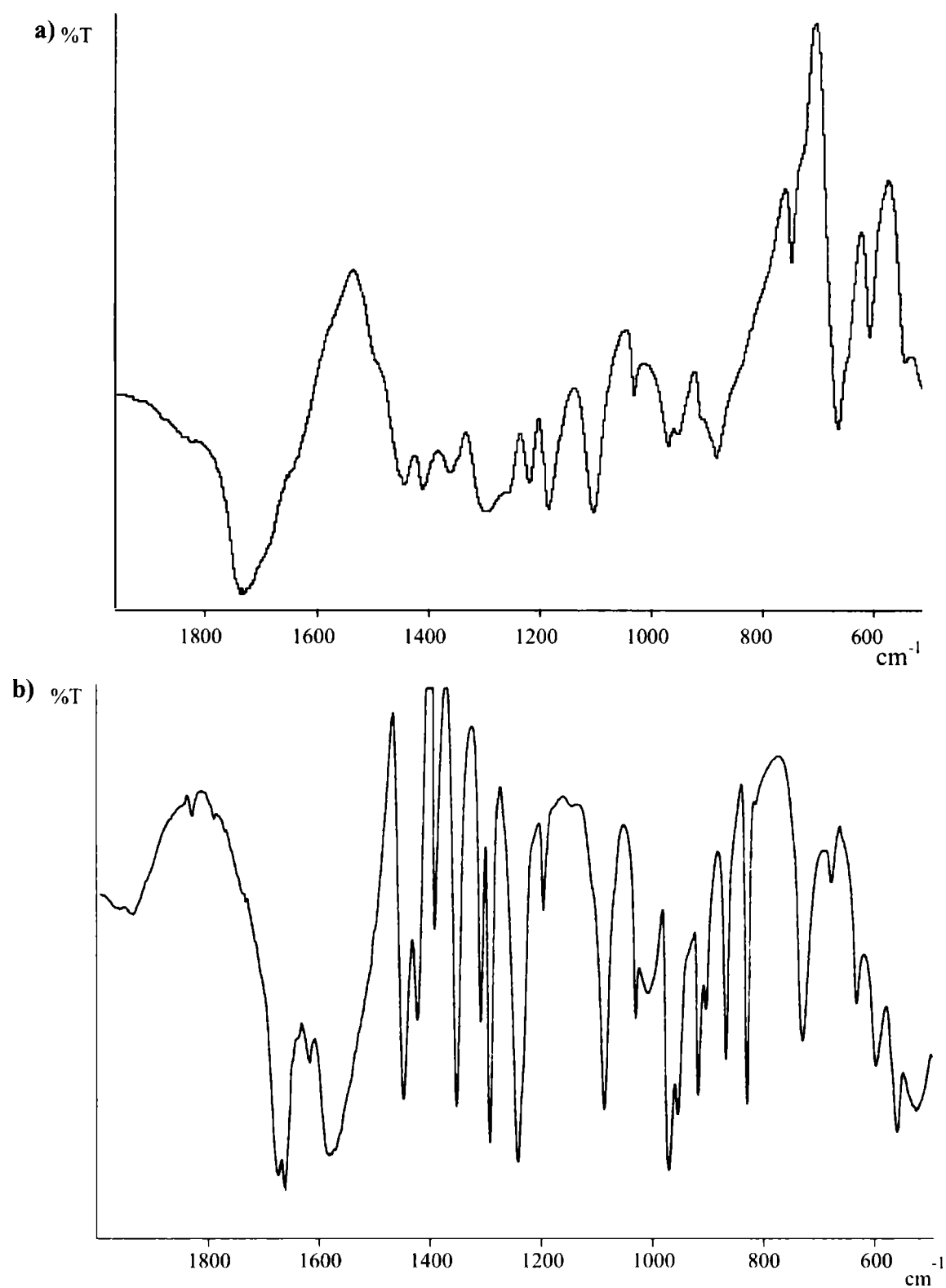
**Figura 3.** Espectro electrónico de  $K[VO(O_2)(C_4H_4O_3)] \cdot H_2O$ : **a)** en solución acuosa y **b)** en solución acuosa ácida (pH 1)

### 2.1.4.2. Espectros infrarrojos

Los espectros IR fueron medidos utilizando las muestras sólidas en forma de pastillas de KBr.

Las asignaciones de las bandas observadas en los espectros de los distintos complejos fueron realizadas al comparar los espectros IR de los mismos con el espectro del ligando libre y en base a datos reportados en la bibliografía para otros monoperoxo complejos de vanadio(V) con heteroligandos [3,11,12].

La porción más relevante del espectro IR del ligando ácido málico y del complejo con potasio se muestra en la Fig.4, mientras que tanto la posición como la asignación de las bandas más importantes de los espectros del ligando y de los distintos complejos se muestran en la Tabla 1.



**Figura 4.** a) Espectro IR del ligando ácido málico; b) Espectro IR del complejo oxoperoxo (malato)vanadato (v) de potasio

Para el ligando ácido málico, el espectro muestra una banda intensa en  $1740\text{ cm}^{-1}$ , la cual se asigna al estiramiento C=O de los grupos carboxílicos. Dos bandas que se originan de la flexión en el plano del enlace C-OH (intensidad media) y del alargamiento C-O (más intensa) aparecen en el espectro en  $1408$  y  $1280\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. La banda de flexión C-OH en  $1408\text{ cm}^{-1}$  se presenta en la misma región que la vibración en tijera del grupo metileno,  $\text{CH}_2$ , adyacente al carbonilo, la cual en este caso aparece en  $1456\text{ cm}^{-1}$ .

Las bandas localizadas entre  $1280$  y  $1180\text{ cm}^{-1}$  se deben al estiramiento del C-O acoplado con la deformación OH de grupos COOH. Una banda intensa en  $1104\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento del enlace C-O alcohólico. Por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  el espectro presenta dos bandas de intensidad media ubicadas en  $970$  y  $950\text{ cm}^{-1}$  las cuales se asignan a la flexión fuera del plano del enlace O-H del grupo carboxílico asociadas al estiramiento del enlace C-C. Una banda de intensidad media en  $882\text{ cm}^{-1}$  se asigna a la deformación del grupo COOH, en tanto que las bandas presentes entre  $750$  y  $670\text{ cm}^{-1}$  se asignan al rocking del grupo  $\text{CH}_2$ .

El espectro IR de los complejos con ácido málico presenta bandas características de los grupos oxo y peroxo, así como también del ácido málico coordinado [3,11,12].

Tal como puede observarse en el espectro, la región correspondiente a las frecuencias de estiramiento antisimétrica y simétrica del grupo  $\text{COO}^-$  muestra características propias del ligando malato coordinado.

En efecto, después de la coordinación del ligando con el vanadio, estos modos aparecen desplazados a frecuencias menores. La banda intensa presente en el espectro del ácido málico a  $1740\text{ cm}^{-1}$ , asociada al estiramiento del grupo C=O, está desplazada en los complejos y aparece como dos bandas intensas entre  $1670$ - $1580\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde al estiramiento antisimétrico del grupo  $\text{COO}^-$  ( $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$ ). Este desplazamiento indica que los dos grupos carboxilato del ácido málico están deprotonados y coordinados. La presencia de dos bandas en esa zona puede atribuirse a dos grupos carboxilatos unidos a carbonos no equivalentes, uno unido a un grupo  $\text{CH}_2$  y el otro a un grupo C-OH. Bandas adicionales localizadas entre  $1449$ - $1394\text{ cm}^{-1}$  se asignan al estiramiento simétrico de los grupos carboxilato deprotonados, que incluyen además contribuciones de movimientos de vibración en tijera del grupo  $\text{CH}_2$ .

La zona en el espectro entre  $1200$  y  $1000$  ofrece también algunas características interesantes: por ej. se observa una banda intensa en  $1090$  la cual se asocia tentativamente al estiramiento C-O del alcohol deprotonado del ligando, la cual en el ácido aparecía a valores mayores de frecuencia ( $1104\text{ cm}^{-1}$ ).

Dos bandas intensas que aparecen entre  $977\text{ cm}^{-1}$  y  $955\text{ cm}^{-1}$  para los distintos complejos se asignan al estiramiento del enlace V=O y una banda adicional de intensidad media que aparece alrededor de  $920\text{ cm}^{-1}$  se asigna a  $\nu(\text{O-O})$ . La banda de intensidad media que aparece en el espectro en  $731\text{ cm}^{-1}$ , se asigna tentativamente a la vibración V-O-V del puente que une al dímero (suele considerarse diagnóstico de la formación del dímero), en tanto que la banda de intensidad media alrededor de  $640\text{ cm}^{-1}$  se asigna tentativamente al acoplamiento entre las vibraciones de estiramiento antisimétrico V-O<sub>2</sub> y el estiramiento del enlace O-O. Finalmente dos bandas entre  $620$  y  $550\text{ cm}^{-1}$  se asignan a las frecuencias de estiramiento antisimétrica y simétrica respectivamente del enlace V-O<sub>2</sub>.



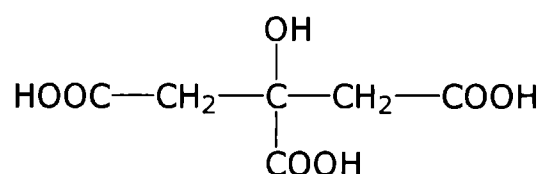
**Tabla 1.** Asignaciones de las vibraciones características del ligando (ac. málico) y sus complejos de oxoperoxovanadio (V). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

Ac. Málico	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Cs <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Asignación
1740 mf					v C=O
	1673 f /1663 f 1588 f	1674 f	1672 f	1672 f	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>
		1583 f	1583 f	1585 f	
1456 m					δ CH <sub>2</sub> tijera
	1449 f 1426 m 1394 m	1445 f	1444 f	1448 f	v <sub>s</sub> COO <sup>-</sup> + δ CH <sub>2</sub>
		1430 m	1400 f	1410 m	tijera
		1390 m		1398 m	
1408 m					δ C-OH en el
1350 m					plano
1280 f					v C-O (COOH)
1240 m					v C-O + δ OH
1183 f					(COOH)
1104 f					v C-O (alcohol)
	1090 f	1985 f	1083 f	1087 f	v C-O (alcohol deprotonado)
970 m					δ C-OH (COOH)
/950 m					+ v C-C
	971 f /955 m	970 f	977 f	974 f	v V=O
		/955 m	/955 f	/955 m	
	920 m /907 d	920 f	922 f	921 f	v O-O
		/905 d	/905 d	/905 d	
882 m					δ (COOH)
750 d					ρ CH <sub>2</sub>
670 m					
	731 m	730 m	733 m	732 m	v V-O-V
	635 m	644 m	630 m	642 m	v <sub>as</sub> V-O <sub>2</sub> + v O-O
	603 m	602 m	600 m	600 m	v <sub>as</sub> V-O <sub>2</sub>
	561 f	568 f	569 f	567 f	v <sub>s</sub> V-O <sub>2</sub>

## 2.2. Oxoperoxo(citrato)vanadato (V)

### 2.2.1. Introducción

El ácido cítrico, cuya fórmula está esquematizada en la Fig. 1, contiene tres grupos carboxílicos ionizables y una función alcohol que perdiendo un protón, también puede constituirse en un potencial sitio de coordinación [3, 15-17].



*Figura 1. Esquema de la molécula de ácido cítrico.*

El ácido cítrico y los iones citratos son compuestos muy importantes en numerosos procesos biológicos [18]. Están presentes como especies de bajo peso molecular en los tejidos de la mayoría de plantas y animales. Se hallan en una concentración de aproximadamente 0,1mM en plasma [19] y en un 0,3 % en peso en dientes y huesos [18,20]. También regulan algunos procesos fisiológicos fundamentales y actúan de intermediarios en el metabolismo de carbohidratos como por ej. en el ciclo de Krebs.

Los peroxo complejos de vanadio (V) con bio-heteroligandos tales como el ácido cítrico son muy interesantes desde el punto de vista bioquímico por varias razones, entre las que podemos citar: en el proceso de purificación y caracterización de las vanadio bromoperoxidasas, dos operaciones están directamente relacionadas con las propiedades de los peroxocitrato-vanadatos (V), la primera de las cuales es la formación de un producto con un  $\lambda_{\text{max}}$  a 420 nm el cual se convierte gradualmente, en soluciones ácidas, en una sustancia diferente al incrementarse la absorbancia a 460 nm [21-24]; En los monoperoxovanadatos (V) la banda de transferencia de carga ligando-metal ocurre entre 415 y 430 nm, y en soluciones ácidas esta banda se corre aproximadamente a 460 nm debido a la formación del catión  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  [11,13,14]. Además, el vanadio puede ser fácilmente extraído por diálisis utilizando EDTA en un buffer de citrato / fosfato, con lo que la enzima se torna inactiva. Es muy probable entonces que algo del vanadio se una al citrato [21]. Por otra parte, también se ha demostrado que este tipo de compuestos presenta

una moderada actividad antitumoral con una toxicidad que ocurre a dosis relativamente altas [4].

Debido a las peculiares características de estos sistemas nos pareció interesante realizar la síntesis y el estudio espectroscópicos de algunos complejos de fórmula  $M^I[VO(O_2)(C_6H_6O_7)] \cdot H_2O$  donde  $M^I = K^+, NH_4^+$  y  $Cs^+$ . Con fines comparativos también se realizó la síntesis y el estudio espectroscópico de dioxocitratos de vanadio (V) de fórmula general  $M^I[VO_2(C_6H_6O_7)] \cdot H_2O$ , con  $M^I = K^+$  y  $NH_4^+$ .

### 2.2.2. Características Estructurales

Previa a la discusión de los espectros UV-Visible e IR, se hará un comentario sobre la estructura que adoptan los distintos compuestos estudiados.

#### 1) Oxoperóxido(citrato)vanadato (V)

La Fig. 2 muestra la estructura del anión dimérico para el oxoperóxido(citrato)-vanadato (V) de potasio. Los estudios de rayos X [3] revelan que el dímero puede ser descrito como dos bipyramides pentagonales distorsionadas doblemente unidas por oxígenos hidroxílicos (O3A y O3A') que ocupan dos sitios del plano ecuatorial pentagonal. Este plano contiene también los dos oxígenos del grupo peróxido coordinado (O1 y O2) y un oxígeno del grupo carboxilato central (O6B). Los sitios axiales están ocupados por el grupo oxo (O3) y un oxígeno del grupo carboxilato terminal, O(1A). Los átomos del puente V-O(3A)-V'-O(3A') forman un plano romboidal perfecto. Como es usual [10,11] en este tipo de compuestos el átomo de vanadio está desplazado aproximadamente 0,24 Å del plano ecuatorial hacia el grupo oxo terminal.

Los dos protones del ion citrato dibásico coordinado es muy probable que estén localizados sobre los dos grupos carboxilato terminales, uno de los cuales está libre (C5). En efecto, el oxígeno del otro grupo carboxilato terminal (O1A) que coordina con el vanadio trans al grupo oxo tiene una longitud de enlace V-O de 2,561 Å. Esta longitud de enlace es mucho más larga que la distancia V-O ecuatorial (2,013 Å) lo que indica que es el grupo carboxilato central el que está deprotonado. Las uniones V-O del puente son mucho más cortas que las usuales y no muy diferentes entre sí, lo que indica que los

oxígenos hidroxílicos de dicho puente están deprotonados, tal como se ha observado previamente en algunos citrato-complejos de metales de transición [18,25].

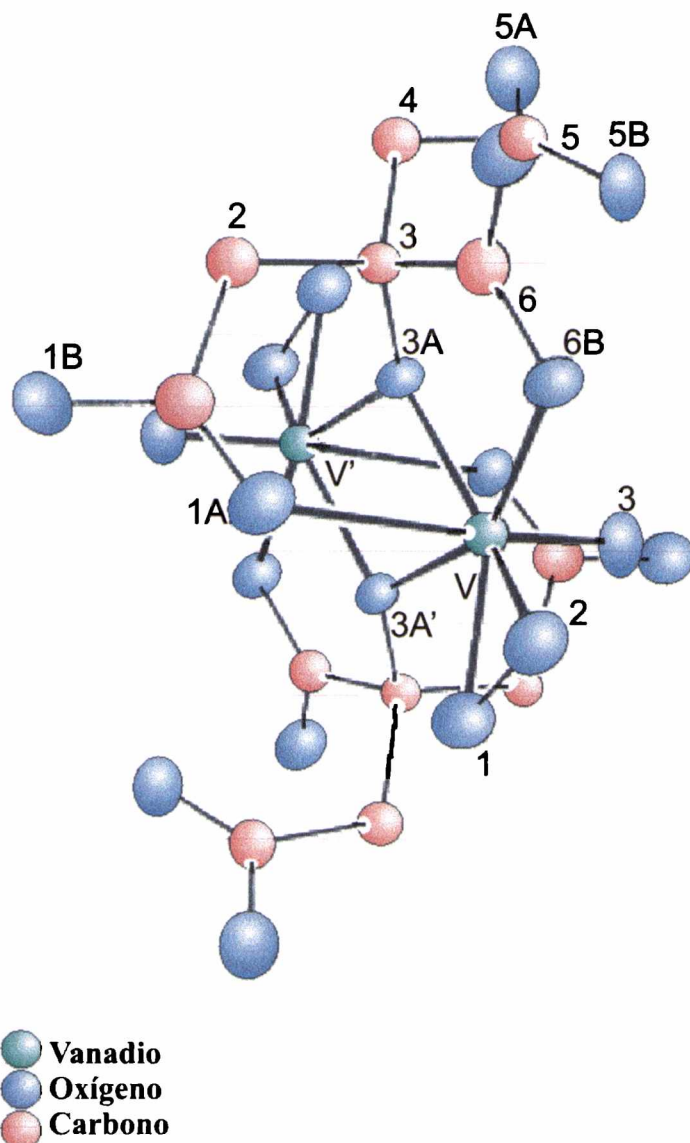


Figura 2. Estructura del anión dimérico  $[VO(O_2)(C_6H_6O_7)]_2^{2-}$ . Tomado y modificado de cita [3]

## 2) Dioxo(citrato)vanadato (V)

La Fig. 3 muestra la estructura del anión dimérico  $[VO_2(H_2Cit)]_2^{2-}$ , en la cual puede apreciarse que cada átomo de vanadio está pentacoordinado con una geometría intermedia entre una pirámide de base cuadrada y una bipirámide de base trigonal. La estructura de rayos X [26] revela una unión bidentada del ácido cítrico con el vanadio (V) a través de un oxígeno hidroxílico y el oxígeno de un grupo  $\alpha$  carboxilato y permanecen dos grupos  $\beta$  carboxílicos libres.

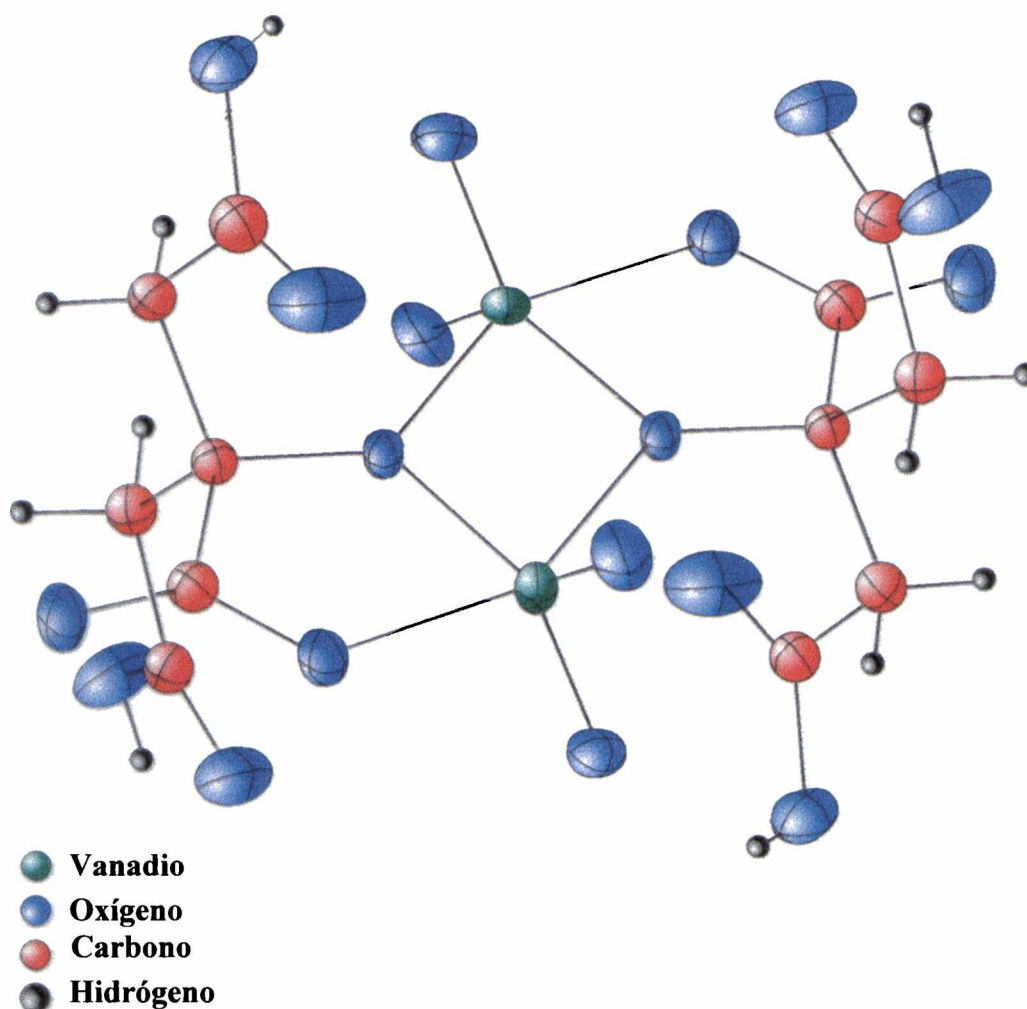


Figura 3. Estructura del anión dimérico  $[VO_2(H_2Cit)]_2^{2-}$ . Tomado y modificado de cita [26]

### 2.2.3. Síntesis de los complejos

Los complejos se prepararon siguiendo la técnica descrita por Djordjevic y col. [3], de la siguiente manera:

#### 1) Oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de potasio. $K[VO(O_2)(C_6H_6O_7)] \cdot H_2O$

Se disuelve 0,5 g de  $V_2O_5$  en 10 mL de agua destilada que contiene 0,3 g de KOH a  $40^\circ C$  hasta obtener una solución clara que se enfría en un baño de hielo. Se añaden 2 mL de  $H_2O_2$  al 30% lentamente y con agitación. Se disuelve 1,16 g de ácido cítrico en 5 mL de agua destilada y se agrega a la mezcla anterior. Se obtiene una solución de color rojo anaranjado de  $pH = 4$ . A continuación se adiciona lentamente etanol frío al 95% hasta turbidez permanente y se deja la mezcla de reacción toda la noche a  $5^\circ C$ . Se obtienen cristales de color naranja que se filtran y se lavan con etanol al 50% y al 95%.

**2) Oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de amonio.  $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]. \text{H}_2\text{O}$** 

Se disuelven 0,59 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 10 mL de agua destilada y se añaden 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y unas gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Se calienta suavemente hasta disolución total. La solución clara de color amarillo se enfría en un baño de hielo y se le adiciona 1,05 g de ácido cítrico disueltos en 5 mL de agua destilada, lentamente y con agitación. La solución se pone de color rojo. Se agrega etanol frío al 95% para iniciar la precipitación y la mezcla de reacción se deja toda la noche a 5°C. Se obtienen cristales de color rojo anaranjado que se filtran y se lavan como en el caso anterior.

**3) Oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de cesio.  $\text{Cs}[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]. \text{H}_2\text{O}$** 

Se disuelven 0,5 g de  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 10 mL de agua que contiene 0,2 g de  $\text{NaOH}$  a 40°C. La solución clara se enfría en un baño de hielo y se añaden 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Se agregan luego 1,16 g de ácido cítrico disueltos en 5 mL de agua destilada lentamente y con agitación, hasta obtener una solución roja anaranjada de  $\text{pH} = 4$ . Finalmente se adicionan 0,99 g de  $\text{CsCl}$  disuelto en 3 mL de agua. La precipitación se inicia agregando etanol frío hasta que persista la turbidez. Los cristales rojo anaranjado se obtienen al dejar la mezcla toda la noche a 5°C y los mismos se separan por filtración y se lavan igual que los anteriores.

**4) Dioxo(citrato)vanadato (V) de potasio.  $\text{K}[\text{VO}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]. \text{H}_2\text{O}$** 

Se disuelve 1,82 g de  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 10 mL de agua destilada que contiene 0,6 g de  $\text{KOH}$ , calentando suavemente a 40°C. Se agrega lentamente y con agitación 10 mL de solución de ácido cítrico 1 M. Se observa que la solución se pone gradualmente roja, naranja amarillenta y finalmente verde. La mezcla de reacción se filtra, se evapora y se obtiene un precipitado de color verde claro que se lava con etanol al 50 % y se seca al aire.

**5) Dioxo(citrato)vanadato (V) de amonio.  $(\text{NH}_4)[\text{VO}_2(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)]. \text{H}_2\text{O}$** 

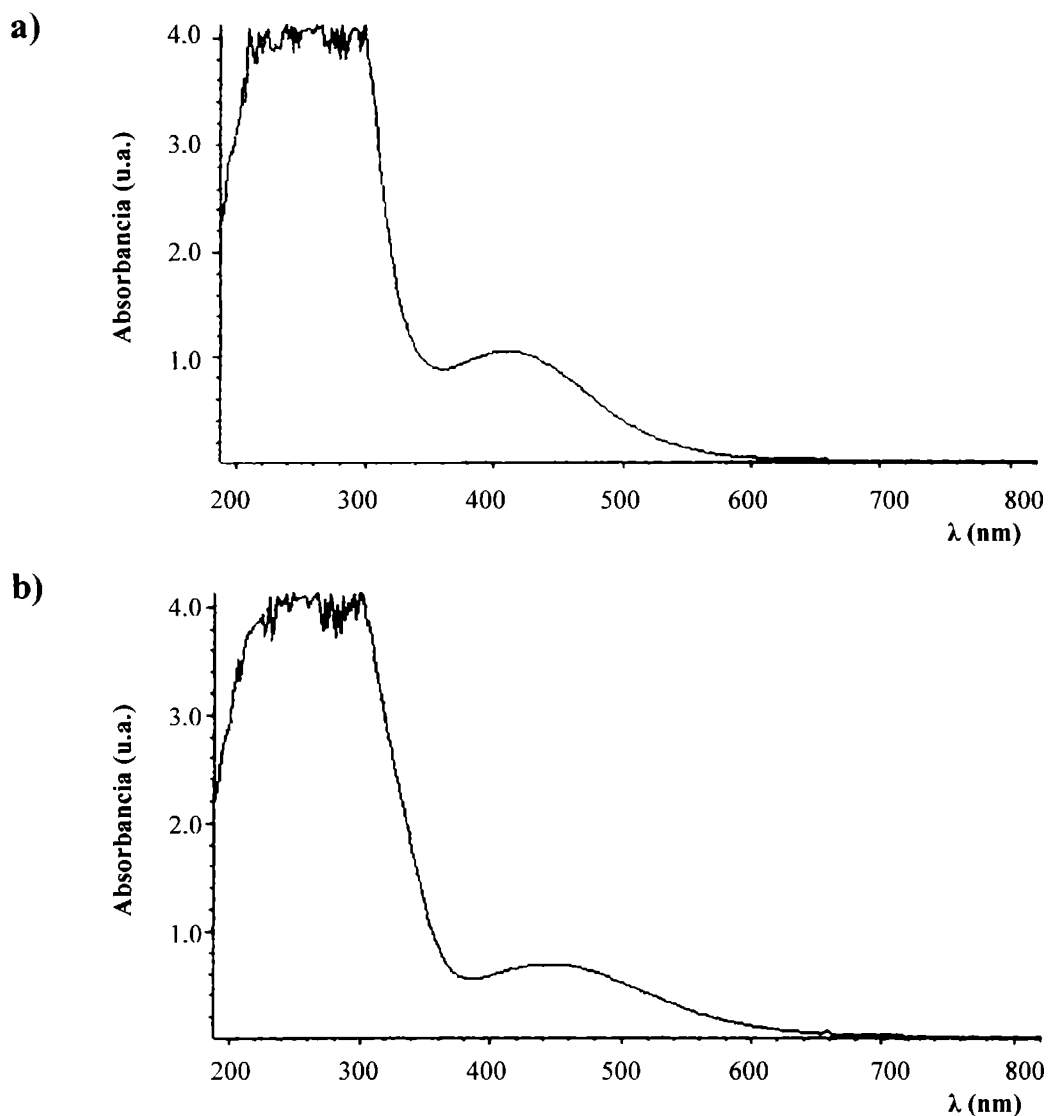
Se disuelven 1,17 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 10 mL de una solución 1M de ácido cítrico. Luego se continúa como en el caso anterior, obteniéndose un precipitado de color verde claro.

