



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Síntesis, caracterización fisicoquímica, determinaciones biológicas (in vitro) y estudios teóricos de complejos de Cu(II) y VO(IV) con ligandos antioxidantes y/o antimicrobianos

Tesista: Juan José Martínez Medina

Director/a: Patricia A.M. Williams

Director/a: Evelina G. Ferrer

Codirector/a: Nora B. Okulik

Año: 2018

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y en el Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS), bajo la dirección conjunta de las Doctoras Patricia A. M. Williams y Evelina G. Ferrer y la co-dirección de la Doctora Nora B. Okulik.

Año 2018

Agradecimientos

A las autoridades de la Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus) y del Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis doctoral en los espacios físicos de dichas instituciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca interna doctoral.

A los organismos financiadores: UNCAus, UNLP, CONICET, ANPCyT y CICPBA.

Luego del expreso agradecimiento a las instituciones y organismos que hicieron posible la realización de mi trabajo de tesis doctoral, me gustaría agradecer a las personas que me acompañaron en este camino.

A mis directoras Patricia y Evelina por permitirme realizar mi tesis doctoral bajo su tutela, por brindarme su conocimiento y experticia en las tareas experimentales, por el apoyo constante, la paciencia y el cariño recibido. Estas pocas líneas no alcanzan para expresar mi enorme agradecimiento.

A mi co-directora Nora quien me inspiró a seguir este camino y nunca me soltó la mano, mi mentora y guía, quién me ha ayudado a traducir los valores morales inculcados por mis padres a un entorno científico. Su fuerte formación metodológica me ha permitido formar un sentido crítico en la labor científica. Su experticia en las cuestiones computacionales repercutió positivamente en mi orientación hacia esta rama del conocimiento. Su amistad y su consejo certero son las cosas más valiosas que ha compartido conmigo.

A las chicas de CEQUINOR, especialmente a Luciana por enseñarme la mayoría de las técnicas y por las determinaciones antitumorales; y a mis compañeros y profesores de la UNCAus que me han apoyado de una forma u otra durante todos estos años.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mis padres Juanjo y Gilda, a mis hermanos Iris, Eve y Migue, a mi amor Lore y a la luz de mis ojos Alejandro. Ellos son lo más importante en mi vida, mi razón de ser. Siempre es bueno reflexionar sobre lo que nos queda si nos despojamos de nuestros logros (papers, títulos, cargos, etc.). La respuesta a este interrogante es: “lo que verdaderamente somos”, somos hijos, hermanos, esposos, padres, amigos. El verdadero sentido de la vida está en nuestros afectos y en el amor hacia nuestros familiares y amigos, y de ningún modo en nuestros logros académicos.

Índice General

Capítulo 1: Introducción	1
1.1. La Química Bioinorgánica.....	1
1.2. Cáncer. Radicales libres y daño oxidativo. Infecciones microbianas.....	5
1.2.1. Cáncer.....	5
1.2.2. Radicales libres y daño oxidativo.....	7
1.2.3. Infecciones microbianas.....	8
1.3. Aspectos biológicos del Cobre y del Vanadio. Biodistribución.....	9
1.3.1. Cobre.....	9
1.3.1.1. El cobre en la naturaleza.....	10
1.3.1.2. El cobre en los mamíferos.....	11
1.3.1.3. Enfermedades humanas relacionadas al cobre.....	11
1.3.1.4. La química del cobre.....	12
1.3.2. Vanadio.....	13
1.3.2.1. El vanadio en la naturaleza.....	14
1.3.2.2. El vanadio en los mamíferos.....	15
1.3.2.3. La química del vanadio.....	16
1.4. Ligandos (flavonoides y 5-Hidroxitriptófano).....	18
1.4.1. Flavonoides.....	18
1.4.1.1. Baicalina.....	25
1.4.1.2. Apigenina.....	27
1.4.2. 5-Hidroxitriptófano.....	29
1.5. Efectos de la complejación en las propiedades biológicas de los ligandos.....	29
1.6. Hipótesis. Objetivo general y objetivos específicos.....	35
Capítulo 2: Materiales y métodos	37
2.1. Caracterización fisicoquímica (fase sólida).....	37
2.1.1. Análisis elemental.....	37
2.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).....	37
2.1.3. Espectros electrónicos (UV-vis).....	37
2.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR).....	37
2.1.5. Espectros de reflectancia difusa.....	38

2.1.6. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	38
2.2. Caracterización fisicoquímica (en solución).....	38
2.2.1. Variaciones espectrales en función del pH.....	38
2.2.2. Tímulaciones espectrofotométrica.....	38
2.2.3. Estudios de estabilidad de los complejos disueltos.....	39
2.3. Estudios teóricos.....	39
2.4. Determinación de propiedades biológicas <i>in vitro</i>	39
2.4.1. Medidas de capacidades antioxidantes.....	39
2.4.1.1. Ensayo de la actividad antirradicalaria frente al DDPH [•]	39
2.4.1.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.....	40
2.4.1.3. Inhibición del radical peroxilo (ROO [•]).....	40
2.4.1.4. Actividad secuestrante del radical hidroxilo (OH [•]).....	41
2.4.2. Determinaciones antimicrobianas.....	41
2.4.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a bacterias y hongos.....	41
2.4.2.2. Determinación del efecto post-antibiótico (PAE).....	43
2.4.3. Medidas de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL).....	43
2.4.4. Estudios de genotoxicidad y toxicidad aguda.....	43
2.4.4.1. Test de Ames (genotoxicidad).....	43
2.4.4.2. Ensayo de toxicidad aguda (<i>Artemia salina</i>).....	44
2.5. Actividad anticancerígena.....	45
2.5.1. Cultivo de líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón humano y cáncer cervical humano.....	45
2.5.2. Ensayos de viabilidad.....	46
2.5.3. Determinación de efectos pro-oxidantes.....	46
2.5.4. Determinación fluorométrica de los niveles de GSH y GSSG celulares.....	47
2.5.4. Determinación de morfología celular.....	47
2.6. Ensayos de biodisponibilidad. Interacción con la albúmina sérica bovina (ASB).....	48
2.6.1. Estudios de desactivación (<i>quenching</i>) de la ASB.....	48
2.6.2. Determinación de Constantes de afinidad y sitios de enlace.....	48
2.6.2. Parámetros termodinámicos (modo de interacción).....	49
2.7. Análisis estadístico.....	50

Capítulo 3: Síntesis y caracterización estructural de los complejos	51
3.1. Preparación de los complejos.....	51
3.2. Caracterización en fase sólida.....	51
3.2.1. Análisis elementales.....	51
3.2.2. Estudios termogravimétricos (TG).....	52
3.2.3. Espectroscopía vibracional FTIR.....	54
3.2.4. Espectroscopía de reflectancia difusa.....	62
3.2.5. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).....	64
3.3. Caracterización en solución.....	68
3.3.1. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).....	68
3.3.2. Espectroscopía UV-vis.....	71
3.3.2.1. Variaciones espectrales en función del pH para los ligandos y los complejos.....	72
3.3.2.2. Medidas de los espectros electrónicos en solución.....	79
3.3.2.3. Determinación de las estequiometrías por el método de la razón molar.....	81
3.3.2.4. Estudios de estabilidad de los complejos disueltos.....	85
3.4. Conclusiones preliminares.....	88
Capítulo 4: Estudios teóricos en el marco de la Teoría del Funcional de la Densidad	89
4.1. Optimización de los ligandos (flavonoides y 5-HTP).....	90
4.2. Optimización de los complejos.....	97
4.2.1. Estudio de adecuación/aplicabilidad de diferentes métodos para los sistemas VO/Flavonoides.....	97
4.2.2. Determinación de geometría y conformación más estable de los complejos.....	101
4.2.3. Evaluación de las propiedades vibracionales de los complejos.....	108
4.3. Conclusiones preliminares.....	112
Anexo.....	114
Capítulo 5: Determinación de propiedades biológicas <i>in vitro</i>	125
5.1. Medidas de actividades antioxidantes.....	125
5.1.1. Capacidad secuestrante sobre radicales DPPH [•]	126
5.1.2. Poder secuestrante de especies reactivas del oxígeno (superóxido, peróxido e hidroxilo).....	129

5.2. Determinaciones antimicrobianas.....	138
5.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a bacterias y hongos.....	138
5.2.2. Determinación del efecto post-antibiótico (PAE).....	140
5.3. Medidas de la actividad de fosfatasa alcalina.....	141
5.4. Estudios de genotoxicidad y toxicidad aguda.....	144
5.4.1. Test de Ames (genotoxicidad).....	144
5.4.2. Ensayo de toxicidad aguda (<i>Artemia salina</i>).....	147
5.5. Conclusiones preliminares.....	150
Capítulo 6: Actividad anticancerígena.....	151
6.1. Actividad antiproliferativa. Viabilidad celular.....	151
6.2. Efectos pro-oxidantes.	156
6.3. Morfología celular.....	166
6.4. Conclusiones preliminares.....	170
Capítulo 7: Ensayos de biodisponibilidad: interacción con albúmina.....	171
7.1. Estudios de desactivación (<i>quenching</i>) de la albúmina.....	171
7.2. Constantes de afinidad y sitios de enlace.....	176
7.3. Parámetros termodinámicos (modo de interacción).....	179
7.3. Conclusiones preliminares.....	183
Capítulo 8: Conclusiones y perspectivas.....	184
Capítulo 9: Bibliografía.....	187
Publicaciones.....	206

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Estructura química de algunos flavonoides.....	19
Tabla 2.1. Contribuciones de las fuerzas de interacción ABS-compuesto al ΔH y ΔS	49
Tabla 3.1. Asignaciones tentativas de las bandas en el FTIR de Baicalina (Baic), sal de sodio de Baicalina (NaBaic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic).....	56
Tabla 3.2. Asignaciones tentativas de las bandas en el FTIR de Apigenina (Api), sal de sodio de Apigenina (NaApi) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api).....	59
Tabla 3.3. Asignaciones tentativas de las bandas en el FTIR de 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP).....	61
Tabla 4.1. Energía y ángulos τ_1 y τ_5 de los diez conformeros BCL de menor energía.....	94
Tabla 4.2. Distancias del enlace $\text{V}=\text{O}$ y frecuencia de vibración asociadas al modo de estiramiento (<i>stretching</i>) del mismo en el complejo VO/Api optimizado con diferentes métodos.....	98
Tabla 4.3. Longitudes de enlace y ángulos alrededor del vanadio en el VO/Baic.....	103
Tabla 4.4. Longitudes de enlace y ángulos alrededor del vanadio en el VO/Api.....	104
Tabla 4.5. Energía y ángulo diedro de los cinco conformeros de Cu/5-HTP.....	107
Tabla 4.6. Longitudes de enlace y ángulos alrededor del cobre en los complejos Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2.....	108
Tabla A1. Frecuencias y porcentaje de contribución PED del VO/Baic.....	114
Tabla A2. Frecuencias y porcentaje de contribución PED del VO/Api.....	117
Tabla A3. Frecuencias y porcentaje de contribución PED del Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2....	120
Tabla 5.1. Resumen de las capacidades antioxidantes de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), Baic, Api, 5-HTP, VO/Baic, VO/Api y Cu/5-HTP.....	137
Tabla 5.2. Valores de Concentración inhibitoria mínima de VO^{2+} , Cu^{2+} y Cu/5-HTP frente a diferentes cepas de bacterias y hongos.....	140
Tabla 5.3. Inducción de revertantes Histidina ⁺ en <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98 y TA100) por el agregado de VO^{2+} , Baic y VO/Baic.....	145
Tabla 5.4. Inducción de revertantes Histidina ⁺ en <i>S. typhimurium</i> (TA98 y TA100) por el agregado de Api y VO/Api.....	146
Tabla 5.5. Inducción de revertantes Histidina ⁺ en <i>S. typhimurium</i> (TA98 y TA100) por el agregado de Cu^{2+} , 5-HTP y Cu/5-HTP.....	147

Tabla 5.6. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> a diferentes concentraciones de VO^{2+} y estimación de la concentración letal media (CL_{50}).....	148
Tabla 5.7. Porcentaje de mortalidad de <i>A. salina</i> a diferentes concentraciones de Cu^{2+} y estimación de la concentración letal media (CL_{50}).....	149
Tabla 6.1. Valores de IC_{50} de Baic y VO/Baic sobre la línea celular A549.....	153
Tabla 6.2. Valores de IC_{50} de Api y VO/Api sobre las líneas celulares A549 y HeLa....	154
Tabla 7.1. Valores de K_{sv} y K_{q} para la interacción de Baic y VO/Baic con la ASB.....	174
Tabla 7.2. Valores de K_{sv} y K_{q} para la interacción de Api y VO/Api con la ASB.....	176
Tabla 7.3. Valores de K_{a} y n para la interacción de Baic y VO/Baic con la ASB.....	178
Tabla 7.4. Valores de K_{a} y n para la interacción de Api y VO/Api con la ASB.....	179
Tabla 7.5. Parámetros termodinámicos de la interacción de Baic y VO/Baic con la ASB....	181
Tabla 7.6. Parámetros termodinámicos de la interacción de Api y VO/Api con la ASB.....	182

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructuras de las principales especies de oxidovanadio(IV), vanadio(III) y vanadio(V) en solución acuosa.....	17
Figura 1.2. Estructura del núcleo flavan (2-fenil-1-benzopiran-4-ona).....	19
Figura 1.3. Posibles sitios quelantes de la quercetina. Segmentos responsables de las dos bandas principales en su espectro de absorción electrónica.....	21
Figura 1.4. Estructuras químicas de la acetilacetona, maltol y catecol.....	23
Figura 1.5. Posibles estructuras para una especie de oxidovanadio(IV) bis quelada por un flavonoidoide bidentado (O,O): pentacoordinado, <i>cis</i> - y <i>trans</i> -octaédrico.....	24
Figura 1.6. Estructura química de la Baicalina (Baic) y Baicaleína.....	26
Figura 1.7. Estructura química de la Apigenina (Api).....	28
Figura 1.8. Estructura química del 5-Hidroxitriptófano (5-HTP).....	29
Figura 2.1. Control positivo de crecimiento bacteriano en agar Mueller Hinton.....	42
Figura 2.2. Revertantes espontáneas de <i>S. typhimurium</i> TA98 en las placas control.....	44
Figura 2.3. Control positivo de crecimiento del crustáceo de mar <i>A. salina</i>	45
Figura 3.1. Curva termogravimétrica (TGA) de VO/Baic.....	52
Figura 3.2. Curva termogravimétrica (TGA) de VO/Api.....	53
Figura 3.3. Curva termogravimétrica (TGA) de Cu/5-HTP.....	54
Figura 3.4. Espectros FTIR de Baic, NaBaic y VO/Baic.....	55
Figura 3.5. Espectros FTIR de Api, NaApi y VO/Api.....	58
Figura 3.6. Espectros FTIR de 5-HTP y Cu/5-HTP.....	60
Figura 3.7. Espectro de reflectancia difusa de VO/Baic.....	63
Figura 3.8. Espectro de reflectancia difusa de VO/Api.....	63
Figura 3.9. Espectro de reflectancia difusa de Cu/5-HTP.....	64
Figura 3.10. Espectros EPR del sólido de VO/Baic.....	66
Figura 3.11. Espectros EPR del sólido de VO/Api.....	67
Figura 3.12. Espectros EPR del sólido de Cu/5-HTP.....	68
Figura 3.13. Espectros EPR de una solución de VO/Baic en DMSO a 120 K.....	69
Figura 3.14. Espectros EPR de una solución de VO/Api en DMSO a 120 K.....	70
Figura 3.15. Espectros EPR de una solución de Cu/5-HTP en DMSO a 120 K.....	71
Figura 3.16. Espectro UV-vis de una solución de Baic a diferentes valores de pH.....	72
Figura 3.17. Espectro Visible de una solución de Baic a diferentes pH.....	73

Figura 3.18. Espectro UV-vis de una solución de VO ²⁺ y Baic a diferentes pH.....	74
Figura 3.19. Espectro Visible de una solución de VO ²⁺ y Baic a diferentes pH.....	75
Figura 3.20. Espectro UV-vis de una solución de Api a diferentes pH.....	76
Figura 3.21. Espectro UV-vis de una solución de VO ²⁺ y Api a diferentes pH.....	76
Figura 3.22. Espectro Visible de una solución de VO ²⁺ y Api a diferentes pH.....	77
Figura 3.23. Espectro UV-vis de una solución de 5-HTP a diferentes pH.....	78
Figura 3.24. Espectro UV-vis de una solución de 5-HTP y Cu ²⁺ a diferentes pH.....	78
Figura 3.25. Espectro Visible de una solución de 5-HTP y Cu ²⁺ a diferentes pH.....	79
Figura 3.26. Espectro UV-visible de Baic y de la mezcla VO/Baic 1/2 a pH=9.....	79
Figura 3.27. Espectro UV-visible de Api y de la mezcla VO/Api 1/1 a pH=5.....	80
Figura 3.28. Espectro UV de 5-HTP y de la mezcla Cu/5-HTP 1/2 a pH=5.....	80
Figura 3.29. Espectro Visible de 5-HTP y de la mezcla Cu/5-HTP 1/2 a pH=5.....	81
Figura 3.30. Espectro UV-visible de Baic en etanol con la adición de VO ²⁺ en distintas relaciones L/M a pH 9. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema Baic/VO ²⁺	82
Figura 3.31. Esfera de coordinación propuesta para el VO/Baic.....	82
Figura 3.32. Espectro UV-visible de Api en etanol con la adición de VO ²⁺ en distintas relaciones L/M a pH 5. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema Api/VO ²⁺	83
Figura 3.33. Esfera de coordinación propuesta para el VO/Api.....	83
Figura 3.34. Espectro Visible de 5-HTP en agua/DMSO con la adición de Cu ²⁺ en distintas relaciones L/M a pH 5. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema 5-HTP/Cu ²⁺	84
Figura 3.35. Esfera de coordinación propuesta para el Cu/5-HTP.....	85
Figura 3.36. Variación del espectro electrónico de VO/Baic en DMSO en el tiempo.....	85
Figura 3.37. Variación del espectro electrónico de VO/Api en DMSO en el tiempo.....	86
Figura 3.38. Variación del espectro electrónico de Cu/5-HTP en DMSO en el tiempo....	87
Figura 4.1. Esquema de la molécula de Baicalina.....	91
Figura 4.2. Geometría optimizada del confórmero BCLa _{2CT} de Baic.....	95
Figura 4.3. Geometría optimizada de Apigenina.....	95
Figura 4.4. Geometría optimizada en fase gaseosa del 5-HTP neutro. Gráfico insertado: geometría optimizada en solvente acuoso del 5-HTP zwitterion.....	96
Figura 4.5. Espectros IR teóricos del complejo VO/Api obtenidos empleando diferentes métodos computacionales (sin escalar).....	99

Figura 4.6. Espectros IR teóricos del complejo VO/Api obtenidos empleando el funcional B3LYP combinado con los dos conjuntos de bases escalados y sin escalar.....	101
Figura 4.7. Geometría optimizada del complejo VO/Baic.....	102
Figura 4.8. Geometría optimizada del complejo VO/Api.....	104
Figura 4.9. Estructuras de los cinco confórmeros del Cu/5-HTP.....	106
Figura 4.10. Geometría de los complejos Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2.....	108
Figura 4.11. Espectro IR experimental y teórico del complejo VO/Baic.....	109
Figura 4.12. Espectro IR experimental y teórico del complejo VO/Api.....	110
Figura 4.13. Espectro IR experimental del complejo Cu/5-HTP y espectro IR teórico del Cu/5-HTP1 (86%) y Cu/5-HTP2 (14%) sumados.....	111
Figura 5.1. Efecto de VO ²⁺ , Baic y VO/Baic sobre el radical DPPH [•]	127
Figura 5.2. Efecto de VO ²⁺ , Api y VO/Api sobre el radical DPPH [•]	128
Figura 5.3. Efecto de Cu ²⁺ , 5-HTP y Cu/5-HTP sobre el radical DPPH [•]	129
Figura 5.4. Efecto de VO ²⁺ , Baic y VO/Baic sobre el anión superóxido (O ₂ ^{•-}).....	130
Figura 5.5. Efecto de Trolox, Baic y VO/Baic sobre los radicales peroxilo (ROO [•]).	
Gráficos insertados: efecto de Baic y VO/Baic a diferentes concentraciones.....	131
Figura 5.6. Efecto de VO ²⁺ , Baic y VO/Baic sobre el radical OH [•]	131
Figura 5.7. Efecto de Api y VO/Api sobre los radicales ROO [•]	133
Figura 5.8. Efecto de VO ²⁺ , Api y VO/Api sobre el radical OH [•]	133
Figura 5.9. Efecto de Cu ²⁺ , 5-HTP y Cu/5-HTP sobre el radical O ₂ ^{•-}	135
Figura 5.10. Efecto de Trolox, 5-HTP y Cu/5-HTP sobre los radicales ROO [•] .	
Gráficos insertados: efecto de 5-HTP y Cu/5-HTP a diferentes concentraciones.....	136
Figura 5.11. Efecto de Cu ²⁺ , 5-HTP y Cu/5-HTP sobre el radical OH [•]	136
Figura 5.12. Variación de la actividad de la enzima FAL por el agregado de VO ²⁺ , Baic, Api, VO/Baic y VO/Api en concentraciones de hasta 100µM.....	143
Figura 5.13. Variación de la actividad de la enzima FAL por el agregado de Cu ²⁺ , 5-HTP y Cu/5-HTP en concentraciones hasta 500 µM.....	144
Figura 6.1. Efectos inhibitorios de VO ²⁺ , Baic y VO/Baic sobre la viabilidad de las células A549 tratadas con diversas concentraciones durante 24 h.....	152
Figura 6.2. Efectos inhibitorios del VO ²⁺ , Api y VO/Api sobre la viabilidad de las células A549 y HeLa tratadas con diversas concentraciones durante 24 h.....	153
Figura 6.3. Efectos inhibitorios del Cu ²⁺ , 5-HTP, y Cu/5-HTP sobre la viabilidad de las células A549, HeLa, HCT-116 y MRC-5 tratadas durante 24 h.....	155
Figura 6.4. Efecto de VO ²⁺ , Baic y VO/Baic sobre la oxidación de H2DCFDA a DCF..	158

Figura 6.5. Efectos inhibitorios de Baic y VO/Baic sobre la viabilidad de las células A549 en presencia de una mezcla de vitaminas C y E y N-acetil-L-cisteína (NAC).....	159
Figura 6.6. Efecto de NAC sobre la producción de EROs inducida por Baic y VO/Baic.....	159
Figura 6.7. Efecto del VO ²⁺ , Api y VO/Api sobre la oxidación de H ₂ DCFDA.....	160
Figura 6.8. Efectos inhibitorios de Api y VO/Api sobre la viabilidad de las células A549 y HeLa en presencia de una mezcla de vitaminas C y E.....	161
Figura 6.9. Efecto de NAC sobre la producción de EROs inducida por Api y VO/Api en las líneas celulares A549 y HeLa.....	162
Figura 6.10. Efecto del catión de VO ²⁺ , Api y VO/Api sobre los niveles celulares de GSH y la relación GSH/GSSG en células A549 y HeLa.....	163
Figura 6.11. Efecto del Cu ²⁺ , 5-HTP, y Cu/5-HTP sobre la oxidación de H ₂ DCFDA....	165
Figura 6.12. Efecto del Cu ²⁺ , 5-HTP y Cu/5-HTP sobre la oxidación de H ₂ DCFDA.....	166
Figura 6.13. Efecto en la morfología de las células A549 tratadas con VO/Baic.....	167
Figura 6.14. Efecto en la morfología de las células A549 y HeLa tratadas con VO/Api.....	167
Figura 6.15. Efecto en la morfología de las células A549, HeLa y HCT-116 tratadas con Cu/5-HTP.....	168
Figura 7.1. Desactivación de la fluorescencia de la ASB por Baic y VO/Baic.....	173
Figura 7.2. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de la ASB con diferentes concentraciones de Baic y VO/Baic a diferentes temperaturas. Gráficos insertados: F ₀ /F en función de [Q] para Baic y VO/Baic a las concentraciones más bajas.....	174
Figura 7.3. Desactivación de la fluorescencia de la ASB por Api y VO/Api.....	175
Figura 7.4. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de la ASB con diferentes concentraciones de Api y VO/Api a diferentes temperaturas. Gráficos insertados: F ₀ /F en función de [Q] para Api y VO/Api a las concentraciones más bajas.....	176
Figura 7.5. Gráfico del log ((F ₀ -F)/F) en función del log [Q] para Baic y VO/Baic a diferentes temperaturas.....	177
Figura 7.6. Gráfico del log ((F ₀ -F)/F) en función del log [Q] para Api y VO/Api a diferentes temperaturas.....	179

Capítulo 1: Introducción

1.1. La Química Bioinorgánica.

La Química Bioinorgánica es una ciencia interdisciplinaria (ubicada en la interfase entre la Química y las Ciencias Biológicas) que se ocupa del estudio de todos aquellos sistemas biológicos que involucren la presencia o participación de metales u otros elementos y compuestos típicamente inorgánicos (Baran, 1995). Se ocupa tanto del estudio de los sistemas y compuestos inorgánicos presentes en tejidos y fluidos biológicos como de sistemas inorgánicos (modelos) mediante los cuales se puede simular o reproducir el comportamiento químico de los sistemas naturales. Y, en última instancia, se trata de correlacionar la actividad biológica de un sistema inorgánico con las características estructurales, electrónicas y químicas del mismo. Este planteamiento hace evidente que para la resolución de estos problemas se debe recurrir a los más avanzados y sofisticados métodos fisicoquímicos de medida, ante todo los espectroscópicos, así como la utilización de modelos teóricos y métodos de la química cuántica. Cabe mencionar que muchos de los aportes de la Química Bioinorgánica al conocimiento científico son de enorme importancia para otras ramas de la Ciencia y la Tecnología (como la medicina, farmacología, ecología, agricultura, veterinaria y metalurgia) favoreciendo el desarrollo de líneas de investigación con la participación interdisciplinaria de químicos, biólogos, farmacólogos, y muchos otros profesionales (Baran, 1995).

Las moléculas inorgánicas y los compuestos de coordinación de iones metálicos (bioelementos) son necesarias para la vida en muchos organismos y sistemas biológicos, ya que funcionan en el transporte de moléculas y son un componente clave de las enzimas. Como ejemplos pueden mencionarse el transporte y almacenamiento de oxígeno en el cuerpo mediante biomoléculas que contienen hierro, y el almacenamiento de compuestos inorgánicos que proporcionan resistencia ósea mediante la utilización de moléculas de fosfato de calcio. A pesar de la importancia de estas moléculas, los metales de transición, incluidos el zinc, el cobalto, el cobre, el níquel, el molibdeno y el cromo, se encuentran en el cuerpo humano en cantidades muy pequeñas. De los metales de transición que se encuentran en la fisiología humana, el hierro es el más abundante, sumando hasta 5 g en el cuerpo de un adulto sano. El hierro es de importancia significativa ya que permite el transporte y almacenamiento de oxígeno. Una gran cantidad de compuestos dentro del cuerpo como las metaloenzimas, metaloproteínas, coenzimas o vitaminas, ácidos nucleicos

y hormonas también contienen elementos inorgánicos (Hosmane, 2017). El hierro, el cobre y el zinc se encuentran en todos los organismos vivos, con algunas excepciones, mientras que otros metales de transición (como el tungsteno, el cadmio o los lantánidos) solo se encuentran en organismos específicos (Hosmane, 2017; Maret, 2016). Los metales constituyen una fracción importante de los elementos esenciales para la vida. Por lo tanto, la química de coordinación, en el sentido de que es en gran medida la química de los cationes metálicos, subyace en muchos de los procesos biológicos más fundamentales. Sin embargo, con ciertas excepciones espectaculares, en particular para las proteínas que poseen el grupo hemo (hemoglobina y mioglobina), la mayoría del conocimiento de las funciones precisas de los iones metálicos en sistemas biológicos permaneció difusa y especulativa durante al menos cincuenta años después de la racionalización de Alfred Werner sobre la naturaleza de los compuestos de coordinación metálicos (Harrowfield, 2005).

Un elemento es considerado esencial cuando una ingesta deficiente produce consistentemente una alteración de una función de óptima a subóptima y cuando la suplementación con niveles fisiológicos de este elemento, pero no otros, previene o cura este deterioro. Esta definición debe incluir una referencia a la especie biológica. Se sabe que 11 metales y 10 elementos no metálicos son esenciales para los humanos, pero no necesariamente para otras formas de vida fuera del reino animal. En este contexto, se propuso categorizarlos de la siguiente manera: (i) elementos que son esenciales para todas las especies; (ii) elementos que se utilizan en un número significativo de especies (V, Ni); y (iii) elementos que se usan solo en algunos organismos en nichos ecológicos especiales (W, Cd, Lantánidos). El tungsteno se usa en lugar del molibdeno en las enzimas de algunas bacterias termófilas. Ni, V, W no están establecidos como esenciales para animales y humanos. La anhidrasa carbónica, que generalmente es una enzima de zinc, es una enzima de cadmio en la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii*. Lantánidos (elementos de tierras raras) en lugar de calcio se encontraron como cofactores de la enzima metanol deshidrogenasa de determinadas bacterias metanotróficas. Por otra parte, los elementos que son esenciales para la supervivencia deben distinguirse de otros que tienen funciones limitadas y algunos beneficios para la salud solamente. Un ejemplo es el flúor que, como fluoruro, previene la caries dental y tal vez sea beneficioso para la salud ósea, pero por lo demás muestra toxicidad (Maret, 2016).

Aunque la química bioinorgánica había sido descubierta y estudiada muchos años antes, con el uso probado de metales en pociones farmacéuticas que datan de las antiguas

civilizaciones de Mesopotamia, India, China y Egipto, la primera aplicación práctica de esta disciplina de la química se encontró en la agricultura con elementos tales como fósforo y nitrógeno. Desde entonces, la química bioinorgánica ha sido muy investigada y ha demostrado ser muy valiosa para el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades, así como para comprender conceptos como la biomineralización y aspectos de la química ambiental. El advenimiento de la química medicinal es típicamente atribuido a Paul Ehrlich por el descubrimiento del compuesto organometálico salvarsán. Este potente antibiótico, originalmente utilizado para el tratamiento de la sífilis, fue el resultado de una exhaustiva búsqueda de compuestos que posean actividad antimicrobiana pero que no afecten al paciente (balas mágicas) (Hosmane, 2017). Por otra parte, los esfuerzos para comprender la acción bactericida de los complejos metálicos simples de los ligandos azaaromáticos pueden considerarse una base para investigaciones extraordinariamente extensas de las interacciones de los complejos metálicos con el ADN, incluyendo, por ejemplo, el estudio del uso de complejos de platino como agentes anticancerosos (Harrowfield, 2005). Uno de los primeros desarrollos importantes en el tratamiento del cáncer comenzó con el descubrimiento accidental del Dr. Barnett Rosenberg en el que la interrupción de la división celular que observaban al aplicar un campo eléctrico a un cultivo de *Eschericia coli*, en una solución de cloruro de amonio entre dos electrodos de platino, se debía a un compuesto que se liberaba desde el electrodo de platino y no al campo eléctrico. Esta revelación llevó al desarrollo del cisplatino como medicamento utilizado para tratar tumores cancerosos. El cisplatino todavía se considera parte de la terapia estándar para muchas formas de cáncer. A pesar de su éxito, el cisplatino tiende a tener muchos efectos secundarios negativos. El ion $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ puede unirse covalentemente luego de la disociación de los ligandos lábiles cloruro, a las bases nitrogenadas del ADN, específicamente guanina y adenina, para formar un aducto cisplatino-ADN, que puede alterar las vías celulares afectando la replicación, transcripción y reparación del ADN, el ciclo celular y ocasionando la muerte por apoptosis. Debido a estos efectos adversos, la dosificación de cisplatino que se puede administrar a los pacientes es bastante baja. La investigación subsiguiente de los agentes antitumorales de platino buscó aliviar la toxicidad del cisplatino manteniendo un efecto terapéutico similar. Muchos de estos medicamentos se diseñaron para aumentar la estabilidad hidrolítica mediante el reemplazo de los dos ligandos de cloro por anillos de carboxilato, lo que minimiza la reactividad química y la posibilidad de efectos secundarios. Carboplatino (*cis*-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*)platino(II)) y oxaliplatino ((1*R*,2*R*)-

ciclohexano-1,2-diamina(oxalato)platino(II)) han sido aprobados en todo el mundo, mientras que heptaplatino (cis-malonato-4,5-bis(aminometil)-2-isopropil-1,3-dioxolano]platino(II)), lobaplatino (cis-1,2-diaminociclobutanoglicolato)platino(II) y nedaplatino (cis-diaminoglicolato)platino(II) están en fase de ensayos clínicos en los Estados Unidos y han sido aprobados para su uso en Japón, China y Corea del Sur (Hosmane, 2017).

La medicina tradicional china (MTC) posee una historia rica y antigua, que data de hace miles de años. La práctica de MTC, altamente influenciada por el desarrollo de la cultura china, involucra fisioterapia usando acupuntura, terapias con calor y compuestos químicos. Los productos naturales empleados en la MTC se aíslan como decocciones de materiales animales, minerales y herbales. Aunque las hierbas medicinales han desempeñado un papel importante en la MTC, las plantas medicinales perdieron gradualmente su importancia a medida que los productos farmacéuticos sintéticos avanzaban. Actualmente, hay un renacimiento del interés en productos naturales bioactivos como compuestos químicos principales para la generación de derivados semi-sintéticos. Teniendo en cuenta la baja tasa de éxito de las actuales estrategias sintéticas contra el cáncer basadas en metales, algunos químicos bioinorgánicos han cambiado el enfoque a los derivados de MTC. Hay muchos ejemplos exitosos de agentes anticancerosos derivados de MTC a través de la modificación orgánica de los constituyentes MTC activos, que se considera un atajo para descubrir nuevos fármacos contra el cáncer. Es bien sabido que los complejos de metales pueden contribuir significativamente al desarrollo de fármacos. Debido a que muchos compuestos activos contienen grupos hidroxilo, ácido carboxílico y amina, con átomos donadores de electrones que pueden formar fácilmente enlaces de coordinación, los mismos resultan valiosos para el desarrollo de complejos de coordinación (Chen et al., 2012). Por lo expuesto anteriormente, para este trabajo de tesis doctoral se seleccionaron las moléculas baicalina, apigenina y 5-Hidroxitriptófano (agentes antioxidantes presentes en vegetales) para sintetizar complejos de coordinación con los cationes cobre(II) y oxidovanadio(IV) con el objeto de que los nuevos compuestos mejoren las propiedades biológicas/farmacológicas de dichos ligandos.

1.2. Cáncer. Radicales libres y daño oxidativo. Infecciones microbianas.

1.2.1. Cáncer.

El cáncer es un grupo de enfermedades que son causadas por una alteración en el metabolismo del crecimiento. Se asume que el origen del mismo es una combinación de factores exógenos y endógenos, que llevan a las células normales a transformarse en células cancerosas. Uno de los factores endógenos es una disposición genética que debilita el control de errores de la transcripción del ADN, aumentando así la probabilidad de mutaciones. La mayoría de las mutaciones son inofensivas porque golpean puntos sin importancia en la secuencia de ADN, algunas son favorables y algunas son dañinas. La alerta del mecanismo de reparación por una mutación trivial de hecho puede ser favorable porque todo el segmento recibe un chequeo exhaustivo. El inconveniente se presenta cuando se producen variantes menos eficaces de las proteínas supresoras (p53 y p16). El papel de estas proteínas es frenar los factores de transcripción, lo que garantiza que el ciclo celular no corra tan rápido provocando que la enzima de control y reparación (una ADN sintetasa) pase por alto los errores de apareamiento de bases (dímeros de timina covalentes o bases modificadas químicamente). La p53 es en realidad un factor de transcripción que induce la expresión de los genes p16 y p21. La proteína codificada por el gen p21 es un inhibidor de las fosfoquinasas de control de la división celular en el punto de control G₁ (fase de crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN (ácido ribonucleico))/S(fase de replicación o síntesis del ADN). La enzima de reparación se mueve a lo largo de la doble hélice de ADN, comprobando continuamente que solo se producen pares de bases A-T y G-C. En caso de fallas, la enzima invierte la dirección de su movimiento y elimina en su viaje de regreso los mononucleótidos que causan el error. Luego, avanza nuevamente para cerrar la hebra con las bases correctas. Esta operación esencial requiere una cierta cantidad de tiempo, que no está disponible si los factores supresores son deficientes (Havsteen, 2002).

El cáncer parece estar asociado con un descarrilamiento de las cadenas de señales que regulan el metabolismo del crecimiento. Además de las enzimas asociadas a las membranas plasmáticas, estas cadenas consisten casi exclusivamente en cascadas de proteínas fosfoquinasas. En las células normales, la mayoría de estas proteínas quinasas son específicas para las cadenas laterales de serina o treonina, mientras que solo unas pocas son específicas para el grupo fenol de la tirosina. Por el contrario, las células cancerosas tienen una fuerte actividad de proteína quinasa específica de tirosina,

especialmente en la parte citoplásmica de las proteínas de membrana plasmática (como receptores de hormona del crecimiento y ATPasas de transporte) (Havsteen, 2002).

La formación de metástasis por las células cancerosas es esencial para la dispersión de la enfermedad en el cuerpo y es un evento clave en su progresión letal. Las células tumorales adquieren su movilidad mediante un aumento de la expresión de genes de proteinasas, por ejemplo: los genes de colagenasa y elastasa. Estas enzimas hidrolizan los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, pero normalmente son inactivadas por inhibidores de proteína endógenos, especialmente por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Desafortunadamente, las células cancerosas pueden alterar la acción de los TIMPs por una mutación en el gen del inhibidor que destruye las interacciones inhibitorias, pero no las interacciones de enlace, con el resultado de que la actividad hidrolítica no solo se conserva, sino que también se protege estéricamente contra el ataque de la mayoría de los otros inhibidores (drogas). Solo pequeños inhibidores pueden alcanzar el sitio activo de las proteasas, pero rara vez son suficientemente específicos (Havsteen, 2002).

Valko et al. (2006) describieron la carcinogénesis como un proceso de múltiples etapas (inducción, promoción y progresión). La carcinogénesis es un proceso complejo de múltiples etapas que involucra el pasaje desde una célula sana a un estado precanceroso hasta finalmente llegar a un estadio temprano de cáncer. El proceso carcinogénico involucra un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular desplazado hacia la proliferación celular. La iniciación del proceso involucra una mutación no letal del ADN que produce una célula alterada. La etapa de promoción es caracterizada por la expansión clonal de las células iniciadas por la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la muerte celular programada. Este proceso requiere la presencia continua de estímulos para la promoción de tumores y por lo tanto es un proceso reversible. La progresión es la tercera y última etapa y se caracteriza por cambios moleculares (acumulación de daños genéticos adicionales) y celulares que ocurren en el pasaje del estado preneoplásico al neoplásico.

La urgencia de superar los inconvenientes biofísicos y biomédicos de los tratamientos quimioterapéuticos actuales llevó a los científicos a considerar los complejos de coordinación formados entre metales y flavonoides como opciones viables en la terapia del cáncer. Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* indican que los flavonoides y sus complejos de iones metálicos ejercen efectos inhibitorios a nivel de la promoción y progresión del tumor. Un nuevo compuesto de coordinación metálico con actividad antitumoral y eficacia clínica prometedora debe cumplir los siguientes criterios: (1) poseer buenas propiedades intrínsecas, estabilidad

molecular, permitiendo que el fármaco llegue intacto a las células diana; (2) ejercer una interacción eficiente con proteínas de transporte en sangre y membranas; (3) mostrar buenas propiedades de unión al ADN; (4) tener actividad selectiva contra células cancerosas y no contra células normales; y (5) preferiblemente tener actividad contra células tumorales que son resistentes a cisplatino y derivados (Uivarosi y Munteanu, 2017).

1.2.2. Radicales libres y daño oxidativo.

En los últimos años, hay un interés creciente en las sustancias antioxidantes. La razón principal de este interés es la protección de las células, sus orgánulos (especialmente las membranas) y las vías metabólicas contra los radicales libres de oxígeno y sus derivados reactivos conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas especies participan en la formación de estados de inflamación crónica y otras enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Majewska et al., 2011).

El oxígeno es una molécula esencial para la vida y actúa como aceptor final de los electrones en la respiración. Sin embargo, las formas reactivas de oxígeno tales como superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno causan estragos en la célula después de una pérdida de enzimas respiratorias. Se considera que los EROs son moléculas altamente reactivas y posibles subproductos tóxicos del mecanismo de oxidación aeróbica. Estos se generan como resultado del metabolismo mitocondrial (transporte de electrones) y la cascada de fosforilación oxidativa en las células. Además, EROs como el superóxido, puede reaccionar con otras moléculas de radicales como el óxido nítrico para producir especies reactivas de nitrógeno (ERNs), produciendo incluso más radicales libres en una reacción en cadena ramificada. Asimismo, se generan EROs durante la fagocitosis de microbios. Durante este proceso, la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa del fagocito reduce el oxígeno por un solo electrón, lo que conduce a la formación de radicales peroxilo, una subclase de EROs. Sin embargo, la mitocondria es una fuente importante para la generación de EROs. En la cadena de transporte de electrones mitocondrial de mamíferos, los superóxidos se originan de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido); ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), ubiquinol; citocromo c oxidorreductasa (complejo III), pero hay crecientes evidencias de generación de superóxido por el complejo I predominantemente. Además, la concentración de EROs o radicales libres aumenta drásticamente durante los períodos de estrés ambiental, exposición a los rayos UV o al calor. La alta concentración de estas especies puede ocasionar estrés oxidativo. Tanto las EROs como las ERNs afectan muchas biomoléculas como lípidos

(peroxidación lipídica), proteínas (oxidación de aminoácidos), ADN y enzima (oxidación de cofactores), causan varios daños y enfermedades celulares, incluyendo aterosclerosis, hipertensión, isquemia, reperfusión, inflamación, fibrosis quística, cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Khalid et al., 2013). La peroxidación lipídica es una propagación de la agresión oxidativa a los ácidos grasos poliinsaturados mediada por radicales libres y cuya terminación se produce a través de medios enzimáticos o mediante la eliminación de radicales libres por antioxidantes. Las EROs contribuyen al envejecimiento celular, la mutagénesis, la carcinogénesis y la enfermedad coronaria; posiblemente a través de la desestabilización de las membranas, el daño del ADN y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Heim et al., 2002).

De acuerdo con la teoría del envejecimiento de los radicales libres, la producción mitocondrial de EROs y el daño resultante a las macromoléculas son responsables del envejecimiento y, por lo tanto, de la determinación de la vida máxima. Las células afectadas por el estrés oxidativo se defienden utilizando enzimas antioxidantes. Una cantidad de metaloenzimas muy eficientes, incluyendo superóxido dismutasa (SOD) y superóxido reductasa (SOR), catalasa, peroxirredoxina (Prx), glutatión peroxidasa (GP) y tioredoxina/tioredoxina reductasa (Trx/TrxR)) están constantemente eliminando EROs y ERNs. La deficiencia de estas enzimas antioxidantes puede conducir a varias enfermedades (Khalid et al., 2013).

1.2.3. Infecciones microbianas.

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos fue reconocida desde que se introdujeron los primeros medicamentos para el uso clínico. Cuando la penicilina se usó por primera vez en 1941, menos del 1% de las cepas de *S. aureus* mostraron resistencia. En 1947, el 38% de las cepas hospitalarias habían adquirido resistencia y en 1998 se informó que más del 90% de las cepas eran resistentes a dicho antibiótico. La reciente aparición de resistencia a la vancomicina entre las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) es una causa de gran preocupación y pone de manifiesto la necesidad urgente de nuevas clases de antibióticos. El diseño racional de medicamentos no siempre produce agentes antimicrobianos efectivos. En el pasado, se han diseñado y sintetizado con éxito inhibidores enzimáticos potentes, pero solo tenían una actividad antibacteriana moderada, probablemente debido a la compleja cuestión farmacocinética/farmacodinámica de la absorción de fármacos por las células. La búsqueda empírica de compuestos químicos con

actividad antimicrobiana representa una estrategia alternativa para el desarrollo de nuevos medicamentos. Los productos naturales en particular han sido una rica fuente de agentes antimicrobianos con un bajo nivel de toxicidad, un espectro suficientemente amplio y una farmacocinética suficientemente buena como para ser clínicamente útiles sin modificación química (Cushnie et al., 2003). Sin embargo, la complejación de estas moléculas permite en algunos casos potenciar las propiedades biológicas de las mismas y constituye una herramienta útil en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

1.3. Aspectos biológicos del Cobre y del Vanadio. Biodistribución.

La vida en la tierra ha evolucionado dentro de una compleja mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos. Mientras que las moléculas orgánicas como los aminoácidos, los carbohidratos y los nucleótidos forman la columna vertebral de las proteínas y el material genético, estos componentes fundamentales de las macromoléculas se sintetizan y finalmente se degradan enzimáticamente. Los elementos inorgánicos tales como cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn), una vez solubilizados de la corteza terrestre, no se crean ni se destruyen y, por lo tanto, su regulación homeostática está bajo estricto control (Festa y Thiele, 2011).

1.3.1. Cobre.

El cobre es un elemento esencial que funciona como un cofactor durante el metabolismo aeróbico; sin embargo, en cantidades bajas o excesivas, el cobre puede tener efectos nocivos. Es esencial para la respiración celular, homeostasis de hierro, formación de pigmentos, producción de neurotransmisores, biogénesis de péptidos, biosíntesis de tejido conectivo y defensa antioxidante (Cass y Hill, 1980; Solomon y Lowery, 1993). Las propiedades redox y de formación de complejos que posee el cobre pueden ser altamente perjudiciales para los procariontes y eucariotes cuando no se controlan adecuadamente, dañando muchas biomoléculas incluyendo ADN, lípidos y proteínas. Para restringir las concentraciones de cobre libre, todas las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia, secuestrando y liberando cobre lábil para minimizar sus efectos nocivos (Dalecki et al., 2017). Actualmente, las propiedades antimicrobianas de las superficies metálicas de cobre están siendo probadas contra numerosos patógenos. Además, el uso de recipientes de cobre para el agua potable se ha incorporado en los países en desarrollo como una alternativa de bajo costo en la prevención de infecciones bacterianas (Etcheverry y Williams, 2009; Ibrahim et al., 2011).

1.3.1.1. El cobre en la naturaleza.

El cobre es un elemento omnipresente en el medio ambiente, así como en los organismos vivos, con sus capacidades redox y su potencial de complejación que lo hace indispensable para muchas funciones celulares. Los iones de cobre son un nutriente esencial para todos los dominios de la vida. El origen de esta dependencia del cobre se remonta al “Gran Acontecimiento de Oxigenación de la Tierra”, hace aproximadamente 2.700 millones de años, cuando los niveles de oxígeno comenzaron a aumentar (Dalecki et al., 2017) por la presencia de organismos fotosintéticos como las cianobacterias, el oxígeno acumulado en la atmósfera y la consecuente oxigenación de los océanos. Esto condujo a una disminución en la solubilidad del Fe y una expansión del papel biológico del Cu. Una propiedad de Cu que impulsa sus diversos roles en la estructura y la catálisis, es su existencia en un estado reducido Cu^+ y un estado oxidado Cu^{2+} . Dado que Cu^+ tiene afinidad por los grupos tiol y tioéter (ejemplos encontrados en cisteína o metionina), y Cu^{2+} exhibe una coordinación preferida para grupos de oxígeno o nitrógeno imidazólico (encontrados en ácido aspártico y glutámico, o histidina, respectivamente), estos iones metálicos pueden participar de amplio espectro de interacciones con proteínas para conducir diversas estructuras y reacciones bioquímicas. Además, en el proceso de interconversión entre Cu^+ y Cu^{2+} , el Cu intracelular libre puede generar radicales hidroxilo, que pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y puede interferir con la síntesis de agrupaciones de Fe-azufre que son esenciales para la actividad de algunas enzimas celulares importantes (Festa y Thiele, 2011). Sin embargo, los beneficios obtenidos por la coordinación del cobre con los sitios catalíticos enzimáticos pueden resultar desfavorables por su propensión a coordinarse accidentalmente a una variedad de sitios biológicos no nativos, que se cree que contribuyen a la toxicidad del cobre en los sistemas biológicos cuando la homeostasis se ve afectada. En comparación con otros iones de metales de transición bivalentes biológicamente relevantes, como Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} , el cobre a menudo tiene una mayor afinidad por los sitios de unión proteicos y, por lo tanto, competiría con los iones metálicos nativos por dicha unión. En última instancia, esto puede conducir al reemplazo o desplazamiento de otros iones metálicos de sus sitios de unión nativos, eliminando la actividad enzimática. Esta preferencia es en gran medida independiente del ligando real y está bien descrita por la serie de Irving-Williams que ordena iones metálicos divalentes de la primera serie basándose en estabilidades termodinámicas relativas de sus respectivos complejos determinadas experimentalmente ($\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$). Gran parte de este fenómeno se explica por la disminución de los radios iónicos de los iones metálicos

cuando se mueve a través de la tabla periódica desde el manganeso al zinc. Por sí solo, sin embargo, los radios iónicos no representan la estabilidad excepcional del cobre, siendo más altos que el zinc. Esta estabilidad se atribuye a la distorsión de Jahn-Teller, que describe una asimetría geométrica que, en la esfera de coordinación octaédrica favorecida por el Cu^{2+} , conduce a la formación de cuatro enlaces más cortos con un carácter más covalente en la base piramidal cuadrada y dos enlaces axiales más largos (Dalecki et al., 2017), o viceversa.

1.3.1.2. El cobre en los mamíferos.

Gran parte de la maquinaria celular de adquisición y transporte de Cu en los mamíferos es similar a la que se encuentra en la levadura. Un miembro de la familia de transportadores de cobre (*Copper Transporter*, CTr) es el principal responsable de la absorción de Cu en el epitelio intestinal de los mamíferos (CTr 1). Los metazoos no solo necesitan adquirir Cu y mediar en su distribución intracelular, sino que también deben regular el Cu en los tejidos periféricos donde impulsa procesos celulares, como la gran demanda de fosforilación oxidativa mitocondrial en el cerebro y el tejido cardíaco. En los mamíferos, el Cu transportado a través de la membrana apical en los enterocitos intestinales, es transportado a la ATPasa transportadora de cobre tipo P (ATP7A) en la membrana basolateral por la chaperona Atox1 y bombeado a la circulación portal, donde hace su camino hacia el hígado, el principal órgano de almacenamiento de Cu. El ATP7A desempeña un papel crucial en el movimiento del Cu a través de otras capas de células polarizadas, incluida la placenta y la barrera hematoencefálica, para asegurar niveles de cobre adecuados en el feto en desarrollo y satisfacer las altas demandas de desarrollo y funcionamiento del cerebro. En el hígado y otros tejidos, una ATPasa homóloga, ATP7B, es importante para cargar Cu en la ceruloplasmina, que tiene una función clave en la distribución periférica de hierro. El ATP7B también moviliza el exceso de Cu en la bilis, previniendo la sobrecarga de Cu del tejido (Festa y Thiele, 2011).

1.3.1.3. Enfermedades humanas relacionadas al cobre.

Los defectos en la homeostasis del Cu conducen a la enfermedad de Wilson donde el exceso de Cu se relaciona con mutaciones en ATP7B, que conducen a la acumulación hepática y neuronal de Cu. La enfermedad de Wilson a menudo conduce a un mal funcionamiento del hígado, defectos neurológicos que incluyen trastornos del movimiento, convulsiones y depresión que se maneja con dietas bajas en Cu, terapia de quelación o en

casos extremos con trasplante de hígado. Existe un vínculo potencial entre Cu y la enfermedad de Parkinson, ya que el Cu se asocia con la agregación acelerada de la proteína α -sinucleína en la formación de cuerpos de Lewy. De forma similar, se ha demostrado que el Cu promueve la agregación de proteínas repetitivas de poli glutamina en la enfermedad de Huntington, así como la oligomerización neurotóxica del péptido β -amiloide en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, la enfermedad de Menkes, causada por mutaciones en el gen *ATP7A*, produce una deficiencia periférica de Cu debido a una falla en la movilización del Cu dietético de los enterocitos intestinales a la circulación. Como un rasgo recesivo ligado al cromosoma X, los pacientes de Menkes son típicamente bebés varones que presentan convulsiones y defectos neurológicos profundos, termorregulación anormal, trastornos del tejido conjuntivo, disfunción de las células inmunes y otros síntomas que típicamente conducen a la mortalidad antes de los tres años de edad (Festa y Thiele, 2011).

1.3.1.4. La química del cobre.

El cobre es probablemente uno de los metales de transición cuya química de coordinación ha sido más estudiada. Dependiendo de su valencia, ligandos disponibles y entorno químico, los iones de cobre pueden participar en diferentes geometrías de coordinación. El Cu^{2+} oxidado favorece las geometrías planas cuadradas, pirámides cuadradas u octaédricas distorsionadas, mientras que el Cu^{1+} reducido tienen una flexibilidad geométrica aún mayor (Dalecki et al., 2017). Un caso que merece mención es el de la estructura del cobre en la plastocianina que posee una geometría tetraédrica fuertemente distorsionada que parece derivarse de una bien conservada secuencia de aminoácidos. Esta geometría junto a la presencia de dos ligandos duros (N) y de dos ligando blandos (S), parece generar una situación de compromiso entre los requerimientos del Cu(I) (que tiene preferencia por coordinación tetraédrica y ligandos blandos) y los de Cu(II) (que prefiere geometrías cuadrado planares u octaédricas distorsionadas, y ligandos duros). Esta situación, que es un excelente ejemplo de estado entáxico, facilita la rápida transferencia de electrones ya que no se requerirán cambios estructurales de importancia al variar el estado de oxidación del metal, como consecuencia de esta transferencia (Baran, 1995). Además de los beneficios catalíticos inherentes, se ha propuesto que la coordinación de iones de cobre (y otros iones metálicos) dentro de las proteínas podría haber servido como una fuerza motriz para la evolución estructural de las proteínas de cobre multidominio. En tal escenario, se esperaría que la coordinación de los iones de cobre superara la repulsión electrostática, el

impedimento estérico u otras fuerzas no covalentes que de otro modo evitarían las interacciones entre las proteínas monoméricas (Dalecki et al., 2017).

Los estados de oxidación del cobre varían desde 0 hasta +4, predominando el estado de oxidación +2. Aún no se ha confirmado la presencia de Cu(0) en compuestos estables, aunque podría aparecer como intermediario en algunas reacciones (Cotton y Wilkinson, 1988). El cobre es el único elemento de la primera serie del bloque d que presenta estado de oxidación +1 estable, excepto en medio acuoso. El Cu(I) o ión cuproso, presenta una configuración electrónica d^{10} de capa llena. La relevancia de los iones Cu(I) desde el punto de vista biológico se debe a que son capaces de activar reductivamente al oxígeno molecular. Sin embargo, la labilidad de la mayoría de este tipo de complejos hace que carezcan de interés para aplicaciones farmacéuticas. En el estado de oxidación +2 el ión cúprico, o Cu(II), tiene una configuración d^9 y presenta el efecto Jahn-Teller (Conry, 2005) con una ganancia en estabilidad que le confiere relevancia en el campo medicinal y para otras aplicaciones.

1.3.2. Vanadio.

El elemento debe su nombre a la diosa nórdica Vanadis, que simboliza la belleza y la fertilidad (características esenciales de la química del vanadio). Una motivación adicional para Sefström al elegir este nombre surgió del hecho de que ninguno de los elementos conocidos hasta entonces comenzaba con la letra V (Rehder, 2008). El vanadio es un bioelemento bastante singular, ya que en su estado de oxidación más elevado (V) se asemeja química y estructuralmente al fósforo, mientras que en sus estados de oxidación inferiores (esencialmente III y IV) se comporta como un metal de transición típico (Baran, 2000). A pesar que la abundancia elemental relativa del vanadio en la corteza de nuestro planeta es bastante alta (alrededor del 0.019%, no muy lejos de la de zinc), que es el segundo elemento de transición más abundante en el agua de mar, y que a principios del siglo XX ya era reconocido como un elemento biológico relevante, hasta 1980 el interés en la investigación sobre complejos de vanadio era escaso. En los años 60 y 70, los compuestos de vanadio (III) y vanadilo (la designación utilizada a menudo para oxidovanadio(IV), pero también para compuestos de oxidovanadio(V) y dioxidovanadio(V)) estaban recibiendo interés por muy pocos grupos de investigación. A principios de los 70, los efectos fisiológicos y toxicológicos del vanadio comenzaron a despertar interés. Durante los años 70, se desarrollaron estudios sobre la unión del vanadio a proteínas, principalmente mediante la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica

(EPR) permitiendo caracterizar la unión de VO^{2+} a las proteínas. En los primeros años de la década de 1980 se informaron varios estudios sobre la inhibición de enzimas por monovanadato(V); se supuso que el monovanadato(V) se unía con una geometría trigonal-bipiramidal y la primera estructura cristalina de un monovanadato unido a una fosfatasa se determinó en 1985. Hacia el final de los años 70, el interés en la química bioinorgánica del vanadio aumentó enormemente después de comprender las amplias implicaciones resultantes de las similitudes entre el ortofosfato y el ortovanadato(V), como por ejemplo la fuerte inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Unos años más tarde, el descubrimiento de las bromoperoxidasas de vanadio (VBPO) en 1984, las primeras enzimas que mostraron el uso de vanadio como cofactor, estimuló aún más la investigación sobre la química y bioquímica de vanadio, lo que llevó poco después al descubrimiento de las nitrogenasas dependientes de vanadio (V-Nasas) que contienen las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter*. Al mismo tiempo, estudios relevantes se relacionaron con la acumulación de vanadio en las células sanguíneas de algunas ascidias, así como en el hongo *Amanita muscaria*, donde se podían encontrar altas concentraciones de un complejo de vanadio(IV) notablemente estable, designado como Amavadina (Costa Pessoa, 2015).

1.3.2.1. El vanadio en la naturaleza.

El vanadio como el elemento número 23 de la tabla periódica, es un metal de transición de la primera serie de metales de transición localizado entre el titanio y el cromo. Es el 22° elemento más abundante en la corteza terrestre y supera a los metales bioactivos importantes, como Cu y Zn. Su presencia en el suelo, hace que ingrese a la cadena alimenticia a través de la asimilación en la vegetación y es un oligoelemento común en las semillas y raíces de plantas y cultivos. Esta propagación de vanadio a través de la cadena alimenticia explica los rastros de vanadio que comúnmente se encuentran en los alimentos humanos y animales (Crans y Chatterjee, 2013). La naturaleza y el contenido de vanadio en la atmósfera es una cuestión de salud pública. La liberación natural de vanadio al medio ambiente se produce por la erosión del suelo y la roca, el polvo continental, los aerosoles marinos y la actividad volcánica. El vanadio está presente en la mayoría de las arenas bituminosas y en los asfaltenos y generalmente es el metal traza más abundante en petróleo crudo y pizarras (roca de arcilla), principalmente en estado de oxidación +4. Por lo tanto, la actividad antropogénica de la combustión de los combustibles ha contribuido en mayor medida a los niveles actuales ambientales de vanadio y a la toxicidad de los compuestos de vanadio por las vías de exposición inhalatoria y oral (Costa Pessoa, 2015).

Al ser un metal del grupo 5, el vanadio tiene un rango de estados de oxidación disponibles y varios de estos están representados en su bioquímica. En un estado de oxidación bajo, los compuestos de vanadio no son estables en presencia de oxígeno y, por lo tanto, generalmente no son compatibles con los entornos de la superficie terrestre. El vanadio es abundante en la corteza terrestre generalmente en los estados de oxidación más altos. El núcleo de vanadio tiene solo dos isótopos naturales, ^{50}V y ^{51}V , de los cuales este último tiene una abundancia natural superior al 99%. En la biosfera, las formas más comunes de vanadio están en los estados de oxidación (IV) y (V). Las formas de vanadio encontradas en ambientes anaeróbicos pueden estar en el estado de oxidación III (Crans y Chatterjee, 2013).

1.3.2.2. El vanadio en los mamíferos.

La existencia de una gran cantidad de datos de experimentos en animales de laboratorio permitió entender algunos aspectos generales relacionados con la absorción, el transporte, las transformaciones biológicas, la toxicidad y la excreción de vanadio. Las vías metabólicas del vanadio proveniente de la dieta, como el dihidrógenovanadato [H_2VO_4^-] pueden resumirse de la siguiente manera. Después de la absorción oral, el vanadato alcanza el tracto gastrointestinal, donde se reduce parcialmente y se precipita a hidróxidos de oxidovanadio(IV) (VO^{2+}) que se excretan con las heces. Otra porción se absorbe y circula en la sangre, donde se somete a especiación redox y complejación por las proteínas séricas transferrina y albúmina. Los iones vanadato(V) y oxidovanadio(IV) son finalmente incorporados a las células, principalmente las del hígado, bazo y riñón. La excreción se logra a través de la orina. Parte del vanadio es absorbido por los huesos, donde el tiempo medio de retención es comparativamente largo (Baran, 2000; Rehder, 2008). Para los humanos, la mayor fuente de exposición natural son los alimentos, en los que se encuentra en baja concentración (<1 ng/g) y por contaminación debida a la inhalación del pentóxido de vanadio producido por la quema de combustibles con un alto contenido de fósiles de vanadio. Algunos de los alimentos ricos en vanadio son champiñones, mariscos, semillas de eneldo, perejil, pimienta negra, cereales y frutas frescas (García, 2006).

La contaminación ambiental por vanadio ha aumentado dramáticamente debido al uso generalizado de combustibles fósiles, muchos de los cuales liberan pentóxido de vanadio finamente particulado a la atmósfera durante la combustión. Por lo tanto, la toxicología del vanadio constituye un área de interés creciente. Se ha informado toxicidad de vanadio en animales de experimentación y en humanos. El grado de toxicidad depende de la ruta de

incorporación, la valencia y la forma química del elemento y, en cierta medida, depende de la especie. En general, aumenta a medida que aumenta la valencia, siendo el pentavalente el más tóxico. Aunque en condiciones naturales los efectos tóxicos no ocurren con frecuencia, en dosis altas o como consecuencia de la exposición crónica, es un elemento relativamente tóxico para los humanos. El tracto respiratorio superior es el objetivo principal en la exposición ocupacional. La exposición aguda y crónica da lugar a la conjuntivitis, la rinitis y las enfermedades similares al asma en los casos más graves. También puede producir fatiga, palpitaciones cardíacas, problemas gastrointestinales y daño renal. En humanos, se ha observado toxicidad aguda en mineros de vanadio y trabajadores industriales expuestos a altas dosis de vanadio. La intoxicación con metales puede tratarse mediante lo que se conoce como terapia de quelación. Este procedimiento ocupa un lugar central en la medicina y farmacología modernas ya que la amplia experiencia clínica y los estudios continuos con animales de laboratorio demuestran que las intoxicaciones agudas o crónicas con una variedad de metales pueden mejorarse considerablemente mediante la administración de un agente quelante adecuado (Williams y Baran, 2008). Sin embargo, en el caso del vanadio, algunos agentes quelantes como el glutatión reducido (GSH) (agente reductor biológico involucrado en los procesos de detoxificación de materiales exógenos) desempeña un papel central en el metabolismo del vanadio. En los eritrocitos, el vanadato se transforma rápidamente en oxidovanadio(IV) por el GSH, que puede actuar como un ligando para los cationes de VO^{2+} generados. La formación de diferentes complejos del catión de oxidovanadio(IV) con formas reducidas y oxidadas de glutatión sugiere que ambas moléculas pueden participar en la estabilización y en los primeros pasos del transporte de VO^{2+} inmediatamente después de la reducción de vanadio(V) mediada por GSH en los sistemas vivos (Baran, 2000).

1.3.2.3. La química del vanadio.

Como ya se mencionó anteriormente, el vanadio presenta diferentes estados de oxidación que van desde -1 hasta +5 siendo los estados +3, +4 y +5 los más relevantes en sistemas biológicos. Si bien el vanadio(III) es un ejemplo conocido de estos sistemas biológicos (se encuentra en los vanadocitos de la sangre de los tunicados), los estados de oxidación IV y V son los más accesibles bajo condiciones fisiológicas. El ion vanadio en estado de oxidación III es un ion metálico de configuración electrónica d^2 mientras que en estado de oxidación IV posee una configuración electrónica d^1 . Tanto el vanadio (III) como (IV) experimentan reacciones de hidrólisis y, por lo tanto, forman varias especies. Los estudios

con estos estados de oxidación en ausencia de ligandos y/o en presencia de oxígeno darán como resultado la oxidación del vanadio. El ion vanadio (IV) generalmente existe como un ion oxido, VO^{2+} y en solución acuosa como el catión pentaacuooxidovanadio(IV) (Figura 1.1A). Los precursores que contienen este grupo son comunes e incluyen VOSO_4 , $\text{VO}(\text{acac})_2$ y VOCl_2 . La química del vanadio (III) se investiga menos que la química del vanadio (IV). Sin embargo, varias especies se forman a partir de este estado de oxidación y pueden ser bastante estables incluso en presencia de oxígeno. En el estado de oxidación III el vanadio siempre carece del grupo oxido. En medio acuoso, se forma exclusivamente el complejo hexaaquovanadio(III) (Figura 1.1B) (Crans y Chatterjee, 2013).

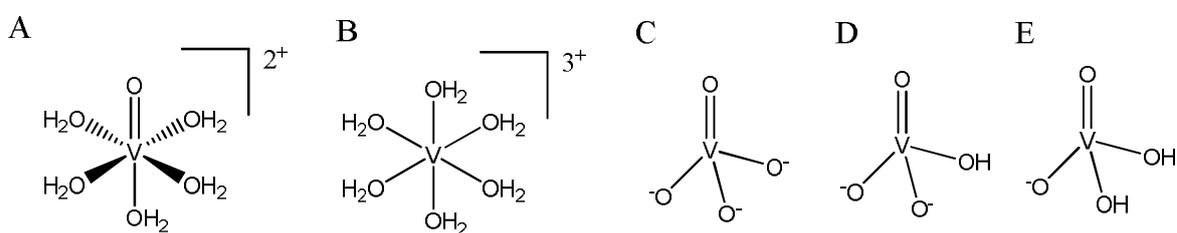


Figura 1.1. Estructuras de las principales especies de (A) oxidovanadio(IV), (B) vanadio(III) y (C, D, E) vanadio(V) en solución acuosa (Crans y Chatterjee, 2013).

La geometría de coordinación de una serie de especies de oxidovanadio(IV) oscila entre piramidal cuadrada o bipirámide de base triangular y octaédrica. La longitud de enlace $\text{V}=\text{O}$ axial está en el rango de 1.57-1.67 Å. Los ángulos de enlace $\text{O}-\text{V}-\text{O}$ se desvían del valor ideal, lo que da como resultado que el vanadio central se eleve ligeramente por encima del plano basal en la geometría piramidal cuadrada. El vanadio(IV) es estable a pH bajo, pero a pH neutro requiere la formación de complejo para evitar procesos de oxidación. La especie de oxidovanadio(IV) es versátil formando complejos estables con una amplia gama de ligandos. Los complejos formados con ligandos cuyos sitios de interacción son predominantemente basados en oxígeno, son particularmente estables y también son frecuentes aquellos cuyos ligandos presentan nitrógenos en su esfera de coordinación. Los complejos formados con ligandos donantes basados en S son menos comunes, pero juegan un papel importante en la bioquímica de vanadio. En el estado de oxidación (V), el vanadio es un ion metálico de configuración electrónica d^0 y, como tal, tiene una química acuosa compleja. En este estado de oxidación, el ion metálico existente tanto en formas catiónicas como aniónicas y forma una amplia gama de complejos. La química de coordinación del vanadio (V) se comprende muy bien, porque la naturaleza

diamagnética de este ion metálico y su gran abundancia natural y momento cuadrupolar lo convierten en un núcleo activo para la resonancia magnética nuclear (RMN). En la naturaleza, el vanadio(V) existe en múltiples formas de oxidovanadatos (Figuras 1.1C, 1.1D y 1.1E) en una variedad de minerales. Esta química de oxidovanadato(V) se evita cuando el vanadio está unido firmemente con una proteína formando un complejo, tal como se observa cuando el vanadio actúa como cofactor en las haloperoxidasas presentes en algas, líquenes y hongos (Crans y Chatterjee, 2013).

1.4. Ligandos (flavonoides y 5-Hidroxitriptófano).

1.4.1. Flavonoides.

Los flavonoides constituyen un grupo grande de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas. El creciente interés en la investigación de los flavonoides se debe a sus diversos beneficios para la salud reportados en varios estudios epidemiológicos (Kumar y Pandey, 2013). Son componentes importantes de la dieta humana y las principales fuentes son los vegetales, como frutas, semillas, nueces, hierbas aromáticas, cebollas y legumbres. Además, diferentes bebidas, como el vino, el té y la cerveza, contienen cantidades apreciables de flavonoides (Kumar y Pandey, 2013; Sanna et al., 2014). Éstos compuestos son antioxidantes multifuncionales polifenólicos naturales capaces de eliminar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno mediante diferentes mecanismos, como ser la eliminación de radicales libres, la quelación de iones metálicos, la inhibición de enzimas prooxidantes y la activación de enzimas antioxidantes. Son reconocidos como posibles fármacos candidatos para ser utilizados en el tratamiento y la prevención de una gran cantidad de trastornos patológicos (Amić y Lučić, 2010; Sanna et al., 2014). Sus propiedades benéficas se atribuyen a su actividad antioxidante que depende del número y la posición de los sustituyentes hidroxilo en sus estructuras. Sin embargo, la gran variedad de actividades biológicas de los flavonoides no se limita a sus propiedades antioxidantes (Kasprzak et al., 2015). Los flavonoides constituyen el grupo más importante de compuestos polifenólicos con más de 6000 especies que se pueden dividir en 13 clases. La estructura principal está compuesta por el núcleo flavan (2-fenil-1-benzopirán-4-ona) que contiene 15 átomos de carbono dispuestos en 3 anillos llamados A, B y C (Figura 1.2), donde el puente con 3 átomos de carbono generalmente se cicla con oxígeno (Sanna et al., 2014). Según el grado de oxidación del anillo C, el patrón de hidroxilación y el sustituyente en C3, los flavonoides pueden clasificarse en siete subclases: flavonas,

flavonoles, flavanonas (Kasprzak et al., 2015), flavanoles (catequinas), flavanonoles (Selvaraj et al., 2013), isoflavonas y antocianidinas (aglicón de las antocianinas) (Uivarosi y Munteanu, 2017). Los compuestos agrupados en cada subclase difieren tanto en el número y disposición de los grupos fenólicos en los anillos A y B, como en el grado de alquilación y/o glicosilación de estos grupos (Tabla 1.1). La glucosa es el residuo de azúcar más común, pero también es posible encontrar galactosa, ramnosa y xilosa (Sanna et al., 2014).