Todos los complejos obtenidos son solubles en agua y tienen una remarcable estabilidad.

## 2.2.4. Resultados y Discusión

### 2.2.4.1. Espectros electrónicos

La Fig. 4a muestra el espectro de una solución acuosa ( $3 \times 10^{-3}$  M) del complejo de oxoperóxido(citrato)vanadato (V) de potasio. Al igual que en el caso de los oxoperóxido(malatos), se obtiene una banda de absorción con máximo en 410 nm y  $\epsilon = 354$  L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, correspondiente a una transferencia de carga del ligando al metal (peroxo-vanadio), característica de los monoperoxovanadatos [10,11]. La Fig. 4b muestra el espectro electrónico de una solución ácida (pH 1) del complejo; el máximo de esta banda, tal como es esperado, se desplaza a 450 nm debido a la presencia del ion VO(O<sub>2</sub>)<sup>+</sup> [11,13, 14].



**Figura 4.** Espectro electrónico de  $K[VO(O_2)(C_6H_6O_7)] \cdot H_2O$  a) en solución acuosa y b) en solución acuosa ácida (pH 1)

### 2.2.4.2. Espectros infrarrojos

Los espectros IR de los distintos oxoperoxo(citrato)vanadatos (V) fueron medidos en una suspensión de Nujol, ya que en pastilla de KBr mostraron signos de descomposición. El espectro del ligando fue medido tanto en suspensión de Nujol como en pastilla de KBr para poder asignar con más precisión el corrimiento de las bandas y por último el espectro de los oxo(citrato)vanadatos (V) fue estudiado en pastilla de KBr ya que se obtuvo una buena reproducción de los mismos.

Las Figs. 5 (a y b) y 6 muestran la porción más relevante de los espectro IR del ligando libre y de los complejos oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de potasio y del dioxo(citrato)vanadato (V) de potasio respectivamente.

En la Tabla 1 se muestran las asignaciones de las bandas más importantes del espectro IR de los oxoperoxo(citrato)vanadatos (V), las cuales fueron realizadas comparando sus espectros con los del ácido cítrico, con los espectros de los dioxo(citrato)vanadato (V) y en base a datos reportados en la bibliografía para otros monoperoxocomplejos de vanadio (V) con heteroligandos [3,10,11].

El espectro IR del ácido cítrico presenta dos bandas ubicadas en 1739 y 1695  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se asignan al estiramiento del enlace C=O. La presencia de dos bandas debidas a este estiramiento pueden atribuirse a dos grupos carboxílicos unidos a carbonos no equivalentes (dos grupos carboxílicos están unidos a carbonos con dos átomos de hidrógeno y el tercero con un carbono que contiene un grupo OH alcohólico). Para este ácido también se espera una banda de intensidad media alrededor de 1400  $\text{cm}^{-1}$  (tapada por la banda de Nujol, pero presente en el espectro en KBr) la cual se asigna a la flexión en el plano del enlace C-OH y que además se presenta en la misma región que la vibración en tijera del grupo  $\text{CH}_2$ . La banda alrededor de 1200  $\text{cm}^{-1}$  (la cual se observa intensa en el espectro en KBr) se asigna al estiramiento del enlace C-O. En esa zona el espectro presenta una serie de bandas algunas de las cuales corresponden al estiramiento C-O acoplado con la deformación OH de grupos COOH y también al estiramiento del enlace C-O alcohólico. Por debajo de 1000 se observa una serie de bandas débiles entre las que se identifica, alrededor de 940  $\text{cm}^{-1}$ , la correspondiente a la flexión fuera del plano del enlace OH y al modo de rocking de los grupos  $\text{CH}_2$  en aproximadamente 780  $\text{cm}^{-1}$ .



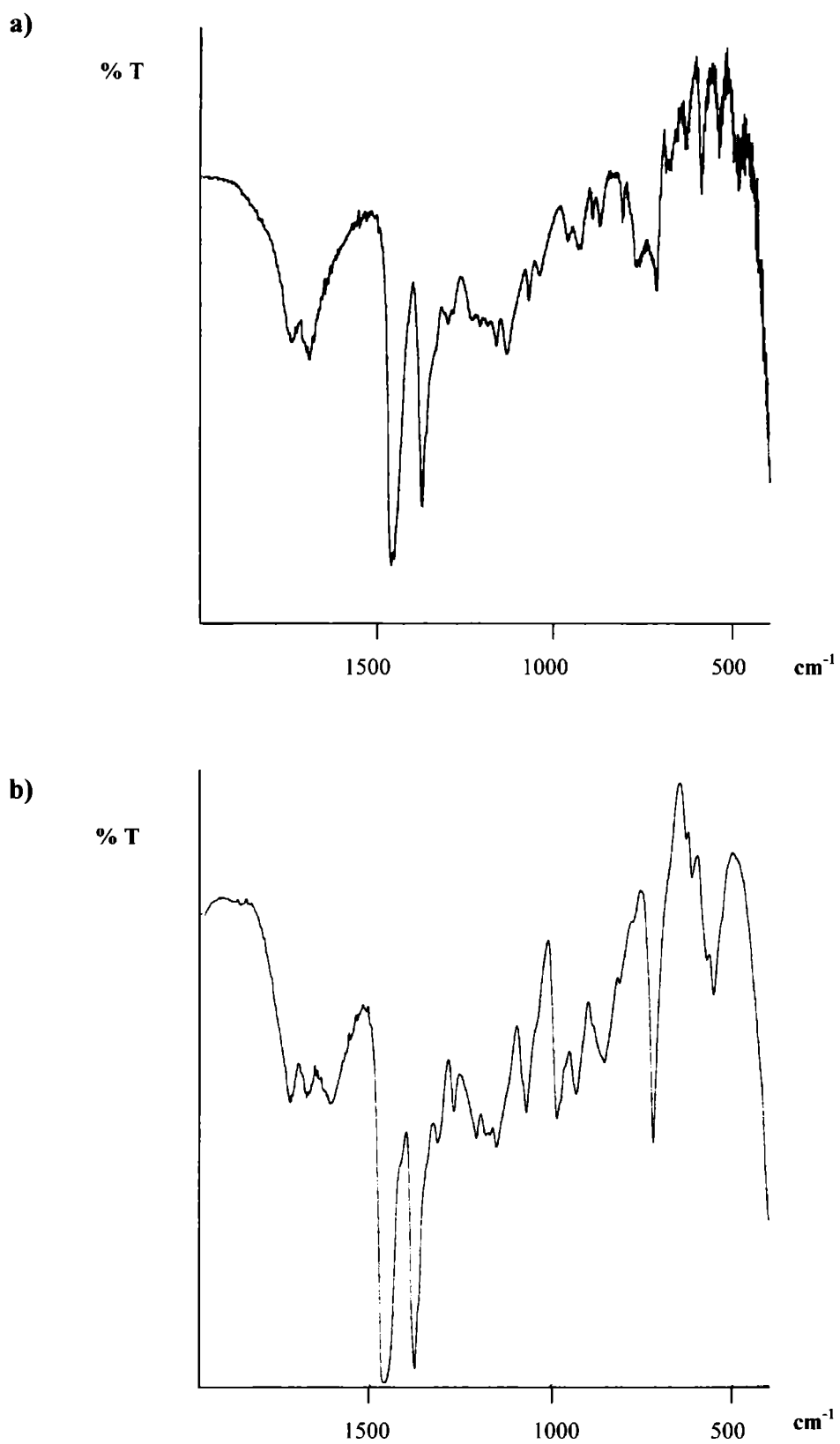


Figura 5. a) Espectro IR del ligando ácido cítrico; b) espectro IR del complejo oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de potasio

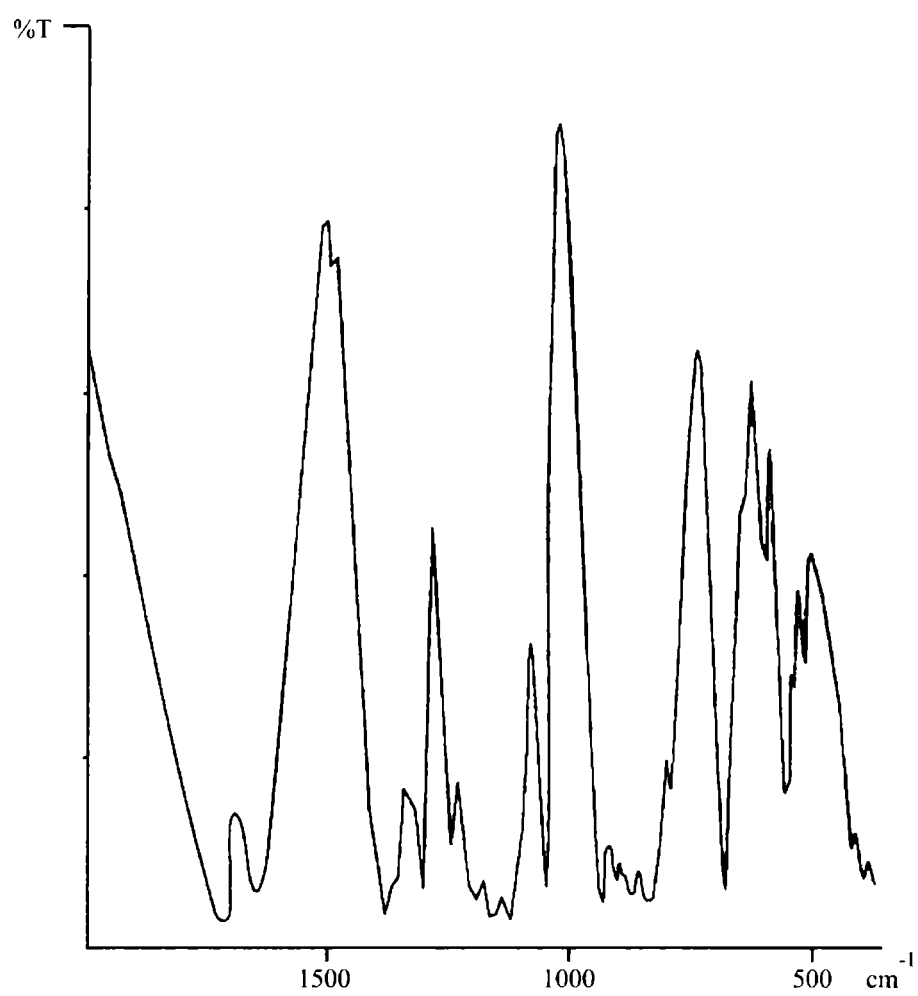


Figura 6. Espectro IR del complejo dioxo(citrato)vanadato (V) de potasio

**Tabla 1.** Asignaciones de las vibraciones características del ligando (ac. cítrico) y de sus complejos de vanadio (V). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

Ac. Cítrico	K[VO(O <sub>2</sub> )(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> )]·H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> [VO(O <sub>2</sub> )(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> )]·H <sub>2</sub> O	Cs[VO(O <sub>2</sub> )(C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> )]·H <sub>2</sub> O	K[VO <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> )]·H <sub>2</sub> O	(NH <sub>4</sub> )[VO <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> )]·H <sub>2</sub> O	Asignación
1739 f						v C=O
1695 f						v C=O
	1717 f	1722 f	1728 f	1705 f	1705 f	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>
	1672 f	1673 f	1717 f	1650 f		v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>
	1611 f	1611 f	1661 f			v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup> + δ CH <sub>2</sub> tijera
	1464 f	1458 f	1464 f	1406 f	1406 f	v <sub>s</sub> COO <sup>-</sup> + δ CH <sub>2</sub> tijera
	1381 f	1380 f	1344 f	1330 f	1340 f	v <sub>s</sub> COO <sup>-</sup> + δ CH <sub>2</sub> tijera
	1317 f	1316 f	1311 f			v <sub>s</sub> COO <sup>-</sup> + δ CH <sub>2</sub> tijera
1456 mf						δ C-OH en el plano + δ CH <sub>2</sub> tijera
1378 mf						δ C-OH en el plano + δ CH <sub>2</sub> tijera
1200 f						v C-O (COOH)
1172 m						v C-O + δ OH (COOH)
1139 m						v C-O (alcohol)
1083 m						v C-O (alcohol)
	1071 f	1067 f	1067 f	1072 f	1072 f	v C-O (alcohol)
	983 f	975 f	972 f	955 f	955	v V=O
940 d						δ (OH) fuera del plano (COOH)
	933 f	933 f	933 f			v O-O
780 d						ρ CH <sub>2</sub>
	717 f	722 f	717 f	710 f	705 f	v V-O-V
	572 m	572 m	572 m	572 m	572 m	v <sub>as</sub> V-O <sub>2</sub>
	550 m	550 m	550 m	550 m	550 m	v <sub>s</sub> V-O <sub>2</sub>

El espectro IR de los complejos estudiados muestra estiramientos característicos del ligando citrato coordinado, así como también de los grupos oxo y peroxo.

El espectro IR de los oxoperoxo(citrato) presenta tres bandas bien definidas entre 1717 y 1611  $\text{cm}^{-1}$  las cuales se atribuyen al estiramiento antisimétrico de los grupos COO<sup>-</sup>. Estas bandas están desplazadas a frecuencias menores que la correspondiente al grupo carboxílico del ligando libre las cuales aparecen, como se dijo, ubicadas en 1739 y 1695  $\text{cm}^{-1}$ . Estos cambios se atribuyen a las peculiaridades estructurales de los tres grupos carboxilato del ligando. En cambio para los oxo(citratos), (sin grupo peroxo) aparecen dos bandas intensas en 1705 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  para el de potasio y una banda ancha alrededor de 1700  $\text{cm}^{-1}$  para el de amonio, las cuales corresponden también al estiramiento antisimétrico de los grupos COO<sup>-</sup>. Para el estiramiento simétrico de este mismo grupo se esperan una

serie de bandas entre 1464 y 1311  $\text{cm}^{-1}$ , tapadas algunas por las bandas de Nujol para el caso de los oxoperóxido(citratos), pero que si se observan en el caso de los oxo(citratos), y las cuales incluyen además las contribuciones de los modos deformacionales del grupo  $\text{CH}_2$ .

La separación entre la frecuencia de vibración antisimétrica y simétrica del grupo  $\text{COO}^-$  de aproximadamente 300  $\text{cm}^{-1}$ , para todos los complejos estudiados, la cual es significativamente más grande que el valor de 210  $\text{cm}^{-1}$  para la sal citrato de sodio confirma la presencia de un grupo carboxílico libre o coordinado unidentadamente, lo cual está de acuerdo con los estudios de rayos X. Estas observaciones demuestran que el  $\Delta (v_{\text{as}} - v_{\text{s}})$ , relacionado con la coordinación del grupo carboxilato, ampliamente estudiado en los complejos con acetato [27], también se da para los ácidos policarboxílicos como el ácido cítrico.

Una banda intensa alrededor de 1072 y 1067  $\text{cm}^{-1}$  para los distintos complejos se asigna tentativamente al estiramiento C-O del alcohol deprotonado del ligando, ya que tales bandas se hallan usualmente entre 1000 y 1100  $\text{cm}^{-1}$ . Algunas de las bandas restantes en esa zona probablemente estén relacionadas con deformaciones del grupo  $\text{CH}_2$ .

La zona del espectro por debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  ofrece características importantes cuando se la compara con el espectro del ligando libre.

El estiramiento del enlace  $\text{V}=\text{O}$  se asigna a la banda ubicada en 983  $\text{cm}^{-1}$  en los oxoperóxido(citratos). En el caso de los dioxo(citratos) la banda correspondiente a este estiramiento aparece a menor frecuencia (955  $\text{cm}^{-1}$ ) [28].

La asignación de la banda correspondiente al estiramiento del enlace O-O del grupo peróxido se realizó al comparar los espectros de los oxoperóxido(citratos) con los de los oxo(citrato). En efecto, una banda ubicada en aproximadamente 933  $\text{cm}^{-1}$  presente en los espectros de los tres oxoperóxido(citratos) y ausente en los espectros de los oxo(citratos) se asigna a este enlace. Esta banda aparece a frecuencias más altas que las observadas en otros peróxido complejos de vanadio (V) con heteroligandos [11,14,29,30].

La banda de intensidad media a intensa que aparece en los distintos complejos entre 705 y 722  $\text{cm}^{-1}$  se asigna tentativamente a la vibración V-O-V del puente que une al dímero (numerosos autores consideran esta banda como diagnóstico de la formación del dímero). Finalmente las bandas adicionales que aparecen en el espectro de los peróxido citratos complejos en la región entre 570 y 550  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a las frecuencias de estiramiento antisimétrica y simétrica respectivamente, del enlace  $\text{V}-\text{O}_2$ .

## 2.3. Oxoperoxo(nitrilotriacetato)vanadato (V)

### 2.3.1. Introducción

Hemos visto en capítulos anteriores que los peroxo complejos de vanadio (V) con bio-heteroligandos representan una interesante clase de compuestos, con actividad biológica [1-3] y que esta actividad biológica depende esencialmente del tipo de heteroligando que forma parte de la esfera de coordinación del vanadio [4].

El ácido nitrilotriacético, cuya fórmula se presenta esquemáticamente en la Fig. 1, es un compuesto alifático tricarbónico muy usado en complexometría debido a sus excelentes características como ligando polidentado.

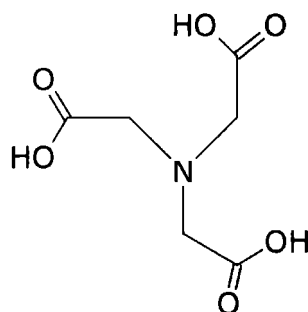


Figura 1. Esquema de la molécula de ácido nitrilo triacético.

Este ácido reacciona con vanadio (V) en presencia de peróxido de hidrógeno para formar un compuesto cristalino, oxoperoxo(nitrilotriacetato)vanadato(V), de fórmula molecular  $K_2[VO(O_2)(C_6H_6NO_6)] \cdot 2H_2O$ , donde  $(C_6H_6NO_6)^{3-}$  es el ion nitrilo triacetato (NTA) [12]. La actividad antitumoral sobre ciertos tipos de leucemia de este interesante complejo como la de otros peroxo vanadatos (V) con heteroligandos ha sido evaluada [4]. Si bien este compuesto no ha demostrado tener una actividad significativa, ha sido distinguido de otras sustancias similares por su inusual estabilidad y baja toxicidad. En efecto, los cristales de color rojo anaranjado son sumamente estables y permanecen en el aire sin descomponerse durante años. La dosis de toxicidad encontrada para otros peroxo vanadatos (V) con heteroligandos [4] varía entre 6 y 16 mg/kg, mientras que para el complejo con NTA la toxicidad ocurre recién por encima de los 120 mg/kg. Debido a las inusuales características de este complejo nos pareció interesante realizar la síntesis y estudio espectroscópico del mismo.

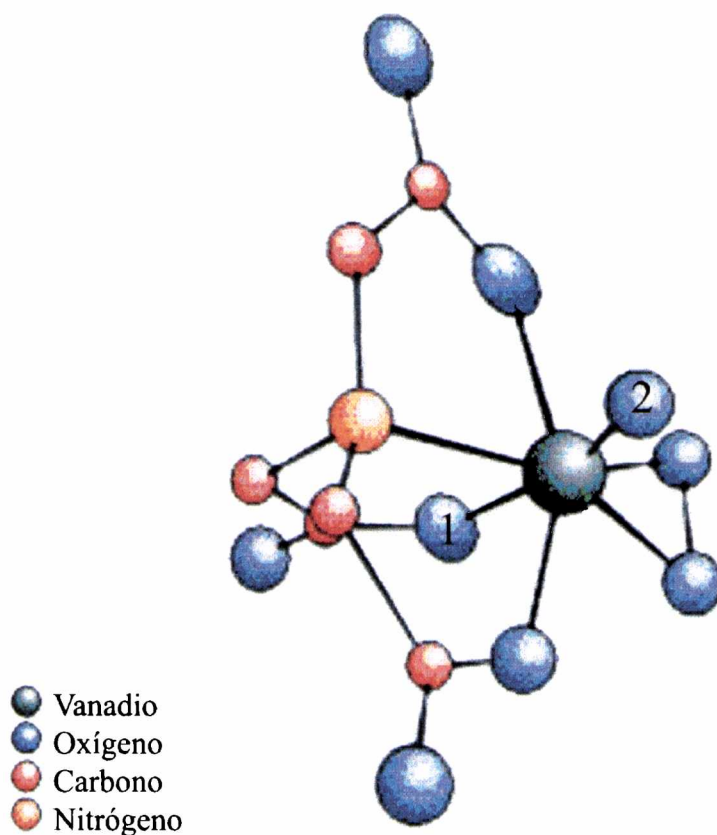
### 2.3.2. Características estructurales

Los estudios de Rayos X [12] indican que la estructura del complejo en estado sólido es monomérica y debe ser distinguida de otros complejos de vanadio que son mucho menos estables, como por ej., los peroxo citratos y los peroxo malatos estudiados en capítulos anteriores.

La Fig. 2 nos muestra la estructura del complejo, el que presenta una geometría de bipirámide pentagonal distorsionada, idéntica a la que se observa en la mayoría de los peroxo complejos [3,11,31-36].

El grupo peroxo ocupa la posición ecuatorial ubicado en posición cis al grupo oxo, que está en posición axial, y localizado entre dos oxígenos de los grupos carboxilatos y al frente del nitrógeno. En posición trans al grupo oxo se encuentra el oxígeno del tercer grupo carboxilato del ligando tetradentado NTA. La longitud del enlace O-O = 1,438 Å cae dentro del rango esperado para este tipo de complejos que es entre 1,43 y 1,47 Å. Sin embargo las dos distancias V-O (del grupo peroxo) son distintas entre sí lo cual es diferente de lo observado en otros peroxo complejos de vanadio (V) [3,11,31-36], en los cuales estas dos distancias son prácticamente iguales.

Resulta evidente, al comparar con la estructura de complejos similares, que la coordinación no simétrica del grupo peroxo depende del heteroligando y de la estereoquímica completa del sistema. Se ha propuesto que esta unión bidentada no simétrica con el vanadio incrementa la interacción entre el orbital atómico 2s del oxígeno y el orbital atómico  $p_z$  del metal [37].



**Figura 2.** Estructura del anión  $[VO(O_2)NTA]^{2-}$ . Tomado y modificado de cita [12]

El nitrógeno, ubicado en posición ecuatorial, está a una distancia de 2,199 Å. la cual es comparable a la distancia V-N de compuestos similares [11]. El vanadio sale fuera de este plano 0,20 Å hacia el grupo axial oxo con una longitud de enlace V=O igual a 1,617 Å y cae dentro del rango esperado.

En posición trans al grupo oxo se encuentra el tercer oxígeno del grupo carboxilato del ion NTA localizado a casi igual distancia del vanadio que los otros dos oxígenos de los grupos carboxilato ubicados en el plano pentagonal. Esto es inusual por que esta unión debería ser más larga o más elongada que las otras dos uniones ecuatoriales. Esto hace que el ángulo de enlace O(1)-V-O(2) sea de 165, 8° y no 180° que es lo que se observa en la mayoría de los monoperoso complejos [3,11,31-36]. Esta inclinación del ángulo O(1)-V-O(2) fuera del grupo peroxo seguido de una envoltura cerrada del quelato NTA distorsiona evidentemente la coordinación del poliedro. Esta distorsión, si bien expone al

grupo peroxo, permite evidentemente un solapamiento óptimo entre los orbitales del ligando y los del vanadio.

Estas características de coordinación tan particulares, que no existen en otros compuestos similares seguramente son, en parte, los responsables de la notoria estabilidad química.

### **2.3.3. Síntesis del complejo**

El complejo se preparó siguiendo la técnica descrita por Djordjevic y col. [12]. Se disuelve 1 g de  $V_2O_5$  en 15 mL de agua destilada que contiene 1 g de KOH, con suave calentamiento. Se le agrega 1,6 g de ácido nitrilo triacético,  $H_3NTA$ , disuelto en 15 mL de agua, y con constante agitación. Luego se añaden 3 mL de  $H_2O_2$  al 30 %. Finalmente se ajusta el pH entre 5 y 6. La solución se filtra, y se adiciona etanol para iniciar la precipitación. La mezcla de reacción se deja toda la noche a  $5^\circ C$  y se obtienen cristales rojo-anaranjados que se filtran y se lavan con etanol al 60%.

### **2.3.4. Resultados y Discusión**

#### **2.3.4.1. Espectros electrónicos**

La Fig. 3a muestra el espectro de una solución acuosa ( $1,5 \times 10^{-3} M$ ) del complejo. La banda de absorción con máximo en 430 nm y  $\epsilon = 307 L mol^{-1} cm^{-1}$  corresponde a una transferencia de carga del ligando al metal (peroxo-vanadio) la cual es característica de los monoperoxovanadatos [3,11,12]. Tal como ocurre en los complejos con ácido cítrico y málico, en soluciones ácidas (pH =1) el máximo de esta banda se desplaza a 450 nm debido a la presencia del ion  $VO(O_2)^+$  [11,13,14] (Fig. 3b).