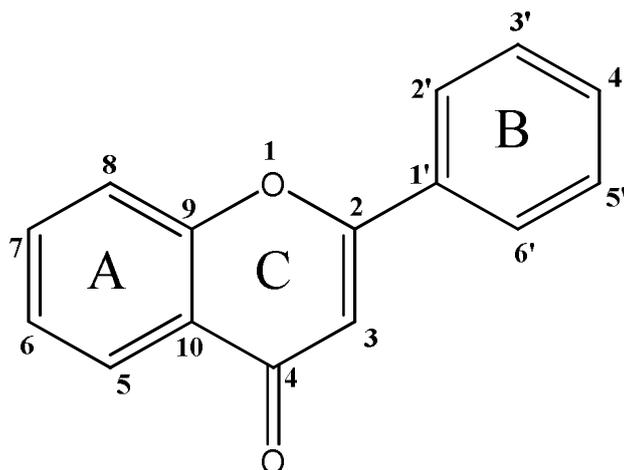


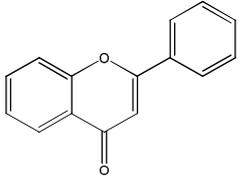
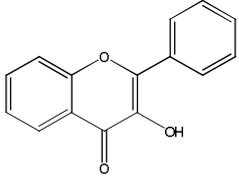
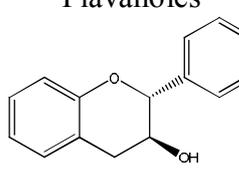
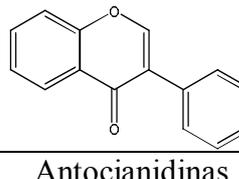
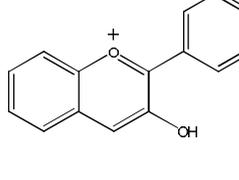
Figura 1.2. Estructura del núcleo flavan (2-fenil-1-benzopiran-4-ona).

Tabla 1.1. Estructura química de algunos flavonoides. Para la numeración ver Figura 1.2.

<p>Flavanonas</p>	Naringenina	5,7,4'-trihidroxi-flavanona
	Naringina	naringenina-7-neohesperidósido
	Liquiritigenina	7,4'-dihidroxi-flavanona
	Hesperetina	5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona
	Hesperidina	hesperetina-7-rutinósido
	Eriodictiol	5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavanona
	Homoeriodictiol	5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-flavanona
	Pinostrobina	5-hidroxi-7-metoxi-flavanona
	Pinocembrina	5,7-dihidroxi-flavanona
<p>Flavanonoles</p>	Silibinina	3,5,7-trihidroxi-2-[3-(S)-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(S)-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il]croman-4-ona
	Taxifolina	3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavanona
	Pinobanksina	3,5,7-trihidroxi-flavanona

(continúa en la siguiente página)

Tabla 1.1. (Continuación)

<p>Flavonas</p> 	Crisina	5,7-dihydroxiflavona
	Baicaleína	5,6,7-trihydroxiflavona
	Baicalina	baicaleína-7-glucósido
	Luteolina	5,7,3',4'-tetrahydroxiflavona
	Apigenina	5,7,4'-trihydroxiflavona
	Scutellareína	5,6,7,4'-tetrahydroxiflavona
	Wogonina	5,7-dihidroxi-8-metoxiflavona
	Tangeritina	5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona
	Diosmetina	5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona
	Diosmina	diosmetina-7-rutinósido
	<p>Flavonoles</p> 	Flavonol
Galangina		3,5,7-trihydroxiflavona
Kampferol		3,5,7,4'-tetrahydroxiflavona
Morina		3,5,7,2',4'-pentahydroxiflavona
Miricetina		3,5,7,3',4',5'-hexahydroxiflavona
Quercetina		3,5,7,3',4'-pentahydroxiflavona
Fisetina		3,7,3',4'-tetrahydroxiflavona
Azaleatina		3,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona
Rutina		quercetina-3-rutinósido
Ramnetina		3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona
<p>Flavanoles</p> 		Catequina
	Epicatequina	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -chromene-3,5,7-triol
	Epicatequina-3-galato	[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -chromen-3-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato
	Epigalocatequina-3-galato	[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -chromen-3-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato
<p>Isoflavonas</p> 	Daidzeína	7,4'-dihidroxiisoflavona
	Daidzina	daidzeína-7-glucósido
	Genisteína	5,7,4'-trihidroxiisoflavona
	Genistina	genisteína-7-glucósido
<p>Antocianidinas</p> 	Pelargonidina	3,5,7,4'-tetrahydroxiflavilio
	Apigenidina	3-desoxi-pelargonidina
	Cianidina	3,5,7,3',4'-pentahydroxiflavilio
	Delfinidina	3,5,7,3',4',5'-hexahydroxiflavilio
	Malvidina	3,5,7,4'-tetrahidroxi-3',5'-dimetoxi-flavilio
	Antocianinas	cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido y malvidina-3-glucósido.

*Tabla construida con datos extraídos de los reportes de Kasprzak et al. (2015), Selvaraj et al. (2013), Uivarosi y Munteanu (2017) y Heim et al. (2002).

Debido a la presencia de grupos oxo e hidroxilo (y donantes de nitrógeno en algunos compuestos sintéticos), muchos flavonoides pueden coordinar y formar complejos quelatos con varios iones metálicos (Figura 1.3). Sin embargo, las reacciones entre los flavonoides y los iones metálicos no siempre se limitan a la formación de enlaces de coordinación simples. Dependiendo del ion metálico, pueden ocurrir reacciones redox entre los iones metálicos y los ligandos, ya que la mayoría de los flavonoides tienen una buena capacidad de reducción. Esto es particularmente relevante para iones metálicos con propiedades oxidantes (Fe^{III} , Ru^{IV} , Ru^{III} , Au^{III} , Os^{VIII}).

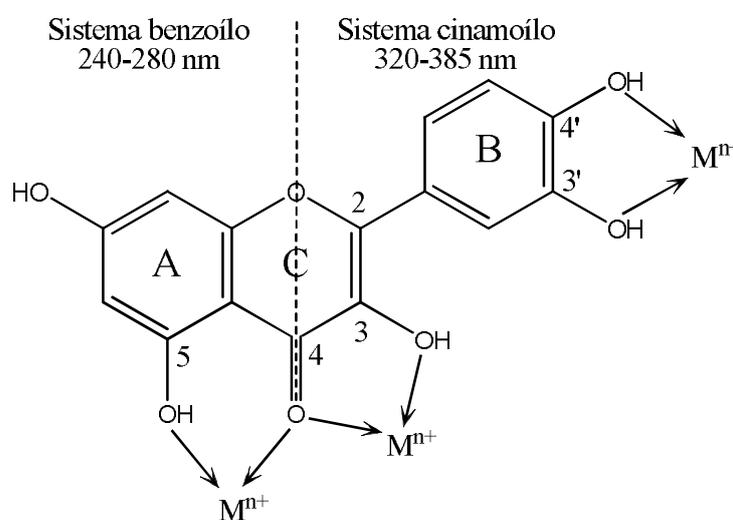


Figura 1.3. Posibles sitios quelantes de la quercetina. Los flavonoides pueden coordinar los iones metálicos en su forma neutra (como se muestra) o aniónica. La línea punteada delimita los dos segmentos estructurales de la quercetina responsables de las bandas principales en su espectro de absorción electrónica (Kasprzak et al., 2015).

Como los flavonoides son compuestos coloreados, tienen bandas de absorción específicas en la región UV-Vis y pueden analizarse mediante métodos espectrofotométricos. Los espectros UV-Vis de la mayoría de los flavonoides (especialmente flavonoles, debido a la presencia del resto 3-OH) muestran dos bandas de absorción principales: la banda del sistema benzoilo (banda II) en el rango de 240-280 nm y la banda del sistema cinamoilo (banda I) en el rango de 320-385 nm (Figura 1.3). Las bandas pueden atribuirse a brechas de energía HOMO-LUMO, y la banda I tiene carácter $\pi \rightarrow \pi^*$. Después de coordinar los iones metálicos, los espectros UV de los flavonoides cambian, mostrando un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo). Algunos autores sugieren que el cambio

batocrómico es causado por una fuerte transferencia de carga desde el flavonoide al centro metálico, mientras que otros atribuyen el cambio a una disminución en la brecha HOMO-LUMO en la molécula de flavonoides, en lugar de la transferencia de carga (Kasprzak et al., 2015).

Como puede observarse en la Figura 1.3, los flavonoides presentan más de un posible sitio de quelación para los iones metálicos. Por ejemplo, la coordinación del metal con la quercetina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona, puede ocurrir a través de los grupos 3-hidroxilo y 4-carbonilo del anillo C (designado como sitio 3-4), a través de los grupos 4-carbonilo del anillo C y 5-hidroxilo del anillo A (sitio 4-5), o a través de los grupos hidroxilo del anillo B (sitio 3'-4') (Kasprzak et al., 2015). En el caso de glucósidos flavonoides que contienen restos de hidratos de carbono tales como glucósido, ramnósido y rutinósido, los grupos hidroxilo adicionales presentes en el resto de azúcar también pueden contribuir a la formación de enlaces con el ion metálico. Aunque los flavonoides poseen un número diferente de sitios de unión a metales, comúnmente los complejos de iones metálicos se forman preferentemente entre el grupo ceto en la cuarta posición en el anillo C y el grupo fenólico en la quinta posición en el anillo A, lo que puede deberse a la proximidad de los grupos donantes de electrones (Selvaraj et al., 2013). No obstante, el sitio de unión preferido depende no solo del flavonoide, sino también del ion metálico y del valor del pH, que además es relevante para las propiedades *in vivo* (debido a condiciones fuertemente ácidas en el estómago frente a pH sanguíneo, pH ácido en lisosomas, acidosis patológica en tumores y tejido inflamado, a modo de ejemplos). Los flavonoides como polifenoles son ácidos débiles que sufren desprotonación que afecta fuertemente la coordinación de los iones metálicos. Se ha publicado un gran número de estudios experimentales y teóricos sobre las propiedades de coordinación de los flavonoides y, a menudo, se han obtenido resultados aparentemente contradictorios con respecto al sitio de unión y la estequiometría o relación metal/ligando, debido a la variación en las condiciones experimentales en los diferentes estudios. Además de los complejos con relación metal/ligando 1:1, 1:2 y 2:1, en principio son posibles otras estequiometrías, incluyendo 1:3, 2:2, 2:3 y 3:1. Sin embargo, por razones estéricas, los complejos con más de dos ligandos flavonoides generalmente están restringidos a iones de metales de tierras raras. Por otra parte, la unión simultánea de dos iones metálicos al sitio 3-4 y 4-5 es desfavorable debido a la repulsión estérica (Kasprzak et al., 2015). Los ligandos flavonoides pueden unirse a un ion metálico usando diferentes conjuntos de donantes, como ser: a) CO y O⁻, denominada coordinación tipo “maltol” o “acetilacetona”

dependiendo de la formación de un anillo de cinco o seis miembros, respectivamente; b) O^- y O^- , llamada coordinación tipo “catecol” (Sanna et al., 2014). Esta denominación se debe a la similitud de cada tipo de coordinación con dichas moléculas (Figura 1.4).

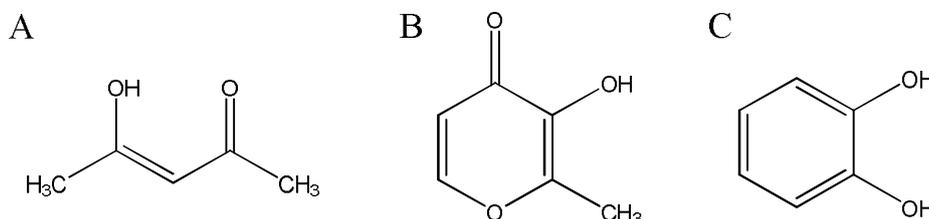


Figura 1.4. Estructuras químicas de la (A) acetilacetona, (B) maltol y (C) catecol.

Sanna et al. (2014) sostiene que es posible la formación de geometrías pentacoordinadas (Figura 1.5A), *cis*-octaédricas (Figura 1.5B) y *trans*-octaédricas (Figura 1.5C). Estos autores, al comparar los resultados obtenidos en los sistemas VO/crisina (coordinación tipo acetilacetona) y VO/3-hidroxiﬂavona (coordinación tipo maltol), afirman que con el conjunto de donantes (CO, O^-) se forman especies *cis*-octaédricas cuando los anillos de quelatos son de cinco miembros (como con 3-hidroxiﬂavona), mientras que las estructuras pentacoordinadas se prefieren cuando los anillos de quelatos son de seis miembros (como con crisina). En el sistema VO/7,8-dihidroxiﬂavona cuyo ligando tiene los grupos fenólicos adyacentes, puede formar complejos con coordinación tipo catecol, mientras que la coordinación del oxígeno de carbonilo monodentado puede ser descartada. En el sistema VO/baicaleína como el ligando además de tener tres grupos fenólicos adyacentes en los carbonos 5, 6 y 7, que pueden dar una coordinación tipo catecol (O^- , O^-) similar al ejemplo anterior, también puede formar anillos de quelatos de seis miembros (CO, O^-) o coordinación tipo acetilacetona usando el grupo fenólico en la posición 5 y el grupo carbonilo en la posición 4, de manera similar a la crisina. Las especies con coordinación tipo catecol tienen una mayor estabilidad termodinámica que aquellas con coordinación tipo acetilacetona, pero la pérdida de dos protones es necesaria para su formación. Dado que para la coordinación (CO, O^-) la desprotonación de un solo grupo fenólico es suficiente, podemos esperar que a un pH más ácido se prefiera la coordinación tipo acetilacetona, mientras que a valores de pH más altos predomine la coordinación tipo catecol. Crisina y morina forman especies pentacoordinadas con coordinación (CO, O^-) tipo acetilacetona. Este comportamiento también se espera para otros complejos VO/ﬂavonoides, como los de apigenina, galangina, isoramnetina y kampfèrol. Con morina,

puede ocurrir la formación de complejos con geometría *cis*-octaédrica y coordinación tipo maltol (análoga a los formados por 3-hidroxi-flavona) o estructura pentacoordinada y coordinación similar a acetilacetona (similar a los formados por crisina). Además, también es posible la formación de complejos con coordinación mixta, es decir, con un anillo quelato de cinco miembros más un anillo quelato de seis miembros. La coordinación o-bifenólica, posible en principio después de la coordinación de los grupos OH en las posiciones 3 (anillo C) y 2' (anillo B), tiene baja estabilidad debido a la formación de un anillo quelante de siete miembros.

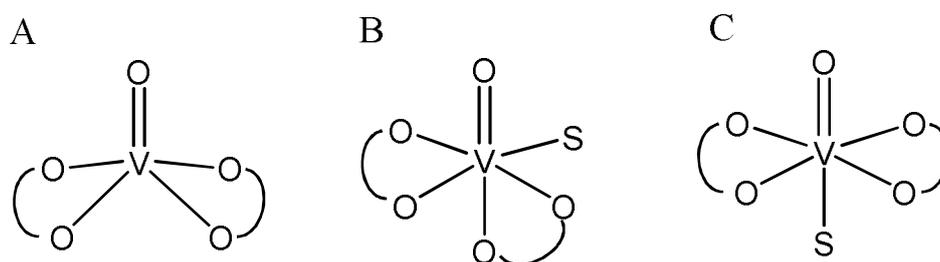
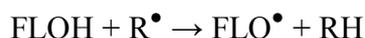


Figura 1.5. Posibles estructuras para una especie de oxidovanadio(IV) bis quelada formada por un ligando flavonoide bidentado (O,O): (A) pentacoordinado, (B) *cis*-octaédrico y (C) *trans*-octaédrico. S representa una molécula de disolvente (Sanna et al., 2014).

Se ha informado que los flavonoides poseen diversos efectos biológicos: anticancerígenos, antivirales, antiinflamatorios, inmunoestimulantes, antialérgicos y que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Uivarosi y Munteanu (2017) sostienen que muchos de estos efectos beneficiosos para la salud, incluida la actividad contra el cáncer, surgen de las propiedades antioxidantes de estos compuestos polifenólicos, y proponen los siguientes mecanismos:

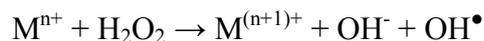
(1) Eliminación directa de radicales: las moléculas de flavonoides se oxidan por radicales libres (R^\bullet) dando como resultado radicales más estables, menos reactivos:



donde R^\bullet hace referencia a las EROs (hidroxilo (OH^\bullet), superóxido (O_2^\bullet), peróxido (ROO^\bullet)), o a las ERNs (óxido nítrico (NO^\bullet), peroxinitrito (ONOOH)) y las siglas FLOH simbolizan al flavonoide protonado.

(2) Quelación de iones metálicos: la propiedad de los flavonoides para formar quelatos se puede considerar desde dos puntos de vista:

- a- Los flavonoides se unen a iones metálicos como Fe(II), Fe(III) y Cu(II), evitando la generación de radicales libres en las reacciones de Fenton:



- b- Los flavonoides forman complejos metálicos que son antioxidantes generalmente más potentes que los ligandos libres.

(3) Inhibición de diversas enzimas que son responsables de la formación de EROs/ERNs (xantina oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa).

(4) Regulación positiva de sistemas enzimáticos y no enzimáticos implicados en los procesos de eliminación y desintoxicación de especies oxidantes, tales como glutatión reducido (GSH), peroxidasa de GSH, superóxido dismutasa, etc.

(5) Regeneración de las especies antioxidantes tales como ascorbato y α -tocoferol por reacciones de transferencia de electrones.

Muchos estudios han correlacionado la actividad antioxidante de los flavonoides con las siguientes características estructurales: la sustitución orto-dihidroxi en el anillo B; la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y de una función 4-oxo; y una conformación de 3-hidroxi-4-ceto y/o 5-hidroxi-4-ceto (Figura 1.3).

1.4.1.1. Baicalina.

La medicina herbaria se ha practicado en China y otros países durante siglos. Baicalina (Baic) y baicaleína son dos de los compuestos bioactivos principales que se encuentran en la hierba medicinal tradicional Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *S. baicalensis* es conocida como "Huang qin" en China y "Ogon" en Japón y ha sido administrada rutinariamente en el tratamiento de diferentes enfermedades. Esta planta se ha utilizado durante siglos en la medicina tradicional asiática y se vende cada vez más en los Estados Unidos y en toda Europa (Perez et al., 2009). Se cultiva en Polonia y el extracto de sus raíces se emplea en la industria farmacéutica y alimentaria europea. Además del aislamiento de flavonoides de tipo glucurónido (como baicalina y wogonósido), también se aislaron a partir de los cultivos de raíces transformadas, flavonoides que poseen grupos metoxilo y/o hidroxilo en diferentes posiciones de los anillos aromáticos (Wolniak et al., 2008).

La Baicalina (ácido 7-glucurónico-5,6-dihidroxi-flavona, Baic) es uno de los principales constituyentes activos aislado a partir de las raíces secas de *S. baicalensis* y su forma aglicona se llama baicaleína (Figura 1.6) (Zhao et al., 2013). Baic es considerada como el compuesto marcador para el control de calidad de más de 100 preparaciones codificadas en

La absorción de Baic es moderada en el estómago y pobre en el intestino delgado y colon. Por el contrario, la baicaleína se absorbe bien en el tracto gastrointestinal (Zhao et al., 2013). Después de la administración oral, Baic se convierte en baicaleína por la β -glucuronidasa de bacterias intestinales y luego se absorbe y se transporta al hígado. En los microsomas hepáticos, la baicaleína se transforma en otros metabolitos mediante la enzima uridina 5'-difosfato (UDP) glucuronosiltransferasa. Estos metabolitos son 7-O-glucurónido-6-metoxi-5-hidroxi-flavona, 6-O-glucurónido-5,7-dihidroxi-flavona y principalmente 7-O-glucurónido-5,6-dihidroxi-flavona (Baic) (Dou et al., 2011).

1.4.1.2. Apigenina.

La Apigenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona, Api) es un flavonoide perteneciente a la clase estructural de flavonas (Figura 1.7), presente en abundancia en frutas y verduras como naranjas, pomelo, apio, perejil, cebollas, manzanilla y brotes de trigo. Una de las fuentes más comunes de Api que se consume como té de hierbas de ingrediente único es la manzanilla, preparada a partir de las flores secas de *Matricaria chamomilla*. Esta es una planta herbácea anual, originaria de Europa y Asia Occidental que se ha naturalizado en Australia, Gran Bretaña y los Estados Unidos. La planta se cultiva en Alemania, Hungría, Rusia y otros países del sur y este de Europa para cosechar las cabezas de flores. Las infusiones de manzanilla contienen concentraciones máximas de Api que varían entre 0.8-1.2% y aceites esenciales que tienen propiedades aromáticas, aromatizantes y colorantes. Otras fuentes de Api incluyen bebidas como el vino tinto y la cerveza elaborada a partir de ingredientes naturales. En la naturaleza, la apigenina también existe como dímero, biapigenina, principalmente aislada de los brotes y flores de *Hypericum perforatum*, que tiene efectos neuroprotectores (Shukla y Gupta, 2010).

Este flavonoide se encuentra estructuralmente relacionado con la crisina y luteolina, las que se diferencian únicamente por el grado de sustitución del anillo B. La crisina no tiene sustituyentes en el anillo B, mientras que la apigenina tiene un grupo OH en la posición 4' y la luteolina tiene dos grupos OH en las posiciones 3' y 4' del anillo B. Apigenina y luteolina fueron identificadas como los principales componentes naturales de un colorante ampliamente utilizado conocido como *weld*. El mismo se origina en las hojas y el tallo de *Reseda luteola* L y fue el colorante más utilizado en Europa antes del descubrimiento de América (Corredor et al., 2009). El *weld* adquiere un peculiar color amarillo cuando se compleja con mordiente metálico y, utilizada desde el comienzo de la Era Cristiana para

fijar el color en seda y lana, es el tinte natural más antiguo conocido en Europa (Amat et al., 2008). Por lo tanto, estos dos flavonoides son muy abundantes en los colorantes textiles de diversas muestras y se conocen sus espectros HPLC, GCMS, IR, Raman, etc. Como su estructura difiere en un solo grupo hidroxilo exhiben propiedades estructurales similares (Corredor et al., 2009).

Además de la importancia histórica de Api en el campo textil, su utilización en el campo de la medicina herbolaria ha llevado a numerosas investigaciones para caracterizar sus propiedades biológicas. En la literatura existen reportes de actividad antimicrobiana de Api extraído de plantas y musgos (Akroum et al., 2009; Basile et al., 1999). Las propiedades antioxidantes de Api fueron estudiadas anteriormente (Majewska et al., 2011; Si et al., 2011; Van Norren et al., 2006; Yi et al., 2013) y podrían considerarse pobres en comparación con la actividad de luteolina. La baja actividad antioxidante de Api está relacionada con su estructura química. La presencia de un solo grupo hidroxilo en el anillo B y la ausencia del grupo OH en la posición 3 afectan la capacidad antioxidante de este flavonoide. Además, se ha informado que Api es un potente inhibidor del crecimiento celular e inductor de la apoptosis en diversas células cancerosas humanas (Shukla y Gupta, 2010) y se han propuesto varias vías de inhibición de la proliferación (Li et al., 2009; Zhao et al., 2011). Además, existen pruebas de que Api puede inducir la apoptosis por generación de EROs en diferentes líneas celulares de cáncer (Das et al., 2012; Harrison et al., 2014; Lee et al., 2008; Lu et al., 2010; Valdameri et al., 2011).

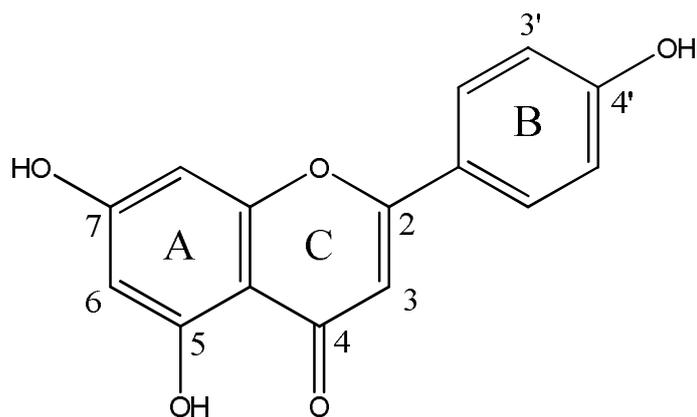


Figura 1.7. Estructura química de la Apigenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona, Api).

1.4.2. 5-Hidroxitriptófano.

El aminoácido 5-Hidroxitriptófano (ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) propanoico, 5-HTP) es un metabolito del L-triptófano en la ruta de la serotonina (Figura 1.8). En el cerebro, controla la concentración de serotonina y, por lo tanto, juega un papel importante en dicha vía. Los niveles de serotonina se elevan por la administración oral de 5-HTP, lo que produce efectos terapéuticos en el caso de diversos síntomas, como depresión, dolor de cabeza crónico e insomnio. Además, el aminoácido aromático de origen natural 5-HTP presente en las semillas de la planta africana *Griffonia simplicifolia* fue descrito como un agente antioxidante (Hara y Kino, 2013). El estrés oxidativo es causado por la reacción de especies de oxígeno químicamente agresivas con biomoléculas y contribuye al desarrollo de algunas enfermedades. En las plantas, los compuestos fenólicos y los carotenoides constituyen los principales antioxidantes protectores de los tejidos. Mucho menos se sabe sobre los antioxidantes de los animales. La esponja que crece en la región intermareal *Hymeniacidon heliophila* que sobrevive bajo la luz solar intensa contiene el antioxidante 5-HTP como componente principal. Otros agentes antioxidantes conocidos tales como flavonoides, carotenoides o derivados de tocoferol están ausentes. Tanto el potencial de oxidación como la concentración de 5-HTP en *H. heliophila* corresponden a los valores observados para los flavonoides que son los principales agentes antioxidantes en las plantas (Lysek et al., 2003).

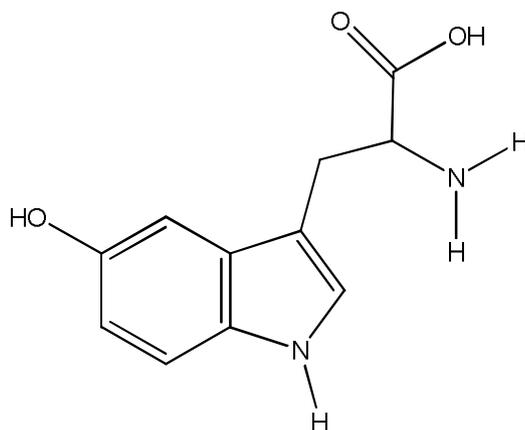


Figura 1.8. Estructura química del 5-Hidroxitriptófano (ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) propanoico, 5-HTP).

1.5. Efectos de la complejación en las propiedades biológicas de los ligandos.

La complejación es una estrategia útil en el diseño de fármacos permitiendo modificar ciertas características de los ligandos libres. Los complejos metálicos exhiben, en algunos casos, propiedades farmacológicas superiores tales como actividades antioxidantes,

antimicrobianas, anticancerígenas y antidiabéticas, brindándoles un enorme potencial terapéutico. Por otra parte, la complejación puede mejorar el perfil toxicológico de algunos ligandos y su estabilidad química tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo uno de los principales desafíos es sortear el obstáculo de la disminución de la solubilidad que acarrea la complejación. En este sentido hay grupos de investigación trabajando en formulaciones farmacéuticas con el objeto de mejorar la solubilidad en agua y controlar la liberación de complejos metálicos, empleando las conocidas ciclodextrinas y desarrollando nuevos micro y nanovehículos (liposomas) (Uivarosi y Munteanu, 2017).

Como ya se mencionó, los flavonoides son sustancias polifenólicas con muy buenas propiedades donadoras de electrones. La capacidad de quelación de metales es una característica clave de los flavonoides y ejerce una gran influencia sobre la naturaleza y la magnitud de las actividades farmacológicas de los mismos. La formación de complejos de iones metálicos con flavonoides da una orientación espacial específica que puede ser responsable de la actividad farmacológica de los mismos. Por lo tanto, estos complejos pueden exhibir características similares a sus flavonoides parentales y también exhiben características novedosas (debido a sus características estructurales únicas). En los últimos años, se han dirigido esfuerzos concertados para sintetizar y caracterizar nuevos complejos de flavonoides con iones metálicos debido a sus posibles aplicaciones en diversos campos (Selvaraj et al., 2013; Uivarosi y Munteanu, 2017).

En esos trabajos, los autores han revisado exhaustivamente la literatura y realizado un resumen de los diferentes complejos de iones metálicos con flavonoides (flavanonas, flavonas y flavonoles) que se han sintetizado con éxito en los últimos años. A continuación se describen algunos datos relevantes de estos reportes. Los complejos metálicos derivados de flavonoides han sido sintetizados con el objeto de potenciar las propiedades antioxidantes del ligando. En la mayoría de los casos se ha logrado el objetivo buscado y la potenciación de la actividad se explica sobre la base de la adquisición de un centro metálico adicional para la eliminación de radicales probablemente con actividad SOD similar. En algunos casos la actividad es menor puesto que la coordinación afecta las propiedades químicas del flavonoide principalmente cuando involucra grupos funcionales que sean necesarios para el efecto antioxidante. Respecto de las propiedades antitumorales, en muchos casos el complejo muestra una actividad citotóxica mejorada y este hecho se explica por la regulación en ciertos eventos importantes del ciclo celular, alteraciones en la estructura del ADN, efectos pro-oxidantes, o interacciones con la bicapa fosfolipídica. Los complejos metálicos de flavonoides mostraron actividad frente a diferentes líneas

celulares, entre las que se puede mencionar las líneas de cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma cervical, leucemia, adenocarcinoma de colon y osteoblastoma. Una característica muy importante y prometedora que muestran estos complejos es que algunos de ellos han demostrado ser selectivos hacia las células cancerosas en comparación con células normales (Uivarosi y Munteanu, 2017). La mayoría de los complejos metálicos de flavanonas exhiben afinidad hacia el ADN, pudiendo interactuar con el mismo ya sea uniéndose a los surcos mayores o menores o por intercalación. El sitio de unión de estos complejos con el ADN tendrá una implicación importante en su perfil de citotoxicidad dependiendo de si estabilizan la estructura de doble hélice del ADN o interrumpen dicha estructura. Para ejemplificar, la mayoría de los complejos metálicos de luteolina han exhibido propiedades antiinflamatorias, que pueden ser una manifestación directa de su efecto de eliminación de radicales libres. Los complejos de quercetina han sido los más ampliamente investigados, seguidos por los de morina. Otra ventaja interesante resulta ser para el tratamiento de la diabetes donde se han demostrado propiedades insulinomiméticas de varios complejos de oxidovanadio(IV) con flavonoles. Esta área podría abrir oportunidades interesantes para una clase completamente única de agentes hipoglucemiantes (Selvaraj et al., 2013). Se sabe que algunos compuestos de vanadio actúan como agentes insulinomiméticos, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, pero también tienen una toxicidad significativa. En particular, el complejo VO/kampferol-3-neohesperidósido mostró propiedades antidiabéticas en modelos animales con diabetes inducida por aloxano. Los complejos de quercetina, además de potenciar la actividad reductora de la glucemia propia del vanadio, también atenuaron su toxicidad al disminuir el estrés oxidativo en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (Kasprzak et al., 2015). Asimismo, en nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que los complejos con VO/flavonoides mostraron mejoras en la actividad antitumoral de los flavonoides trabajando con diversas líneas celulares de cáncer, de hueso, mama y pulmón entre otras (Ferrer et al., 2006; Islas et al., 2015; Naso et al., 2016a, 2016b, 2013, 2010). Es de destacar que en las líneas tumorales se observa un efecto pro-oxidante del ligando y del complejo y que esa es la principal causa del efecto deletéreo de los compuestos sobre las células. Mientras las células no-transformadas tienen bajos niveles basales de EROs intracelulares con capacidad antioxidante alta, las células de cáncer tienen mayores niveles de EROs y éstos son responsables del mantenimiento del fenotipo canceroso. Los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes pro-oxidantes a través de auto-oxidación formando semiquinona y el radical superóxido. Estos radicales son muy

reactivos y pueden dañar moléculas esenciales tales como proteínas o ADN, siendo uno de los mecanismos del efecto antitumoral encontrado para los flavonoides y sus complejos.

Por otro lado, numerosos complejos de coordinación de cobre con ligandos de interés biológico demostraron mejorar las propiedades antioxidantes de sus ligandos de origen (Williams, 2014). El cobre(II) forma complejos estables con aminoácidos mediante quelación. A veces, el cobre y los aminoácidos forman oxocomplejos, que también tienen cobre(III). Con dipéptidos y tripéptidos, los complejos de cobre(III) de color púrpura son estabilizados por los ligandos de amida desprotonados. Los aminoácidos que tienen los grupos amina y ácido carboxílico unidos al primer átomo de carbono, o alfa, tienen particular importancia bioquímica. Se los conocen como 2-aminoácidos o α -aminoácidos (fórmula genérica $H_2NCHR\text{COOH}$ en la mayoría de los casos donde R es un sustituyente orgánico conocido como "cadena lateral"). Se han sintetizado y caracterizado un gran número de complejos de cobre(II) con aminoácidos como glicina, alanina, arginina, triptófano, histidina, leucina, aspartato, fenilalanina, valina, tirosina, glutamina, metionina, isoleucina, treonina, serina y prolina (Hakimi y Aliabadi, 2012).

Se sabe que algunos complejos metálicos exhiben propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas y que las eficacias de los agentes terapéuticos se incrementan por coordinación. En la literatura, existen numerosas series de complejos de Cu, Zn, Ag, Co, entre otros, con propiedades antimicrobianas mayores que la de los ligandos libres, lo que ha resultado un campo atractivo de investigación (Chohan et al., 2010; El-Gamel et al., 2011; Joseph et al., 2012; Zhang et al., 2011). En trabajos anteriores hemos demostrado que el cobre tiene actividad antimicrobiana por sí mismo y que la coordinación del catión Cu^{2+} con ligandos orgánicos puede potenciar dicha actividad. Esta potenciación puede explicarse sobre la base de la "Teoría de quelación de Tweedy" que propone una reducción de la polaridad del átomo metálico debido a la distribución parcial de su carga positiva con el ligando y un aumento de la deslocalización de electrones π sobre el anillo de quelato aumentando la lipofilia de los complejos y el "concepto de Overtone" que propone una disminución de la densidad electrónica del ligando por un proceso de transferencia de carga de ligando a metal otorgando al complejo más liposolubilidad y por ende mayor permeabilidad celular (Martínez Medina et al., 2014; Urquiza et al., 2016). Varios complejos de cobre han sido efectivos como agentes antibacterianos independientemente de la disposición geométrica. Por ejemplo, monómero octaédrico (Cu(II)N_6), dímeros pentacoordinados ($\text{Cu(II)O}_4\text{N}$, $\text{Cu(II)N}_2\text{O}_3$) y geometría cuadrada plana ($\text{Cu(II)N}_2\text{O}_2$) entre otros. Nuestro grupo de investigación ha sintetizado una serie de compuestos de cobre con

drogas antitiroideas típicas. El complejo de cobre con propiltiouracilo $[\text{Cu}(\text{PTU})_2]_2$ mostró mejores propiedades antibacterianas que los complejos de cobre con metimazol ($[\text{Cu}(\text{Met})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\text{Met})_2(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$). En general, hay algunos complejos de cobre(II) con modos de coordinación similares o relacionados que se probaron como agentes antibacterianos y que muestran una mejora general de dicha actividad respecto del ligando de origen. Algunos de ellos son complejos con geometrías planas cuadradas con entorno $\text{Cu}(\text{II})\text{N}_2\text{S}_2$, complejos bimetalicos, complejos con un conjunto de donantes $\text{Cu}(\text{II})\text{NSCl}_2$, y complejos con simetrías piramidales ($\text{Cu}(\text{II})\text{N}_2\text{S}_2\text{Cl}$) y octaédricas ($\text{Cu}(\text{II})\text{N}_2\text{S}_2\text{X}_2$, X= halógeno) (Urquiza et al., 2016). Por lo expuesto anteriormente, se realizaron determinaciones antimicrobianas para caracterizar el perfil antibacteriano y antifúngico de los complejos sintetizados. La caracterización implicó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) que nos muestra la cantidad de agente necesario para inhibir el crecimiento del microorganismo y posteriormente la determinación del efecto postantibiótico (PAE) para aquellas sustancias que muestren una CIM relevante. El PAE es la fase de latencia o período de recuperación del crecimiento bacteriano después de una breve exposición a un antibiótico. Este parámetro farmacodinámico es importante en el diseño de regímenes de dosificación de antibióticos (Pankuch et al., 2003; Rescott et al., 1988). La determinación del PAE se recomienda en la evaluación preclínica de todos los agentes antimicrobianos nuevos porque es un factor que permite un óptimo establecimiento de los intervalos de dosificación del agente antimicrobiano (Stubbings et al., 2004).

Muy pocos informes también han sugerido que algunos complejos causan efectos nocivos en los sistemas biológicos. Es posible que tales efectos puedan surgir debido a la liberación de iones metálicos como resultado de la disociación del complejo. También es posible que los efectos adversos puedan ser la consecuencia de los blancos intracelulares de los complejos. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado esfuerzos para descifrar los motivos de los efectos adversos de los complejos de iones metálicos flavonoides (Selvaraj et al., 2013). Existe una gran variedad de tipos de células y especies (modelos experimentales/biomarcadores) utilizados para evaluar el efecto genotóxico de los agentes en estudio. Estos modelos experimentales se dividen en ocho grupos: microorganismos, cultivos celulares, insectos, plantas, crustáceos, moluscos, peces y mamíferos. En cada grupo se observa el predominio de un tipo de célula/especie: para los microorganismos el más común es *Salmonella typhimurium* (76%), para el cultivo celular son las células de ovario de hámster chino (CHO) (30%), para los insectos es *Drosophila melanogaster*

(100%), para las plantas es *Allium cepa* (96 %), para los crustáceos es *Artemia salina* (100%), para los moluscos es *Helix aspersa* (100%), para los peces es *Channa punctatus* (100%) y para los mamíferos es el ratón suizo (52%) (Sponchiado et al., 2016). En la literatura existen muy pocos estudios de toxicidad de los metales Cu(II) y VO(IV). Para el cobre, los resultados de diferentes investigadores en diferentes sistemas son inconsistentes (algunos reportan efectos clastogénicos y otros no). La propiedad mutagénica del ion cobre puede deberse a su capacidad de inducir errores en la síntesis de ADN porque interactúa iónicamente con el mismo (Bhunya y Jena, 1996). El vanadio también puede inducir efectos citotóxicos, citostáticos y daño cromosómico porque es capaz de generar especies reactivas de oxígeno responsables de las alteraciones cromosómicas (Rodríguez-Mercado et al., 2003). Por otra parte, algunos flavonoides pueden presentar efectos genotóxicos mientras otros pueden resultar protectores (inhibiendo la genotoxicidad de mutágenos conocidos) (Delaney et al., 2002). En lo que respecta a complejos de coordinación, hay pocos estudios de toxicidad sobre complejos de oxidovanadio(IV) (Chohan et al., 2010) pero existen varios reportes sobre estudios de toxicidad para complejos de cobre con diferentes ligandos empleando tanto el Test de Ames, (Bacchi et al., 1999; Carcelli et al., 1995; Duff et al., 2012; Frías González et al., 2013) como el ensayo de toxicidad aguda con *Artemia salina* (Alomar et al., 2013; Ferraz et al., 2009). Esto resalta la importancia de la realización de estudios de toxicidad sobre los complejos sintetizados para demostrar la seguridad de los mismos.

En este contexto, se estudiaron las propiedades antioxidante, antimicrobiana y antitumoral de los complejos de coordinación de oxidovanadio(IV) con baicalina y apigenina y de cobre(II) con 5-HTP y se compararon con las propiedades del ligando libre, en busca de una potenciación. El estudio de las propiedades biológicas se complementa con estudios de toxicidad y biodisponibilidad.

1.6. Hipótesis. Objetivo general y objetivos específicos.

Hipótesis

La complejación de los ligandos baicalina y apigenina con el catión oxidovanadio(IV) y del ligando 5-hidroxitriptófano con el catión cobre(II) mejora las propiedades biológicas de los ligandos libres permitiendo la obtención de moléculas novedosas, seguras y biodisponibles.

Objetivo general

Desarrollar nuevos complejos metálicos con potencial actividad antimicrobiana, antioxidante y antitumoral con el fin de mejorar la actividad biológica de los biometales y de los ligandos.

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nuevos complejos de Cu(II) y VO(IV) con potencial actividad antimicrobiana, antioxidante y antitumoral, buscando técnicas de síntesis que den lugar a compuestos de alta pureza y que preferentemente no usen solventes que afecten el ambiente y la salud.
- Caracterizar los complejos obtenidos mediante sus propiedades químicas y fisicoquímicas tanto en fase sólida como las especies bioactivas en solución (solubilidad y estabilidad para ser evaluados biológicamente).
- Realizar estudios estructurales teóricos usando DFT para evaluar las propiedades geométricas, electrónicas y vibracionales y su relación con la actividad biológica para mejorar la comprensión de las mismas.
- Analizar los efectos de actividades antioxidantes de los ligandos y complejos en sistemas acelulares (frente a anión superóxido, y a los radicales peroxilo y oxhidrilo) y de actividad antirradicalaria usando el radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).
- Evaluar los complejos seleccionados respecto a sus propiedades antimicrobianas realizando: determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), determinación del efecto post-antibiótico (PAE) y post-antifúngico (PAFE), estudios de genotoxicidad (Test de Ames con *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100) y estudios de toxicidad aguda (con *Artemia salina*).

- Evaluar la actividad antiproliferativa de los complejos sintetizados sobre diferentes líneas celulares de cáncer (cáncer de pulmón humano (A549), cáncer cervical (HeLa) y cáncer de colon (HCT-116)) y establecer el probable mecanismo de acción del efecto citotóxico.
- Evaluar la biodisponibilidad de los complejos mediante el estudio de interacción con albúmina sérica bovina (ASB).

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Caracterización fisicoquímica (fase sólida).

2.1.1. Análisis elemental.

La determinación del contenido de C, H y N se realiza empleando un analizador elemental (Carlo Erba EA1108) medidos en INQUIMAE. La determinación de vanadio se realiza por destrucción de materia orgánica de la muestra sólida con el agregado de HNO₃ y H₂SO₄ y calentando, repitiendo el procedimiento tres veces y posterior agregado de ácido fosfórico y tungstato de sodio. La formación del ácido tungstofosfovanádico permite determinar el porcentaje de vanadio de la muestra, usando una curva de calibración previamente realizada y midiendo la absorbancia de la solución preparada a 400 nm (Onishi, 1989).

El contenido de sodio se determina empleando un fotómetro de llama (J.R. Technology). El contenido de cloro se determina empleando un electrodo específico (Cole-Parmer 27.502-12).

2.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realiza mediante el empleo de un sistema termoanalítico (Shimadzu TG-50 y DTA-50). Se trabaja en atmósfera de O₂ con un flujo de 50 mL min⁻¹ y una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹. El rango de muestra utilizado es de entre 10 y 20 mg. Se emplea Al₂O₃ como estándar para el DTA. Los datos obtenidos se analizan utilizando el software adecuado (TASYS).

2.1.3. Espectros electrónicos (UV-vis).

Las medidas espectrales se realizan utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Hewlett-Packard HP 8453, Shimadzu UV-300 y Agilent Technologies Cary 60) empleando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los espectros electrónicos del ligando y de los respectivos complejos al pH de síntesis se superponen (empleando un software gráfico) para analizar las diferencias existentes entre los mismos.

2.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR).

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas (pastillas de KBr) se obtienen mediante el empleo de un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier - FTIR

(Bruker IFS 66) desde 4000 a 400 cm^{-1} con un total de 60 scans acumulados y una resolución espectral de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Los datos obtenidos se analizan con un software adecuado (OPUS 4.2).

2.1.5. Espectros de reflectancia difusa.

Los espectros de reflectancia difusa UV-visible se registran empleando un espectrofotómetro (Shimadzu 2600/2700) con el accesorio correspondiente y empleando MgO como estándar.

2.1.6. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Los espectros CW-EPR de banda X de muestras de polvo de los diferentes complejos se obtienen a temperatura ambiente en un espectrómetro (Bruker EMX-Plus) equipado con una cavidad rectangular con modulación de campo de 100 kHz y fueron medidos en la UNL. Los espectros EPR de banda X de soluciones congeladas de los diferentes complejos en dimetilsulfóxido (DMSO) se registran a 120 K. Los espectros EPR se simulan con las herramientas del EasySpin basada en MATLAB (Stoll y Schweiger, 2006).

2.2. Caracterización fisicoquímica (en solución).

2.2.1. Variaciones espectrales en función del pH.

Las variaciones espectrales se miden empleando un espectrofotómetro UV-vis (Hewlett-Packard HP 8453 y Agilent Technologies Cary 60). Este estudio permite identificar los procesos de desprotonación y coordinación facilitando así la selección del pH de síntesis de los diferentes complejos, pH en el que existe una especie única.

2.2.2. Titulaciones espectrofotométrica.

La estequiometría de los sistemas estudiados en solución se establece mediante el método de la razón molar. La titulación espectrofotométrica se realiza mediante el registro de los cambios de absorbancia de los espectros electrónicos de los compuestos en función de la relación Ligando/Metal (L/M) a un valor constante de longitud de onda. Para obtener los espectros se usa una solución del ligando en estudio (en el solvente adecuado y al pH de síntesis) con el agregado de una solución del cloruro del metal cubriendo un rango de relaciones L/M desde 10/1 hasta 0,5/1, bajo atmósfera de nitrógeno. Las medidas espectrales se realizan utilizando espectrofotómetros UV-visible (Hewlett-Packard HP 8453 y Agilent Technologies Cary 60) empleando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

2.2.3. Estudios de estabilidad de los complejos disueltos.

El estudio de estabilidad se lleva a cabo monitoreando la variación en el máximo de absorbancia del espectro UV-visible de los complejos (disueltos en DMSO y mantenidos a 25 °C) en un lapso de tiempo mayor a 1 h. Esto permite evaluar la estabilidad de los complejos en solución y asegurar que los mismos no sufrieron descomposición alguna antes de ser agregados en los diferentes sistemas de ensayos biológicos.

2.3. Estudios teóricos.

Para aquellos complejos de coordinación en los que no se logran obtener monocristales adecuados para determinaciones estructurales, los parámetros geométricos pueden elucidarse mediante metodologías computacionales. Los cálculos teóricos se realizan utilizando herramientas de la teoría del funcional de la densidad (*Density Functional Theory*, DFT) (Hohenberg y Kohn, 1964; Kohn y Sham, 1965; Parr y Yang, 1989), empleando el programa GAUSSIAN 09 (Frisch et al., 2010). Los ligandos se optimizan empleando el funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993) con diferentes conjuntos de bases. Dichas geometrías optimizadas se utilizan para construir los complejos de coordinación. Los complejos construidos se optimizan primero al mismo nivel de teoría que el ligando y luego se reoptimizan empleando diferentes funcionales y conjuntos de bases (añadiendo funciones de polarización y difusión según corresponda) para refinar la geometría de los mismos. La estructura molecular de los ligandos y complejos se optimizan en fase gaseosa. Además, se realizan cálculos de frecuencia (vibracionales) al mismo nivel de teoría que los cálculos de optimización para demostrar que esa geometría representa un mínimo en la superficie de energía potencial y para simular los espectros vibracionales de infrarrojo (teóricos). Las frecuencias del espectro IR teórico se analizan por medio del cálculo de la Distribución de Energía Potencial (PED%) utilizando el software de análisis de la distribución de energía vibracional (VEDA 4) (Jamróz, 2010).

2.4. Determinación de propiedades biológicas *in vitro*.

2.4.1. Medidas de capacidades antioxidantes.

2.4.1.1. Ensayo de la actividad antirradicalaria frente al DDPH•.

La actividad antirradicalaria se mide en términos de la capacidad de los compuestos para eliminar los radicales DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Las mediciones se realizan

empleando el método modificado de Yamaguchi y colaboradores (Yamaguchi et al., 1998). Este ensayo es ampliamente utilizado para el estudio de la actividad de antioxidantes naturales debido a su alta sensibilidad y simpleza. A una solución metanólica de DPPH• (4 mL, 4 ppm) se le agrega 1 mL de una solución del compuesto en estudio (cationes metálicos VO²⁺ y Cu²⁺, ligandos y complejos de coordinación) diluido en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 7,1). Luego de incubar 1 hora en oscuridad se mide la absorbancia de las distintas muestras a 517 nm y se las compara con un control (preparado con el radical y el buffer) al que se le asigna un valor arbitrario de 100%. Un agente antioxidante (que en teoría es un donador de hidrógeno) puede reducir el radical DPPH• por transferencia de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón seguida de la transferencia de un átomo de hidrógeno, lo que produce una disminución del color inicial (Moon y Shibamoto, 2009). Las mediciones se realizan por triplicado en tres ensayos independientes y se utilizó ácido ascórbico como antioxidante de referencia, el cual provoca una decoloración inmediata del color violeta inicial.

2.4.1.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.

La actividad superóxido dismutasa símil se evalúa empleando un método no enzimático que consiste en generar el radical superóxido (O₂•⁻) a través del sistema fenazina-metosulfato (PMS)/nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). El radical O₂•⁻ es capaz de reducir el nitro-azul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. En este ensayo se determina la habilidad que tienen los compuestos en estudio de inhibir dicha reducción. La mezcla de reacción contiene 0,5 mL de muestra (en distintas concentraciones), 0,5 mL de NADH (140 mM) y 0,5 mL de NBT (300 μM) en buffer fosfato 0,1M (KH₂PO₄/NaOH, pH 7,4). Los tubos de reacción se incuban a 25 °C por 15 minutos y se inicia la reacción agregando 0,5 mL de PMS (120 μM). Luego de 5 minutos se lee la absorbancia a 560 nm y se compara con el blanco (Kuo et al., 2001). La concentración de compuesto que produce un 50 % de inhibición (IC₅₀) se obtiene a partir de la construcción del gráfico % de inhibición de la reducción de NBT en función del -log de la concentración (Patel et al., 2011), utilizando un asistente de regresión sigmoideo provisto por un programa adecuado (Sigma Plot).

2.4.1.3. Inhibición del radical peroxilo (ROO•).

El radical peroxilo (ROO•) se genera mediante la descomposición térmica del 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) incubado a 37 °C por 30 minutos (Huang et al., 2010; Magalhães et al., 2008). El AAPH se selecciona debido a su capacidad para generar radicales libres a una tasa constante durante largos períodos de tiempo (semivida de 175 h). La

mezcla de reacción contiene AAPH (50 mM), piranina (50 μ M) y diferentes concentraciones de los compuestos en estudio. El consumo de piranina (por el radical ROO \bullet) se puede seguir espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia a 454 nm empleando una celda termostatzada a 37 °C. El retraso en el consumo de piranina (fase de retardo o *fase lag*) que producen los agentes antioxidantes se define como el tiempo transcurrido antes del inicio del consumo de piranina (reducción de la absorbancia) por parte del radical peroxilo (Hapner et al., 2010).

2.4.1.4. Actividad secuestrante del radical hidroxilo (OH \bullet).

El radical hidroxilo (OH \bullet) se genera por el sistema ascorbato/Fe/H₂O₂. La mezcla de reacción contiene 3,75 mM de 2-desoxirribosa, 2,0 mM de H₂O₂, 100 μ M de FeCl₃, 100 μ M de EDTA y diferentes concentraciones de los compuestos en estudio disueltos en buffer KH₂PO₄-KOH (20 mM, pH 7,4). La reacción comienza por el agregado de 100 μ L de ácido ascórbico (100 μ M) a la mezcla y los tubos se incuban a 37 °C durante 30 min. Finalmente, la degradación de la desoxirribosa por los radicales OH \bullet se mide por el método del ácido tiobarbitúrico (ATB). El producto formado por la degradación de la desoxirribosa reacciona con el ATB en caliente y bajo condiciones ácidas (en presencia de ácido tricloroacético (TCA)) y da como resultado la formación de un cromógeno de color rosa (532 nm) (Halliwell et al., 1987).

2.4.2. Determinaciones antimicrobianas.

2.4.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a bacterias y hongos.

La actividad antibacteriana se estudia mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a cepas bacterianas derivadas de la American Type Culture Collections (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12263) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). La actividad antifúngica se evalúa mediante la determinación de la CIM frente a cepas de hongos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC (sensu stricto) 22019 (Souza et al., 2012), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* de aislamiento clínico). La CIM se determina usando el método de dilución en agar. El medio de cultivo empleado en los ensayos fue el Mueller Hinton (caldo o agar) para todas las cepas (Klančnik et al., 2010; Suksrichavalit et al., 2009). Los inóculos de las diferentes cepas se preparan a partir de cultivos

en caldo MH de 18 horas de crecimiento. Se prepara una suspensión de Mc Farland 0,5 para cada microorganismo y se realiza una dilución de 1:10 antes de la inoculación (aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro) (Berahou et al., 2007; Rowe et al., 2002). Los inóculos de cepas fúngicas se ajustan a 0,5 Mc Farland y esta suspensión (aproximadamente 10^8 UFC por mililitro) se emplea directamente (sin previa dilución). Generalmente, los metales se disuelven en agua mientras que los ligandos y complejos se disuelven en DMSO. Todas estas soluciones se esterilizan usando filtros esterilizantes de $0,22 \mu\text{m}$. Además, se preparan diluciones dobles seriadas a partir de la solución madre y se incorporan al agar MH fundido que posteriormente se vierte en placas de Petri y se enfría a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Los compuestos se ensayan en un rango de concentraciones de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (criterio de corte). Las mediciones de actividades antimicrobianas *in vitro* con valores de CIM superiores a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ se consideran irrelevantes desde una perspectiva clínica (Tanaka et al., 2006). Posteriormente, se inoculan $2 \mu\text{l}$ de las suspensiones microbianas sobre el medio de cultivo y se incuba aeróbicamente a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 y 48 h para bacterias y hongos, respectivamente. La inhibición del crecimiento microbiano en las placas que contienen los compuestos en estudio se determina por comparación con el crecimiento en placas control empleando el solvente como blanco (Figura 2.1). La CIM se define como la dilución más baja del compuesto que inhibe el crecimiento visible del microorganismo.

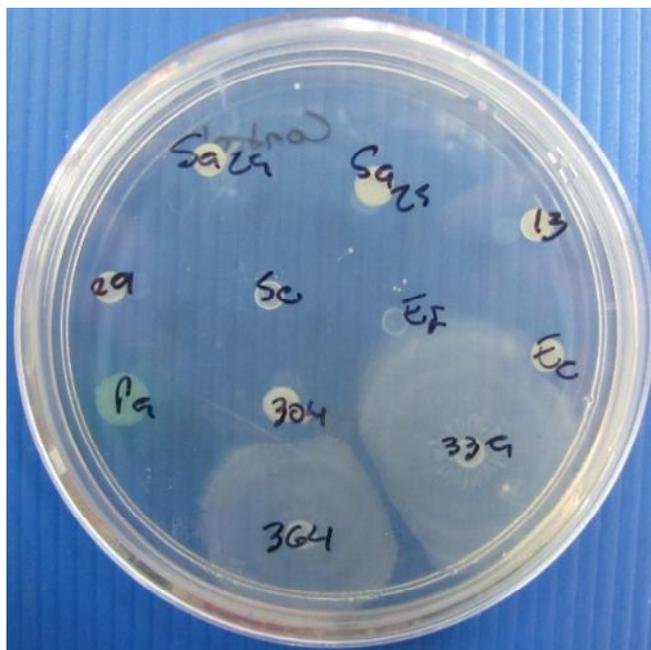


Figura 2.1. Control positivo de crecimiento bacteriano, en agar Mueller Hinton, de las cepas *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Staphylococcus aureus* (Sa25), *Staphylococcus epidermidis* (Se) y *Enterococcus faecalis* (Ef), entre otras.

2.4.2.2. Determinación del efecto post-antibiótico (PAE).

Para aquellos compuestos con valores de CIM menores a $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a determinadas cepas, se estudia el efecto post-antibiótico (PAE) mediante un método espectrofotométrico, que consiste en el monitoreo del crecimiento microbiano luego de la exposición al agente en estudio. Este ensayo brinda información acerca de los intervalos entre dosis del agente antimicrobiano. Se somete a una suspensión microbiana a la acción del agente antimicrobiano (a valores de 1 o más veces la CIM) durante un período de 1 hora. Luego se elimina el agente mediante dilución y se detecta el crecimiento microbiano mediante una disminución de un 5% de la transmitancia a 670 nm. El efecto post-agente se calcula empleando la fórmula $\text{PAE} = T - C$, donde T es el tiempo requerido para que el cultivo expuesto al agente antimicrobiano disminuya la transmitancia en un 5% y C es el tiempo requerido para que el cultivo no expuesto (control) disminuya la transmitancia en un 5% (Ellepola, 2012). Un PAE de 20 minutos o menos es considerado insignificante debido a las limitaciones propias del procedimiento de medida (Rescott et al., 1988).

2.4.3. Medidas de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL).

La actividad inhibitoria de la fosfatasa alcalina (FAL) se determina por espectroscopia UV-visible. Las condiciones experimentales para la medición de la FAL son las siguientes: se disuelven $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FAL intestinal bovina y 5 mM de p-nitrofenil fosfato (p-NPP) en el tampón de incubación (pH = 10,5) y se mantienen durante 10 min. Los efectos de los compuestos en estudio se determinan por adición de diferentes concentraciones (1-500 μM) de cada uno a la mezcla preincubada. La solución del complejo se prepara en DMSO antes de añadir el tampón para obtener las concentraciones finales deseadas. La reacción se inicia mediante la adición del sustrato p-NPP y la aparición del producto p-nitrofenol se controla mediante los cambios de absorbancia a 405 nm. Las determinaciones se realizan al menos por triplicado en tres experimentos diferentes (Sakharov et al., 1988; Urquiza 2010).

2.4.4. Estudios de genotoxicidad y toxicidad aguda.

2.4.4.1. Test de Ames (genotoxicidad).

El potencial mutagénico de nuevos fármacos necesita ser investigado porque algunos agentes químicos que muestran mutagenicidad pueden inducir cáncer. La mutagenicidad/genotoxicidad de los compuestos en estudio se evalúa mediante el método de la incorporación directa en placa propuesto por Maron y Ames (1983) empleando dos cepas de

Salmonella typhimurium (TA98 y TA100). Los repiques de las cepas se cultivan durante 12 a 14 horas a 37 °C en caldo Mueller Hinton. Las diferentes concentraciones de los compuestos (previamente disueltos en el solvente adecuado) se añaden a 2 mL de top agar y se mezclan con 100 µL de cultivo bacteriano. Luego se añade la mezcla anterior a una placa con agar mínimo. Estas placas se incuban a 37 °C durante 48 horas y se cuenta el número de colonias revertantes. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El índice mutagénico (MI) se calcula como el número medio de revertantes por placa dividido por el número medio de revertantes espontáneas en las placas control (Figura 2.2).

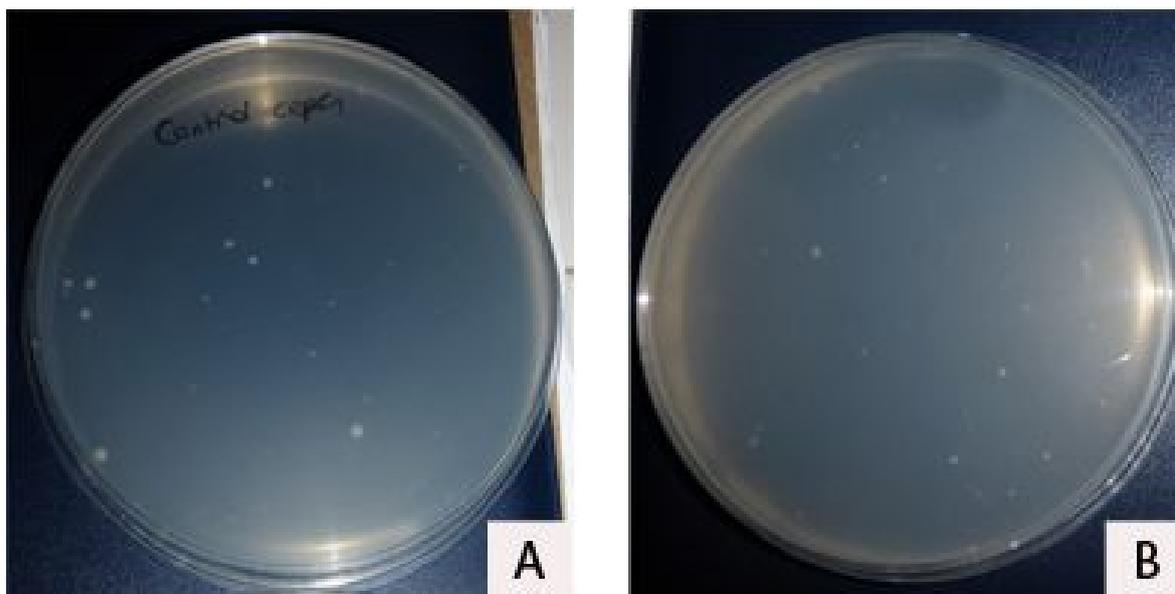


Figura 2.2. Revertantes espontáneas de *Salmonella typhimurium* TA98 en las placas control (A) empleando agua como solvente y (B) empleando DMSO como solvente.

2.4.4.2. Ensayo de toxicidad aguda (*Artemia salina*).

Este ensayo ha demostrado ser adecuado para el cribado de nuevos fármacos con el fin de predecir su toxicidad con una buena correlación con los ensayos en ratones ($r= 0,85$ $p < 0,05$), lo que sugiere que *A. salina* es un modelo alternativo útil (Lagarto Parra et al., 2001). Para la determinación de la toxicidad aguda de los compuestos en estudio se emplean huevos del crustáceo de mar *A. salina*. Los mismos se incuban en una cámara con agua de mar artificial a 20-30 °C. Un litro de agua de mar artificial contiene: 23 g de NaCl, 11 g de MgCl₂·6H₂O, 4 g de Na₂SO₄, 1,3 g de CaCl₂·2H₂O y 0,7 g de KCl. El pH del agua de mar se ajusta a 9,0 usando Na₂CO₃ para evitar el riesgo de muerte de las larvas de *A. salina* por la disminución del pH durante la incubación (Lewan et al., 1992). Después de 24 h, las larvas (nauplios) se colectan y se cuentan usando una micropipeta. Para determinar la relación dosis-respuesta, se ensayan varias concentraciones por triplicado y se usan controles negativos (agua

destilada) y positivos ($K_2Cr_2O_7$). Las concentraciones se seleccionan teniendo en cuenta las concentraciones utilizadas para las determinaciones biológicas. Los pocillos que contienen la muestra y alrededor de 10 larvas del crustáceo, incluyendo los grupos de control (Figura 2.3), se llenan hasta un volumen total de 100 μ l con agua de mar artificial. Después de 24 h, se cuenta el número de larvas vivas y se estima el valor de concentración letal media (CL_{50}).

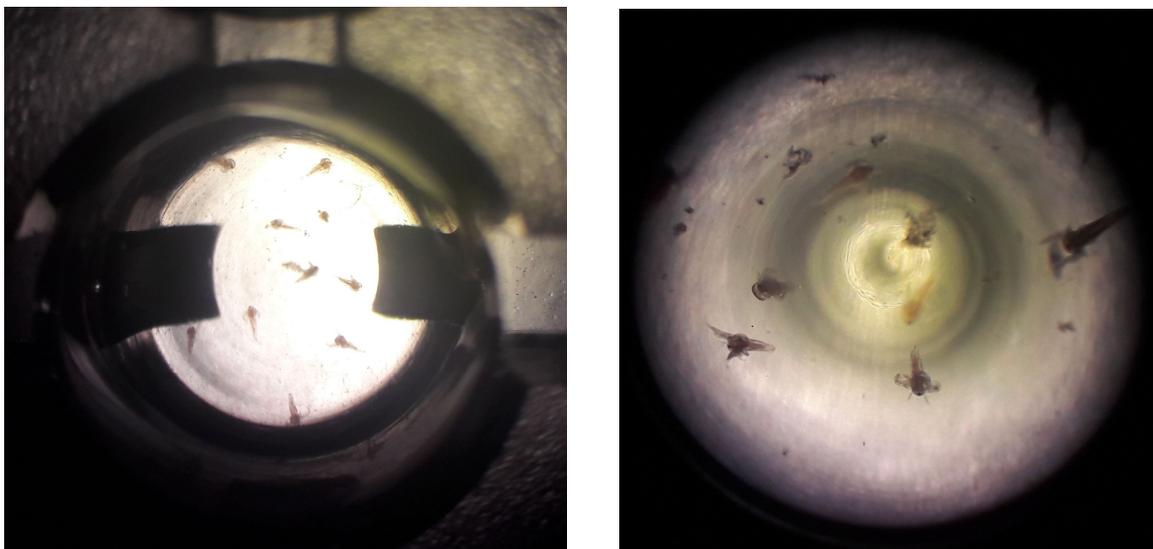


Figura 2.3. Control positivo de crecimiento del crustáceo de mar *A. salina*.

2.5. Actividad anticancerígena.

2.5.1. Cultivo de líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón humano y cáncer cervical humano.

La línea celular derivada de cáncer de pulmón humano (A549) se obtiene de la ABAC (Asociación Argentina de Banco de Células INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina). Para los estudios de la actividad anticancerígena del complejo de cobre(II) se utilizaron, además de la línea A549, la línea celular derivada de cáncer cervical humano (HeLa) y la HCT-116, derivada de cáncer humano de colon. Las células se mantienen a 37 °C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% usando como medio de cultivo el Medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) suplementado con penicilina 100 U mL⁻¹, estreptomycin 100 μ g mL⁻¹ y suero fetal bovino al 10% (v/v). Cuando se alcanza la confluencia del 70-80%, las células se subcultivan utilizando el medio TrypLE™ de Gibco (Gaithersburg, MD, EE.UU) y solución salina tamponada libre de fosfato (PBS, 11 mM KH₂PO₄, 26 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4). Para los experimentos, las células se cultivan en placas de pocillos múltiples. Cuando las células alcanzan una confluencia del 70%,

las monocapas se lavan dos veces con DMEM y luego se incuban con los diferentes compuestos en estudio.

2.5.2. Ensayos de viabilidad.

Las células se siembran a una densidad de 1×10^5 /pocillo en placas de 48 pocillos, se cultivan durante la noche y se tratan con el vehículo y los compuestos en estudio a diferentes concentraciones en medio libre de suero fetal bovino. Se usa DMSO como el vehículo de disolución de los complejos, dada su insolubilidad en agua, a una concentración final máxima de 0,5% en el pocillo tratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de 24, 48 o 72 h de incubación a 37 °C, se añaden 100 µg/pocillo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difenil Tetrazol o MTT (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) y se incuban durante 2 h. Los productos de formazan generados por la reducción celular de MTT se disuelven en DMSO y la densidad óptica se mide a 450 nm (Denizot y Lang, 1986). Si se utiliza como disolvente una mezcla de alcohol isopropílico y HCl (en lugar de DMSO) la densidad óptica se lee a 570 nm (Mosmann, 1983). Todos los experimentos se realizan por triplicado. Los datos se presentan como porcentaje de la viabilidad celular (%) del grupo tratado con respecto a las células no tratadas (control) en las que se supone que la viabilidad es del 100%. Para evaluar la viabilidad celular en presencia de sustancias con alta capacidad antioxidante que previenen el efecto pro-oxidante de los compuestos, se incuban las células con diferentes concentraciones de los compuestos en estudio adicionados de una mezcla de vitaminas C y E (50 µM cada una) o NAC (N-acetilcisteína, 5 mM) durante 24 h y a continuación se realiza el ensayo de MTT.

2.5.3. Determinación de efectos pro-oxidantes.

La generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las líneas celulares se mide por la oxidación de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Se siembran las células en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se dejan adherir durante la noche. A continuación, se añaden diferentes concentraciones de los compuestos en estudio y se incuban durante 24 h. Después del tratamiento, se retira el medio y agrega H2DCFDA, 10 µM, diluido en medio libre durante 30 min a 37° C. Luego se separa el medio y las monocapas de células se enjuagan con PBS y se lisan con 1 mL de Triton-X100 al 0,1%. Dichos extractos celulares se analizan por espectroscopía de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 485 nm, longitud de onda de emisión: 535 nm) en busca del producto oxidado DCF (Carter et al., 1994) usando un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer LS 50B). La generación de ROS en las células se mide

asimismo en presencia del agente antioxidante NAC, utilizando el mismo ensayo descrito anteriormente; pero en este caso las células son pretratadas con 5 mM de NAC durante 30 min y seguidamente se tratan con los diferentes compuestos a diferentes concentraciones y se incuban durante 24 h adicionales.