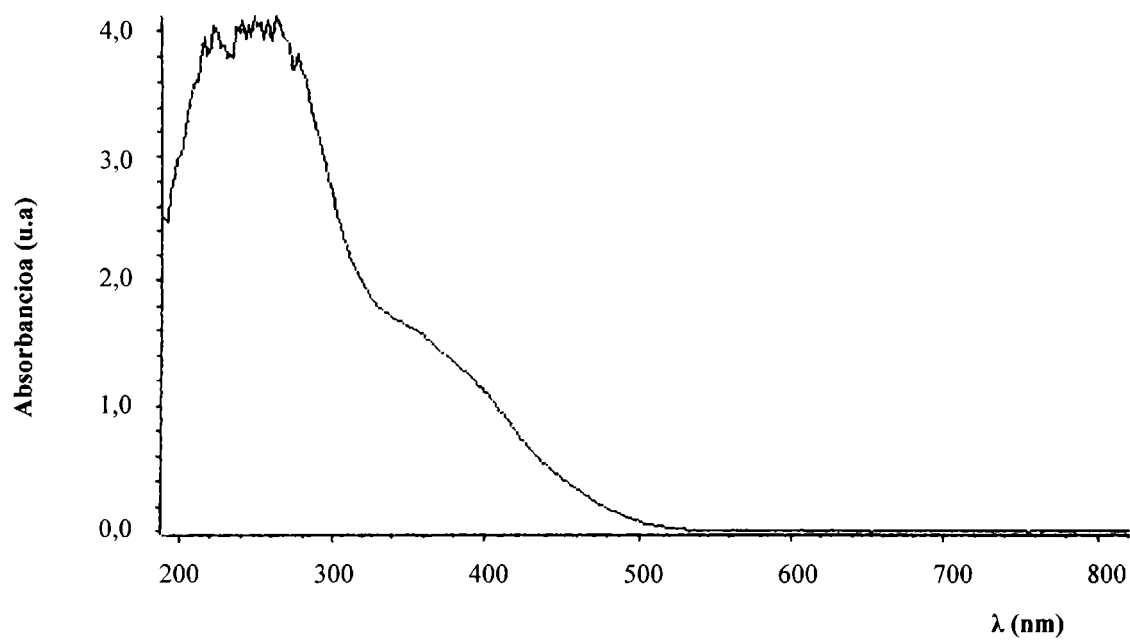


Figura 3a. Espectro electrónico de  $K_2[VO(O_2)(C_6H_6NO_6)].2H_2O$  en solución acuosa

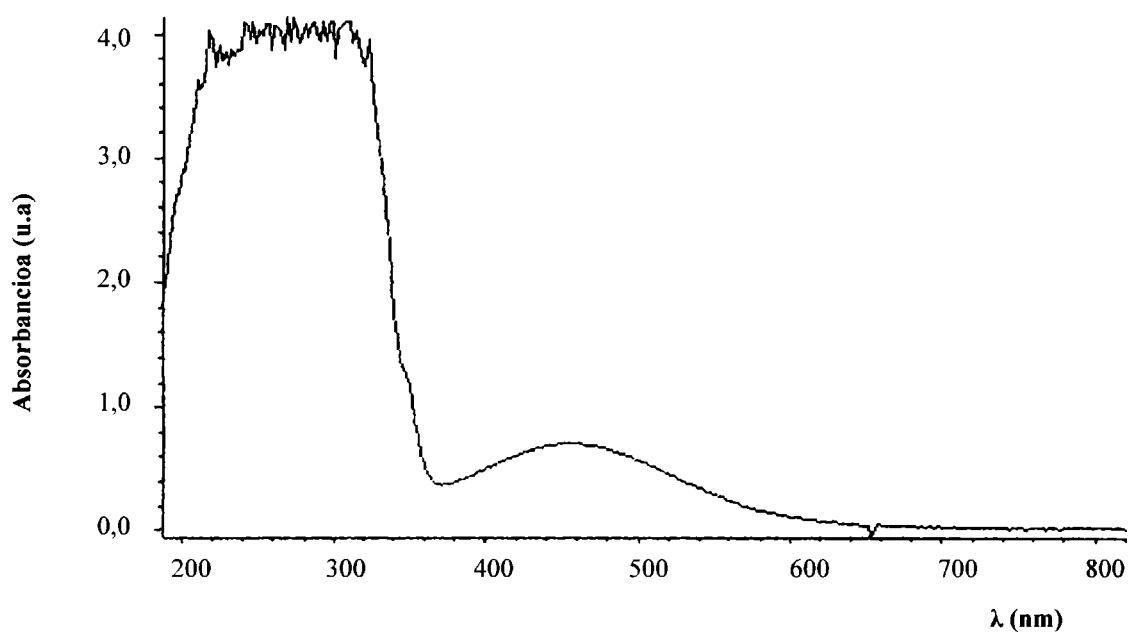


Figura 3b. Espectro electrónico de  $K_2[VO(O_2)(C_6H_6NO_6)].2H_2O$  en solución acuosa ácida (pH 1)

### 2.3.4.2. Espectros infrarrojos y Raman

Los espectros IR fueron medidos utilizando las muestras sólidas en forma de pastillas de KBr.

Las Figs. 4 (a y b) muestran la porción más relevante del espectro IR del ligando NTA y su complejo de vanadio en tanto que la Fig. 5 muestra el espectro Raman del mismo.

En la Tabla 1 se muestran las asignaciones de las bandas más importantes del espectro IR y Raman las cuales fueron realizadas comparando el espectro del complejo con el del ligando NTA libre y en base a datos reportados en la bibliografía para otros monoperoxocomplejos de vanadio(V) con heteroligandos [3,11,12].

Para el ligando NTA el espectro IR muestra una banda intensa alrededor de  $1730\text{ cm}^{-1}$  la cual se asigna al estiramiento C=O de los grupos carboxilato. Una serie de bandas que se presentan en el espectro entre  $1460$  y  $1300$  se asignan a la flexión en el plano del enlace C-OH, la cual se presenta en la misma región que la vibración en tijera del grupo metileno,  $\text{CH}_2$ , adyacentes al carboxilo. Un doblete de mayor intensidad ubicado en  $1244$ - $1224\text{ cm}^{-1}$  se asigna al alargamiento del enlace C-O. La banda intensa ubicada en  $1205\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento del grupo C-O acoplado con la deformación OH de grupos COOH en tanto que la banda ubicada en  $1077\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento del enlace C-N. Tres bandas intensas ubicadas en  $1009$ ,  $970$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, se asignan a la flexión fuera del plano del enlace O-H del grupo carboxílico, acopladas al estiramiento del enlace C-C. Una banda de intensidad media en  $862\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento simétrico CCN, en tanto que las bandas presentes entre  $750$  y  $680\text{ cm}^{-1}$  se asignan al modo de rocking del grupo  $\text{CH}_2$ .

El espectro IR del complejo de vanadio (V) presenta una banda ancha de intensidad media centrada en  $1628\text{ cm}^{-1}$  asignable al estiramiento antisimétrico de los grupos  $\text{COO}^-$ . Tal como puede observarse, al comparar los espectros del ligando y su complejo, esta banda está desplazada a frecuencias menores que la correspondiente al grupo C=O del ligando libre, el cual aparecía en  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Este desplazamiento indica que todos los grupos carboxilatos del ligando están deprotonados y coordinados al igual que en otros peroxo complejos estudiados en los cuales el  $\text{COO}^-$  forma parte del enlace metal-ligando. Una banda adicional en  $1400\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento simétrico de los grupos  $\text{COO}^-$ .

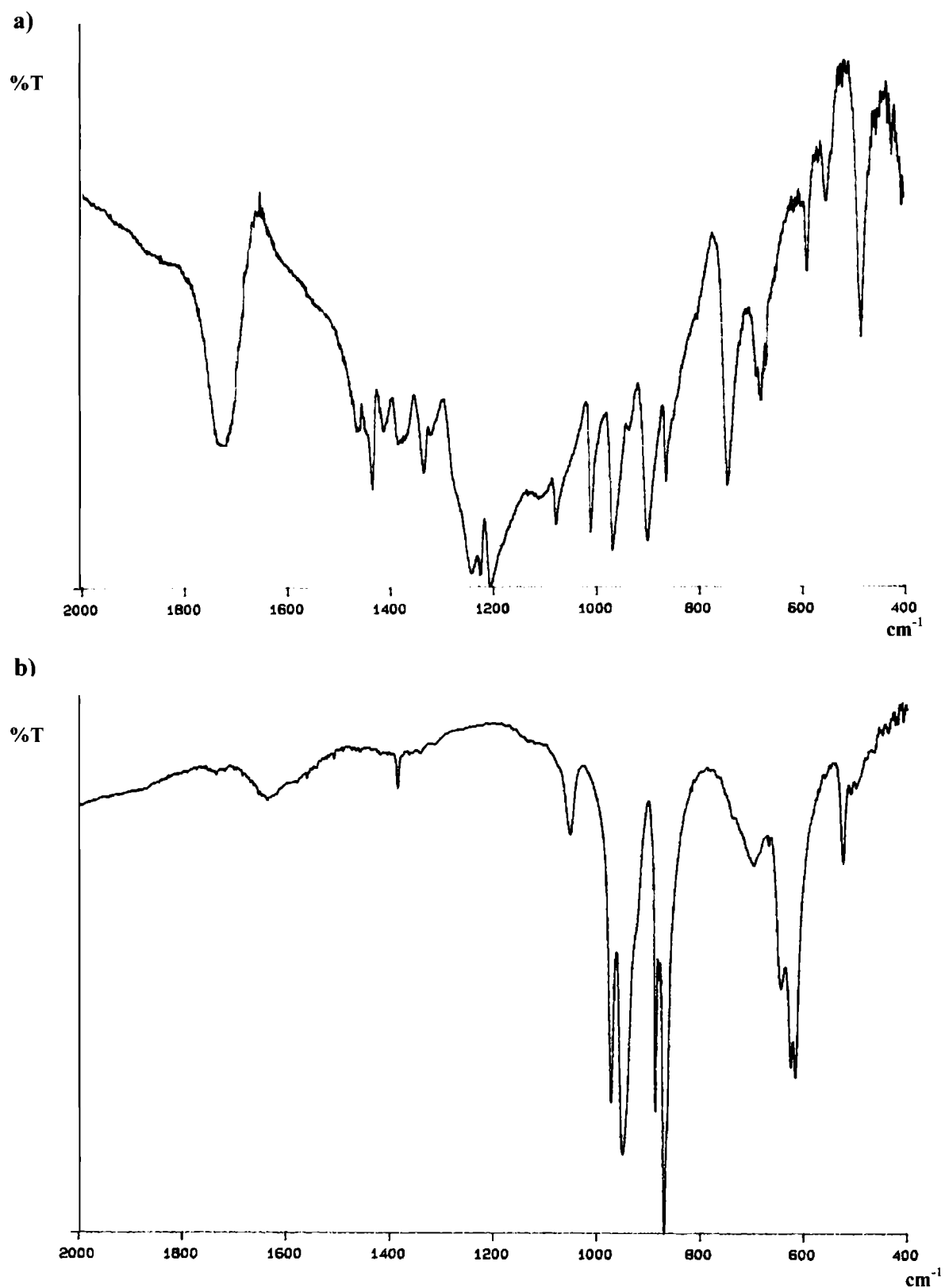


Figura 4: a) Espectro IR del ligando NTA; b) espectro IR del complejo oxoperoxo(nitrilotriacetato)vanadato (V) de potasio

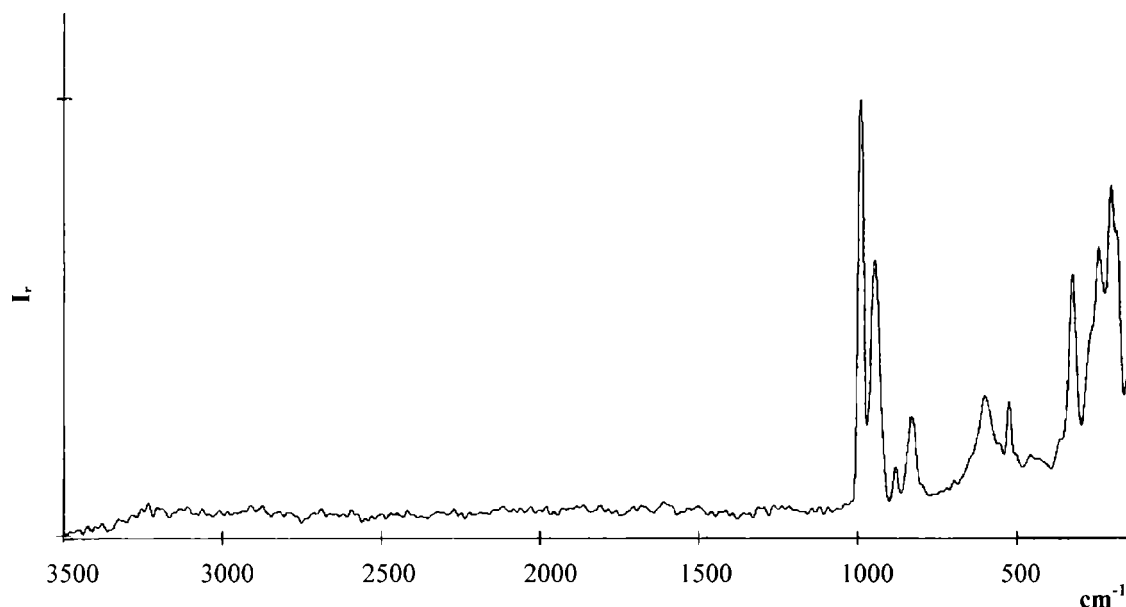


Figura 5. Espectro Raman del complejo oxoperóxido(nitrilotriacetato)vanadato (V) de potasio

La banda de intensidad media ubicada en  $1068\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento C-N. Por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  el espectro presenta dos pares de bandas intensas ubicadas en  $980 - 956$  y  $890 - 880\text{ cm}^{-1}$  las cuales se asignan a las frecuencias de estiramiento de los enlaces V=O y O-O, respectivamente. En el espectro Raman, se observan dos bandas en  $991$  y  $952\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a  $\nu(\text{V}=\text{O})$  y dos bandas en  $898$  y  $886\text{ cm}^{-1}$  que se asignan a  $\nu(\text{O}-\text{O})$ . La banda de intensidad media alrededor de  $700\text{ cm}^{-1}$  se asigna tentativamente al acoplamiento entre las vibraciones de estiramiento antisimétrico V-O<sub>2</sub> y el estiramiento del enlace O-O. Finalmente el estiramiento antisimétrico del grupo V-O<sub>2</sub> aparece como un doblete intenso en IR ubicado en  $607-602\text{ cm}^{-1}$  y en  $603\text{ cm}^{-1}$  de intensidad media en Raman, en tanto que el estiramiento simétrico del mismo grupo aparece como una banda de intensidad media ubicada en  $522\text{ cm}^{-1}$  en IR y  $526\text{ cm}^{-1}$  en Raman.

Los desdoblamientos observados para algunos de los vibradores presentes en el complejo (por ej.  $\nu(\text{V}=\text{O})$  y  $\nu(\text{O}-\text{O})$ ) podrían deberse, en principio a efectos de grupo factor.

**Tabla 1.** Asignaciones de las vibraciones características del ligando NTA y su complejo de oxoperoxovanadio (V). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

NTA IR	$\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]$ IR	Raman	Asignación
1730 f			$\nu \text{C}=\text{O}$
	1628 f		$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1463 f			$\delta \text{CH}_2$ tijera
1435 f			$\delta \text{C-OH}$ en el plano
1412 m			
1385 m			
1316 d			
	1400 m		$\nu_{\text{s}}\text{COO}^- + \delta \text{CH}_2$ tijera
1244 f			$\nu \text{C-O}$
1224 f			$\nu \text{C-O} + \delta \text{C-OH}$
1205 f			
1077 m	1068 m		$\nu \text{C-N}$
	980 f	991 mf	$\nu \text{V}=\text{O}$
	956 f	952 f	
1009 m			$\delta \text{C-OH}$ fuera del plano + $\nu \text{C-C}$
970 f			
937 d			
900 f			
	890 f	898 d	$\nu \text{O-O}$
	880 mf	886 m	
862 m			$\nu \text{CCN}$
750 f			$\rho \text{CH}_2$
680 m			
	700 m		$\nu_{\text{as}}\text{V-O}_2 + \nu \text{O-O}$
	607 f	603 m	$\nu_{\text{as}}\text{V-O}_2$
	602 f		
	522 m	526 m	$\nu_{\text{s}}\text{V-O}_2$

## 2.4. Conclusiones

Para finalizar este capítulo se hará una revisión comparativa de los principales resultados espectroscópicos obtenidos. La información más relevante para analizar se resume en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Comparación de datos estructurales y espectroscópicos de los tres complejos estudiados

Complejo	Datos cristalográficos	Datos estructurales	Frecuencia de estiramiento (cm <sup>-1</sup> )	T.C. (O <sub>2</sub> <sup>2-</sup> → V) (ε/L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
[VO(O <sub>2</sub> )(malato)] <sub>2</sub> <sup>2-</sup> [10]*	Grupo espacial: P1 Z = 2	d(V=O) = 1,602 Å d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,884 Å 1,874 Å d(O-O) = 1,442 Å	v(V=O) = 971f / 955m v <sub>as</sub> (V-O) = 603m v <sub>s</sub> (V-O) = 561 f v(O-O) = 920m / 907d	420 nm (ε = 300)
[VO(O <sub>2</sub> )(citrato)] <sub>2</sub> <sup>2-</sup> [3]*	Grupo espacial: P2 <sub>1</sub> /n Z = 2	d(V=O) = 1,601 Å d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,873 Å 1,883 Å d(O-O) = 1,427 Å	v(V=O) = 983 f v <sub>as</sub> (V-O) = 572 m v <sub>s</sub> (V-O) = 550 m v(O-O) = 933 f	410 nm (ε = 354)
[VO(O <sub>2</sub> )(NTA)] <sub>2</sub> <sup>2-</sup> [12]*	Grupo espacial: Pna2 <sub>1</sub> Z = 4	d(V=O) = 1,617 Å d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,929 Å 1,790 Å d(O-O) = 1,438 Å	v(V=O) = 980 f v <sub>as</sub> (V-O) = 607f / 602f v <sub>s</sub> (V-O) = 522 m v(O-O) = 890f / 880mf	430 nm (ε = 307)

\* Datos correspondientes a las sales de K<sup>+</sup>

La comparación de las características estructurales de los complejos preparados e investigados en este capítulo de la Tesis muestra que básicamente los enlaces químicos relevantes muestran solo muy pequeñas variaciones. Así, las longitudes de enlace V=O correspondientes al grupo oxovanadio varían entre 1,602 y 1,617 Å mientras que las uniones del vanadio con los oxígenos del grupo peróxido oscilan alrededor de 1,88 Å y sólo en el caso del complejo con NTA, las diferencias son un poco más marcadas. Por su parte las longitudes d(O-O) de esos grupos peroxo son también comparables, oscilando en todos los casos alrededor de 1,44 Å.

Esas similitudes estructurales también se reflejan marcadamente en el comportamiento espectroscópico. Por un lado, la frecuencia de estiramiento v(V=O) está claramente localizada alrededor de los 980 cm<sup>-1</sup> (en el caso de los complejos con malato, el desdoblamiento de esta banda seguramente se origina en efectos de correlación). Por otra parte, todos los modos relacionados con los grupos peroxo, esto es v<sub>as</sub> y v<sub>s</sub> (V-O) y v (O-O), muestran una dispersión mayor lo que confirma la idea de que ninguna de estas vibraciones es una vibración que pueda considerarse como realmente “pura”, mostrando un variable grado de acoplamiento con otros modos vibracionales del respectivo complejo.

En lo que respecta a la característica transferencia de carga  $O_2^{2-} \rightarrow V$ , la misma también está claramente acotada en todos los complejos estudiados con su máximo de absorción alrededor de 420 nm y con intensidades totalmente comparables.

Finalmente, era interesante ver si resultaba posible establecer alguna correlación entre la posición de esa banda de T.C. y la magnitud del enlace O-O del grupo peroxo ligado. En general, se ha admitido que esa T.C. se origina en una transición que involucra, esencialmente, la orbital  $\pi^*$  del grupo peroxo y alguna de las orbitales d vacías del metal central (preferentemente las  $d_{xy}$  o  $d_{x^2-y^2}$ ) [38]. Este tipo de “donación  $\pi$ ” seguramente se ve favorecida por la elevada carga del metal central [38,39] y debería llevar aun refuerzo del enlace O-O debido a la cesión de densidad electrónica inicialmente en una OM antienlazante.

Un análisis detallado de esa situación en los tres complejos reunidos en la Tabla 2 muestra claramente esa tendencia. La T.C. de mayor energía se observó en el complejo con citrato que es el que tiene el enlace O-O del grupo peroxo más corto. Los otros dos complejos, con enlaces O-O algo más largos muestran la T.C. a menores energías.

## 2.5. Bibliografía

1. XIIth IUPHAR Congress, Montreal, "Vanadium Symposium", *Can. J. Phys. Pharm.* **72**, Suppl. 3 (1994).
2. Wever, R. y Kustin, K., *Adv. Inorg. Chem.* **35**, 81 (1990).
3. Djordjevic, C., Lee, M. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **28**, 719 (1989).
4. Djordjevic, C. y Wampler, G.L., *J. Inorg. Biochem.* **25**, 51 (1985).
5. Conte, V. DiFuria, F. y Modena, G., *J. Org. Chem.* **53**, 1665 (1988).
6. Fridovich, I., en G. L. Eichhorn y L. G. Marzilli (Editores.) *Advances in Inorganic Biochemistry Vol. 1*, Elsevier, New York, p 67 (1979).
7. Floyd, R. A., *Free Radicals and Cancer*, Marcel Dekker, New York, (1982).
8. Sigel, H. y Sigel, A. (Editores), *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 31, Vanadium and Its Role for Life*, Marcel Dekker, New York, (1995).
9. Chasteen, N.D. (editor), *Vanadium in Biological Systems*, Kluwer, Dordrecht (1990).
10. Djordjevic, C., Lee, M. y Sinn, E., *Inorg. Chem. Acta* **233**, 97 (1995).
11. Djordjevic, C., Craig, S.A. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **24**, 1281 (1985).
12. Djordjevic, C., Wilkins, P.L., Sinn, E. y Butcher, R.J., *Inorg. Chim. Acta* **230**, 241 (1995).
13. Orhanovic, M. y Wilkins, R.G., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 278 (1967).
14. Djordjevic, C., Puryear, B. C., Vuletic, N., Abelt, C. J. y Sheffield, S. J., *Inorg. Chem.* **27**, 2926 (1988).
15. Alcock, N. W., Dudek, M., Grybos, R., Hodorowicz, E., Kanas, A. y Samotos, A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 707 (1990).
16. Cruywagen, J. J., Saayman, L. J. y Niven, M. L., *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **22**, 737 (1992).
17. Llopis, E., Ramirez, J. A., Domenech, A. y Cervilla, A.J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1121 (1993).
18. Glusker, J. P., *Acc. Chem. Res.* **13**, 345 (1980).
19. Martín, R. B., *J. Inorg. Biochem.* **28**, 181 (1986).
20. Etcheverry, S. B., Apella, M. C. y Baran, E. J., *J. Inorg. Biochem.* **20**, 269 (1984).
21. Vilter, H. *Phytochemistry* **23**, 13,87 (1984).



22. Vilter, H., Glombitza, K.W. y Grawe, A. *Bot. Mar.* **26**, 331 (1983).
23. Vilter, H. y Glombitza, K.W. *Bot. Mar.* **26**, 341 (1983).
24. Vilter, H., *Bot. Mar.* **26**, 451 (1983).
25. Job, R., Kelleher, P. J., Stallings, W. C. Jr., Monti, C. T. y Glusker, J. P., *Inorg. Chem.* **21**, 3760 (1982).
26. Zhou, Z. H., Yan, W. B., wan, H. L., Tsai, K. R., Wang, J. Z. y Hu, S. Z., *J. Of. Chem. Crystall.* **25**, 807 (1995).
27. Deacon, G. B. y Phillips, R. J., *Coord. Chem. Rev.* **33**, 227 (1980).
28. Griffith, W. P. y Wickins, T. D., *J. Chem. Soc. A*, 400 (1968).
29. Vuletic, N. y Djordjevic, C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1137 (1973).
30. Mimoun, H., Saussine, L., Daire, E., Postel, M., Fisher, J. y Weiss, R., *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3101 (1983).
31. Stomberg, R., Olson, S. y Svensson, I.B., *Acta Chem. Scand. Ser. A* **38**, 653 (1984).
32. Szentivanyi, H. y Stomberg, R., *Acta Chem. Scand. Ser. A* **37**, 553 (1983).
33. Stomberg, R., *Acta Chem. Scand. Ser. A* **40**, 168 (1986).
34. Begin, D., Einstein, F.W.B. y Field, J., *Inorg. Chem.*, **14**, 1785 (1975).
35. Campbell, N.J., Capparelli, M.V., Griffith, W.P., y Scapski, A.C., *Inorg. Chim. Acta* **77**, L215 (1983).
36. Lapshin, A.E., Smolin, Y.I., Shepelev, Y.F., Schwendt, P. y Gyepesova, D., *Acta Crystallogr. Sect C* **46**, 738 (1990).
37. Cundari, T.R., Zerner, M.C. y Drago, R.S., *Inorg. Chem.* **27**, 4239 (1988).
38. Baran, E.J., *Monatsh. Chem.* **108**, 989 (1977).
39. Tuck, D.G. y Walters, R.M., *Inorg. Chem.* **2**, 428 (1963).

# *Capítulo 3*

---

*Síntesis y propiedades  
Espectroscópicas de  
Oxidiperoxo Complejos  
de Vanadio (V)*

---

### 3.1. Oxodiperoxo complejos de Vanadio V

#### 3.1.1. Introducción

Al igual que los monoperoxo complejos de vanadio (V) estudiados en el capítulo anterior, los diperoxo complejos también reaccionan con distintos tipos de ligandos para formar complejos de fórmula general,  $M_x^1[VO(O_2)_2(L)]$ , donde x depende de la carga negativa del heteroligando. El estudio de estos compuestos resulta muy interesante desde el punto de vista biológico, ya que las investigaciones han demostrado que ellos también tienen actividad insulínica tanto *in vivo* como *in vitro* [1], así como también actividad antitumoral [2], además de ser excelentes oxidantes [3,4]. Con el fin de avanzar en el conocimiento de modelos que permitan simular las intrincadas características del sitio activo de las vanadio-haloperoxidasas se estudió primeramente la síntesis y las propiedades espectroscópicas de algunos oxo-diperoxo complejos de vanadio (V) simples, a saber:

- 1)  $NH_4[VO(O_2)_2NH_3]$
- 2)  $(NH_4)_4 [O\{VO(O_2)_2\}_2]$
- 3)  $K_3[HV_2O_3(O_2)_4] \cdot 2H_2O$  y 3')  $K_3[HV_2O_3(O_2)_4]$

#### 3.1.2. Características Estructurales

La Fig. 1 muestra la estructura del complejo 1, que adopta una geometría de pirámide pentagonal con seis ligandos unidos al átomo de vanadio [5]. Tiene dos grupos peroxo bidentados y un átomo de nitrógeno del grupo  $NH_3$  ubicados en el plano pentagonal. El átomo de vanadio está desplazado fuera de este plano 0,46 Å, es decir un valor más grande que el observado en la geometría de bipirámide pentagonal [5], considerada en todas las estructuras analizadas previamente. Los otros tres complejos, con una geometría de bipirámide pentagonal adoptan la estructura del anión dimérico  $[O\{VO(O_2)_2\}]^{4-}$  [6] que se muestra en la Fig. 2. Esta última estructura es adoptada directamente por el complejo 2, mientras que en los complejos 3 y 3', el oxígeno 6 aparece protonado [7].

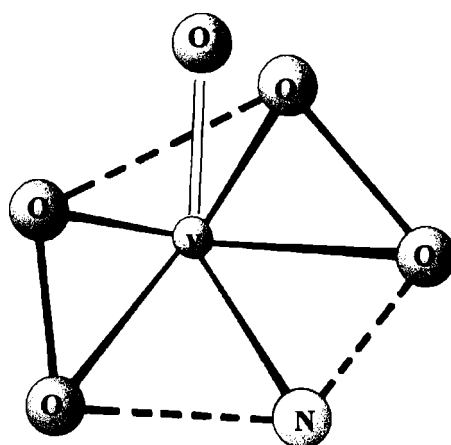


Figura 1. Estructura del anión  $[VO(O_2)_2NH_3]^-$ . Tomado y modificado de cita [5]

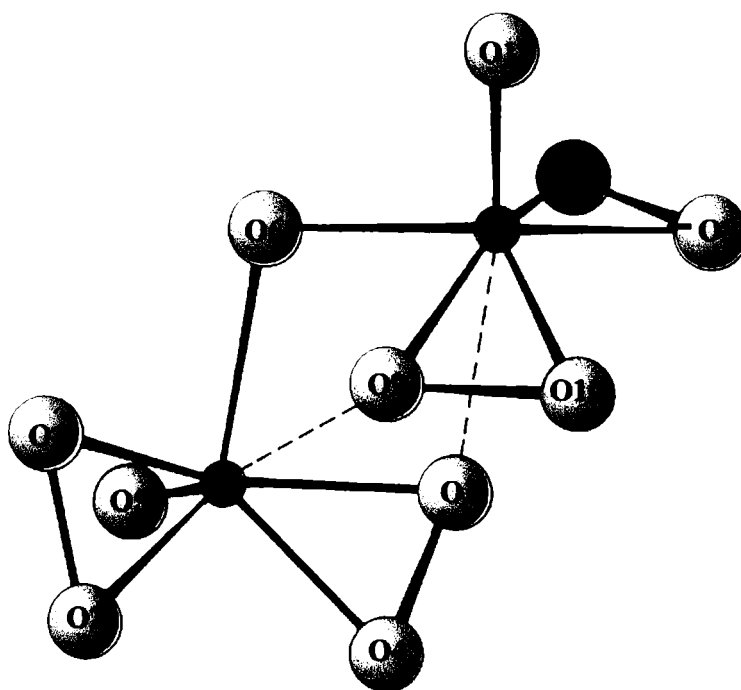


Figura 2. Estructura del anión dimérico  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^+$ . Tomado y modificado de cita [6]

### 3.1.3. Síntesis de los Complejos

Todos los compuestos fueron sintetizados por reacción en solución acuosa, utilizando métodos citados en la bibliografía [6-8], tal como se describe a continuación:

#### 1) $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]$

Se disuelven 2 g de metavanadato de amonio en 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % con agitación suave hasta obtener una solución naranja transparente. Se ajusta el pH entre 9 y 12 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y luego se agrega etanol para iniciar la precipitación. Se enfría por espacio de una hora a  $5^\circ\text{C}$  hasta que cese la aparición de cristales amarillos. El producto obtenido se filtra, se lava con éter y se seca a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 6 h.

#### 2) $(\text{NH}_4)_4 [\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]$

Se disuelven 1,2 g de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  y 2,8 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  en 40 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  que contienen 2,4 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Se agita aproximadamente durante 2 h hasta obtener una disolución total de los sólidos. Se agrega  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta llevar el pH a 9 (aproximadamente 0,6 mL) y la solución se deja en reposo toda la noche, tiempo en el cual se separan los cristales del complejo, de color amarillo.

#### 3) $\text{K}_3[\text{HV}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 3') $\text{K}_3[\text{HV}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4]$

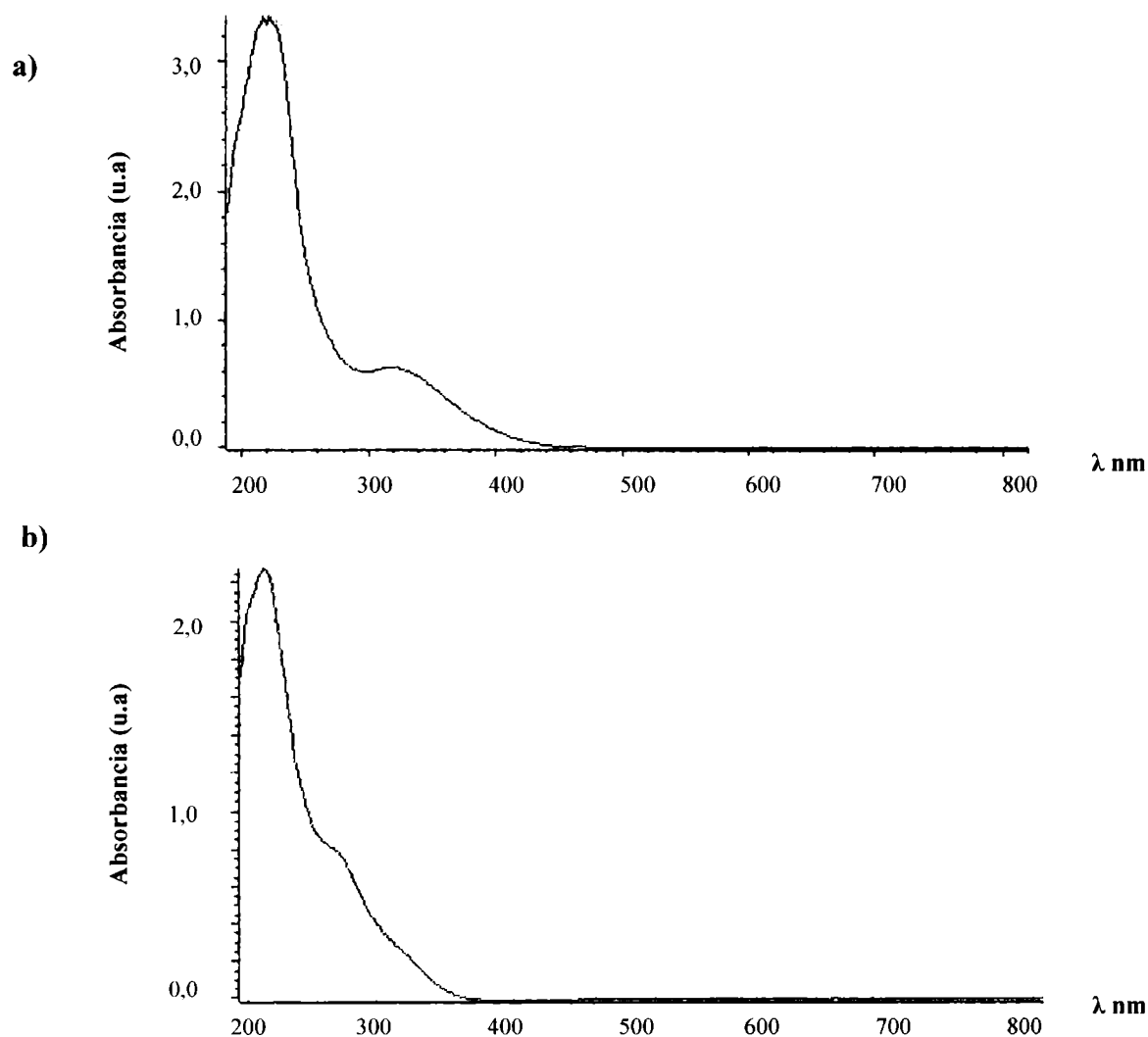
Se disuelven 0,9 g de  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 30 mL de agua destilada y 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Se obtiene una solución de color rojo. Se agrega lentamente 20 mL de  $\text{KOH}$  1M hasta obtener una solución amarilla de  $\text{pH} = 6$ . Se deja dos días a  $2^\circ\text{C}$  y se obtienen cristales amarillos de  $\text{K}_3[\text{HV}_2\text{O}_3(\text{O}_2)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que se lavan con etanol y se secan al aire. Si estos cristales se secan sobre  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ , se obtiene la sal anhidra.

### 3.1.4. Resultados y Discusión

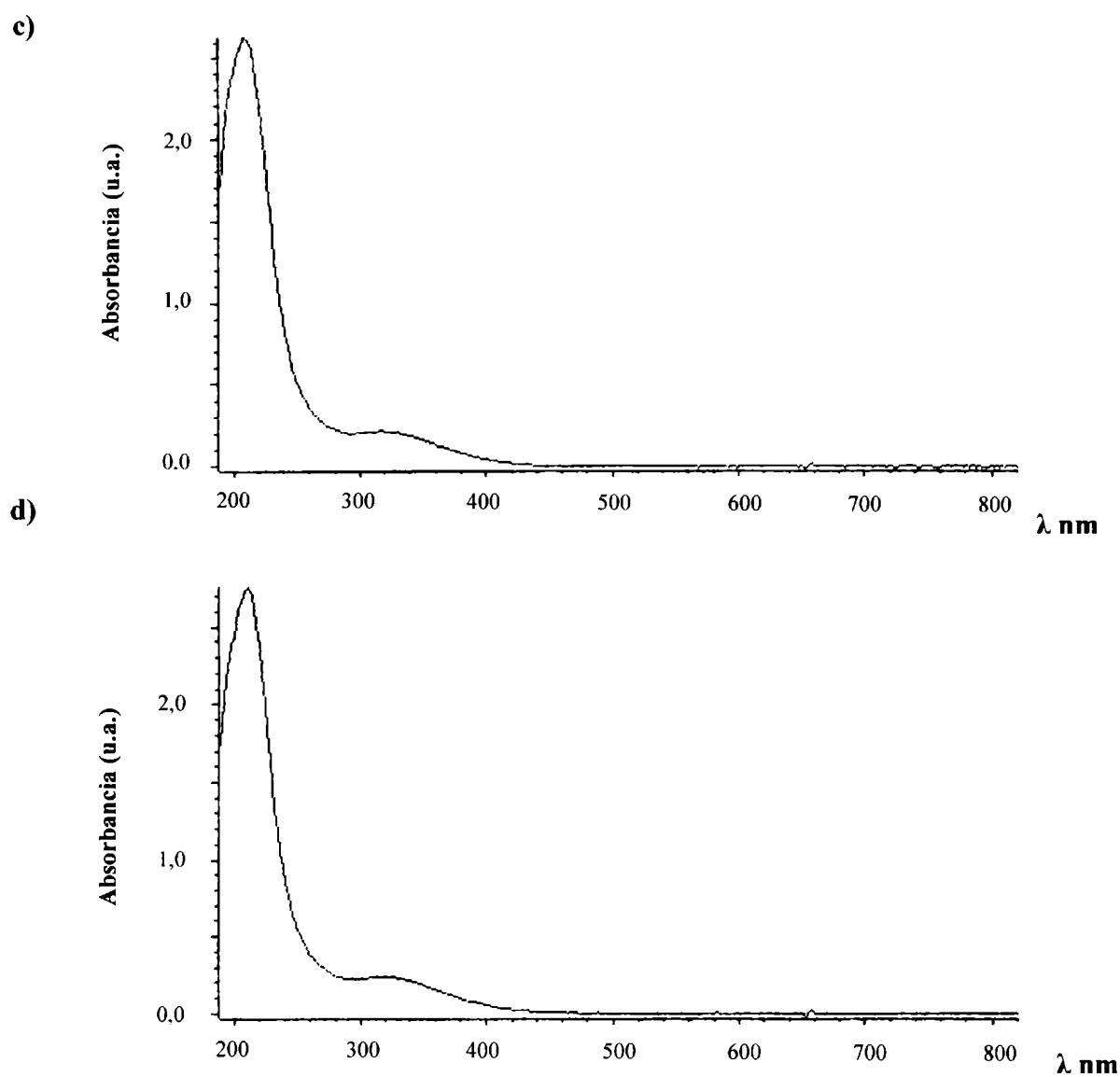
#### 3.1.4.1. Espectros electrónicos

La Fig. 3 (a, b c y d) muestran los espectros electrónicos de soluciones acuosas de los cuatro complejos estudiados, en el rango comprendido entre 200 y 800 nm.

En la Tabla 1 se indican las posiciones de las bandas de absorción que muestran estos complejos, así como los respectivos coeficientes de extinción. La banda de absorción más intensa, cuya posición varía entre 208 y 222 nm para los distintos peroxo complejos puede ser asignada a una transición de transferencia de carga del oxígeno libre al metal. La segunda banda, responsable del color, cuya localización fluctúa entre 316 y 320 nm corresponde a una transferencia de carga del orbital  $\pi^*$  del  $O_2^{2-}$  a un orbital  $d_{xy}$  o  $d_{x^2-y^2}$  desocupado del metal. De todas maneras, la mayor intensidad de estas bandas, en comparación con la de los monoperoxo complejos, podría deberse a un cierto mezclamiento de ambas transiciones, aún en esta zona, o simplemente a un refuerzo adicional debido a la presencia de dos grupos peroxo donores.



**Figura 3.** Espectros electrónicos en solución acuosa a)  $NH_4[VO(O_2)_2NH_3]$  ( $3,5 \times 10^{-4} M$ )  
b)  $(NH_4)_4[O\{VO(O_2)_2\}_2]$  ( $2,29 \times 10^{-4} M$ )



**Figura 3.** Espectros electrónicos en solución acuosa c)  $K_3[HV_2O_3(O_2)_4] \cdot 2H_2O$  ( $1,8 \times 10^{-4} M$ )  
d)  $K_3[HV_2O_3(O_2)_4]$  ( $1,8 \times 10^{-4} M$ )

**Tabla 1.** Datos de los espectros electrónicos de los complejos estudiados.

Complejo	Posición de las bandas (nm)		$\epsilon$ (L M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )		
NH <sub>4</sub> [VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> ]	222	318	9560		1790
(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> [O{VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> } <sub>2</sub> ]	208	262 308	9967	3502	1342
K <sub>3</sub> [HV <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (O <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ]. 2H <sub>2</sub> O	210	316	15000		1222
K <sub>3</sub> [HV <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (O <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ]	212	318	14800		1277

### 3.1.4.2. Espectros infrarrojos y Raman

Los espectros IR fueron medidos utilizando las muestras sólidas en forma de pastillas de KBr.

La asignación de las bandas de los espectros para las distintas especies estudiadas en este capítulo se realizó en base a los estudios espectroscópicos realizados en capítulos anteriores y en base a datos reportados en la bibliografía [7,9-11]

Las Figuras 4, 5 y 6 muestran la sección más relevante de los espectros IR y Raman para los compuestos 1, 2 y 3. mientras que tanto la posición como la asignación de las bandas más importantes de los mismos se muestran en la Tabla 2.

Tal como puede observarse en los distintos espectros, todos los compuestos estudiados tienen vibraciones típicas de V-O<sub>T</sub>, V-O<sub>P</sub> y O-O<sup>2-</sup> las cuales aparecen en el rango de frecuencias esperadas para este tipo de uniones. Así por ej. para el complejo NH<sub>4</sub>[VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>], el espectro muestra dos bandas intensas ubicadas en 970 y 950 cm<sup>-1</sup>, las cuales se asignan al estiramiento del enlace V=O. En el espectro Raman estas bandas aparecen ubicadas en 1000 (intensa) y 957 (media) cm<sup>-1</sup> respectivamente. El estiramiento del enlace O-O se observa como dos bandas intensas en 885 y 870 cm<sup>-1</sup> en IR y 900 (intensa) y 890 (muy débil) cm<sup>-1</sup> en Raman. Una banda de intensidad media ubicada en 640 cm<sup>-1</sup> en IR y ausente en Raman se asigna tentativamente al acoplamiento entre las vibraciones de estiramiento antisimétrico V-O<sub>2</sub> y el estiramiento del enlace O-O.



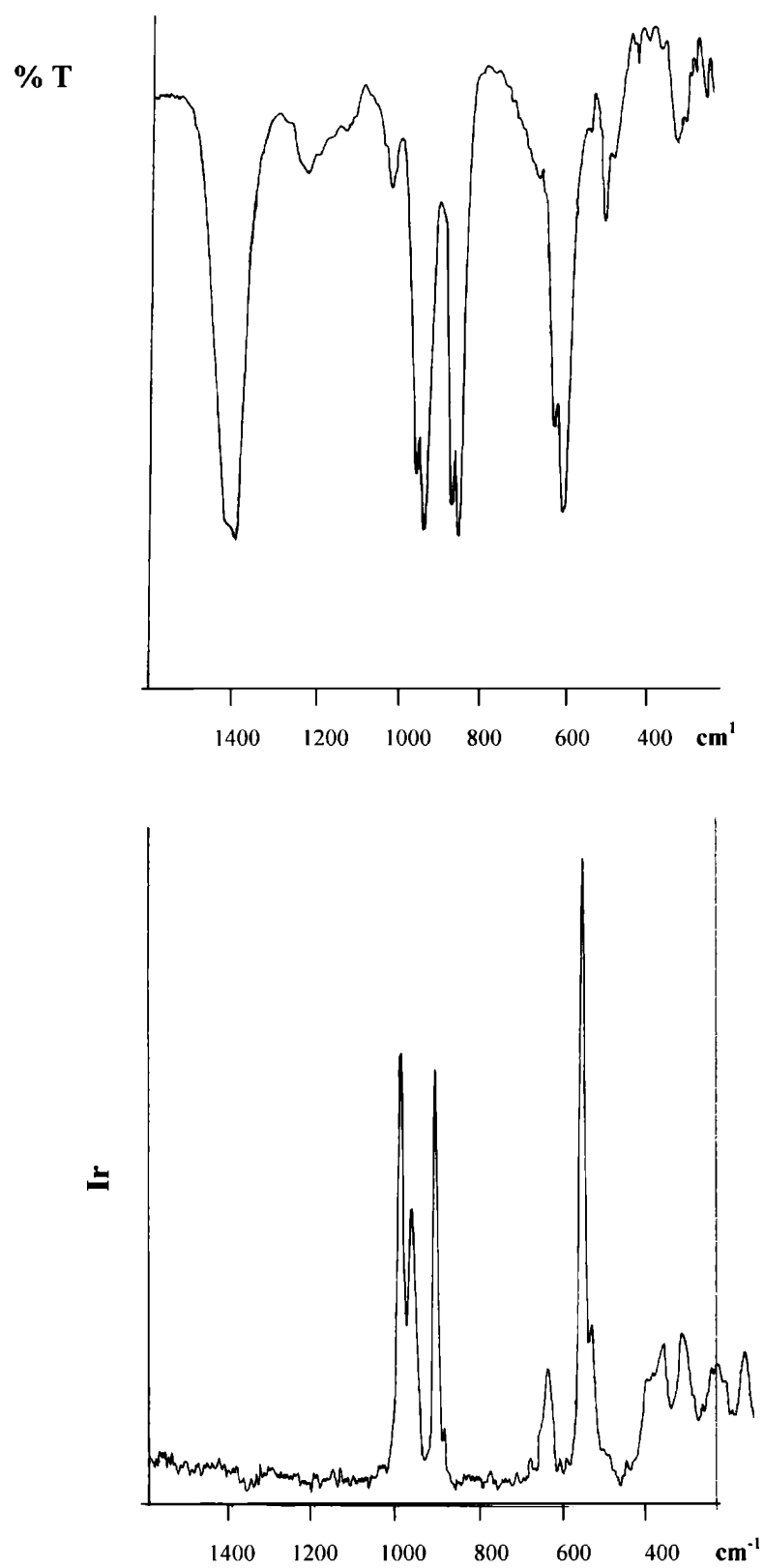
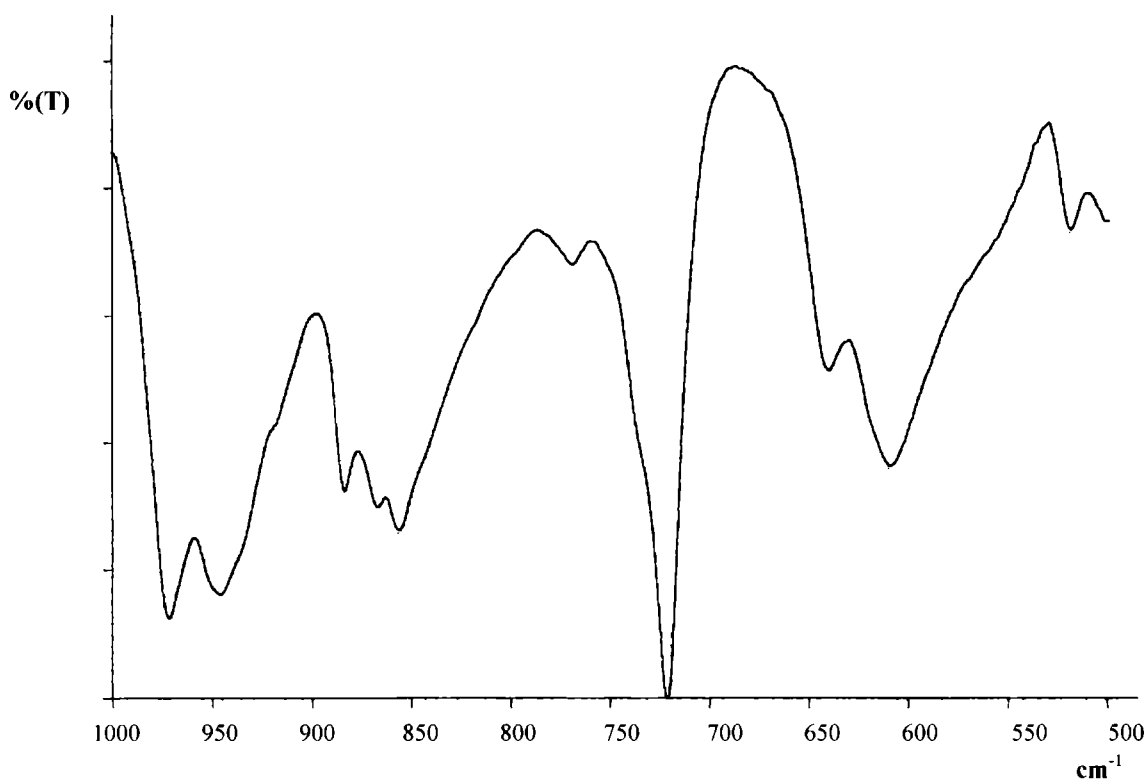


Figura 4. Espectros IR y Raman de  $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]$



*Figura 5. Espectro IR del complejo  $(\text{NH}_4)_4 [\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]$*

Las frecuencias del estiramiento simétrico y antisimétrico del enlace metal-peroxo, V-O<sub>2</sub>, son claramente distinguibles y aparecen separadas aproximadamente 100 cm<sup>-1</sup> tal como puede esperarse para un complejo diperoxo con un ligando monodentado [11]. Así dos bandas presentes en el espectro IR en 621(intensa) y 523 cm<sup>-1</sup> y en 621(débil) y 530 (fuerte) en Raman, se asignan a las frecuencias de estiramiento antisimétrica y simétrica respectivamente del enlace V-O<sub>2</sub>.

Los espectros de los otros complejos estudiados en esta sección presentan características similares en cuanto a la posición y asignación de las bandas las cuales pueden observarse en la Tabla 2.

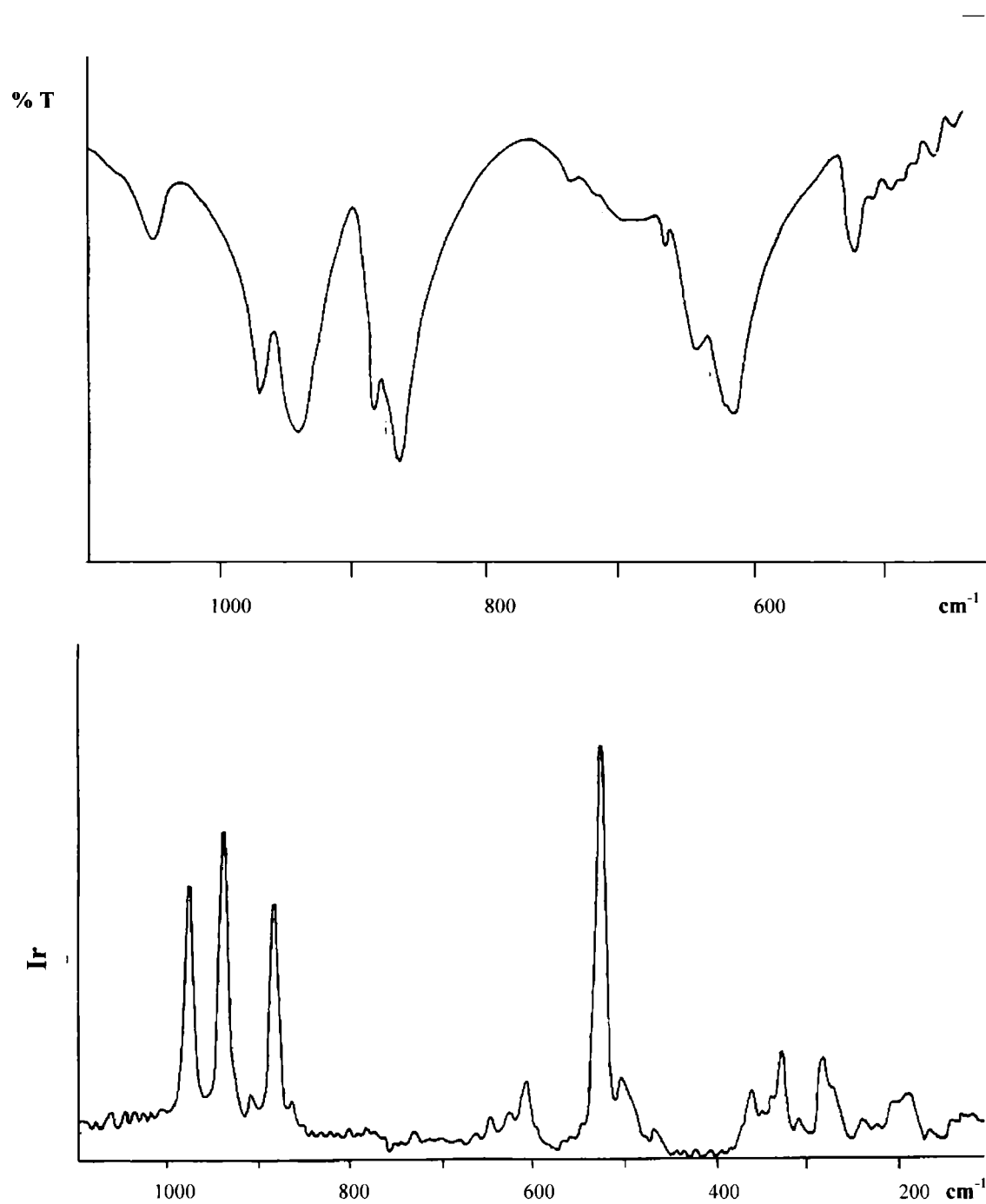


Figura 6. Espectro IR y Raman de  $K_3[HV_2O_3(O_2)_4]$

**Tabla 2.** Asignaciones de las vibraciones características de los complejos estudiados. (Posición de las bandas en  $cm^{-1}$ )

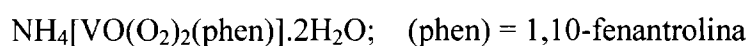
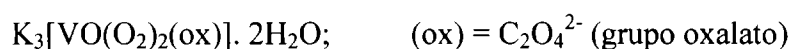
COMPUESTO	IR	RAMAN	ASIGNACIÓN
<b>NH<sub>4</sub>[VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>]</b>	1402 f		$\nu_4$ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
	1230 d		$\delta_s$ NH <sub>3</sub>
	970 f	1000 f	$\nu$ V=O
	/ 950 f	/ 957 m	
	885 f	900 f	$\nu$ O-O
	/ 870 f	/ 890 md	
	640 m		$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub> + $\nu$ O-O
	621 f	621 d	$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub>
	523 m	530 f	$\nu_s$ V-O <sub>2</sub>
	444 d	447 d	$\nu$ V-N
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>[O{VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>}<sub>2</sub>]</b>	972 f		$\nu$ V=O
	/946 f		
	883 m		
	/867 m		$\nu$ O-O
	/856 m		
	641 m		$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub> + $\nu$ O-O
	610 f		$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub>
519 m		$\nu_s$ V-O <sub>2</sub>	
<b>K<sub>3</sub>[HV<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(O<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]</b>	972 m	975 f	$\nu$ V=O
	/942 f	/938 f	
	886 m	885 f	$\nu$ O-O
	/868 f	/863 d	
	644 m		$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub> + $\nu$ O-O
	617 f	607 d	$\nu_{as}$ V-O <sub>2</sub>
	525 m	526 f	$\nu_s$ V-O <sub>2</sub>

## 3.2. Oxodiperoxo complejos de Vanadio (V) con ligandos bidentados

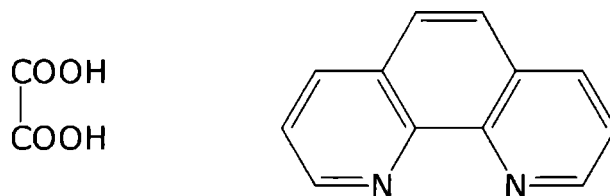
### 3.2.1. Introducción

Estudios realizados por Djordjevic y col. [12] mostraron que el niobio (V) y el tantalio (V), elementos de transición que pertenecen al mismo grupo del vanadio, forman, en presencia de peróxido de hidrógeno, triperoxo complejos con ligandos bidentados tales como 1,10 fenantrolina y ácido oxálico. Sin embargo, los mono y diperoxo complejos de estos elementos de transición se forman solo en presencia de ligandos más electronegativos, tales como los haluros. En cambio el vanadio (V) forma con ligandos bidentados, mono y diperoxo complejos que además contienen como todos los peroxo vanadatos reportados [13-19] un grupo oxo. De modo que estos complejos de vanadio (V) no son análogos a los que forman el Nb (V) y el Ta (V), bajo condiciones similares, y tal comportamiento es esperado debido a la gran tendencia del vanadio a formar uniones con el oxígeno.

En esta sección detallaremos la síntesis y el estudio espectroscópico de oxodiperoxo de dos complejos de vanadio (V) con los ligandos bidentados ácido oxálico y 1,10-fenantrolina de fórmula:



En la Fig. 1 se observan las estructuras de los ligandos bidentados utilizados en la síntesis de estos complejos de vanadio.



**Figura 1.** Esquema de la estructura del ácido oxálico y de 1,10-fenantrolina

### 3.2.2. Características Estructurales

En el caso del complejo  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{C}_2\text{O}_4)]^{3-}$  los dos grupos peroxo y un átomo de oxígeno del oxalato ocupan cinco posiciones ecuatoriales, mientras que el grupo oxo y el restante oxígeno del oxalato se ubican en posición axial, generando un complejo con índice de coordinación siete y geometría de bipirámide pentagonal [20], como se muestra en la Fig. 2. El átomo de vanadio está ligeramente desplazado fuera del plano ecuatorial, tal como es característico en este tipo de complejos [21-23].