2.5.4. Determinación fluorométrica de los niveles de GSH y GSSG celulares

El glutatión (GSH) es el principal agente antioxidante natural de las células y las protege de las EROs generadas. Es un tripéptido compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Los niveles GSH y de glutatión oxidado (GSSG) se determinan en cultivos de las líneas celulares, luego del agregado de los compuestos. Las monocapas de células confluentes se incuban a 37 °C durante 24 h en placas de 24 pocillos con diferentes concentraciones de los compuestos en estudio. A continuación, se lavan con PBS y se suspenden incubándolas con 300 µl de Triton al 0,1% durante 30 min. Para la determinación de GSH, se mezclan alícuotas de 100 µl con 1,8 mL de tampón fosfato enfriado con hielo (Na_2HPO_4 0,1 M-EDTA 0,005 M, pH 8) y 100 µl de o-ftaldialdehído (OPT) (0,1% en metanol) tal como fue descrito por Hissin y Hilf (Hissin y Hilf, 1976). Para la determinación de GSSG, se mezclan alícuotas de 100 µl con 1,8 mL de NaOH 0,1 M y OPT, pero previamente y para evitar la oxidación de GSH los extractos celulares se incuban con 0,04 M de N-etilmaleimida (NEM). La fluorescencia se mide en el espectrómetro de luminiscencia a una longitud de onda de emisión de 420 nm (después de la excitación a 350 nm). En forma paralela se procesan curvas estándar con diferentes concentraciones de GSH. El contenido de proteína en cada extracto celular se cuantifica usando el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). La relación GSH/GSSG, que es un buen marcador del estado redox celular, se calcula como % respecto del control para todas las condiciones experimentales.

2.5.4. Determinación de morfología celular.

Para evaluar la morfología de las células, las mismas se cultivan en placas de seis pocillos y se incuban durante la noche con DMEM libre de suero (basal) o con las diferentes concentraciones de los compuestos en estudio. Posteriormente, las monocapas se lavan dos veces con PBS, se fijan con metanol y se tiñen con una dilución 1:10 de Giemsa durante 10 min. Dicha técnica de tinción permite observar características morfológicas del citoplasma y del núcleo. Luego se lavan con agua y los cambios morfológicos se examinan mediante microscopía óptica y se registran las imágenes con una cámara fotográfica.

2.6. Ensayos de biodisponibilidad. Interacción con la albúmina sérica bovina (ASB).

2.6.1. Estudios de desactivación (*quenching*) de la ASB.

Se sabe que la ASB tiene dos residuos de triptófano (situado en las posiciones 134 y 212) que poseen fluorescencia intrínseca (Moriyama et al., 1996). La disminución en la intensidad de la fluorescencia de la ASB y el corrimiento a longitudes de onda cercanas conforme aumenta la concentración de los compuestos en estudio, sugiere la existencia de interacciones entre los compuestos y dicha proteína. Para confirmar el mecanismo de desactivación se analizan los datos de fluorescencia a diferentes temperaturas con la ecuación de Stern-Volmer (1):

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador (*quencher*), respectivamente; K_q es la constante de desactivación bimolecular; τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo en ausencia del desactivador; $[Q]$ es la concentración del desactivador y K_{sv} es la constante de desactivación de Stern-Volmer que puede obtenerse a partir de la pendiente de la ecuación (1).

Para el ensayo, la ASB se disuelve en buffer Tris-HCl (0,1 M; pH 7,4) a una concentración final de 6 μ M. Se añaden las soluciones de los compuestos a la solución de ASB y se dejan reposar para asegurar la formación de soluciones homogéneas con concentraciones que oscilan entre 2 y 100 μ M con un tiempo de incubación de 1 h. La intensidad de fluorescencia se mide a 298, 303 y 310 K (excitación a 280 nm y emisión a 248 nm). Se realizan triplicados independientes para cada muestra y concentración. Las medidas se realizan en un espectrómetro de luminiscencia (Perkin-Elmer LS-50B, Beaconsfield, England) equipado con una lámpara pulsada de xenón (ancho medio de pico <10 ns, 60 Hz) un tubo fotomultiplicador R928 y un software (FLWinlab). Las rendijas de excitación y de emisión se fijan en 10 nm a lo largo de todo el estudio.

2.6.2. Determinación de Constantes de afinidad y sitios de enlace.

La determinación del grado de unión del compuesto en estudio con la ASB es crítica y se correlaciona directamente con el transporte, la disposición y la eficacia *in vivo* de dicho compuesto. Asumiendo que la desactivación de la fluorescencia de la ASB podría ser un proceso de desactivación estático (formación de complejos entre proteína y desactivador), el equilibrio entre la molécula libre y la ligada podría darse por la siguiente ecuación (2):

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

donde K_a es la constante de unión y n es el número de sitios de unión. Por lo tanto, graficando el logaritmo de $(F_0-F)/F$ en función del logaritmo de Q , se obtiene el número de sitios de unión (pendiente de la recta) y la constante de unión (ordenada al origen).

2.6.2. Parámetros termodinámicos (modo de interacción).

Las fuerzas de interacción entre fármacos y biomoléculas pueden incluir interacciones electrostáticas, múltiples enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, contactos hidrófobos y estéricos dentro del sitio de unión a anticuerpos, etc. (Ross y Subramanian, 1981). Para inferir el tipo de proceso de interacción entre los ligandos o complejos y la ASB se estudian los parámetros termodinámicos, incluyendo cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio de energía libre (ΔG). Si ΔH no varía significativamente en el rango de temperatura estudiado, su valor y el de ΔS pueden evaluarse, graficando logaritmo neperiano de la constante de unión en función de $-1/RT$, a partir de la ecuación de van't Hoff (3):

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

donde K_a es análoga a las constantes de unión asociativa a la temperatura correspondiente y R es la constante de los gases. El cambio de energía libre (ΔG) se calcula a partir de la siguiente relación (4):

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

Si el ΔG toma valores negativos el proceso de interacción es espontáneo. El cambio de entalpía negativo sugiere que la unión entre los compuestos en estudio y la ASB es exotérmica y entonces la constante de asociación disminuye con el aumento de la temperatura. La combinación de valores ΔH y ΔS obtenidos en cada sistema indica el tipo de fuerzas de interacción involucradas (Tabla 2.1) (Ross y Subramanian, 1981).

Tabla 2.1. Contribuciones de las fuerzas de interacción ABS-compuesto al ΔH y ΔS .

Proceso	ΔH	ΔS
Asociación hidrofóbica	Positivo	Positivo
Interacciones de van der Waals	Negativo	Negativo
Formación de puente de hidrógeno en un medio de constante dieléctrica baja	Negativo	Negativo
Interacción iónica (neutralización de carga)	Ligeramente Positivo o Negativo	Positivo
Protonación	Negativo	Negativo

*Tabla extraída del reporte de Ross y Subramanian (1981).

2.7. Análisis estadístico.

Para todos los ensayos biológicos se realizan 3 experimentos independientes y los resultados se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media). Para realizar el análisis estadístico (análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Fisher (LSD) para comparar medias) se utiliza el programa Statgraphics PLUS 5.1.

Capítulo 3: Síntesis y caracterización estructural de los complejos

3.1. Preparación de los complejos.

Síntesis del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic): se disolvieron 0,25 mmoles de Baicalina en 30 ml de alcohol etílico absoluto bajo agitación y calor. Sobre dicha solución se agregaron 0,125 mmoles de una solución acuosa de cloruro de vanadilo (50%). Esta solución se ajustó a pH=9 con hidróxido de sodio, se dejó agitando durante 1 hora (a 60 °C) obteniéndose así un abundante precipitado verde. El precipitado de VO/Baic se filtró al vacío, se lavó tres veces con alcohol etílico absoluto y se dejó secar en estufa a 60 °C.

Síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api): se disolvieron 0,5 mmoles de Apigenina en 60 ml de alcohol etílico absoluto bajo agitación y calor. Se dejó enfriar dicha solución y se agregaron 0,25 mmoles de una solución acuosa de cloruro de vanadilo (50%), en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se ajustó a pH=5 y el volumen de solvente se redujo hasta 2 ml en rotavapor obteniendo un precipitado verde. El precipitado de VO/Api se filtró al vacío, se lavó tres veces con alcohol etílico absoluto y se dejó secar en estufa a 60 °C.

Síntesis del complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP): se disolvió 1 mmol de 5-Hidroxitriptófano en 30 ml de agua destilada bajo agitación y calor. Se dejó enfriar y se agregaron 0,5 mmoles de una solución acuosa de acetato de cobre. La mezcla se agitó durante 5 minutos obteniéndose así un abundante precipitado celeste. El precipitado de Cu/5-HTP se filtró al vacío, se lavó tres veces con agua destilada y se dejó secar en estufa a 60 °C.

3.2. Caracterización en fase sólida.

3.2.1. Análisis elementales.

A continuación se presentan los resultados de los análisis elementales de los complejos sintetizados. En líneas generales, los porcentajes de carbono, hidrógeno, nitrógeno, vanadio, sodio y cloro determinados experimentalmente concuerdan con los porcentajes teóricos calculados a partir de las fórmulas moleculares propuestas para cada uno de ellos.

Complejo VO/Baic: Anal. Calc. ($C_{42}H_{42}O_{29}VNa_4$) %: C: 43,7; H: 3,6; V: 4,4 y Na: 8,0. Exp. %: C: 43,6; H: 3,5; V: 4,5 y Na: 8,2.

Complejo VO/Api: Anal. Calc. ($C_{15}H_{13}O_8VCl$) %: C: 44,1; H: 3,2; V: 12,5 y Cl: 8,7. Exp. %: C: 44,2; H: 3,2; V: 12,4 y Cl: 8,8.

Complejo Cu/5-HTP: Anal. Calc. ($C_{22}H_{24}N_4O_7Cu$) %: C: 50,8; H: 4,6 y N: 10,8. Exp. %: C: 50,7; H: 4,5 y N: 10,8.

3.2.2. Estudios termogravimétricos (TG)

Los estudios termogravimétricos muestran los siguientes resultados y sobre la base de los mismos se determinaron el número de moléculas de agua (de coordinación o de hidratación, respectivamente) para cada uno de los complejos.

Complejo VO/Baic: la curva de descomposición termogravimétrica, TG, (Figura 3.1) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min demostró que en una primera etapa (30-110 °C) la pérdida de peso experimental es de 9,6%, que coincide con el valor esperado para la pérdida de las 6 moléculas de agua presentes en el complejo (9,4%). Como puede apreciarse de la Figura 3.1, a la temperatura límite de trabajo el proceso de descomposición definitiva del compuesto no finaliza por lo que no puede evaluarse el residuo final.

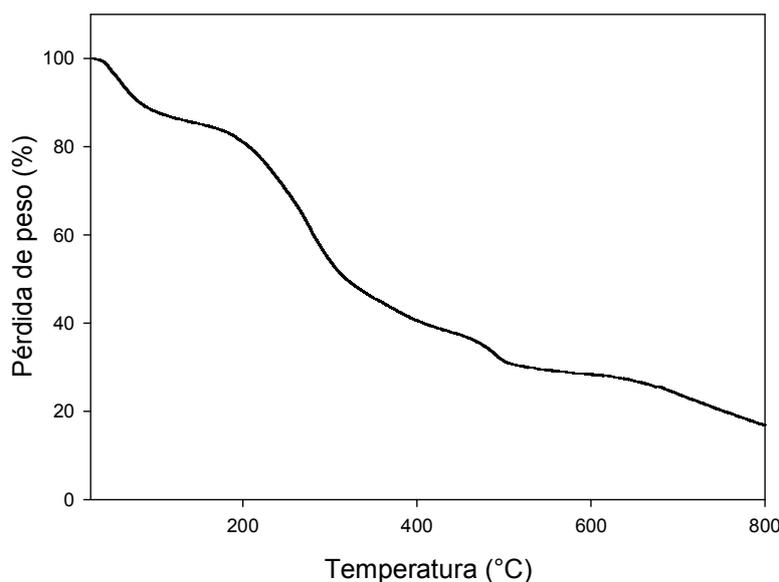


Figura 3.1. Curva termogravimétrica (TGA) del complejo $Na_4[VO(Baic)_2].6H_2O$ (VO/Baic) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min.

Complejo VO/Api: la curva de calentamiento indica una pérdida de agua en el termograma (Figura 3.2) que termina a temperaturas relativamente altas (187 °C) y el valor experimental correspondiente a una pérdida de masa del 8,4% coincide con el valor esperado para la pérdida de dos moléculas de agua (8,3%). La temperatura de deshidratación indica que las dos moléculas de agua pertenecen a la esfera de coordinación del catión oxidovanadio(IV) (VO^{2+}). Después de la deshidratación, el compuesto se degrada en dos etapas consecutivas hasta llegar a los 600 °C. La constancia del peso se alcanza a los 650 °C y el peso del residuo sólido restante, recogido a esa temperatura, representa un 22,4% (en concordancia con el valor teórico esperado del 22,3% para el residuo de V_2O_5). La presencia de V_2O_5 en el residuo se confirmó mediante espectroscopía FTIR.

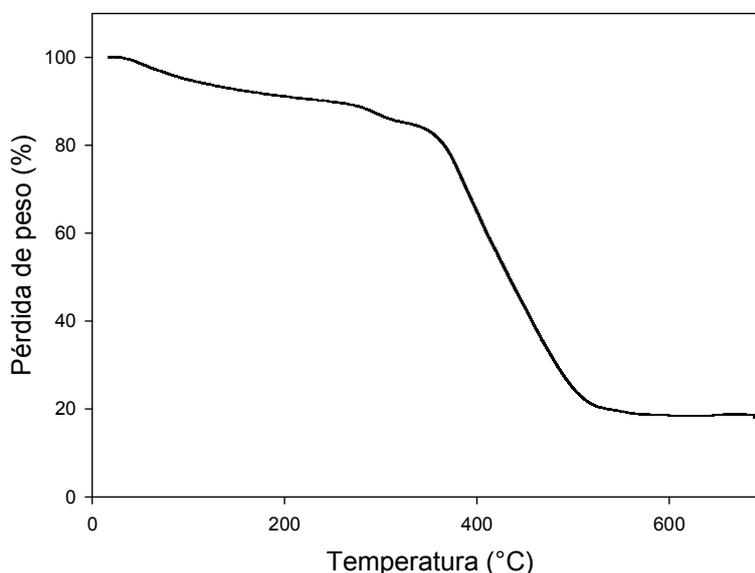


Figura 3.2. Curva termogravimétrica (TGA) del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min.

Complejo Cu/5-HTP: la curva del análisis termogravimétrico (Figura 3.3) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min demostró que la pérdida de agua termina a temperaturas relativamente bajas (100 °C) involucrando dicho porcentaje la pérdida de una molécula de agua (Calc= 3,5%, Exp= 3,5%). La temperatura de deshidratación sugiere que la molécula de agua no está unida al centro metálico formando parte de las denominadas aguas de hidratación. A una temperatura de 650 °C, la pérdida de peso (Calc= 84,7%, Exp= 85,0%) coincide con la formación de CuO como residuo final el que fue caracterizado por espectroscopía de FTIR.

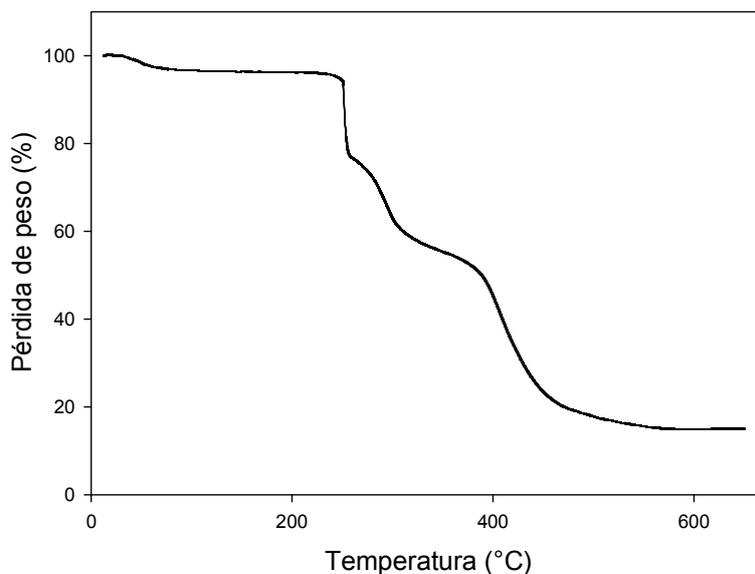


Figura 3.3. Curva termogravimétrica (TGA) del complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) en atmósfera de oxígeno y a una velocidad de flujo de 50 ml/min.

3.2.3. Espectroscopía vibracional FTIR.

La caracterización fisicoquímica de los complejos incluyó el análisis y estudio de los mismos por medio de la espectroscopía vibracional. En este apartado se presentan y discuten los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), tanto de los ligandos como de los complejos medidos en fase sólida (pastillas KBr). Las asignaciones tentativas a los modos de vibración para las bandas observadas se realizaron por comparación con datos previamente reportados en la literatura.

Complejo VO/Baic: en la Figura 3.4 se muestran los espectros vibracionales de infrarrojo FTIR de Baicalina (Baic, véase Figura 1.6), su sal sódica (NaBaic) y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) y en la Tabla 3.1 se presentan las asignaciones tentativas de los mismos. La preparación de NaBaic se realizó agregando 0,25 mmoles Na(OH) a una solución etanólica que contiene 0,25 mmoles del ligando y el precipitado obtenido se filtra y se seca en estufa a 60 °C. Para discutir el espectro vibracional de la baicalina (glucurónido de la baicaleína), se consideraron dos componentes: el ácido glucurónico y el resto flavonoide.

Al valor de pH utilizado para la síntesis del complejo (pH= 9), no se considera la deprotonación de los sustituyentes OH del ácido glucurónico ya que la ionización de estos grupos ocurre a valores de pH mayores a 13 (Albert y Serjeant, 1984). Los sustituyentes OH del anillo aromático denominado A presentan mayor fuerza ácida, debido a la existencia de

una acción combinada entre el efecto inductivo (atractor de electrones) del anillo aromático y el efecto mesomérico. Por lo tanto, para la formación del complejo VO/Baic se consideró que a pH 9 se encuentran disociados los tres átomos de hidrógeno ácidos y se asignaron de manera consecutiva la primera deprotonación al ácido carboxílico, y la segunda y tercera ionización a los grupos 6-OH y 5-OH. A pesar de que la denominación más precisa de la baicalina sería H_3Baic , nos referiremos al ligando deprotonado como Baicalina o Baic.

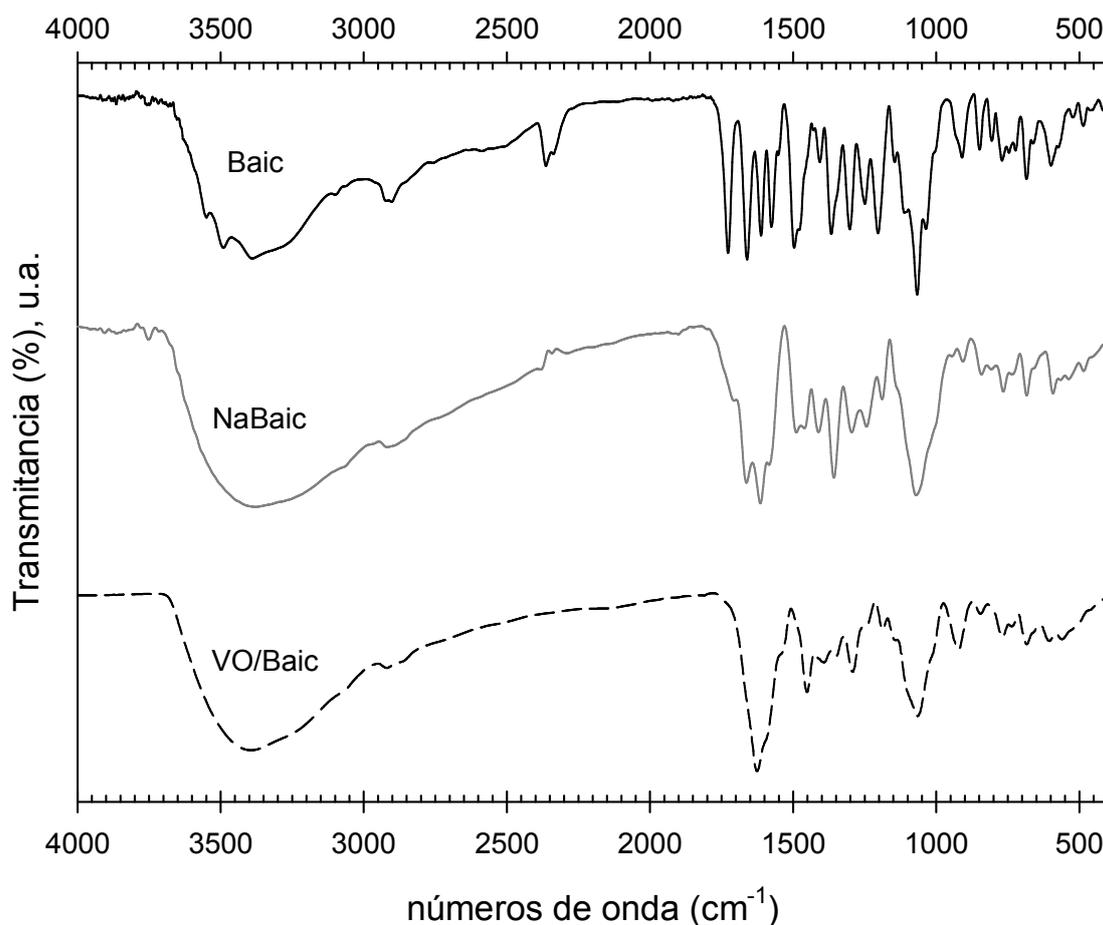


Figura 3.4. Espectros FTIR de Baicalina (Baic), sal de sodio de Baicalina (NaBaic) y complejo $Na_4[VO(Baic)_2].6H_2O$ (VO/Baic).

El modo de estiramiento (*stretching*) del carbonilo del ácido carboxílico perteneciente al grupo glucurónico se asignó a la banda muy intensa del espectro que aparece a 1728 cm^{-1} . Tras la deprotonación del grupo COOH, se forma el anión carboxilato y los dos enlaces CO se tornan equivalentes con igual longitud de enlace ($-COO^-$) apareciendo dos modos vibracionales correspondientes al estiramiento simétrico y antisimétrico de dicho grupo. Analizando los espectros y, teniendo como referencia la sal de sodio, se asignaron para dichos modos vibracionales, dos bandas de estiramiento, $\nu_{as}(COO^-)$ a 1583 cm^{-1} (NaBaic) y 1593 cm^{-1}

(VO/Baic) y $\nu_s(\text{COO}^-)$ a 1456 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} para NaBaic y VO/Baic, respectivamente (Tabla 3.1). Las posiciones de estas bandas indican que este grupo no está implicado en la coordinación con el centro metálico porque las bandas asociadas al anión carboxilato de la sal sódica y al complejo oxidovanadio(IV) aparecen en las mismas posiciones. Entonces, se pudo concluir que el grupo carboxilato del ligando de baicalina deprotonado no participa en la coordinación del catión oxidovanadio(IV).

Tabla 3.1. Asignaciones tentativas (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de Baicalina (Baic), sal de sodio de Baicalina (NaBaic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic).

Baic	NaBaic	VO/Baic	Asignaciones tentativas
1728 mf			$\nu(\text{C}=\text{O})$, carboxílico
1660 mf	1662 f	1662 h	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1612 f	1612 mf	1625 mf	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}2=\text{C}3)$, estiramiento del anillo A
1576 f	1583 f	1593 f	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1497 f, 1480 f	1487 m	1489 d	$\nu(\text{C}5-\text{O}5)$
1430 d	1456 m	1450 m	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1366 m, 1348 h	1357 m	1348 d	$\delta(\text{COH})$
1301 f	1295 m	1290 m	$\delta(\text{COH})$
1250 m	1244 m	1244 d	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{OH})$
1204 m	1189 m	1189 m	$\nu(\text{C}5-\text{O}5)$ (Albert y Serjeant, 1984)
1111 m	1104 h	1098 h	$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{endo}}$
1065 mf	1072 f	1062 f	$\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{exo}}$
1036 m	1057 h, 1021 h	1020 h	$\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
930 h	945 d	925 m, a	$\nu(\text{V}=\text{O})$

Intensidades relativas de las bandas: mf: muy fuerte, f: fuerte, m: media, d: débil, h: hombro, a: ancha. ν : vibración de estiramiento, δ : vibración de deformación.

La otra banda relacionada al modo de estiramiento del grupo carbonilo ($\text{C}4=\text{O}$ del anillo C) se asigna a la banda localizada en 1660 cm^{-1} para la baicalina (Looker y Hanneman, 1962). Se ha informado previamente que la coordinación de iones metálicos a este grupo produce una disminución de su orden de enlace y esto se observa como un corrimiento de la banda del

modo de estiramiento en el espectro IR hacia el rojo (Guo M. et al., 2014). Como puede observarse en la Tabla 3.1, la presencia del hombro localizado a 1662 cm^{-1} en el complejo VO/Baic indica que el catión oxidovanadio(IV) no interactúa de forma directa con este grupo.

Los mayores desplazamientos espectrales en el ligando por interacción con el metal involucran las bandas asignadas a los modos de estiramiento (*stretching*) y deformación (*bending*) de los grupos C-O y C-OH respectivamente (Tabla 3.1). En particular, la banda asignada al estiramiento C5-O5 se desplazó hacia el rojo cuando el átomo de H del grupo OH es sustituido por el ion oxidovanadio(IV), lo que indica la coordinación del ión metálico con este grupo (Li et al., 2013).

La posición de la banda de estiramiento V=O localizada a valores de frecuencias relativamente bajas (925 cm^{-1}) sugiere una coordinación de este catión a través de los átomos de oxígeno cis-deprotonados (Naso et al., 2016a) provenientes de los restos OH. Por lo tanto, puede concluirse que el catión oxidovanadio(IV) coordinó con el flavonoide a través de los dos grupos OH deprotonados situados en los átomos C5 y C6 del anillo A formando un anillo quelato (coordinación tipo “catecol”, véase Figura 1.4C). Esta interacción produjo una donación sigma de las cargas negativas de los OH deprotonados y por lo tanto el enlace V=O aumentó en longitud, desplazándose la banda de estiramiento al rojo, respecto a la frecuencia normal del catión oxidovanadio(IV) del VOSO_4 de 987 cm^{-1} (Selbin et al., 1963). Esta conclusión se apoya en las mediciones de los espectros EPR (sección 3.2.5).

Complejo VO/Api: en la Figura 3.5 se muestran los espectros vibracionales de infrarrojo FTIR de Apigenina (Api, véase Figura 1.7), su sal sódica (NaApi) y del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) y en la Tabla 3.2 se presentan las asignaciones tentativas de los mismos. La preparación de NaApi se realizó siguiendo la misma técnica que para NaBaic. A continuación se describen los principales cambios en el espectro infrarrojo durante la coordinación. La banda asignada al modo de estiramiento $\nu\text{ C=O}$ (1657 cm^{-1} en Api y 1660 cm^{-1} en NaApi) se desplaza a energías más bajas (1638 cm^{-1} en el complejo) como consecuencia del aumento de longitud del enlace C=O producido por coordinación con el catión oxidovanadio(IV). La deprotonación y coordinación con el O(5) está indicada por la presencia de la banda fuerte localizada a 1584 cm^{-1} en el ligando Api que desaparece tras la deprotonación y/o complejación. Las modificaciones del anillo A fueron asignadas por los desplazamientos de las bandas de 1612 cm^{-1} en Api y 1602 cm^{-1} en NaApi que aparece en 1596 cm^{-1} en el complejo. Las modificaciones del anillo C fueron asignadas debido a los desplazamientos de las bandas en 1556 cm^{-1} en Api y NaApi hacia menores frecuencias (1529

cm^{-1}) en el complejo. El desplazamiento de la banda asignada al modo de deformación $\delta(\text{CH})_{\text{ip}}$ (ip, en el plano) localizado a 1029 cm^{-1} en Api y en 1023 cm^{-1} en el NaApi hacia 1040 cm^{-1} en el complejo, indica la deformación estructural del anillo. Otro cambio observado en la formación del complejo, fue la modificación de la banda situada a 1243 cm^{-1} asociada al modo de estiramiento $\nu(\text{C-O-C})$ que cambia ligeramente con la complejación, indicando que el oxígeno del anillo del ligando no formaba enlaces metal-oxígeno con el ión metálico. La banda correspondiente a las vibraciones del anillo **B** que aparece en 1498 cm^{-1} no se vio afectada por la interacción de la apigenina con el centro metálico.

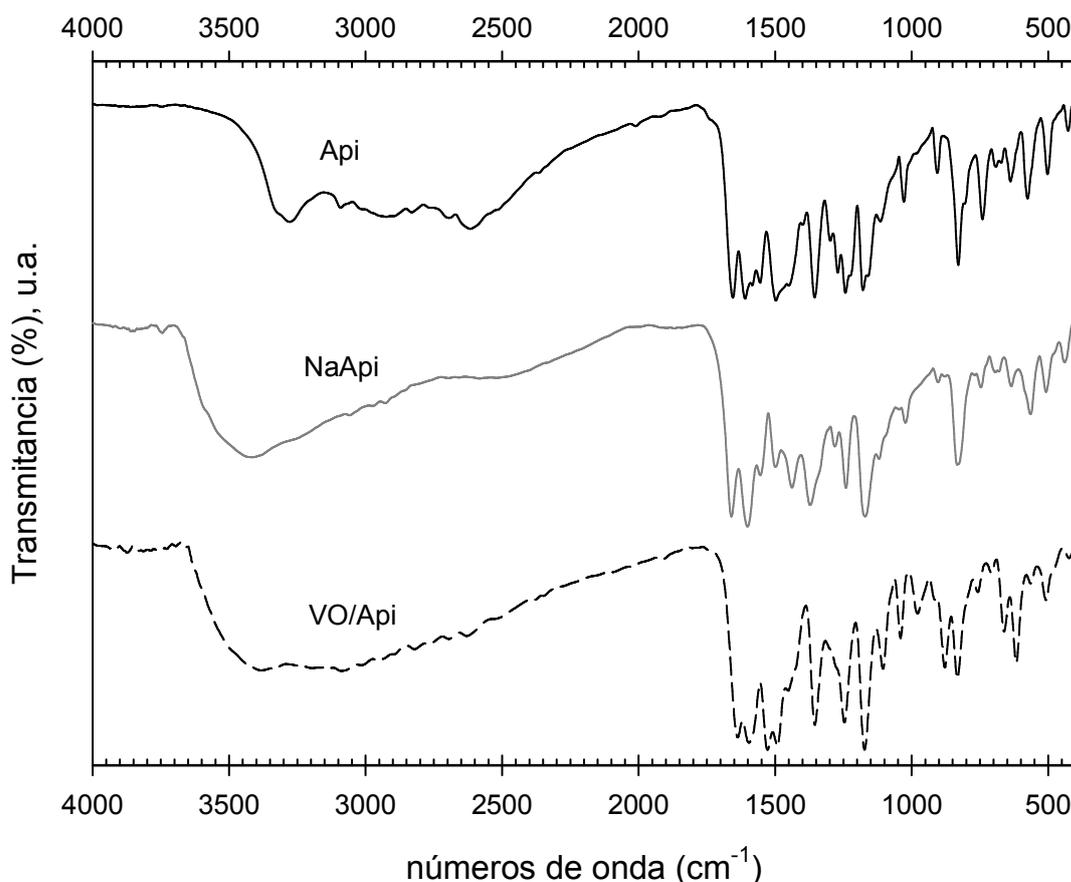


Figura 3.5. Espectros FTIR de Apigenina (Api), sal de sodio de Apigenina (NaApi) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api).

La posición de la banda de estiramiento $\nu\text{V}=\text{O}$ asignada a localizada en 977 cm^{-1} es típica para una esfera de coordinación conformada por grupos (CO, O⁻) del flavonoide (coordinación tipo "acetilacetona", véase Figura 1.4A). En este caso, la resonancia del sistema pi con el anillo aromático genera que este enlace sea más fuerte y más corto que en el caso del complejo VO/Baic (coordinación por O⁻,O⁻) y la frecuencia de estiramiento V=O aparece desplazada al azul. Esta conclusión se apoya también en las mediciones de los espectros EPR (sección 3.2.5).

Por consiguiente, los resultados del análisis del espectro vibracional, sugieren que la coordinación del ion oxidovanadio(IV) con el ligando apigenina se produjo muy probablemente a través del oxígeno del grupo carbonilo y del grupo 5-OH deprotonado formando enlaces metal-oxígeno en el complejo.

Tabla 3.2. Asignaciones tentativas (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de Apigenina (Api), sal de sodio de Apigenina (NaApi) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api).

Api	NaApi	VO/Api	Asignaciones tentativas
3322 h, 3279 m	3417 m	3380 m	$\nu(\text{O-H})$ Puente de Hidrógeno
3092 m	3058m	3087m	$\nu(\text{C-H})$
2922 m, 2831m	2974 m, 2925 m, 2855 m	2954 m, 2893 m, 2822 m	$\nu(\text{C-H})$
2762 m, 2695 m, 2616 f		2766 m, 2693 m, 2630 m	Puente de Hidrógeno
1657 mf	1660 mf	1638 mf	$\nu(\text{C=O})$
1612 mf	1602 mf	1596 mf	$\nu(\text{C=O}) + \nu(\text{C}_2=\text{C}_3)$, estiramiento del anillo A
1584 f	1582 h	--	$\delta(\text{OH}) +$ estiramiento del anillo
1556 f	1556 mf	1529 mf	$\nu(\text{C=C})$, Anillo C
1498 mf	1499 m	1492 mf	$\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}, \nu(\text{C=C})$
1447 f	1439 m	1452 m	$\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}, \nu(\text{C=C})$
1355 mf	1372 f, 1340 h	1353 f	$\nu(\text{C-OH}) + \nu(\text{CC})$
1243 mf	1241 f	1246 f	$\nu(\text{C-O-C}), \nu(\text{C-OH})$
1223 f	--	--	$\nu(\text{CH})_{\text{en el plano}}, \delta(\text{OH})$
1178 mf, 1159 h	1169 mf	1171 mf	$\delta(\text{C-OH})_{\text{en el plano}}$
1114 m	1121 m	1104 m	$\nu(\text{C-OH}), \delta(\text{C-H})_{\text{anillo aromático}}$
1029 m	1023 d	1040 m	$\delta(\text{CH})_{\text{en el plano}}$
--	--	977 m	$\nu(\text{V=O})$

Intensidades relativas de las bandas: mf: muy fuerte, f: fuerte, m: media, d: débil, h: hombro. ν : vibración de estiramiento, δ : vibración de deformación.

Complejo Cu/5-HTP: en la Figura 3.6 se muestran los espectros vibracionales de infrarrojo FTIR de 5-Hidroxitriptófano (5-HTP, véase Figura 1.8) y el complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) y en la Tabla 3.3 se presentan las asignaciones tentativas de los mismos. Estas asignaciones se basan en reportes previos de 5-HTP (Ituen et al., 2017), L-Triptófano (Cao y Fischer, 1999) y el complejo de Cobre(II) con L-Triptófano (Wagner y Baran, 2004).

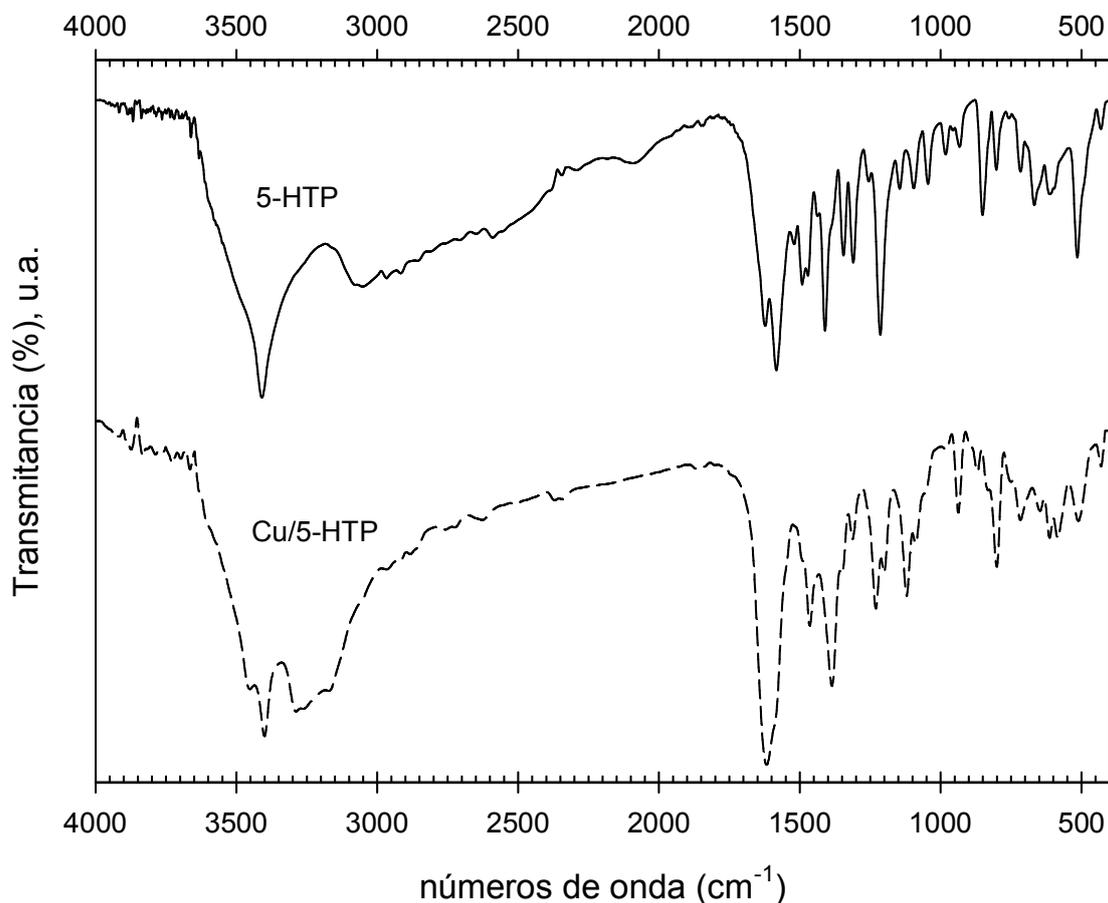


Figura 3.6. Espectros FTIR de 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP).

La presencia de las bandas características de los modos de estiramiento y deformación, $\nu(\text{NH}_3^+)$, $\nu(\text{COO}^-)$ y $\delta(\text{NH}_3^+)$, en el ligando libre confirmaron la existencia del 5-HTP en la forma de zwitterion en el estado sólido así como las bandas anchas en la región $2900\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ indican la presencia de puentes de hidrógeno. Los modos de vibración del grupo OH en el C-5 aparecieron tanto en el ligando como en el complejo. En el complejo, los modos de estiramiento de los grupos $\nu\text{O-H}$ y $\nu\text{C-O}$ se localizan en 3455 cm^{-1} y 1230 cm^{-1} , respectivamente y el modo de deformación δCOH en 1199 cm^{-1} . Luego de la deprotonación y complejación, pudieron observarse las vibraciones debidas al grupo amina $-\text{NH}_2$, $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ y

$\nu_s(\text{NH}_2)$, donde la posición de las mismas indica que dicho grupo está involucrado en la unión al centro metálico. Además, la banda de vibración $\nu(\text{C-N})_{\text{alifático}}$ apareció más afectada que la del $\nu(\text{C-N})_{\text{indol}}$, sugiriendo que el átomo de nitrógeno del grupo indol no está involucrado en la formación del complejo.

Tabla 3.3. Asignaciones tentativas (en cm^{-1}) de las principales bandas en el espectro infrarrojo de 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y del complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP).

5-HTP	Cu/5-HTP	Asignaciones tentativas
3490 h	3455 m	$\nu(\text{OH})$
3410 mf	3400 f	$\nu(\text{N-H})$
--	3289 m, 3264 m	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$
--	3172 m	$\nu_s(\text{NH}_2)$
3072 m	--	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$
3052 m	--	$\nu_s(\text{NH}_3^+)$
1623 f	1619 mf	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$
1584 mf		$\delta(\text{NH}_3^+)$
--	1588 h	$\delta(\text{NH}_2)$
1492 m	--	$\delta(\text{NH}_3^+)$
1472 m	1465 m	$\delta(\text{CH}_2)$
1412 f	1387 f	$\nu_s(\text{COO}^-)$
1346 m	1348 m	$\nu(\text{C-N})_{\text{indol}}$
1310 m	1312 m	$\delta(\text{CH})$
1257 d	1230 m	$\nu(\text{C-O})$
1214 f		$\nu(\text{C-O}) + \rho(\text{NH}_3^+)$
	1199 m	$\rho(\text{NH}_2) + \delta(\text{COH})$
1096 d	1120 m, 1089 m	$\nu(\text{CC}) + \nu(\text{C-N})_{\text{alifático}}$
1045 d, 982 d, 933 d	1052 md, 937 m	Modos del anillo
851 m	869 md, 834 h	$\rho(\text{CH}_2)$
802 d	801 m	$\delta(\text{COO}^-)$

Intensidades relativas de las bandas: mf: muy fuerte, f: fuerte, m: media, d: débil, md: muy débil, h: hombro.
 v: vibración de estiramiento; δ : vibración de deformación; ρ : vibración de deformación.

Por otra parte, las modificaciones en la posición de la bandas del grupo carboxilato confirmaron la unión de este grupo al cobre. Las vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo -COO^- ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$) asignadas al 5-HTP (zwitterion) se desplazaron a valores más bajos de frecuencia luego de la coordinación. Se conoce que la diferencia $\Delta\nu = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, es usada como un criterio para establecer el modo de coordinación del grupo COO^- al metal (Deacon y Phillips, 1980). El valor de $\Delta\nu$ para el complejo (232 cm^{-1}) resulta mayor que el valor de $\Delta\nu$ para el ligando (211 cm^{-1}), en concordancia con un modo de coordinación unidentado del carboxilato. Estos resultados sugieren que la coordinación del ión cobre(II) con el ligando 5-HTP se produjo a través de los grupos carboxilato (COO^-) y amino (NH_2) del resto aminoácido de la molécula. Esta conclusión es apoyada por determinaciones de EPR en solución (sección 3.2.5).

3.2.4. Espectroscopía de reflectancia difusa.

La espectroscopía de reflectancia difusa es una técnica complementaria que ayuda a reforzar la propuesta del modo de coordinación del metal para el complejo en estado sólido. Como podrá apreciarse, las posiciones de las bandas concuerdan razonablemente bien con las esferas de coordinación propuestas para cada uno de ellos.

Complejo VO/Baic: en el espectro de reflectancia difusa (Figura 3.7) se observan dos bandas localizadas en 440 nm y la otra, a longitud de onda mayor a 800 nm y también un hombro en 660 nm. La posición de las mismas se correlaciona con una coordinación del oxidovanadio(IV) en un entorno de átomos de oxígeno (Uivarosi et al., 2010).

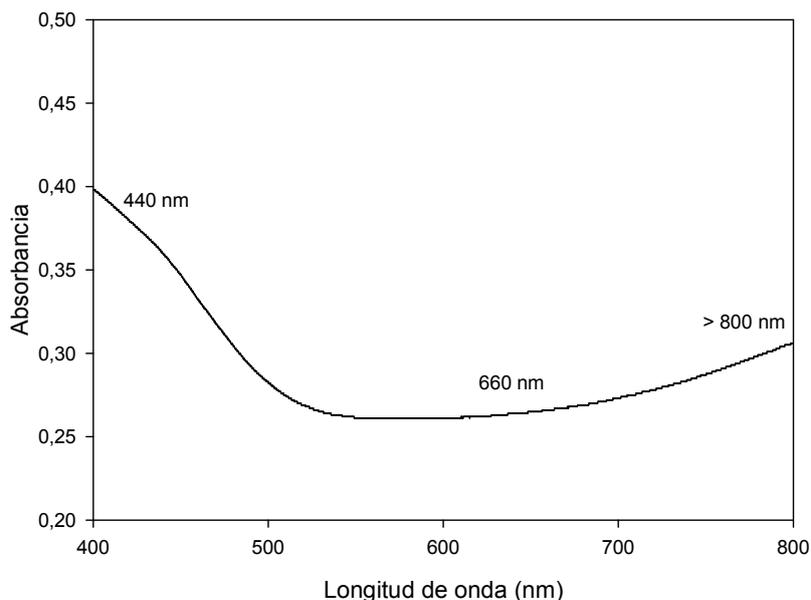


Figura 3.7. Espectro de reflectancia difusa del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic).

Complejo VO/Api: en el espectro de reflectancia difusa (Figura 3.8) se observan dos bandas, una en 453 nm y la otra a una longitud de onda mayor a 800 nm y varios hombros (268 nm, 360 nm y 395 nm), indicando nuevamente un entorno oxigenado alrededor del catión metálico.

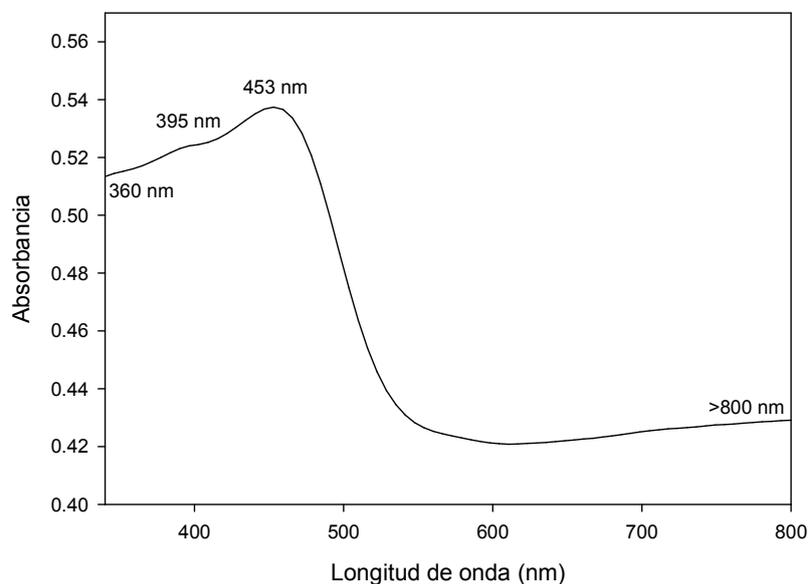


Figura 3.8. Espectro de reflectancia difusa del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api).

Complejo Cu/5-HTP: en el espectro de reflectancia difusa (Figura 3.9) se observan dos bandas definidas localizadas en 360 nm y 615 nm. La presencia de interacciones entre los centros metálicos en el Cu/5-HTP se puede suponer por la aparición de la banda típica de alta

intensidad alrededor de 360 nm (Etcheverry et al., 2012), en concordancia con lo observado en las determinaciones de EPR (sección 3.2.5). La banda de 615 nm se encuentra en una posición similar a la transición observada en el espectro visible del complejo de Cu(II) con el aminoácido triptófano (Wagner y Baran, 2004), indicando una esfera de coordinación típica de Cu con los grupos -NH_2 y -COO^- de los aminoácidos.

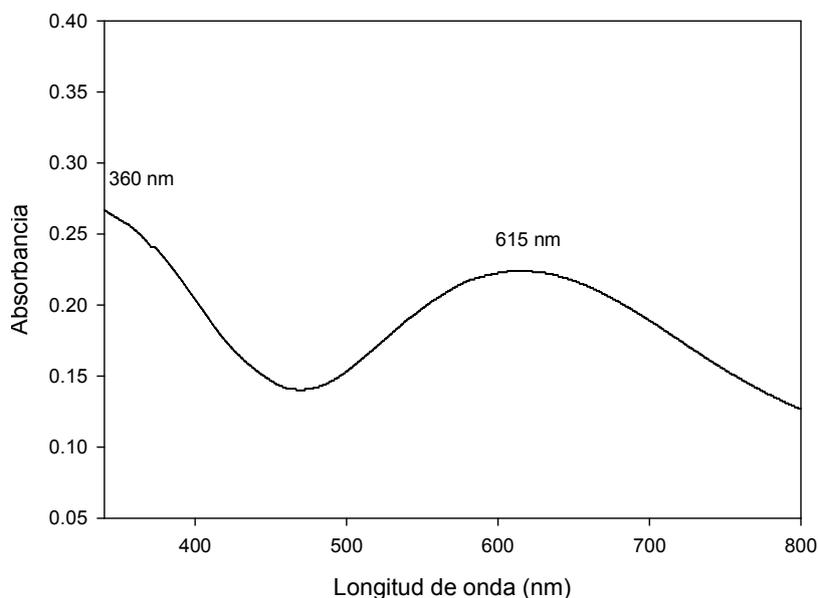


Figura 3.9. Espectro de reflectancia difusa del complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP).

3.2.5. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).

La resonancia paramagnética electrónica es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados. En ese sentido es ideal para estudiar tanto al catión oxidovanadio(IV) (d^1) como al catión cobre(II) (d^9). Los datos experimentales que resultan de un espectro de EPR son las componentes del tensor giromagnético (g) y la constante de acoplamiento hiperfino (A), que permiten deducir la simetría del entorno sobre el sitio magnético, el estado fundamental del ion metálico, el grado de deslocalización electrónica así como también la naturaleza de los ligandos. Por esos motivos, se convierte en una técnica relevante para el estudio del entorno de coordinación de los complejos metálicos tanto en estado sólido como en solución. Sobre la base de estos conceptos, a partir de los parámetros de EPR fueron propuestas las esferas de coordinación para cada uno de los complejos en estudio, las que presentan muy buena correlación con los datos espectroscópicos de infrarrojo y de reflectancia UV-visible.

Complejo VO/Baic: para obtener una visión más profunda del entorno del ión oxidovanadio(IV), se realizaron mediciones espectroscópicas de EPR, trabajando con el polvo microcristalino a 293 K (Figura 3.10). El espectro EPR del VO/Baic dio un patrón de desdoblamiento hiperfino de ocho líneas debido al electrón desapareado del núcleo ^{51}V ($I=7/2$), siendo generalmente indicativo de la presencia de una única especie mononuclear de oxidovanadio(IV) en el complejo sólido. El espectro experimental en polvo puede ser bien simulado sobre la base de una simetría axial. La simulación (Figura 3.10) predice que la señal observada se origina por la presencia de un cromóforo de vanadio que resulta consistente con el ion oxidovanadio(IV) en un campo de ligando cuasi axial o pseudoaxial. Los parámetros experimentales obtenidos fueron $g_z = g_{\parallel} = 1,9565$; $A_z = A_{\parallel} = 154,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $g_x = g_y = g_{\perp} = 1,9785$; $A_x = A_y = A_{\perp} = 50,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Para calcular la magnitud de A_z , se utilizó la relación de aditividad para los complejos de oxidovanadio(IV), $A_z = \sum n_i A_{z,i}$, introducida por Chasteen (1981). En esta ecuación, n_i es el número de ligandos ecuatoriales de tipo i y $A_{z,i}$ es la contribución al acoplamiento hiperfino paralelo del entorno de coordinación más probable. Esta constante puede proporcionar la identidad de los conjuntos de donadores ecuatoriales coordinados con el catión VO^{2+} dada la contribución específica de cada grupo donante y la suma de las contribuciones de los cuatro ligandos ecuatoriales puede compararse con el valor experimental observado. Teniendo en cuenta el conjunto de donantes probable y esperado, considerando cuatro grupos ArO^- con una contribución a $A_z = \text{ArO}^- = 38,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, se calculó el valor de A_z de $154,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, el que resulta en concordancia con el valor experimental. Por lo tanto, se sugiere un modo de unión que implica una esfera de coordinación ecuatorial con dos átomos de oxígeno de dos grupos ArO^- de cada resto flavonoide (del anillo **A**). Esta coordinación coincide con las características espectrales bien conocidas de los complejos VO^{2+} bis quelatos en los que dos restos 1,2-diolato de un ligando están unidos al catión oxidovanadio(IV). Este modo de coordinación $2 \times (\text{O}^-, \text{O}^-)$ tipo “catecol” del VO^{2+} es reconocido para complejos de coordinación con azúcares y sus derivados conteniendo al menos los ligandos un par de grupos hidroxilo en posición -cis deprotonados (Garribba et al., 2001).

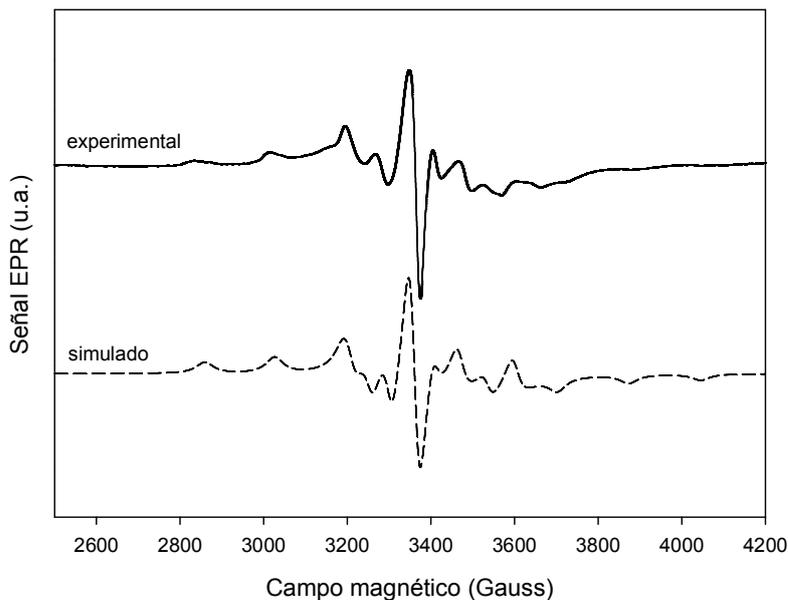


Figura 3.10. Espectros EPR (experimental y simulado) del sólido de $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) a temperatura ambiente (293 K) medido en banda X. Frecuencia de microondas de 9,459 GHz.

Además, se ha reportado que el flavonoide baicaleína (la aglicona de baicalina, véase Figura 1.6) también forma complejos aniónicos pentacoordinados (véase Figura 1.5A) en solución con el catión VO^{2+} mostrando una geometría piramidal de base cuadrada y una coordinación $2 \times (\text{O}^-, \text{O}^-)$ o tipo “catecol” (véase Figura 1.4C) a valores de pH superiores a 7,4, con parámetros espectrales de EPR similares al complejo de baicalina ($g_{\parallel} = 1,954$; $A_{\parallel} = 155,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). El reporte sugiere que este tipo de coordinación se produce a través de los grupos C-O⁻ del anillo A en las posiciones 6 y 7 (o 5 y 6) para la baicaleína. En este caso, con el enlace glucosídico situado en la posición 7, pudimos determinar que la coordinación del ligando con el metal se produjo inequívocamente a través de los grupos 5 y 6 del anillo A (Sanna et al., 2014).

Complejo VO/Api: la Figura 3.11 muestra el espectro EPR del sólido obtenido a temperatura ambiente. Se obtuvo un espectro muy similar a baja temperatura (no mostrado). El espectro de EPR del polvo microcristalino de VO/Api da una señal isotrópica, que no muestra el patrón de desdoblamiento hiperfino típico de ocho líneas que se presenta para el núcleo de ^{51}V ($I = 7/2$). Este hecho indica la presencia de interacciones magnéticas entre los iones paramagnéticos de oxidovanadio(IV) en el complejo sólido, que colapsan la interacción hiperfina. Se ha

encontrado un comportamiento similar para los complejos VO/naringenina (Islas et al., 2015) y VO/quercetina (Ferrer et al., 2006), obtenidos previamente en el grupo de trabajo.

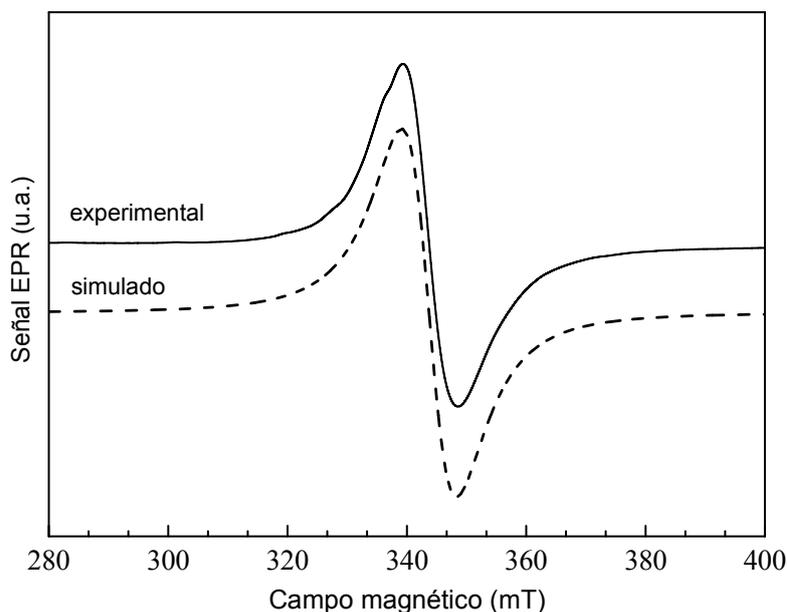


Figura 3.11. Espectros EPR (experimental y simulado) del sólido de $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) obtenido a temperatura ambiente (293 K). Frecuencia de microondas 9,4565 GHz.

Complejo Cu/5-HTP: en la Figura 3.12 se muestra el espectro EPR de una muestra de polvo de Cu/5-HTP medida a temperatura ambiente, junto con la simulación. El espectro EPR del polvo microcristalino muestra valores axiales para el parámetro g ($g_x = g_y = g_{\perp} = 2,061$, $g_z = g_{\parallel} = 2,226$) que resultan típicos de una especie Cu(II) ($S = 1/2$) en geometrías octaédrica alargada, cuadrado piramidal o cuadrado plana, donde el estado fundamental es el orbital $d_{x^2-y^2}$ (Neuman et al., 2012). A baja temperatura (120 K), el espectro muestra las mismas características (datos no mostrados). Aunque no se pudo observar una señal de EPR con una estructura hiperfina resuelta (Figura 3.12), para realizar la simulación se tuvo que tener en cuenta un valor para la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino (A_{\parallel}) menor que un valor A_{\parallel} típico para el ion Cu(II) en un entorno cuadrado plano. El hecho de que no se pueda observar una estructura hiperfina resuelta es compatible con la presencia de interacción entre centros metálicos (típicos de centros de cobre en una red extendida), donde la interacción de intercambio colapsa la interacción hiperfina típica de 4 líneas con el núcleo de Cu(II) ($I = 3/2$).

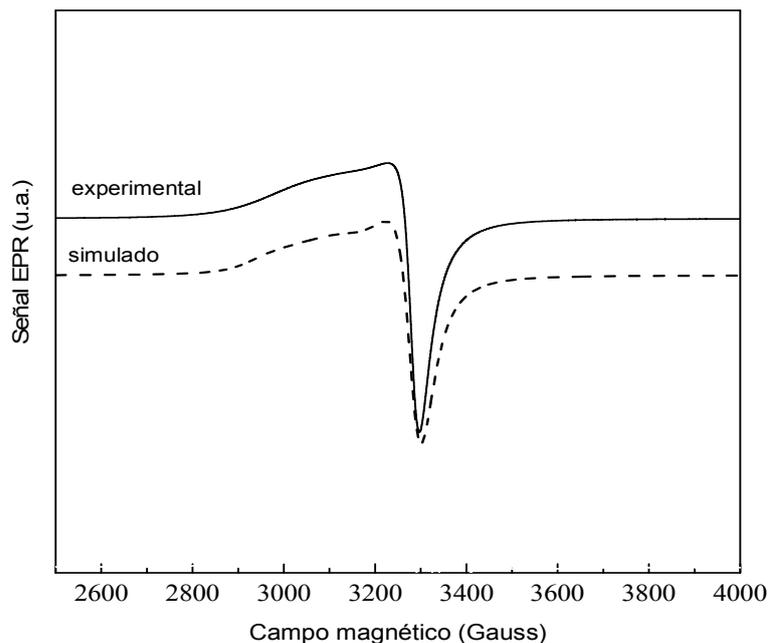


Figura 3.12. Espectros EPR (experimental y simulado) del sólido de $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Cu}/\text{5-HTP}$) obtenido a temperatura ambiente (295 K). Frecuencia de microondas 9,459 GHz.

3.3. Caracterización en solución.

3.3.1. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).

Como parte de las ventajas que ofrece la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) está el hecho de poder también establecer el entorno de coordinación y la geometría del complejo que se forma luego de la disolución del mismo en el solvente adecuado. De esa forma es posible inferir si la estructura del complejo sólido se retiene en solución o si ocurre algún cambio debido a la interacción con el solvente. En particular, el solvente utilizado para los ensayos biológicos es el DMSO y como podrá apreciarse a continuación, los datos muestran que la esfera de coordinación se mantiene tras la disolución del compuesto sólido.

Complejo VO/Baic: para determinar si la estructura del complejo sólido se retuvo en solución, el espectro EPR (banda X) se midió a partir de la disolución del complejo sólido en DMSO (120 K, 1,25 mM). La señal EPR (Figura 3.13) muestra el espectro con un patrón típico de ocho líneas para los sistemas de oxidovanadio(IV).

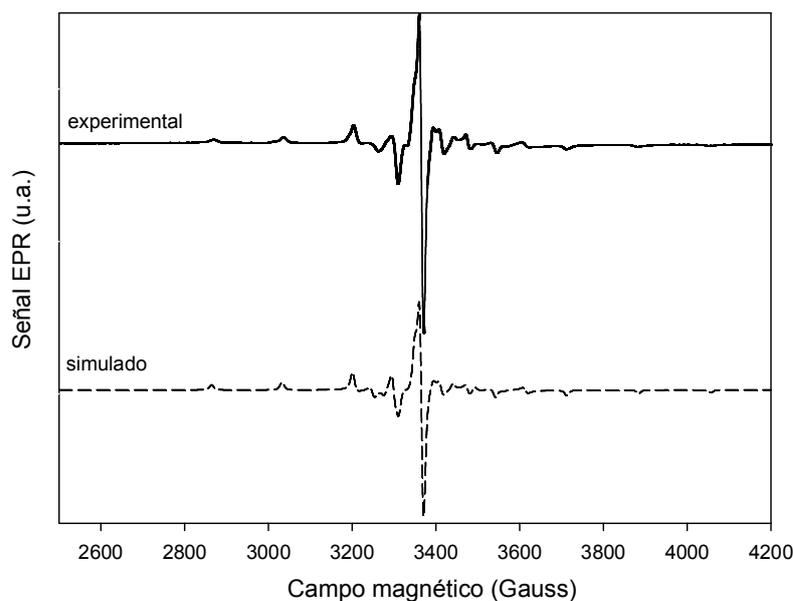


Figura 3.13. Espectros EPR (experimental y simulado) de una solución congelada de $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) en DMSO (1,25 mM) registrado a 120 K. Frecuencia de microondas de 9,452 GHz.

El espectro experimental de la solución puede ser bien simulado asumiendo una simetría del tipo rómbica. Esta señal indicó la presencia de especies mononucleares únicas después del proceso de disolución. La simulación espectral (Figura 3.13) predijo la formación de un cromóforo de oxidovanadio(IV) con parámetros Hamiltonianos de spin $g_z = 1,9505$, $g_x = 1,9824$ y $g_y = 1,9762$ y constantes de acoplamiento hiperfina de $A_z = 155,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_x = 39,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $A_y = 53,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. El valor de A_z calculado es indicativo de una esfera de coordinación similar a la del complejo sólido, mostrando que no se producen cambios en la esfera de coordinación del metal tras la disolución del compuesto sólido.

Complejo VO/Api: la Figura 3.14 muestra el espectro de EPR obtenido de una solución de DMSO a 120 K. La señal de EPR muestra el espectro con un patrón típico de ocho líneas para los sistemas de cationes de oxidovanadio(IV). El espectro experimental de la solución puede ser bien simulado asumiendo simetría rómbica. Esta señal indicó la formación de especies mononucleares individuales después del proceso de disolución. La simulación espectral predijo la formación de un cromóforo de oxidovanadio(IV) con parámetros Hamiltonianos de $g_z = 1,9439$, $g_x = 1,9767$ y $g_y = 1,9717$ y constantes de acoplamiento hiperfina de $A_z = 166,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_x = 52,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $A_y = 61,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

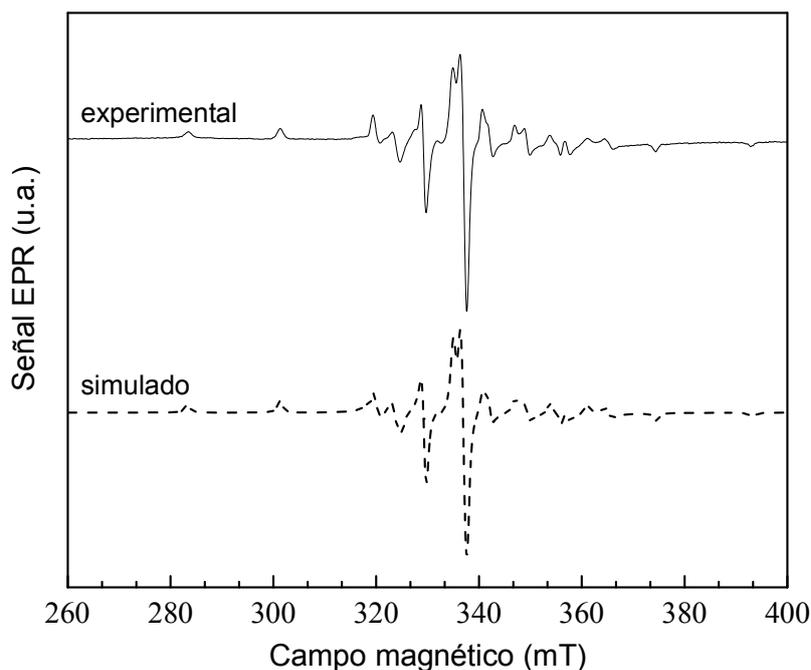


Figura 3.14. Espectros EPR (experimental y simulado) de una solución congelada de $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) en DMSO (1,25mM) registrado a 120 K. Frecuencia de microondas de 9,462 GHz.

Sobre la base de lo estudiado por vía espectroscópica, asumiendo ese entorno de coordinación, y suponiendo que las dos moléculas de coordinación de agua fueron sustituidas por dos moléculas de disolvente (DMSO) en el plano ecuatorial, se utilizó nuevamente la regla de aditividad (Chasteen, 1981) obteniéndose un valor calculado de $A_z = 169,9 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O} = 44,7 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$, $\text{ArO}^- = 38,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$, $\text{O}_{\text{DMSO}} = 43,3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ (Ando et al., 2003)) el que correlaciona muy bien con el valor A_z experimental.

Complejo Cu/5-HTP: el espectro EPR de una solución congelada de Cu/5-HTP en DMSO a 120 K, junto con la simulación, se muestra en la Figura 3.15. Se sabe que los espectros EPR de compuestos paramagnéticos puros (es decir, sistemas en los que los centros paramagnéticos no están diluidos) están dominados por interacciones entre los centros y por lo tanto brindan poca información sobre los centros individuales (Rizzi et al., 2016). Cuando se quiere recopilar información sobre las propiedades electrónicas del ion individual, hay que registrar espectros en solución o muestras dopadas, donde los iones metálicos no están interactuando. Este es el caso del espectro mostrado en la Figura 3.15, que muestra un espectro de EPR cuasi axial ($g_x = 2,058$, $g_y = 2,045$, $g_z = 2,249$) con estructura hiperfina claramente resuelta de 4 líneas ($A_x =$

$12,9 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$, $A_y = 20,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$, $A_z = 179,3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$) debido a la interacción del spin del electron desapareado con el núcleo de Cu(II) ($I = 3/2$). Estos resultados indican un estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ y la formación de una única especie mononuclear después de la disolución. De acuerdo con la correlación de Peisach Blumberg (Peisach y Blumberg, 1974), los valores $A_{//}$ y $g_{//}$ encontrados en la simulación del espectro son compatibles con un ion cobre(II) en un entorno de coordinación 2N-2O, en concordancia con los resultados del análisis del espectro FTIR (sección 3.2.3).

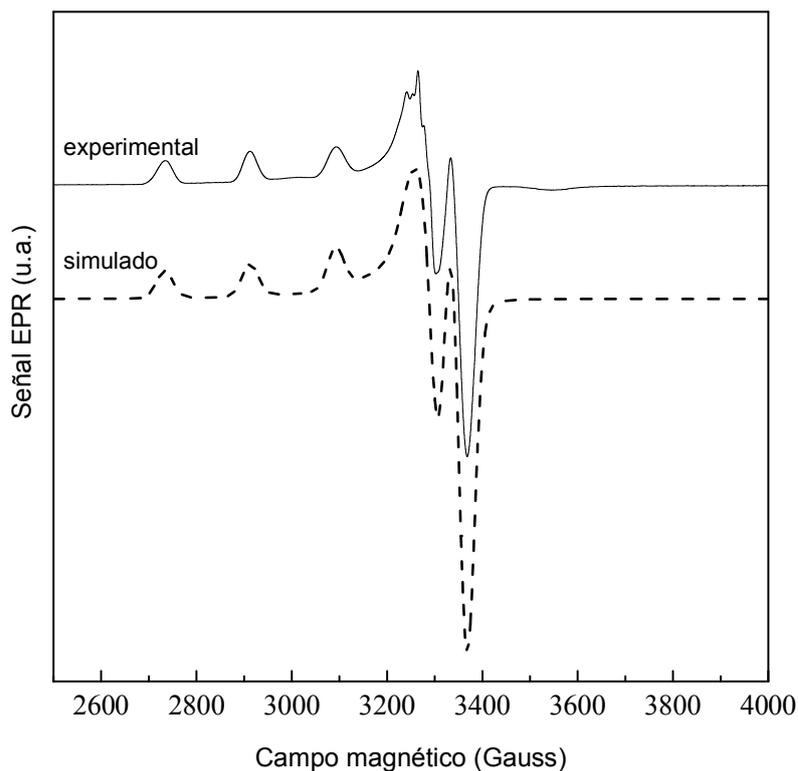


Figura 3.15. Espectros EPR (experimental y simulado) de una solución congelada de $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) en DMSO (1,25mM) registrado a 120 K. Frecuencia de microondas de 9,453 GHz.

3.3.2. Espectroscopía UV-vis.

Las bandas de absorción observadas en los espectros electrónicos de los complejos de coordinación pueden estar asociadas a: (i) transiciones del tipo d-d entre niveles energéticos localizados esencialmente en el ion metálico, (ii) bandas de transferencia de carga que involucran tanto a orbitales del metal como del ligando y, (iii) transiciones internas de los ligandos (transiciones electrónicas entre los O.M. del ligando).

La posición de las bandas de absorción correspondientes a las transiciones d-d, puede dar información sobre el tipo y característica de los ligandos, así como sobre el estado de

oxidación del metal; mientras que su forma e intensidad (coeficiente de absortividad molar, ϵ) proporcionan evidencias sobre la geometría de la esfera de coordinación así como sobre el grado de deslocalización electrónica.

Por este motivo, esta técnica resulta de gran valor al momento de estudiar las especies químicas presentes en solución así como la estabilidad de las mismas en dicho medio.

3.3.2.1. Variaciones espectrales en función del pH para los ligandos y los complejos.

A continuación se presentan los resultados del estudio de variaciones espectrales determinadas en solución y en función del pH para cada sistema. En líneas generales, las variaciones espectrales indican los procesos de deprotonación y/o coordinación permitiendo la selección del pH de síntesis de los diferentes complejos. Para cada complejo se seleccionó el pH de síntesis en el que existe una especie única.

Complejo VO/Baic: los espectros de absorción UV-vis de una solución acuosa de Baic a diferentes valores de pH fueron descritos previamente (Liang et al., 2009). La Figura 3.16 muestra los datos espectrales obtenidos para una disolución de Baic 5×10^{-5} M en DMSO/EtOH (1/100) a diferentes valores de pH.

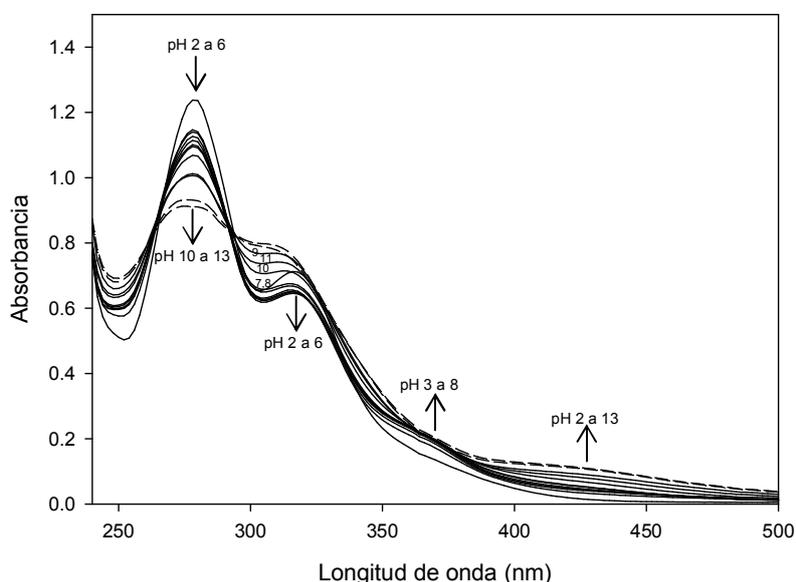


Figura 3.16. Espectro UV-vis de una solución de Baicalina (5×10^{-5} M) en DMSO/Etanol (1/100) para diferentes valores de pH.

A valores de pH inferiores a 6 se observaron dos bandas a 279 nm (relacionadas con el anillo **A**, benzoílo, $n \rightarrow \pi^*$) y 316 nm (relacionadas con el anillo **B**, cinamoílo, $\pi \rightarrow \pi^*$)

(véase Figura 1.3). La banda de mayor energía disminuyó su intensidad de valores de pH de 2 a 6. La banda relacionada con el anillo **B** se corre a menores longitudes de onda (306 nm) a valores de pH superiores a 7. Los cambios espectrales más importantes aparecieron a valores de pH superiores a 7, en los que se produce la deprotonación de C-6OH generando una banda de transferencia de carga a 420 nm debido a la donación de electrones al anillo. Debido al enlace de hidrógeno intramolecular entre los grupos $5\text{-OH}\cdots\text{O4}=\text{C}$ que estabilizan el grupo 5-OH en su forma ácida, la deprotonación del grupo C-5OH se produjo a valores de pH superiores al del grupo hidroxilo situado en C6 ($\text{pK}_{\text{a}1}=7,6$; $\text{pK}_{\text{a}2}=10,1$) (Liang et al., 2009). La ionización del grupo carboxílico (del ácido glucurónico) ocurre a valores de pH inferiores a 5 y no afecta el patrón espectral de la Baic.

A una concentración 100 veces superior del flavonoide (5×10^{-3} M) se detectó una nueva banda a aproximadamente 600 nm (ϵ , $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 8) (Figura 3.17). A mayores valores de pH, esta banda se desplaza hacia el azul indicando que se produjo una nueva deprotonación en el ligando (567 nm, $\epsilon = 34 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH = 9).

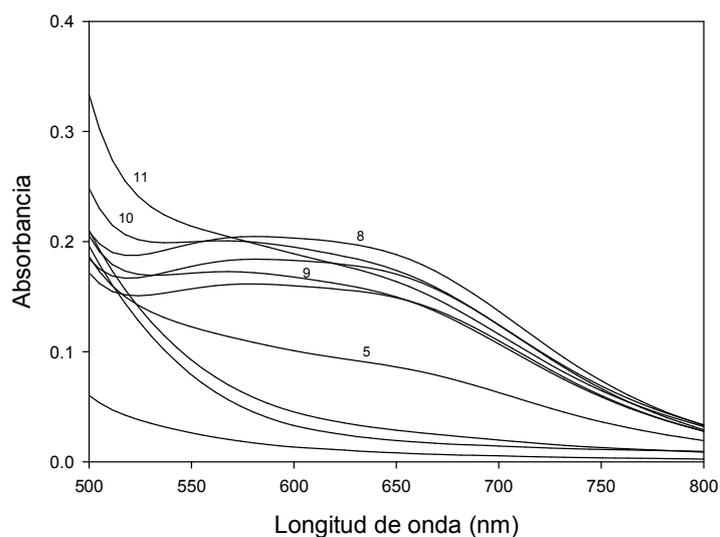


Figura 3.17. Espectro Visible de una solución de Baicalina (5×10^{-3} M) en DMSO para diferentes valores de pH.

Los cambios espectrales UV-vis de una disolución de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \times 10^{-5}$ M) y Baic (5×10^{-5} M) en DMSO/EtOH (1/100) a diferentes valores de pH, representados en la Figura 3.18, mostraron un patrón similar al del ligando.

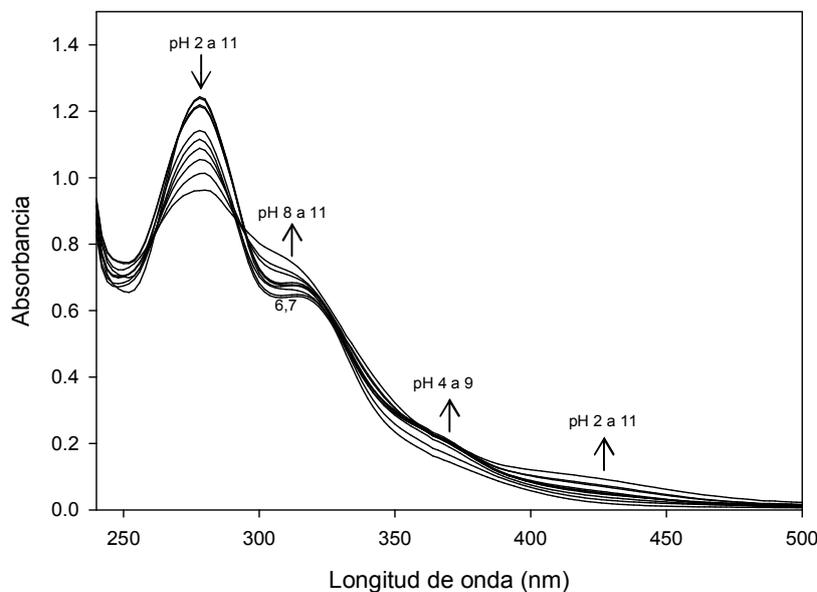


Figura 3.18. Espectro UV-vis de una solución de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \times 10^{-5}$ M) y Baicalina (5×10^{-5} M) en DMSO/Etanol (1/100) para diferentes valores de pH.

Cuando la concentración de la solución es 100 veces mayor es posible observar el espectro electrónico del catión de oxidovanadio(IV) en la región del visible. Las bandas a 610 nm ($372 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 795 nm ($516 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) hasta pH 5 son similares a las observadas en el espectro de un complejo carboxilato-oxidovanadio(IV) (Figura 3.19) (Ferrer et al., 1993). A pH 9 se observa una banda única a 610 nm ($204 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A pesar de que la parte visible del espectro a alta energía está enmascarada por la banda intensa de la región UV, este espectro podría compararse con el de una esfera de coordinación con grupos (O^-, O^-) ligados al catión VO^{2+} (Etcheverry et al., 1997). La banda del ligando a 600 nm es de menor intensidad y no interfiere con estas observaciones.

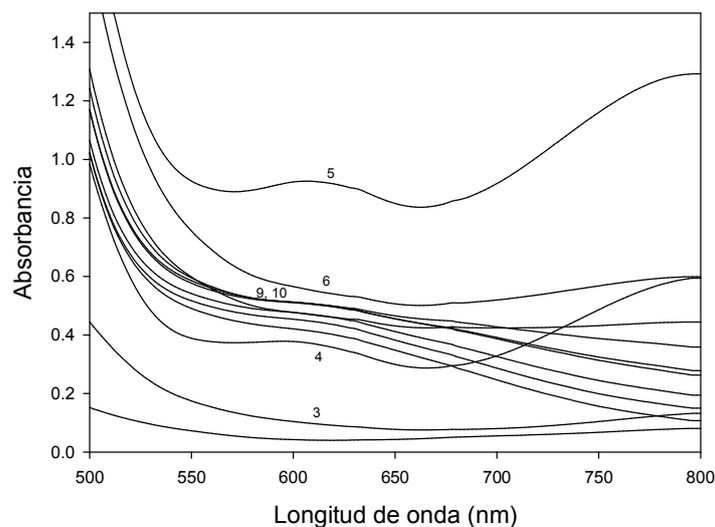


Figura 3.19. Espectro Visible de una solución de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \times 10^{-3}$ M) y Baicalina (5×10^{-3} M) en DMSO para diferentes valores de pH.

Complejo VO/Api: los espectros UV-vis del ligando y del complejo fueron medidos en DMSO/Etanol (1/100). Para el flavonoide apigenina se han reportado dos pasos de disociación ácido-base: $\text{pK}_{a1} = 6,61 \pm 0,07$ y $\text{pK}_{a2} = 9,31 \pm 0,07$ (Favaro et al., 2007). A valores de pH hasta 8 el ligando presenta dos bandas principales de absorción en la región UV-vis, a 340 nm (banda I) que representa la absorción del anillo **B** (sistema cinamoílo) y la absorción en 269 nm (banda II) asociada con la porción de anillo **A** (sistema benzoílo), las que están relacionadas con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente (véase Figura 1.3). A valores de pH superiores a 9, el espectro de absorción se desplaza a mayor longitud de onda, de 345 nm a 390 nm (pH 9 a 11) (banda I) como se muestra en la Figura 3.20. Se observa que la deprotonación causa un cambio bastante grande probablemente debido a la extensión del sistema conjugado establecido por los grupos de ArO^- deprotonados.

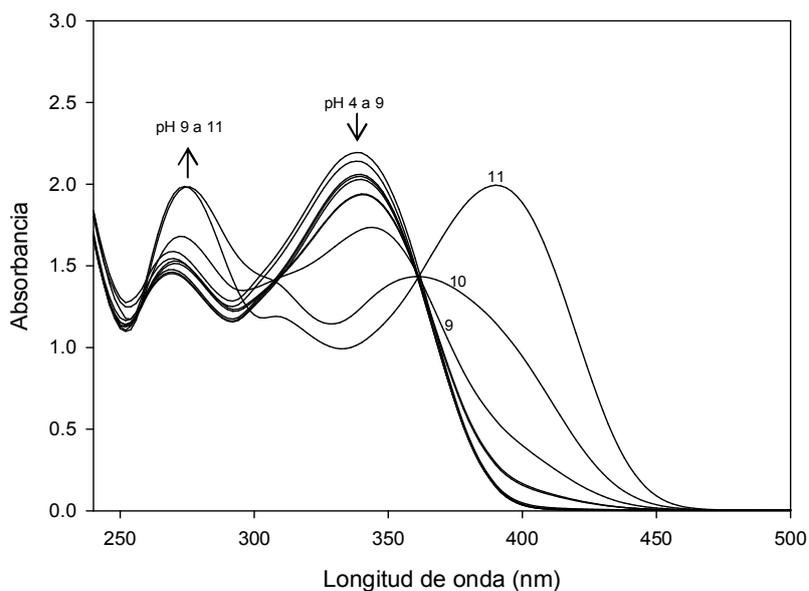


Figura 3.20. Espectro UV-vis de una solución de Apigenina (1×10^{-4} M) en DMSO/Etanol (1/100) para diferentes valores de pH.

Para estudiar con más detalle la interacción, se determinaron los espectros UV-Vis de una mezcla 1:1 de Api:VO²⁺ (Figura 3.21) los que mostraron un patrón espectral similar al del ligando en la región de 250-500 nm. Comparando ambas variaciones espectrales se puede demostrar que tanto la deprotonación como la coordinación indujeron los cambios espectrales que son similares en la región espectral UV-vis.

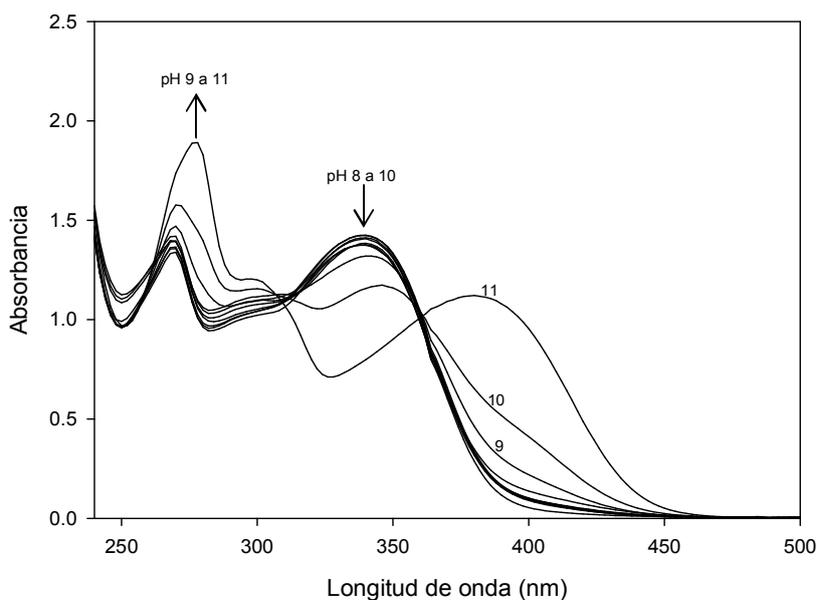


Figura 3.21. Espectro UV-vis de una solución de VOCl₂·H₂O (1×10^{-4} M) y Apigenina (1×10^{-4} M) en DMSO/Etanol (1/100) para diferentes valores de pH.

Trabajando con soluciones 100 veces más concentradas se pueden observar las transiciones d-d del catión oxidovanadio(IV) (Figura 3.22). A valores de pH de 2 a 3, se observa el espectro típico del catión VO^{2+} en DMSO ($[\text{VO}(\text{DMSO})_5]^{2+}$). Los cambios espectrales de 650 nm a 570 nm a valores de pH más altos (a partir de valores de pH superiores a 4) son indicativos de la coordinación del metal con el flavonoide. Por lo expuesto anteriormente, se seleccionó un valor de pH de 5 para la síntesis del complejo.

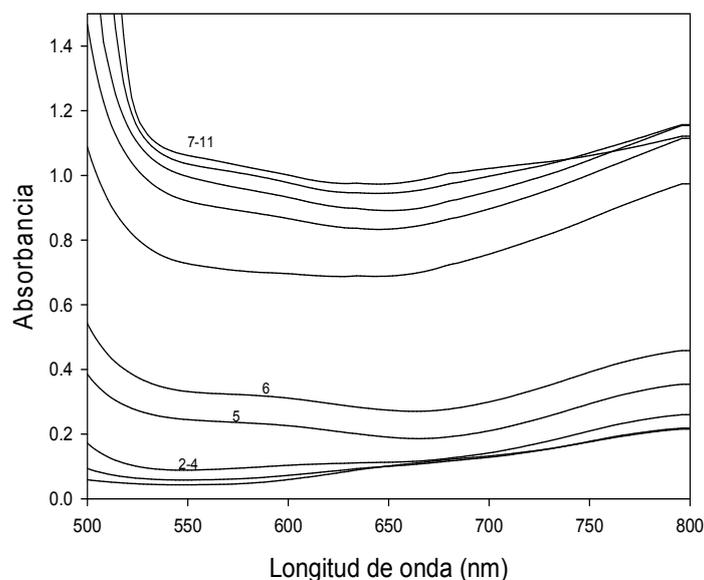


Figura 3.22. Espectro Visible de una solución de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1×10^{-2} M) y Apigenina (1×10^{-2} M) en DMSO para diferentes valores de pH.

Complejo Cu/5-HTP: para estudiar las modificaciones de los espectros UV-vis en solución del ligando se tuvieron en cuenta los valores de pK reportados para el 5-HTP los cuales son: pK_1 (-COOH) = 2,65, pK_2 (-NH $^{3+}$) = 9,63, pK_3 (5-OH) = 10,68. La variación con el pH de los espectros UV-vis de una solución acuosa del aminoácido 5-HTP (5×10^{-5} M) coincide con estos valores (Figura 3.23). También se han reportado las constantes de estabilidad $\log \beta_1 = 8,61$ y $\log \beta_2 = 15,76$ para los complejos Cu(5-HTP) y Cu(5-HTP) $_2$, respectivamente (Weber y Simeon, 1971).

El patrón espectral electrónico obtenido a partir de soluciones acuosas de una mezcla de 5-HTP (1×10^{-4} M) y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5×10^{-5} M) a diferentes valores de pH (Figura 3.24) es similar al de la Figura 3.23. Sin embargo, la comparación a pH 5 mostró diferencias entre ambos espectros que indican la formación del complejo (Figura 3.28).

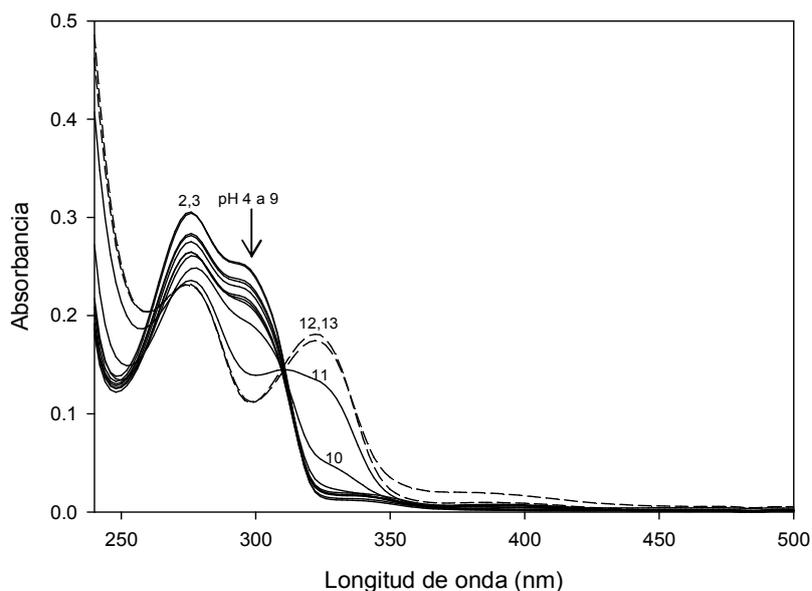


Figura 3.23. Espectro UV-vis de una solución acuosa de 5- Hidroxitriptófano (5×10^{-5} M) para diferentes valores de pH.

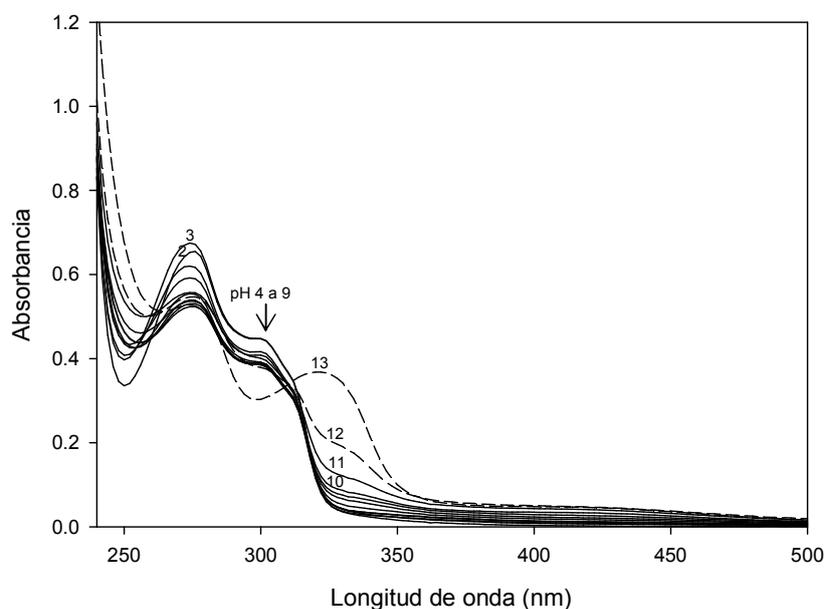


Figura 3.24. Espectro UV-vis de una solución acuosa de 5- Hidroxitriptófano (1×10^{-4} M) y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5×10^{-5} M) para diferentes valores de pH.

Trabajando con soluciones 100 veces más concentradas, se visualiza la parte visible del espectro electrónico del complejo. En la Figura 3.25 se muestran los espectros electrónicos de soluciones acuosas de 5-HTP (1×10^{-2} M) y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5×10^{-3} M) a diferentes valores de pH en el intervalo de 400 nm a 1000 nm. A valores de pH inferiores a 3 se puede observar el

espectro típico del complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ($\lambda_m = 830 \text{ nm}$). La formación del complejo tuvo lugar a pH 5-6 ($\lambda_m = 620 \text{ nm}$). A valores de pH más altos se observan nuevas especies. Por lo tanto, se seleccionó un valor de pH de 5 para la síntesis del complejo.

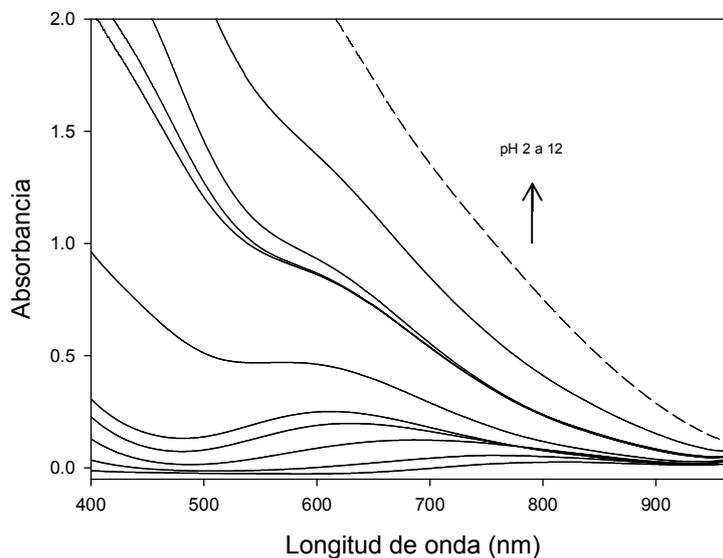


Figura 3.25. Espectro Visible de una solución acuosa de 5- Hidroxitriptófano ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$) y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$) para diferentes valores de pH.

3.3.2.2. Medidas de los espectros electrónicos en solución.

En las siguientes figuras, se muestran la superposición de los espectros del ligando y del complejo al pH de síntesis seleccionado para cada sistema: pH= 9 para VO/Baic (Figura 3.26) y pH= 5 para VO/Api (Figura 3.27) y Cu/5-HTP (Figuras 3.28 y 3.29). Las diferencias observadas entre ambos espectros sugieren la formación de los complejos.

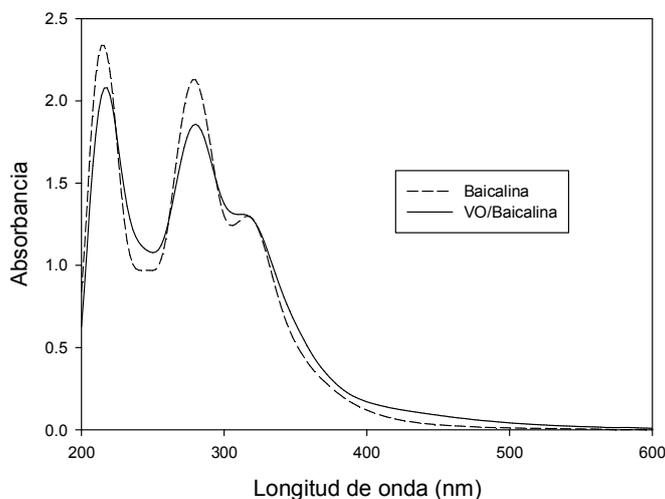


Figura 3.26. Espectro UV-visible de Baicalina ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) y de la mezcla VO/Baicalina 1/2 ($2,5 \times 10^{-5} \text{ M} / 5 \times 10^{-5} \text{ M}$) en etanol a pH=9.

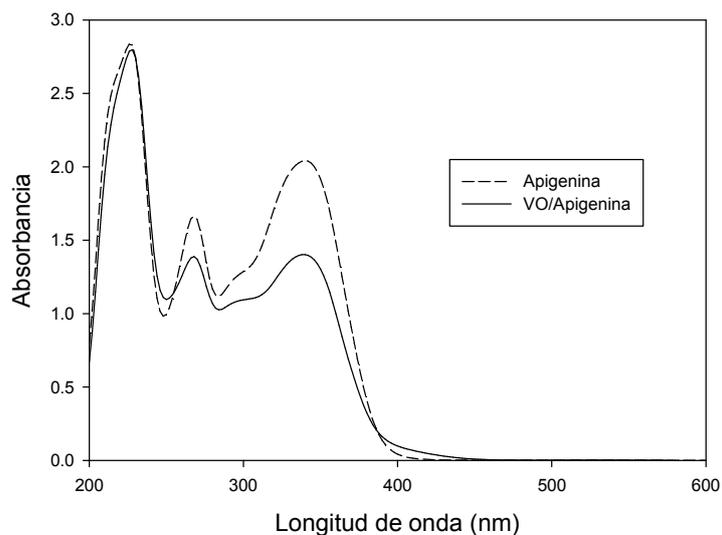


Figura 3.27. Espectro UV-visible de Apigenina (1×10^{-4} M) y de la mezcla VO/Apigenina 1/1 (1×10^{-4} M) en etanol a pH=5.

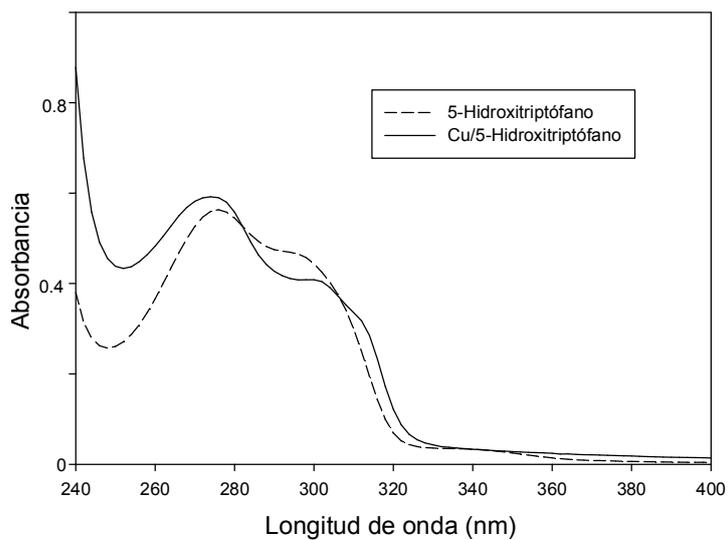


Figura 3.28. Espectro UV de 5-Hidroxitriptófano (1×10^{-4} M) y de la mezcla Cu/5-Hidroxitriptófano 1/2 (5×10^{-5} M / 1×10^{-4} M) en agua a pH=5 (240-400nm).

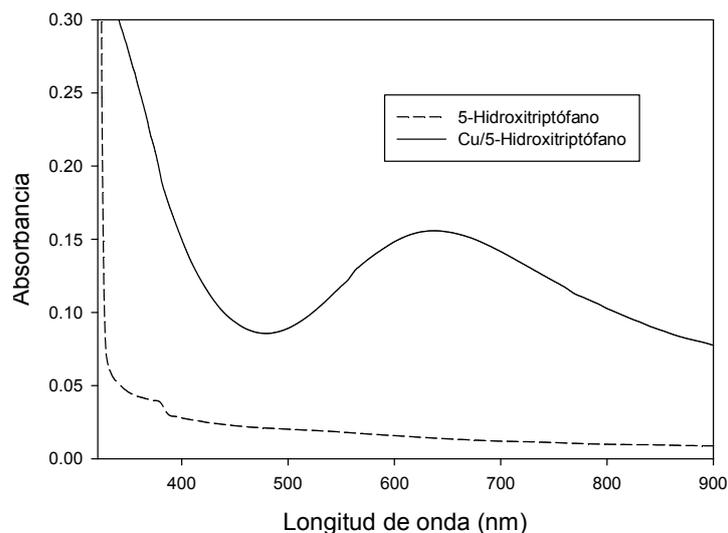


Figura 3.29. Espectro Visible de 5-Hidroxitriptófano (5×10^{-3} M) y de la mezcla Cu/5-Hidroxitriptófano 1/2 ($2,5 \times 10^{-3}$ M/ 5×10^{-3} M) en agua a pH=5 (450-900nm).

3.3.2.3. Determinación de las estequiometrías por el método de la razón molar.

Una forma de establecer las estequiometrías de los complejos formados en solución, es la realización de titulaciones espectrofotométricas por medio del conocido método de la razón molar. Podrá observarse a continuación que las determinaciones realizadas para los sistemas en estudio en solución concuerdan con las estructuras propuestas para los complejos sólidos caracterizados tanto por FTIR, EPR, reflectancia difusa así como los datos obtenidos por análisis elementales (sección 3.2).

Cada titulación se realizó manteniendo constante la concentración de ligando y variando la concentración del metal para obtener distintas relaciones ligando/metal (L/M) que varían desde 0,5 a 10 y regulando el pH en el valor usado para la síntesis de los respectivos complejos.

Complejo VO/Baic: la titulación espectrofotométrica se realizó siguiendo la variación espectral de la banda de absorción localizada a 316 nm de una solución etanólica 4×10^{-5} M de Baic a pH 9 con la adición sucesiva de VOCl_2 a diferentes relaciones, ajustando el pH a un valor final de 9 con el agregado de NaOH 1M para cada curva (Figura 3.30). Para este sistema, se obtuvo una relación 2/1 (L/M) en concordancia con la estequiometría determinada para el complejo sólido (Figura 3.31).

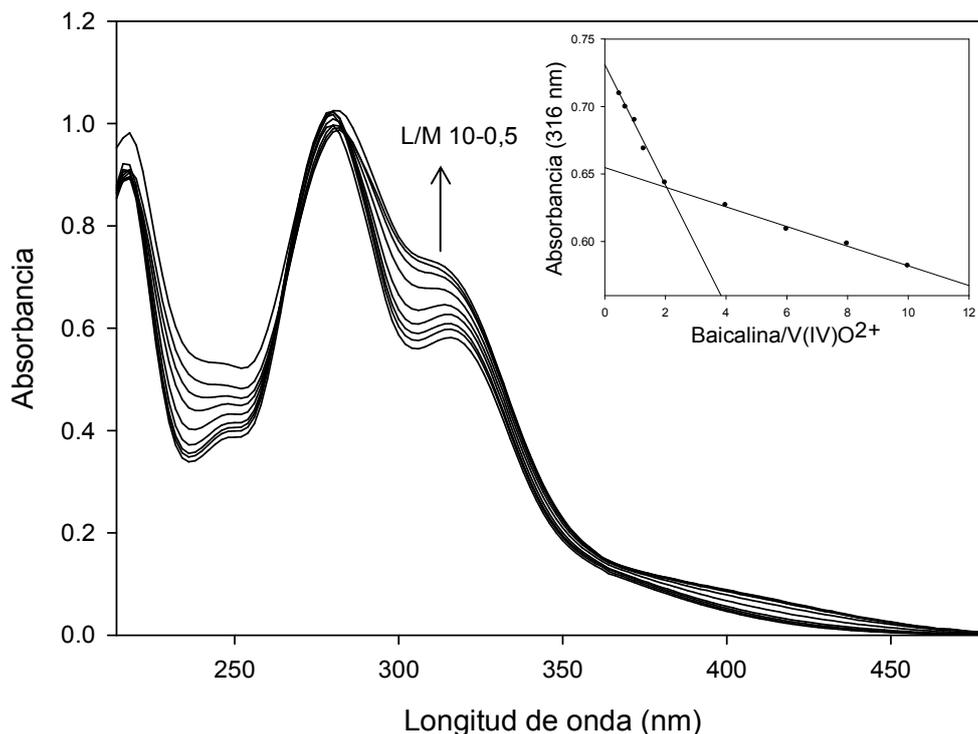


Figura 3.30. Espectro UV-visible de Baicalina (4×10^{-5} M) en etanol con la adición de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,5) a pH 9 y bajo atmósfera de nitrógeno. La flecha indica aumento de la concentración de metal. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema Baicalina/ VO^{2+} a $\lambda=316$ nm por el método de la razón molar (pH=9).

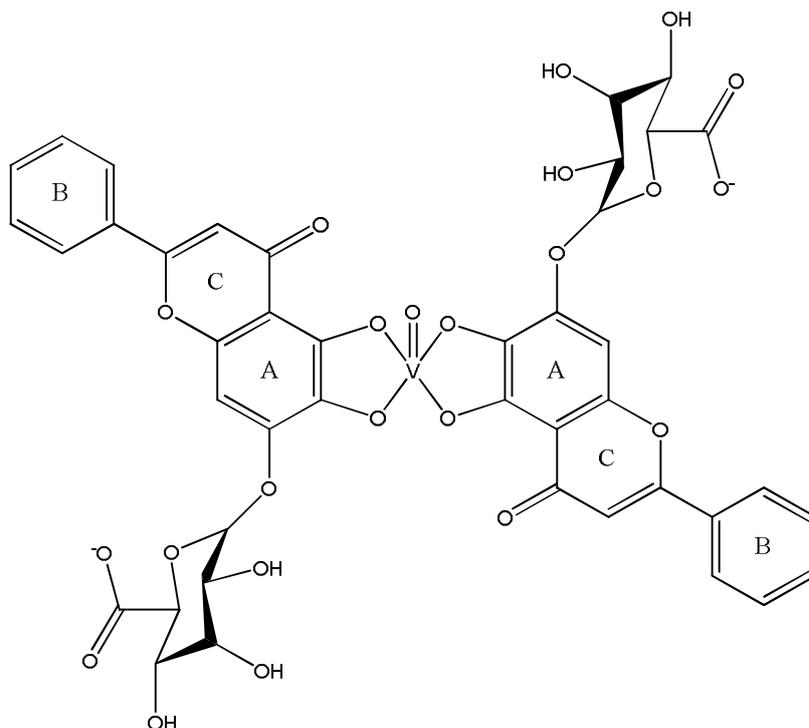


Figura 3.31. Esfera de coordinación propuesta para el complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Complejo VO/Api: la titulación espectrofotométrica se realizó siguiendo la variación espectral de la banda de absorción localizada a 298 nm de una solución etanólica 4×10^{-5} M de Apigenina a pH 5 con la adición sucesiva de VOCl_2 a diferentes relaciones, ajustando el pH a un valor final de 5 con el agregado de NaOH 1M para cada curva (Figura 3.32). Para este sistema, se obtuvo una relación L/M: 1/1 de acuerdo con la estequiometría determinada para el complejo sólido (Figura 3.33).

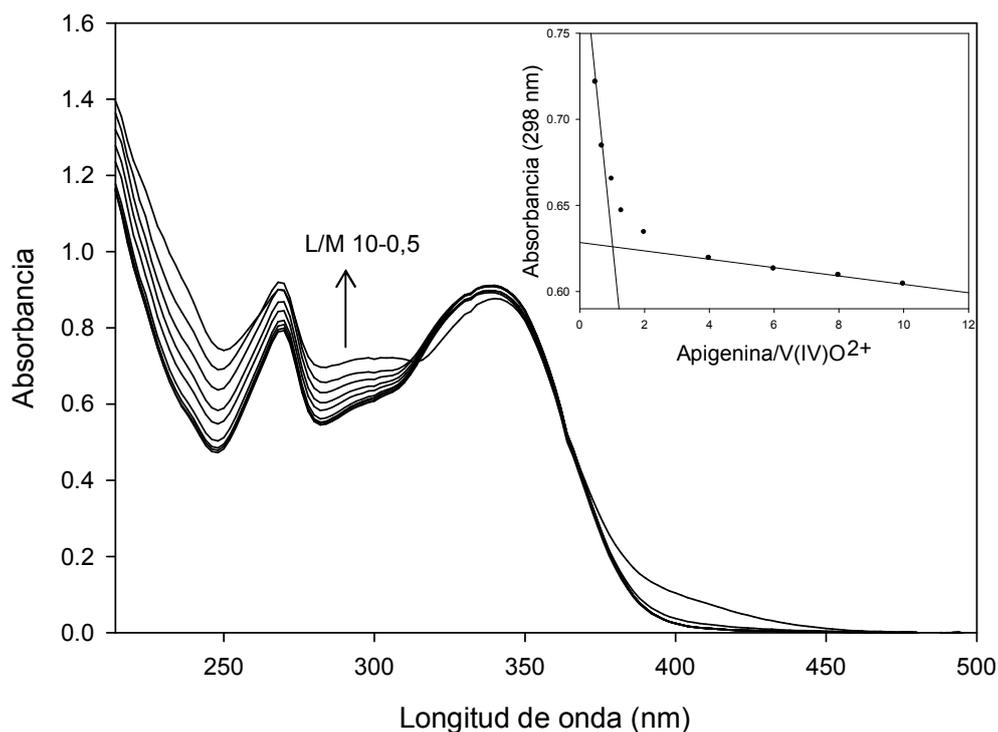


Figura 3.32. Espectro UV-visible de una solución de Apigenina (4×10^{-5} M) en etanol con la adición de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,5) a pH 5 en atmósfera de nitrógeno. La flecha indica aumento de la concentración de metal. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema Apigenina/ VO^{2+} a $\lambda=298$ nm por el método de la razón molar (pH=5).

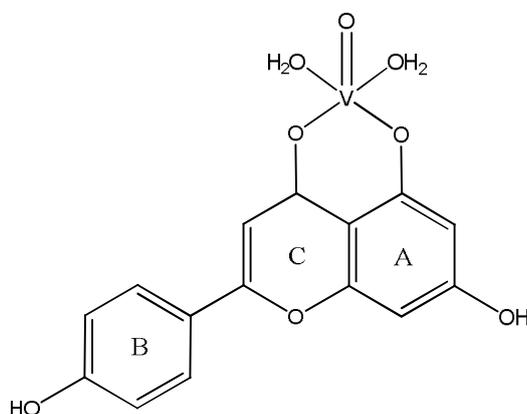


Figura 3.33. Esfera de coordinación propuesta para el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$.

Complejo Cu/5-HTP: como se vino realizando para los otros complejos, para establecer la estequiometría del complejo en solución se aplicó el método de la razón molar. Como en la zona espectral del UV no se observaron los cambios necesarios para el análisis, en solución acuosa, se procedió a medir la variación espectral usando mezclas de solventes (DMSO-agua) y se procedió a medir los espectros en la zona del visible, dado que las bandas espectrales del DMSO producen interferencias en el UV medio y el lejano. Se preparó una solución de 5-HTP ($1,2 \times 10^{-2}$ M) en una mezcla de agua y DMSO en partes iguales y se registró su espectro electrónico. Se midieron los espectros de absorción de soluciones acuosas de 5-HTP y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en relaciones molares ligando/metal de 10 a 0,5 (pH = 5; NaOH). Si bien cuando la relación molar de L/M es inferior al valor 2 el máximo de la banda de absorción comienza a desviarse de 630 nm, por el exceso de cobre(II), puede verse que hasta una relación 2/1 se observa una variación lineal de la absorbancia (Figura 3.34). El cambio de pendiente se observa a menor relación molar, sugiriendo una estequiometría de 2 ligandos para cada ion metálico (Figura 3.35).

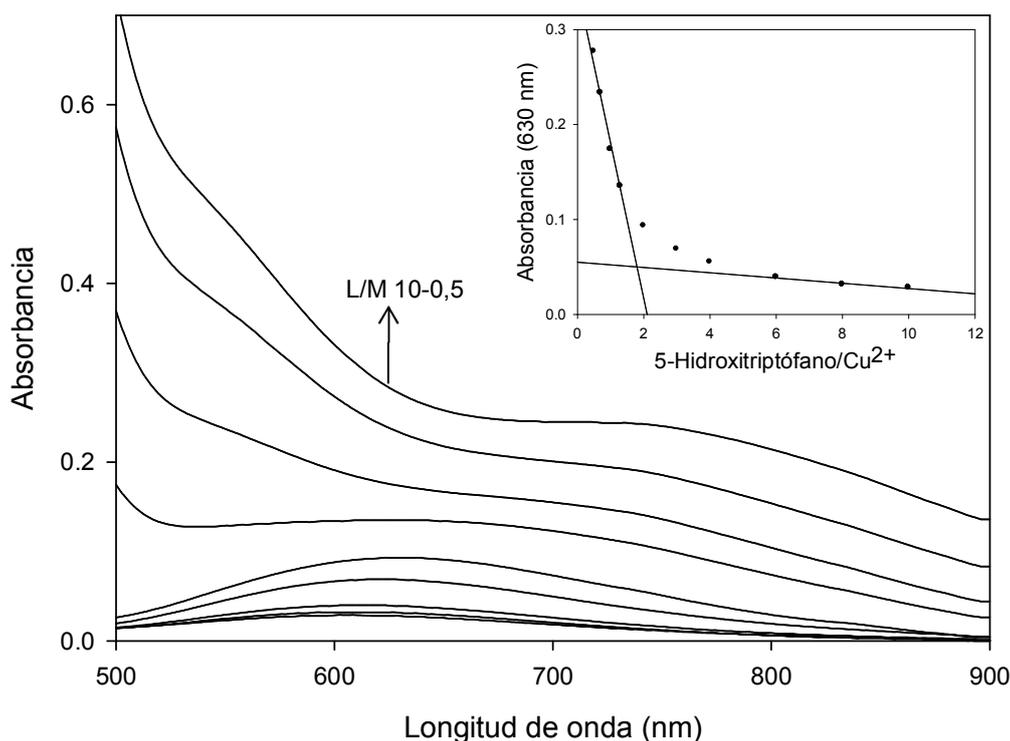


Figura 3.34. Espectro Visible de 5-Hidroxitriptófano ($1,2 \times 10^{-2}$ M) en agua/DMSO (50/50) con la adición de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en distintas relaciones L/M (desde 10 hasta 0,5) a pH 5. La flecha indica aumento de la concentración de metal. Gráfico insertado: determinación espectrofotométrica de la estequiometría para el sistema 5-HTP/ Cu^{2+} a una $\lambda=630$ nm por el método de la razón molar (pH=5).

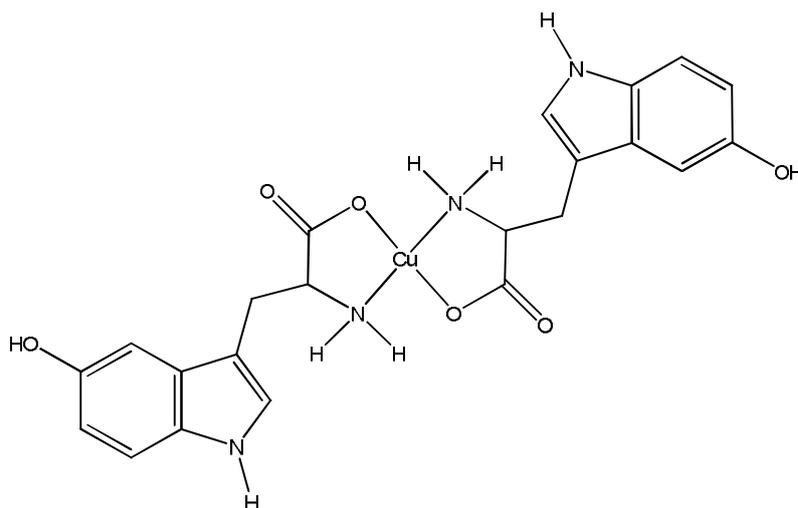


Figura 3.35. Esfera de coordinación propuesta para el complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$.

3.3.2.4. Estudios de estabilidad de los complejos disueltos.

A continuación se muestran los estudios de estabilidad de los diferentes complejos sólidos disueltos en DMSO, que es el solvente empleado en las determinaciones biológicas.

Complejo VO/Baic: el complejo permaneció estable en una solución de DMSO (no se observaron cambios apreciables en los espectros UV-vis) al menos durante 1 h (Figura 3.36). Se puede afirmar que el complejo no se descompuso durante la manipulación de la solución para los estudios biológicos, que toma como máximo 15 minutos hasta que se disuelve en el buffer usado en las diferentes determinaciones.

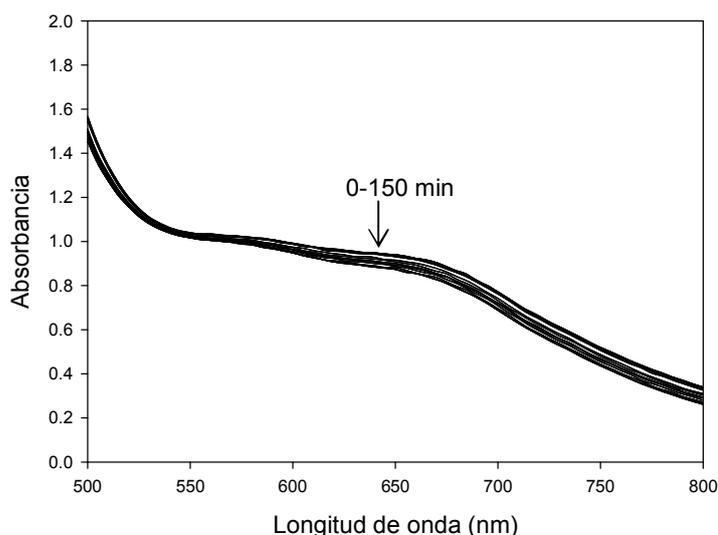


Figura 3.36. Variación del espectro electrónico de una solución 2 mmol L^{-1} , en DMSO, del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) en el tiempo.

Complejo VO/Api: el complejo permaneció estable en una solución de DMSO (no se observaron cambios apreciables en los espectros UV-vis) al menos durante 1 h (Figura 3.37). Entonces se puede afirmar que el complejo no se descompuso durante la manipulación de la solución para los estudios biológicos.

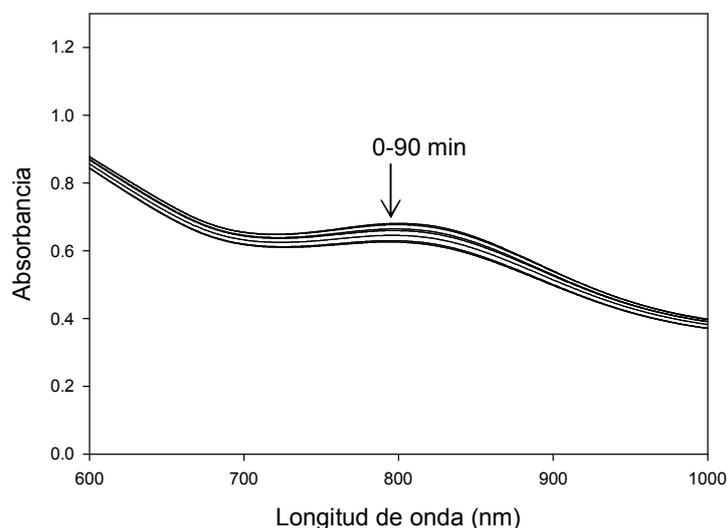


Figura 3.37. Variación del espectro electrónico de una solución 4 mmol L^{-1} en DMSO del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) en el tiempo.

Adicionalmente, para este complejo se realizó la determinación de la estabilidad por medio de medidas de conductividad. Como se sabe, la conductividad molar Λ_m mide la capacidad de transporte de corriente eléctrica de un electrolito en solución. Se define como:

$$\Lambda_m = \kappa/c$$

Donde c es la concentración molar del electrolito y κ es la conductividad específica de la disolución, que se calcula conociendo la constante de celda del equipo y la resistencia medida:

$$\kappa = \text{constante de celda}/R$$

Esta magnitud depende del electrolito y del disolvente. La medida de la conductancia molar del complejo VO/Api en DMSO, $\Lambda_m = 29 \text{ (}\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$, sugiere la existencia de un electrolito 1:1 (Geary, 1971), en concordancia con la determinación de los análisis elementales, donde el complejo adquiere una carga positiva y posee como contraión al anión cloruro. Este valor se mantuvo estable en el tiempo (1h), lo que permite inferir que el complejo se mantiene estable en este período de tiempo.

Complejo Cu/5-HTP: la estabilidad del complejo Cu/5-HTP se midió en DMSO ya que el mismo se empleó como co-disolvente en las determinaciones biológicas. El espectro UV-vis obtenido por disolución en DMSO del complejo Cu/5-HTP muestra una banda de absorción ubicada en 603 nm ($\epsilon = 94.2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para demostrar la estabilidad del complejo tras la disolución, su velocidad de descomposición se midió espectrofotométricamente. El complejo permaneció estable en una solución de DMSO (no se observaron cambios apreciables en los espectros UV-vis) al menos durante 1 h (Figura 3.38), por lo que se puede afirmar que el complejo no se descompuso durante la manipulación de la solución para los estudios biológicos.

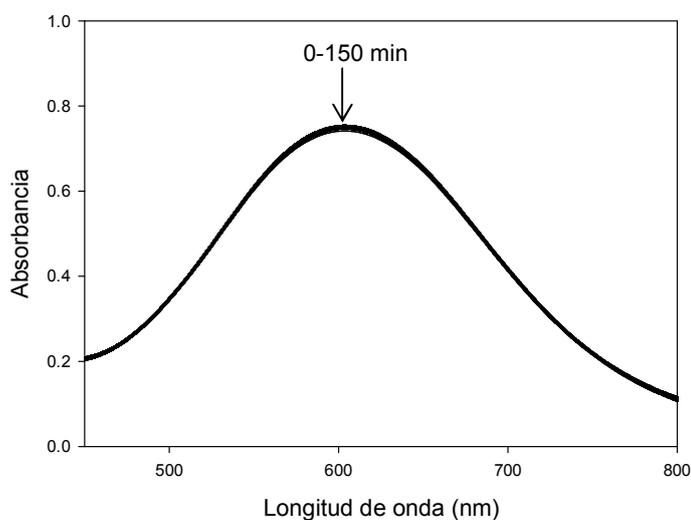


Figura 3.38. Variación del espectro electrónico de una solución 8 mmol L^{-1} en DMSO del complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) en el tiempo.

3.4. Conclusiones preliminares

A continuación se resumen las principales conclusiones de este capítulo que serán ampliadas en el Capítulo 8 de “Conclusiones y perspectivas”.

Los complejos de coordinación VO/Baic, VO/Api y Cu/5-HTP se sintetizaron y caracterizaron analítica y fisicoquímicamente como $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ y $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, respectivamente.

Teniendo en cuenta los estudios en fase sólida y en solución, pueden proponerse las siguientes esferas de coordinación para cada uno de los complejos:

- El complejo VO/Baic es un complejo aniónico pentacoordinado con una estequiometría 2/1 (L/M) y coordinación tipo “catecol”.
- El complejo VO/Api es un complejo catiónico pentacoordinado con una estequiometría 1/1 (L/M) y coordinación tipo “acetilacetona”. El mismo tiene dos moléculas de agua en su esfera de coordinación.
- El complejo Cu/5-HTP es un complejo neutro tetraordinado con una estequiometría 2/1 (L/M).

Estas conclusiones se complementan con los estudios teóricos en el marco de la Teoría del Funcional de la Densidad (Capítulo 4).

Los estudios de estabilidad de los diferentes complejos sólidos disueltos en DMSO demuestran que la esfera de coordinación se conserva luego de la disolución y que los complejos permanecen estables durante el tiempo de preparación de las muestras para las determinaciones biológicas.

Capítulo 4: Estudios teóricos en el marco de la Teoría del Funcional de la Densidad

Los avances de la química computacional han llevado al desarrollo de nuevos métodos cuánticos basados en la teoría del funcional de la densidad (*Density Functional Theory*, DFT) que permiten calcular la geometría de los compuestos químicos. En los últimos años se han publicado varios artículos relativos a la predicción de la estructura de los complejos de metales de transición, incluyendo especies de oxidovanadio(IV) (Micera y Garribba, 2012). La importancia de los cálculos computacionales estriba en la posibilidad de estudiar propiedades químicas o físicas (geometría, propiedades vibracionales, cálculos termodinámicos, reactividad química, entre otras) algunas de las cuales no pueden ser determinadas experimentalmente (Orbitales Moleculares). Aquellas propiedades que pueden ser determinadas experimentalmente (estructuras cristalinas, espectros vibracionales de infrarrojo, etc.) permiten realizar comparaciones teórico-experimentales.

La importancia del conocimiento de la geometría de los compuestos de coordinación se debe a la relación entre la estructura del complejo formado y su actividad biológica. La geometría de un compuesto puede relacionarse con las actividades biológicas del mismo. En este sentido, Micera y Garribba mencionaron algunos ejemplos de cómo la modificación estructural de los complejos de vanadio puede afectar su actividad insulinomimética. La inactivación de las haloperoxidasas dependientes de vanadio, debido a la reducción de las especies $V(V)O^{3+}$ a $V(IV)O^{2+}$, está relacionada con un cambio estructural irreversible. La transformación en solución acuosa del fármaco $[VO(\text{maltolato})_2]$ de una geometría piramidal cuadrada (pentacoordinada, véase Figura 1.5A) a una *cis*-octaédrica (véase Figura 1.5B) facilita el transporte en el suero sanguíneo hacia los sitios diana mediante la coordinación de un nitrógeno de histidina de la albúmina sérica humana en la cuarta posición ecuatorial del ion $V(IV)O^{2+}$ (Micera y Garribba, 2012). Por lo tanto, la predicción de la geometría de los complejos de coordinación es de suma importancia en la caracterización de las propiedades biológicas cuando no se disponen de estructuras cristalográficas. En este trabajo de tesis doctoral, se han sintetizado y caracterizado complejos de coordinación sin lograr la obtención de cristales, por lo que, gracias a la química computacional, fue posible obtener teóricamente información relevante para estos sistemas. En este contexto, se realizaron cálculos teóricos para los ligando y complejos utilizando herramientas del DFT (Hohenberg y Kohn, 1964; Kohn y Sham, 1965; Parr y Yang, 1989) empleando el programa GAUSSIAN 09 (Frisch et al., 2010). En todos los casos, se realizaron cálculos vibracionales al mismo nivel de teoría

que el proceso de optimización para corroborar la existencia de un mínimo en la superficie de energía potencial.

4.1. Optimización de los ligandos (flavonoides y 5-HTP).

Baicalina: existen numerosos reportes de estudios estructurales y conformacionales de flavonoides como la morina (Cody y Luft, 1994), quercetina (Russo et al., 2000), baicaleína (Marković et al., 2011), miricetina (Vojta et al., 2017), luteolina (Amat et al., 2008), e incluso apigenina (Amat et al., 2008; Mariappan et al., 2012) que es el otro flavonoide seleccionado para este trabajo de tesis doctoral. En este contexto, y teniendo en cuenta que las investigaciones teóricas del flavonoide Baicalina (Baic) se basan en un pequeño número de conformeros (Dai et al., 2009; Wolniak et al., 2008), se realizó un estudio del espacio conformacional de dicho flavonoide. Los datos de la difracción de rayos X de Baic (Dai et al., 2009) se emplearon como estructura de partida para realizar los procedimientos de rotación rígida (escaneos) con el método semiempírico PM3 (Stewart, 1989a, 1989b). Posteriormente, los conformeros de menor energía se reoptimizaron con geometría totalmente relajada empleando el método *ab initio* B3LYP (Becke, 1993) combinado con diferentes conjuntos de bases en fase gaseosa.

En la Figura 4.1 se muestra la numeración de los átomos y los principales ángulos utilizados para el estudio del espacio conformacional de la Baic. El primer escaneo se realizó teniendo en cuenta la rotación de los ángulos diedros (τ_1)= C8–C7–O7–C1'', (τ_2)= O1–C2–C1'–C2' y (τ_3)= O6c''(carbonilo)–C6''–C5''–O5'' alrededor de los enlaces C7–O7, C2–C1' y C6''–C5'' en pasos de 60°. Los ángulos τ_1 y τ_2 representan la posición relativa de la unidad glucurónido y del anillo B con respecto a los anillos centrales (A y C), respectivamente. El ángulo τ_3 configura la posición del grupo ácido en la unidad glucurónido. En esta etapa se seleccionaron siete conformeros para ser empleados en el segundo escaneo. Estos conformeros se seleccionaron considerando que el ángulo τ_2 muestra valores cercanos a 30°, 90°, 150°, -150°, -90° y -30°. Debido a la simetría del grupo fenilo en la Baic (sin sustituyentes en el anillo B), los tres últimos ángulos representan la misma disposición que los primeros, lo cual permite reducir el número de moléculas. El segundo escaneo se realizó teniendo en cuenta los efectos de la rotación alrededor de los enlaces C–O de los sustituyentes OH en las posiciones C5 y C6 del anillo A y el OH del ácido carboxílico en pasos de 90°. Estos ángulos diedros son (τ_4)= C10–C5–O5–H, (τ_5)= C5–C6–O6–H y (τ_6)= C5''–C6''–O6''–H. Al completar el segundo escaneo, el valor del ángulo τ_2 cambió en el conformero con $\tau_2 = 90^\circ$. Estos resultados preliminares sugieren

que la disposición perpendicular del anillo B con respecto a los anillos centrales (A y C) es menos probable. Estos datos son coherentes con el hecho de que las conformaciones perpendiculares de los flavonoides luteolina y apigenina se asociaron con barreras altas de energía potencial (Amat et al., 2008). En esta etapa se seleccionaron once conformeros para ser empleados en el tercer escaneo. El tercer escaneo se realizó teniendo en cuenta los efectos de la rotación alrededor de los enlaces C–O de los sustituyentes OH en la unidad de glucurónido en pasos de 90°. Estos ángulos diedros son (τ_7)= C5''–C4''–O4''–H, (τ_8)= C4''–C3''–O3''–H y (τ_9)= C3''–C2''–O2''–H. Al finalizar el tercer escaneo, veintidós estructuras se seleccionaron para ser empleadas en la siguiente etapa.

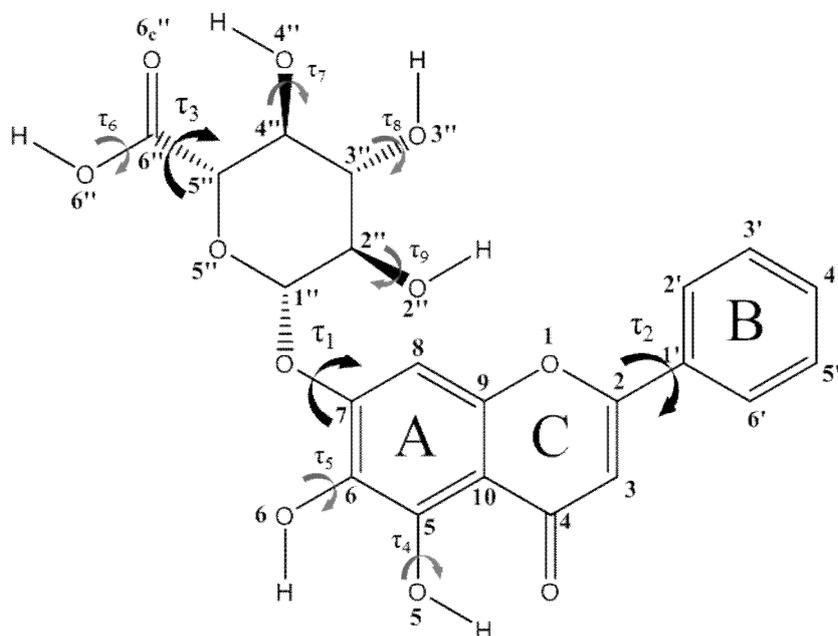


Figura 4.1. Esquema de la molécula de baicalina (Baic). Numeración de los átomos y principales ángulos utilizados para el análisis.

Las veintidós estructuras primitivas seleccionadas del tercer escaneo fueron reoptimizadas con la geometría totalmente relajada a nivel B3LYP/3-21G* y B3LYP/6-31G*. Los conformeros optimizados empleando el conjunto de bases 3-21G* mostraron una modificación relevante en el ángulo τ_2 . Este ángulo diedro que mostraba valores cercanos a -45° o $+45^\circ$ en las estructuras primitivas (seleccionadas del tercer escaneo) toma valores cercanos a cero después de la optimización a nivel B3LYP/3-21G*. Cuando estas estructuras se reoptimizan empleando el conjunto de bases 6-31G*, en algunos casos el ángulo τ_2 vuelve al valor original, mientras que en otros casos toma el valor opuesto. Estudios anteriores sobre flavonoides similares han caracterizado las curvas de energía potencial en función del ángulo τ_2 y sus resultados sugieren que las estructuras planares

representan puntos de ensilladura (Amat et al., 2008; Mariappan et al., 2012). Estos hechos nos permitieron concluir que el nivel de teoría B3LYP/3-21G* no es adecuado para este sistema. Por el contrario, los conformeros optimizados empleando el conjunto de bases 6-31G* preservan la información geométrica relacionada con la disposición del anillo B (τ_2). Estos datos sugieren que el nivel de teoría B3LYP/6-31G* resulta adecuado para este sistema. Para el siguiente paso, se seleccionaron diez estructuras de las estructuras optimizadas empleando el conjunto de bases 6-31G* y se reoptimizaron a nivel B3LYP/6-31G**.

Los diferentes conformeros de la Baicalina (denominados BCL) fueron nombrados y agrupados considerando algunos aspectos geométricos (Tabla 4.1). El ángulo τ_1 (disposición de la unidad glucurónida) permitió la clasificación de los conformeros BCL en cuatro grupos, indicados por *a*, *b*, *c* y *d*, y los valores medios de este ángulo en cada grupo son $-39,89^\circ$, $-125,40^\circ$, $119,80^\circ$ y $4,85^\circ$, respectivamente. Dai y colaboradores (Dai et al., 2009) reportaron un ángulo τ_1 de $106,4^\circ$, similar a la que encontramos en el grupo *c*. Propusieron dos puentes de H (HBs) que contribuyen al empaquetamiento molecular tipo sándwich en el estado sólido. Estos HBs son $C2''-OH\cdots O-C4''$ (intramolecular) y $C5-OH\cdots O-C6$ (intermoleculares). Wolniak y colaboradores (Wolniak et al., 2008) sugirieron dos posibles valores de ángulo τ_1 y uno de ellos ($2,8^\circ$) es cercano al valor que encontramos en el grupo *d*. El ángulo τ_2 (disposición del grupo fenilo) tiene sólo dos valores posibles 20° o -20° (-20° es igual a 160° debido a la simetría del grupo fenilo sin sustituyentes en el anillo B) y este hecho nos llevó a clasificar los conformeros BCL en los grupos *1* y *2*, respectivamente. El grupo *1* muestra valores de ángulos τ_2 similares en comparación con datos cristalográficos ($7,7^\circ$) y las diferencias pueden ser explicadas considerando las interacciones de tipo π - π *stacking* entre las diferentes moléculas presentes en el cristal (Dai et al., 2009), pero no en las moléculas aisladas. Reportes anteriores sobre flavonoides similares revelaron que las curvas de energía potencial del ángulo τ_2 son casi planas en la región de $\pm 40^\circ$ (Marković et al., 2011), $\pm 30^\circ$ ($\pm 15^\circ$) a nivel MP2 (B3LYP) (Amat et al., 2008). Estos autores sugirieron que las estructuras con ángulo τ_2 cercano a 0 representan puntos de ensilladura entre dos estructuras estables con una pequeña frecuencia negativa asociada a un modo de torsión alrededor del enlace C2-C1'. Por otra parte, Amat y colaboradores (Amat et al., 2008) sugirieron la presencia de ambas estructuras (*1* y *2*) con una oscilación casi libre del anillo de fenilo B en un rango de $\pm 20^\circ$ alrededor de la estructura plana. Rossi y colaboradores (Rossi et al., 2001) reportaron los datos cristalográficos de la aglicona del flavonoide Baic, baicaleína, y propusieron una

conformación planar con un ángulo τ_2 de $8,2^\circ$. Sin embargo, el análisis de los factores que afectan la planaridad de la estructura de la flavona fue discutido anteriormente por este grupo y concluyeron que la energía potencial más baja corresponde a una conformación no planar con un ángulo τ_2 igual a $22,8^\circ$. Este ángulo de torsión intermedio, similar al encontrado en la Baic, representa un equilibrio entre la interacción atractiva de una estructura plana que proporciona el marco para un efecto mesomérico más extenso y las interacciones estéricas repulsivas que pueden resultar de los dos átomos de hidrógeno en posición orto. Marković y colaboradores (Marković et al., 2011) informaron que los mínimos absolutos en el ángulo τ_2 de la baicaleína se encontraron a $21,00^\circ$ y a $158,95^\circ$ y el enlace C2–C1' está en el plano de la cromona y tiene una longitud de $1,473 \text{ \AA}$, en concordancia con nuestros datos para Baic. El ángulo τ_3 (posición del grupo ácido) no permitió otra clasificación. Los valores medios de este ángulo en los grupos *a*, *b*, *c* y *d* son $-122,46^\circ$, $-151,65^\circ$, $-169,48^\circ$ y $-103,44^\circ$, respectivamente. Por otra parte, las posibles disposiciones de los grupos OH explorados en el segundo escaneo (τ_4 , τ_5 y τ_6) permitieron otra clasificación de los conformeros BCL, indicada por los subíndices C o T. Esta designación se refiere a las configuraciones *syn* (*cis*) y *anti* (*trans*) de los enlaces O5–H, O6–H y O6"–H respecto a los enlaces C10–C5, C5–C6 y C5"–C6", respectivamente. Los valores medios de los ángulos τ_4 , τ_5 y τ_6 fueron cercanos a 0° (*cis*) o 180° (*trans*). Teniendo en cuenta que la configuración del grupo OH situado en la posición 5 del anillo A (τ_4) era siempre *cis*, la configuración de este ángulo no se incluyó en la nomenclatura de los conformeros BCL. Los subíndices C o T en la nomenclatura de los conformeros BCL indican la configuración de los ángulos τ_5 (primer subíndice) y τ_6 (segundo subíndice). El hecho de que la configuración del ángulo τ_4 fuera siempre *cis* puede explicarse por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular (IMHB) entre el hidrógeno del grupo OH situado en la posición 5 del anillo A y el oxígeno del grupo carbonilo situado en la posición 4 del anillo C. Wolniak y colaboradores (Wolniak et al., 2008) reportaron previamente este IMHB en baicalina, baicaleína y wogonosido basados en datos de espectroscopía de RMN. Los autores caracterizaron la interacción C5–OH \cdots O=C4 por RMN de ^{13}C en solución y estado sólido e informaron que los desplazamientos químicos indican la presencia de este IMHB en ambas fases. Además, Marković y colaboradores (Marković et al., 2011) sugieren que la formación del enlace C5–OH \cdots O=C4 tiene un efecto estabilizador en la molécula de la baicaleína. Sin embargo, esta interacción de HB está ausente en el cristal de Baic porque el OH localizado en la posición 5 tiene configuración *trans* y el hidrógeno de este grupo está implicado en un HB intermolecular

con el oxígeno del OH situado en la posición 6 (también en configuración trans) de una unidad de Baic adyacente (Dai et al., 2009). Los ángulos τ_7 , τ_8 y τ_9 no están representados en la nomenclatura, pero se tuvieron en cuenta para seleccionar los conformeros BCL de menor energía.

Tabla 4.1. Energía y ángulos diedros τ_1 y τ_5 característicos para los diez conformeros BCL de menor energía optimizados en fase gaseosa a nivel B3LYP/6-31G**.