La estructura del complejo con 1,10 fenantrolina no ha sido aún determinada, pero su comportamiento general sugiere una geometría totalmente análoga; esto es, con los dos grupos peroxo y un nitrógeno de la fenantrolina conformando el plano ecuatorial y el grupo oxo y el segundo nitrógeno de la fenantrolina en las posiciones axiales.

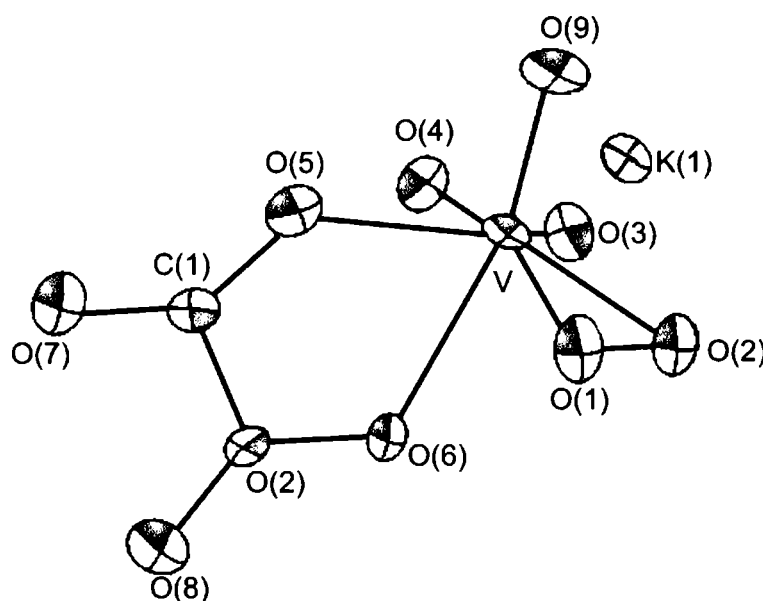


Figura 2. Estructura del anión  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{C}_2\text{O}_4)]^{3-}$ . Tomado y modificado de cita [20]

### 3.2.3. Síntesis de los Complejos

Ambos complejos fueron preparados a partir de soluciones acuosas y por precipitación con etanol, utilizando métodos de la bibliografía [24], tal como se describe a continuación:

**1)  $K_3[VO(O_2)_2(ox)]. 2H_2O$** 

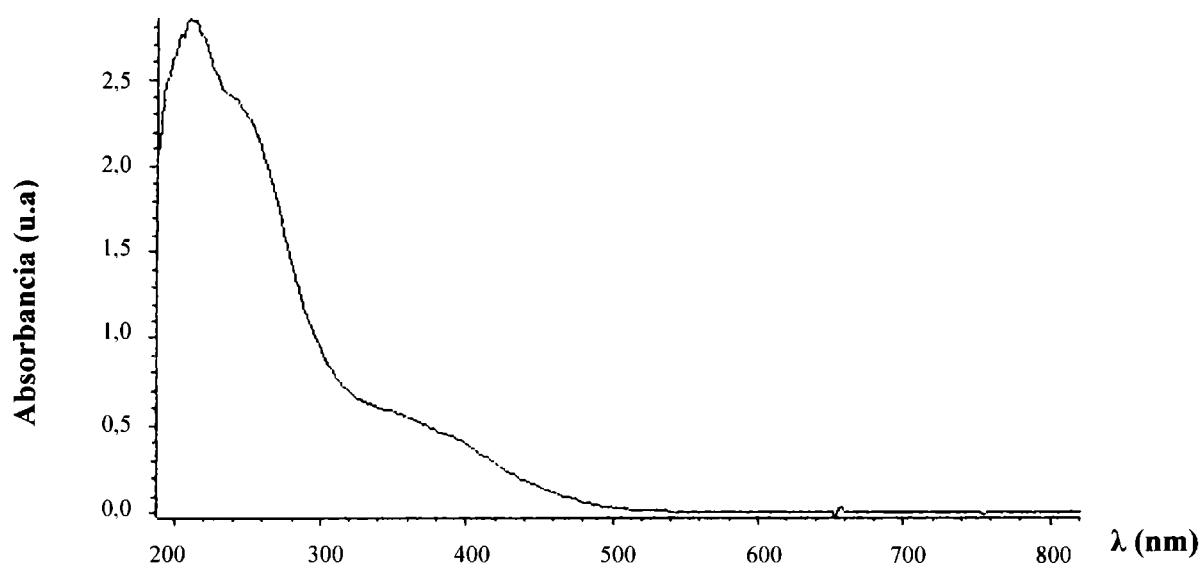
Se disuelven 0,91 g de  $V_2O_5$  y 1,95 g de KOH en 20 mL de agua destilada y se agrega a esta solución 1,26 g de ácido oxálico disuelto en 10 mL de agua y 20 mL de  $H_2O_2$  al 30 %. Se adiciona luego etanol gradualmente hasta que comienza a aparecer un precipitado. Este último se redissuelve en una pequeña cantidad de  $H_2O_2$ , y la mezcla de reacción se deja que cristalice a 5°C toda la noche. Se obtienen cristales de color naranja que se filtran y se secan sobre papel de filtro.

**2)  $NH_4[VO(O_2)_2(phen)].2H_2O$** 

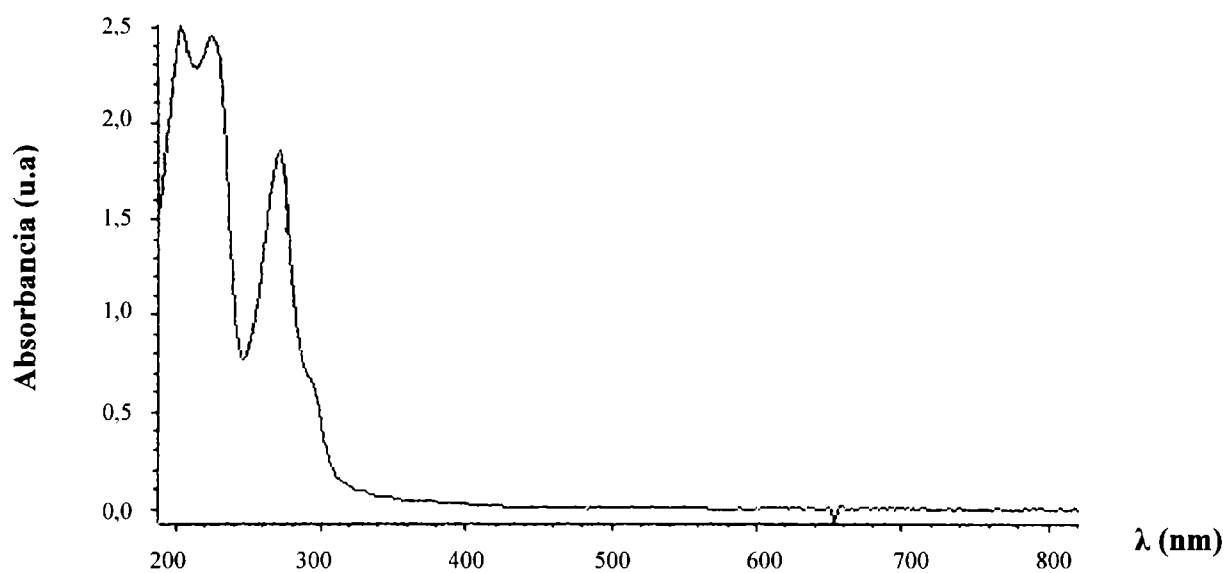
Se disuelven con enfriamiento 0,59 g de  $NH_4VO_3$  en 10 mL de  $H_2O_2$  al 20 % y se agregan con agitación 0,9 g de 1,10 fenantrolina disueltos en 5 mL de etanol. Luego se añaden 20 mL de etanol y se deja que la mezcla de reacción cristalice a 5°C toda la noche. Se obtienen cristales de color amarillo anaranjado que se filtran, se lavan con etanol y se secan al aire.

**3.2.4. Resultados y Discusión****3.2.4.1. Espectros electrónicos**

La Fig. 3 muestra el espectro electrónico de una solución acuosa ( $2,3 \times 10^{-4}$  M) del complejo oxodiperoxo(oxalato)vanadato (V) de potasio mientras que la Fig. 4 muestra el espectro para una solución acuosa ( $2 \times 10^{-4}$  M) del complejo oxodiperoxo(1,10 fenantrolina) vanadato (V) de amonio. La posición de los máximos de absorción para los espectros electrónicos de ambos complejos así como los respectivos coeficientes de extinción se detallan en la Tabla 1. En ambos casos se trata de bandas asignables a transferencias de carga, dado su gran intensidad y su ubicación en el espectro. Así las bandas de absorción más intensa, cuya posición varía entre 204 y 270 nm para los distintos peroxo complejos puede ser asignada a una transición de transferencia de carga del grupo oxo al vanadio ( $O^{2-} \rightarrow V(V)$ ). La segunda banda, responsable del color, ubicada en 356 nm para el complejo con oxalato y que no alcanza suficiente intensidad en el complejo con fenantrolina corresponde a una transferencia de carga  $O_2^{2-} \rightarrow V(V)$ .



**Figura 3.** Espectro electrónico en solución acuosa del complejo  $K_3[VO(O_2)_2(\text{oxalato})] \cdot 2H_2O$



**Figura 4.** Espectro electrónico en solución acuosa del complejo  $NH_4[VO(O_2)_2(\text{phen})] \cdot 2H_2O$



Tabla 1. Datos de los espectros electrónicos de los complejos estudiados

Complejo	Posición de las bandas (nm)			$\epsilon$ (L M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )		
K <sub>3</sub> [VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (oxalato)]. 2H <sub>2</sub> O	212	242	356	12294	10259	2434
NH <sub>4</sub> [VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (phen)].2H <sub>2</sub> O	204	224	270	12530	12226	9278

### 3.2.4.2. Espectros infrarrojos

La asignación de las bandas de los espectros IR para las distintas especies estudiadas en esta sección se realizó en base a los datos reportados en la bibliografía [10,11,13,24,25] y comparando con los espectros de los ligandos libres.

#### a) Ácido oxálico y oxodiperoxo(oxalato)vanadato (V) de potasio

Los espectros IR del ligando y su complejo de vanadio se midieron utilizando las muestras sólidas en forma de pastillas de KBr.

La Fig. 5 muestra la porción más relevante de los espectro IR de ambos compuestos, mientras que la posición y la asignación de las bandas más importantes de los espectros IR se muestran en la Tabla 2.

Para el ácido oxálico, el espectro muestra una banda intensa en 1721 cm<sup>-1</sup>, la cual se asigna al estiramiento del enlace C=O de los grupos carboxílicos. La banda muy intensa en 1634 cm<sup>-1</sup> se asigna a la deformación del agua. Una banda débil, presente en el espectro alrededor de 1395 cm<sup>-1</sup>, se asigna a la deformación en el plano del enlace C-OH, en tanto que la banda de intensidad media que aparece en 1228 cm<sup>-1</sup>, se asigna al alargamiento del enlace C-O.

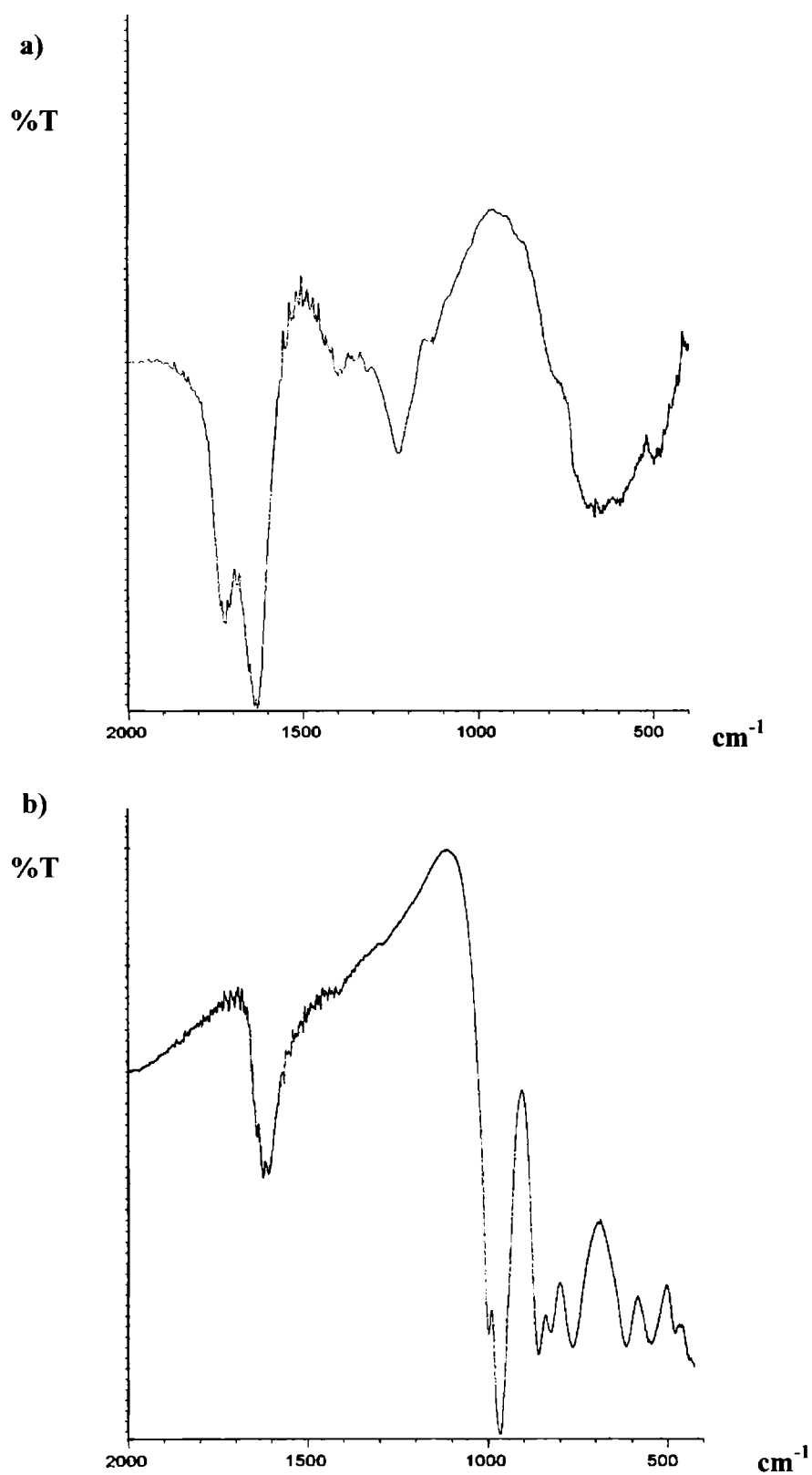


Figura 5. a) Espectro IR del ligando ácido oxálico; b) espectro IR del complejo oxodiperoxo(oxalato)vanadato (V) de potasio

Por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  el espectro presenta una banda ancha de mediana intensidad centrada alrededor de  $650\text{ cm}^{-1}$ , que se asigna a los movimientos de torsión de la molécula de agua.

El espectro del complejo de vanadio presenta bandas características del ácido oxálico coordinado así como también de los grupos oxo y peroxo [24]. Dos bandas de mediana intensidad ubicadas en  $1620$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al estiramiento antisimétrico de los grupos  $\text{COO}^-$ . Tal como puede observarse en el espectro, estas bandas están desplazadas a frecuencias menores que la correspondiente al grupo carboxílico del ligando, la cual aparecía en  $1721\text{ cm}^{-1}$ . Este desplazamiento indica que los dos grupos carboxílicos del ácido oxálico están coordinados. Una banda de intensidad muy débil alrededor de  $1400\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento simétrico de los grupos  $\text{COO}^-$ . La zona del espectro por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  presenta dos bandas ubicadas en  $981$ (fuerte) y  $950$  (muy fuerte)  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se asignan al estiramiento del grupo terminal  $\text{V}=\text{O}$ , en tanto que las dos bandas fuertes ubicadas en  $841$  y  $820\text{ cm}^{-1}$  se asignan con certeza al estiramiento del grupo peroxo ( $\text{O}-\text{O}$ ), ya que esta zona del espectro en el ligando se presenta prácticamente despejada. Dos banda adicionales intensas ubicadas en  $591$  y  $523\text{ cm}^{-1}$  se asignan a las frecuencias de estiramiento antisimétrica y simétrica del enlace  $\text{V}-\text{O}_2$ .

**Tabla 2.** Asignaciones de las vibraciones características del ligando ácido oxálico y su complejo de oxo-diperoxo vanadio (V). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

Ácido oxálico	$\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{ox})].2\text{H}_2\text{O}$	Asignación
1721 f		$\nu\text{ C}=\text{O}$
1634 mf		$\delta\text{ H}_2\text{O}$
	1620 m	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
	1600 m	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
	1400 md	$\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$
1395 d		$\delta\text{ C-OH en el plano}$
1228 m		$\nu\text{ C-O}$
	981 f	$\nu\text{ V}=\text{O}$
	950 mf	$\nu\text{ V}=\text{O}$
	841 f	$\nu\text{ O-O}$
	820 f	$\nu\text{ O-O}$
652 m		$\delta\text{ H}_2\text{O}$
	591 f	$\nu_{\text{as}}\text{ V-O}_2$
	523 f	$\nu_{\text{s}}\text{ V-O}_2$

**b) 1,10-fenantrolina y oxodiperoxo(1,10 fenantrolina) vanadato (V) de amonio**

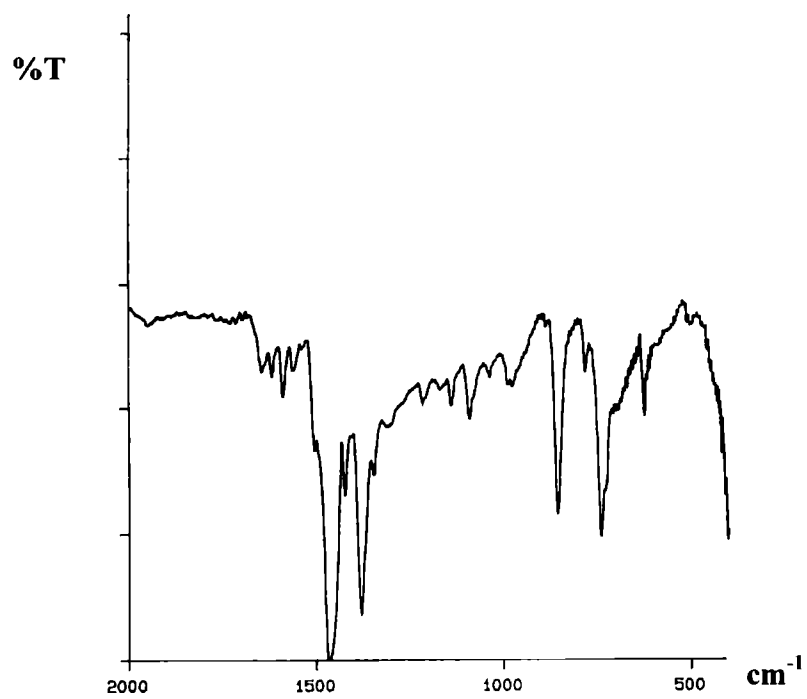
Los espectros IR del ligando y su complejo de vanadio se midieron utilizando las muestras sólidas en suspensión de Nujol.

En la Fig. 6 se muestra la región de mayor interés de los espectros del ligando 1,10-fenantrolina y su complejo de vanadio. En la Tabla 3 se detalla la ubicación y la asignación de las bandas observadas en ambos espectros.

Los espectros del ligando y su complejo de vanadio muestran una serie de bandas entre 1650 y 1378  $\text{cm}^{-1}$  (algunas tapadas por las bandas de Nujol), las cuales se asignan a las vibraciones de alargamiento anular (bandas esqueléticas). La absorción implica el alargamiento y la contracción de todos los enlaces del anillo y la interacción entre estas formas de alargamiento. La zona del espectro entre 1300 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  presenta una serie de bandas, las cuales se asignan a la flexión en el plano del enlace C-H, típica de compuestos aromáticos. Por abajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  se observan cambios significativos al comparar ambos espectros que permiten realizar importantes asignaciones. El espectro del ligando presenta una banda de poca intensidad en 978  $\text{cm}^{-1}$  y dos bandas fuertes en 830 y 737  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales se asignan a la flexión anular fuera del plano del enlace C-H. Por último una banda de intensidad media en 622  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a la deformación del anillo fuera del plano.

El espectro IR del complejo de vanadio en esa misma zona presenta bandas características de los grupos oxo y peroxo [24]. Una banda intensa en 928  $\text{cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento del grupo terminal V=O. Por debajo de 900  $\text{cm}^{-1}$  se obtienen una banda intensa ubicada en 867  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda muestra un pico adicional de intensidad media a mayor frecuencia (877  $\text{cm}^{-1}$ ) separado de la banda principal solamente por 10  $\text{cm}^{-1}$ . Ambas bandas se asignan al estiramiento del enlace O-O, lo cual está de acuerdo con lo observado por Djordjevic y col.[24]. La banda intensa que aparece en 830  $\text{cm}^{-1}$  está presente tanto en el espectro del ligando como en el del complejo y se asigna a la flexión anular fuera del plano del enlace C-H. Finalmente el espectro del complejo presenta dos bandas adicionales de intensidad media ubicadas en 620 y 589  $\text{cm}^{-1}$  las cuales se asignan a los estiramientos antisimétrico y simétrico respectivamente del enlace V-O<sub>2</sub>.

a)



b)

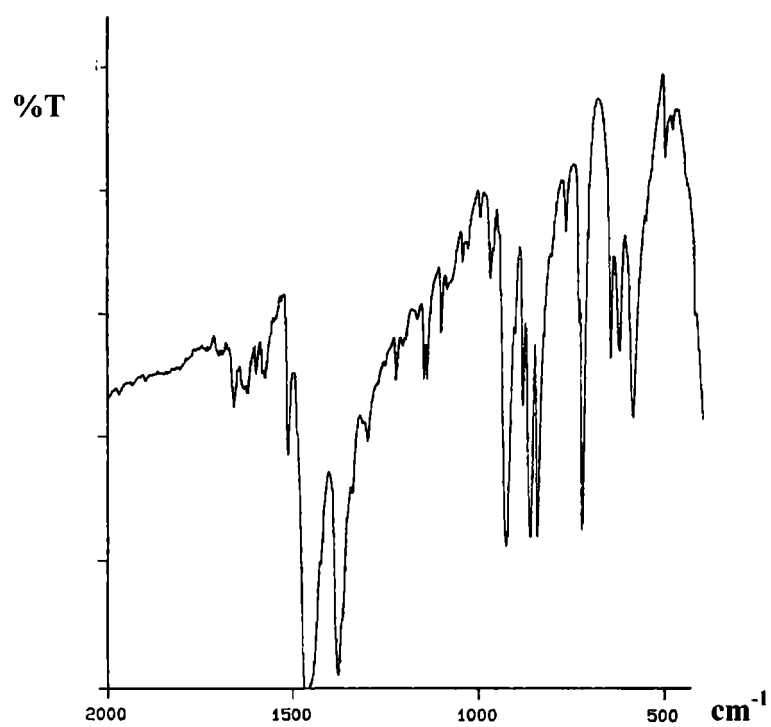


Figura 6. a) Espectro IR del ligando 1,10 fenantrolina; b) espectro IR del complejo oxodiperoxo(1,10 fenantrolina)vanadato (V) de amonio

**Tabla 3.** Asignaciones de las vibraciones características del ligando 1,10-fenantrolina y su complejo de oxo-diperoxo vanadio (V). (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

1,10-fenantrolina	$\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	asignación
1645 m	1660 m	
1614 m	1634 m	
1583 m	1606 m	
1556 m	1578 m	alargamiento anular C-C, C-N (bandas esqueléticas)
1463 f	1550 m	
1417 m	1463 f	
1378 f	1376 f	
1300 d	1300 m	
1211 m	1250 m	
1167 d	1159 m	
1139 m	1144 m	flexión en el plano C-H
1083 m	1105 m	
1039 m	1140 d	
	1010 m	
978 m		flexión anular fuera del plano, C-H
	928 f	$\nu \text{ V}=\text{O}$
	877 m	
	867 f	$\nu \text{ O}-\text{O}$
830 f	830 f	deformación del anillo fuera del plano
737 f		
622 m	650 m	$\nu_{\text{as}} \text{ V}-\text{O}_2$
	620 m	$\nu_{\text{as}} \text{ V}-\text{O}_2$
	589 f	$\nu_{\text{s}} \text{ V}-\text{O}_2$

### 3.2.5. Conclusiones

De la misma manera que al final del capítulo precedente, pareció oportuno analizar en forma comparativa las características estructurales y espectroscópicas de los complejos de este grupo. Para ello la información pertinente se reúne en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de datos estructurales y espectroscópicos de los complejos estudiados.

Complejo	Datos cristalográficos	Datos estructurales	Frecuencia de estiramiento (cm <sup>-1</sup> )	T.C. (O <sub>2</sub> <sup>2-</sup> → V) (ε/L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
[VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> )] <sup>-</sup> [5]	Grupo espacial: D <sup>16</sup> <sub>2h</sub> Z = 4	d(V=O) = 1,606 Å d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,88 Å <sup>p</sup> d(O-O) = 1,472 Å <sup>p</sup>	v(V=O) = 970f / 950f v <sub>as</sub> (V-O) = 621 f v <sub>s</sub> (V-O) = 523 m v(O-O) = 885f / 870f	318 nm (ε = 1790)
[O{VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> } <sub>2</sub> ] <sup>4-</sup> [6]	Grupo espacial: P2 <sub>1</sub> /c Z = 4	d(V=O) = 1,607 Å <sup>p</sup> d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,892 Å <sup>p</sup> d(O-O) = 1,468 Å <sup>p</sup>	v(V=O) = 972f / 946f v <sub>as</sub> (V-O) = 610 f v <sub>s</sub> (V-O) = 519 m v(O-O) = 883f / 867m / 856m	308 nm (ε=1342)
[HV <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (O <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>3-</sup> [7]	Grupo espacial: P2 <sub>1</sub> /c Z = 4	d(V=O) = 1,597 Å <sup>p</sup> d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,88 Å <sup>p</sup> d(O-O) = 1,468 Å <sup>p</sup>	v(V=O) = 972f / 942f v <sub>as</sub> (V-O) = 617 f v <sub>s</sub> (V-O) = 525 m v(O-O) = 885f / 863d	318 nm (ε=1382)
[VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (ox)] <sup>3-</sup> [20]	Grupo espacial: P2 <sub>1</sub> /c Z = 4	d(V=O) = 1,622 Å d(V-O <sub>per</sub> ) = 1,856 Å 1,934 Å d(O-O) = 1,455 Å <sup>p</sup>	v(V=O) = 981f / 950mf v <sub>as</sub> (V-O) = 591 f v <sub>s</sub> (V-O) = 523 f v(O-O) = 841f / 820f	356 nm (ε = 2434)
[VO(O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (phen)] <sup>-</sup>	(no se conoce su estructura)	-	v(V=O) = 928 f v <sub>as</sub> (V-O) = 620 m v <sub>s</sub> (V-O) = 589 f v(O-O) = 877m / 867f	-

(<sup>p</sup> valores promedio)

Un detalle llamativo que se da en estos compuestos es el hecho de que, aparte del [VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, todos los otros complejos cristalizan en el mismo grupo espacial, P2<sub>1</sub>/c y con Z = 4.

Al igual que en los casos del capítulo anterior también para este grupo se observa que las distancias de enlace están en rangos relativamente acotados y también las vibraciones características de todos esos enlaces aparecen en regiones comparables.

Un hecho remarcable desde el punto de vista vibracional es que, en todos los casos, la característica vibración del estiramiento v(V=O) aparece desdoblada. Debido a la existencia de cuatro unidades de complejo por celda unitaria primitiva, es indudable que este desdoblamiento se origina en efectos de correlación. También para las vibraciones v(O-O) se observa un comportamiento similar. En este caso, seguramente además de los

efectos de correlación hay que considerar los efectos de acoplamiento con otros modos vibracionales.