Conformero	Ángulo diedro τ_1	Ángulo diedro τ_5	Energía ^a	ΔE ^b	ΔE ^c	Población relativa ^d
BCLa2 _{CT}	-37,47	-9,33	-1027970,8470	0,00	0,00	13,46
BCLa1 _{CT}	-37,52	-9,65	-1027970,4618	0,39	0,39	12,49
BCLa1 _{TT}	-42,24	-163,80	-1027969,8970	0,95	0,95	9,20
BCLa2 _{TT}	-42,32	-164,05	-1027969,8782	0,97	0,97	9,58
BCLb1 _{CC}	-124,32	-0,57	-1027970,7987	0,05	0,00	13,22
BCLb2 _{CC}	-126,49	-1,80	-1027970,0407	0,81	0,76	15,01
BCLc1 _{CC}	126,21	0,03	-1027969,5450	1,30	0,00	10,49
BCLc1 _{CT}	113,39	-0,27	-1027968,4983	2,35	1,05	9,18
BCLd2 _{TT}	9,66	-171,22	-1027967,0650	3,78	0,00	5,16
BCLd1 _{TT}	0,05	-168,19	-1027964,9943	5,85	2,07	2,21

^a Energía calculada a nivel B3LYP/6-31G** y corregida por la energía en el punto cero (ZPE), expresada en kcal mol⁻¹.

^b Diferencia energética respecto del conformero más estable, expresada en kcal mol⁻¹.

^c Diferencia energética respecto del conformero más estable en cada grupo, expresada en kcal mol⁻¹.

^d Población relativa calculada por la ecuación de Boltzmann, expresada como porcentaje (%).

Estos resultados sugieren que el conformero BCLa2_{CT} es el más estable, su estructura optimizada a nivel B3LYP/6-31G** (en fase gaseosa) se muestra en la Figura 4.2.

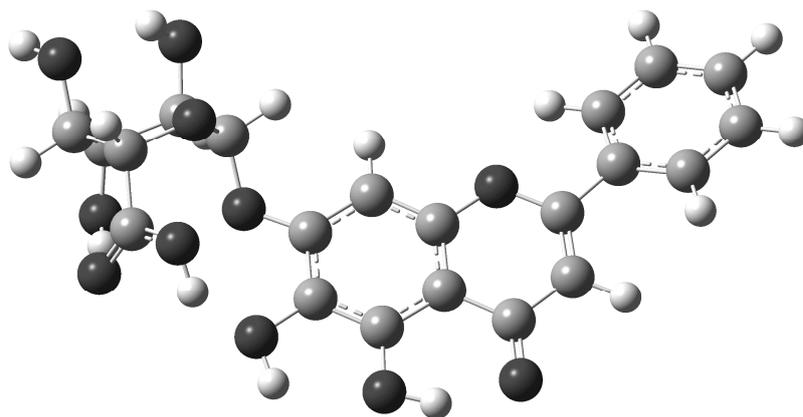


Figura 4.2. Geometría optimizada del conformero BCLa₂CT de Baicalina (Baic) a nivel B3LYP/6-31G**. Las esferas grises representan a los átomos de C, las esferas negras representan a los átomos de O y las esferas blancas representan a los átomos de H.

Apigenina: existen reportes previos sobre estudios computacionales del ligando Apigenina (Api) a nivel B3LYP con diferentes conjuntos de bases (Amat et al., 2008; Corredor et al., 2009; Minenkov et al., 2012). En este contexto, y dada la simplicidad de la molécula, no fue necesario realizar una búsqueda conformacional para este ligando. Api se optimizó en fase gaseosa a nivel B3LYP/6-31G** y se realizaron cálculos vibracionales al mismo nivel de teoría. La estructura optimizada (en fase gaseosa) del ligando Api se muestra en la Figura 4.3.

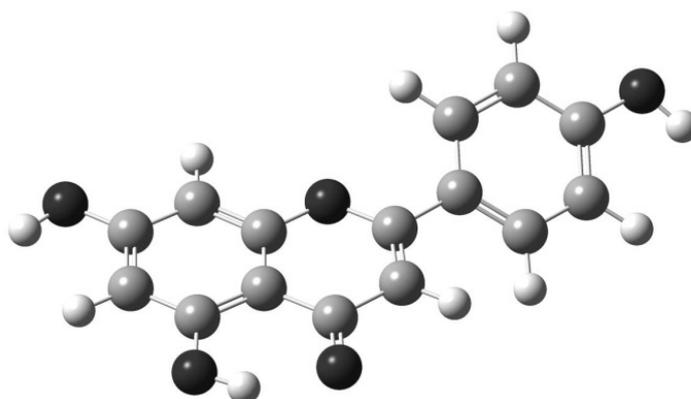


Figura 4.3. Geometría optimizada de Apigenina (Api) a nivel B3LYP/6-31G**. Las esferas grises representan a los átomos de C, las esferas negras representan a los átomos de O y las esferas blancas representan a los átomos de H.

5-Hidroxitriptófano: los datos cristalográficos del 5-HTP (Wakahara et al., 1973) se emplearon como punto de partida para los procesos de optimización. Este ligando es un aminoácido que está presente como zwitterión en el estado sólido. Muchos aminoácidos existen en la forma de zwitterión estable en estado sólido o en solución, pero dentro de un cierto intervalo de pH, mientras que normalmente es difícil de estabilizar dicha separación de cargas en un entorno de fase gaseosa (Li et al., 2013; Price et al., 1997; Wang et al., 2003). Por lo tanto, el ligando 5-HTP se optimizó tanto en fase gaseosa como en solución acuosa a nivel B3LYP/6-31G**. Los resultados sugieren que el 5-HTP en la forma de zwitterión sólo existe en solución acuosa, en donde el solvente permite la separación de las cargas. Al estado gaseoso, sólo pudo optimizarse la molécula en su forma neutra. Aun cuando la geometría de partida (Wakahara et al., 1973) tiene la estructura de zwitterión, en fase gaseosa el $-\text{NH}_3^+$ cede el protón al COO^- restituyendo los grupos funcionales ácido y amino de la forma neutra, debido a una baja barrera para la transferencia de protones. La estructura optimizada en fase gaseosa (y en solución acuosa, gráfico insertado) del ligando 5-HTP se muestra en la Figura 4.4.

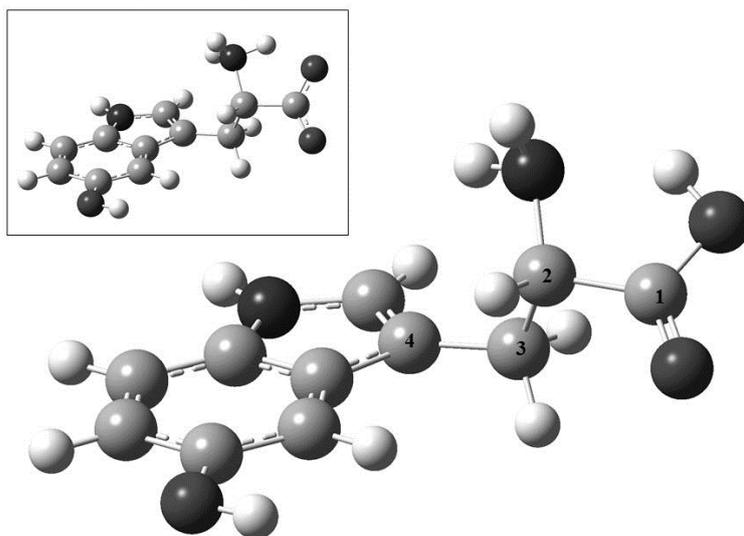


Figura 4.4. Geometría optimizada del ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico (5-HTP) a nivel B3LYP/6-31G** en fase gaseosa. Gráfico insertado: geometría optimizada del 5-HTP en la forma de zwitterion a nivel B3LYP/6-31G** en solvente acuoso. Las esferas grises claras representan a los átomo de C, las esferas grises oscuras representan a los átomos de O, las esferas negras representan a los átomos de N y las esferas blancas representan a los átomos de H.

Estudios anteriores con dímeros de los aminoácidos glicina y alanina sugieren que 12 moléculas de agua son suficientes para estabilizar los caracteres zwitteriónicos y evitar la transferencia de protones entre los grupos COO^- y $-\text{NH}_3^+$ (Koyambo-Konzapa et al., 2015). Además de la evidencia experimental de que la glicina no es un zwitterión en la fase gaseosa, la superficie de energía potencial de la glicina aislada ha sido investigada minuciosamente por métodos *ab initio*. En los niveles más altos de teoría, el zwitterión es 16-20 kcal/mol menos estable que la forma neutra sin barrera para la transferencia de protones entre el $-\text{NH}_3^+$ y el COO^- (Price et al., 1997). El complejo entre la glicina en su forma de zwitterión y una molécula de agua no existe al estado gaseoso (Wang et al., 2003), se necesitan dos moléculas de agua complejadas con glicina para estabilizar el zwitterión (Price et al., 1997). Para la mayoría de los aminoácidos naturales, existen muchos estudios experimentales y teóricos que sugieren que la forma canónica es siempre dominante en la fase gaseosa (Li et al., 2013).

4.2. Optimización de los complejos.

4.2.1. Estudio de adecuación/aplicabilidad de diferentes métodos para los sistemas VO/flavonoides.

Complejo VO/Api: este sistema fue seleccionado para realizar el estudio de adecuación/aplicabilidad de diferentes métodos para los sistemas VO/flavonoides atendiendo a su simpleza y bajo número de átomos. En términos de química computacional, un método se define como la combinación de un determinado funcional con un determinado conjunto de bases (Método= Funcional/Conjunto de bases). Para este estudio se seleccionaron los siguientes funcionales: funcionales híbridos con intercambio Hartree-Fock (B3LYP, B3P86, PBE1PBE, MPW1PW91), un metafuncional híbrido con el gradiente de densidad de energía cinética (M06) y un funcional corregido de dispersión (B97D) (Laury et al., 2012). Se emplearon dos conjuntos de bases combinadas con los diferentes funcionales. El conjunto de bases de calidad doble Z 6-31G adicionado con funciones de polarización (Funcional/6-31G**) y el conjunto de bases de calidad triple Z 6-311G adicionado con funciones de polarización y difusas (Funcional/6-311++G**). Los procesos de optimización y cálculos de frecuencia del complejo VO/Api empleando los diferentes métodos se realizaron sin mayores contratiempos. Como no se disponen de datos experimentales de distancias de enlace o ángulos de enlace, se consideró el espectro vibracional de infrarrojo FTIR (véanse Figura 3.5 y Tabla 3.2) como parámetro

experimental. En este sentido, se compararon los espectros simulados empleando los diferentes métodos con el objeto de determinar la adecuación o aplicabilidad de los mismos para reproducir los espectros FTIR y apoyar las asignaciones de las bandas. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 4.2, en la que se muestran las distancias del enlace V=O en Å y la frecuencia de vibración en cm^{-1} asociadas al modo de estiramiento (*stretching*) del mismo.

Tabla 4.2. Distancias del enlace V=O (Å) y frecuencia de vibración (cm^{-1}) asociadas al modo de estiramiento (*stretching*) del mismo en el complejo VO/Api optimizado con diferentes métodos.

Conjunto de bases	6-31G**		6-311++G**	
Funcional	Enlace V=O	Frecuencia	Enlace V=O	Frecuencia
B3LYP	1,565	1.127	1,567	1.096
B3P86	1,556	1.148	1,557	1.116
PBE1PBE	1,552	1.157	1,553	1.127
MPW1PW91	1,552	1.157	1,553	1.126
M06	1,556	1.139	1,558	1.110
B97D	1,574	1.076	1,576	1.045

Estos resultados sugieren que el método más adecuado para la optimización estructural del VO/Api es el B97D/6-311++G**, ya que con este método se obtiene un enlace V=O de mayor longitud y por consiguiente una frecuencia menor. En concordancia con esta afirmación, Minenkov y colaboradores han investigado el rendimiento de 8 funcionales en la reproducción de 18 estructuras moleculares determinadas por difracción de rayos X de monocristal (Minenkov et al., 2012). Estos autores consideran que todos los métodos que tienen en cuenta la dispersión (B97D, wB97XD, M06 y M06L) dan lugar a estructuras más compactas, eliminando la sobrestimación sistemática de las distancias internucleares y sugieren un orden de estos funcionales (B97D < M06 \approx wB97XD < M06L). Sin embargo, concluyen que teniendo en cuenta los problemas de oscilación bien conocidos de los funcionales de Minnesota, B97D es una elección tentadora y computacionalmente menos exigente. No obstante, para el sistema VO/Api el conocido (y ampliamente utilizado) método B3LYP/6-311++G** reprodujo de manera aceptable los resultados obtenidos con el método B97D/6-311++G** (0,009 Å de diferencia en el enlace V=O y 51 cm^{-1} de diferencia en la

frecuencia). Teniendo en cuenta que el valor experimental asignado al modo de estiramiento (*stretching*) del V=O es 977 cm^{-1} (véase Tabla 3.2) se puede considerar que si bien los resultados del método B97D/6-311++G** arrojan valores de frecuencia más bajos (pero bastante superiores al valor experimental) que los del método B3LYP/6-311++G**, las diferencias no son relevantes y ambos métodos pueden considerarse en el estudio de los complejos VO/flavonoides. En la Figura 4.5 se ilustran los espectros IR graficados en su totalidad (desde 4000 a 400 cm^{-1}) obtenidos por los diferentes funcionales combinados con el conjunto de bases triple Z sin la aplicación de factores de escala.

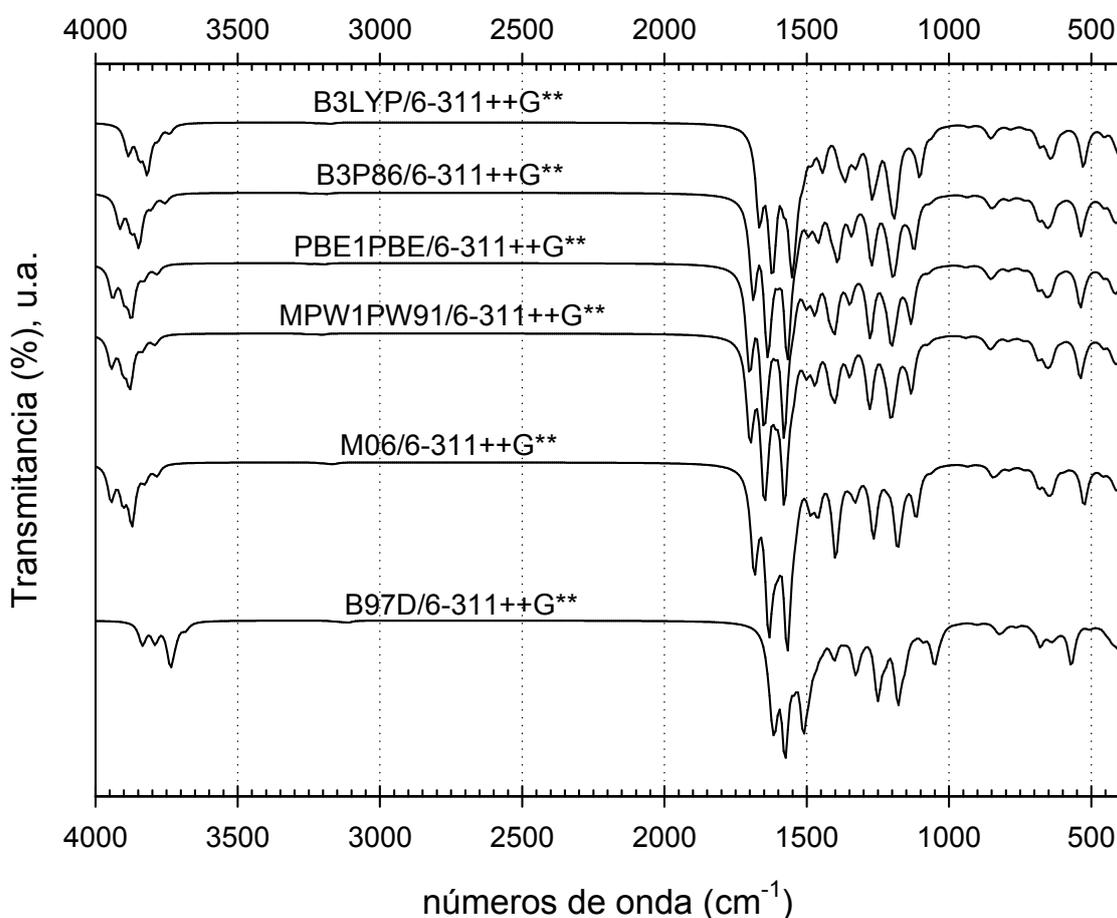


Figura 4.5. Espectros IR teóricos del complejo VO/Api obtenidos empleando diferentes métodos computacionales (sin escalar).

Teniendo en cuenta que los mejores resultados se obtuvieron con los funcionales B97D y B3LYP, se realizó un análisis comparativo atendiendo la calidad de las bases (doble o triple Z). Para ambos funcionales (B97D y B3LYP) el enlace V=O se alarga $0,002\text{ \AA}$ y la frecuencia disminuye en 31 cm^{-1} al pasar de 6-31G** (doble Z) a 6-311++G** (triple Z). Teniendo en cuenta que el valor experimental es 977 cm^{-1} (lejos del valor obtenido en la simulación) y

que el costo computacional del conjunto de bases 6-311++G** es muy superior al del conjunto de bases 6-31G** se puede considerar adecuada la aplicación de bases de calidad doble Z para sistemas VO/flavonoides con un gran número de átomos. Esto permitiría disminuir en gran medida el costo computacional sin perder calidad en los cálculos. Estas afirmaciones concuerdan con los resultados de Parihar y colaboradores que emplearon este nivel de teoría para optimizar las estructuras de algunos complejos de oxidovanadio(IV) con ligandos 4-acilpirazolona y obtuvieron concordancias razonables entre los datos teóricos y cristalográficos (Parihar et al., 2014).

Además, esta diferencia entre las bases puede disminuirse con el uso de factores de corrección. Merrick y colaboradores han realizado un estudio exhaustivo respecto de los factores de escala aplicados a regiones altas ($> 1000 \text{ cm}^{-1}$) y bajas ($< 1000 \text{ cm}^{-1}$) del espectro (Merrick et al., 2007). Estos autores proponen diferentes factores de escala teniendo en cuenta el método utilizado en la optimización, por ejemplo, para B3LYP/6-311++G** sugieren un factor de 0,9688 y para B3LYP/6-31G** sugieren un factor de 0,9627 (para frecuencias altas). Aplicando dichos factores de escala, la vibración asociada al modo de estiramiento (*stretching*) del V=O a nivel B3LYP/6-311++G** sería de 1.062 cm^{-1} y a nivel B3LYP/6-31G** sería de 1.085 cm^{-1} . Puede verse que aplicando estos factores de corrección, la diferencia en los valores de frecuencia disminuye a 23 cm^{-1} . Esto justificaría el uso del conjunto de bases 6-31G** combinado con los factores de escala para sistemas con un gran número de átomos (como es el caso de VO/Baic) permitiendo cálculos computacionales de calidad y a un costo computacional razonable. En la Figura 4.6 se ilustran los espectros IR (escalados) obtenidos empleando el funcional B3LYP combinado con los dos conjuntos de bases (6-31G** y 6-311++G**). Adicionalmente, se grafica el espectro del VO/Api calculado a nivel B97D/6-311++G** (sin escalar) para mostrar las similitudes con los espectros calculados con el funcional B3LYP (escalados).

Este estudio permitió seleccionar los métodos para los sistemas VO/Api y VO/Baic de manera coherente y atendiendo la relación costo/beneficio (costo computacional/calidad de los cálculos). Para el complejo VO/Api (37 átomos) se seleccionó el método B97D/6-311++G** mientras que para el complejo VO/Baic (96 átomos) se seleccionó el método B3LYP/6-31G** adicionado de difusas sobre los átomos de oxígeno, puesto que no se logró una convergencia satisfactoria con el funcional B97D (Sección 4.2.2).

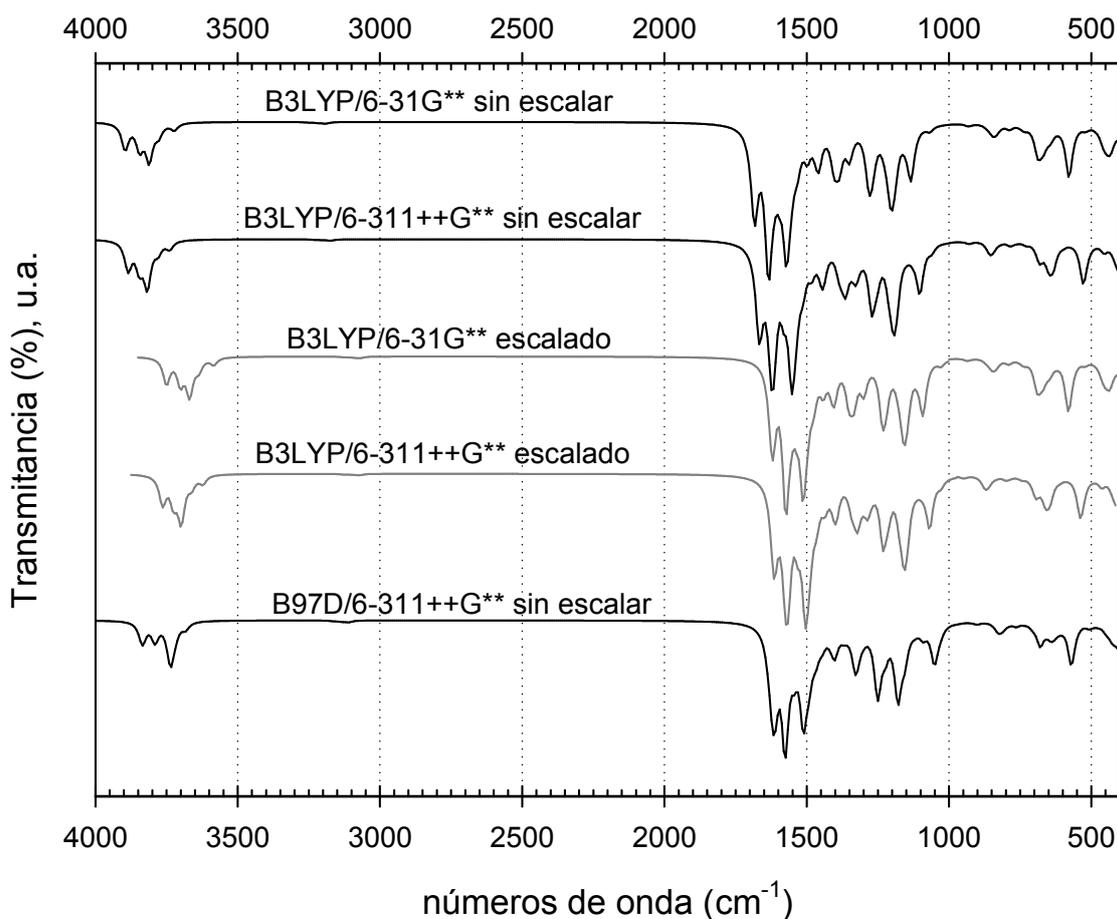


Figura 4.6. Espectros IR teóricos del complejo VO/Api obtenidos empleando el funcional B3LYP combinado con los dos conjuntos de bases (6-31G** y 6-311++G**) escalados (gris) y sin escalar (negro). Factores de escala para B3LYP/6-31G**: frecuencias $<1000 = 1,0028$ y frecuencias $> 1000 = 0,9627$. Factores de escala para B3LYP/6-311++G**: frecuencias $<1000 = 1,0189$ y frecuencias $> 1000 = 0,9688$. Espectro IR teórico del complejo VO/Api calculado a nivel B97D/6-311++G** (sin escalar).

4.2.2. Determinación de geometría y conformación más estable de los complejos.

Complejo VO/Baic: la geometría optimizada del ligando se empleó para construir el complejo de oxidovanadio(IV) y Baicalina (VO/Baic). El complejo se optimizó primero al mismo nivel de teoría que el ligando (B3LYP/6-31G**) y luego, teniendo en cuenta la carga negativa del mismo, se reoptimizó empleando funciones difusas para átomos de oxígeno. Estos conjuntos de bases fueron seleccionados atendiendo a su razonable costo computacional y confiabilidad (sección 4.2.1). La estructura optimizada (en fase gaseosa) del complejo VO/Baic se muestra en la Figura 4.7. El mismo resultó ser un complejo pentacoordinado (véase Figura 1.5A) con geometría piramidal cuadrada. Las longitudes y

ángulos de enlace más relevantes alrededor del átomo de vanadio se muestran en la Tabla 4.3. Los principales cambios geométricos en el ligando luego de la coordinación son la disminución en la longitud de los enlaces C(5)-O(5) (1,348 Å) y C(6)-O(6) (1,374 Å) debido a que la resonancia del sistema pi del V=O le otorga un mayor carácter doble a estos enlaces. Por otra parte, la distancia del C=O del anillo C no sufre grandes modificaciones siendo de 1,253 Å en el ligando libre y de 1,243 Å en el complejo. Teniendo en cuenta la esfera de coordinación alrededor del centro de vanadio, puede verse que la longitud de enlace V=O calculada (1,600 Å) es mayor al valor de V=O en el complejo bisacetilacetato (1,56 Å) (Dodge et al., 1961) lo que nuevamente descarta la coordinación por el C=O del anillo C, coherente con un tipo de coordinación “biscatecol” (véase Figura 1.4C).

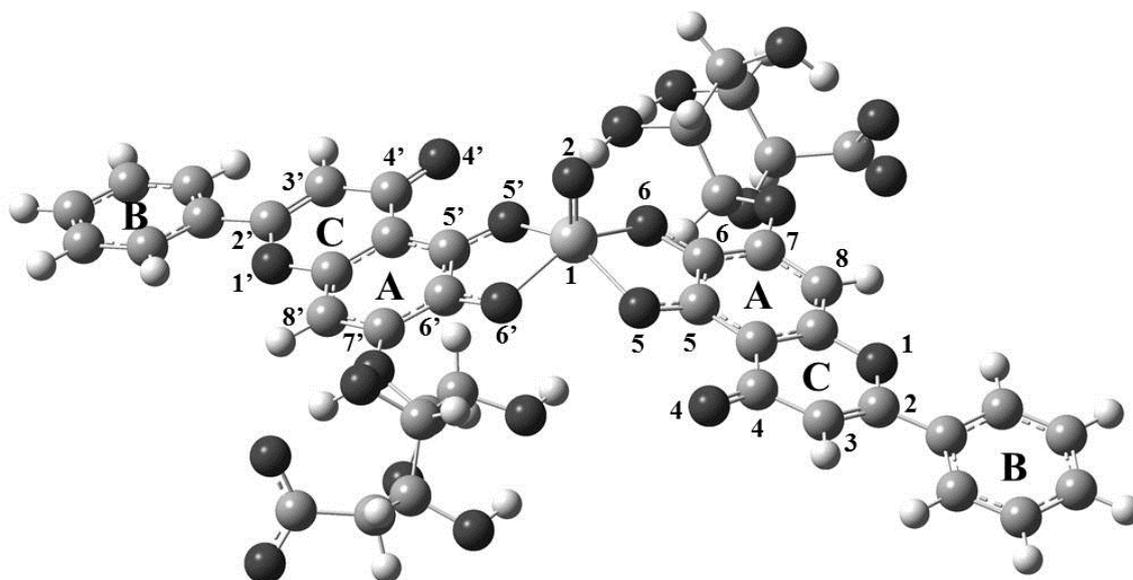


Figura 4.7. Geometría optimizada del complejo VO/Baic empleando el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G** para los átomos de C, H y V y 6-31+G** para los átomos de O. Las esferas grises representan a los átomos de C, las esferas negras representan a los átomos de O, las esferas blancas representan a los átomos de H y la esfera grande de color gris claro (1) representa el átomo de V.

Tabla 4.3. Longitudes de enlace (Å) y ángulos (°) seleccionadas alrededor del vanadio en el complejo VO/Baic calculado empleando el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G** para los átomos de C, H y V y 6-31+G** para los átomos de O.

Longitudes de enlace ^a	VO/Baic	Ángulos de enlace ^a	VO/Baic
V(1)-O(2)	1,600	O(2)-V(1)-O(5)	109,2
V(1)-O(5)	1,997	O(2)-V(1)-O(6)	108,9
V(1)-O(6)	1,982	O(2)-V(1)-O(5')	109,2
V(1)-O(5')	1,997	O(2)-V(1)-O(6')	108,9
V(1)-O(6')	1,982		
C(5)-O(5)	1,315		
C(6)-O(6)	1,334		
C(5')-O(5')	1,315		
C(6')-O(6')	1,334		

^a para la denominación de los átomos ver Figura 4.7.

Complejo VO/Api: la geometría optimizada del ligando se empleó para construir el complejo de oxidovanadio(IV) de Apigenina (VO/Api). El complejo se optimizó primero al mismo nivel de teoría que el ligando (B3LYP/6-311++G**) y luego se reoptimizó empleando diferentes funcionales y conjuntos de bases (sección 4.2.1). El conjunto de bases de valencia triple zeta 6-311++G**, desarrollada por Pople y colaboradores (Krishnan et al., 1980), resultó la mejor elección. Además, los resultados indicaron que el empleo del funcional B97D parece ser el más ventajoso, teniendo en cuenta la mejor correlación con el espectro experimental FTIR. La estructura optimizada (en fase gaseosa) del complejo VO/Api se muestra en la Figura 4.8. Los datos experimentales (conductimetría, termogravimetría y análisis elementales) permitieron confirmar que el VO/Api tiene sólo un ligando coordinado con el centro metálico. A partir de las determinaciones espectroscópicas, se sugiere que el modo de coordinación del ligando con el centro metálico se produce a través de los grupos C=O y O⁻ con coordinación tipo “acetilacetona” (véase Figura 1.4A), similar a los complejos de coordinación de oxidovanadio(IV) de crisina y morina medidos previamente (Naso et al., 2013, 2010). La esfera de coordinación se completa con dos moléculas de agua (determinadas por medidas termogravimétricas). La estructura optimizada del VO/Api sugiere un complejo pentacoordinado (véase Figura 1.5A) con geometría piramidal cuadrada distorsionada. Las longitudes y ángulos de enlace más relevantes alrededor del átomo de vanadio se muestran

en la Tabla 4.4. Teniendo en cuenta la esfera de coordinación alrededor del centro de vanadio, puede verse que la longitud de enlace V=O calculada (1,576 Å) representa un valor intermedio entre los valores del V=O en el complejo bisacetilacetionato (1,56 Å) (Dodge et al., 1961) y el ión hidratado $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ (1,582 Å, véase Figura 1.1A) (Krakowiaka et al., 2012). Además, el enlace C=O de Api se alargó por la coordinación de 1,253 Å a 1,309 Å, tal como se esperaba.

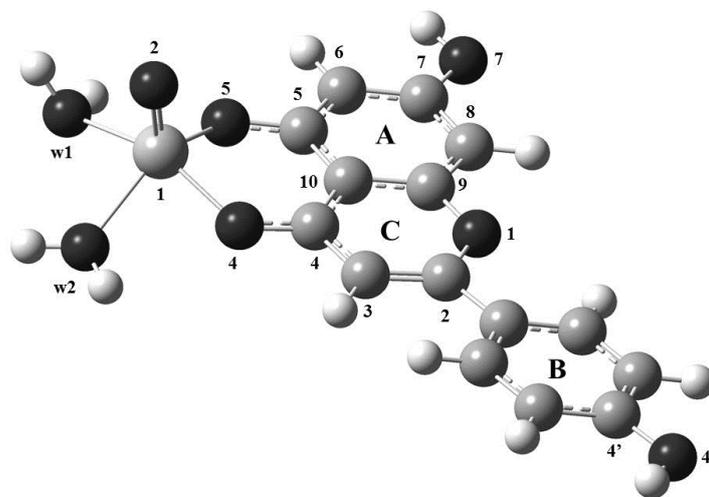


Figura 4.8. Geometría optimizada del complejo VO/Api a nivel B97D/6-311++G**. Las esferas grises representan a los átomos de C, las esferas negras representan a los átomos de O, las esferas blancas representan a los átomos de H y la esfera grande de color gris claro (1) representa el átomo de V.

Tabla 4.4. Longitudes de enlace (Å) y ángulos (°) seleccionadas alrededor del vanadio en el complejo VO/Api calculado a nivel B97D/6-311++G**.

Longitudes de enlace ^a	VO/Api	Ángulos de enlace ^a	VO/Api
V(1)-O(2)	1,576	O(2)-V(1)-O(w1)	99,09
V(1)-O(w1)	2,180	O(2)-V(1)-O(w2)	111,99
V(1)-O(w2)	2,119	O(2)-V(1)-O(4)	107,40
V(1)-O(4)	1,947	O(2)-V(1)-O(5)	112,76
V(1)-O(5)	1,893		
C(5)-O(5)	1,338		
C(4)-O(4)	1,309		

^a para la denominación de los átomos ver Figura 4.8.

Dado que el complejo VO/Baic fue optimizado empleando el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G** para los átomos de C, H y V y 6-31+G** para los átomos de O, para poder establecer comparaciones, el complejo VO/Api se reoptimizó a este mismo nivel de cálculo. Los resultados de las optimizaciones a este nivel muestran que la longitud de enlace V=O en el VO/Api (1,564 Å, dato no tabulado) es menor que en el VO/Baic (1,600 Å). Además, las simulaciones de los espectros vibracionales muestran que la banda del estiramiento del V=O se localiza a frecuencias más altas en el VO/Api (1115 cm⁻¹, dato no tabulado) que en el VO/Baic (1028 cm⁻¹). Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta la esfera de coordinación de cada complejo. La esfera de coordinación en el complejo VO/Api está conformada por los grupos carbonilo y 5-OH deprotonado (C=O, O⁻) o tipo “acetilacetona” (véase Figura 1.4A). Por el contrario, la esfera de coordinación en el complejo VO/Baic involucra los dos grupos OH deprotonados situados en los átomos C5 y C6 del anillo A de las dos unidades de Baic 2 x (O⁻, O⁻) o tipo “catecol” formando un anillo quelato (véase Figura 1.4C). El fuerte efecto inductivo que producen los cuatro grupos ArO⁻ coordinados con el centro metálico en el complejo VO/Baic y que puede apreciarse tanto en las geometrías optimizadas como en las simulaciones de los espectros vibracionales, produciría un aumento en la longitud del enlace V=O y el consecuente desplazamiento de la banda de estiramiento al rojo (a menores números de onda). Esta conclusión se apoya en las mediciones de los espectros FTIR y EPR.

Complejo Cu/5-HTP: los estudios teóricos de este complejo se realizaron usando el funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993) con el conjunto de bases 6-311G (Krishnan et al., 1980) mejorado mediante la adición de funciones de polarización. La geometría optimizada del ligando se empleó para construir el complejo Cu/5-HTP. Se realizó una investigación conformacional de Cu/5-HTP con una geometría cuadrado-plana de coordinación CuN₂O₂ (con dos moléculas de aminoácido N y O donadores) teniendo en cuenta las conformaciones *cis* y *trans* del nitrógeno alifático y un oxígeno del carboxilato en la esfera de coordinación (CuN₂O₂). Además, en los modelos construidos se consideró la rotación alrededor del enlace C2-C3, definido como el ángulo diedro C1-C2-C3-C4 (Figura 4.4). Este ángulo diedro configura la posición relativa del plano del sistema de anillos del 5-HTP respecto al plano de la esfera de coordinación (CuN₂O₂). Estos cálculos se realizaron en fase gaseosa combinando diferentes funcionales (SVWN y B3LYP) con diferentes conjuntos de bases (3-21G, 6-31G, 6-31G** y 6-311G**). Para las estructuras resultantes

de la búsqueda conformacional optimizada a nivel B3LYP/6-311**, se realizó el análisis vibracional al mismo nivel de teoría.

El análisis conformacional y estructural de Cu/5-HTP se llevó a cabo sin ningún inconveniente. Los procesos de optimización de los diferentes conformeros se llevaron a cabo empleando diferentes funcionales combinados con diferentes conjuntos de bases. Sin embargo, sólo cinco estructuras convergieron a nivel B3LYP/6-311G** y se confirmó que se trataba de estructuras de mínima energía (Figura 4.9). Los aspectos geométricos y energéticos de los cinco conformeros se enumeran en la Tabla 4.5. Los conformeros 1 (*trans*) y 2 (*cis*) son los más estables y tienen una diferencia energética (ΔE) inferior a 2 kcal mol⁻¹ y esta baja diferencia sugiere la coexistencia de ambas especies a temperatura ambiente. Las poblaciones relativas de estos dos conformeros se calcularon mediante la distribución de Maxwell-Boltzmann a 298,15 K. Los conformeros 1 y 2 muestran poblaciones relativas cercanas al 86% y al 14%, respectivamente. Estos resultados llevaron a seleccionar la estructura de estos dos conformeros para estudiar sus aspectos geométricos y vibracionales.

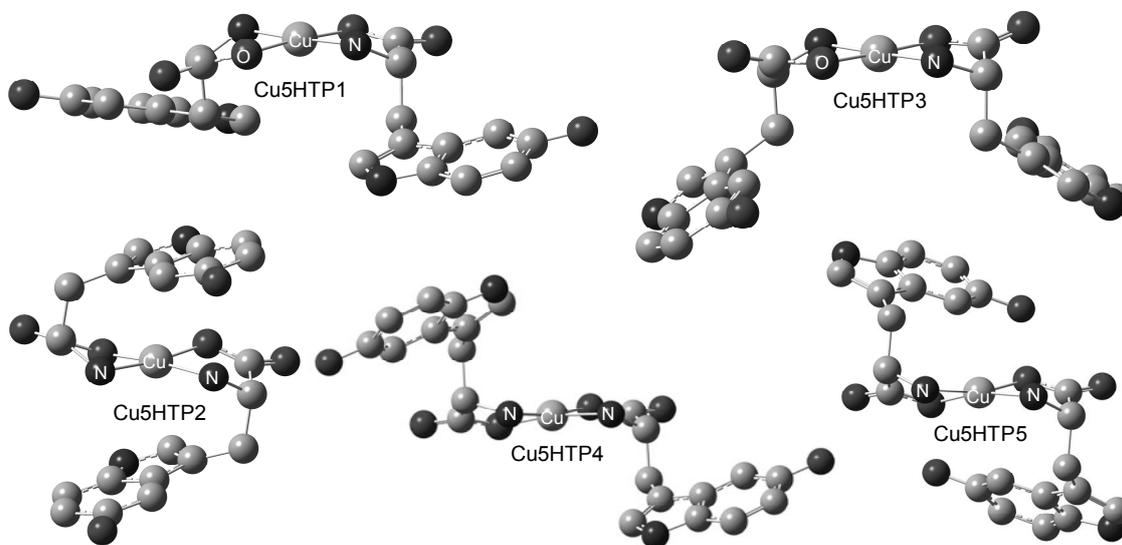


Figura 4.9. Estructuras de los cinco conformeros del Cu/5-HTP optimizados en fase gaseosa a nivel B3LYP/6-311G**. Los átomos de hidrógeno han sido omitidos por razones de claridad, las esferas negras representan a los átomos de N, las esferas grises representan a los átomos de O, las esferas grises claras representan a los átomos de C y la esfera grande de color gris claro representa el átomo de Cu.

Tabla 4.5. Energía y ángulo diedro característico C1-C2-C3-C4 (ver Figura 4.4 para la numeración de los átomos) para los cinco conformeros de Cu/5-HTP optimizados en fase gaseosa a nivel B3LYP/6-311G**.

Conformero	Configuración del CuN ₂ O ₂	Ángulo diedro	Energía ^a	ΔE ^b	Población relativa ^c
Cu/5-HTP1	<i>trans</i>	179,94	-1984498,35	0,00	86,31
Cu/5-HTP2	<i>cis</i>	-68,95	-1984497,08	1,26	13,69
Cu/5-HTP3	<i>trans</i>	67,53	-1984488,08	10,26	
Cu/5-HTP4	<i>cis</i>	-178,90	-1984486,59	11,76	
Cu/5-HTP5	<i>cis</i>	21,72	-1984481,40	16,94	

^a Energía calculada a nivel B3LYP/6-311G** y corregida por la ZPE, expresadas en kcal mol⁻¹.

^b Diferencia energética respecto del conformero más estable, expresada en kcal mol⁻¹.

^c Población relativa de los principales conformeros calculada por la ecuación de Boltzmann, expresada como porcentaje (%).

El centro metálico en la estructura optimizada de Cu/5-HTP1 tiene una geometría cuadrado-plana CuN₂O₂ con una disposición *trans* de los aminoácidos en el plano ecuatorial, involucrando los grupos amino y carboxilato terminales de dos moléculas de 5-HTP. Por otra parte, la estructura optimizada de Cu/5-HTP2 indica que este conformero tiene el ion cobre(II) en una geometría cuadrada-plana distorsionada con una disposición *cis* de las moléculas de 5-HTP coordinando también por nitrógeno alifático y un oxígeno del carboxilato en un entorno CuN₂O₂. El complejo Cu/5-HTP1 (*trans*) es el conformero más estable, en concordancia con reportes previos de un complejo emparentado de triptófano con el ión cobre(II) (Cu(Trp)₂) (Wagner y Baran, 2004). La Figura 4.10 muestra la geometría optimizada de los complejos Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2 a nivel B3LYP/6-311G**, incluyendo átomos de hidrógeno y números de átomos alrededor del cobre en la esfera de coordinación. Las longitudes y ángulos de enlace representativos alrededor del átomo de cobre en ambos conformeros se muestran en la Tabla 4.6.

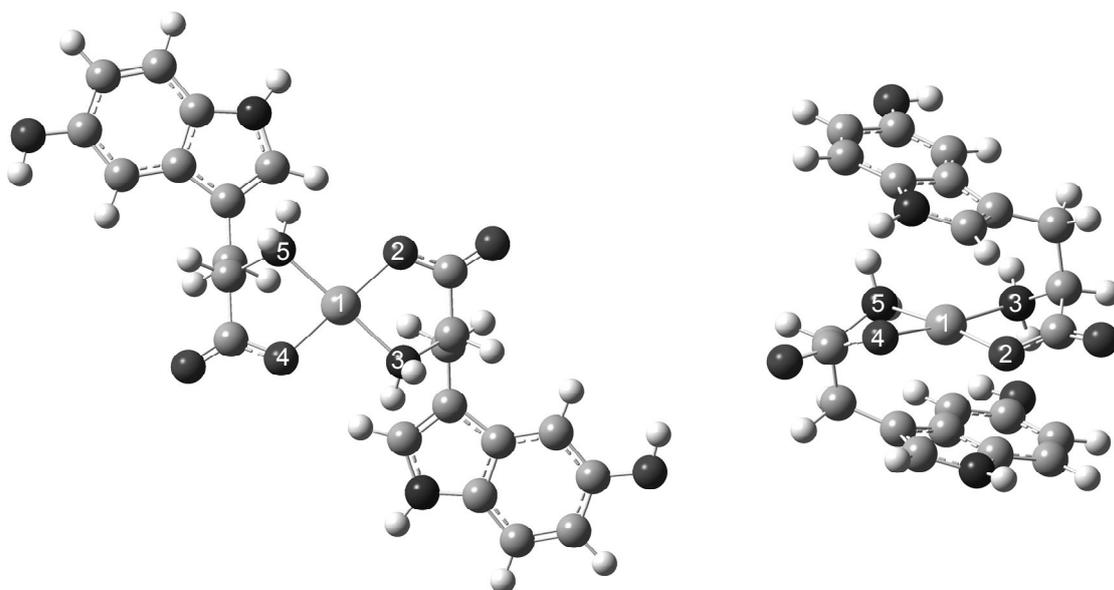


Figura 4.10. Geometría de los complejos Cu/5-HTP1 (izquierda) y Cu/5-HTP2 (derecha) optimizados a nivel B3LYP/6-311G**. Las esferas blancas representan a los átomos de H, las esferas negras representan a los átomos de N, las esferas grises representan a los átomos de O, las esferas grises claras representan a los átomos de C y la esfera grande de color gris claro representa el átomo de Cu. Los átomos alrededor del cobre (átomo 1) están numerados.

Tabla 4.6. Longitudes de enlace seleccionadas (Å) y ángulos (°) alrededor del cobre en los complejos Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2 calculados a nivel B3LYP/6-311G**.

Longitudes de enlace ^a	Cu/5-HTP1	Cu/5-HTP2	Ángulos de enlace ^a	Cu/5-HTP1	Cu/5-HTP2
Cu(1)-O(2)	1,904	1,937	O(2)-Cu(1)-N(3)	84,44	81,99
Cu(1)-O(4)	1,904	1,937	O(4)-Cu(1)-N(5)	84,44	81,99
Cu(1)-N(3)	2,010	2,042	O(2)-Cu(1)-N(5)	95,68	173,24
Cu(1)-N(5)	2,010	2,042	O(4)-Cu(1)-N(3)	95,68	173,24
			O(2)-Cu(1)-O(4)	175,44	96,78
			N(3)-Cu(1)-N(5)	176,97	100,00

^a Para la denominación de los átomos ver Figura 4.10.

4.2.3. Evaluación de las propiedades vibracionales de los complejos.

Complejo VO/Baic: los espectros IR experimental y teórico (calculados al mismo nivel de teoría empleado en la optimización) del complejo VO/Baic se muestran en la Figura 4.11. Los datos experimentales y calculados mostraron similitudes razonables, mediante el uso

de los factores de escala reportados por Merrick y colaboradores (Merrick et al., 2007). Los resultados de la simulación utilizando diferentes factores de escala para diferentes regiones del espectro (frecuencias $<1000= 1,0028$ y frecuencias $>1000= 0,9627$). Sin embargo, un estudio vibracional exhaustivo indicó que el espectro de IR calculado es ligeramente diferente al experimental. Por ejemplo, la banda a 925 cm^{-1} en el espectro experimental se asignó al estiramiento $\text{V}=\text{O}$ (véase Tabla 3.1), mientras que en la simulación este modo vibracional aparece a 1028 cm^{-1} (sin escalar). Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que el espectro FTIR se midió en el estado sólido en el que la estructura se somete a interacciones intra e intermoleculares tales como enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals, mientras que los cálculos para la molécula aislada se han realizado en fase gaseosa. En este contexto, el análisis de Distribución de Energía Potencial (PED) es una herramienta indispensable para un análisis serio de los espectros vibracionales. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa VEDA 4 con el fin de identificar los componentes más importantes en cada modo vibracional. Los resultados del análisis de PED se muestran en la Tabla A1 del Anexo y los porcentajes de contribución de cada modo acoplado para un mismo número de onda se indican entre paréntesis.

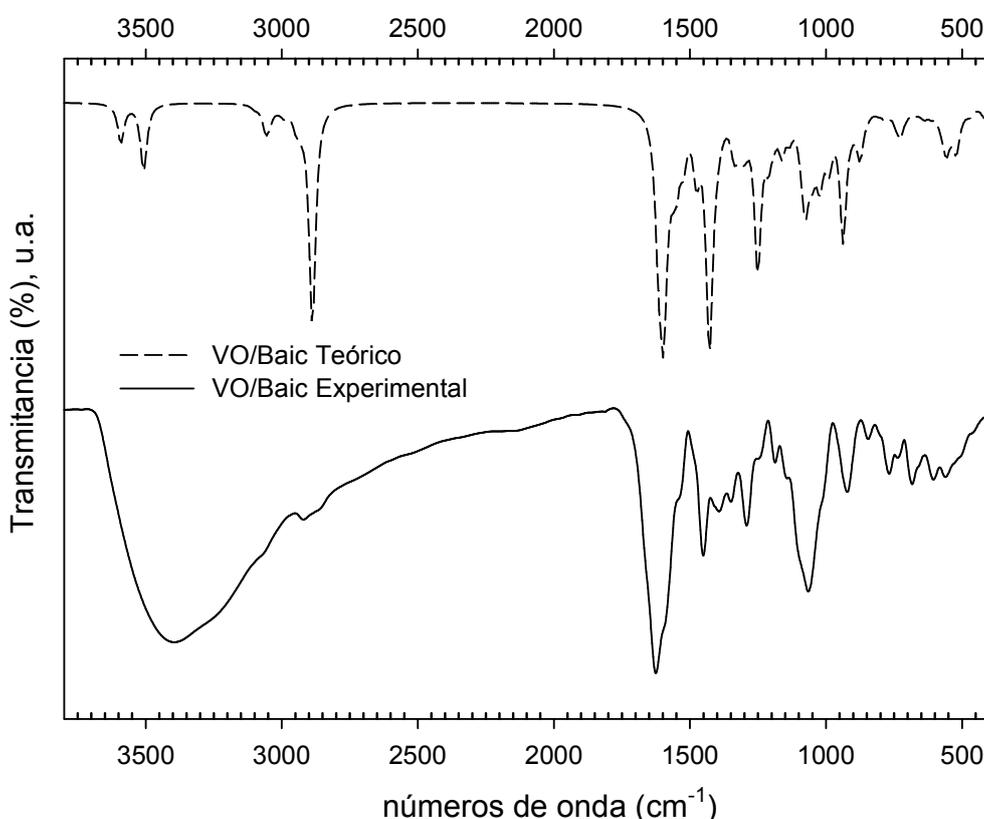


Figura 4.11. Espectro IR experimental y teórico del complejo VO/Baic. Factores de escala: frecuencias $<1000= 1,0028$ y frecuencias $> 1000= 0,9627$.

Complejo VO/Api: los espectros IR experimental y teórico (calculados al mismo nivel de teoría empleado en la optimización, B97D/6-311++G**) del complejo VO/Api se muestran en la Figura 4.12. Los datos experimentales y calculados mostraron similitudes razonables, incluso sin el uso de factores de escala. Sin embargo, un estudio vibracional exhaustivo indicó que el espectro de IR calculado es ligeramente diferente al experimental. Por ejemplo, la banda a 977 cm^{-1} en el espectro experimental se asignó al estiramiento V=O (véase Tabla 3.2), mientras que en la simulación este modo vibracional aparece a 1045 cm^{-1} . Como en el caso anterior, estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que el espectro FTIR se midió en el estado sólido, mientras que los cálculos para la molécula aislada se han realizado en fase gaseosa. El análisis de los espectros vibracionales se llevó a cabo utilizando el programa VEDA 4. Los resultados del análisis de PED se muestran en la Tabla A2 del Anexo y los porcentajes de contribución de cada modo acoplado para un mismo número de onda se indican entre paréntesis. A efectos comparativos, la Tabla A2 incluye datos previamente informados del espectro vibracional de Api calculado al nivel B3LYP/6-31G(d,p) (escala 0,9608) (Mariappan et al., 2012).

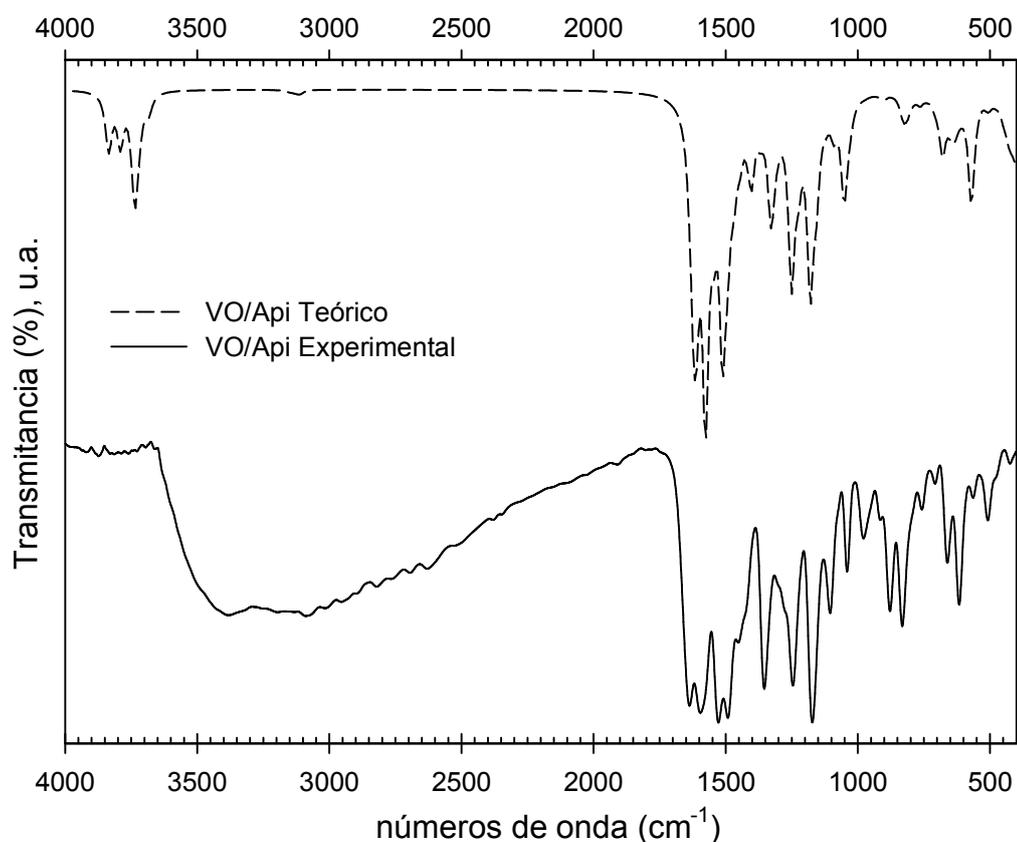


Figura 4.12. Espectro IR experimental y teórico (optimizados a nivel B97D/6-311++G**) del complejo VO/Api.

Complejo Cu/5-HTP: los espectros IR experimentales y teóricos del complejo Cu/5-HTP, calculados al mismo nivel de teoría empleado en el procedimiento de optimización (B3LYP/6-311G**), se muestran en la Figura 4.13. Los espectros IR teóricos se han construido sumando los espectros del Cu/5-HTP1 (86%) y Cu/5-HTP2 (14%), atendiendo al porcentaje de población relativa de estos dos conformeros calculado por la ecuación de Maxwell-Boltzmann (véase Tabla 4.5). Los resultados de la simulación empleando diferentes factores de escala (Merrick et al., 2007) para diferentes regiones del espectro (frecuencias $<1000 = 1,0119$ y frecuencias $>1000 = 0,9682$) son ligeramente diferentes de los datos experimentales. Como en los casos anteriores, estas diferencias podrían atribuirse al hecho de que el espectro FTIR se midió en el estado sólido, mientras que los cálculos para la molécula aislada se han realizado en fase gaseosa. El análisis de los espectros vibracionales se llevó a cabo utilizando el programa VEDA 4. Los resultados del análisis de PED para los complejos Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2 se muestran en la Tabla A3 del Anexo; los porcentajes de contribución de cada modo acoplado para un mismo número de onda se indican entre paréntesis.

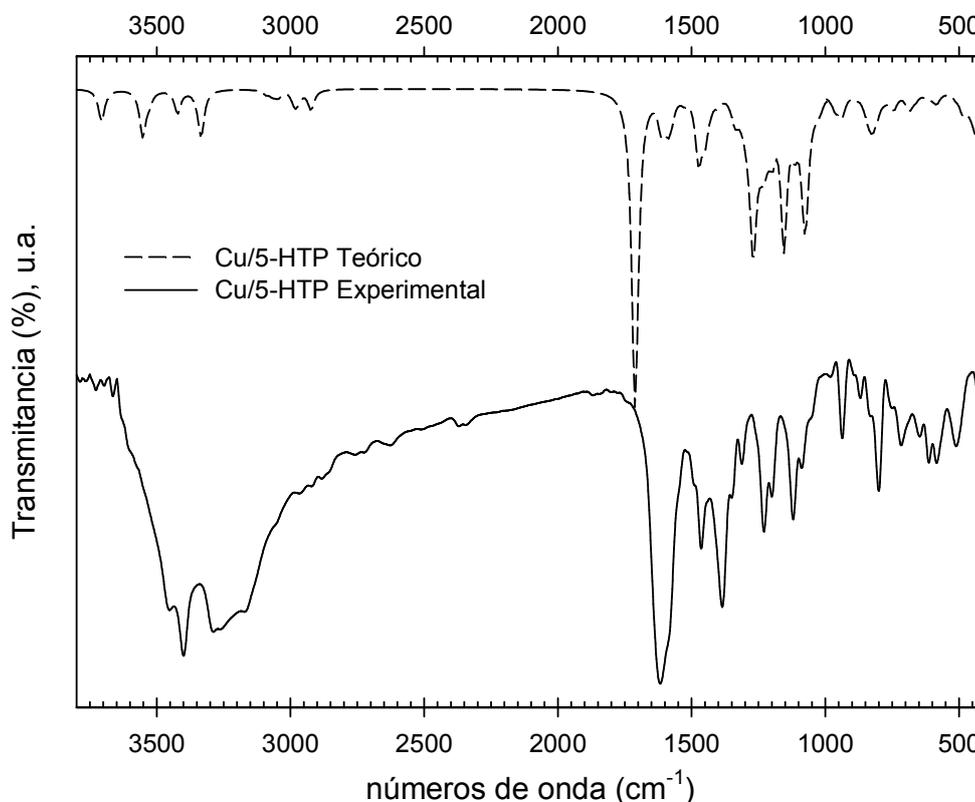


Figura 4.13. Espectros IR experimental (negro) del complejo Cu/5-HTP y teórico (gris) del Cu/5-HTP1 (86%) y Cu/5-HTP2 (14%) sumados (optimizados a nivel B3LYP/6-311G**). Factores de escala: frecuencias $<1000 = 1,0119$ y frecuencias $>1000 = 0,9682$.

4.3. Conclusiones preliminares

La selección de los métodos para los sistemas VO/Api y VO/Baic se realizó atendiendo la relación costo/beneficio (costo computacional/calidad de los cálculos). Para el complejo VO/Api se seleccionó el método B97D/6-311++G** mientras que para el complejo VO/Baic se seleccionó el método B3LYP/6-31G** adicionado de difusas sobre los átomos de oxígeno. El último método resulta adecuado para sistemas VO/flavonoide con un gran número de átomos como es el caso del VO/Baic.

La optimización de los ligandos como instancia previa a la construcción de la geometría de partida de los complejos facilitó la reoptimización de los mismos puesto que se parte de una estructura refinada del flavonoide.

La optimización del complejo VO/Baic a nivel B3LYP/6-31G** sugieren que el mismo es un complejo pentacoordinado con geometría piramidal cuadrada. En el caso del VO/Api, la optimización a nivel B97D/6-311++G** sugiere que se trata de un complejo pentacoordinado con geometría piramidal cuadrada distorsionada. Para el complejo Cu/5-HTP se seleccionó el método B3LYP/6-311++G** y los cálculos sugieren que el conformero que tiene una geometría cuadrado-plana CuN_2O_2 con una disposición *trans* de los aminoácidos en el plano ecuatorial (involucrando los grupos amino y carboxilato terminales de dos moléculas de 5-HTP) es el conformero más estable (86%), pero que a temperatura ambiente el conformero con disposición *cis* coexiste en un porcentaje minoritario (14%). En todos los casos, las optimizaciones fueron satisfactorias y se realizaron los cálculos vibracionales para demostrar que se trata de mínimos totales en la superficie de energía potencial (y no puntos de ensilladura). La determinación de la geometría y conformación más estable de los complejos está en concordancia con los datos experimentales de caracterización estructural de los mismos.

Las simulaciones de los espectros vibracionales de infrarrojo coinciden de manera aceptable con los datos experimentales, lo que sugiere con un alto grado de probabilidad que dichas estructuras optimizadas se corresponden con las geometrías de los complejos en estudio. Además, los cálculos vibracionales sirven de soporte a las asignaciones tentativas de las diferentes bandas en el espectro FTIR experimental. Las diferencias encontradas entre los espectros teóricos y experimentales pueden ser bien explicadas teniendo en cuenta que los cálculos se realizan con una molécula aislada y en fase gaseosa mientras que los espectros experimentales se miden en el estado sólido (afectado por las interacciones inter e intramoleculares). Para el caso particular del modo de estiramiento del enlace $\text{V}=\text{O}$, si bien las frecuencias de estiramiento calculadas difieren de las medidas, se observa el

comportamiento esperado por su coordinación con diferentes grupos funcionales de los flavonoides. Las longitudes de enlace calculadas para V=O en VO/Baic de 1,60 Å y en VO/Api, de 1,576 Å, en acuerdo con el corrimiento esperado para los modos de estiramiento V=O sin escalar (1028,35 cm⁻¹ y 1045,49 cm⁻¹, respectivamente), indican que la esfera de coordinación propuesta para cada complejo coincide con la esfera determinada a través de las medidas usando diferentes técnicas experimentales.

Anexo

 Tabla A1. Frecuencias (sin escalar y en cm^{-1}) y porcentaje de contribución de PED ($\geq 10\%$) del complejo VO/Baic calculado empleando el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G** para los átomos de C, H y V y 6-31+G** para los átomos de O.

Complejo VO/Baic			
Frecuencias	Asignaciones PED ^a ($\geq 10\%$)	Frecuencias	Asignaciones PED ^a ($\geq 10\%$)
3737,00	vOH (98)	984,89	χHCCC (78) + χHCCC (78)
3736,99	vOH (98)	974,82	vOC (48)
3650,27	vOH (99)	972,92	vOC (46)
3232,19	vCH (97)	962,34	χHCCC (65) + χCCCC (15) + χHCCC (69)
3232,18	vCH (97)	946,98	vCC (11)
3226,50	vCH (99)	940,59	δCCO (13)
3226,49	vCH (99)	940,27	vCC (11) + δCCO (13)
3225,05	vCH (87) + vCH (12)	916,71	δCOC (11)
3207,89	vCH (82)	912,57	τHCCC (75)
3207,88	vCH (12)	912,54	τHCCC (74)
3182,83	vCH (88)	910,20	τHOCC (28)
3182,78	vCH (88)	903,09	τHOCC (17)
3168,30	vCH (13) + vCH (78)	902,46	τHOCC (13)
3153,70	vCH (84)	883,57	vCC (18)
3153,69	vCH (11)	854,31	τHCCC (76) + τHCCC (15)
3134,86	vCH (96)	838,45	τHCCC (73) + χCCCC (19)
3119,48	vCH (95)	838,35	τHCCC (20) + χCCCC (16)
3119,47	vCH (95)	814,04	vOC (16) + vOC (17)
3107,58	vCH (99)	805,26	τHCCC (73)
3107,56	vCH (99)	805,24	χOCCC (10)
3066,62	vCH (95)	775,37	τHCCC (20) + χOCOC (14)
3066,56	vCH (95)	773,43	τHCCC (34)
3046,78	vCH (80)	756,81	vCC (16) + δCCO (10)
3046,75	vCH (80)	755,53	vCC (13)
3004,88	vOH (81) + vCH (15)	733,33	δOCO (26) + χOCOC (16)
1681,06	vCC (68)	733,25	δOCO (26)
1678,53	vCC (69)	729,95	χCCCC (54)
1652,54	vCC (47)	725,80	δCCO (19)
1652,24	δCCC (11)	699,41	τHCCC (27) + τCCCC (20)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A1. (Continuación)

1626,64	vCC (33) + vCC (10)	682,92	χ OCCC (14)
1626,07	vCC (10) + vCC (12)	682,42	τ COVO (10)
1610,89	vCC (46)	664,07	δ CCO (12)
1609,23	vCC (29) + vCC (10)	662,96	δ CCO (16)
1585,67	δ HOC (81)	638,57	vCC (16)
1585,61	δ HOC (81)	638,28	χ CCOC (36)
1539,89	vCC (37) + δ HCC (12)	638,13	χ CCOC (40)
1533,67	vCC (15)	632,36	δ CCC (10)
1533,64	δ HCC (41)	632,33	δ CCC (67)
1484,34	δ HCC (49)	615,60	χ OCCC (14) + χ OCCC (28)
1467,66	δ HOC (62) + δ HCO (28)	614,93	χ OCCC (40)
1466,78	δ HOC (63) + δ HCO (29)	600,36	δ CCO (17)
1448,36	vCC (50)	588,77	τ HCCC (18) + χ CCCC (11)
1436,94	δ HCO (15)	581,00	τ HOCC (18) + τ HOCC (37)
1436,92	τ HCOC (22)	580,51	τ HOCC (38)
1423,34	δ HCO (46)	566,56	δ COC (10)
1401,21	δ HCO (49)	564,63	χ HOCC (11)
1401,12	δ HCO (50)	550,13	δ CCO (11) + χ HOCC (15)
1394,75	vOC (17)	545,96	vOC (13) + χ HOCC (12)
1394,17	vOC (17) + δ HCC (12)	539,79	δ CCO (13)
1388,31	vOC (56)	526,11	δ CCC (13)
1381,63	δ HCC (11)	511,42	δ COV (13)
1381,43	δ HCC (11) + δ HCO (11)	499,35	δ CCC (10)
1372,43	τ HCOH (14)	499,15	δ CCC (12)
1372,33	τ HCOH (14)	490,59	δ COC (11)
1365,85	vCC (11) + vOC (13)	471,31	τ CCCC (11) + χ CCOC (10)
1364,78	vCC (26) + δ HCC (13)	468,61	τ CCCC (10)
1364,37	δ HCC (14)	430,87	δ CCO (23)
1354,95	vCC (30)	424,97	δ OCO (14)
1354,30	vCC (15)	415,11	τ CCCC (29)
1351,84	δ HCO (40) + τ HCOC (12)	414,97	τ HCCC (12) + τ CCCC (10) + τ CCCC (11)
1351,48	δ HCO (40) + τ HCOC (11)	409,80	δ CCO (48)
1345,22	δ HCO (19) + χ CCCH (16)	407,57	δ CCO (49)
1343,75	χ CCCH (15)	405,87	τ COVO (11)
1330,39	vCC (32)	390,87	δ OCO (12) + τ COVO (19)
1330,08	vCC (32) + δ HCC (21)	372,86	δ CCO (15)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A1. (Continuación)

1310,62	vCC (52)	360,07	δ CCC (17)
1305,51	δ HCO (21)	349,65	δ CCC (20)
1299,81	vCC (16)	346,67	δ CCO (11) + δ CCO (21)
1294,02	δ HCO (10) + τ HCOC (30)	337,83	δ OCC (13)
1293,84	τ HCOC (30)	317,27	δ CCO (22)
1261,44	δ HCC (30)	304,61	τ CCCC (21)
1260,78	δ HCC (30)	271,62	δ OVO (42)
1246,60	δ HOC (14) + δ HCO (12)	267,16	τ CCOC (12) + χ CCOC (23)
1246,58	δ HCO (11)	266,31	χ CCOC (25)
1237,61	vCC (10) + vCC (12)	255,78	χ OOOV (17)
1235,78	vCC (32)	225,13	δ OVO (13)
1209,19	δ HCC (17)	204,62	δ CCO (23)
1207,18	δ HOC (15)	201,99	δ CCO (24)
1205,49	vCC (14)	174,71	χ OOOV (11)
1205,37	vCC (14) + δ HCC (64)	168,34	τ CCCO (10) + τ OCCC (10)
1181,27	δ HCC (53)	128,68	δ COC (14)
1181,21	δ HCC (53)	126,56	τ CCOC (18)
1177,27	δ HCC (60)	117,00	δ CCO (13)
1176,92	δ HCC (54)	111,11	τ CCOC (40)
1145,92	vOC (17)	107,71	τ CCOC (33)
1145,85	vCC (12) + vCC (11)	93,98	δ CCO (11)
1134,52	vOC (10) + vOC (21)	80,56	τ CCOV (14)
1122,64	vOC (31) + δ HOC (10)	78,55	τ CCOC (14)
1120,04	vOC (23)	73,61	δ CCO (11) + τ CCOC (16)
1108,68	δ HCC (12) + δ HCC (11)	71,36	δ CCO (24)
1108,66	vCC (12) + δ HCC (12) + δ HCC (11)	64,33	τ COCC (15)
1098,64	vCC (10)	53,01	δ CCO (13) + δ CCO (11)
1098,18	vCC (10)	51,48	τ CCCO (54)
1091,66	vOC (19)	36,14	τ COVO (12) + τ COCC (11)
1091,19	vOC (18)	34,24	vVO (10) + τ COCO (16) + τ CCOC (11)
1075,65	vOC (18)	29,09	τ CCCO (41)
1075,64	vOC (16)	24,57	τ CCCO (47)
1064,00	vOC (62)	23,85	τ CCCO (20) + τ CCOC (15)
1063,96	vOC (64)	22,81	τ CCCO (12) + τ CCCO (27)
1055,65	vCC (37) + δ HCC (25) + vCC (38) + δ HCC (20)	20,20	τ COCC (15)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A1. (Continuación)

1043,82	vOC (11)	15,82	τ CCOC (27)
1042,28	vOC (12) + δ HCC (12)	14,91	τ CCOC (24) + τ CCOV (13) + τ COVO (11)
1028,35	vVO (95)	10,00	τ CCOV (11)
1011,32	vCC (12) + vCC (23) + δ CCC (57)	9,46	δ OVO (25) + τ CCOV (42)
1002,91	δ CCO (16)	6,77	τ COVO (54)

^a Porcentaje de contribución PED tomado del VEDA4. v: vibración de estiramiento; δ : vibración de flexión; τ : vibración de torsión; χ : flexión fuera del plano.

Tabla A2. Frecuencias (sin escalar y en cm^{-1}) y porcentaje de contribución de PED ($\geq 15\%$) del complejo VO/Api calculado a nivel B97D/6-311++G**. Comparación con los datos reportados para el ligando Api calculado a nivel B3LYP/6-31G(d,p) (escala 0,9608) (Mariappan et al., 2012).