En cuanto a los espectros electrónicos, hay algunos aspectos que los diferencian de los estudiados en el capítulo previo. En primer lugar, las características bandas de transferencia de carga  $O_2^{2-} \rightarrow V$  aparecen claramente desplazadas hacia mayores energías en los presentes casos (las bandas están desplazadas en casi 100 nm hacia menores longitudes de onda) y por lo tanto están más cerca de las absorciones más intensas, localizadas ligeramente por encima de 200 nm, y asignables a transferencias de carga del grupo oxo al vanadio. Una segunda diferencia, está en la intensidad de esas bandas  $O_2^{2-} \rightarrow V$ , marcadamente más altas que en los monoperoxocomplejos. Estas diferencias podrían ser explicadas por la existencia de dos “donores  $\pi$ ” en los presentes casos y/o por la existencia de un cierto “mezclamiento” entre las transferencias de carga  $O_2^{2-} \rightarrow V$  con las  $O^{2-} \rightarrow V$ . Este comportamiento peculiar tampoco permitió visualizar con claridad una relación entre las transferencias de carga  $O_2^{2-} \rightarrow V$  y las longitudes de los enlaces O-O, de los grupos peróxido, como habíamos notado en el capítulo anterior.

Respecto a las transiciones “oxo”  $\rightarrow V(V)$ , cabe recordar que la transferencia de carga principal en el oxovanadio (V), asignable a la transición electrónica  $t_1(\pi) \rightarrow e(d)$ , ocurre alrededor de 270 nm y tiene una intensidad del orden de  $9000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [26]. Esta comparación es la que permite justificar la asignación de todas las bandas observadas en el presente trabajo en las regiones cercanas a los 200 nm como originadas en transiciones del grupo oxo al vanadio (V).

Finalmente, vale remarcar que la similitud en el comportamiento espectroscópico del  $[VO(O_2)_2(\text{phen})]^-$  con el del complejo similar conteniendo oxalato en lugar de fenantrolina, apoya decididamente nuestra idea de una estrecha similitud estructural entre ambos.



### 3.2.6. Bibliografía

1. Shaver, A., Ng., J. B., Hall, D. A., Loon, B. S. y Posner, B. I., *Inorg. Chem.* **32**, 3109 (1993).
2. Djordjevic, C. y Wampler, G. L., *J. Inorg. Biochem.* **25**, 51 (1985)
3. Di Furia, F. y Modena, G., *Rev. Chem. Intermed.* **6**, 51 (1985).
4. Campestrini, S., Conte, V., Di Furia, F. y Modena, G., *J. Org. Chem.* **53**, 5721 (1988).
5. Drew, R. E. y Einstein, F. W. B., *Inorg. Chem.* **11**, 1079 (1972).
6. Stomberg, R., Olson, S. y Svensson, I., *Acta Chem. Scan.* **38**, 653 (1984).
7. Wiegardt, K. y Quilitzsch, U., *Z. Naturforsch.* **34b**, 242 (1979).
8. Strydom, C. A. y de Waal, D., *J. Thermal. Anal.* **38**, 943 (1992).
9. Baran, E. J., *Monatsh. Chem.* **108**, 989 (1977).
10. Schwendt, P. y Pisárcik, M., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **47**, 1549 (1982).
11. Schwendt, P., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **48**, 248 (1983).
12. Djordjevic, C. y Vuletic, N., *Inorg. Chem.*, **7**, 1864, (1968); *Chem.Ind.* 1360, (1968); *Croat. Chim. Acta* **43**, 271 (1971).
13. Ing-Svensson, B. y Stomberg, R., *Acta Chem. Scand.* **25**, 898 (1971).
14. Drew, R. E. y Einstein, W. B., *Inorg. Chem.* **11**, 1079, (1972).
15. Einstein, W. B., Enwall, E., Morris, D. M. y Sutton, D., *ibid.* **10**, 678 (1971).
16. Cotton, F. A. y Wilkinson, G., *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley y Sons, Inc., 3<sup>rd</sup> edn., 824 (1972).
17. Connor, J. A. y Ebswort, E. A. W., *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **6** 303 (1964).
18. Ferguson, J. E., Wilkins, C. J. y Young, J. F., *J. Chem. Soc.* 2136 (1962).
19. Griffith, W. P. y Wickins, T. D., *J. Chem. Soc.* 397 (1968).
20. Begin, D., Einstein, F. W. B. y Field, J., *Inorg. Chem.* **14**, 1785, (1975).
21. Djordjevic, C., Craig, S.A. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **24**, 1281 (1985).
22. Djordjevic, C., Lee, M. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **28**, 719 (1988).
23. Djordjevic, C., Wilkins, P.L., Sinn, E. y Butcher, R.J., *Inorg. Chim. Acta* **230**, 241 (1995).
24. Vuletic, N. y Djordjevic, C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans* 1137 (1973).
25. Campbell, N. J., Flanagan, J., Griffith, W. P. y Skapski, C., *Transit. Met. Chem.* **10**, 353 (1985).
26. Müller, A., Diemann, E., Jorgensen, C.K., *Struct. Bonding* **14**, 23 (1973).

# *Capítulo 4*

---

*Estudio de la  
Actividad Catalítica de  
Peroxo Complejos de Vanadio (V)*

---

## 4.1. Introducción

El interés en el estudio de reacciones químicas de oxidación de haluros por peróxido de hidrógeno, mediadas por peroxo complejos de vanadio (V), se ha incrementado recientemente [1-5], sobre todo debido al descubrimiento de las haloperoxidasas dependientes de vanadio [6].

Como hemos visto anteriormente, las bromoperoxidasas (V-BrPO) que contienen vanadio en su sitio activo son enzimas aisladas de algas marinas, que catalizan la oxidación de bromuro por peróxido de hidrógeno, y desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis de numerosos productos marinos halogenados [6,7]. El vanadio es un cofactor esencial para la actividad catalítica de la enzima, sin embargo, debido a que el estudio del comportamiento del vanadio (V) en el sitio de las V-BrPO es inaccesible a través de las técnicas espectroscópicas convencionales [1], es necesario recurrir a modelos que permitan comprender el rol de este elemento.

Tal como vimos en la sección referida al mecanismo de la reacción enzimática, los estudios mecanísticos sugieren que las V-BrPO ejercen su efecto catalítico al formar, con el peróxido de hidrógeno, un peroxo complejo de vanadio que oxida al ión bromuro dando un intermediario de naturaleza desconocida [2,8,9]. Tal intermediario puede ya sea bromar un sustrato orgánico o bien reaccionar con otra molécula de  $H_2O_2$  para formar oxígeno [10,11]. Si partimos de la hipótesis de que la oxidación de ion bromuro tiene lugar en la porción hidrofílica de la enzima, mientras que la bromación del sustrato orgánico ocurre en la porción hidrofóbica de la misma, se puede pensar que la primera reacción está favorecida sobre la última debido a la posibilidad del intermediario de migrar desde la porción hidrofílica de la enzima, en la cual la oxidación del bromuro tiene lugar, hacia la porción hidrofóbica en la cual ocurre la bromación.

Basados en esta hipótesis, surgió entonces la idea de reproducir tal situación empleando un sistema de dos fases, agua / cloroformo, de manera de lograr condiciones similares bajo las cuales se produce la reacción enzimática [12].

## 4.2. Parte Experimental

La halogenación de un sustrato orgánico mediada por complejos de vanadio, se estudió utilizando una adaptación de la técnica desarrollada por Conte y col. [12]

La reacción se llevó a cabo en un sistema de dos fases, agua / cloroformo. En la fase acuosa ácida, 20 mL, (pH = 1, HCl) se disuelve: KBr (1mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,4 mmoles), y cantidades catalíticas de los complejos de vanadio

En la fase cloroformo, 20 mL, se disuelven 0,2 mmoles de distintos sustratos orgánicos tales como acetanilida, salicilaldehído y fenol.

Se mezclan ambas fases y la bromación procede con agitación a 25 °C. Después de aproximadamente 10 minutos, se observa una turbidez de la fase orgánica la cual se separa de la fase acuosa por medio de una ampolla de decantación. Se evapora el solvente de la fase orgánica y se obtiene un sólido que se identifica por cromatografía en capa fina revelada por luz UV, punto de fusión, espectro IR y espectro RMN.

Los complejos de vanadio que se utilizaron para realizar esta experiencia fueron los siguientes:

- 1) NH<sub>4</sub>[VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>]
- 2) (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub> [O{VO(O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>}<sub>2</sub>]
- 3) K<sub>3</sub>[HV<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(O<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]. 2H<sub>2</sub>O y 3') K<sub>3</sub>[HV<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(O<sub>2</sub>)<sub>4</sub>]
- 4) K[VO(O<sub>2</sub>)(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>)]. H<sub>2</sub>O
- 5) K[VO(O<sub>2</sub>)(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>)]. H<sub>2</sub>O
- 6) NH<sub>4</sub>[VO(O<sub>2</sub>)(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>)]. H<sub>2</sub>O

## 4.3. Resultados y Discusión

En cuanto a la reactividad de los complejos estudiados, se encontró un comportamiento similar al de la enzima bromoperoxidasa en medio ácido, ya que en un sistema de dos fases catalizan la bromación de distintos sustratos orgánicos tales como la acetanilida, salicilaldehído y fenol.

Los correspondientes productos bromados, productos de la reacción catalizada por los compuestos estudiados, p-bromo-acetanilida, 5-bromo-salicilaldehído y p-bromo-fenol, fueron obtenidos prácticamente puros, lo que fue confirmado por cromatografía en

capa fina revelada por luz U.V. (la cual muestra una sola mancha lo que indica que el producto obtenido es puro), punto de fusión y espectroscopía IR, y RMN.

### 4.3.1. Espectro infrarrojo

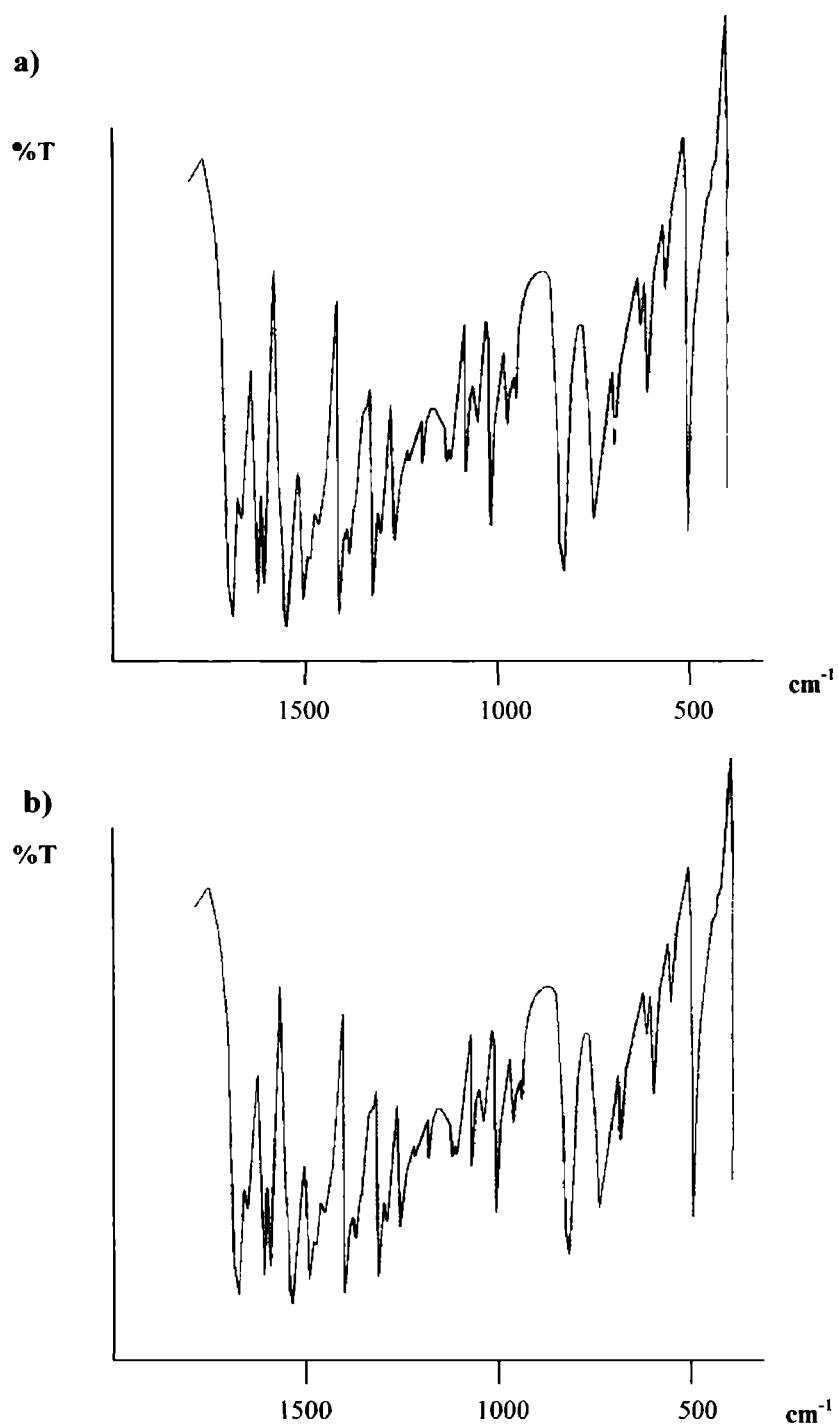
La reacción ocurre con todos los complejos utilizados. Como ejemplo se muestra en la Fig. 1a la zona de mayor interés del espectro IR de la p-Br-acetanilida obtenida usando como catalizador el complejo de  $K[VO(O_2)(C_4H_4O_5)] \cdot H_2O$  y en donde se puede apreciar que es idéntico al espectro IR patrón de la p-Br-acetanilida (Fig. 1b).

El espectro IR de la p-Br-acetanilida fue medido utilizando la muestra sólida en forma de pastilla de KBr y muestra bandas características de este tipo de compuestos [13]. La posición y la asignación de estas bandas se detallan en la Tabla 1.

La banda intensa ubicada en  $1666 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de alargamiento del grupo C=O (banda amida I). Una segunda banda de menor intensidad, ubicada muy próxima a la anterior, que aparece alrededor de  $1650 \text{ cm}^{-1}$  se asigna al modo de deformación del grupo  $NH_2$  (banda amida II).

El espectro muestra también una serie de bandas entre  $1616$  y  $1487 \text{ cm}^{-1}$  las cuales se asignan a las vibraciones de alargamiento anular (bandas esqueléticas). La absorción implica el alargamiento y la contracción de todos los enlaces del anillo y la interacción entre estas formas de alargamiento. Una banda de intensidad media en  $1460 \text{ cm}^{-1}$  se asigna a la vibración de flexión asimétrica del grupo  $CH_3$ . La banda intensa, presente en el espectro alrededor de  $1400 \text{ cm}^{-1}$ , se asigna al estiramiento del enlace C-N. La banda de intensidad media en  $1360 \text{ cm}^{-1}$  se asigna a la vibración de flexión simétrica del grupo  $CH_3$ . La zona del espectro entre  $1360$  y  $1000 \text{ cm}^{-1}$  presenta una serie de bandas de intensidad media, las cuales se asignan a la flexión en el plano del enlace C-H, típica de compuestos aromáticos.

Por abajo de  $1000 \text{ cm}^{-1}$  el espectro del ligando presenta una banda de poca intensidad en  $978 \text{ cm}^{-1}$  y dos bandas fuertes en  $820$  y  $810 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales se asignan a la flexión anular fuera del plano del enlace C-H. Una banda ancha de intensidad media ubicada en  $750 \text{ cm}^{-1}$  se asigna a la vibración en abanico del enlace N-H fuera del plano. Una banda de intensidad media en  $622 \text{ cm}^{-1}$  se asigna a la deformación del anillo fuera del plano. Por último el espectro presenta una banda intensa ubicada alrededor de  $500 \text{ cm}^{-1}$ , la cual se asigna al estiramiento del enlace C-Br.



**Figura 1.** a) Espectro IR *p*-Br- acetanilida muestra; b) Espectro IR *p*-Br- acetanilida patrón

**Tabla 1.** Asignaciones de las vibraciones características de la *p*-Br-acetanilida. (Posición de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

IR	Asignación
1666 f	$\nu$ C=O (amida I)
1650 m	$\delta$ NH <sub>2</sub> (amida II)
1616 f	
1600 m	$\nu$ C-C del anillo
1528 f	
1487 m	
1460 m	$\delta_{\text{as}}$ CH <sub>3</sub>
1400 f	$\delta$ C-N
1360 m	$\delta_{\text{s}}$ CH <sub>3</sub>
1302 f	
1290 m	
1244 m	
1174 m	
1116 m	$\delta$ C-H anular en el plano
1070 m	
1046 d	
1009 m	
978 d	
820 m	$\delta$ C-H anular fuera del plano
810 f	
750 f	vibración en abanico N-H
622 m	deformación del anillo fuera del plano
500 f	$\nu$ C-Br

### 4.3.2. Espectro RMN

En la Fig. 2a se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ RMN de la p-Br-acetanilida obtenida usando como catalizador el complejo de oxoperoxo(citrato)vanadato (V) de amonio, el cual puede compararse con el tomado de la bibliografía [14] que se representa en la Fig. 2b. Se observa la correlación de los desplazamientos químicos de los protones metílicos y aromáticos. La señal del protón unido a nitrógeno muestra desplazamientos químicos diferentes como consecuencia del efecto de concentración.

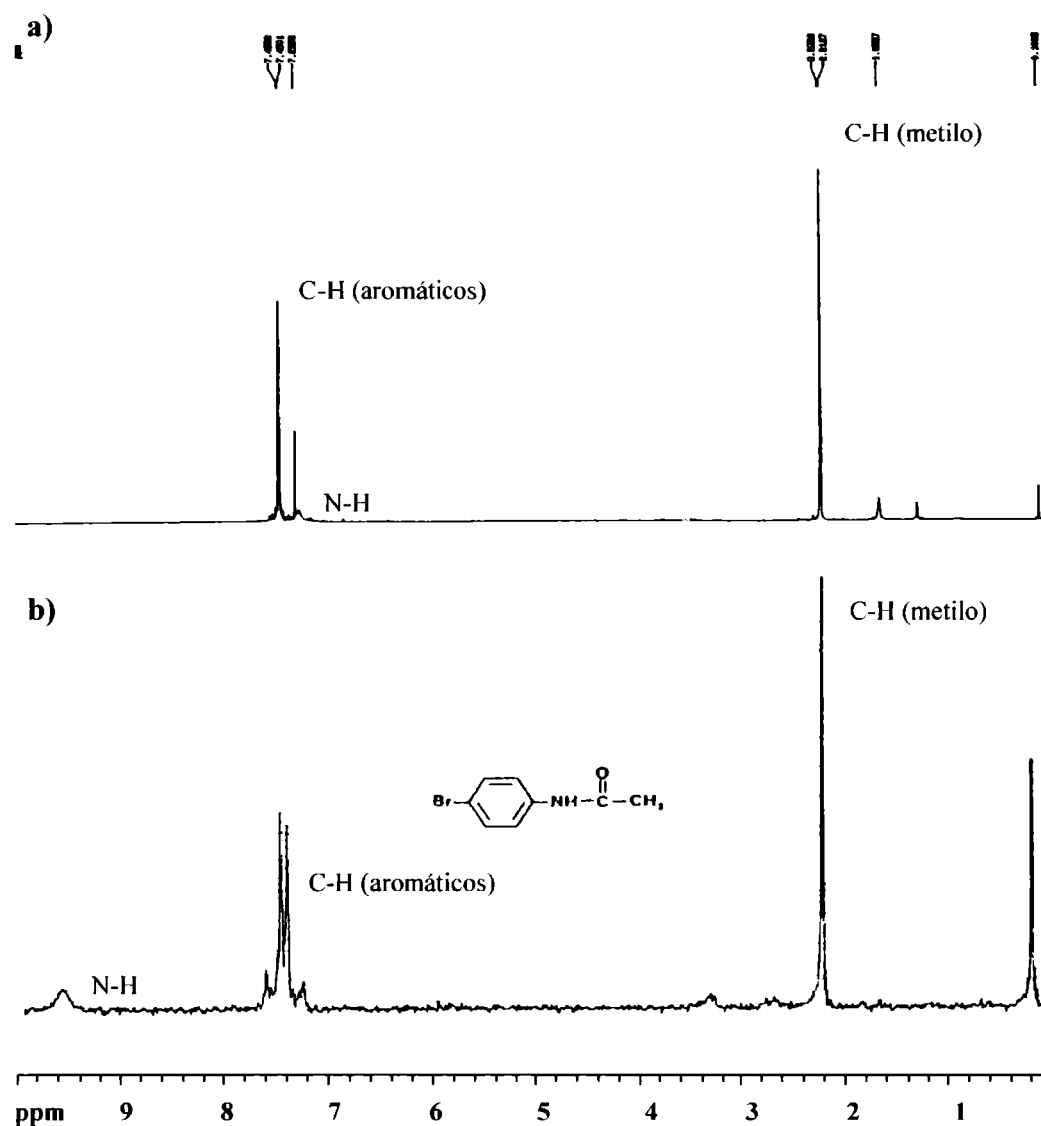
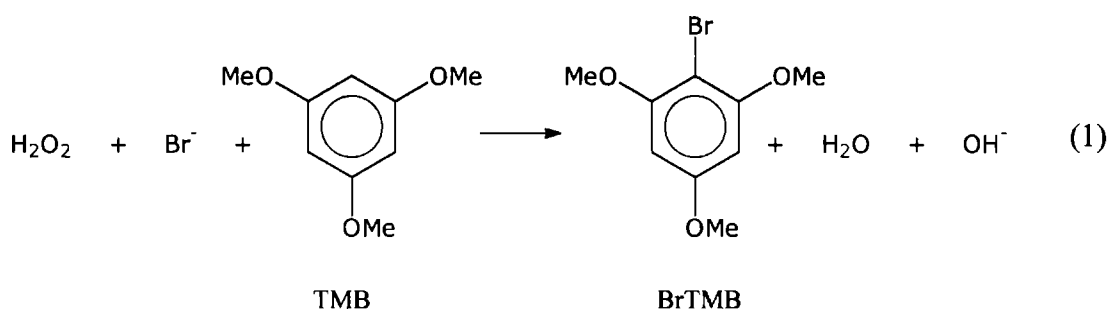


Figura. 2 a) Espectro RMN p-Br- acetanilida muestra; b) Espectro RMN p-Br- acetanilida patrón

El hecho de obtener un único compuesto bromado sugiere un mecanismo electrofílico que involucra la oxidación del bromuro por dos electrones y descarta cualquier mecanismo con radicales libres. Nuestros resultados están de acuerdo con los



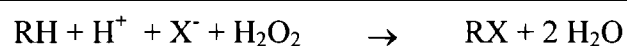
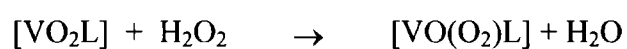
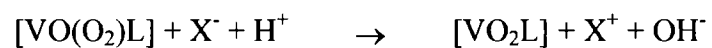
obtenidos por Butler y col. [1], quienes demostraron que la especie *cis*-dioxovanadio (V),  $\text{VO}_2^+$ , cataliza la oxidación de bromuro por peróxido de hidrógeno para obtener un intermediario oxidado en dos electrones. Tal intermediario, afirman estos autores, es el responsable de bromar un sustrato orgánico, en su caso el compuesto 1,3,5-trimetoxibenceno (TMB). Durante la reacción obtuvieron un solo producto bromado, el 2-bromo-1,3,5-trimetoxibenceno (BrTMB) (Ecuación 1):



Así concluyen los autores, la bromación ocurre por un mecanismo electrofílico y no a través de una reacción que involucra radicales libres.

El rendimiento en los productos bromados fue aproximadamente de un 95 % en todos los casos, lo que indica que la descomposición competitiva del  $\text{H}_2\text{O}_2$  está minimizada. Esto puede interpretarse como una ventaja del sistema de dos fases, ya que el intermediario es fácilmente transferido a la fase cloroformo, evitando las reacciones de este equivalente con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente en la fase acuosa. Esto se comprobó repitiendo la experiencia sin agregar cloroformo. Prácticamente no se obtuvo sustrato bromado lo cual se atribuye a la subsecuente reacción del intermediario formado, con el agua oxigenada. Esta experiencia también se repitió sin agregar ácido a la fase acuosa; ningún producto bromado fue obtenido, lo cual puede interpretarse como que el agregado de ácido es necesario para la activación del complejo.

En efecto, los peroxo complejos de vanadio (V), en presencia de iones haluros, peróxido de hidrógeno y ácido catalizan la reacción de halogenación de un sustrato orgánico a través de las siguientes reacciones:



La ecuación final obtenida responde justamente a la ecuación general de acción de las haloperoxidasas.

Los resultados obtenidos nos muestran que los modelos estudiados imitan la acción de las V-BrPO, y por lo tanto son adecuados para realizar estudios mecanísticos en relación con estas interesantes enzimas.

#### 4.4. Bibliografía

1. De la Rosa , R. I., Clague, M. J. y Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 760 (1992).
2. Clague, M. J., Keder, N. L. y Butler, A., *Inorg. Chem.* **32**, 4754 (1993).
3. Colpas, G. J., Hamstra, B. J., Kampf, J. W. y Pecoraro, V. L., *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3627 (1994).
4. Secco, F., *Inorg. Chem.* **19**, 2722 (1980).
5. Smith, R. H. y Kilford, J., *Int. J. Chem. Kinet.* **8**, 1 (1976).
6. Vilter, H., *Phytochemistry* **23**, 1387 (1984).
7. Butler, A. *Vanadium Bromoperoxidase. en Bioinorganic. Catálisis*, Reedijk, J., (editor). Marcel Dekker, New York, p. 425 (1992).
8. De Boer, E. y Wever, R., *J. Biol. Chem.* **263**, 12326 (1988).
9. Hager, L. P., Morrison, D. R., Brown, F.S. y Eberwein, H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1769 (1966).
10. Everett, R. R., Kanofsky, J. R. y Butler, A., *J. Biol. Chem.* **265**, 4908 (1990).
11. Soedjak, H.S. y Butler, A., *Biochemistry* **29**, 7974 (1990).
12. Conte, V., Di Furia, F. y Moro, S., *Tetrahedron Lett.* **35**, 7429 (1994).
13. Bellamy L.J., *The infra-red spectra of complex molecules*, John Wiley & Sons, INC. 2<sup>da</sup> edición, New York, (1958).
14. Pouchert, C.J. y Campbell, J.R., *The Aldrich Library of NMR spectra Vol. VII* .

# *Capítulo 5*

---

*Estudio de la reacción de  
bromación del rojo fenol  
mediada por peroxo complejos  
de Vanadio (V)*

---

## 5.1. Reacción de bromación del rojo fenol mediada por peroxo complejos de Vanadio (V)

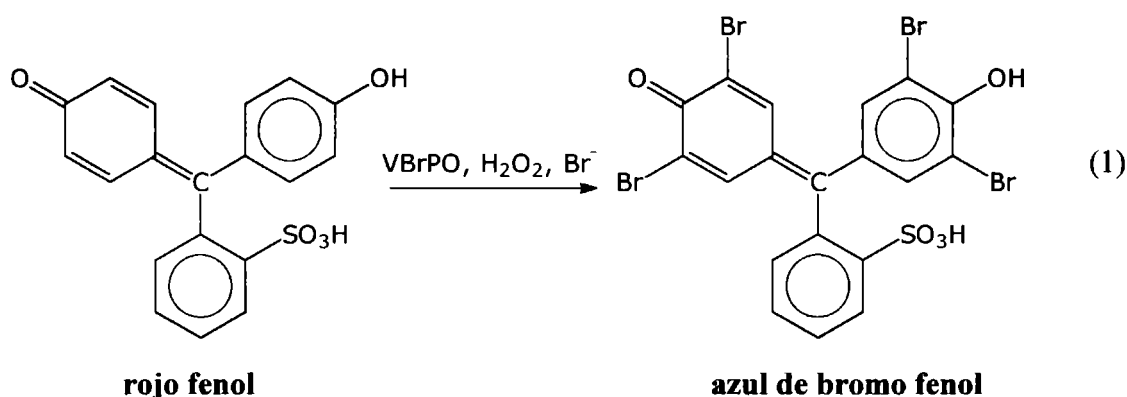
### 5.1.1. Introducción

Las bromoperoxidasas que contienen vanadio, a diferencia de las peroxidasa que contienen un grupo hemo en su sitio activo, no oxidan compuestos orgánicos tales como la o-dianisidina o el guaiacol [1,2], los cuales son usados normalmente para detectar actividad peroxidasa, y por lo tanto no se pueden usar estas técnicas convencionales para determinar la actividad enzimática.