Espectro vibracional del complejo VO/Api		Espectro vibracional del ligando Api	
Frecuencias	Asignaciones PED ^a ($\geq 15\%$)	Frecuencias	Asignaciones TED ^b ($\geq 10\%$)
3738,33	vOH (100) O(7)-H^c		
3734,00	vOH (100) O(4')-H^c		
3719,93	vOH (97) O(w2)-H^c		
3682,33	vOH (94) O(w1)-H^c	3672	vOH(100)
3182,50	vCH (97)	3668	vOH(100)
3167,38	vCH (100)	3119	vCH(100)
3155,79	vCH (91)	3111	vCH(100)
3141,51	vCH (15)	3105	vCH(97)
3140,11	vCH (77)	3088	vCH(100)
3125,23	vCH (100)	3086	vCH(89)
3108,73	vCH (94)	3081	vCH(84)
		3050	vCH(85)
		3049	vOH(99)
1628,67	δ HOH (85) H-O(w1)-H^c	1652	vOC(27) + vCC(11)
1615,76	vCC (44) Anillo A^c + Anillo C^c	1610	vOC(19) + vCC(17)
1608,86	vCC (63) Anillo B^c	1599	vOC(40) + vCC(27)
1605,07	δ HOH (87) H-O(w2)-H^c	1587	vCC(46) + vOC(10)
1563,67	vCC (46) Anillo B^c	1576	vCC(49) + δ HOC(21)
1506,92	δ HCC (27)	1563	vCC(56) + δ HOC(11)
		1500	δ HCC(18) + vCC(9)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A2. (Continuación)

1462,73	$vOC(25) \mathbf{O(4)-C(4)^c} + \mathbf{O(5)-C(5)^c} + \mathbf{O(7)-C(7)^c}$	1486	$\delta HCC(41) + \delta HOC(13)$
1439,83	$vCC(31) + \delta HCC(18)$	1450	$\delta HCC(17) + vOC(10) + \delta CCC(11)$
1410,39	$vCC(20)$	1424	$\delta HCC(36) + vCC(12) + \delta HOC(11)$
		1418	$\delta HOC(29) + \delta HCC(11)$
1364,99	$vCC(17) + \delta HOC(18) \mathbf{H-O(4')-C(4')^c}$	1379	$vCC(21) + \delta HOC(12)$
1323,88	$\delta CCC(15)$	1342	$vOC(42) + vCC(13)$
1312,26	$\delta HCC(25)$	1330	$\delta COH(28) + \delta HCC(29)$
		1305	$\delta HCC(31) + vCC(26)$
1294,58	$vCC(56)$	1281	$\delta CCC(21) + vCC(17)$
1244,87	$\delta HCC(34)$	1272	$vOC(28) + \delta HCC(22)$
1218,07	$\delta HOC(39) \mathbf{H-O(7)-C(7)^c}$	1249	$\delta HCC(20) + vCC(22)$
		1231	$vCC(17) + vOC(13)$
		1216	$vCC(23) + \delta HOC(11) + \delta HCC(10)$
1182,38	$\delta HCC(46)$	1161	$\delta HOC(19) + \delta HCC(15)$
1173,65	$\delta HOC(29) \mathbf{H-O(4')-C(4')^c} + \delta HCC(30)$	1159	$\delta HCC(59)$
1150,27	$\delta HCC(43)$	1152	$\delta HCC(41) + vOC(28)$
1123,29	$\delta CCO(23) \mathbf{C(3)-C(2)-O(1)^c} + \mathbf{C(10)-C(9)-O(1)^c} + \mathbf{C(8)-C(9)-O(1)^c}$	1136	$\delta HCC(57) + \delta HOC(20)$
1113,39	$\delta HCC(37)$		
1085,08	$vOC(47) \mathbf{O(1)-C(9)^c}$	1098	$\delta HCC(36) + \delta HOC(30)$
1045,49	$vVO(96) \mathbf{V(1)-O(2)^c}$	1087	$vOC(23) + \delta CCO(16)$
		1083	$vOC(26) + \delta CCC(11)$
		1009	$\delta HCC(31) + vCC(27)$
968,29	$vOC(19) \mathbf{O(1)-C(2)^c}$	988	$\delta HCC(17) + \delta CCC(12) + vCC(10)$
953,49	$\tau HCCC(80)$	958	$\delta CCC(18)$
918,54	$\tau HCCC(76)$	936	$\delta CCC(52) + vCC(12)$
		908	$\tau HCCC(65) + \tau CCC(14)$
829,02	$\tau HCCC(64)$	884	$vCC(26) + vOC(21)$
815,56	$vCC(32) \mathbf{Anillo B^c}$	858	$\tau HCCC(52) + \tau CCC(16)$
803,22	$\tau HCCC(66)$	825	$\tau HCCC(80)$

(continúa en la siguiente página)

Tabla A2. (Continuación)

		815	τ HCCC(56)
		809	τ HOCC(83)
		808	τ HCCC(59)
784,79	τ HCCC (84)	784	τ HCCC(77)
757,52	δ CCO (48) C(3)-C(4)-O(4)^c + C(6)-C(5)-O(5)^c + C(3)-C(2)-O(1)^c	741	τ HCCC(65) + γ OCCC(13)
730,72	τ CCCC (56)	716	τ HCCC(42) + γ CCCC(16)
		711	τ HCCC(59) + τ CCCC(11) + γ OCCC(12)
		704	δ CCC(17) + γ OCCC(14)
699,47	ν VO (20) V(1)-O(5)^c	666	γ OCCC(22)
673,16	δ HOV (63)	645	δ CCC(12) + δ COC (11)
636,13	δ CCC (42)	635	γ HOC (37) + τ HCCC(26)
630,10	δ HOV (42)	626	γ CCOC(35) + γ OCCC(10)
617,61	δ CCC (19)	618	γ CCOC(32) + τ HCCC(13) + γ OCCC(12)
		611	δ CCO(23) + δ OCC(12)
		591	γ OCCC(67)
		561	δ CCC(79)
		547	δ CCC(29) + ν CC(10) + ν OC(11)
493,86	χ CCCC (25)	499	γ CCOC(36) + γ OCCC(23)
409,70	δ CCC (15)	494	δ OCC(21) + δ CCC(20)
405,33	ν VO (20) V(1)-O(w2)^c	475	δ COC(22) + δ CCC(19) + δ OCC(10)
		425	δ CCC(39)
		403	γ CCCC(27) + τ CCCC(21)
392,76	τ HOCC (95) H-O(7)-C(7)-C(8)^c	398	δ CCO(13)
389,76	δ CCO (15) C(6)-C(7)-O(7)^c	369	γ OCC(55) + γ HCC(11)
352,53	ν VO (39) V(1)-O(w1)^c + τHOVO (20)	362	γ CCCC(51) + τ HCCC(18)
336,11	τ HOVO (50)	345	τ HOCC(94)
318,82	χ CCCC (58)	339	δ CCC(28) + δ COC(11) + δ OCC(13)
		318	δ COC(40)
289,97	τ CCOC (24)	274	τ CCCC(26)
285,08	δ CCO (27) C(8)-C(9)-O(1)^c	249	τ CCCC(14) + δ CCO(11)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A2. (Continuación)

274,70	vVO (16) V(1)-O(w2)c + vVO (19) V(1)-O(5)c	237	τCCCC(30)
257,69	τCCOV (19) + τCCOV (15)	226	vOC(19) + τCCCC(10)
248,78	δOVO (20) O(2)V(1)O(4)^c	214	τCCCC(63) + γOCCC(15)
208,08	τHOVO (72)		
177,43	τCCCC (35)	171	τCCCC(48)
137,88	δOVO (33) O(w2)V(1)O(2)^c	114	τCCCC(27)
128,17	δOVO (17) O(w1)V(1)O(2)^c	103	τCCCC(39) + τCOCC(11)
92,63	χOOOV (42)	77	δCOC(41) + δCCC(10)
71,82	δCCC (36)	42	τCOCC(38) + τCCCC(18)+ γOCCC(11)
44,49	τCCOV (29) + τCCOV (33)	30	τCOCC(86)
32,10	τCCCC (18)		
23,07	τCCOC (84)		

^a Porcentaje de contribución PED tomado del VEDA4. v: vibración de estiramiento; δ: vibración de flexión; τ: vibración de torsión; χ: flexión fuera del plano.

^b Porcentaje de Distribución de Energía Total (TED) tomado del reporte de Mariappan y colaboradores (2012) e incluido en esta tabla con fines comparativos. v: vibración de estiramiento; δ: vibración de flexión; τ: vibración de torsión; γ: flexión fuera del plano.

^c Para la denominación de los átomos ver Figura 4.8.

 Tabla A3. Frecuencias (sin escalar y en cm^{-1}) y porcentaje de contribución de PED ($\geq 10\%$) de los complejos de Cu/5-HTP1 y Cu/5-HTP2 calculadas a nivel B3LYP/6-311G**.

Cu/5-HTP1		Cu/5-HTP2	
Frecuencias	Asignaciones PED ^a ($\geq 10\%$)	Frecuencias	Asignaciones PED ^a ($\geq 10\%$)
3833,98	vOH (92)	3835,41	vOH (98)
3833,98	vOH (92)	3835,35	vOH (98)
3674,87	vNH (97)	3649,57	vNH (95)
3674,87	vNH (97)	3468,21	vNH (98)
3540,08	vNH (85)	3467,32	vNH (98)
3539,82	vNH (15) + vNH (85)	3199,90	vCH (77) + vCH (10)
3450,13	vNH (15) + vNH (85)	3199,90	vCH (10) + vCH (77)
3449,01	vNH (85)	3139,71	vCH (90)
3233,91	vCH (99)	3139,62	vCH (90)
3233,89	vCH (99)	3084,33	vCH (88)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A3. (Continuación)

3198,69	vCH (85)	3084,30	vCH (83)
3198,68	vCH (85)	3069,55	vCH (97)
3153,41	vCH (86)	3026,30	vCH (86)
3153,41	vCH (86)	1770,06	vOH (83)
3086,96	vCH (86) + vCH (13)	1664,70	vCC (33)
3086,67	vCH (11) + vCH (81)	1636,07	δ HNH (79)
3075,15	vCH (13)	1623,09	vCC (44) + δ CCC (10)
3075,11	vCH (13)	1622,92	vCC (44)
3023,68	vCH (97)	1574,47	vCC (45)
3023,35	vCH (12)	1517,59	vCC (35)
1779,31	vOC (85)	1498,00	δ HCC (14)
1669,56	vCC (11)	1488,40	δ HCH (81)
1669,37	vCC (11)	1488,30	δ HCH (80)
1643,60	δ HNH (80)	1461,10	δ HNC (28)
1643,35	δ HNH (80) + τ HNCC (18)	1461,02	δ HNC (27)
1629,90	vCC (16)	1388,82	δ HCC (14) + τ HCCC (18)
1580,72	vCC (48) + δ HCC (11)	1372,43	δ HCC (10) + τ HCCC (24)
1524,80	vCC (44)	1356,24	vOC (11)
1498,94	δ HCC (33)	1340,48	vNC (24)
1482,08	δ HCH (84)	1340,33	vNC (21)
1482,00	δ HCH (84)	1309,98	vOC (38)
1450,14	δ HNC (37)	1301,34	vOC (45) + δ HCC (19)
1450,03	δ HNC (35)	1279,99	δ HCC (18) + δ HCC (11) + δ HCC (17)
1387,07	vCC (39) + δ HOC (15)	1279,58	δ HCC (19)
1381,23	τ HCCO (53)	1242,48	δ HCC (17) + δ HCC (14)
1378,64	τ HCCO (43)	1241,70	vNC (11) + vOC (22) + δ HCC (14)
1367,37	τ HCCO (10)	1192,71	δ HCC (48)
1367,00	δ HCC (12)	1191,91	δ HOC (53)
1354,14	δ HCC (13) + τ HCCC (33)	1191,04	δ HCC (40)
1336,09	vNC (22)	1190,51	δ HOC (52)
1316,51	vOC (47)	1177,31	τ HCCC (15)
1312,82	δ HNC (10)	1175,22	δ HNC (42)
1283,97	δ HCC (37)	1149,94	δ HCC (18)
1272,79	δ HCC (34)	1149,90	vCC (11) + vNC (10) + δ HCC (34) + δ HCC (13)

(continúa en la siguiente página)

Tabla A3. (Continuación)

1257,60	$\delta\text{HNC (13)} + \delta\text{HCC (15)}$	1127,28	$\delta\text{HCC (10)} + \delta\text{HCC (17)} + \tau\text{HNCC (10)}$
1257,34	$\delta\text{HNC (11)}$	1126,53	$\nu\text{NC (12)} + \delta\text{HCN (12)} + \delta\text{HCC (21)}$
1253,04	$\tau\text{HCCC (10)}$	1119,04	$\delta\text{HNNH (13)}$
1252,79	$\nu\text{CC (32)}$	1064,43	$\delta\text{CCC (11)} + \delta\text{CCC (14)}$
1236,79	$\nu\text{CC (24)}$	1064,25	$\delta\text{CCC (15)}$
1236,27	$\nu\text{NC (19)}$	966,19	$\delta\text{HCC (14)}$
1194,60	$\delta\text{HOC (55)}$	962,66	$\nu\text{CC (10)}$
1194,23	$\delta\text{HOC (54)}$	940,75	$\tau\text{HCCN (82)}$
1154,20	$\delta\text{HNC (18)}$	918,05	$\nu\text{CC (37)}$
1146,15	$\nu\text{CC (13)} + \delta\text{HCC (42)}$	881,31	$\nu\text{CC (11)} + \delta\text{OCO (15)} + \tau\text{HCCC (10)}$
1145,08	$\nu\text{CC (10)}$	878,13	$\nu\text{CC (10)} + \delta\text{OCO (17)}$
1119,20	$\delta\text{HNNH (11)}$	848,93	$\tau\text{HCCC (60)}$
1116,08	$\nu\text{NC (10)} + \delta\text{HCC (20)}$	833,90	$\delta\text{HCC (13)}$
1111,85	$\tau\text{HNCC (15)}$	818,01	$\tau\text{HCCC (50)} + \tau\text{CCCC (17)}$
1053,62	$\nu\text{NC (21)}$	817,50	$\tau\text{HCCC (23)} + \tau\text{HCCC (15)}$
976,33	$\nu\text{CC (27)} + \delta\text{HNC (11)}$	805,08	$\tau\text{HCCC (58)}$
974,59	$\nu\text{CC (26)} + \delta\text{HNC (12)}$	804,27	$\nu\text{CC (12)}$
934,81	$\tau\text{HCCN (86)}$	771,41	$\delta\text{CNC (12)} + \delta\text{CNC (12)}$
934,81	$\tau\text{HCCN (82)}$	771,06	$\nu\text{CC (14)} + \delta\text{CNC (13)}$
919,37	$\nu\text{OC (14)} + \nu\text{CC (31)}$	736,17	$\tau\text{CCCC (41)}$
871,80	$\nu\text{NC (27)} + \tau\text{HCCC (12)}$	735,86	$\chi\text{CCCC (51)}$
870,24	$\tau\text{HCCC (13)}$	724,34	$\chi\text{OCOC (31)}$
846,70	$\nu\text{CC (11)}$	714,99	$\chi\text{OCOC (30)}$
846,06	$\delta\text{CCC (13)}$	681,38	$\delta\text{NCC (17)} + \tau\text{HNCC (12)}$
830,22	$\tau\text{HCCC (81)}$	653,65	$\tau\text{CCCC (15)}$
830,09	$\tau\text{HCCC (78)}$	650,45	$\chi\text{OCCC (52)}$
816,74	$\tau\text{HCCC (59)}$	615,29	$\tau\text{CCCC (24)}$
813,52	$\tau\text{HCCC (22)} + \tau\text{HCCC (11)}$	615,06	$\tau\text{HCCN (15)}$
796,55	$\tau\text{HCCC (56)}$	593,49	$\nu\text{CC (16)}$
770,53	$\delta\text{CNC (13)} + \delta\text{CNC (11)}$	510,92	$\delta\text{CCC (16)}$
754,63	$\tau\text{CCCC (19)} + \tau\text{CNCC (10)}$	475,78	$\tau\text{HNCC (64)}$
754,52	$\tau\text{CCCC (20)} + \tau\text{CNCC (10)} + \chi\text{CCCC (26)}$	460,76	$\delta\text{CCC (21)}$
736,31	$\chi\text{OCOC (19)}$	460,74	$\delta\text{CCC (22)}$

(continúa en la siguiente página)

Tabla A3. (Continuación)

725,18	χOCOC (22)	433,81	δOCO (11)
693,15	χOCOC (22)	388,97	νCuO (36)
692,99	νCC (11) + χOCOC (17)	383,02	δCCO (25)
679,49	τHNCC (65)	381,46	δCCO (33)
653,04	τCCNC (20)	371,75	δCOCu (10) + δCCO (22)
652,37	τCCNC (10)	326,00	νCuO (17) + δCOCu (23)
577,94	δCOCu (12)	316,81	τHOCC (69)
572,31	δCCO (10)	315,87	δCOCu (12)
505,84	δCCC (10) + δCCC (28)	313,92	χCCNC (13)
505,28	δCCC (30)	308,77	τHOCC (94)
483,28	νCuO (10) + δCCO (49)	275,82	δCCC (10)
474,17	δCCO (25) + δCCO (15)	263,72	νCuO (21)
461,03	δCCC (15)	231,99	νCuO (28) + δCCN (38)
458,97	νNC (10) + δCCC (15) + δCCC (17)	207,83	δCCC (11) + τCNCC (14) + τCCOCu (15)
444,22	χHNCC (11)	186,95	τCNCC (11)
432,08	χCCNC (59)	171,44	τCCOCu (39)
429,04	χCCCC (46)	165,09	τCCNC (30) + τCCCC (10)
408,46	νCuO (26) + τHNCC (16)	159,04	τCCCC (34)
388,03	χNCCC (18)	158,91	δOCuO (31) + τCCOCu (12)
376,09	δCCO (37) + τHNCC (13)	137,45	δCCC (21) + δCCC (14)
363,41	τCCCC (12)	134,32	δCCC (17) + δOCuO (17)
338,27	δCCN (42)	74,69	δCCC (16) + τCCOCu (16) + τCCCC (10) + τCCOCu (14)
325,52	δCCO (11) + τHOCC (49)	64,87	τCCCO (29) + τCCCO (10)
322,58	τHOCC (93)	54,08	τCCCC (43)
319,42	δCCO (11)	40,03	τCCOCu (14) + τCCO (56)
293,62	δCCO (10)	38,61	τCCOCu (17) + τCCOCu (43)
228,06	δCCC (12) + δCCN (10) + δNCC (10)	23,74	τCCCC (13) + τCCCC (34)
224,58	δNCC (10) + δCCC (10)	19,24	τCCOCu (10) + τCCO (58)
213,30	δOCuO (36)		
178,06	δCCC (36)		
174,14	δCCC (52)		
153,52	τCCCC (57)		
153,02	τCCNC (54)		
86,06	τCCCN (41)		
66,56	δCCC (18) + χCCCC (15)		

(continúa en la siguiente página)

Tabla A3. (Continuación)

60,89	τCOCuO (31) + χCCCC (10)		
54,37	δCCC (11) + χCCCO (24)		
38,72	τCCCO (17) + τCCCC (14)		
20,61	τCCCC (67)		
7,77	δCCO (11) + τCCCO (71)		
7,44	τCCCO (59)		

^a Porcentaje de contribución PED tomado del VEDA4. v: vibración de estiramiento; δ : vibración de flexión; τ : vibración de torsión; χ : flexión fuera del plano.

Capítulo 5: Determinación de propiedades biológicas *in vitro*

El desarrollo de un nuevo medicamento desde la idea original hasta el lanzamiento del producto al mercado es un proceso complejo, largo y costoso. Un programa de descubrimiento de fármacos (*drug discovery*) se inicia porque hay una enfermedad o condición clínica sin productos médicos adecuados disponibles lo que constituye una necesidad clínica no satisfecha. Se realiza una búsqueda intensiva para encontrar una molécula (candidato) que se estudiará en fase preclínica y posteriormente en fase clínica para dar lugar a un medicamento (Hughes et al., 2011). El *drug discovery* muchas veces implica el uso de animales de experimentación en las etapas preclínicas para caracterizar las propiedades biológicas y toxicológicas de la molécula. No obstante, se propusieron varias alternativas a las pruebas con animales para superar los inconvenientes asociados a las mismas. Actualmente se está aplicando una estrategia conocida como regla de las 3 R (reducción, refinamiento y reemplazo) para el uso de animales de laboratorio (Doke y Dhawale, 2015). Los métodos que derivan de la aplicación de dicha estrategia proporcionan una alternativa útil al uso de animales para ensayar un gran número de sustancias químicas en las primeras etapas del *drug discovery*. En este contexto, la determinación de las propiedades biológicas *in vitro* de moléculas nuevas y el estudio de su perfil toxicológico (evitando el uso de animales) resultan de gran importancia en el diseño de moléculas nuevas.

5.1. Medidas de actividades antioxidantes.

Como fue mencionado en la parte introductoria (véase sección 1.2.2), las especies reactivas del oxígeno (EROs) se producen continuamente en los seres vivos como subproducto del metabolismo normal del oxígeno. Estas especies incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos y, en exceso, pueden dañar significativamente a las estructuras celulares, lo que se conoce como estrés oxidativo. Si bien en los organismos existen mecanismos de defensa contra los EROs que incluyen enzimas y pequeñas moléculas antioxidantes, el consumo de las sustancias naturales conocidas como polifenoles contrarresta la acción de los radicales libres. Dada las características de los flavonoides como reconocidos agentes antioxidantes (Kasprzak et al., 2015; Selvaraj et al., 2014) y en conocimiento que tanto el V(IV) como el Cu(II) se reconocen en los sistemas biológicos por actuar en sendos procesos de óxido-reducción, se procedió al estudio de las capacidades antioxidantes de los complejos obtenidos. En ese sentido, los EROs superóxido, peróxido e hidroxilo fueron seleccionados para medir el poder

secuestrante de los compuestos atendiendo su relevancia biológica y el desarrollo de enfermedades asociadas. La actividad antirradicalaria empleando el radical sintético DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se determinó con fines comparativos, debido a la amplia utilización de dicho ensayo en diferentes grupos de investigación.

Para todos los ensayos se determinaron las actividades antioxidantes de los cationes metálicos VO^{2+} y Cu^{2+} , ligandos y complejos de coordinación.

5.1.1. Capacidad secuestrante sobre radicales DPPH• (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

En la sección experimental fueron detallados los métodos utilizados en las determinaciones antioxidantes. En esta sección se mencionan brevemente las medidas finales realizadas, y se muestran y discuten los resultados obtenidos.

La capacidad antioxidante de los compuestos frente al radical DPPH• se midió empleando el método de Yamaguchi et al. (Yamaguchi et al., 1998). El DPPH• es un radical libre estable, que disuelto en metanol posee color violeta. Cuando el compuesto en estudio tiene actividad antioxidante, reduce el radical y ocasiona una disminución del color que puede cuantificarse espectrofotométricamente y se expresa como porcentaje del basal (100%).

Complejo VO/Baic: el ligando Baicalina (Baic) y el complejo $Na_4[VO(Baic)_2] \cdot 6H_2O$ (VO/Baic) mostraron una actividad antioxidante similar y pudieron secuestrar el 95% del radical DPPH• a una concentración 50 μM (Figura 5.1). La capacidad depuradora de radicales libres y las actividades antioxidantes de los cuatro flavonoides principales presentes en las raíces de *Scutellaria baicalensis* Georgi (baicaleína, baicalina, wogonina y wogonósido) fueron estudiados previamente en diferentes sistemas (Gao et al., 1999). Gao et al. determinaron que los flavonoides baicaleína y baicalina son mucho más efectivos en la depuración del radical DPPH• que los flavonoides wogonina y wogonósido con valores de IC_{50} de 24 y 32 μM , respectivamente, pero menos efectivos que la quercetina ($IC_{50} = 10 \mu M$) (Gao et al., 1999). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos para Baic. La estructura principal de los flavonoides está compuesta por el núcleo flavan (2-fenil-1-benzopirán-4-ona) que contiene 15 átomos de carbono dispuestos en 3 anillos llamados A, B y C con el oxígeno como heteroátomo en el anillo C (véase Figura 1.2). Como se mencionó en el capítulo de introducción, la Baicalina no tiene sustituyentes OH en el anillo B, ni en la posición 3 del anillo C. Para este flavonoide las sustituciones se producen en las posiciones 5 (OH), 6 (OH) y 7 (resto glucurónido) del anillo A (véase Figura 1.6) y para el

complejo el doble enlace C(2)-C(3) en resonancia con el grupo C=O sin coordinar del ligando sería el sitio responsable de su actividad reductora.

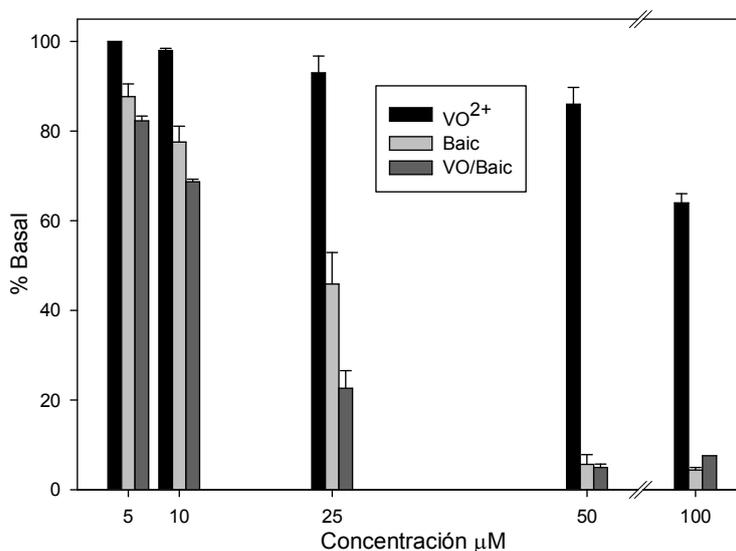


Figura 5.1. Efecto de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Baicalina (Baic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) en la reducción de la concentración de DPPH^\bullet .

Complejo VO/Api: tanto el ligando Apigenina (Api) como el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) fueron capaces de capturar solamente el 3% y 16% de los radicales DPPH^\bullet , respectivamente (Figura 5.2) a una concentración 100 μM . Majewska et al. estudiaron la capacidad secuestrante de los radicales DPPH^\bullet de dos grupos de flavonoides: flavonoles (quercetina, ramnetina e isoramnetina) y flavonas (apigenina y luteolina). El orden de actividad determinado en este estudio fue quercetina > luteolina > ramnetina > isoramnetina > apigenina, siendo la luteolina veinte veces más potente que la apigenina (Majewska et al., 2011). Yi et al. reportaron actividades comparables entre luteolina y quercetina y una actividad de luteolina diez veces superior a apigenina. Estos autores explicaron dicha diferencia teniendo en cuenta el número de grupos hidroxilo en el anillo B, que contribuye en gran medida a las potencias antioxidantes de los flavonoides. El anillo B de luteolina tiene grupos OH en la posición 3' y 4', mientras que el de apigenina tiene solo un grupo en posición 4' (véanse Figura 1.2 y Tabla 1.1). Esto explica el hecho que la luteolina se oxide más fácilmente y presente una mayor capacidad de eliminación de radicales. La gran brecha de actividad entre luteolina y apigenina sugiere que el grupo OH en posición 3' es especialmente esencial para la potencia antioxidante de este flavonoide, y

que sus grupos *o*-dihidroxi tienen mejores propiedades de donación de electrones para formar cetonas después de eliminar los radicales (Yi et al., 2013).

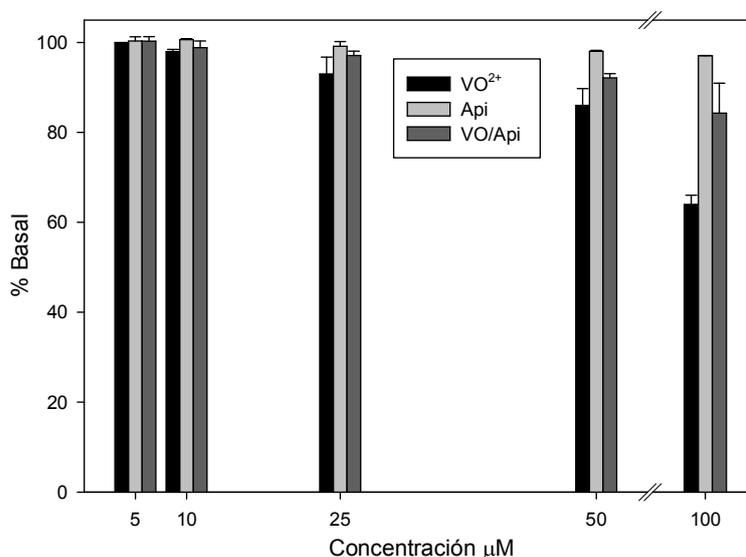


Figura 5.2. Efecto de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Apigenina (Api) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) en la reducción de la concentración de DPPH^\bullet .

Complejo Cu/5-HTP: el ligando 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y el complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) fueron capaces de depurar el 89,4 y 91,3% del radical DPPH^\bullet a concentración 25 μ M (Figura 5.3) lo que sugiere una muy buena actividad antioxidante. Siddhuraju et al. reportaron una excelente actividad secuestrante del 5-HTP, incluso mejor que la quercetina y que los antioxidantes sintéticos BHA (butilhidroxianisol) y BHT (butilhidroxitolueno), y lo explicaron por la presencia del grupo OH que contribuye a la capacidad donadora de hidrógeno del mismo (Siddhuraju y Becker, 2003) (véase Figura 1.8).

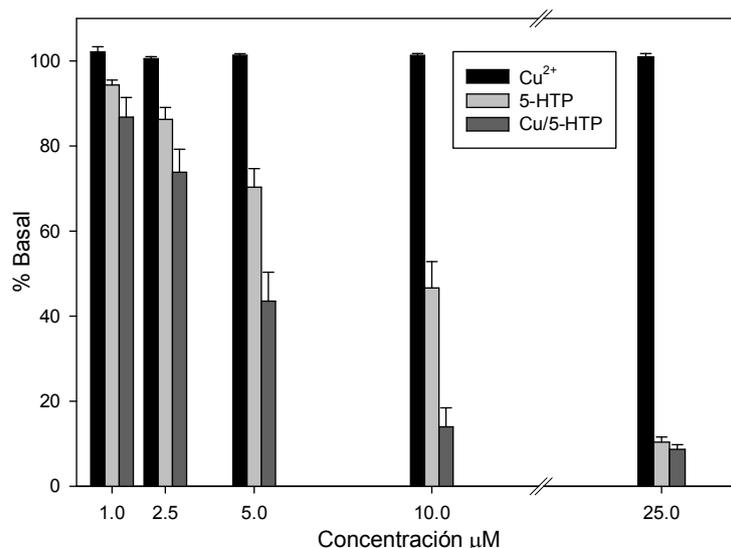


Figura 5.3. Efecto de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) en la reducción de la concentración de DPPH^\bullet .

5.1.2. Poder secuestrante de especies reactivas del oxígeno (superóxido, peróxido e hidroxilo).

Para determinar la capacidad de los compuestos de dismutar el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se empleó un método no enzimático (Kuo et al., 2001). Los compuestos con actividad SOD-símil inhiben la reducción del nitroazul tetrazolio (NBT) de color amarillo a azul de formazán por el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$. Los resultados se expresan como IC_{50} que es la concentración del compuesto en estudio que produce un 50 % de inhibición (Patel et al., 2011). Para determinar la capacidad de los compuestos de secuestrar al radical peróxido (ROO^\bullet) se empleó un método espectrofotométrico utilizando piranina. El radical ROO^\bullet reacciona con la piranina ocasionando una disminución inmediata del color verde de la misma. Los resultados se presentan como valor de *fase lag* (en minutos) en función de la concentración de los compuestos. La *fase lag* se define como el retraso en el consumo de piranina ocasionado por las sustancias que pueden depurar el radical ROO^\bullet (Hapner et al., 2010). Para determinar la capacidad de los compuestos de secuestrar el radical OH^\bullet se empleó un método espectrofotométrico (Moorhouse et al., 1987). Los radicales OH^\bullet reaccionan con la desoxirribosa, que en condiciones ácidas, reacciona con el ácido tiobarbitúrico para dar un cromógeno. Los agentes antioxidantes inhiben la degradación de la desoxirribosa porque compiten con la misma por el radical OH^\bullet .

Complejo VO/Baic: mientras que el ligando Baic no mostró actividad SOD (Figura 5.4), el complejo VO/Baic mostró una mejora en la capacidad de dismutación del anión

superóxido. No obstante, VO/Baic mostró una actividad moderada ($IC_{50} = 65,8 \mu M$) en comparación con las actividades del catión oxidovanadio(IV) ($IC_{50} = 15 \mu M$) y la SOD nativa ($IC_{50} = 0,21 \mu M$).

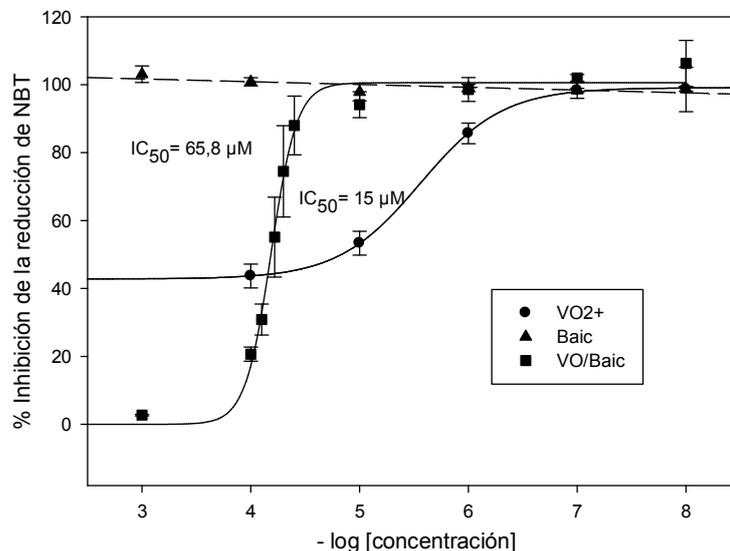


Figura 5.4. Efecto de $VOCl_2 \cdot H_2O$ (VO^{2+}), Baicalina (Baic) y complejo $Na_4[VO(Baic)_2] \cdot 6H_2O$ (VO/Baic) en la reducción de NBT por medio del anión radical superóxido generado por un método no enzimático.

El ligando Baicalina mostró una actividad moderada en la eliminación del radical peroxilo (Figura 5.5) con una fase de retardo en el consumo de piranina de 4 min a una concentración $10 \mu M$, mientras que el complejo VO/Baic aumentó el tiempo de retardo y mostró una mejor actividad antioxidante que el ligando e incluso que el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), usado como antioxidante de referencia. El catión oxidovanadio(IV) no mostró actividad a concentraciones de hasta $100 \mu M$. Tanto Baicalina como el complejo mostraron una actividad antioxidante similar contra el radical OH^\bullet (Figura 5.6) capturando cerca del 60% de los radicales a una concentración de $50 \mu M$.

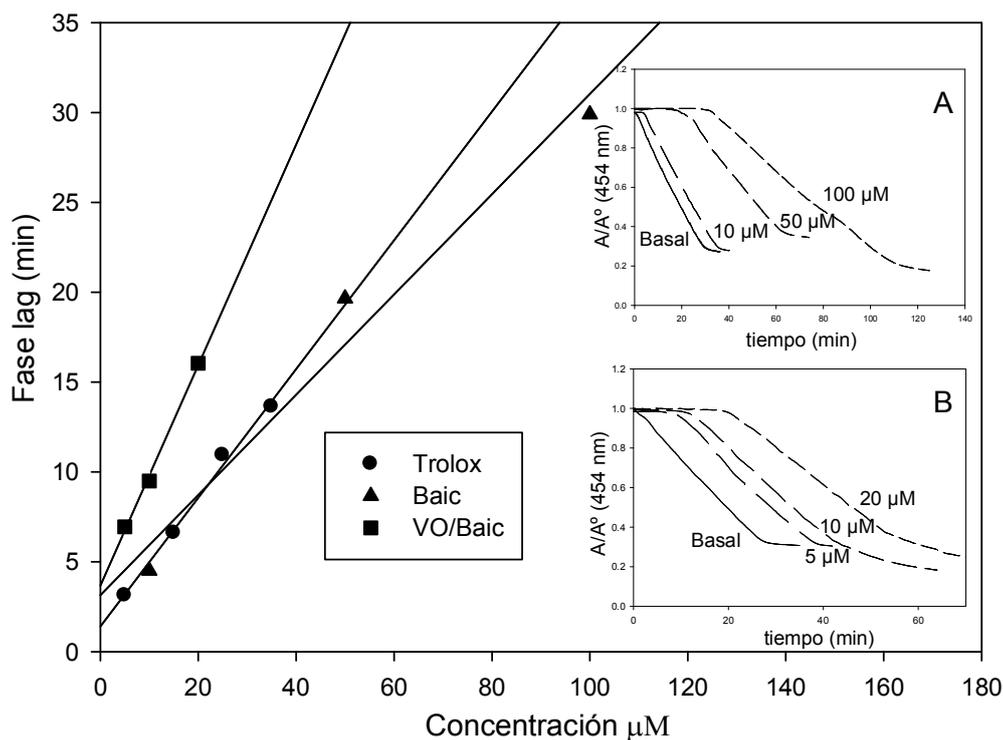


Figura 5.5. Efecto de Trolox, Baicalina (Baic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) sobre los radicales peroxilo generados por el AAPH. Los cambios fueron calculados como el tiempo de inducción (*fase lag*) en el consumo de piranina. Gráficos insertados: efecto del ligando Baic (A) y del complejo VO/Baic (B) a diferentes concentraciones sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO^\bullet .

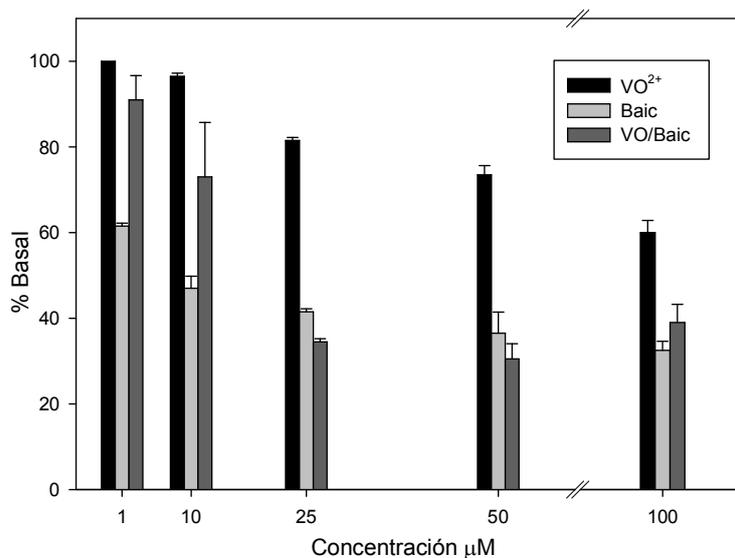


Figura 5.6. Efecto de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Baicalina (Baic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH^\bullet por el método del ácido tiobarbitúrico.

En resumen, los efectos antioxidantes encontrados para el ligando Baicalina concuerdan con los valores reportados previamente (Cheng et al., 2013; Liu et al., 2013) y su complejación con el catión oxidovanadio(IV) mejoró la actividad antioxidante del mismo, en particular frente a los radicales superóxido y peróxido. En concordancia con resultados anteriores (Naso et al., 2016a), se deduce que cuando el catión VO^{2+} coordina a través del V con los grupos $C4=O$ y a los grupos OH deprotonados en posición 3 o 5 (véase Figura 1.2) se produce la deslocalización de los electrones del sistema π del $V=O$ en los anillos A y C (en caso de que esté presente un doble enlace entre C2 y C3). En este grupo de complejos VO/flavonoides (flavonoide= quercetina, naringenina, crisina, silibinina, morina, véase Tabla 1.1) las propiedades antioxidantes del complejo son mejores que las del flavonoide libre debido a la alta estabilidad del radical formado por el flavonoide tras la interacción con un radical libre externo. Por el contrario, cuando la coordinación implica grupos OH en posición *-cis* del anillo B o un sustituyente distante de los anillos B o C (hesperidina, luteolina, diosmina, véase Tabla 1.1) (Naso et al., 2016b), la formación del complejo no mejora las propiedades antioxidantes del ligando. En el complejo VO/Baic la interacción se produce a través de los grupos fenolato generados por deprotonación de los grupos OH en posición 5 y 6 del anillo A (véase Figura 1.2) siendo factible una deslocalización de los electrones π y observándose una mejora de las propiedades antioxidantes del flavonoide luego de la complejación.

Complejo VO/Api: el ligando Api no mostró actividad SOD símil, en concordancia con reportes previos (Van Norren et al., 2006) y por coordinación con el catión oxidovanadio(IV) no se logró mejorar esta actividad. El flavonoide no mostró actividad en la eliminación del radical peróxido (no se detectó un retraso de fase del consumo de piranina a una concentración 200 μ M) mientras que el complejo VO/Api mostró baja actividad, con una fase de retardo en el consumo de piranina de 1,62 min a una concentración 173 μ M (Figura 5.7).

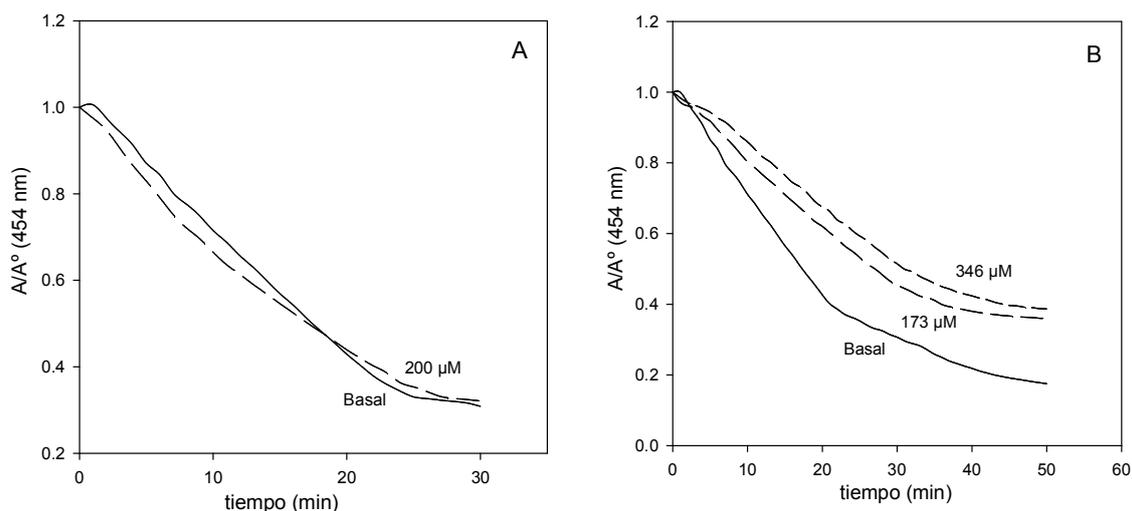


Figura 5.7. Efecto del ligando Api (A) y del complejo VO/Api (B) sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO[•].

El ligando Apigenina y VO/Api a concentración 100 µM mostraron actividad antioxidante contra radicales OH[•] eliminando el 64% y 53% de los radicales, respectivamente (Figura 5.8). Un efecto similar fue reportado previamente para el flavonoide (Si et al., 2011).

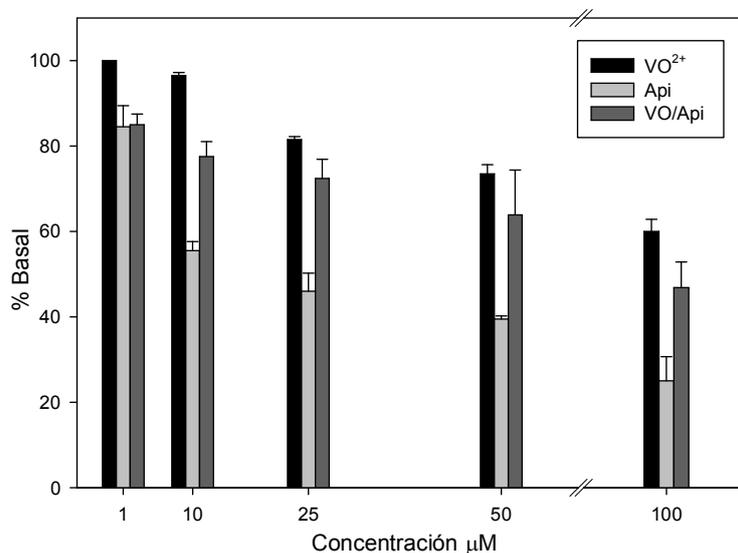


Figura 5.8. Efecto de VOCl₂·H₂O (VO²⁺), Apigenina (Api) y complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api) sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH[•] por el método del ácido tiobarbitúrico.

La baja actividad antioxidante de la apigenina está relacionada con su estructura química. La presencia de un solo grupo hidroxilo en el anillo B y dos OH en posición *meta* y no *orto*

en el anillo A y la ausencia del grupo OH en la posición 3 influyen directamente en su capacidad de eliminación de radicales (véase Figura 1.7). Además, la ausencia de grupo hidroxilo en posición 3'- es especialmente esencial para la potencia antioxidante de los flavonoides, porque la disposición de los dos grupos oxhidrilo en el anillo B tiene mejores propiedades donadoras de electrones para formar o-quinonas después de eliminar radicales. En este contexto, puede verse que la apigenina está estructuralmente relacionada con la luteolina con los mismos sustituyentes en los anillos A (OH en posición 5 y 7) y C (sin OH en posición 3), pero difiere en las sustituciones OH en el anillo B, como fue mencionado anteriormente. La luteolina posee grupos 3 'y 4' *orto* o *cis* diol en el anillo B mientras que la apigenina sólo posee un grupo OH en 4' (véase Figura 1.2). En nuestro grupo se encontró una mayor actividad antioxidante para los radicales DPPH• y ROO• para la luteolina, acorde con la relación de la estructura del flavonoide con su actividad. Sin embargo, se determinó que el complejo de oxidovanadio(IV) con apigenina mejoró las actividades de eliminación de DPPH• y ROO•, mientras que el complejo con luteolina no mostró mayor poder secuestrante (Naso et al., 2016a). Este comportamiento podría explicarse por el modo de coordinación de los ligandos. En la coordinación con el metal del complejo VO/luteolina intervienen los grupos 3'-OH y 4'-OH del anillo B, impidiendo la participación de estos grupos en la acción antioxidante del complejo. Por el contrario, la coordinación en el VO/Api implica grupos (C=O y O⁻) de los anillos A y C en la quelación al catión de oxidovanadio(IV) que podría potenciar la deslocalización electrónica del electrón desapareado del anillo C por conjugación π cuando actúa como un eliminador de radicales, generando un radical más estable.

Complejo Cu/5-HTP: la enzima SOD posee limitaciones como falta de biodisponibilidad oral, alto peso molecular y baja estabilidad. Por lo tanto se ha estimulado la búsqueda de compuestos capaces de imitar la actividad de la enzima y que presente mayor biodisponibilidad, proponiendo que estos compuestos sintéticos biomiméticos actúen como fármacos potenciales. Estos compuestos podrían tener ventajas como agentes farmacéuticos sobre las enzimas naturales, como la capacidad de acceso al espacio intercelular, la permeabilidad celular, un tiempo de vida media más largo en la sangre, potencial para la administración oral y costos más bajos. Los complejos de cobre con moléculas biológicamente activas han mostrado importantes propiedades miméticas para la SOD debido a la capacidad del cobre para participar en las reacciones redox. Khalid et al. demostraron que una geometría distorsionada de los complejos desempeña un papel en la

mejora de la actividad de SOD (Khalid et al., 2013). Nuestros estudios mostraron que mientras el aminoácido 5-Hidroxitriptófano no presentó actividad SOD (Figura 5.9), su coordinación con el cobre mejoró la capacidad de dismutación del anión superóxido del ligando libre. El complejo Cu/5-HTP mostró una actividad SOD-símil relevante ($IC_{50}= 4,8 \mu M$) similar a la actividad del $CuCl_2$ ($IC_{50}= 3,6 \mu M$) y algo menor que la SOD nativa= $0,21 \mu M$) (Islas et al., 2013).

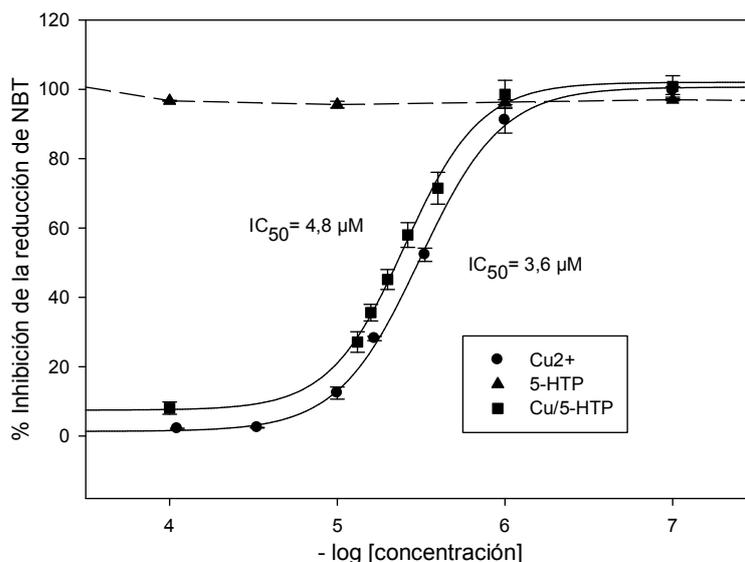


Figura 5.9. Efecto de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Cu^{2+}), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[Cu(5-HTP)_2] \cdot H_2O$ (Cu/5-HTP) en la reducción de NBT.

El ligando 5-HTP mostró una buena actividad de eliminación del radical peroxilo (Figura 5.10), incluso mejor que el trolox (antioxidante de referencia). El Cu/5-HTP aumentó la fase de retardo y mostró una mejor actividad que el ligando.

Sin embargo, el 5-HTP no tiene buena actividad depuradora del radical OH^\bullet . Dicho efecto fue mejorado por complejación y el Cu/5HTP mostró una actividad antioxidante moderada contra los radicales OH^\bullet (Figura 5.11), eliminando cerca del 43% de los radicales a una concentración de $75 \mu M$.

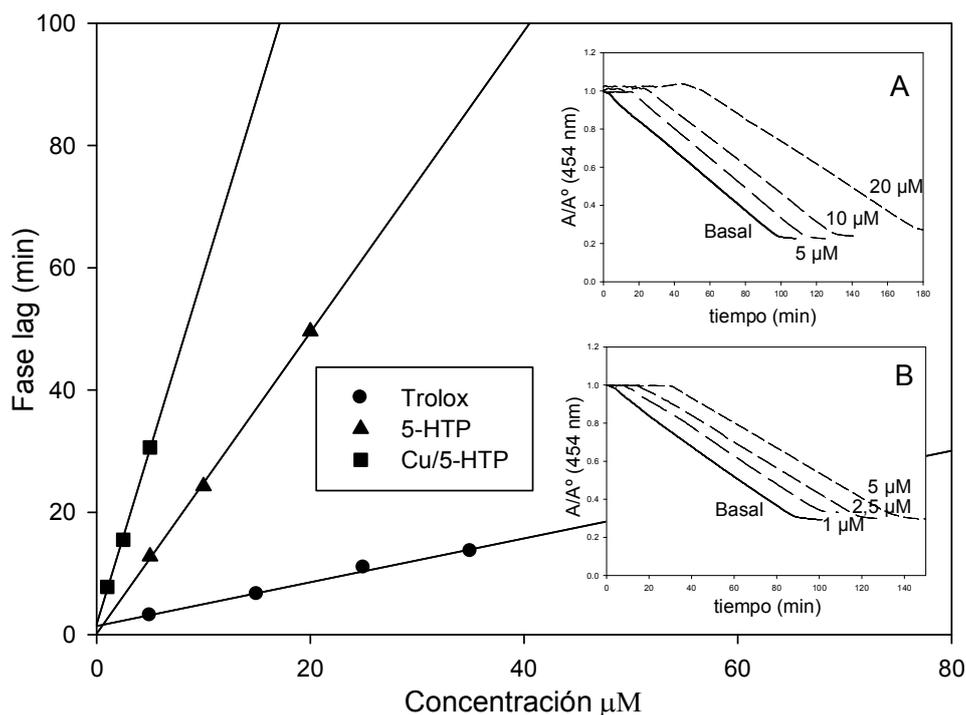


Figura 5.10. Efecto de Trolox, 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) sobre los radicales peroxilo generados por el AAPH. Los cambios fueron calculados como el tiempo de inducción (*fase lag*) en el consumo de piranina. Gráficos insertados: efecto del ligando 5-HTP (A) y del complejo Cu/5-HTP (B) a diferentes concentraciones sobre el consumo de piranina por parte de los radicales ROO^\bullet .

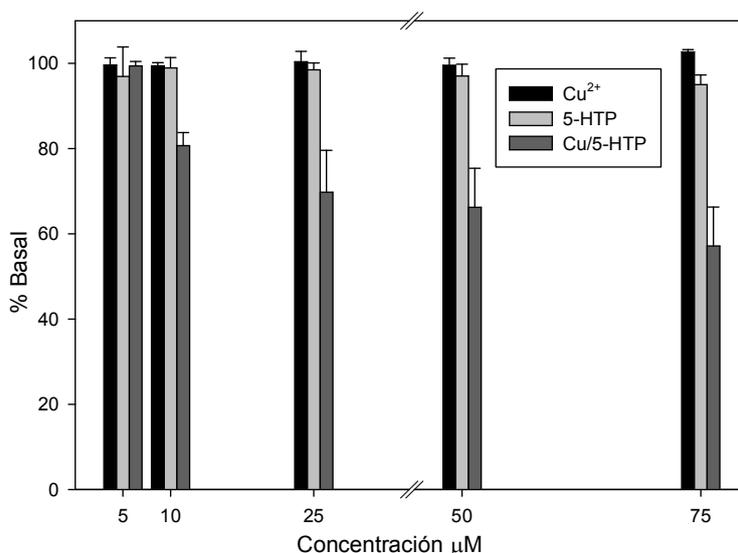


Figura 5.11. Efecto de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(\text{5-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) sobre la degradación de la desoxirribosa a través del radical OH^\bullet por el método del ácido tiobarbitúrico.

El aminoácido 5-HTP es capaz de prevenir el daño de moléculas bioquímicamente importantes a un valor de pH fisiológico. Actúa como un antioxidante natural endógeno en organismos marinos (Lysek et al., 2003). El 5-HTP se comportó como un buen eliminador de especies reactivas de oxígeno (excepto del anión superóxido) en concordancia con resultados anteriores (Siddhuraju y Becker, 2003). Además, mostró buena actividad frente al radical DPPH[•]. La actividad secuestrante de radicales libres indica que 5-HTP tiene una excelente capacidad donadora de electrones (Simic et al., 2013). La formación de un complejo de coordinación entre este aminoácido y el cobre aumentó la actividad antioxidante del 5-HTP contra todos los radicales y, en particular, mejoró la acción de eliminación del anión superóxido.

En la Tabla 5.1 se muestra el resumen de las capacidades antioxidantes de los ligandos y complejos sintetizados, medidas en los diferentes sistemas. Dichos ensayos se explican detalladamente la sección experimental. Para los complejos del catión cobre(II) con 5-Hidroxitriptófano y oxidovanadio(IV) con Baicalina, la complejación mejoró las propiedades antioxidantes del ligando libre. Por otra parte, el ligando Apigenina y su complejo con el catión oxidovanadio(IV) no mostraron buenas propiedades antioxidantes.

Tabla 5.1. Resumen de las capacidades antioxidantes de VOCl₂.H₂O (VO²⁺), CuCl₂.2H₂O (Cu²⁺), Baicalina (Baic), Apigenina (Api), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP), complejo Na₄[VO(Baic)₂].6H₂O (VO/Baic), complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api) y complejo [Cu(5-HTP)₂].H₂O (Cu/5-HTP) frente a los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]), superóxido (O₂^{•-}), peroxilo (ROO[•]) e hidroxilo (OH[•]).

Compuesto ensayado	DPPH [•] ^a	O ₂ ^{•-} ^b	ROO [•] ^c	OH [•] ^d
VO ²⁺	14	15	<1	27
Cu ²⁺	0	3,6	<1	0
Baic	95	>100	4	59
Api	2	>100	<1	61
5-HTP	53 (a 10 μM)	>100	13 (a 5 μM)	3
VO/Baic	95	66	11	64
VO/Api	8	>100	<1	36
Cu/5-HTP	86 (a 10 μM)	4,8	31 (a 5 μM)	34

^a Porcentaje de eliminación del radical DPPH[•] a 50 μM. ^b IC₅₀ expresada en μM. IC₅₀ SOD nativa= 0,21 μM.

^c Fase de retardo en minutos a 10 μM. ^d Porcentaje de eliminación del radical OH[•] a 50 μM.

5.2. Determinaciones antimicrobianas.

Durante las últimas décadas se ha observado un aumento de las frecuencias de las infecciones debido a diferentes causas. Esto ha aumentado el consumo de agentes antimicrobianos y ha creado la necesidad de sintetizar nuevos fármacos. La aparición de diversos niveles de resistencias bacterianas generó una competencia entre los microorganismos y es por eso que se está permanentemente en la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana (Berahou et al., 2007; Recio Despaigne et al., 2012). Se sabe que algunos complejos metálicos exhiben propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas y que las eficacias de los agentes terapéuticos se incrementan por coordinación (Chandraleka et al., 2011; Samsonowicz y Regulska, 2017; Selvaraj et al., 2014). En este contexto, se planteó la determinación del perfil antimicrobiano de los diferentes compuestos en estudio y los resultados del ensayo se presentan en esta sección.

5.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a bacterias y hongos.

Un parámetro importante para caracterizar el perfil antimicrobiano de una molécula es la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se define como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo. Los valores de CIM de los compuestos en estudio se determinaron mediante el método de dilución en agar y se compararon con el efecto del ligando y del metal libres en busca de una potenciación, de acuerdo a lo descrito en la parte experimental. Las mediciones de actividades antimicrobianas *in vitro* con valores de CIM superiores a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ se consideran irrelevantes desde una perspectiva clínica (Tanaka et al., 2006). Por lo tanto, todos los ensayos se realizaron hasta una concentración máxima de $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (criterio de corte).

Complejos VO/Baic y VO/Api: tanto los flavonoides Baicalina y Apigenina como sus complejos con el catión oxidovanadio(IV) no mostraron actividad antimicrobiana relevante (CIM > $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$, o > $3.360 \mu\text{M}$ para Baicalina y > $1.300 \mu\text{M}$ para VO/Baic; o > $5.555 \mu\text{M}$ para Apigenina y > $3.680 \mu\text{M}$ para VO/Api). Por otra parte, el $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}) mostró una actividad antimicrobiana moderada (CIM = $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ o $4.812 \mu\text{M}$) frente a todas las cepas de bacterias y frente a *C. tropicalis* (Tabla 5.2). Desafortunadamente, la actividad antimicrobiana de los flavonoides no se vio aumentada luego de la complejación con el catión oxidovanadio(IV). Si bien en la literatura se observan actividades antimicrobianas reportadas para algunos flavonoides, es de hacer notar que en estos ensayos se han

utilizado flavonoides extraídos de plantas y musgos y no los flavonoides puros (Akroum et al., 2009; Basile et al., 1999). En los ensayos con los flavonoides puros no se reportan actividades antimicrobianas para los mismos (Cushnie et al., 2003; Cushnie y Lamb, 2011, 2005).

Complejo Cu/5-HTP: las propiedades del cobre para prevenir infecciones son reconocidas desde la antigüedad. El mecanismo íntimo que explica la actividad antibacteriana del cobre no está totalmente dilucidado. Un elemento crucial en la actividad antibacteriana es la capacidad del cobre para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo. Algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidróperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (Rodríguez-Montelongo et al., 1993). El efecto antibacteriano del CuCl_2 fue determinado previamente en nuestro grupo de investigación (Martínez Medina et al., 2014; Martini et al., 2017).

La actividad antimicrobiana del aminoácido 5-HTP contra todas las cepas ensayadas no resultó ser clínicamente relevante ($\text{CIM} > 1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ o $>6.811 \mu\text{M}$). Los valores de CIM de 5-HTP y Cu/5-HTP se compararon con el efecto obtenido para CuCl_2 (Tabla 5.2). Los valores de CIM para CuCl_2 fueron $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ (o $2.199 \mu\text{M}$) para las cepas bacterianas y mayor a $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (o $>8.799 \mu\text{M}$) para las cepas fúngicas. Se observó una baja capacidad antibacteriana para el complejo Cu/5-HTP, con valores de CIM frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212 de $750 (1.442 \mu\text{M})$ y $1.500 \mu\text{g mL}^{-1} (2.885 \mu\text{M})$, respectivamente. En estos casos, la complejación con cobre aumentó la actividad antimicrobiana del ligando. Sin embargo, el complejo Cu/5-HTP no mostró actividad relevante frente a las otras cepas. La mejora de las propiedades antimicrobianas de los ligandos mediante la coordinación con el cobre (II) podría explicarse sobre la base de la teoría de quelación de Tweedy que proponen que la complejación aumenta la liposolubilidad de los metales iónicos (Chandraleka et al., 2011). Además, el aumento de la liposolubilidad del complejo Cu/5-HTP produce una mayor permeabilidad celular (concepto de Overtone) (Anjaneyulu y Rao, 1986). Para *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212, el paso de materiales solubles en lípidos a través de la membrana

que rodea a la célula sería mayor y como resultado, el complejo exhibe actividad antibacteriana (un mecanismo diferente probablemente gobierne a las otras bacterias y cepas de hongos debido a su diferente comportamiento).

Tabla 5.2. Valores de Concentración inhibitoria mínima (CIM) de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) frente a diferentes cepas de bacterias y hongos. Valores de CIM expresadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cepa microbiana ensayada	VO^{2+}	Cu^{2+}	Cu/5-HTP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	750	375*	>1.500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	750	375*	>1.500
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	750	375*	1.500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	750	375*	750
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12231	750	375*	>1.500
<i>Candida albicans</i>	1.500	>1.500*	>1.500
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1.500	1.500*	>1.500
<i>Candida glabrata</i>	1.500	1.500*	>1.500
<i>Candida krusei</i>	>1.500	1.500*	>1.500
<i>Candida parapsilosis</i>	1.500	1.500*	>1.500
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC (sensu stricto) 22019 (Souza et al., 2012)	1.500	>1.500*	>1.500
<i>Candida tropicalis</i>	750	>1.500*	>1.500

*Valores de CIM tomados de las referencias Martínez Medina et al. (2014) y Martini et al. (2017).

5.2.2. Determinación del efecto post-antibiótico (PAE).

La supresión persistente del crecimiento bacteriano después de la exposición corta a los antibióticos ha sido bien documentada con una variedad de microorganismos; este fenómeno se conoce como el efecto post-antibiótico (*post-antibiotic effect*, PAE) (Dolcino et al., 2002). El PAE es la fase de retraso o el período de recuperación del crecimiento bacteriano después de una breve exposición a un antibiótico. El PAE es un parámetro farmacodinámico y la presencia de este efecto puede ser una consideración importante en el diseño de regímenes de dosis de antibióticos. Un PAE de 20 minutos o menos es considerado insignificante debido a las limitaciones propias del procedimiento de medida (Rescott et al., 1988). Como los complejos de flavonoides y el catión oxidovanadio(IV) no mostraron efectos antibacterianos,

sólo se determinó el PAE para el complejo de cobre frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212.

Complejo Cu/5-HTP: teniendo en cuenta que el complejo Cu/5-HTP tiene un valor de CIM de $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.442 \mu\text{M}$) frente a *S. aureus* ATCC 25923 (clínicamente relevante) y de $1.500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.885 \mu\text{M}$) frente a *E. faecalis* ATCC 29212 se determinó su PAE a valores de media, una y dos veces la CIM. Desafortunadamente, el complejo de Cu/5-HTP no mostró un PAE relevante ($\text{PAE} < 20 \text{ min}$) frente a las cepas ensayadas a ninguno de los valores de CIM. Por otra parte, el CuCl_2 mostró PAE a valores de $2 \times \text{CIM}$ frente a *S. aureus* ATCC 25923 ($3,04 \pm 0,21 \text{ h}$) y *E. faecalis* ATCC 29212 ($1,87 \pm 0,04 \text{ h}$) (Martínez Medina et al., 2014) pero no a valores menores a la CIM.

5.3. Medidas de la actividad de fosfatasa alcalina.

Las fosfatasas alcalinas (FAL) son una superfamilia de metaloenzimas homodiméricas (EC3.1.3.1) que están ampliamente distribuidas en los animales y microorganismos. Su función biológica consiste en la hidrólisis de los monoésteres ortofosfóricos unidos a nucleótidos, proteínas y varios otros sustratos a valores de pH entre 8 y 11 (Urquiza et al., 2010). La FAL es una de las enzimas dependientes de Zn más importantes y se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo (sobre todo en el hígado, las vías biliares y los huesos). La actividad de la FAL en el suero se correlaciona usualmente con enfermedades de hígado y es un marcador de diferenciación osteoblástica, siendo de gran utilidad para el diagnóstico médico (Li et al., 2008).

Complejos VO/Baic y VO/Api:

Está reportado que el ión vanadato (H_2VO_4^- , véase Figura 1.1E) ha sido usado para inhibir un gran número de ATP-asa y enzimas que hidrolizan ésteres fosfato. Las similitudes de vanadato y fosfato en términos de geometría, carga, longitud de enlace y capacidad para adoptar una coordinación de bipirámide trigonal, probablemente explican la eficacia del vanadato como un inhibidor de muchas enzimas ligadoras de fosfato (Crans, 2015). El vanadato inhibe específicamente aquellas ATP-asa que forman un intermediario enzimático fosforilado covalente durante el ciclo de reacción enzimática, inhibiendo la (Na,K) ATP-asa, las fosfatasas ácida y alcalina, etc y necesita Mg y K para producir la inhibición de la (Na,K) ATP-asa. El vanadato se reduce en los glóbulos rojos formando el catión oxidovanadio(IV) por el glutatión intracelular. El catión libre es normalmente

inestable con respecto a la oxidación, pero parece ser estable cuando se compleja con proteínas intracelulares o moléculas más pequeñas. Nuestras medidas de actividad inhibitoria de la FAL para el $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ coinciden con los datos reportados (reducción de la actividad basal al 54%, a valores de 100 μM) (Williams et al., 1999). Por el contrario, tanto los ligandos Baicalina y Apigenina como los complejos VO/Baic y VO/Api no mostraron actividad inhibitoria de la FAL hasta valores de 100 μM (Figura 5.12) en las condiciones experimentales. Las condiciones generales del ensayo de FAL se describen detalladamente en el capítulo de metodología en el cual se menciona la disolución de los compuestos en el tampón de glicina (pH= 10,5) para la incubación de los mismos. Para estos dos sistemas, se ensayó en las condiciones generales y además se introdujo una modificación a la técnica para evitar la interferencia de color a 405 nm, que es el valor de absorbancia al que se monitorea la aparición del p-nitrofenol (Sakharov et al., 1988; Urquiza et al., 2010). Las interferencias presentes principalmente en el sistema VO/Api se deben a que el ligando y el complejo presentan una banda muy intensa en la región del 400 nm a valores de pH superiores a 10 como los que se requieren en este ensayo (véanse Figuras 3.20 y 3.21). Esta banda es mucho menos intensa en el sistema VO/Baic (véanse Figuras 3.16 y 3.18) y de muy baja intensidad en el sistema Cu/5-HTP, en las condiciones experimentales del ensayo general. Como estas condiciones generales resulta imposible determinar el efecto inhibitorio de la FAL para el sistema VO/Api, se procedió a una dilución 1/3 de la mezcla de reacción previo a la lectura de la misma (y luego de finalizado el tiempo de reacción). En el caso del sistema VO/Baic se pudo medir la absorbancia tanto en las condiciones generales como modificadas (dilución 1/3 previo a la lectura). En todos los casos se realizaron blancos de concentración del compuesto para cada concentración. Dichos blancos de concentración se preparan disolviendo el compuesto en estudio en el buffer de glicina a la misma concentración del ensayo y se mide la absorbancia del mismo a 405 nm para realizar posteriormente la sustracción (Absorbancia del tubo de reacción - Absorbancia del blanco de concentración). Esta sustracción nos permite eliminar el color producido a 405 nm por el compuesto y obtener así el color producido exclusivamente por el del p-nitrofenol. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo general o modificado, puede inferirse que los ligandos y complejos no producen efecto inhibitorio de la FAL siendo los valores de absorbancia similares al basal. Los resultados muestran que el $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tiene actividad inhibitoria de la FAL pero la complejación del mismo no mejora la actividad de los flavonoides libres.

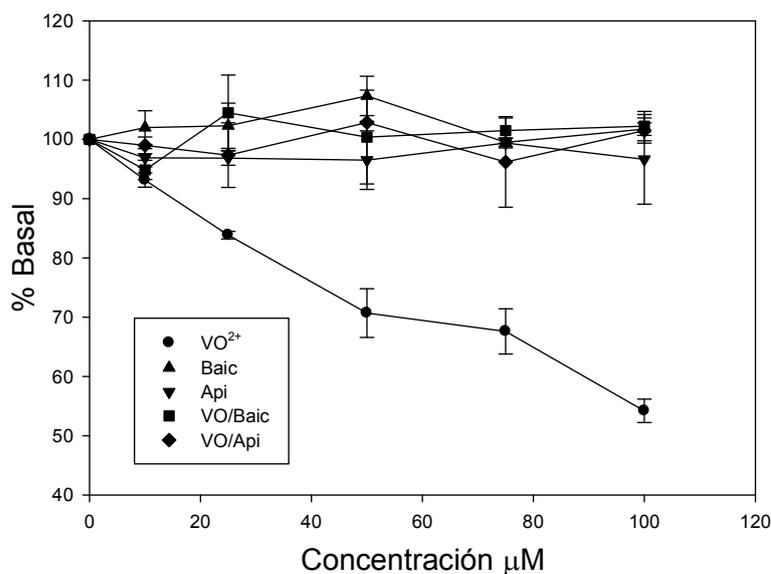


Figura 5.12. Variación de la actividad de la enzima FAL por el agregado de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Baicalina (Baic), Apigenina (Api), complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) en concentraciones de hasta $100\mu\text{M}$.

Complejo Cu/5-HTP: el efecto inhibitorio del 5-HTP y Cu/5-HTP en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) se evaluó y se comparó con el efecto de CuCl_2 reportado previamente (Martínez Medina et al., 2014) (Figura 5.13). Al igual que el CuCl_2 , el 5-HTP no posee efecto inhibitorio significativo, mientras que el Cu/5-HTP ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad de la FAL. El mecanismo de inhibición de FAL postulado para complejos de coordinación sugiere una interacción en el sitio catalítico de la enzima que actúa como inhibidores competitivos que se unen al sitio activo o cerca del mismo (Martin y Evans, 1991). Sin embargo, también se propuso que el efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosforilo puede atribuirse a una mejor biodisponibilidad, en lugar del aumento de la potencia en los sitios activos de la enzima fosfatasa causada por complejos metálicos (Peters et al., 2003). A partir de la Figura 5.13 se puede observar que la complejación aumenta el efecto inhibitorio del metal y del ligando sobre la FAL. Por consiguiente, una mayor liposolubilidad y permeabilidad celular del complejo podría producir una mejora de la biodisponibilidad del ion cobre(II) y una mayor interacción con el sitio catalítico produciendo la inhibición de la acción enzimática (Martin, 1995).

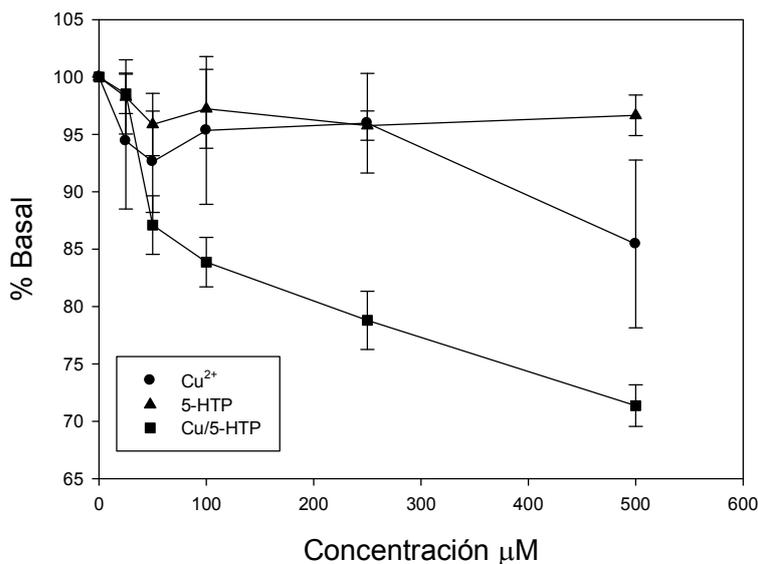


Figura 5.13. Variación de la actividad de la enzima FAL por el agregado de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) en concentraciones de hasta 500 μM .

5.4. Estudios de genotoxicidad y toxicidad aguda.

5.4.1. Test de Ames (genotoxicidad).

El Test de Ames en *Salmonella typhimurium* se utiliza para identificar sustancias que puedan producir un daño genético (que conduce a mutaciones). Esta prueba utiliza cepas de *Salmonella* con mutaciones preexistentes que no son capaces de sintetizar histidina y no pueden crecer o formar colonias en medios de cultivo que no posean dicho aminoácido. Los compuestos con potencial mutagénico pueden restaurar la función de los genes (ensayo de reversión) permitiendo el crecimiento de las colonias mutadas (revertantes Histidina⁺). Un compuesto se considera mutagénico cuando el índice de mutagenicidad (IM) es igual o mayor que 2 (Maron y Ames, 1983). El IM se define como el cociente entre el número de revertantes inducidas por la muestra y el número de revertantes espontáneas. Es de hacer notar que, en este ensayo la cantidad del compuesto en estudio se expresa como microgramos/placa (que no es una unidad de concentración como tal) y no se puede determinar a ciencia cierta la concentración presente en el medio de cultivo. Como no hay una correlación entre la cantidad de compuesto disuelta en el top agar que se vierte en cada placa y la cantidad que efectivamente difunde hacia el agar mínimo que ya está en la placa (véase sección 2.4.4.1), no se puede calcular una concentración real del compuesto (como sí se hace en el ensayo actividad antimicrobiana para la determinación de la CIM).

Complejo VO/Baic: el catión de oxidovanadio(IV), el ligando Baicalina y el complejo VO/Baic no ejercieron acción mutagénica sobre las cepas ensayadas (Tabla 5.3). A las concentraciones más altas no se pudo calcular el valor de IM del catión oxidovanadio(IV) debido a la acción antimicrobiana ejercida por VOCl_2 contra *Salmonella typhimurium* TA98 ($> 75 \mu\text{g/placa}$) y *Salmonella typhimurium* TA100 ($> 18,75 \mu\text{g/placa}$). El valor del IM resultó menor que 2 en todos los casos demostrando que las sustancias ensayadas no inducen un aumento en el número de revertantes. Estos resultados indican que los compuestos ensayados no inducen mutaciones de cambio de marco de lectura (*S. typhimurium* TA98) o mutaciones de sustitución de pares de bases (*S. typhimurium* TA100) a las concentraciones ensayadas.

Tabla 5.3. Inducción de revertantes Histidina⁺ en *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) por el agregado de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Baicalina (Baic) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) en ausencia de activador metabólico S9.

	Concentración ($\mu\text{g/placa}$)	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b
Control(-)		34,5 ± 0,5	--	139,5 ± 1,5	--
VO ²⁺	75	26 ± 3	0,75	--	--
	37,5	30 ± 2	0,87	--	--
	18,75	30 ± 2	0,87	97,5 ± 2,5	0,70
Baic	300	32 ± 1	0,93	159 ± 1	1,14
	150	37,5 ± 1,5	1,09	161,5 ± 1,5	1,16
	75	34 ± 1	0,98	139 ± 1	0,99
	37,5	45 ± 1	1,30	143 ± 2	1,02
	18,75	35 ± 1	1,01	141,5 ± 1,5	1,01
VO/Baic	300	33 ± 2	0,96	--	--
	150	30 ± 1	0,87	107,5 ± 2,5	0,77
	75	31 ± 1	0,89	104 ± 2	0,74
	37,5	25,5 ± 0,5	0,74	129 ± 1	0,92
	18,75	24,5 ± 0,5	0,71	142,5 ± 2,5	1,02

^aNúmero de revertantes por placa expresado como el promedio de dos ensayos independientes ± la desviación estándar.

^bIM: índice de mutagenicidad (número de revertantes Histidina⁺ inducidas por la muestra/ número de revertantes Histidina⁺ espontáneas en el control negativo).

Complejo VO/Api: el ligando Apigenina y el complejo VO/Api no ejercieron acción mutagénica sobre las cepas ensayadas (Tabla 5.4). Ambos mostraron actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium* TA98 a concentraciones superiores a 150 µg/placa. El valor del índice mutagénico resultó menor que 2 en todos los casos. Estos resultados indican que los compuestos ensayados no inducen mutaciones de cambio de marco de lectura o mutaciones de sustitución de pares de bases a las concentraciones ensayadas.

Tabla 5.4. Inducción de revertantes Histidina⁺ en *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) por el agregado de Apigenina (Api) y complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api) en ausencia de activador metabólico S9.

	Concentración (µg/placa)	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b
Control(-)		22,5 ± 1,5	--	100,5 ± 1,5	--
Api	300	--	--	69 ± 2	0,69
	150	23 ± 2	1,02	80,5 ± 1,5	0,80
	75	24 ± 1	1,07	96 ± 2	0,95
	37,5	17 ± 1	0,75	91,5 ± 1,5	0,91
	18,75	20,5 ± 1,5	0,91	76 ± 2	0,76
VO/Api	300	--	--	64 ± 1	0,64
	150	13,5 ± 1,5	0,60	59,5 ± 1,5	0,59
	75	18 ± 2	0,80	74 ± 1	0,74
	37,5	14,5 ± 1,5	0,64	68 ± 2	0,68
	18,75	18 ± 1	0,80	73 ± 1	0,73

^aNúmero de revertantes por placa expresado como el promedio de dos ensayos independientes ± la desviación estándar.

^bIM: índice de mutagenicidad (número de revertantes Histidina⁺ inducidas por la muestra/número de revertantes Histidina⁺ espontáneas en el control negativo).

Complejo Cu/5-HTP: el CuCl₂, 5-HTP y Cu/5-HTP no ejercieron acción mutagénica sobre las cepas ensayadas (Tabla 5.5). Existen reportes previos de la ausencia de actividad mutagénica de Cu²⁺ (como la sal de perclorato) en el ensayo de Ames con *S. typhimurium* TA98 y *S. typhimurium* TA100 (con activación metabólica) (Duff et al., 2012). El valor del IM inferior a 2 en todos los casos mostró que las sustancias ensayadas no inducen un

aumento en el número de revertantes. Estos resultados indican que los compuestos en estudio no inducen mutaciones de cambio de marco de lectura o mutaciones de sustitución de pares de bases a las concentraciones ensayadas.

Tabla 5.5. Inducción de revertantes Histidina⁺ en *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) por el agregado de CuCl₂·2H₂O (Cu²⁺), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo [Cu(5-HTP)₂].H₂O (Cu/5-HTP) en ausencia de activador metabólico S9.

	Concentración (µg/placa)	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b
Control(-)		22,5 ± 1,5	--	100,5 ± 1,5	--
Cu ²⁺	300	21,5 ± 1,5	0,96	77 ± 2	0,77
	150	24,5 ± 0,5	1,09	99 ± 1	0,98
	75	13 ± 2	0,58	84 ± 2	0,83
	37,5	25,5 ± 1,5	1,13	90,5 ± 1,5	0,90
	18,75	12 ± 1	0,53	102 ± 2	1,01
5-HTP	300	28,5 ± 1,5	1,27	99,5 ± 1,5	0,99
	150	21 ± 1	0,93	82 ± 2	0,81
	75	20,5 ± 1,5	0,91	87,5 ± 0,5	0,87
	37,5	17,5 ± 0,5	0,78	83,5 ± 1,5	0,83
	18,75	10 ± 2	0,44	86 ± 1	0,85
Cu/5-HTP	300	16 ± 1	0,71	88 ± 1	0,87
	150	13 ± 2	0,58	78,5 ± 0,5	0,78
	75	26 ± 2	1,15	68,5 ± 0,5	0,68
	37,5	24 ± 1	1,07	92 ± 2	0,91
	18,75	21 ± 1	0,93	94 ± 1	0,93

^aNúmero de revertantes por placa expresado como el promedio de dos ensayos independientes ± la desviación estándar.

^bIM: índice de mutagenicidad (número de revertantes Histidina⁺ inducidas por la muestra/número de revertantes Histidina⁺ espontáneas en el control negativo).

5.4.2. Ensayo de toxicidad aguda (*Artemia salina*).

La prueba del crustáceo de mar se ha utilizado ampliamente para probar la toxicidad de una gran variedad de productos. Aunque la sustitución de animales de laboratorio por estudios de toxicidad por *A. salina* necesita investigación adicional, se demostró que la

concentración letal media (CL_{50}) de extractos de plantas medicinales utilizando *A. salina* se correlaciona bien con la dosis oral letal correspondiente (DL_{50}) en ratones (Molina-Salinas y Said-Fernández, 2006). La CL_{50} se define como la concentración requerida para matar a la mitad de los miembros de la población sometida a prueba.

Complejo VO/Baic: la mortalidad del crustáceo de mar para cada concentración de $VOCl_2$ se muestra en la Tabla 5.6. La mortalidad aumentó de una manera dosis-dependiente y esta linealidad nos permitió determinar un valor de CL_{50} de $33,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($244 \mu\text{M}$). Por otra parte, no se observaron nauplios muertos para el ligando Baicalina y el complejo VO/Baic a las concentraciones ensayadas demostrando que el flavonoide y el complejo no ejercen efectos tóxicos en concentraciones de hasta $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 5.6. Porcentaje de mortalidad de *A. salina* a diferentes concentraciones de $VOCl_2 \cdot H_2O$ (VO^{2+}) y estimación de la concentración letal media (CL_{50}).

	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidad (%)	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
VO^{2+}	75	100	33,71
	37,5	46,7	
	18,75	40	
	9,37	20	

Complejo VO/Api: no se observaron nauplios muertos para el ligando Apigenina y el complejo VO/Api a las concentraciones ensayadas demostrando que el flavonoide y el complejo no ejercen efectos tóxicos en concentraciones de hasta $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Complejo Cu/5-HTP: la mortalidad del crustáceo de mar producida por el catión Cu^{2+} fue reportada previamente (Ferraz et al., 2009; Gajbhiye y Hirota, 1990; Kokkali et al., 2011) y es ligeramente diferente respecto de nuestros datos (Tabla 5.7). Estas diferencias podrían deberse a las diferentes metodologías, condiciones experimentales (especialmente la sal de cobre y la composición del agua de mar utilizada) y la cepa de huevos de *Artemia*. Por el contrario, el 5-HTP y el complejo Cu/5-HTP no produjeron la mortalidad de los nauplios a las concentraciones ensayadas demostrando que estos compuestos no ejercen efectos tóxicos en concentraciones de hasta $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 5.7. Porcentaje de mortalidad de *A. salina* a diferentes concentraciones de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) y estimación de la concentración letal media (CL_{50}).

	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortalidad (%)	CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cu^{2+}	150	100	89,76
	75	26,7	
	37,5	6,7	
	18,75	3,3	
	9,37	0	

5.5. Conclusiones preliminares

En líneas generales, los complejos de coordinación en estudio mostraron buenas propiedades antioxidantes (excepto el complejo VO/Api que actuó con un nivel antioxidante moderado). El complejo Cu/5-HTP fue el que mostró las mejores propiedades antioxidantes, seguido por el complejo VO/Baic. En todos los casos la complejación con el metal mejoró las propiedades antioxidantes del ligando libre. Esto puede explicarse en función de la relación que existe entre la estructura química y las actividades biológicas.

En el caso de los flavonoides, las diferencias en el grado de sustitución del anillo B explica el hecho que la apigenina presente una pobre capacidad de eliminación de radicales (un único grupo OH en el anillo B). Para el complejo de VO/Api, la coordinación tipo “acetilacetona” (coordinación por C=O y C5-O⁻ de los anillos C y A) en forma de quelato potencia la deslocalización electrónica con los electrones del sistema π del V=O, favoreciendo la conjugación con el electrón impar del radical generado cuando se oxida el flavonoide y aumentando así su estabilidad.

La deslocalización π es aún más marcada en el complejo VO/Baic cuya coordinación tipo “catecol” en forma de quelato (coordinación por C5-O⁻ y C6-O⁻ del anillo A) es responsable del incremento observado en las propiedades antioxidantes del complejo.

En el complejo de Cu/5-HTP, probablemente la coordinación por los grupos amino y carboxilato, incrementen la resonancia del grupo aromático indol, por efecto inductivo, estabilizando el radical que se genera por pérdida del átomo de H.

El complejo Cu/5-HTP fue el único entre los ligandos y complejos medidos que mostró actividad antimicrobiana moderada (frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212). La complejación mejoró actividad del ligando libre pero no la del metal. Asimismo, este complejo fue el único que mostró una fuerte actividad inhibitoria de la enzima fosfatasa alcalina, mucho mayor que las actividades medidas para el ligando y el metal libres.

Los estudios toxicológicos indican que los complejos sintetizados son seguros puesto que no mostraron toxicidad aguda en *Artemia salina* y no indujeron mutaciones de cambio de marco de lectura ni mutaciones de sustitución de pares de bases (Test de Ames).

Capítulo 6: Actividad anticancerígena

La urgencia de superar los inconvenientes biofísicos y biomédicos de los tratamientos quimioterapéuticos actuales llevó a los científicos a considerar los complejos de coordinación formados entre metales y flavonoides como opciones viables en la terapia del cáncer. Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* indican que los flavonoides y sus complejos de iones metálicos ejercen efectos inhibitorios a nivel de la promoción y progresión del tumor (Uivarosi y Munteanu, 2017). En muchos casos, se ha informado que la actividad antitumoral de los complejos de metal flavonoides es mayor que la de los flavonoides libres (Ferrer y Williams, 2011). Esto puede estar mediado por la regulación de ciertos eventos del ciclo celular, alteraciones en la estructura del ADN, efectos prooxidantes o interacciones con la bicapa fosfolípida. Se ha informado que los complejos de metal flavonoide son activos contra células de cáncer gástrico, células de carcinoma hepatocelular humano, células de carcinoma cervical humano, células de leucemia, células de adenocarcinoma de colon humano, células de hepatoma humano y células de cáncer de osteoblastos (Selvaraj et al., 2014; Uivarosi y Munteanu, 2017).

6.1. Actividad antiproliferativa. Viabilidad celular.

La viabilidad celular se estudió mediante el ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difenil Tetrazol). El fundamento de este método consiste en la reducción del MTT (sal de tetrazolio de color amarillo y soluble en agua) a azul de formazán (formazano de color violeta insoluble en agua). Esta reducción es producida por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa de las células metabólicamente activas, brindando información acerca de la viabilidad celular. Los productos de formazán generados por la reducción celular de MTT se disuelven en el solvente adecuado y se mide la densidad óptica a la longitud de onda correspondiente (Denizot y Lang, 1986; Mosmann, 1983). Esto nos permite estimar el porcentaje de células que no murieron debido a la acción de los compuestos en estudio. En este ensayo, una inhibición de la viabilidad celular se pone en evidencia por una menor generación de color en las células tratadas respecto de las células sin tratar (basales).

En este apartado se discutirán los resultados del ensayo del MTT en los diferentes sistemas.

Complejo VO/Baic: existen reportes sobre la actividad anticancerígena de la Baicalina (Baic) frente a diferentes líneas celulares de cáncer como la leucemia linfocítica aguda

(ALL) (Kumagai et al., 2007), las líneas celulares de cáncer de próstata humanos (KU-1 y EJ-1) (Chana et al., 2000), líneas celulares de cáncer de vejiga murino (MBT-2) (Ikemoto et al., 2000) y células de cáncer de pulmón humano (A549) (Nayak et al., 2014). La citotoxicidad del $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Baic y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) en la línea celular A549 se determinó por el ensayo del MTT. Como se muestra en la Figura 6.1, el VO^{2+} no indujo citotoxicidad en las células de cáncer de pulmón humano a las concentraciones ensayadas. Baic se comportó como un agente ligeramente anticanceroso, inhibiendo el 20% de la viabilidad celular a 100 μM ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$), en concordancia con reportes anteriores (Nayak et al., 2014). El complejo VO/Baic exhibió su efecto citotóxico de una manera dosis-respuesta (el porcentaje de supervivencia de las células fue del 65% respecto del control a una concentración de 100 μM). Pudo observarse que la complejación mejoró la acción del ligando libre, similar a las determinaciones anteriores para complejos de Baic con cobre y aluminio (Liu et al., 2012).

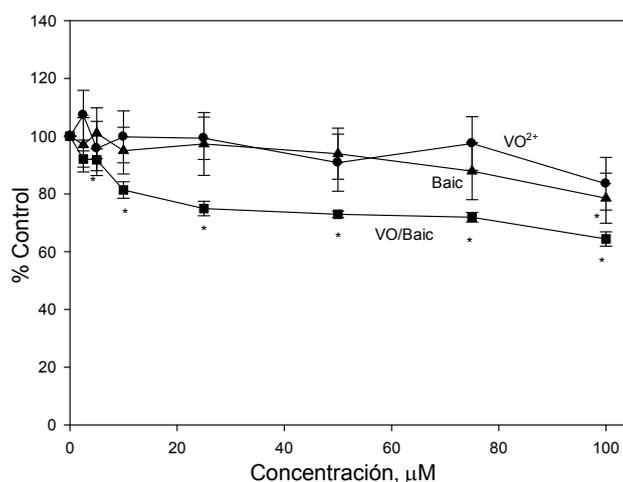


Figura 6.1. Efectos inhibitorios de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+} , ●), Baicalina (Baic, ▲) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic, ■) sobre la viabilidad de las células A549. La línea celular se trató con diversas concentraciones de los compuestos durante 24 h. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor de control y representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos separados. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Al aumentar el tiempo de incubación de las células con los diferentes compuestos en estudio, se observó una mejora de sus efectos anticancerígenos (Tabla 6.1). A las 72 h de incubación se encontró un valor IC_{50} de 77,4 μM para Baic, en concordancia con resultados anteriores (Gao et al., 2011; Sak, 2014; Zhu et al., 2015) y 21,7 μM para

VO/Baic. En todos los casos, VO/Baic mejoró la acción del ligando mostrando un comportamiento dependiente del tiempo con valores bajos de IC_{50} . Por lo tanto, se pudo demostrar que el tiempo de exposición afectó la viabilidad celular y en 72 horas de incubación el complejo mostró un fuerte efecto deletéreo en la línea celular A549.

Tabla 6.1. Valores de IC_{50} de Baicalina (Baic) y del complejo $Na_4[VO(Baic)_2] \cdot 6H_2O$ (VO/Baic) a 24, 48 y 72 horas de incubación sobre la línea celular A549.

Compuesto	IC_{50} (μM), 24 h	IC_{50} (μM), 48 h	IC_{50} (μM), 72 h
Baic	>100	>100	$77,4 \pm 2,7$
VO/Baic	>100	$44,7 \pm 3,5$	$21,7 \pm 1,3$

Complejo VO/Api: se ha demostrado previamente que la Apigenina (Api) afectó ligeramente a la viabilidad de las células A549 a las 24 h de incubación (Das et al., 2012; Liu R. et al., 2013; Patil et al., 2015) y que el VO^{2+} no produce citotoxicidad a las células de cáncer de pulmón humano A549 a las concentraciones ensayadas (16% de inhibición a 100 μM) (Islas et al., 2015). En la Figura 6.2A se puede observar que la viabilidad de las células A549 a las 24 h también se vio ligeramente afectada cuando las células fueron tratadas con el complejo $[VO(Api)(H_2O)_2]Cl$ (VO/Api) con valores de $IC_{50} > 100 \mu M$.

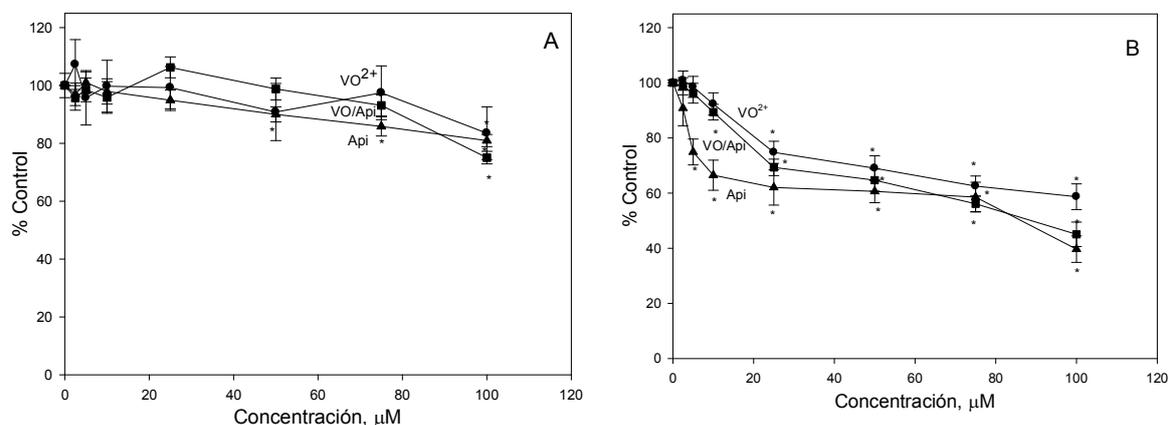


Figura 6.2. Efectos inhibitorios del $VOCl_2 \cdot H_2O$ (VO^{2+} , ●), Apigenina (Api, ▲) y complejo $[VO(Api)(H_2O)_2]Cl$ (VO/Api, ■) en la viabilidad de las células A549 (A) y HeLa (B). Las líneas celulares se trataron con diversas concentraciones de los compuestos durante 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor del control y representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos separados. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Por otra parte, el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de la línea celular HeLa a las 24 h de incubación fue más pronunciado. El VO²⁺ produjo un 40% de inhibición de la viabilidad celular a 100 μM (IC₅₀ > 100 μM), como se informó previamente (Banik et al., 2011), y la citotoxicidad inducida por Api en células HeLa con aproximadamente 60% de reducción de la viabilidad celular a una concentración de 100 μM (IC₅₀ = 85,4 μM), en concordancia con resultados anteriores (Liu R. et al., 2013; Szliszka et al., 2008; Xu et al., 2011). El complejo VO/Api mostró menor citotoxicidad que el ligando a bajas concentraciones (<50 μM) y a concentraciones mayores el comportamiento fue similar al del ligando (Figura 6.2B). Api y VO/Api a concentraciones que van desde 2,5 a 100 μM a 48 y 72 h de incubación mostraron una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo (véase la Tabla 6.2) en ambas líneas celulares. Los efectos del ligando libre y del complejo en todos los tiempos de incubación medidos fueron similares en la línea celular HeLa, y sólo se ha demostrado una baja mejora del efecto anticancerígeno del flavonoide tras la coordinación para la línea celular de cáncer de pulmón a 72 h de incubación. Cabe mencionar que para estudios realizados con el ligando libre Api, existen algunas discrepancias en los datos de la literatura para la viabilidad celular de las líneas A549 y HeLa a las 48 y 72 h, siendo los resultados reportados bastante diferentes entre sí (Banik et al., 2011; Choudhury et al., 2013; Liu R. et al., 2013; Lu et al., 2010; Szliszka et al., 2008; Tan et al., 2009; Xu et al., 2011; Zheng et al., 2005).

Tabla 6.2. Valores de IC₅₀ de Apigenina (Api) y del complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api) a 24, 48 y 72 horas sobre las líneas celulares A549 y HeLa.

Compuesto	IC ₅₀ (μM), 24 h		IC ₅₀ (μM), 48 h		IC ₅₀ (μM), 72 h	
	A549	HeLa	A549	HeLa	A549	HeLa
Api	>100	85,4 ± 1,7	24,8 ± 2,9	20,3 ± 3,2	9,1 ± 1,8	7,6 ± 2,1
VO/Api	>100	88,1 ± 1,4	17,7 ± 3,1	15,5 ± 1,6	2,2 ± 0,9	9,7 ± 1,9

Complejo Cu/5-HTP: los efectos citotóxicos del 5-HTP, Cu/5-HTP y del catión cobre(II) en las líneas celulares malignas derivadas de cáncer de pulmón humano (A549), cáncer cervical (HeLa) y cáncer de colon (HCT-116) se muestran en la Figura 6.3. Con la finalidad de comparar el efecto citotóxico producido sobre las líneas celulares malignas respecto de las normales, se determinaron también las actividades de los compuestos sobre la línea celular de fibroblastos de pulmón humano no maligno (MRC-5). El aminoácido natural 5-HTP mostró una baja citotoxicidad contra las líneas celulares probadas con

valores de $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$. En la línea celular A549, el Cu/5-HTP muestra un comportamiento bifásico, induciendo el aumento de la viabilidad celular hasta concentraciones de $100 \mu\text{M}$ y con un efecto citotóxico a altas concentraciones (aproximadamente 40% de inhibición a $500 \mu\text{M}$). Sin embargo, en las líneas celulares HeLa y HCT-116, el complejo inhibió la viabilidad celular de una manera dosis-respuesta (aproximadamente 50% de inhibición a $100 \mu\text{M}$). Asimismo, los resultados para el catión cobre(II) muestran que la citotoxicidad *in vitro* es insignificante, en concordancia con estudios publicados previamente (Figura 6.3) (Fatfat et al., 2014; Trávníček et al., 2012).

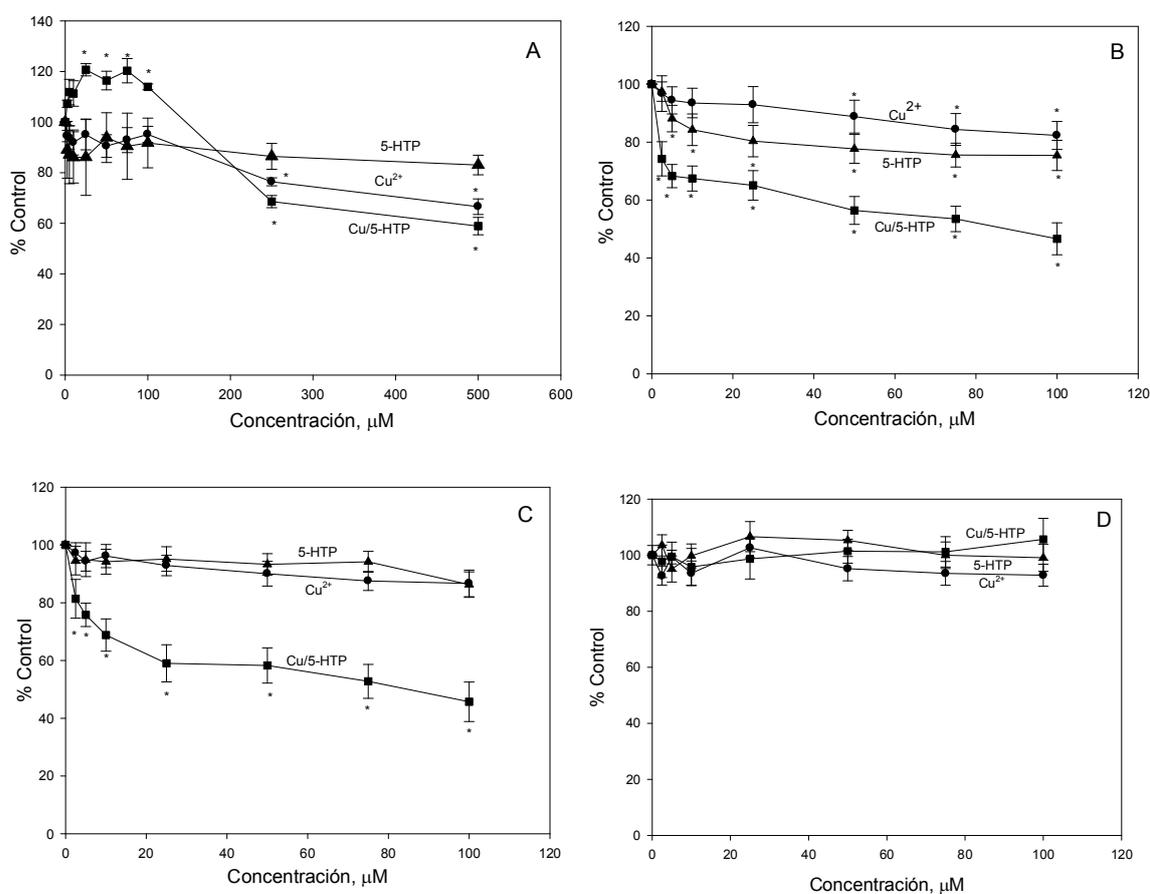


Figura 6.3. Efectos inhibitorios del $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+} , ●), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP, ▲) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP, ■) en la viabilidad de las células A549 (A), HeLa (B), HCT-116 (C) y MRC-5 (D). Las líneas celulares se trataron con diversas concentraciones de los compuestos durante 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor del control y representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos separados. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Una forma razonable de evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* es evaluar la capacidad de los fármacos para destruir células cancerígenas sin afectar significativamente a las células no malignas. Para ello, se seleccionó la línea celular MRC-5. En la Figura 6.3D se puede observar que los compuestos no mostraron toxicidad contra la línea normal de fibroblastos. Los resultados para el CuCl_2 en esta línea celular concuerdan con determinaciones previas (Recio Despaigne et al., 2014). Además, estos compuestos no mostraron toxicidad aguda en el ensayo de *Artemia salina* ni efectos mutagénicos en el Test de Ames (véase sección 5.4).

6.2. Efectos pro-oxidantes.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) como el radical hidroxilo (OH^\bullet), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical peroxilo (ROO^\bullet), el óxido nítrico (NO^\bullet) y las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) que son espontáneamente generadas en las células durante el metabolismo, son capaces de causar daño oxidativo cuando se producen en cantidades excesivas. Las EROs han sido implicados en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades humanas que alteran la función del aparato genético y pueden oxidar y dañar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, que son los principales componentes de las membranas celulares y también conducen a la muerte celular (Coimbra Diniz et al., 2015). Las células normales contienen menos cantidades de EROs y antioxidantes en relación con las células cancerosas y la homeostasis de las EROs sufre pequeños cambios con la pérdida de EROs o antioxidantes, manteniendo las células viables y funcionales. Por el contrario, las células cancerosas tienen mayores niveles de EROs y antioxidantes, y entonces el aumento de la generación de EROs y/o la inhibición de los antioxidantes produce la muerte de las células cancerosas por estrés oxidativo, mientras que el efecto contrario (la prevención de la generación de EROs o tratamiento con antioxidantes) produce citostasis y posiblemente senescencia (Gibellini et al., 2010; Sullivan y Chande, 2014). Por lo tanto, el estado pro-oxidativo persistente que caracteriza a las células cancerosas, así como sus múltiples mecanismos de adaptación para minimizar los efectos del daño oxidativo pueden utilizarse para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Para tratar de dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos en estudio, se evaluó la generación de EROs celular (efecto pro-oxidante).

Las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina y glutaredoxina desempeñan un papel importante en la eliminación de EROs y el mantenimiento del estado redox en las células. Además, muchos eliminadores de

radicales hidrófilos tales como ácido ascórbico (vitamina C) y eliminadores de radicales lipófilos como α -tocoferol (vitamina E) protegen a las células del daño oxidativo causado por EROs (Padayatty et al., 2013; Stephens et al., 1996). Estos antioxidantes no enzimáticos (vitamina C, vitamina E y glutatión reducido) constituyen la segunda línea de defensa del cuerpo (Mahdi, 2002). La vitamina C depura los radicales superóxido, hidroxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete y es oxidada por una variedad de otros oxidantes tales como halógenos, quinonas y radicales de fenoxilo. Por otra parte la vitamina E es el antioxidante liposoluble más importante en los seres humanos. Es un eliminador de radicales peroxilo y por lo tanto inhibe las reacciones en cadena en la peroxidación lipídica (Janisch et al., 2005).

Por lo antes mencionado, y para evaluar si el mecanismo de acción de los compuestos se produce vía el estrés oxidativo, se determinó para cada compuesto la generación de EROs por parte de los mismos y se ensayaron además en presencia de una mezcla de vitaminas C y E o del antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC).

Complejo VO/Baic: para una mejor comprensión de los posibles mecanismos implicados en la citotoxicidad de los compuestos en la línea celular A549, se evaluó el efecto de Baic y VO/Baic en la generación de EROs celular a través de la sonda de oxidación H₂DCFDA. Los resultados mostraron que el VO²⁺ no aumentó los niveles de EROs celulares (Figura 6.4) y VO/Baic produjo un incremento de los niveles de EROs de una manera dependiente de la dosis con diferencias estadísticamente significativas en todo el rango de concentraciones ($p < 0,05$). A una concentración de 100 μ M el complejo causó un incremento a 260 % de EROs sobre las células tumorales (con respecto al estado basal, células sin tratar, de 100 %) y la Baic produjo un bajo incremento de los niveles de EROs (a 150% en 100 μ M). El aumento de las especies reactivas de oxígeno con la concentración de los compuestos añadidos es consistente con la mayor inhibición de la viabilidad celular producida por el flavonoide y el complejo donde la diferencia en la producción de EROs por parte del complejo en relación al ligando pueda explicar las diferencias observadas en el efecto entre ambos.

Para determinar los efectos de las EROs en la viabilidad celular, las células de cáncer de pulmón humano se incubaron con Baic o VO/Baic junto con antioxidantes naturales (mezcla de vitaminas C y E). Se puede observar a partir de la Figura 6.5A que Baic y VO/Baic, se comportaron como las células no tratadas, siendo las viabilidades celulares como las de las células basales. Los mismos resultados se obtuvieron usando otro

eliminador de radicales libres, N-acetil-L-cisteína (NAC) (Figura 6.5B). Se puede observar que mientras que los compuestos añadidos generan estrés oxidativo en las líneas celulares que producen la inhibición de la viabilidad celular, la incubación de los compuestos con la adición de antioxidantes fuertes evita la muerte celular por la depuración de los radicales libres generados.

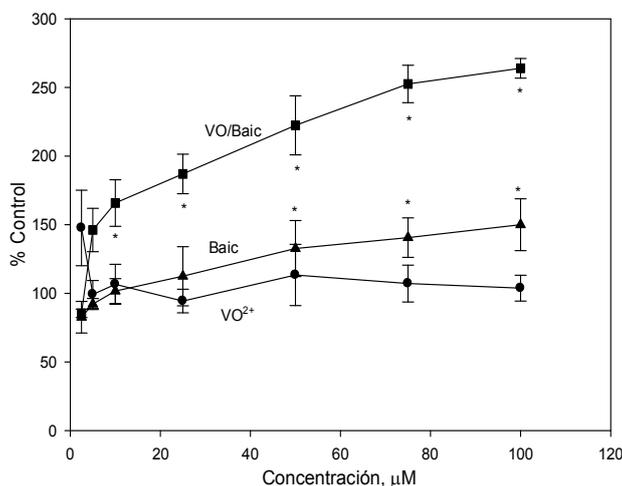


Figura 6.4. Efecto de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+} , ●), Baicalina (Baic, ▲) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic, ■) sobre la oxidación de H₂DCFDA a DCF. Las células A549 fueron incubadas a 37 °C en presencia de 10 µM de H₂DCFDA. Los valores se expresan como el porcentaje del control y representan la media ± SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Para confirmar esta hipótesis, los niveles de EROs celular se midieron nuevamente en las líneas celulares con el pretratamiento de N-acetil-L-cisteína (NAC) y Baic o VO/Baic. Puede verse en la Figura 6.6 que los niveles de EROs se redujeron completamente a los niveles de EROs naturales de la línea celular de cáncer no tratada. La comparación con los resultados mostrados en la Figura 6.4 sugiere que el estrés oxidativo generado por la acción de Baic y VO/Baic en ausencia de agentes antioxidantes es uno de los posibles mecanismos de muerte celular, en concordancia con algunos resultados informados para el flavonoide Baicalina (Chen et al., 2012; Lu et al., 2007).

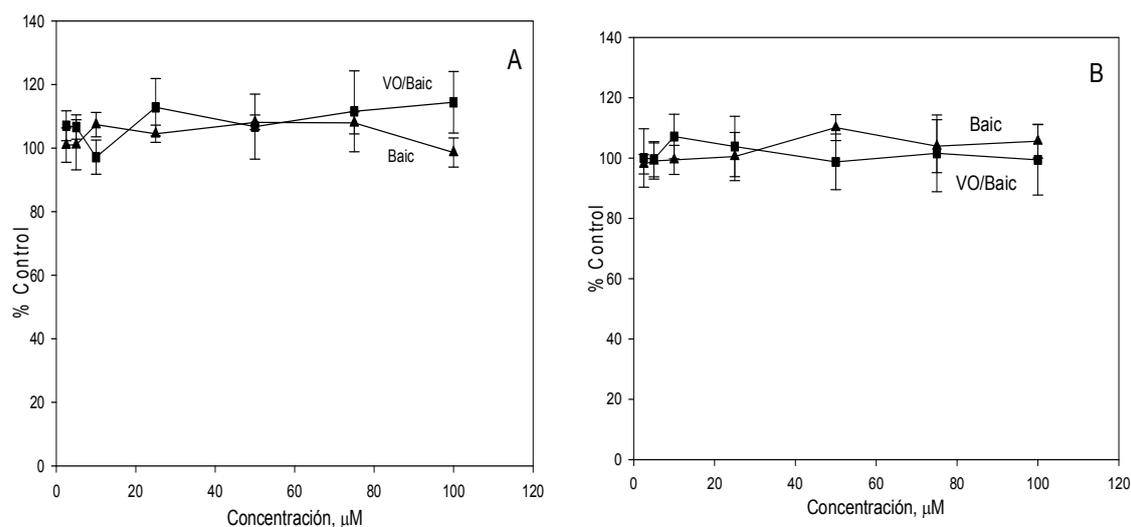


Figura 6.5. Efectos inhibitorios de Baicalina (Baic, ▲) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic, ■) sobre la viabilidad de las células A549 en presencia de una mezcla de vitaminas C y E (cada una a $50 \mu\text{M}$) (A) y NAC (B). La línea celular se trató con diversas concentraciones de los compuestos y una mezcla de vitaminas y NAC a 37°C durante 24 h. Los resultados se expresan como el porcentaje del valor del control y representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos separados. Los valores no presentan diferencias significativas con el valor del control ($p < 0,05$).

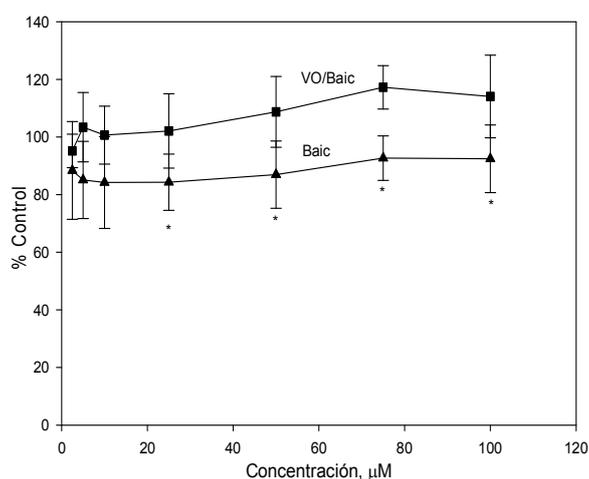


Figura 6.6. Efecto de N-acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM) sobre la producción de EROs inducida por Baicalina (Baic, ▲) y complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic, ■). Los valores se expresan como un porcentaje del nivel de control y representan la media \pm SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Complejo VO/Api: para este complejo así como para su ligando, se utilizó el mismo procedimiento anterior mediante el cual se examinaron los niveles intracelulares de EROs en células A549 y HeLa tratadas con los compuestos usando la sonda H₂DCFDA. Si bien, los datos relacionados al efecto del VO²⁺ son conocidos de forma previa, se determinan nuevamente a modo de referencia. Se puede observar en la Figura 6.7 que tanto el flavonoide Apigenina como el complejo VO/Api produjeron los mismos efectos en ambas líneas celulares. En la línea celular A549, ambos compuestos produjeron un ligero incremento de los niveles de EROs en concentraciones superiores a 80 μM. Al igual que lo determinado anteriormente en el sistema VO/Baic, el VO²⁺ no aumentó los niveles de EROs celulares.

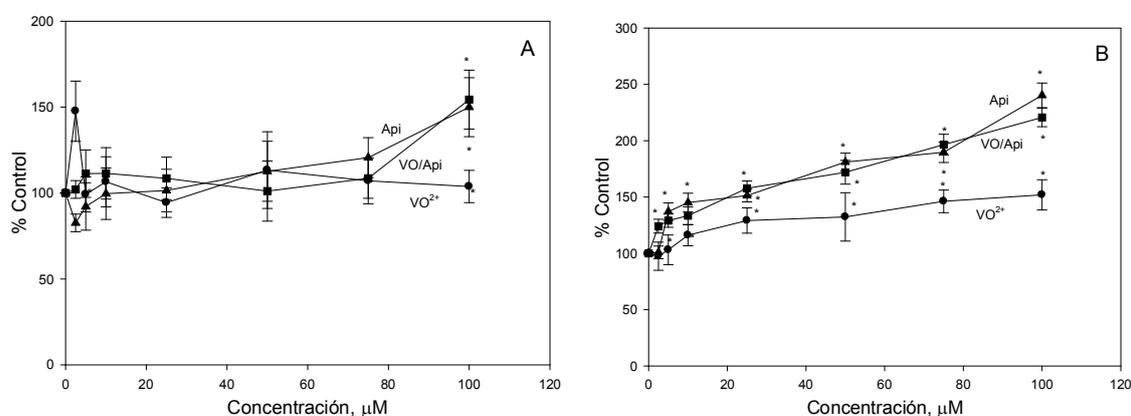


Figura 6.7. Efecto del VOCl₂.H₂O (VO²⁺, ●), Apigenina (Api, ▲) y complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api, ■) sobre la oxidación de H₂DCFDA a DCF. Las células A549 (A) y HeLa (B) se incubaron a 37°C en presencia de 10 μM de H₂DCFDA. Los valores se expresan como el porcentaje con el valor del control y representan la media ± SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control (p < 0,05).

Para comprender un poco el comportamiento observado para Apigenina, se compara su efecto con el del flavonoide estructuralmente relacionado, Luteolina (Naso et al., 2016a). La actividad anticancerígena de Luteolina, que posee alta capacidad de captación de peróxido, en la línea celular A549 a las 24 h de incubación es mayor que la de Apigenina (que resultó mejor secuestrante de radical hidroxilo). Sin embargo, en ambos casos la complejación no produjo mejoras en el comportamiento citotóxico ni en la generación de EROs celular con respecto a los ligandos, a pesar que el poder antioxidante *in vitro* fue diferente luego de la complejación con VO²⁺ debido a los diferentes modos de coordinación con cada flavonoide. Es importante mencionar que a pesar que la producción

de EROs de ambos compuestos en la línea celular A549 es similar para los ligandos y los complejos, en el caso de Api y VO/Api, la producción de EROs y los efectos citotóxicos comienzan en paralelo (en concentraciones superiores a 80 μM a 24 h de incubación). Por lo tanto, los mecanismos de estrés oxidativo generado por la capacidad pro oxidante de los compuestos en células podrían ser los responsables de la muerte celular en ambos casos.

Por otro lado, el tratamiento con Api y VO/Api en células HeLa causó una mejora significativa en la acumulación de EROs en las mitocondrias con un comportamiento dosis dependiente (aproximadamente 230% del valor del control a 100 μM) en comparación con las células control (no tratadas). El VO^{2+} , como ya vimos, genera un menor incremento de los niveles de EROs (150% a 100 μM). Por consiguiente, el aumento del estrés oxidativo inducido por los compuestos se correlaciona bastante bien con la inhibición de la viabilidad celular en ambas líneas.

Para confirmar esta hipótesis, y de la misma manera que se procedió en los ensayos con VO/Baic, se estudió el efecto de Api y VO/Api sobre la viabilidad celular en presencia de una mezcla de vitaminas C y E (Figura 6.8) y el efecto de NAC sobre el nivel de EROs (Figura 6.9) generado por los compuestos en ambas líneas celulares.

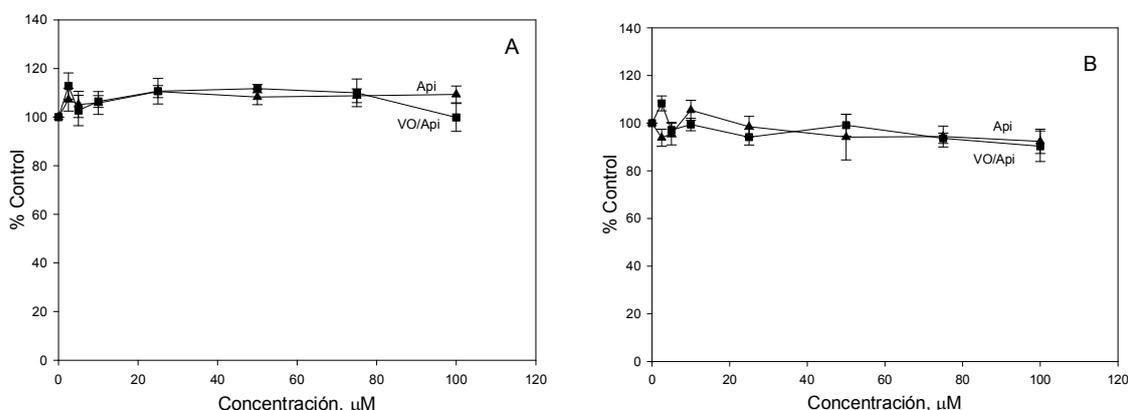


Figura 6.8. Efectos inhibitorios de Apigenina (Api, ▲) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api, ■) sobre la viabilidad de las células A549 (A) y HeLa (B) en presencia de una mezcla de vitaminas C y E (cada una a 50 μM). La línea celular se trató con diversas concentraciones de los compuestos y una mezcla de vitaminas a 37°C durante 24 h. Los resultados se expresan como el porcentaje con el valor del control y representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos separados. Todos los valores no son diferentes en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Se puede observar que cuando las células se incubaron en presencia de antioxidantes naturales se recuperó la viabilidad de las células tratadas. Por otra parte, el pretratamiento de ambas líneas celulares con 5 mM de NAC y Api o VO/Api suprimió la generación de EROs en las líneas celulares A549, y redujo los niveles de EROs en células HeLa tratadas con respecto a las células no tratadas. Por lo tanto, se puede inferir que el estrés oxidativo está implicado en el mecanismo de muerte celular.

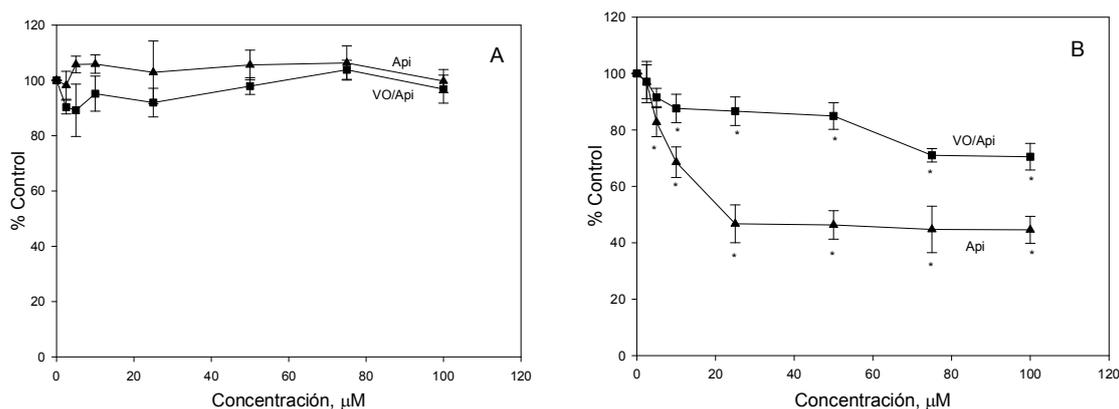


Figura 6.9. Efecto de N-acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM) sobre la producción de EROs inducida por Apigenina (Api, ▲) y por el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api, ■) en las líneas celulares A549 (A) y HeLa (B). Los valores se expresan como un porcentaje del valor del control y representan la media \pm SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

El glutatión es el principal regulador no enzimático de la homeostasis redox intracelular, ubicuo en todos los tipos de células a concentración milimolar. Existe en dos formas, reducida (GSH) y oxidada (GSSG) y participa en reacciones redox por la oxidación reversible de su tiol activo. Dentro de las células, el GSH total existe libre y ligado a proteínas. Dado que la enzima glutatión reductasa, que devuelve el glutatión libre de su forma oxidada, es constitutivamente activa e inducible sobre el estrés oxidativo, el glutatión libre está presente casi exclusivamente en su forma reducida (Masella et al., 2005). En las células de mamífero en condiciones fisiológicas, se sabe que el GSH está presente con concentraciones en estado estacionario de 1-10 mM en eritrocitos. La relación global de GSH/GSSG en una célula suele ser mayor que 100:1, y la pareja redox GSH/GSSG se utiliza como indicador de los cambios en el entorno redox y del estrés oxidativo en la célula. En varios modelos de estrés oxidativo, esta relación se ha demostrado que disminuye a valores de 10:1 e incluso 1:1 (Zitka et al., 2012). Para ampliar

el estudio de los efectos pro-oxidantes en el sistema VO/Api, se midió la concentración de GSH y GSSG en las líneas celulares y se calculó la relación GSH/GSSG porque la depleción de GSH por sí misma no es una causa principal de citotoxicidad.

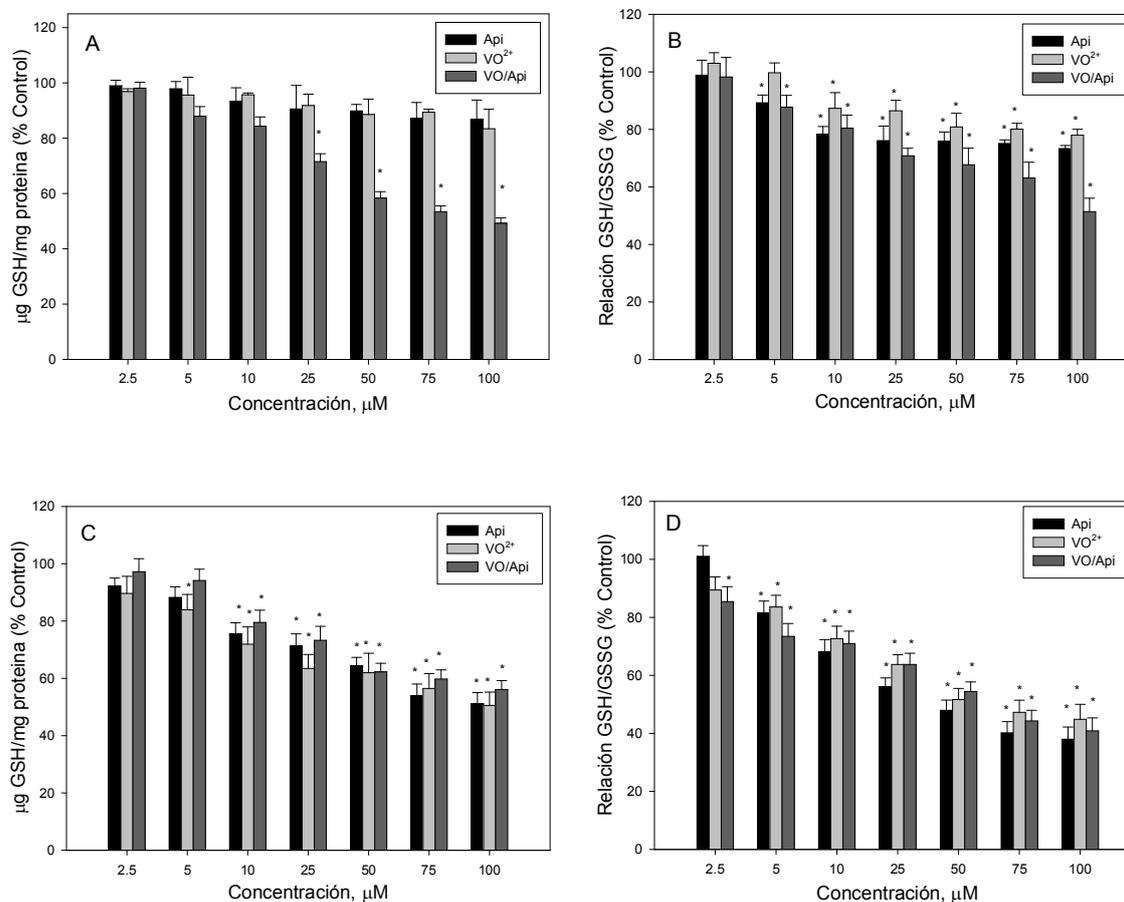


Figura 6.10. Efecto del catión de $\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (VO^{2+}), Apigenina (Api) y complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) sobre los niveles celulares de GSH y la relación GSH/GSSG en células A549 (A, B) y HeLa (C, D). Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes, *Diferencias significativas en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

La concentración del agente antioxidante natural GSH se determinó en las líneas de cáncer A549 y HeLa incubando las células con diferentes concentraciones de los compuestos. Asimismo, se midieron los niveles de glutatión oxidado, GSSG, y se calculó la relación GSH/GSSG. En la Figura 6.10A se puede observar que para la línea celular A549 los niveles de GSH se redujeron aproximadamente un 13%, 17% y 52% por el agregado de Api, VO²⁺ y VO/Api, respectivamente (100 μM, $p < 0,05$). Se debe remarcar que los resultados obtenidos para Api concuerdan con reportes anteriores (Das et al., 2012;

Kachadouriana y Day, 2006). En la línea celular HeLa los compuestos produjeron una disminución de cerca del 50% de los niveles de GSH (Fig. 10C). Como puede verse en las Figs. 10B y 10D, Api, VO²⁺ y VO/Api indujeron una disminución de la relación GSH/GSSG en ambas líneas celulares. En la línea celular A549 si bien el complejo produjo una mayor disminución de GSH que el ligando, la producción de EROs y la viabilidad celular fueron similares para el ligando y el complejo. Sin embargo, los resultados indican que la relación GSH/GSSG es similar para los dos compuestos, y la disminución de dicha relación con la concentración de los compuestos se debe no sólo a una disminución en el nivel de GSH sino también a una acumulación de GSSG producido por el daño oxidativo.

Complejo Cu/5-HTP: para investigar la posible producción de EROs por los compuestos en las líneas celulares A549, HeLa y HCT-116, las células se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos durante 24 h. Para la línea celular A549 se puede observar que cuando las células se incuban con concentraciones de hasta 100 µM de los compuestos, no se observa un aumento significativo en la generación de EROs en comparación con el control (Figura 6.11). A una concentración superior a 250 µM los compuestos produjeron una ligera disminución en la producción de EROs. El comportamiento sobre la producción de EROs tanto del 5-HTP como del CuCl₂ es similar en las líneas celulares HeLa y HCT-116 (Figura 6.11) generando un ligero incremento en los niveles de EROs con el aumento de concentración, medidos hasta 100 µM. Por otro lado, el complejo Cu/5-HTP produjo un incremento en los niveles de EROs intracelulares en ambas líneas celulares de una manera dependiente de la dosis (alrededor de 160-170% a 100 µM). Estos resultados se correlacionan con los efectos de disminución de la viabilidad celular observados en las líneas celulares de cáncer de colon y cáncer cervical humanos.

Teniendo en cuenta que en la línea celular de cáncer de pulmón humano los compuestos produjeron una reducción en la viabilidad celular asociada con una disminución de los niveles de EROs intracelulares, se ha realizado el experimento de medición de EROs reduciendo el tiempo de incubación. La línea celular A549 se incubó con concentraciones de 250 y 500 µM de los compuestos durante 2 horas. Se observó un aumento en la producción de EROs dependiente de la dosis para CuCl₂ y Cu/5-HTP (Figura 6.12) que muestra que la producción de EROs pueden iniciarse en tiempos más cortos y que está significativamente asociada con la muerte celular observada a las 24 h de incubación (Figura 6.3).

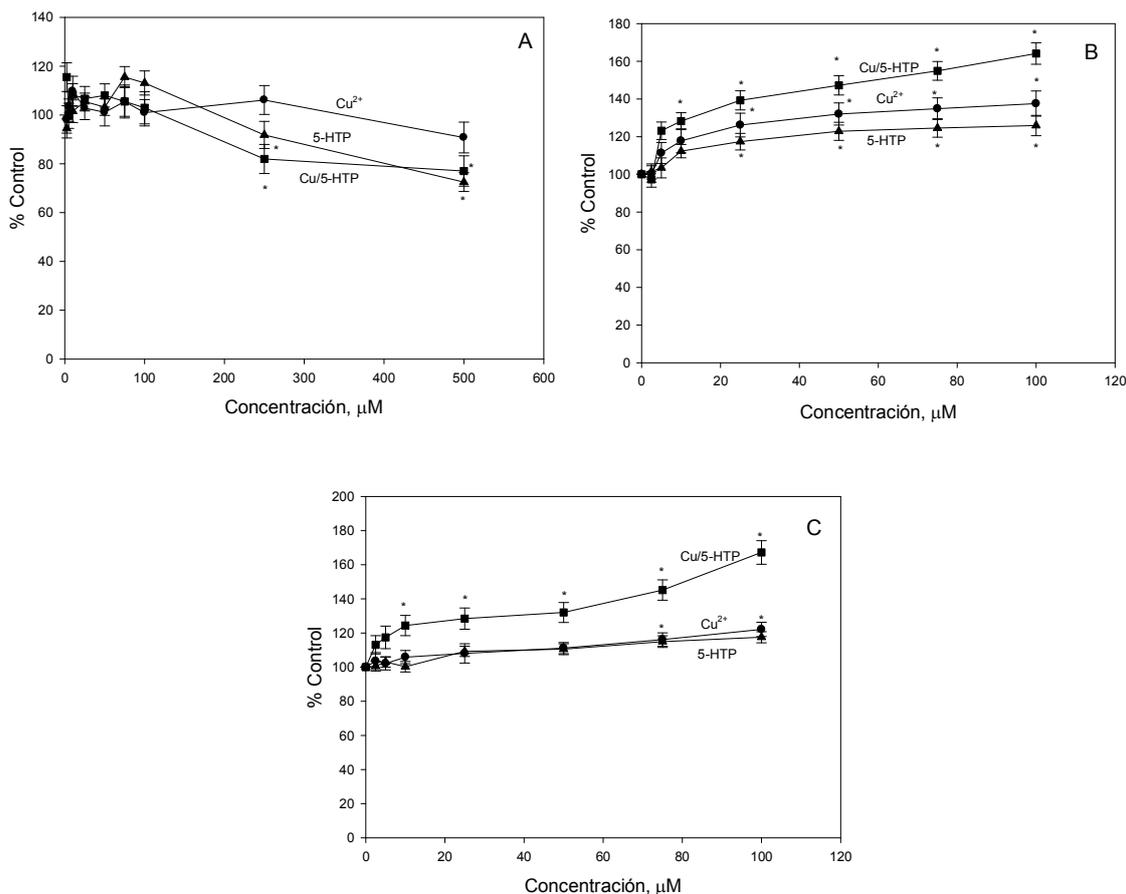


Figura 6.11. Efecto del $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+} , ●), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP, ▲) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP, ■) sobre la oxidación de H_2DCFDA a DCF. Las células A549 (A), HeLa (B) y HCT-116 (C) se incubaron a 37°C durante 24 h en presencia de $10 \mu\text{M}$ de H_2DCFDA . Los valores se expresan como el porcentaje con el valor del control y representan la media \pm SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

Estos resultados muestran que el complejo Cu/5-HTP mejora la actividad del aminoácido natural en las tres líneas celulares tumorales evaluadas sin afectar la viabilidad normal de los fibroblastos, siendo el estrés oxidativo uno de los posibles mecanismos de acción.

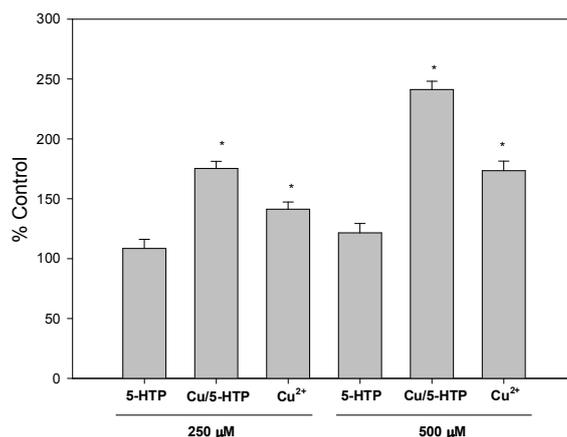


Figura 6.12. Efecto del $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP) y complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) sobre la oxidación de H_2DCFDA a DCF. Las células A549 se incubaron a 37°C durante 2 h en presencia de $10 \mu\text{M}$ de H_2DCFDA . Los valores se expresan como el porcentaje con el valor del control y representan la media \pm SEM. *Valores significativos en comparación con el valor del control ($p < 0,05$).

6.3. Morfología celular.

Los cambios morfológicos producidos en las células tratadas con el agente en estudio brindan información valiosa respecto del probable mecanismo de muerte celular. La necrosis y la apoptosis son dos mecanismos que llevan a la muerte celular por diferentes vías. En la necrosis no se observan cambios morfológicos en los núcleos porque la muerte se debe al daño de la membrana celular y pérdida de material intracelular. En la apoptosis los cambios morfológicos (condensación del citoplasmática y nuclear, fragmentación del núcleo, presencia de burbujas en las membranas y presencia de núcleos picnóticos) son muy notorios (Saraste y Pulkki, 2000).

Complejo VO/Baic: teniendo en cuenta los efectos citotóxicos de VO/Baic en las células de cáncer de pulmón humano se investigó su acción sobre la morfología celular (Figura 6.13). La mayoría de las células A549 no tratadas mostraron una morfología epitelial y una adhesión cercana a célula-célula (Ren et al., 2015). Tras el tratamiento con $100 \mu\text{M}$ de VO/Baic durante 24 h se observaron cambios morfológicos. Las células mostraron condensación del citoplasma y aparecieron protusiones estrechas.

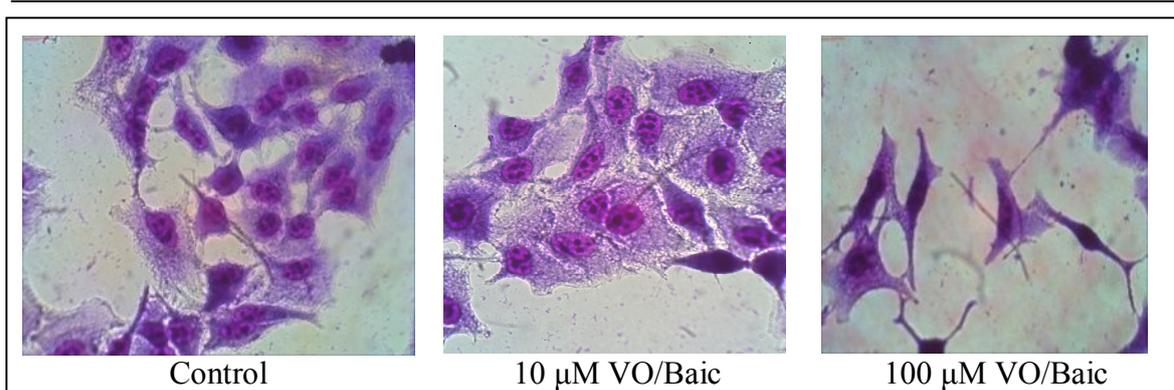


Figura 6.13. Efecto en la morfología de las células A549 tratadas con el complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic). Las células se incubaron durante 24 h sin adición del compuesto en estudio (control) y con adición del VO/Baic (10 y 100 μM , 40 x).

Complejo VO/Api: las células A549 y HeLa expuestas a 100 μM de VO/Api durante 24 h mostraron cambios morfológicos, evidenciados por la condensación del citoplasma y la presencia de núcleos picnóticos. El complejo VO/Api a la concentración de 10 μM no produce un efecto aparente en comparación con el control no tratado en ambas líneas celulares (Figura 6.14).

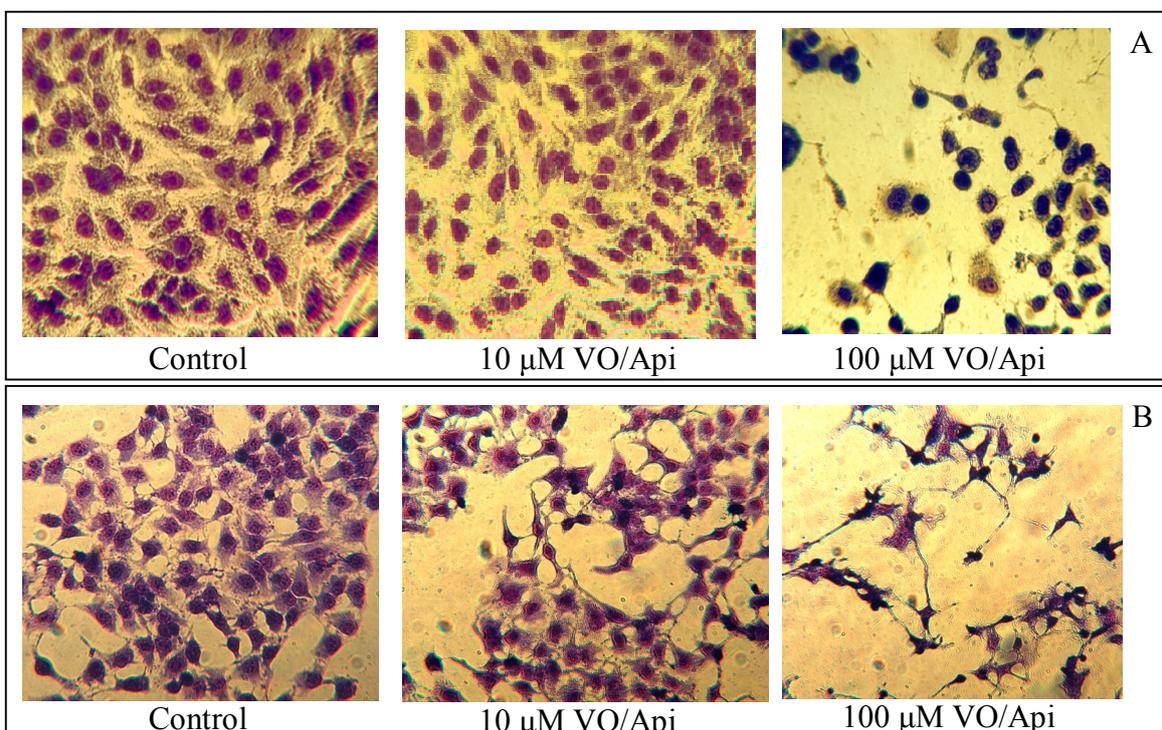


Figura 6.14. Efecto en la morfología de las células A549 (A) y HeLa (B) tratadas con el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api). Las células se incubaron durante 24 horas sin adición del compuesto en estudio (control) y con adición del VO/Api (10 y 100 μM , 40 x).

Estos resultados coinciden con los efectos observados en el ensayo MTT, en el que Api y VO/Api mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre la viabilidad de células de cáncer de pulmón humano y cáncer de cuello uterino en particular a las 48 h de incubación.

Complejo Cu/5-HTP: el ensayo con células A549 mostró morfología epitelial, adhesión celular estrecha y contorno celular definido (Ren et al., 2015). Después del tratamiento con 500 μM de Cu/5-HTP, se pueden observar cambios morfológicos tales como contracción celular y presencia de núcleos picnóticos.