Sin embargo existen otros métodos para medir actividad bromoperoxidasa. Uno de los mas usados se basa en la determinación espectroscópica de la bromación de una monoclorodicetona, la 2-cloro-5,5-dimetil-1,3-ciclohexadiona (MCD), usando peróxido de hidrógeno como oxidante del haluro [3]. Si bien este ensayo es conveniente por el importante cambio en el coeficiente de extinción entre el enolato y el producto, su dificultad radica en las condiciones necesarias para estabilizar el enolato a partir de la  $\beta$  dicetona.

Por otra parte, un amplio rango de compuestos aromáticos, tales como fenoles, anilinas y compuestos aromáticos heterocíclicos pueden ser rápidamente halogenados en presencia de las V-BrPO. Estos ensayos, muy usados para detectar actividad bromoperoxidasa, son muy convenientes porque están acompañados de un cambio de color muy marcado, que puede ser observado visualmente.

Dentro de estos ensayos nosotros seleccionamos la conversión visible del rojo fenol en azul de bromo fenol [4], el cual en presencia de la enzima natural reacciona de la siguiente manera:



De acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo anterior nos pareció interesante reemplazar en este sistema de reacción la enzima natural por alguno de los peroxo complejos de vanadio para determinar su posible actividad bromoperoxidasa.

### **5.1.2. Parte Experimental**

La reacción protocolar para la bromación del rojo fenol catalizada por la enzima V-BrPO fue adecuadamente modificada de manera que permita reemplazar la enzima por los distintos complejos de vanadio.

La técnica modificada se describe a continuación.

- a) Se disuelve en 10 mL de agua destilada 0,2 mmoles de complejo de vanadio y se lleva a pH =1 con el agregado de HCl. Luego se agrega 1 mmol de KBr y 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %.
- b) Se coloca en un tubo de ensayo 5 mL de buffer fosfato pH = 6,5 y se añaden 50 µL de rojo fenol al 0,04 % y 50 µL de la mezcla anterior.
- c) Se observa la reacción “visualmente” ya que el rojo fenol es amarillo a pH = 6,5 y el azul de bromo fenol es azul a ese valor de pH, o bien se mide el incremento de la absorbancia a 595 nm.

### **5.1.3. Resultados y Discusión**

Todos los peroxo complejos de vanadio sintetizados y estudiados en capítulos precedentes fueron ensayados utilizando esta técnica y en todos los casos se observó la bromación del rojo fenol visualmente, ya que el producto bromado, azul de bromo fenol, se obtiene casi instantáneamente.

Los resultados obtenidos con estos ensayos previos de orientación confirman una vez mas que los complejos sintetizados pueden actuar como modelos funcionales de las V-BrPO y pueden ser utilizados para iniciar un estudio más detallado de la reactividad de los mismos que se incluye a continuación.

## **5.2. Estudio cinético de la bromación del rojo fenol mediada por peroxo complejos de Vanadio (V)**

### **5.2.1. Introducción**

Los resultados obtenidos hasta ahora nos permiten asegurar que los complejos sintetizados tienen una reactividad que modela la actividad de las V-BrPO y por lo tanto pueden ser usados para avanzar en la comprensión del mecanismo químico involucrado en el ciclo catalítico de la enzima nativa.

Una cuestión que hasta el presente no ha sido totalmente resuelta, es la función del vanadio como grupo prostético en las bromoperoxidasas.

Sabemos que el grupo peróxido (rico en electrones) [5] forma fácilmente complejos con iones metálicos de transición que contienen bajo número de electrones d, tales como el vanadio y el molibdeno, y tal como hemos visto anteriormente un gran número de estos complejos son excelentes oxidantes. Justamente esta propiedad de los peroxo complejos de vanadio (V), es la que pensamos tiene una relevancia directa con la manera en la cual este tipo de compuestos en las V-BrPO son capaces de oxidar al bromuro.

Mimoun y Col. [6], mostraron que los peroxo complejos de vanadio (V) son efectivos oxidantes en solventes no próticos bajo condiciones moderadas. Estos compuestos no solamente catalizan la epoxidación de olefinas a epóxidos sino que también hidroxilan hidrocarburos aromáticos y alcanos a alcoholes y cetonas. A partir del estudio de la hidroxilación de hidrocarburos aromáticos a compuestos fenólicos, se ha concluido [6] que estos complejos son capaces de transferir oxígeno a los hidrocarburos aromáticos. El mecanismo de transferencia de oxígeno desde el complejo hacia el sustrato nucleofílico es un tema de considerable debate [7]. Dos alternativas han sido propuestas. Una procede a través de un mecanismo bimolecular que involucra tanto al aceptor nucleofílico como al peroxo complejo de vanadio (V). El otro es un mecanismo [8] que involucra la formación de un intermediario que resulta de la coordinación del sustrato al metal.

En el caso de la epoxidación de olefinas catalizada por alquil peroxo complejos de vanadio (V) [8], el mecanismo propuesto consiste en la unión de la olefina al metal, para desplazar un átomo de oxígeno de la unión peróxido, a través de un ataque nucleofílico de la olefina hacia el peróxido coordinado, seguido de la disociación del epóxido y la reacción del intermediario de vanadio remanente con otra molécula de alquil peróxido.

A partir de estas consideraciones nos preguntamos si las V-BrPO son capaces de oxidar al bromuro en presencia de peróxido de hidrógeno, a través de un comportamiento similar al de los peroxocomplejos de vanadio (V).

Se ha encontrado que distintos tipos de peroxo complejos de vanadio (V), son capaces de bromar sustratos en medio ácido [9,10]; y este comportamiento ha sido relacionado con la estructura del sitio del vanadio en las V-BrPO. Butler y col. [11] encontraron que la especie  $\text{cis-VO}_2^+$  es activa en medio ácido mientras que el vanadato,  $(\text{H}_2\text{VO}_4^- + \text{HVO}_4^{2-})$  es inactivo a valores de pH cercanos a 7, y se ha sugerido que esta actividad, requiere la presencia de la especie dimérica  $[(\text{VO})_2(\text{O}_2)]_2\text{O}_2$ .

Con el fin de avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de las V-BrPO, se estudió la cinética de bromación del rojo fenol (HPhR) para producir azul de bromo fenol (BrPhB), mediada por los oxidiperoxo complejos de vanadio (V):

- 1) aminooxidiperoxovanadato (V)  $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]$  (monómero) y
- 2)  $\mu$ -oxobis[oxidiperoxovanadato(V)]  $(\text{NH}_4)_4 [\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]$  (dímero)

## 5.2.2. Parte Experimental

### 5.2.2.1. Preparación de los complejos

Las sales de amonio de los dos complejos,  $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]$  y  $(\text{NH}_4)_4[\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]$ , fueron preparadas siguiendo las técnicas detalladas en el capítulo 3 de esta segunda parte de la Tesis.

### 5.2.2.2. Mediciones cinéticas

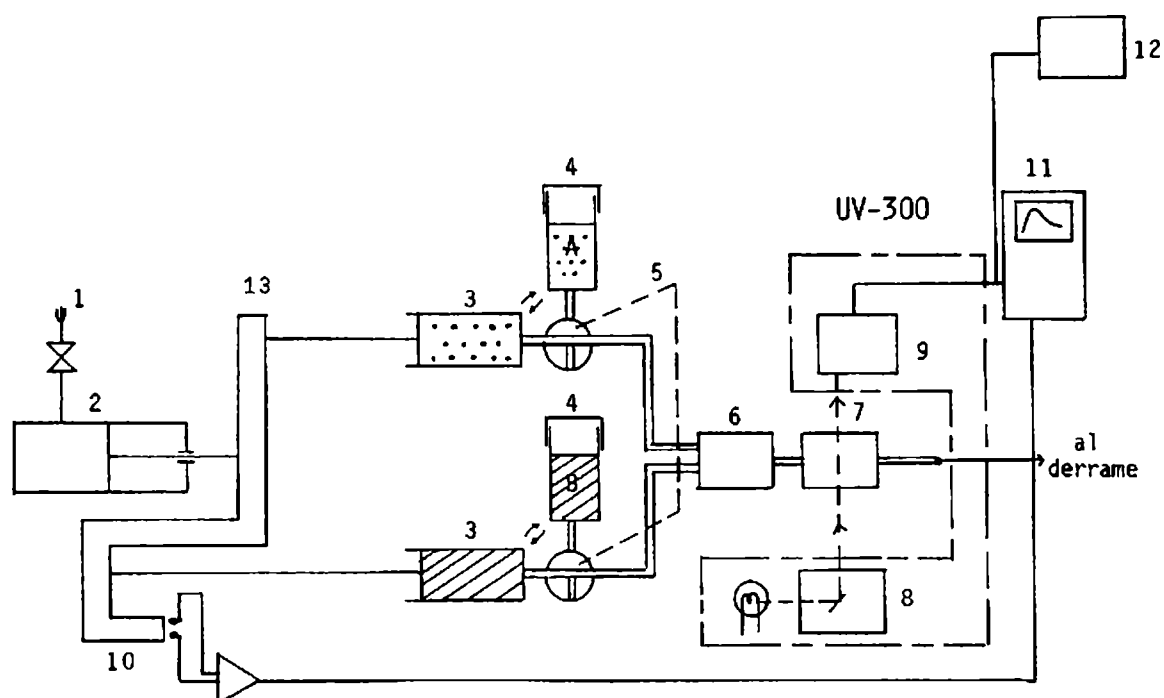
Las reacciones cinéticas de bromación del rojo fenol fueron medidas a través del incremento de la absorbancia del azul de bromo fenol (BrPhB) a 595 nm.

Para estas medidas cinéticas se usó el accesorio de detención de flujo ("stopped-flow") del espectrofotómetro Shimadzu UV-300, provisto de procesador de datos y osciloscopio con pantalla de registro permanente. El equipo de detención de flujo consiste en un sistema que permite mezclar rápida y eficientemente soluciones de los reactivos,



previamente a su entrada en la celda óptica del espectrofotómetro UV-visible. En cierto momento, el flujo de reactivos es detenido y se inicia la medición de la absorbancia en función del tiempo. El aparato está esquematizado en la Fig. 1. Soluciones de los reactivos A y B se colocan, respectivamente, en los reservorios de 3mL de capacidad aproximada (cada uno) y de allí, colocando la llave en posición de carga (CHARGE), se los pasa a las jeringas respectivas por accionamiento manual de los pistones. Las jeringas están colocadas en un bloque metálico termostatzado. Las dos soluciones pasan al mezclador por accionamiento neumático simultáneo de ambos pistones colocando la válvula en posición de mezcla (MIX). Los pistones se detienen ante un tope donde está instalado un disparador (trigger). La solución resultante de la mezcla entra en la celda de medición espectrofotométrica. Se usa el procesador de datos SAPCOM-1A y/o un osciloscopio de trazo permanente para registrar las variaciones de absorbancia. Cuando el disparador es accionado, se inicia la recolección de datos en la memoria del procesador y/o en el osciloscopio. Del procesador los datos son pasados posteriormente al mismo registrador del espectrofotómetro. La traza en la pantalla del osciloscopio puede ser fotografiada con cámara polaroid o directamente colocada sobre papel traslúcido.

La celda de medida es de cuarzo de 1 cm de camino óptico y 0,18 mL de capacidad; el volumen de cada jeringa es de aproximadamente 1,8 mL. Los reactivos se pueden inyectar, a partir de las respectivas jeringas en forma simultánea, en pasos de 0,2 mL o múltiplos de ese volumen, desde 0,2 a un máximo de 1,4 mL, para cada reactivo y en cantidades iguales.



**Figura 1.** Esquema del accesorio de medición de flujo detenido.

1. presión neumática. 2. cilindro y pistón. 3. jeringas. 4. reservorios. 5. llaves. 6. mezclador. 7. celda de medida. 8. monocromador. 9. detector y amplificador. 10. generador de señal del trigger. 11. osciloscopio. 12. procesador de datos. 13. barra de impulsión

Para realizar las mediciones cinéticas se trabajó con la técnica de la conversión visible del rojo fenol en azul de bromo fenol, descrita en la primera parte de este capítulo, adecuadamente modificada para ser utilizada en mediciones cinéticas y en presencia de nuestros complejos.

Todas las experiencias fueron realizadas a 25°C, pH 6,5 (buffer fosfato) y fuerza iónica 1,0 mol dm<sup>-3</sup> (NaCl).

Se realizaron dos tipos de experiencia para cada complejo:

a) Los reactivos se disolvieron en un medio de pH 6,5, y se inició la reacción al mezclar una solución que contiene complejo de vanadio y bromuro con una solución de rojo fenol.

b) Los complejos de vanadio se disolvieron, con agitación aproximadamente durante cinco minutos, en una solución fuertemente ácida (pH 1), y se mezcló con una solución que contiene bromuro y rojo fenol a pH 6,5. Debido a las concentraciones

empleadas, el pH de la mezcla de reacción se mantuvo siempre en 6,5. La incubación de tiempos mayores a cinco minutos arroja los mismos resultados y nuestras condiciones experimentales excluyen la posibilidad de explorar tiempos más cortos.

Las concentraciones de los reactivos utilizados variaron entre  $(1,5-4) \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> para los complejos de vanadio,  $(3,75-120) \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> para el bromuro y  $10^{-6}-10^{-7}$  mol. dm<sup>-3</sup> para el rojo fenol.

La principal fuente de error en las mediciones cinéticas fue la desviación de las concentraciones de bromuro y vanadio respecto de los valores nominales.

Los errores asociados con las desviaciones del comportamiento lineal durante el tratamiento de los datos fueron despreciables.

### **5.2.3. Resultados y Discusión**

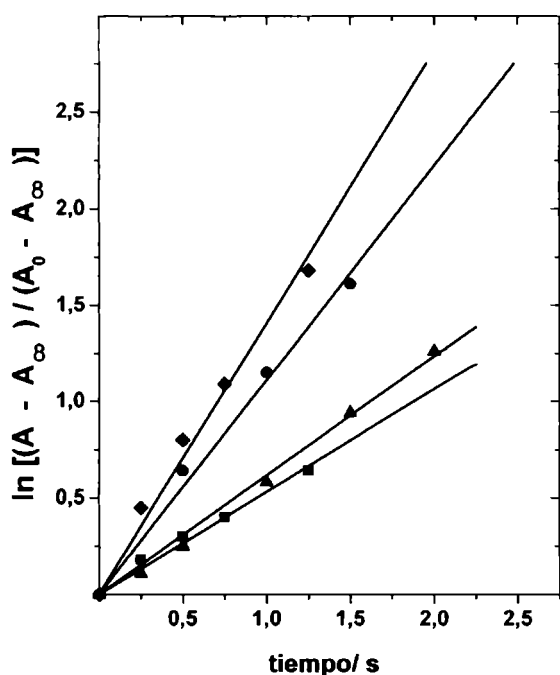
#### **5.2.3.1. Reacción directa a pH 6,5**

Cuando la reacción fue investigada en estas condiciones, no se observó bromación del rojo fenol, lo cual nos permite afirmar que ambas especies,  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]^-$  y  $[\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]^{4-}$  son incapaces de oxidar al bromuro ya que son cinéticamente estables y a estos valores de pH no pueden interactuar con este anión.

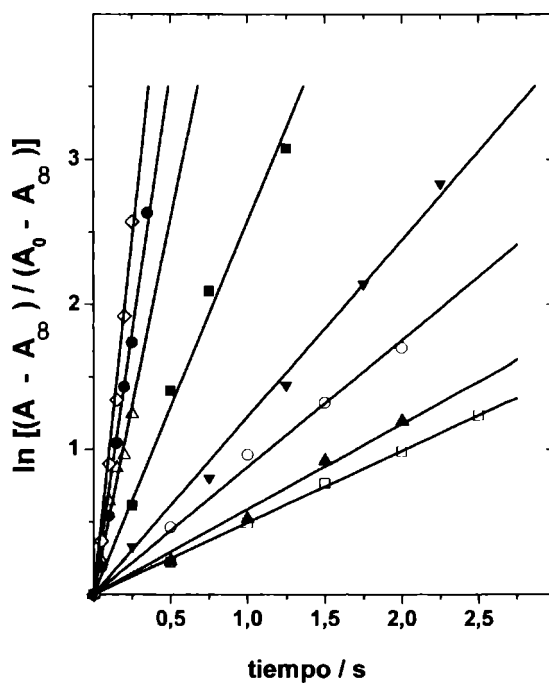
#### **5.2.3.2. Reacción a pH 6,5 después de la incubación de las soluciones de vanadio a pH 1**

Después de la incubación de las soluciones de vanadio a pH 1, se observó la reacción de bromación del rojo fenol. Utilizando el complejo  $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]$  y en el rango de concentraciones de rojo fenol, bromuro y vanadio explorado en nuestro estudio, la reacción de oxidación de bromuro es de primer orden en rojo fenol. Esta dependencia de primer orden se demuestra a través de la linealidad del gráfico de  $\ln[(A-A_\infty) / (A_0 - A_\infty)]$  vs tiempo, donde  $A$ ,  $A_\infty$  y  $A_0$  son las absorbancias a 595 nm, medidas al tiempo  $t$ ,  $t \rightarrow \infty$  y  $t = 0$  respectivamente a concentraciones constante de bromuro y de vanadio tal como se indica en las Figuras 1a y 1b. Los rangos de concentración de rojo fenol corresponden

aproximadamente a  $10^{-6} - 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ , y las concentraciones constantes de bromuro y de aminooxidiperoxovanadato (V) están indicadas en ambas figuras.

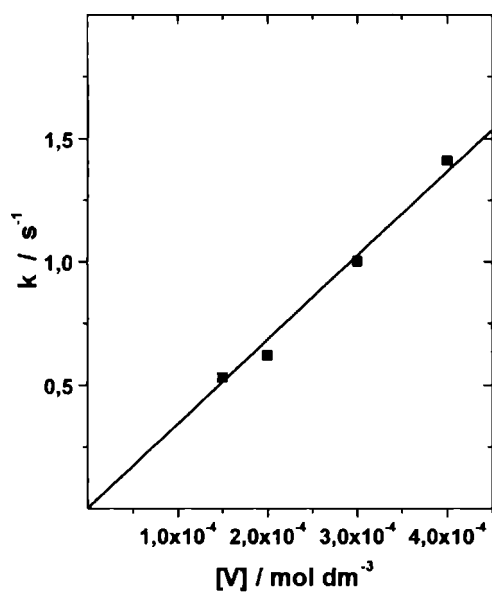


**Figura 1(a).**  $\ln [(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})]$  vs tiempo para diferentes concentraciones de  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]$ : (■)  $1,5 \times 10^{-4}$ ; (▲)  $2,0 \times 10^{-4}$ ; (●)  $3,0 \times 10^{-4}$ ; (◐)  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 6.5 y  $25^\circ\text{C}$ .  $[\text{Br}^-] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

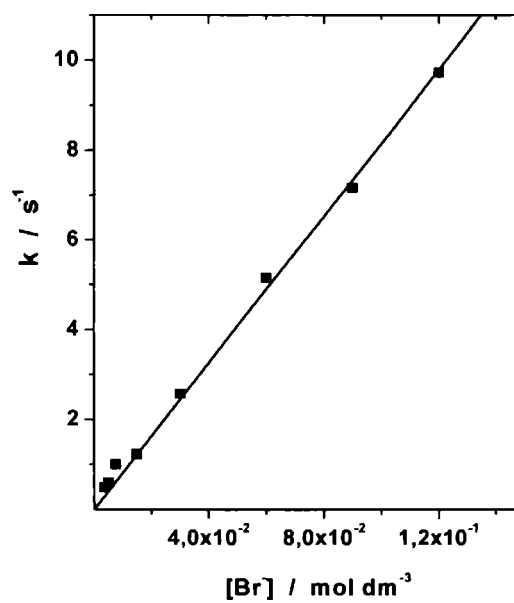


**Figura 1(b).**  $\ln [(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})]$  vs tiempo para diferentes concentraciones de  $\text{Br}^-$ : (□)  $3,75 \times 10^{-3}$ ; (▲)  $5,0 \times 10^{-3}$ ; (○)  $7,5 \times 10^{-3}$ ; (▼)  $1,50 \times 10^{-2}$ ; (■)  $3,00 \times 10^{-2}$ ; (△)  $6,00 \times 10^{-2}$ ; (●)  $9,00 \times 10^{-2}$ ; (◊)  $12,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  a pH 6.5 y  $25^\circ\text{C}$ .  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)] = 3,70 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .

La dependencia de las constantes de pseudo primer orden, obtenidas de las figuras 1a y 1b, con las concentraciones de vanadio y bromuro se muestran en las figuras 2a y 2b, respectivamente. Puede apreciarse que también con respecto a estos reactivos la reacción es de primer orden.

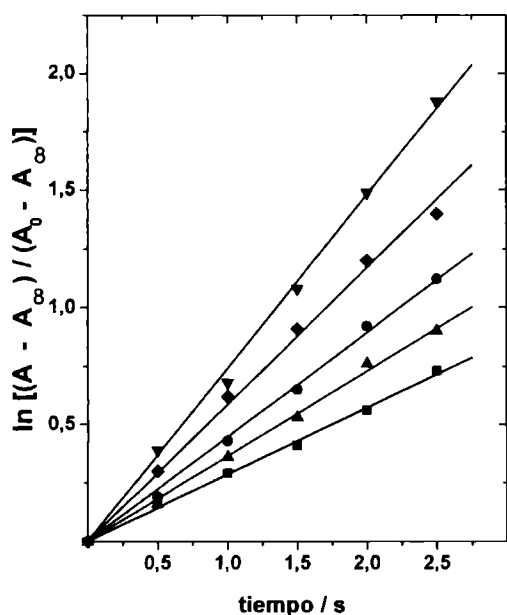


**Figura 2(a).** Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden derivada de la Figura 1(a) con la concentración de complejo de vanadio;  $[Br] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  ( $R = 0,9945$ ).

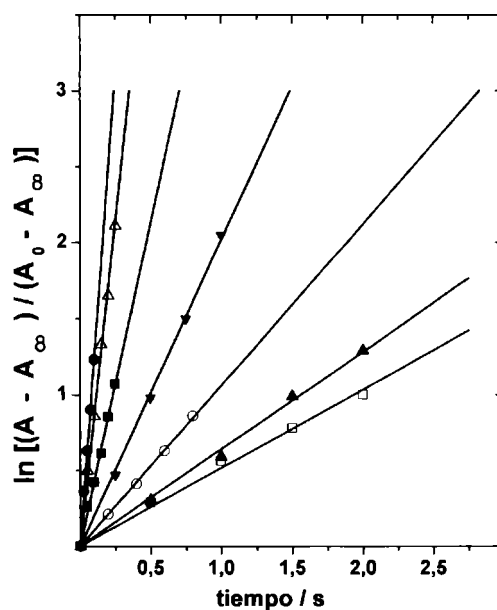


**Figura 2(b).** Dependencia de la constante de velocidad de pseudo primer orden derivada de la Figura 1(b) con la concentración de bromuro;  $[V(V)] = 3,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  ( $R = 0,9992$ ).

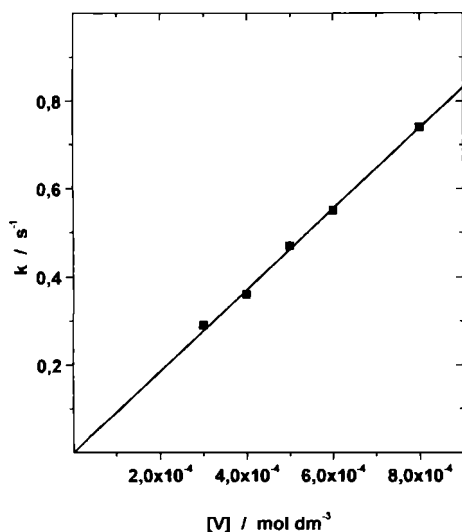
Seguidamente, se realizó un estudio similar utilizando el complejo  $(\text{NH}_4)_4- [\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]$ . Las figuras 3 a,b y 4 a,b muestran que el comportamiento de este complejo es totalmente similar



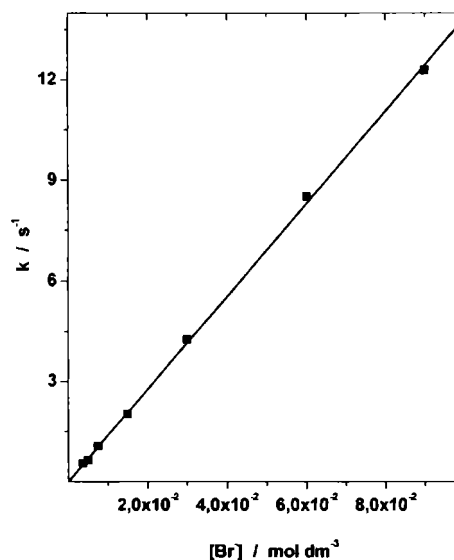
**Figura 3(a).**  $\ln [(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})]$  versus tiempo para diferentes concentraciones de  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4+}$ : (■)  $1,5 \times 10^{-4}$ ; (▲)  $2,0 \times 10^{-4}$ ; (●)  $2,5 \times 10^{-4}$ ; (◆)  $3,0 \times 10^{-4}$ ; (▼)  $4,0 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$  a pH 6.5 y 25 °C.  $[Br^-] = 3,75 \times 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$ ;  $\lambda = 595$  nm.



**Figura 3(b).**  $\ln [(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})]$  versus tiempo para diferentes concentraciones de  $[Br^-]$ : (□)  $3,75 \times 10^{-3}$ ; (▲)  $5,0 \times 10^{-3}$ ; (○)  $7,5 \times 10^{-3}$ ; (▼)  $1,50 \times 10^{-2}$ ; (■)  $3,00 \times 10^{-2}$ ; (Δ)  $6,00 \times 10^{-2}$ ; (●)  $9,00 \times 10^{-2}$  mol  $dm^{-3}$  a pH 6.5 y 25 °C.  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4+} = 3,0 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$ ;  $\lambda = 595$  nm.



**Figura 4(a).** Dependencia de la constante de velocidad de seudo primer orden derivada de la Figura 3(a) con la concentración de complejo de vanadio;  $[Br^-] = 3,75 \times 10^{-3}$  mol  $dm^{-3}$  ( $R = 0,9988$ )



**Figura 4(b).** Dependencia de la constante de velocidad de seudo primer orden derivada de la Figura 3(b) con la concentración de bromuro;  $[V(V)] = 6,0 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$  ( $R = 0,9997$ ).

La Tabla 1 muestra los valores de la constante de velocidad de pseudo segundo orden que se obtiene a partir de los gráficos 2a, 2b, 4a y 4b

**Tabla 1.** Valores de la constante de velocidad de pseudo segundo orden obtenidos a partir de los experimentos realizados

Serie	Complejo de Vanadio	$10^4 [V^V] / \text{mol dm}^{-3}$	$10^3 [Br^-] / \text{mol dm}^{-3}$	$10^{-2}$ Constante de velocidad de pseudo 2 <sup>do</sup> orden/ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	R (factor de correlación)
1	$[VO(O_2)_2(NH_3)]^-$	1,5-4,0	7,5	$34,2 \pm 2,70$	0,9945
2	$[VO(O_2)_2(NH_3)]^-$	3,0	3,75-120	$0,82 \pm 0,06$	0,9992
3	$[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4-}$	3,0-8,0	3,75	$9,19 \pm 0,74$	0,9985
4	$[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4-}$	6,0	3,75-90	$1,38 \pm 0,11$	0,9997

La ley cinética de la bromación del rojo fenol (HRPh), que se obtiene de los resultados experimentales, en ambos casos es:

$$V = k [V]_T [Br^-] [HS] \quad (1)$$

donde HS es el sustrato que sufre la bromación en el paso determinante de la velocidad.

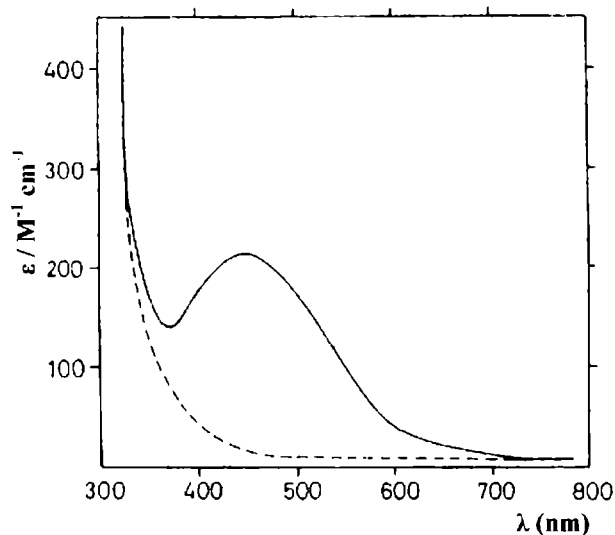
El principal producto de la bromación del rojo fenol es el tetrabromo-derivado (bromofenol), tal como se indica en la ecuación 1 de la sección 5.1.1; evidentemente están involucradas cuatro reacciones de bromación sucesivas, pero no se conoce el paso determinante de la velocidad en el curso de esas cuatro bromaciones sucesivas y no puede ser derivada a partir de nuestras mediciones. Varios mecanismos de reacción pueden estar involucrados y conducir a una reacción de primer orden, lo que dificulta la identificación de HS (por ej. rojo fenol o cualquiera de sus derivados parcialmente bromados). Aunque uno espera que la cuarta bromación sea la más lenta,  $k$  puede, en realidad, estar involucrada con la reactividad de las diferentes especies. Esta ambigüedad, es sin embargo irrelevante para nuestros propósitos ya que el sustrato es el mismo en todos los experimentos.

Los valores de la constante  $k$ , deducidos a partir de las diferentes series de experimentos que se muestran en la Tabla 1 son, respectivamente,  $(4,55 \pm 0,36; 2,72 \pm 0,22; 2,45 \pm 0,20$  y  $2,30 \pm 0,19) \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$ . Excepto para el primer valor, se obtiene un buen acuerdo para los distintos experimentos y se puede concluir que ambos complejos tienen la misma reactividad, caracterizada por una constante de velocidad única igual a  $2,49 \times 10^5 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$ . El origen de la discrepancia en la primera serie de experimentos no es claro, sin embargo se puede atribuir esta discrepancia a un error

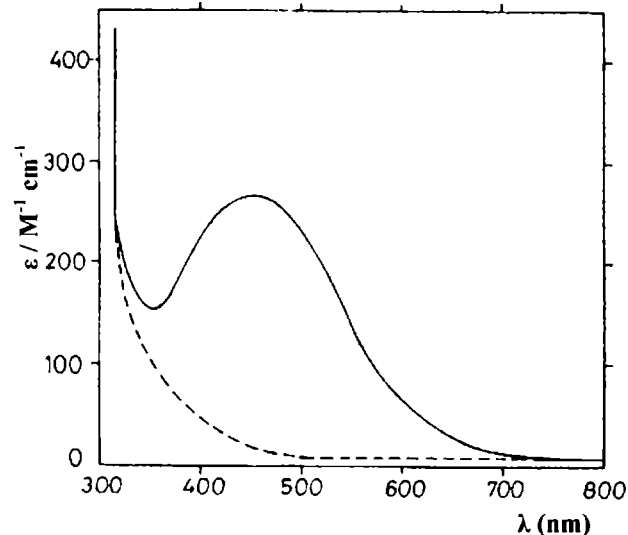
sistemático en la concentración de bromuro. Por otra parte, si comparamos los puntos experimentales de la serie 1 y la serie 2, puede observarse una mayor desviación de la línea recta de los puntos correspondientes a la serie 1. Esta serie muestra también una mayor dispersión en los datos (ver valor de R en la Tabla 1) y también esta constituida por un número menor de puntos individuales (cuatro). Consecuentemente se descartan los resultados de la serie 1 en nuestros análisis.

Un posible mecanismo implica la participación de un intermediario común, generado por el ataque del ácido sobre los complejos de vanadio. La acidificación de las soluciones de  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]^-$  y de  $[\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]^{4-}$ , produce especies de color rojo; la Fig. 5a muestra el espectro de absorción después de acidificar la solución de  $\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)^-$  a pH 1 y en el cual se observa una banda de absorción centrada alrededor de 450 nm con una absorptividad molar  $\epsilon = 215 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ . Similar tratamiento de la solución de  $\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2^{4-}$  produce un espectro parecido con una absorptividad un poco mas alta, siendo su valor  $\epsilon = 270 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 5b). Esta banda corresponde a una transición de transferencia de carga en complejos  $\text{LVO}(\text{O}_2)^{n-}$  [12,13], y podemos asumir que en ambos casos se forma una mezcla de especies con  $\text{L} = \text{H}_2\text{O}$ ,  $[(\text{VO}(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O}))]^+$  y  $\text{L} = \text{O}_2^{2-}$ ,  $[(\text{VO}(\text{O}_2)_2)]^-$  (14). Se desconoce el número de moléculas de agua coordinadas con la especie  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$ , aunque probablemente se trata de una especie de coordinación pentagonal [15,16].



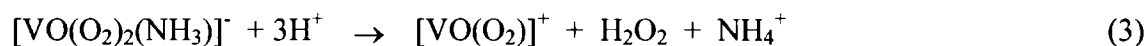
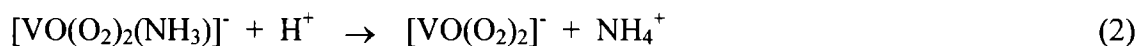


**Figura 5a.** Espectro UV-visible de la especie formada a partir de  $[VO(O_2)_2(NH_3)]^-$  a pH 1 (—) y a pH 5,5 (----)

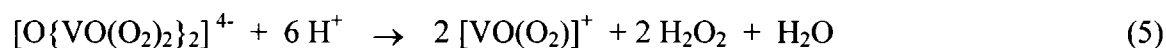
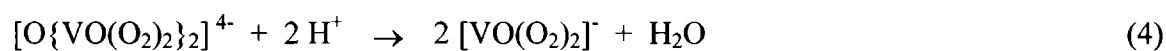


**Figura 5b.** Espectro UV-visible de la especie formada a partir de  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^+$  a pH 1 (—) y a pH 5,5 (----)

Nuestros resultados indican que el desprendimiento de  $NH_3$  a partir de  $[VO(O_2)_2(NH_3)]^-$  es cuantitativa a pH 1 y despreciable a pH > 2 (ecuación 2). También se produce la liberación de peróxido de hidrógeno con la consecuente formación de un monoperoxo complejo de vanadio (V) (ecuación 3).



En el caso del  $[O\{VO(O_2)_2\}_2]^{4+}$ , se produce la ruptura previa irreversible del puente oxo conjuntamente con la liberación de peróxido de hidrógeno, en el caso de la formación del monoperoxo complejo (ecuaciones 4 y 5):



La alcalinización de las soluciones resultantes conduce a la formación de complejos de vanadio desconocidos. Se ha propuesto que las especies activas en la oxidación del

haluro es el dímero  $\mu$ -peroxo,  $[\{VO(O_2)\}_2O_2]$  [11,14]. En nuestros sistemas de reacción no se observa la oxidación del bromuro, solamente se detecta la bromación del rojo fenol. Los datos cinéticos obtenidos experimentalmente a pH 6,5, son compatibles con una reacción en equilibrio en la cual se forma una especie entre el peroxo complejo de vanadio (V) y el bromuro (descrita por la ecuación 6), seguida por la bromación irreversible del rojo fenol (descrita por la ecuación 7).



Con el objeto de simplificar la evaluación de los resultados obtenidos asumiremos que la especie activa en nuestro sistema es  $[VO(O_2)]^+$ , aunque otras especies tales como el mencionado dímero  $\{VO(O_2)\}_2O_2$  podrían conducir a resultados similares.

La constante de velocidad de tercer orden fue calculada asumiendo que el dímero se rompe para formar dos monómeros. Los resultados cinéticos excluyen la ocurrencia simultánea de los monómeros y del dímero, puesto que el desplazamiento en el equilibrio de dimerización al incrementar la concentración de vanadio podría conducir a otros resultados con un comportamiento cinético más complicado. Como hemos mencionado anteriormente, el producto de la reacción (7) podría de hecho ser un precursor del azul de bromo fenol, que evoluciona rápidamente a ésta especie en el medio de reacción. Un posible mecanismo viene dado por el equilibrio (6) y la reacción lenta (7).

Bajo las condiciones que  $K_6 \ll 1$  y  $k_{-6} \gg k_7 [H^+] [HS]$ , este esquema conduce a la expresión cinética, descrita por la ecuación (8), con  $k = k'_7(k_6 / k_{-6})$ :

$$d [BrPhB] / dt = k'_7(k_6/k_{-6}) [HS] [Br^-] [V] \quad (8)$$

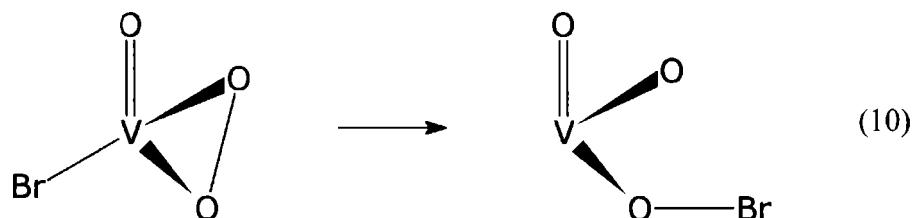
la cual está de acuerdo con la ecuación empírica (1). Nótese que la constante  $k'_7 = k_7 f [H^+]$  es una función indefinida de la acidez; nuestros experimentos se realizaron a pH constante, y por lo tanto no podemos analizar la posible participación de los protones en el estado activado.

Este mecanismo sugiere que la bromación del rojo fenol está mediada por la coordinación del haluro con el centro metálico para formar  $[VO(O_2)Br]$ , y que no se forma previamente ácido hipobromoso, en la etapa lenta de la reacción, esquema que conduciría a

un orden cero en la concentración de sustrato orgánico. En otros casos, se ha informado orden cero en rojo fenol [17]; un posible origen de la diferencia es la baja concentración de rojo fenol usada en nuestros experimentos, en la cual se cumple la ley cinética encontrada por nosotros. A concentraciones mayores, es posible que se cumpla que  $k_7[H^+][HS] \gg k_6$ , y la ley cinética es entonces:

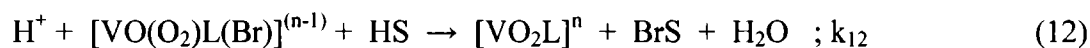
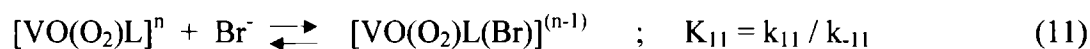
$$d [\text{BrPhB}] / dt = k_6 [\text{Br}^-][\text{V}] \quad (9)$$

El intermediario  $[\text{VO}(\text{O}_2)\text{Br}]$  ha sido postulado por otros autores [14,18], que han sugerido incluso la posible reacción de reorganización interna que se muestra a continuación en la ecuación (10):



Esta reorganización es equivalente a la generación de hipobromito coordinado. Asumiendo que la especie activa es  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$ , nuestros resultados están de acuerdo con esta posibilidad, y además sugieren que el ataque inicial del bromuro sobre el  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  debe ocurrir sobre el átomo de vanadio; por ello es necesario la generación previa del  $\text{VO}(\text{O}_2)^+$  a partir ya sea del  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]^-$  o del  $[\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]^{4+}$ . Esta reacción sólo ocurre en medio acuoso fuertemente ácido ( $\text{pH} \sim 1$ ); el átomo de vanadio hexa-coordinado tal como se encuentra en los complejos precursores es inactivo.

En contraposición al comportamiento de nuestros dos complejos modelos, las V-BrPO no requieren ninguna transformación previa para desarrollar su actividad catalítica en condiciones fisiológicas. Aparentemente, el factor central es la posibilidad de estabilizar el “ensemble”  $[\text{LVO}(\text{O}_2)]^n$  piramidal (L, ligando bidentado) en dicho medio, y la posibilidad de generar condiciones tales que  $k_{12} [\text{H}^+] [\text{HS}] \gg k_{-11}$ , lo que involucra las ecuaciones (11) y (12)



Las reacciones (11) y (12) son análogas a las ecuaciones (6) y (7). En el caso de las bromoperoxidasas, la actividad catalítica se completa con la reacción (13):



Se sabe en efecto, que el peróxido de hidrógeno regenera la actividad catalítica de las peroxidasas de vanadio (V) [19].

En definitiva, podemos verificar que algunos de los peroxocomplejos de vanadio (V) que hemos caracterizados en este trabajo de Tesis, aparecen como buenos modelos para estudios mecanísticos relacionados con las bromoperoxidasas dependientes de vanadio. Eventualmente también podrían ser muy útiles como sistemas catalíticos en diversos tipo de reacciones de oxidación de interés básico y aplicado.

### 5.2.4. Bibliografía

1. Wever, R., Plat, H. y de Boer, E., *Biochim. Biophys. Acta* **830**, 181 (1985).
2. De Boer, E., Plat, H. y Wever, R., en "Biocatalysis in Organic Media" (C. Laane, J. Tramper y M. D. Lilly, editores.), vol. **29**, p. 317. Elsevier, Amsterdam (1987).
3. Hager, L. P., Morrison, D. R., Brown, F.S. y Eberwein, H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1769 (1966).
4. De Boer, E., Plat, H., Tromp, M. G. M., Franssen, M. C. R., Van der Plas, H. C., Meijer, E. M., Schoemaker, H. E. y Wever, R., *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 607 (1987).
5. Djordjevic, C. *Chem. Britain* **18**, 553 (1982).
6. Mimoun, H., Saussine, L., Daire, E., Postel, M., Fischer, J. y Weiss, R., *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3101 (1983).
7. Campestrini, S., Conte, V., Di Furia, F. y Modena, G., *J. Org. Chem.* **53**, 5721 (1988).
8. Mimoun, H., Mignard, M., Brechelot, P. y Saussine, L., *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3711 (1983).
9. Conte, V., Di Furia, F. y Moro, S., *Tetrahedron Lett.* **35**, 7429 (1994).
10. De la Rosa, R. I., Clague, M. J. y Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 760 (1992).
11. Clague, M. y Butler, A., *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3475 (1995).
12. Orhanovic, M. y Wilkins, R., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 278 (1967).
13. a) Djordjevic, C., Craig, S. y Sinn, E., *Inorg. Chem.* **24**, 1281 (1985). b) Djordjevic, C., Puryear, B., Vuletic, N., Abelt, C. y Sheffield, S., *Inorg. Chem.* **27**, 2926 (1988).
14. Butler, A., *Coordination Chem. Rev.* **187**, 17 (1999).
15. Howard, O. y Hunt, J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1388 (1979).
16. Jaswal, J., y Tracey, A., *Inorg. Chem.* **30**, 3722 (1991).
17. Colpas, G., Hamstra, B., Kampf, J. y Pecoraro, V., *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3469 (1996).
18. Clague, M. J., Keder, N. L. y Butler, A., *Inorg. Chem.* **32**, 4754 (1993).
19. Tromp, M. G. M., Olafsson, G., Kreen, B. E. y Wever, R., *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 192 (1990).

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Equipos y técnicas utilizadas*

#### *Espectroscopia infrarroja*

Los espectros de infrarrojo de las muestras sólidas se registraron en forma de pastillas, con KBr de calidad espectroscópica. En algunos casos fue necesario el empleo de Nujol para preparar suspensiones, las que fueron medidas entre ventanas de KBr.

En el presente trabajo se realizaron espectros utilizando los espectrofotómetros interferométricos a Transformadas de Fourier (FTIR) en el infrarrojo medio (MIR, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), **Bruker** modelo **IFS 66** y **Perkin Elmer** modelo **1600**.

#### *Espectroscopia raman*

Los espectros Raman se obtuvieron con el accesorio **FRA 106** adosado al equipo **Bruker IFS 66** antes citado, usando la línea de excitación de un láser de estado sólido de Nd-YAG de longitud de onda de 1064 nm.

Las abreviaturas usadas en las tablas de las asignaciones de los espectros vibracionales son las siguientes

Abreviatura	Significado
h	hombro
d	débil
m	media
f	fuerte
a	ancha
md	muy débil
mf	muy fuerte
v	estiraminto
$\delta$	deformación
$\rho$	rocking

### ***Espectroscopia electrónica***

Los espectros de absorción electrónica fueron registrados utilizando un espectrofotómetro **Hewlett-Packard** modelo **8452-A**, con arreglos de diodos. Se usaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico en todos los casos.

Los espectros de reflectancia fueron medidos con un instrumento Shimadzu UV-300, usando MgO como patrón.

### ***Susceptibilidad magnética***

Para las medidas de susceptibilidad magnética se utilizó un magnetosuseptómetro completamente automático **DSM-8**, basado en el método de Faraday y utilizando  $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$  y  $\text{Gd}(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  para la calibración del equipo. La intensidad del campo magnético fue de 12 KG con  $\text{HdH} / \text{dZ} = 28 \text{ KG}^2 \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### ***Espectroscopia de resonancia de espín electrónicos (ESR)***

El espectro ESR del complejo de Cu(II) con carnosina fue registrado a temperaturas de 100 y 300 K usando un instrumento **Bruker-300** trabajando a una frecuencia de 34,01 GHz (banda Q)

### ***Voltamperometría cíclica***

Las medidas se realizaron en un equipo **Bioanalytical System Inc. modelo CV-1B** con una celda de tres electrodos. Se utilizó un electrodo de trabajo de carbón vítreo, un contraelectrodo de alambre de platino y como referencia Ag / AgCl. Las experiencias fueron realizadas en una solución acuosa 0,5 M de  $\text{LiClO}_4$  (utilizado como electrolito soporte).

### ***Resonancia magnética nuclear***

El espectro RMN de la p-bromo-acetanilida fue medido a 25 °C utilizando un equipo **BRUKER** modelo **AMX300** y utilizando TMS como patrón.

## *Conclusiones Generales*

Este trabajo de tesis se centró en el estudio de algunos sistemas modelo vinculados a la bioquímica del oxígeno. Y, concretamente, se encaró el estudio de la posible actividad superóxido-dismutasa (SOD) de una variedad de complejos metálicos con diverso tipo de ligandos así como el de complejos de vanadio que pudieran servir para avanzar en el mejor conocimiento de la acción de las haloperoxidasas dependientes de este elemento.

Luego de una introducción general, en la que se presentaron y discutieron brevemente los aspectos más importantes relacionados a la bioquímica del oxígeno, los estudios encarados en el trabajo se dividieron en dos partes. La primera de ella se dedicó, esencialmente, al estudio de la actividad SOD de una serie de complejos de cobre (II) de variadas características y complejidad estructural. La segunda parte se centró en el estudio de peroxocomplejos de vanadio que pueden resultar útiles en relación a la actividad y a los mecanismos de acción de algunas haloperoxidasas descubiertas en años recientes y dependientes de este metal.

La **primera parte**, que se inicia con una introducción referida a los aspectos químicos y bioquímicos básicos de la enzima superóxido-dismutasa, está dividida en cinco capítulos. En el primero de ellos se investigó la actividad SOD de una serie de complejos metálicos derivados de la sacarina (o-sulfobenzimida, sac.) de estequiometría  $[M^{II}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y con  $M^{II} = \text{Mn}, \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}$  y  $\text{Zn}$ . Se encontró que el complejo de Cu(II) es el que presenta la mejor actividad SOD y los resultados obtenidos permiten especular que sólo este complejo produce una reacción tipo SOD mientras que todos los demás sólo catalizarían, en cierta medida, la dismutación espontánea del anión superóxido. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos de un estudio electroquímico previo de esta misma serie de complejos.

En el segundo capítulo se realizó un estudio similar para una serie de complejos de Cu(II) con aminoácidos biológicamente relevantes, del tipo  $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ , donde R = residuo hidrofóbico u oxhidrílico. Todos estos complejos mostraron importante actividad SOD y muy similar para todos ellos, lo que tal vez derive de sus similitudes estructurales. No pudo establecerse una correlación simple entre las pequeñas variaciones de actividad y



el efecto de los diferentes ligandos. Estos resultados sugieren la necesidad de ampliar estos estudios involucrando otros aminoácidos con restos R diferentes y de una más amplia y variada complejidad estructural.

En el tercer capítulo se evaluó la actividad SOD de una serie de complejos de Cu(II) con bases de Schiff derivados del salicilaldehído y los aminoácidos serina, triptofano, metionina y glutamina. Se encontró que todos estos complejos presentan una muy baja actividad en comparación con la observada para los complejos del capítulo precedente.

En la búsqueda de este tipo de actividad en sistemas algo más complicados estructuralmente, se investigó el complejo que forma el Cu(II) con la carnosina, el dipéptido  $\beta$ -alanil-L-histidina. Previo al análisis de su actividad SOD, se realizó un pormenorizado estudio del complejo que incluyó sus espectros electrónico y vibracional, su comportamiento magnético (a través de medidas de susceptibilidad en un amplio intervalo de temperaturas y de espectroscopía ESR) y sus características redox, investigadas a través de voltamperometría cíclica. Curiosamente, este complejo prácticamente no mostró actividad SOD, a pesar de que su estructura en solución permitiría inferir esa posibilidad. No obstante, esa falta de actividad estaría justificada por la importante estabilidad redox que presenta el mismo.

Finalmente en el quinto y último capítulo de esta primera parte, se evaluó la actividad SOD de una serie de complejos ternarios de Cu(II) conteniendo, junto al dipéptido glicilglicina, otros ligandos orgánicos sencillos (creatinina, benzimidazol, isocitosina, 6-metilisocitosina). Estos compuestos si bien exhiben una actividad más alta que la del complejo con carnosina, tampoco muestran un efecto demasiado notable aunque también en estos casos, las estructuras moleculares permitían esperar una mayor actividad.

La **segunda parte** se inicia con una nueva introducción en la que se analizan las principales características y propiedades de las haloperoxidasas dependientes de vanadio y se sugiere la utilidad de peroxocomplejos de vanadio como buenos “modelos” para avanzar en la mejor comprensión de ciertas peculiaridades y de los mecanismos de reacción de estos novedosos sistemas enzimáticos.

Esta segunda parte está dividida también en cinco capítulos. En el primero de ellos se presenta un análisis de las características estructurales y espectroscópicas así como de la reactividad de peroxocomplejos de vanadio (V). En el siguiente, se presenta un estudio pormenorizado de las peculiaridades espectroscópicas de oxo-monoperoxocomplejos de vanadio (V), las que son analizados en base a sus características estructurales. El estudio incluye varias sales de los aniones diméricos  $[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{malato})]_2^{2-}$  y  $[\text{VO}(\text{O}_2)(\text{citrato})]_2^{2-}$  y del correspondiente complejo dioxo,  $[\text{VO}_2(\text{cittrato})]_2^{2-}$  así como el oxoperoxocomplejo conteniendo el ligando tridentado nitrilotriacetato.

En el tercer capítulo se realizaron estudios similares de oxodiperoxocomplejos. Estos incluyeron dos complejos diméricos conteniendo sólo esos ligandos (dos grupo peróxido y dos grupos oxo) y un y tercer compuesto, conteniendo además una molécula de amoníaco como ligando monodentado,  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]^-$ . Junto a estas especies se investigó, también un par de complejos de tipo  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{L}]^n$  conteniendo como L a los ligandos bidentados oxalato y 1,10 fenantrolina, respectivamente.

En el cuarto capítulo se investiga la actividad catalítica de algunos de los peroxo complejos descriptos en las secciones precedentes. Para ello se trabajó en un sistema bifásico (agua/cloroformo) estudiando la bromación de diversos sustratos orgánicos (acetanilida, salicilaldehído y fenol). En todos los casos, la reacción de halogenación ocurre con excelente rendimiento (del orden del 95%) y los resultados demuestran que los complejos ensayados imitan la acción de las bromoperoxidasas dependientes de vanadio y pueden resultar útiles para encarar estudios mecanísticos.

Un estudio de este tipo se realiza en el capítulo final de la Tesis en el que se investigó la reacción de bromación del rojo fenol (con bromuro y agua oxigenada), trabajando a  $\text{pH} = 6,5$  y utilizando como catalizadores las especies generadas por tratamiento ácido del complejo  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{NH}_3]^-$  o del  $[\text{O}\{\text{VO}(\text{O}_2)_2\}_2]^{2-}$ . La reacción se midió siguiendo las variaciones de absorbancia del azul de bromo fenol a  $\lambda = 595 \text{ nm}$ , y a  $25^\circ\text{C}$ , utilizando la técnica de “flujo detenido”. Los resultados apuntan a que la especie activa sería un intermediario bromado del tipo  $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{Br}]$  con el bromo inicialmente unido en forma directa al vanadio y los datos cinéticos excluyen la mediación de hipobromito en la reacción sugiriendo, en cambio, la necesaria presencia de una especie pentacoordinada de vanadio (V) en el ciclo catalítico de las haloperoxidasas.

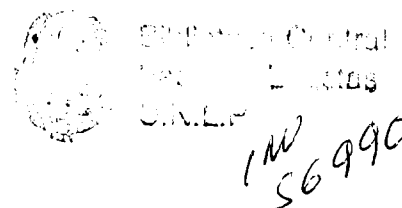
Finalmente se resume brevemente las técnicas experimentales y el instrumental utilizado a lo largo del trabajo y se presenta un listado de las publicaciones científicas y las comunicaciones originadas en el mismo.

---

**Publicaciones y Comunicaciones Originadas en este Trabajo de Tesis**

**A) Publicaciones Científicas**

- 1.- "Determination of superoxide dismutase-like activity some divalent metal saccharinates"  
María C. Apella, Roxana Tótaró y E. J. Baran  
*Biol. Trace Elem. Res.* **37**, 293 (1993)
  
- 2.- "Evaluation of superoxide dismutase-like activity in some copper(II) complexes of essential aminoacids"  
Roxana M. Tótaró, María C. Apella, María M. Torre, Eva Priet, Inés Viera, Eduardo Kramer y Enrique J. Baran  
*Acta Farmacéutica Bonarense* **12**, 73 (1993)
  
- 3.- "Spectroscopic, magnetic and electrochemical behavior of the copper(II) complex of carnosine"  
E.J. Baran, B.S. Parajón-Costa, T. Rojo, R. Sáez-Puche, F. Fernandez, R.M. Tótaró, M.C. Apella, S.B. Etcheverry y M.H. Torre.  
*J. Inorg. Biochem.* **58**, 279 (1995)
  
- 4.- "Bromination of phenol red mediated by vanadium (V) peroxo complexes at pH 6,5".  
Roxana M. Tótaró, Patricia A. M. Williams, María C. Apella, Miguel A. Blesa y Enrique J. Baran.  
*J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 4403 (2000).



## ***B) Comunicaciones Presentadas a Congresos***

- 1.- "Propiedades Espectroscópicas de Peroxocomplejos del Vanadio"

Roxana M. Tótaró, María C. Apella y Enrique J. Baran

IX Congreso Argentino de Fisicoquímica.

Noviembre de 1994, San Luis, Argentina.

- 2.- "Compuestos de Vanadio: Modelos Funcionales de Bromoperoxidasa

Roxana M. Tótaró, María C. Apella y Enrique J. Baran

X Congreso Argentino de Fisicoquímica

Abril de 1997, S.M. de Tucumán, Argentina

- 3.- "Reacción de Bromación del Rojo Fenol Mediada por peroxocomplejos de Vanadio".

Roxana Tótaró, Patricia A.M. Williams, María C. Apella y Enrique J. Baran

XI Congreso Argentino de Fisicoquímica y I Congreso de Fisicoquímica del MERCOSUR.

Abril de 1999, Santa Fe, Argentina.