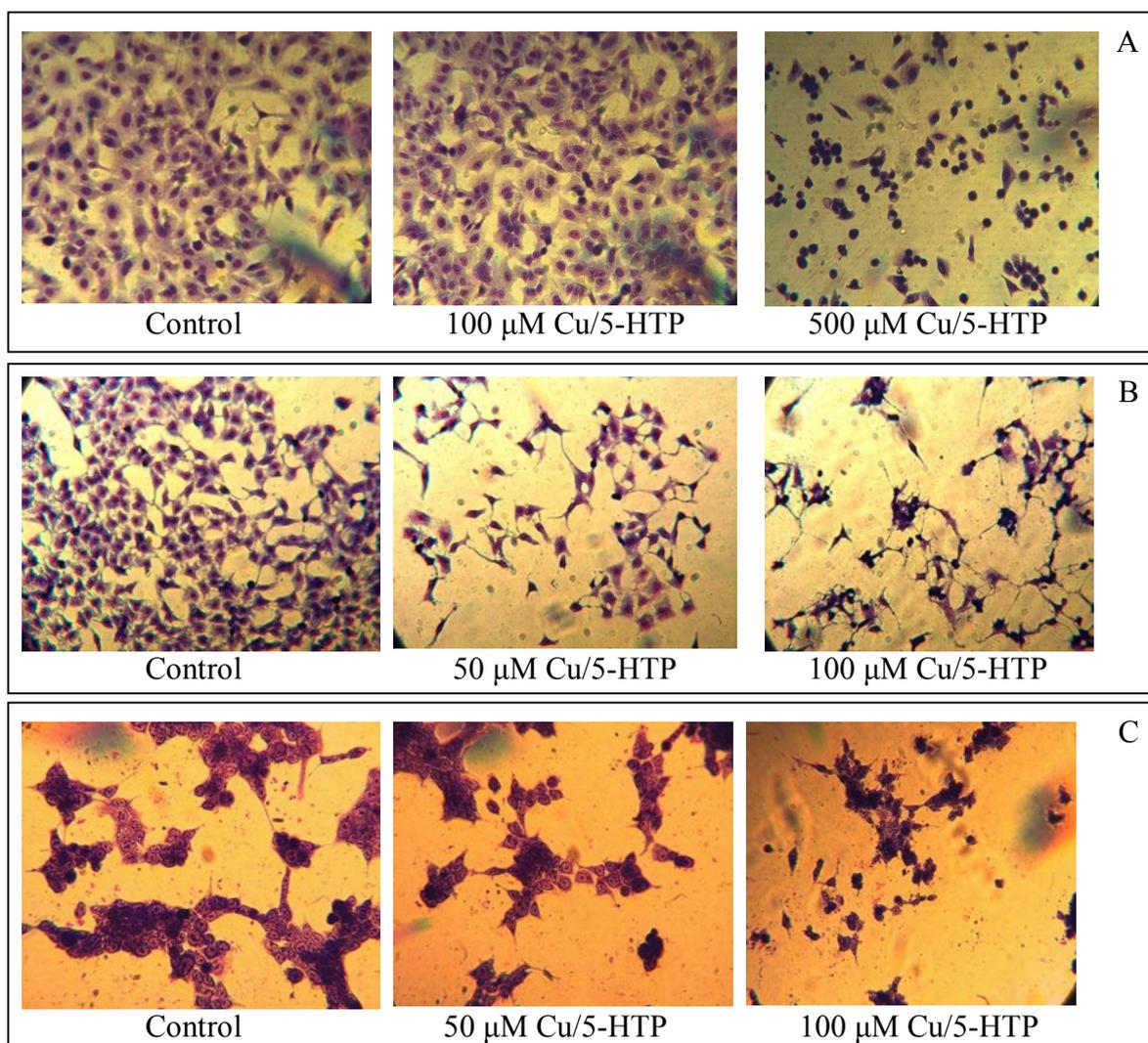


Figura 6.15. Efecto en la morfología de las células A549 (A), HeLa (B) y HCT-116 (C) tratadas con el complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP). Las células se incubaron durante 24 horas sin adición del compuesto en estudio (control) y con adición del Cu/5-HTP (50, 100 y 500 μM , 40 x).

Las células HeLa no tratadas muestran su forma típica romboide-tetraédrica y núcleos pleomórficos (Martínez-Ramos et al., 2005) y después del tratamiento con Cu/5-HTP, especialmente a 100 μM , puede observarse encogimiento, presencia de lamelipodios, condensación nuclear y muchas células desprendidas. Las células HCT-116 presentan una morfología típica de núcleos definidos y presencia de nucléolos (Grodén et al., 1995). Se observaron cambios morfológicos como núcleos condensados y contracción celular cuando se incubaron con el complejo en concentración de 100 μM (Figura 6.15). En los tres casos, la disminución en el número de células coincide con los resultados obtenidos por el ensayo de MTT.

6.4. Conclusiones preliminares

Como conclusión del efecto de los compuestos en las líneas celulares puede observarse que los complejos de coordinación VO/Baic, VO/Api y Cu/5-HTP mostraron actividad antitumoral frente a las líneas de cáncer ensayadas. Los ligandos Baic y Api (flavonoides) muestran actividad antitumoral intrínseca a diferencia del aminoácido 5-HTP. La complejación mejoró la actividad antitumoral del complejo VO/Baic incluso a períodos de incubación corta, mientras que sólo se observa una ligera mejoría de la actividad en VO/Api en períodos de incubación largos sobre las células de cáncer de pulmón. No obstante, el efecto antitumoral de VO/Api es más marcado sobre la línea de cáncer cervical respecto de la línea de cáncer pulmonar. Por otra parte, la complejación del 5-HTP mejora la actividad antitumoral del mismo principalmente frente a las líneas de cáncer cervical y de cáncer de colon. La disminución en la viabilidad celular y los cambios morfológicos observados ponen en evidencia la actividad antitumoral de los complejos sintetizados. En líneas generales la actividad es dependiente de la dosis y del tiempo.

Los resultados de los ensayos de generación intracelular de EROs (con y sin agregado de los agentes antioxidantes) sugieren que el mecanismo de acción antitumoral en todos los casos está asociado al estrés oxidativo generado por el agregado de los compuestos, puesto que el incremento en la generación de EROs se correlaciona con la disminución de la viabilidad celular (del ensayo MTT).

Para el complejo Cu/5-HTP, los estudios antitumorales fueron complementados con estudios de citotoxicidad sobre una línea de células normales para demostrar que la citotoxicidad del complejo es selectiva (dirigida a las células tumorales). Este ensayo y los estudios de toxicidad aguda (Test de *Artemia salina*) y genotoxicidad (Test de Ames) realizados para todos los complejos sugieren que los mismos podrían ser candidatos para el tratamiento del cáncer.

Capítulo 7: Ensayos de biodisponibilidad: interacción con albúmina

La biodisponibilidad se define como la velocidad y cantidad de fármaco que llega al sitio de acción y se encuentra disponible para ejercer su efecto farmacológico. La albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo e interviene en el transporte y disposición de fármacos. Por lo tanto, la capacidad de unión de un fármaco a la albúmina sérica en sangre puede tener un impacto significativo en la distribución, concentración libre y metabolismo del mismo. En este contexto, la investigación de la interacción fármaco-proteína tiene un importante significado en la farmacología (Zhao et al., 2012). La albúmina sérica puede reaccionar mediante unión reversible no covalente con un gran número de compuestos endógenos y exógenos, por lo que se utiliza a menudo en estudios de interacción fármaco-proteínas. La albúmina sérica bovina (ASB) es similar a la albúmina sérica humana (ASH) en la estructura terciaria y con secuencias altamente homólogas (76,52%) (Tang et al., 2014). La ASB es adecuada como proteína modelo para la liberación de fármacos debido a su importancia médica, abundancia, bajo costo, facilidad de purificación, propiedades inusuales de unión al ligando y que es ampliamente aceptada en la industria farmacéutica (Bi et al., 2012; Tang et al., 2014; Zhao et al., 2012). Los parámetros cuantitativos utilizados para caracterizar las interacciones fármaco-albúmina son principalmente la constante de desactivación de Stern-Volmer (K_{sv}), la constante de unión (K_a) y el número de sitios de unión (n), que se obtienen mediante modelos matemáticos utilizando resultados experimentales (Tang et al., 2014).

7.1. Estudios de desactivación (*quenching*) de la albúmina.

Las técnicas utilizadas comúnmente para detectar la interacción entre el fármaco y la albúmina sérica incluyen espectroscopía de fluorescencia, espectrofotometría UV, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía Raman, resonancia magnética nuclear y electroquímica (Shang y Li, 2010; Tang et al., 2014). La determinación por espectroscopía de fluorescencia es altamente sensible, rápida y simple, y los espectros de fluorescencia pueden dar información acerca de los cambios en el ambiente local del fluoróforo. La accesibilidad de los desactivadores (*quenchers*) a los fluoróforos de la albúmina puede ser revelada midiendo la desactivación (*quenching*) intrínseca de la fluorescencia de la ASB. Este estudio ayuda a comprender los mecanismos de unión de la albúmina a los compuestos y proporciona pistas sobre la naturaleza del fenómeno de unión (Shang y Li, 2010). La disminución de la fluorescencia se puede producir por varias razones, algunas triviales y otras por interacción

entre los *quenchers* y el fluoróforo. Este último tipo de interacción puede dar una valiosa información sobre la accesibilidad de triptófanos a diferentes *quenchers*, y es una herramienta metodológica que permite visualizar cambios conformacionales, unión de ligandos, o asociación de proteínas en solución.

A continuación se describen los estudios de desactivación de la ASB para los ligandos baicalina y apigenina y sus respectivos complejos de oxidovanadio(IV). El complejo $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Cu/5-HTP) no pudo estudiarse por esta metodología porque presenta fluorescencia a la misma longitud de onda que la ASB. La fluorescencia del 5-hidroxitriptófano presente en el complejo interfiere en el ensayo impidiendo el monitoreo de desactivación de la ASB. Al aumentar la concentración del complejo o ligando, aumentó la fluorescencia medida. Esto se debe a que la ASB tiene dos residuos de triptófano (situado en las posiciones 134 y 212) que poseen fluorescencia intrínseca (Moriyama et al., 1996) y la base metodológica de este ensayo es la medición de la disminución de dicha fluorescencia.

Complejo VO/Baic: los estudios relativos a la interacción y el transporte potencial por la ASB se realizaron con el ligando Baicalina (Baic) y el complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) midiendo la intensidad de fluorescencia de la ASB antes y después de la adición de estos compuestos (Figura 7.1). La interacción con el catión de oxidovanadio(IV) (VO^{2+}) se discutió previamente (Islas et al., 2015). Se ha demostrado que el incremento de las concentraciones de VO^{2+} sólo produjo una desactivación del 10% a los valores más altos de concentración ensayada. La ASB tiene dos residuos de triptófano que poseen fluorescencia intrínseca, mientras que Baic y VO/Baic no muestran fluorescencia intrínseca en las condiciones experimentales (datos no presentados).

Para los experimentos (Figura 7.1) pueden realizarse las siguientes observaciones:

- (i) La intensidad de fluorescencia de la banda característica de la ASB disminuyó conforme fue aumentando la concentración de los compuestos en estudio, indicando interacciones entre los compuestos y la proteína,
- (ii) Dicha desactivación de la fluorescencia es acompañada por un desplazamiento hacia el rojo de la posición del máximo de la banda en los espectros. Este desplazamiento de la longitud de onda de la banda de emisión sugiere un cambio en la fluorescencia intrínseca del resto triptófano de la ASB, lo que indica una modificación en la polaridad alrededor del residuo, con alteración de la estructura del subdominio hidrofóbico donde se encuentran estos residuos, llevándolo hacia un entorno más hidrófilo provocando una modificación en la estructura secundaria de la proteína (Itri et al., 2004).

(iii) Se puede observar que VO/Baic ocasionó una desactivación total a 40 μM de concentración y que Baic ocasionó un 70% de desactivación de la intensidad de fluorescencia de BSA a la misma concentración.

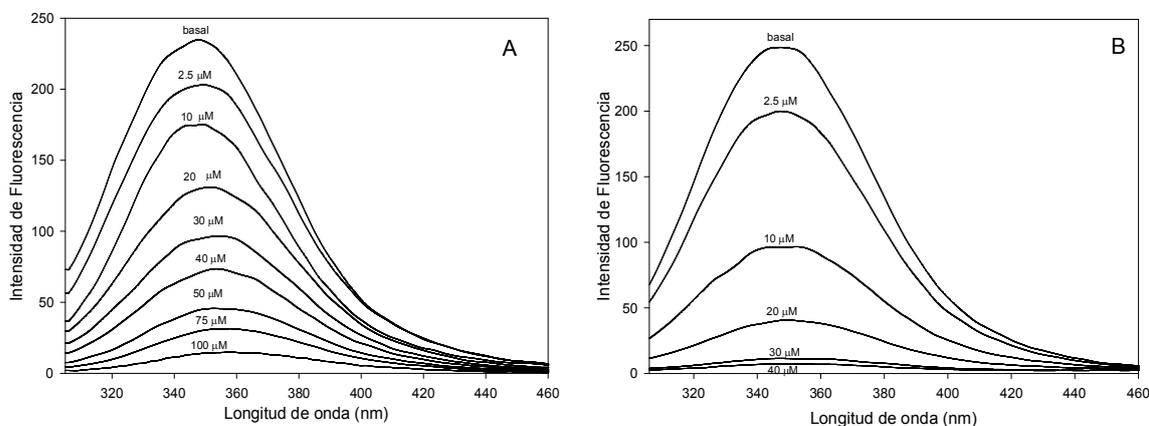


Figura 7.1. Experimentos de desactivación de la fluorescencia intrínseca de la albúmina sérica bovina (ASB). Espectros de las soluciones con concentración fija de ASB (6 μM) y diferentes concentraciones de cada compuesto a 298 K. Las concentraciones utilizadas fueron: 0 (basal); 2,5; 10; 20; 30; 40; 50; 75 y 100 μM de Baicalina (A) y 2,5; 10; 20; 30 y 40 μM del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B).

Para confirmar el mecanismo de desactivación se analizaron los datos de fluorescencia a diferentes temperaturas mediante el uso de la ecuación de Stern-Volmer. La Figura 7.2 muestra las gráficas de Stern-Volmer de la desactivación de la fluorescencia de la ASB por Baic (A) y VO/Baic (B) a diferentes temperaturas. Se puede observar que las curvas se desvían en gran medida de la linealidad a concentraciones superiores a 30 μM . La curvatura ascendente indicó que el tipo de desactivación es combinada (mediante un mecanismo tanto estático como dinámico) (Lakowicz, 2013), pero a concentraciones más bajas se produce probablemente un único mecanismo de desactivación (estático o dinámico). Las curvas de Stern-Volmer se utilizaron para elucidar estos supuestos mecanismos a concentraciones más bajas, y se obtuvo una correlación lineal para ambos compuestos (Figuras 7.2C y 7.2D). En la Tabla 7.1 se presentan los valores de las constantes de desactivación de Stern-Volmer (K_{sv}) calculadas que, a su vez, muestran una disminución con la temperatura. Cuando se calcularon los valores de la constante de desactivación bimolecular (K_q) utilizando la relación $K_q = K_{sv}/\tau_0$, $\tau_0 = 10^{-8}$ s, se obtuvieron valores mucho mayores que el valor máximo para una constante de desactivación dinámica ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la interacción entre los compuestos

y la ASB ocurrió más probablemente por desactivación del tipo estática lo que implica la formación de un compuesto ASB-complejo (Shi et al., 2010).

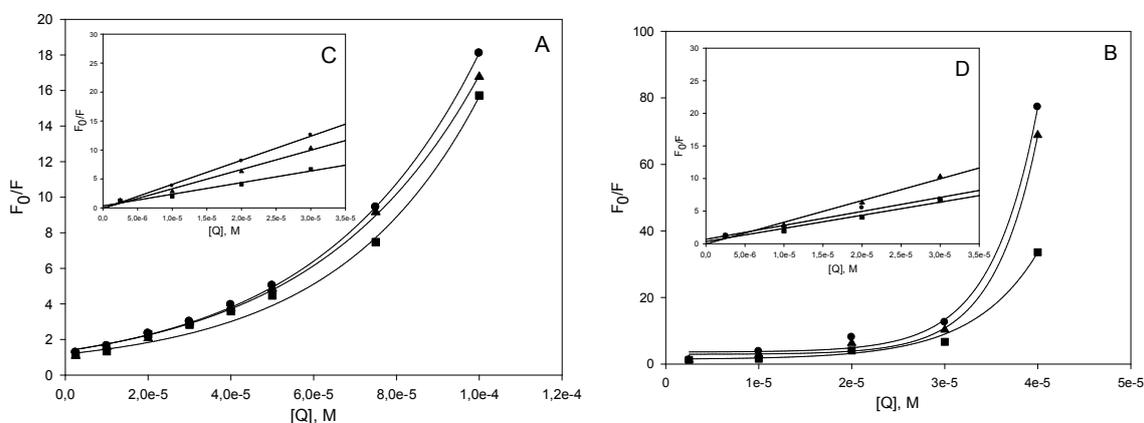


Figura 7.2. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de la fluorescencia de la ASB con diferentes concentraciones de Baicalina (A) y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B) a diferentes temperaturas ((●), 298 K; (▼), 303 K; (■), 310 K), $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. Gráficos insertados: F_0/F en función de $[Q]$ para Baicalina (C) y para el complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (D) a las concentraciones más bajas.

Tabla 7.1. Valores de K_{sv} y K_{q} para la interacción de unión de Baicalina (Baic) y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) con la ASB ($6 \mu\text{M}$) en buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) a diferentes temperaturas.

Compuesto	T (K)	$K_{\text{sv}} (\times 10^4)$ (L mol^{-1})	r^2	$K_{\text{q}} (\times 10^{12})$ (L mol^{-1})
Baic	298	$7,86 \pm 0,52$	0,98	$7,86 \pm 0,52$
	303	$7,79 \pm 0,78$	0,98	$7,79 \pm 0,78$
	310	$7,10 \pm 0,53$	0,99	$7,10 \pm 0,53$
VO/Baic	298	$41,57 \pm 0,22$	0,99	$41,57 \pm 0,22$
	303	$33,27 \pm 0,35$	0,99	$33,27 \pm 0,35$
	310	$20,06 \pm 0,57$	0,97	$20,06 \pm 0,57$

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores de K_{sv} .

Complejo VO/Api: los estudios relativos a la interacción y el transporte potencial por la ASB se realizaron con el ligando Apigenina (Api) y el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) midiendo la intensidad de fluorescencia de la ASB antes y después de la adición de estos compuestos. Los efectos del ligando y el complejo sobre la fluorescencia

intrínseca de la ASB se muestran en la Figura 7.3. Para ambos compuestos, la intensidad de fluorescencia de la ASB disminuyó conforme aumenta la concentración de los mismos, acompañado de un ligero desplazamiento de las longitudes de onda de máxima emisión hacia el azul sugiriendo que la unión está posiblemente asociada con cambios en el entorno dieléctrico de al menos uno de los dos anillos de indol en la ASB (Bi et al., 2012).

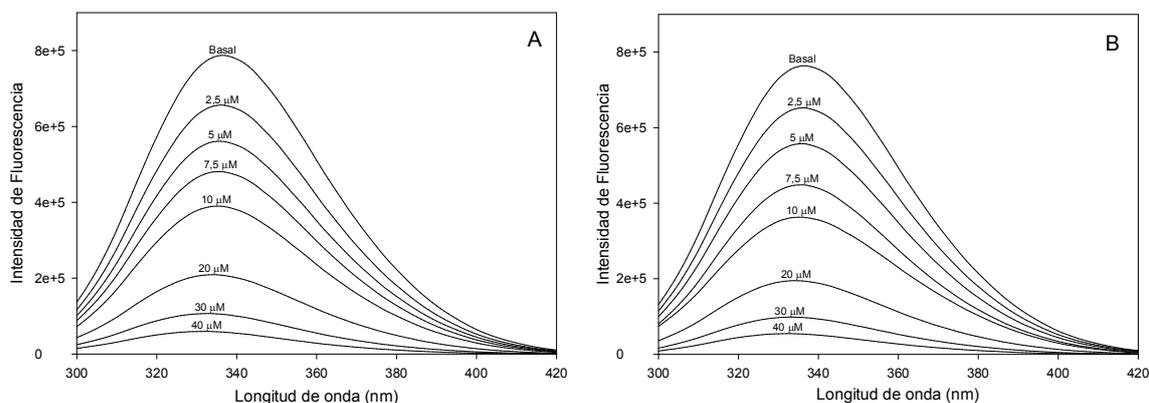


Figura 7.3. Experimentos de desactivación de la fluorescencia intrínseca de la albúmina sérica bovina (ASB). Espectros de las soluciones con concentración fija de ASB ($6 \mu\text{M}$) y diferentes concentraciones de cada compuesto a 298 K. Las concentraciones utilizadas fueron: 0 (basal); 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 30 y $40 \mu\text{M}$ de Apigenina (A) y del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (B).

Para confirmar el mecanismo de desactivación se analizaron los datos de fluorescencia a diferentes temperaturas con la ecuación de Stern-Volmer. La Figura 7.4 muestra las gráficas de Stern-Volmer de la desactivación de la fluorescencia de la ASB por Api (A) y VO/Api (B) a diferentes temperaturas. Se puede observar que las curvas se desvían en gran medida de la linealidad a concentraciones superiores a $10 \mu\text{M}$. La curvatura ascendente indicó que el tipo de desactivación es combinada (Lakowicz, 2013), pero a concentraciones más bajas se produce probablemente un único mecanismo de desactivación. Las curvas de Stern-Volmer se utilizaron para elucidar estos supuestos a concentraciones más bajas, y se obtuvo una correlación lineal para ambos compuestos (Figuras 7.4C y 7.4D). En la Tabla 7.2 se presentan los valores calculados de K_{sv} que muestran una disminución con la temperatura. Cuando se calcularon los valores de K_{q} , se obtuvieron valores mucho mayores que el valor máximo para una constante de desactivación dinámica ($2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Estos resultados sugieren, al igual que en el caso anterior, que la interacción entre los compuestos y la ASB ocurrió

probablemente por desactivación estática indicando la formación de un compuesto ASB-complejo (Lakowicz, 2013).

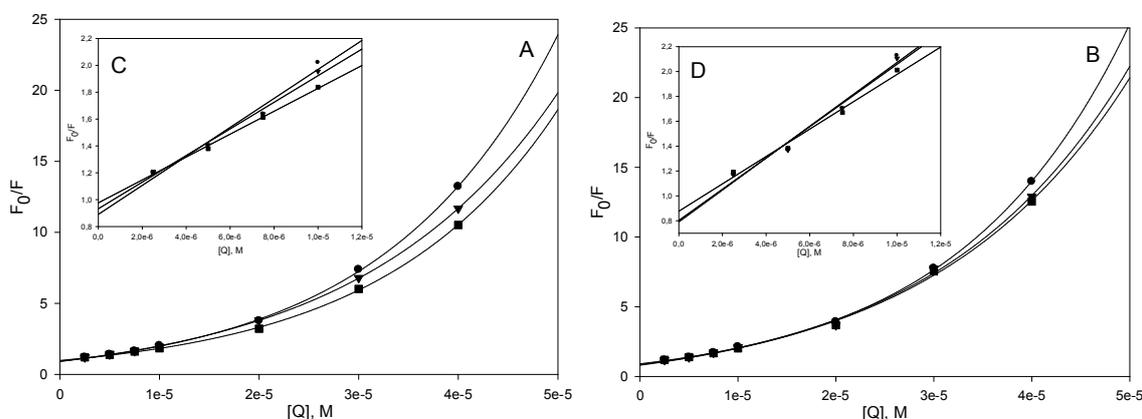


Figura 7.4. Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de la fluorescencia de la ASB con diferentes concentraciones de Apigenina (A) y del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (B) a diferentes temperaturas ((●), 298 K; (▼), 303 K; (■), 310 K), $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. Gráficos insertados: F_0/F en función de $[Q]$ para Apigenina (C) y para el complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (D) a las concentraciones más bajas.

Tabla 7.2. Valores de K_{sv} y K_{q} para la interacción de unión de Apigenina (Api) y del complejo $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ (VO/Api) con la ASB (6 μM) en buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) a diferentes temperaturas.

Compuesto	T (K)	$K_{\text{sv}} (\times 10^4)$ (L mol^{-1})	r^2	$K_{\text{q}} (\times 10^{12})$ (L mol^{-1})
Api	298	$10,71 \pm 0,10$	0,98	$10,71 \pm 0,10$
	303	$9,77 \pm 0,19$	0,99	$9,77 \pm 0,19$
	310	$8,43 \pm 0,11$	0,99	$8,43 \pm 0,11$
VO/Api	298	$12,89 \pm 0,18$	0,99	$12,79 \pm 0,03$
	303	$12,47 \pm 0,11$	0,99	$12,47 \pm 0,11$
	310	$11,15 \pm 0,21$	0,98	$11,15 \pm 0,21$

r^2 es el coeficiente de correlación para los valores de K_{sv} .

7.2. Constantes de afinidad y sitios de enlace.

Se sabe que la interacción fármaco-proteína influye directamente en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos en el organismo (Bi et al., 2012). En consecuencia, es importante estudiar la interacción de los fármacos con la albúmina sérica, porque influye

directamente en la farmacología y en la farmacodinamia de los medicamentos (Shang y Li, 2010). La determinación del nivel de unión del compuesto con la ASB es crítica y se correlaciona directamente con el transporte, la disposición y la eficacia *in vivo* del compuesto. El valor de la constante de unión (K_a) es esencial para entender la distribución de compuestos en el plasma ya que una unión débil puede dar lugar a concentraciones relativamente altas del fármaco en el plasma, dando como resultado un tiempo de vida más corto mientras que una unión fuerte puede disminuir las concentraciones de compuesto en el plasma, mejorando el efecto farmacológico.

Complejo VO/Baic: los valores de K_a y el número de sitios de unión (n) a diferentes temperaturas fueron calculados a partir de las gráficas de la Figura 7.5 y se enumeran en la Tabla 7.3. Se encontró que la constante de unión disminuye con el aumento de la temperatura, lo que resulta en una reducción de la estabilidad del sistema compuesto-ASB. Comparando las constantes de unión de Baic-ASB y VO/Baic-ASB, se encontró que la unión con el complejo es más fuerte que con el ligando libre.

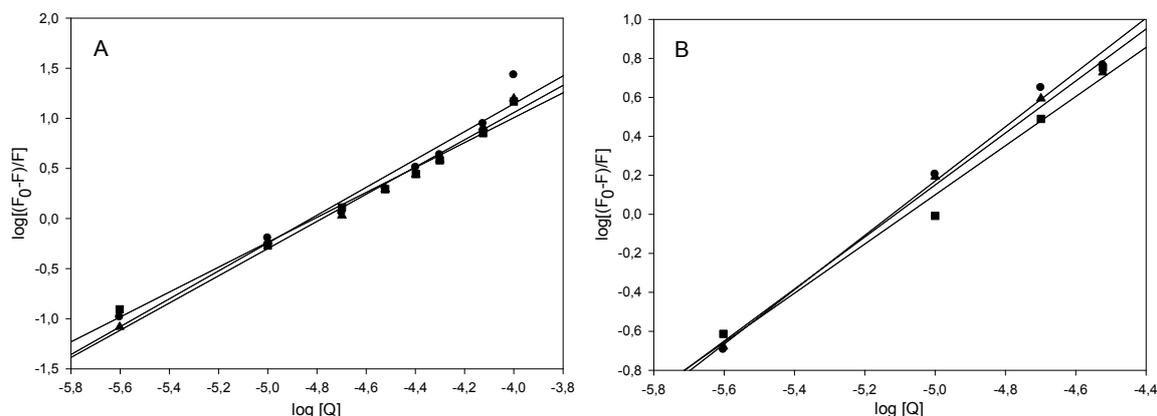


Figura 7.5. Gráfico del $\log ((F_0-F)/F)$ en función del $\log [Q]$ para Baicalina (A) y para el complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B) a diferentes temperaturas ((●), 298 K; (▼), 303 K; (■), 310 K).

Por otra parte se determinaron los sitios de unión de los compuestos con la ASB encontrándose valores en el rango $n= 1,25-1,39$, los que sugieren que existe al menos 1,0 sitio de unión de alta afinidad para los compuestos. Estos datos sugieren que Baicalina y VO/Baic pueden ser ligados y transportados por la ASB.

Tabla 7.3. Valores de K_a y n para la interacción de unión de Baicalina (Baic) y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) con la ASB a diferentes temperaturas.

Compuesto	T (K)	K_a ($\times 10^6$) (L mol^{-1})	n
Baic	298	$5,13 \pm 0,31$	$1,39 \pm 0,06$
	303	$3,06 \pm 0,17$	$1,35 \pm 0,03$
	310	$1,02 \pm 0,23$	$1,25 \pm 0,02$
VO/Baic	298	$13,48 \pm 0,46$	$1,39 \pm 0,05$
	303	$6,61 \pm 0,82$	$1,33 \pm 0,07$
	310	$2,51 \pm 0,21$	$1,26 \pm 0,03$

Los resultados encontrados para n y K_a para Baicalina coinciden con datos reportados anteriormente por Xiao y colaboradores (Xiao et al., 2007). Sin embargo, es importante mencionar que existen discrepancias en la literatura para la interacción de la Baicalina con la albúmina, siendo K_{sv} , K_a y los parámetros termodinámicos bastante diferentes entre sí. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en cada determinación (diferencias en las concentraciones de albúmina y flavonoides, fracciones de albúmina y/o medios de disolución) (Shi y Cao, 2011; Xiao et al., 2007; Xu et al., 2010).

Complejo VO/Api: los valores de K_a y n a diferentes temperaturas fueron calculados a partir de las gráficas de la Figura 7.6 y se enumeran en la Tabla 7.4. Se encontró que la constante de unión disminuye con el aumento de la temperatura, lo que resulta en una reducción de la estabilidad del sistema compuesto-ASB. Comparando las constantes de unión de Api-ASB y VO/Api-ASB, se encontró que la unión con el complejo es más fuerte que con el ligando libre. El número de sitios de unión de los compuestos con la ASB cuyos valores se encuentran entre $n= 0,99-1,43$ indican la presencia de un sitio de alta afinidad para la unión con la albúmina. Las constantes de unión obtenidas están en el intervalo intermedio, de modo que no son demasiado bajas para evitar una distribución eficiente y no son tan elevadas como para ocasionar una disminución de la concentración plasmática. Estos datos sugieren que Api y VO/Api pueden ser ligados y transportados por la ASB. Nuestros resultados para K_{sv} , K_a , n y los parámetros termodinámicos (valores negativos de ΔH y ΔS , ver más abajo) están de acuerdo con los datos anteriores reportados para Api (Zhao, 2012). Por otra parte, es importante mencionar que existen discrepancias en la

literatura para la interacción de Api con la ASB, siendo K_{sv} , K_a o los parámetros termodinámicos bastante diferentes entre sí (Shang y Li, 2010; Shi y Cao, 2011; Tang et al., 2014). Como ya se mencionó, estas diferencias se han atribuido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en cada determinación (Tang et al., 2014) (diferencias en las concentraciones de albúmina y flavonoides, fracciones de albúmina y/o medios de disolución: valores de pH y concentraciones de NaCl y Mg^{2+}).

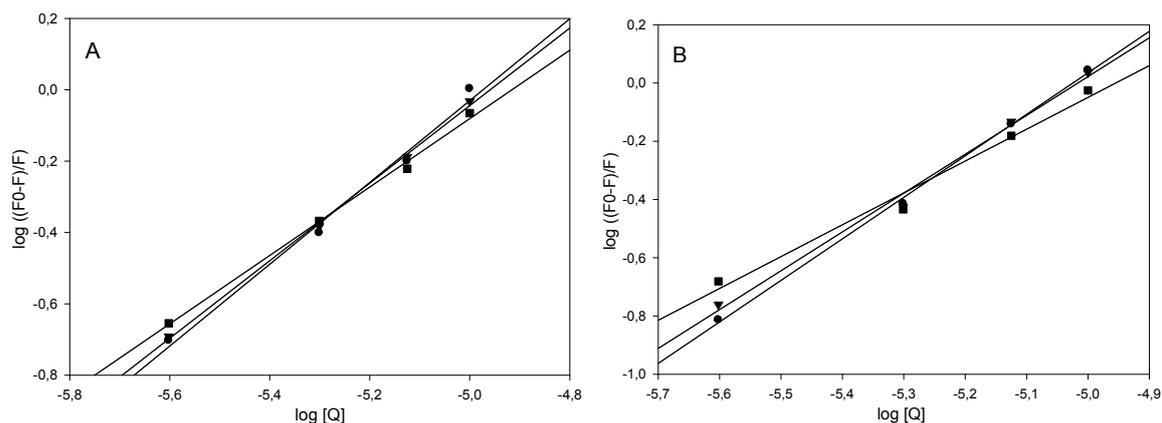


Figura 7.6. Gráfico del $\log ((F_0-F)/F)$ en función del $\log [Q]$ para Apigenina (A) y para el complejo $[VO(Api)(H_2O)_2]Cl$ (B) a diferentes temperaturas ((●), 298 K; (▼), 303 K; (■), 310 K).

Tabla 7.4. Valores de K_a y n para la interacción de unión de Apigenina (Api) y del complejo $[VO(Api)(H_2O)_2]Cl$ (VO/Api) con la ASB a diferentes temperaturas.

Compuesto	T (K)	K_a ($\times 10^5$) ($L mol^{-1}$)	n
Api	298	$5,22 \pm 0,24$	$1,15 \pm 0,01$
	303	$2,50 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,01$
	310	$0,75 \pm 0,33$	$0,99 \pm 0,04$
VO/Api	298	$150,41 \pm 7,59$	$1,43 \pm 0,01$
	303	$51,16 \pm 3,16$	$1,34 \pm 0,01$
	310	$5,88 \pm 4,63$	$1,14 \pm 0,07$

7.3. Parámetros termodinámicos (modo de interacción).

Los parámetros termodinámicos fueron analizados con el fin de caracterizar las fuerzas de interacción involucradas en el proceso de asociación entre albúmina y ambos complejos. Ross

y Subramanian (1981), propusieron que el signo y magnitud de los parámetros termodinámicos están asociados con un tipo particular de interacción que toma lugar en el proceso de asociación a proteínas (véase Tabla 2.1). En una primera etapa, la destrucción de las capas de hidratación de las especies hidratadas aisladas es inducida por interacciones hidrofóbicas. Este proceso se acompaña de valores de ΔS positivos (mayor desorden), y ΔH y ΔG negativos. En la segunda etapa se producen interacciones intermoleculares entre la proteína y el complejo metálico que pueden incluir interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, (dipolo-dipolo, dipolo inducido y el efecto de dispersión de London). Las Interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno están asociadas con valores de ΔS y ΔH negativos, siendo este tipo de interacciones, junto con los procesos de protonación (que pueden estar relacionados con el proceso de asociación) las que generalmente presentan parámetros termodinámicos negativos tan comúnmente encontrados en procesos de asociación a proteínas. Por otro lado, las interacciones de tipo electrostáticas se caracterizan por presentar valores de ΔH pequeños (de cualquier signo) y ΔS positivos. En resumen, las proteínas están involucradas en interacciones hidrofóbicas, pero las interacciones intermoleculares (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, y de van der Waals) desempeñan un papel importante, sino el predominante, en la determinación de los parámetros termodinámicos de la asociación a proteínas. En esencia, los parámetros termodinámicos asociados al primer proceso (destrucción de las capas de hidratación), describen solo la reorganización de la estructura del solvente alrededor de la proteína y de los ligandos hacia un mayor desorden en comparación con las especies hidratadas individualmente. Esta asociación favorable, dirigida entrópicamente, se aplica para moléculas totalmente no-polares, así como a segmentos de las moléculas anfipáticas. La etapa hidrofóbica, sin embargo, es necesaria pero no suficiente para explicar los parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente en la gran mayoría de las reacciones de asociación a proteínas.

Complejo VO/Baic: para inferir el tipo de proceso de interacción entre Baic y VO/Baic con la ASB se determinaron los parámetros termodinámicos, incluyendo cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio de energía libre (ΔG). Como el valor de ΔH no varía significativamente en el rango de temperatura estudiado, entonces su valor y el de ΔS pueden evaluarse a partir de la ecuación de van't Hoff, desarrollada en la sección experimental. Los valores de ΔG se calcularon a partir de los valores de ΔH y ΔS para los dos sistemas estudiados a tres temperaturas. El signo negativo obtenido para ΔG (Tabla 7.5) indica que el

proceso de interacción es espontáneo. El cambio de entalpía negativo sugiere que la unión entre los compuestos y la ASB es exotérmica. Una fuente importante de contribución negativa al ΔH y ΔS surge si se forma un enlace de hidrógeno y además las interacciones que implican electrones deslocalizados de sistemas de anillos aromáticos resultan en contribuciones significativas a su signo negativo. Los valores ΔH y ΔS negativos obtenidos para la interacción de Baic y VO/Baic con la ASB indican que la unión es principalmente impulsada por la entalpía con un factor entrópico desfavorable y por lo tanto durante las interacciones operan fuerzas de enlace de hidrógeno y van der Waals principalmente (Ross y Subramanian, 1981).

Tabla 7.5. Parámetros termodinámicos de la interacción de Baicalina (Baic) y del complejo $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VO/Baic) con la ASB (6 μM) en buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4) a diferentes temperaturas.

Compuesto	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Baic	-104,40	-221,14	-38,84 (298 K)
			-37,74 (303 K)
			-36,20 (310 K)
VO/Baic	-104,44	-214,15	-40,62 (298 K)
			-39,98 (303 K)
			-38,05 (310 K)

Complejo VO/Api: para inferir el tipo de proceso de interacción entre Api y VO/Api con la ASB se estudiaron los parámetros termodinámicos, incluyendo cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio de energía libre (ΔG). Como el ΔH no varía significativamente en el rango de temperatura estudiado, entonces su valor y el de ΔS pueden evaluarse a partir de la ecuación de van't Hoff. El signo negativo obtenido para ΔG (Tabla 7.6) indica un proceso de interacción espontánea. El cambio de entalpía negativo sugiere que la unión entre los compuestos y la ASB es exotérmica. Los valores de ΔH y ΔS negativos obtenidos para la interacción de Api y VO/Api con la ASB indican que la unión es principalmente favorecida por el factor entálpico con un factor entrópico desfavorable y por lo tanto, como para el complejo de VO/Baic, las fuerzas de enlace de hidrógeno y van der Waals desempeñan papeles importantes durante las interacciones (Ross y Subramanian, 1981).

Tabla 7.6. Parámetros termodinámicos de la interacción de Apigenina (Api) y del complejo [VO(Api)(H₂O)₂]Cl (VO/Api) con la ASB (6 μM) en buffer Tris-HCl (0.1 M, pH 7,4) a diferentes temperaturas.

Compuesto	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)
Api	-124,62	-308,46	-32,70 (298 K)
			-31,16 (303 K)
			-29,00 (310 K)
VO/Api	-209,35	-564,15	-41,23 (298 K)
			-38,41 (303 K)
			-34,46 (310 K)

Una interacción entre complejos metálicos y la ASB a menudo conduce a una perturbación de la estructura secundaria de la proteína, interrumpiendo los enlaces disulfuro y conduciendo a una pérdida parcial de la conformación de la hélice α con el despliegue subsiguiente de la proteína, o un cambio en la polaridad del entorno al que están expuestos los residuos de triptófano como resultado de interacciones moleculares (reacciones de estado excitado, reordenamientos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos de estado fundamental o extinción de colisiones) (Topalá et al., 2014). Para el complejo VO/Api, se determinó una interacción de formación de complejo, similar que para los complejos de oxidovanadio(IV) con Baicalina y Luteolina (Naso et al., 2016a) con valores de constantes de unión de orden de magnitud similares ($13,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $79,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Además, se determinó que la unión reversible se produce a través de uno de los sitios de alta afinidad de la albúmina ($n= 1,5-1,3$) (Kragh-Hansen et al., 2002).

7.3. Conclusiones preliminares

La interacción de los complejos VO/Baic y VO/Api con la ASB se produce de manera espontánea y al mismo tiempo reversible. Los resultados sugieren que los compuestos podrían ser ligados y transportados por la ASB interactuando mediante la formación de complejos a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. En este contexto, los complejos VO/Baic y VO/Api serían transportados por la ASB hasta el sitio de acción en el que van a ejercer su actividad farmacológica (antioxidante, antitumoral, etc).

Este estudio, sumado a los estudios de toxicidad permite una aproximación al diseño de fármacos (*drug discovery*) con la finalidad que sean seguros y posean una biodisponibilidad adecuada.

Capítulo 8: Conclusiones y perspectivas

Como ya se mencionó en el capítulo introductorio, la Química Bioinorgánica constituye la intersección entre la Química Inorgánica y la Bioquímica. Se sabe que los elementos inorgánicos (incluidos los iones metálicos y los compuestos de coordinación) son necesarios para la vida en muchos organismos, ya que funcionan en el transporte de moléculas y son un componente clave de las enzimas. Además, la coordinación de moléculas orgánicas con metales permite potenciar las propiedades biológicas de las mismas. En este contexto, se decidió sintetizar y caracterizar complejos de coordinación para estudiar sus propiedades biológicas y toxicológicas en el marco de este trabajo de tesis doctoral. A continuación se presenta una reseña de las principales conclusiones arribadas luego del estudio de la química bioinorgánica de los compuestos sintetizados y una breve descripción de las futuras líneas de investigación que se desprenden de esta tesis.

En concordancia con los objetivos propuestos en el plan de tesis, se sintetizaron tres complejos de coordinación nuevos (VO/Baic, VO/Api y Cu/5-HTP). Los mismos se caracterizaron experimentalmente como $\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Baic})_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $[\text{VO}(\text{Api})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$ y $[\text{Cu}(5\text{-HTP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$. La optimización de los complejos empleando herramientas del DFT sugiere que el complejo VO/Baic es un complejo pentacoordinado con geometría piramidal cuadrada $\text{VO}(\text{O}_4)$, el VO/Api es un complejo pentacoordinado con geometría piramidal cuadrada distorsionada $\text{VO}(\text{O}_4)$ y que el conformero más estable del Cu/5HTP tiene una geometría cuadrado-plana CuN_2O_2 con una disposición *trans* de los aminoácidos en el plano ecuatorial. Las geometrías optimizadas de los mismos concuerdan con las esferas de coordinación propuestas teniendo en cuenta la caracterización estructural realizada por métodos químicos y fisicoquímicos.

La determinación de las propiedades biológicas *in vitro* de las moléculas nuevas y el estudio de su perfil toxicológico constituyen los pilares fundamentales del descubrimiento de fármacos (*drug discovery*). En este sentido, se estudiaron las características biológicas y toxicológicas de los complejos sintetizados. Los complejos en estudio mostraron buenas propiedades antioxidantes en ensayos *in vitro* con el siguiente orden de actividad $\text{Cu/5-HTP} > \text{VO/Baic} > \text{VO/Api}$. En todos los casos la complejación con el metal mejoró las propiedades antioxidantes del ligando libre. En lo que respecta a las demás propiedades biológicas, el complejo Cu/5-HTP fue el único que mostró actividad antimicrobiana moderada (frente a *S. aureus* ATCC

25923 y *E. faecalis* ATCC 29212). Asimismo, este complejo fue el único que mostró una fuerte actividad inhibitoria de la enzima fosfatasa alcalina, mucho mayor que las actividades medidas para el ligando y el metal libre. Los estudios toxicológicos indican que los complejos sintetizados son seguros ya que no mostraron toxicidad aguda ni genotoxicidad. Estos hallazgos permiten concluir que la complejación mejora las propiedades biológicas de los mismos permitiendo la obtención de nuevas moléculas farmacológicamente activas.

Existen numerosos reportes sobre complejos de iones metálicos que ejercen efectos inhibitorios a nivel de la promoción del tumor. Los complejos de coordinación sintetizados durante este trabajo de tesis doctoral mostraron actividad antitumoral frente a las líneas de cáncer ensayadas. La complejación mejoró la actividad antitumoral de los ligandos (efecto sinérgico). La disminución en la viabilidad celular y los cambios morfológicos observados ponen en evidencia la actividad antitumoral de los complejos sintetizados. En líneas generales la actividad es dependiente de la dosis de los compuestos y del tiempo de incubación. Los resultados de los ensayos de generación intracelular de ROS (con y sin agregado de los agentes antioxidantes) sugieren que el mecanismo de acción antitumoral en todos los casos está asociado al estrés oxidativo generado por el agregado de los compuestos, los que mostraron actividad pro-oxidante en las células tumorales. Estos hallazgos sugieren que los complejos sintetizados podrían ser candidatos para el tratamiento del cáncer.

Además de las propiedades biológicas y toxicológicas, es necesario estudiar la biodisponibilidad de las moléculas nuevas. Como la albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo e interviene en el transporte y disposición de fármacos, se estudió la interacción de los complejos VO/Baic y VO/Api con la ASB. Dicha interacción se produce de manera espontánea y al mismo tiempo reversible indicando que los dos complejos podrían ser transportados por la ASB hasta el sitio de acción en el que van a ejercer su actividad farmacológica (antioxidante, antitumoral, etc). Para el complejo de Cu/5-HTP no pudo medirse la interacción por técnicas fluorométricas debido a la interferencia que el espectro de fluorescencia del ligando produce sobre la banda característica de la albúmina.

Tomados en conjunto, los resultados indican que la modificación estructural de compuestos antioxidantes por complejación con iones metálicos de transición resultó en la generación de candidatos prometedores como nuevos agentes con potencial actividad anticancerígena. Los aportes al conocimiento científico de la química bioinorgánica generados durante el desarrollo de esta tesis doctoral pueden dar lugar a nuevas líneas de investigación.

Durante el transcurso de mi etapa doctoral fue un avance importante, desde el punto de vista de mi formación, la incorporación de la realización de cálculos teóricos con las metodologías mencionadas. En ese contexto nos focalizamos en las simulaciones de los espectros vibracionales. Sin embargo pensamos que en un futuro y dada las potencialidades de las simulaciones teóricas actuales, implementar las simulaciones tanto de los espectros vibracionales como la de los de resonancia paramagnética electrónica, nos permitirá tener una visión más integral de la correlación de lo teórico con lo experimental.

Desde el punto de vista de lo experimental, se pretende ampliar los conocimientos del grupo de investigación en el campo de la toxicología e incursionar en un futuro en estudios toxicológicos con modelos alternativos al uso de animales, tales como *Caenorhabditis elegans* y/o *Tenebrio molitor*. Ambos modelos son de un costo relativamente bajo comparado con métodos en animales o con otros métodos alternativos y brindan información respecto de la toxicidad de moléculas nuevas, además de servir como modelos de infección en estudios parásito-hospedero.

Capítulo 9: Bibliografía

- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., Lalaoui, K. (2009). *Antibacterial Activity And Acute Toxicity Effect of Flavonoids Extracted From Mentha longifolia*. Am-Euras. J. Sci. Res. 4, 93-96.
- Albert, A., Serjeant, E.P. (1984). *The Determination of Ionization Constants*. Capítulo 9, páginas 136-175. Netherlands: Springer.
- Alomar, K., Landreau, A., Allain, M., Bouet, G., Larcher, G. (2013). *Synthesis, structure and antifungal activity of thiophene-2,3-dicarboxaldehyde bis(thiosemicarbazone) and nickel(II), copper(II) and cadmium(II) complexes: unsymmetrical coordination mode of nickel complex*. J. Inorg. Biochem. 126, 76-83.
- Amat, A., De Angelis, F., Sgamellottia, A., Fantacci, S. (2008). *Theoretical investigation of the structural and electronic properties of luteolin, apigenin and their deprotonated species*. J. Mol. Struc. THEOCHEM 868, 12-21.
- Amić, D., Lučić, B. (2010). *Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids*. Bioorg. Med. Chem. 18, 28-35.
- Ando, R., Nagai, M., Yagyu, T., Maeda, M. (2003). *Composition and geometry of oxovanadium(IV) and (V)-aminoethanol-Schiff base complexes and stability of their peroxo complexes in solution*. Inorg. Chim. Acta 351, 107-113.
- Anjaneyulu, Y., Rao, R.P. (1986). *Preparation, characterization and antimicrobial activity studies on some ternary complexes of Cu(II) with acetylacetone and various salicylic acids*. Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem. 16, 257-272.
- Bacchi, A., Carcelli, M., Pelagatti, P., Pelizzi, C., Pelizzi, G., Zani, F. (1999). *Antimicrobial and mutagenic activity of some carbon- and thiocarbonohydrazone ligands and their copper(II), iron(II) and zinc(II) complexes*. J. Inorg. Biochem. 75 123-133.
- Banik, B., Sasmal, P.K., Roy, S., Majumdar, R., Dighe, R.R., Chakravarty, A.R. (2011). *Terpyridine Oxovanadium(IV) complexes of phenanthroline bases for cellular imaging and photocytotoxicity in HeLa cells*. Eur. J. Inorg. Chem. 2011, 1425-1435.
- Baran, E.J. (1995). *Química Bioinorgánica*. España: McGraw Hill.
- Baran, E.J. (2000). *Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems*. J. Inorg. Biochem. 80, 1-10.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J.A., Cobianchi, R.C. (1999). *Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses*. Phytochemistry 52, 1479-1482.
- Becke, A.D. (1993). *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. J. Chem. Phys. 98, 5648-5652.

- Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., Gadhi, C.A. (2007). *Antibacterial activity of Quercus ilex bark's extracts*. J. Ethnopharmacol. 112, 426-429.
- Bhunya, S.P., Jena, G.B. (1996). *Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo test system*. Mutat. Res. 367, 57-63.
- Bi, S., Yan, L., Pang, B., Wang, Y. (2012). *Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique*. J. Lumin. 132, 132-140.
- Bradford, M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Cao, X., Fischer, G. (1999). *Infrared Spectral, Structural, and Conformational Studies of Zwitterionic L-Tryptophan*. J. Phys. Chem. A, 103, 9995-10003.
- Carcelli, M., Mazza, P., Pelizzi, C., Pelizzi, G., Zani, F. (1995). *Antimicrobial and genotoxic activity of 2,6-diacetylpyridine bis(acylhydrazones) and their complexes with some first transition series metal ions. X-ray crystal structure of a dinuclear copper(II) complex*. J. Inorg. Biochem. 57, 43-62.
- Carter, W.O., Narayanan, P.K., Robinson, J.P. (1994). *Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells*. J. Leukocyte Biol. 55, 253-258.
- Cass, A.E., Hill, H.A. (1980). *Copper proteins and copper enzymes*. Ciba Found. Symp. 79, 71-91.
- Chana, F.L., Choia, H.L., Chenb, Z.Y., Chanc, P.S.F., Huang, Y. (2000). *Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin*. Cancer Lett. 160, 219-228.
- Chandraleka, S., Ramya, K., Chandramohan, G., Dhanasekaran, D., Priyadharshini, A., Panneerselvam, A. (2011). *Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens*. J. Saudi Chem. Soc. 18, 953-962.
- Chasteen, N.D. (1981). *Vanadyl(IV) spin probes, inorganic and biochemical aspects*. En: Berliner, L.J., Reuben, J. (eds) Biological magnetic resonance, Plenum, New York.
- Chen, W., Kuo, T., Tzeng, Y., Tsai, Y. (2012). *Baicalin Induces Apoptosis in SW620 Human Colorectal Carcinoma Cells in Vitro and Suppresses Tumor Growth in Vivo*. Molecules 17, 3844-3857.
- Chen, Z.; Liang, H., Liu, Y. (2012). *Traditional Chinese Medicine Active Ingredient-Metal Based Anticancer Agents*. En: Recent Advances in Theories and Practice of Chinese Medicine. Capítulo 22. Prof. Haixue Kuang (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/29125.
- Cheng, F., Lu, Y., Zhong, X., Song, W., Wang, X., Sun, X., Qin, J., Guo, S., Wang, Q. (2013). *Baicalin's Therapeutic Time Window of Neuroprotection during Transient Focal Cerebral Ischemia and Its Antioxidative Effects In Vitro and In Vivo*. Evid. Based Complementary Altern. Med. 2013, 1-11.

- Cheng, Z.Y., Tian, X., Gao, J., Li, H.M., Jia, L.J., Qiao, H.L. (2014). *Contribution of Baicalin on the Plasma Protein Binding Displacement and CYP3A Activity Inhibition to the Pharmacokinetic Changes of Nifedipine in Rats In Vivo and In Vitro*. PLoS ONE 9, 1-8.
- Chohan, Z., Shad, H.A., Youssoufi, M.H., Hadda, T.B. (2010). *Some new biologically active metal-based sulfonamide*. Europ. J. Med. Chem. 45, 2893-2901.
- Chohan, Z.H., Sumrra, S.H., Youssoufi, M.H., Hadda, T.B. (2010). *Metal based biologically active compounds: design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes*. Eur. J. Med. Chem. 45, 2739-2747.
- Choudhury, D., Ganguli, A., Ghosh Dastidar, D., Acharya, B.R., Das, A., Chakrabarti, G. (2013). *Apigenin shows synergistic anticancer activity with curcumin by binding at different sites of tubulin*. Biochimie 5, 1297-1309.
- Cody, V., Luft, J.R. (1994). *Conformational analysis of flavonoids: crystal and molecular structures of morin hydrate and myricetin (1:2) triphenylphosphine oxide complex*. J. Mol. Struct. 317, 89-97.
- Coimbra Diniz, T., Cabral Silva, J., Gomes de Lima-Saraiva, S.R., Pires Rodrigues de Almeida Ribeiro, F., Gomes Marques Pacheco, A., Mendes de Freitas, R., Quintans-Júnior, L.J., de Souza Siqueira Quintans, J., Mendes, R.L., Guedes da Silva Almeida, J.R. (2015). *The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy*. Oxid. Med. Cell. Long. 2015, 1-9.
- Conry, R.C. (2005). En: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (Second Edition). Prof. R. Bruce King (Ed.).
- Corredor, C., Teslova, T., Vega Cañamares, M., Chen, Z., Zhang, J., Lombardi, J.R., Leona, M. (2009). *Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin*. Vib. Spectrosc. 49, 190-195.
- Costa Pessoa, J. (2015). *Thirty years through vanadium chemistry*. J. Inorg. Biochem. 147, 4-24.
- Cotton, F.A., Wilkinson, G. (1988). *Advanced Inorganic Chemistry*. Quinta edición. New York.
- Crans, D.C. (2015). *Antidiabetic, Chemical, and Physical Properties of Organic Vanadates as Presumed Transition-State Inhibitors for Phosphatases*. J. Org. Chem. 80, 11899-11915.
- Crans, D.C., Chatterjee, P.B. (2013). 3.13 - *Vanadium Biochemistry*. En: *Comprehensive Inorganic Chemistry II* (Second Edition), Jan Reedijk y Kenneth Poeppelmeier (Eds.), Amsterdam: Elsevier, páginas 323-342.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). *Antimicrobial activity of flavonoids*. Int. J. Antimicrob. Agents 26, 343-356.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2011). *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 99-107.
- Cushnie, T.P.T., Hamilton, V.E.S., Lamb, A.J. (2003). *Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports*. Microbiol. Res. 158, 281-289.

- Dai, Q., Lei, X., Yang, J., Cheng, Q., Gao, C., Li, H. (2009). *Crystal Structure of Baicalin*. Acta Chim. Sinica 67, 2363-2367.
- Dalecki, A.G., Crawford, C.L., Wolschendorf, F. (2017). *Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications*. Adv. Microb. Physiol. 70, 193-260.
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R. (2012). *Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria*. Exp. Biol. Med. 237, 1433-1448.
- Deacon, G.B., Phillips, R.J. (1980). *Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination*. Coord. Chem. Rev. 33, 227-250.
- Delaney, B., Phillips, K., Vasquez, C., Wilson, A., Cox, D., Wang, H-B., Manthey, J. (2002). *Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones*. Food Chem. Toxicol. 40, 617-624.
- Denizot, F., Lang, R. (1986). *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J. Immunol. Methods 89, 271-277.
- Dodge, R.P., Templeton, D.H., Zalkin, A. (1961). *Crystal Structure of Vanadyl Bisacetylacetonate. Geometry of Vanadium in Fivefold Coordination*. J. Chem. Phys. 35, 55-67.
- Doke, S.K., Dhawale, S.C. (2015). *Alternatives to animal testing: A review*. Saudi Pharm. J. 23, 223-229.
- Dolcino, M., Zoratti, A., Debbia, E.A., Schito, G.C., Marchese, A. (2002). *Postantibiotic effect and delay of regrowth in strains carrying mutations that save proteins or RNA*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 4022-4025.
- Dou, J., Chen, L., Xu, G., Zhang, L., Zhou, H., Wang, H., Su, Z., Ke, M., Guo, Q., Zhou, C. (2011). *Effects of baicalein on Sendai virus in vivo are linked to serum baicalin and its inhibition of hemagglutinin-neuraminidase*. Arch. Virol. 156, 793-801.
- Duff, B., Thangella, V.R., Creaven, B.S., Walsh, M., Egan, D.A. (2012). *Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells*. Eur. J. Pharmacol. 689, 45-55.
- El-Gamel, N.E.A., Zayed, M. (2011). *Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 82, 414-423.
- Ellepola, A.N.B. (2012). *Amphotericin B-Induced in vitro Postantifungal Effect on Candida Species of Oral Origin*. Med. Princ. Pract. 21, 442-446.
- Etcheverry, S.B., Williams, P.A.M. (2009). *New developments in medicinal chemistry*. En: Medicinal Chemistry of Copper and Vanadium Bioactive Compounds. Ortega y Gil (Eds.), Nova Science, Hauppauge, páginas 105-129.

- Etcheverry, S.B., Di Virgilio, A.L., Nascimento, O.R., Williams, P.A.M. (2012). *Dinuclear copper(II) complexes with valsartan. Synthesis, characterization and cytotoxicity*. J. Inorg. Biochem. 107, 25-33.
- Etcheverry, S.B., Williams, P.A.M., Baran, E.J. (1997). *Synthesis and characterization of oxovanadium(IV) complexes with saccharides*. Carbohydr. Res. 302, 131-138.
- Fatfat, M., Merhi, R.A., Rahal, O., Stoyanovsky, D., Zaki, A., Haidar, H., Kagan, V.E., Gali-Muhtasib, H., Machaca, K. (2014). *Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species*. BMC Cancer 14, 527-539.
- Favaro, G., Clementi, C., Romani, A., Vickackaite, V. (2007). *Acidochromism and Ionochromism of Luteolin and Apigenin, the Main Components of the Naturally Occurring Yellow Weld: A Spectrophotometric and Fluorimetric Study*. J. Fluoresc. 17, 707-714.
- Ferraz, K.O., Wardell, S.M.S.V., Wardell, J.L., Louro, S.R.W., Beraldo, H. (2009). *Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Spectral studies and toxicity against Artemia salina*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 73, 140-145.
- Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2011). *Modification of flavonoid structure by oxovanadium(IV) complexation. Biological effects*. En: Handbook on flavonoids: Dietary Sources, Properties and Health Benefits. Editors: K. Yamane, Y. Kato. Nova science publishers, inc, New York. Cap III, 145-190.
- Ferrer, E.G., Salinas, M.V., Correa, M.J., Naso, L., Barrio, D.A., Etcheverry, S.B., Lezama, L., Rojo, T., Williams, P.A.M. (2006). *Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes*. J. Biol. Inorg. Chem. 11, 791-801.
- Ferrer, E.G., Williams, P.A.M., Baran, E.J. (1993). *The interaction of the VO²⁺ cation with oxidized glutathione*. J. Inorg. Biochem. 50, 253-262.
- Festa, R.A., Thiele, D.J. (2011). *Copper: an essential metal in biology*. Curr. Biol. 21, R877- R883.
- Frías González, S.E., Angeles Anguiano, E., Mendoza Herrera, A., Escutia Calzada, D., Ordaz Pichardo, C. (2013). *Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer*. Toxicology. 314, 155-165.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T.,x Honda, T., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P. Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, O., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J. (2010). Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

- Gajbhiye, S.N., Hirota, R. (1990). *Toxicity of heavy metals to brine shrimp Artemia*. J. Indian Fish. Assoc. 20, 43-50.
- Gao, J., Morgan, W.A., Sanchez-Medina, A., Corcoran, O. (2011). *The ethanol extract of Scutellaria baicalensis and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 254, 221-228.
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. (1999). *Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi*. Biochim. Biophys. Acta 1472, 643-50.
- García, G. B. (2006). *El vanadio, un elemento ambiguo*. Acta Toxicol. Argent. 14, 32-36.
- Garribba, E., Lodyga-Chruscinska, E., Sanna, D., Micera, G. (2001). *Oxovanadium(IV) binding to ligands containing donor sites of biological relevance*. Inorg. Chim. Acta 322, 87-98.
- Geary, W.J. (1971). *The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds*. Coord. Chem. Rev. 7, 81-122.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., De Biasi, S., Roat, E., Bertocelli, L., Cossarizza, A. (2010). *Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin*. Cancers 2, 1288-1311.
- Groden, J., Joslyn, G., Samowitz, W., Jones, D., Bhattacharyya, N., Spirio, L., Thilveris, A., Robertson, M., Egan, S., Meuth, M., White, R. (1995). *Response of Colon Cancer Cell Lines to the Introduction of APC, a Colon-specific Tumor Suppressor Gene*. Cancer Res. 55, 1531-1539.
- Guo, C., Chen, X., Xiong, P. (2014). *Baicalin suppresses iron accumulation after substantia nigra injury: relationship between iron concentration and transferrin expression*. Neural Regen. Res. 9, 630-636.
- Guo, M., Wu, Z., Wang, C., Gao, X. (2014). *Synthesis and anti-tumor activity of baicalin-metal complex*. Acta Pharm. Sin. 49, 337-345.
- Hakimi, M., Aliabadi, T.S. (2012). *Coordination Chemistry of Copper α - Amino Acid Complexes*. World Applied Programming 2, 431-443.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Aruoma, O. (1987). *The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals*. Anal. Biochem. 165, 215-219.
- Hapner, C.D., Deuster, P., Chen, Y. (2010). *Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants*. Chem. Biol. Interact. 186, 275-279.
- Hara, R., Kino, K. (2013). *Enhanced synthesis of 5-hydroxy-L-tryptophan through tetrahydropterin regeneration*. AMB Express 3, 1-7.

- Harrison, M.E., Power Coombs, M.R., Delaney, L.M., Hoskin, D.W. (2014). *Exposure of breast cancer cells to a subcytotoxic dose of apigenin causes growth inhibition, oxidative stress, and hypophosphorylation of Akt*. *Exp. Mol. Pathol.* 97, 211-217.
- Harrowfield, J.M. (2005). *Biological coordination chemistry, a confluence of chemistry and biochemistry*. *C. R. Chim.* 8, 199-210.
- Havsteen, B.H. (2002). *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacol. Ther.* 96, 67-202.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584.
- Hissin, P.J., Hilf, R. (1976). *A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues*. *Anal. Biochem.* 74, 214-226.
- Hohenberg, P., Kohn, W. (1964). *Inhomogeneous Electron Gas*. *Phys. Rev.* 136, B864-B871.
- Hosmane, N.S. (2017). *Capítulo 12 - Bioinorganic Chemistry and Applications*. En: *Advanced Inorganic Chemistry*, Academic Press, Boston.
- Huang, W.Y., Majumder, K., Wu, J. (2010). *Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals*. *Food Chem.* 123, 635-641.
- Huang, Y., Tsang, S.Y., Yao, X., Chen, Z.Y. (2005). *Biological Properties of Baicalein in Cardiovascular System*. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 5, 177-184.
- Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B., Philpott, K.L. (2011). *Principles of early drug discovery*. *Br J Pharmacol.* 162, 1239-1249.
- Ibrahim, M., Wang, F., Lou, M., Xie, G., Li, B., Bo, Z., Zhang, G., Liu, H.A., Wareth, A. (2011). *Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant Burkholderia cepacia complex bacteria*. *J. Biosc. Bioeng.* 112, 570-576.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T. (2000). *Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines*. *Urology* 55, 951-955.
- Islas, M. S., Naso, L.G., Lezama, L., Valcarcel, M., Salado, C., Roura-Ferrer, M., Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2015). *Insights into the mechanisms underlying the antitumor activity of an oxidovanadium(IV) compound with the antioxidant naringenin. Albumin binding studies*. *J. Inorg. Biochem.* 149, 12-24.
- Islas, M.S., Rojo, T., Lezama, L., Griera Merino, M., Cortes, M.A., Rodriguez Puyol, M., Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2013). *Improvement of the antihypertensive capacity of candesartan and trityl candesartan by their SOD mimetic copper(II) complexes*. *J. Inorg. Biochem.* 123, 23-33.

- Itri, R., Caetano, W., Barbosa, L.R.S., Baptista, M.S. (2004). *Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism*. Braz. J. Phys. 34, 58-63.
- Ituen, E., Akaranta, O., James, A. (2017). *Electrochemical and anticorrosion properties of 5-hydroxytryptophan on mild steel in a simulated well-acidizing fluid*. J. Taibah Univ. Sci. 11, 788-800.
- Jamróz, M.H. *Vibrational Energy Distribution Analysis, VEDA 4.0 Program*. Warsaw, 2004-2010.
- Janisch, K.M., Milde, J., Schempp, H., Elstner, E.F. (2005). *Vitamin C, Vitamin E and Flavonoids*. Basic Clin. Res. 38, 59-69.
- Joseph, J.J., Nagashri, K., Janaki, G.B. (2012). *Novel metal based anti-tuberculosis agent: synthesis, characterization, catalytic and pharmacological activities of copper complexes*. Eur. J. Med. Chem. 49, 151-163.
- Kachadouriana, R., Day, B.J. (2006). *Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment*. Free Radic. Biol. Med. 41, 65-76
- Kasprzak, M.M., Erxleben, A., Ochocki, J. (2015). *Properties and applications of flavonoid metal complexes*. RSC Adv. 5, 45853-45877.
- Khalid, H., Hanif, M., Hashmi, M.A., Mahmood, T., Ayub, K., Monim-ul-Mehboob, M. (2013). *Copper Complexes of Bioactive Ligands with Superoxide Dismutase Activity*. Mini. Rev. Med. Chem. 13, 1944-1956.
- Kim, A.R., Kim, S.N., Jung, I.K., Kim, H.H., Park, Y.H., Park, W.S. (2014). *The Inhibitory Effect of Scutellaria baicalensis Extract and Its Active Compound, Baicalin, on the Translocation of the Androgen Receptor with Implications for Preventing Androgenetic Alopecia*. Planta Med. 80, 153-158.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010). *Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts*. J. Microbiol. Meth. 81, 121-126.
- Kohn, W., Sham, L.J. (1965). *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Phys. Rev. 140, A1133-A1138.
- Kokkali, V., Katramados, I., Newman, J.D. (2011). *Monitoring the Effect of Metal Ions on the Mobility of Artemia salina Nauplii*. Biosensors 1, 36-45.
- Koyambo-Konzapa, S.J., Minguirbara, A., Nsangou, M. (2015). *Solvent effects on the structures and vibrational features of zwitterionic dipeptides: L-diglycine and L-dialanine*. J. Mol. Model. 21, 1-12.
- Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T.G., Otagiri, M. (2002). *Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin*. Biol. Pharm. Bull. 25, 695-704.

- Krakowiaka, J., Lundberg, D., Persson, I. (2012). *A coordination chemistry study of hydrated and solvated cationic vanadium ions in oxidation states +III, +IV, and +V in solution and solid state*. Inorg. Chem. 51, 9598-9609.
- Krishnan, R., Binkley, J.S., Seeger, R., Pople, J.A. (1980). *Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions*. J. Chem. Phys. 72, 650-654.
- Kumagai, T., Müller, C.I., Desmond, J.C., Imai, Y., Heber, D., Koeffler, H.P. (2007). *Scutellaria baicalensis, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines*. Leuk. Res. 31, 523-530.
- Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. ScientificWorldJournal. 2013, 1-16.
- Kuo, C.C., Shih, M., Kuo, Y., Chiang, W. (2001). *Antagonism of Free-Radical-Induced Damage of Adlay Seed and Its Antiproliferative Effect in Human Histolytic Lymphoma U937 Monocytic Cells*. J. Agric. Food Chem. 49, 1654-1570.
- Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., Iglesias Buela, L. (2001). *Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts*. Phytomedicine 8, 395-400.
- Lakowicz, J.R. (2013). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Laury, M.L.; Carlson, M.J., Wilson, A.K. (2012). *Vibrational frequency scale factors for density functional theory and the polarization consistent basis sets*. J. Comput. Chem. 33, 2380-2387.
- Lee, S.H., Ryu, J.K., Lee, K.Y., Woo, S.M., Park, J.K., Yoo, J.W., Kim, Y.T., Yoon, Y.B. (2008). *Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer*. Cancer Lett. 259, 39-49.
- Lewan, L., Andersson, M., Morales-Gomez, P. (1992). *Use of Artemia salina in toxicity testing*. Altern. Lab. Anim. 20, 297-301.
- Li, H., Li, L., Jiang, J., Lin, Z., Luo, Y. (2015). *Theoretical spectroscopic studies on chemical and electronic structures of arginylglycine*. Phys. Chem. Chem. Phys. 17, 24754-24760.
- Li, M., Ding, W., Baruah, B., Crans, D.C., Wang, R. (2008). *Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis(maltolato)oxovanadium (IV)*. J. Inorg. Biochem. 102, 1846-1853.
- Li, Z., Hua, X., Wang, Y., Fang, J. (2009). *Apigenin inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells through Id1*. FEBS Lett. 583, 1999-2003.
- Li, Z., Shi, J., Liu, Q., He, X. (2013). Chinese Patent, PCT/CN2012/072601.
- Liang, R., Han, R., Fu, L.M., Ai, X.C., Zhang, J.P., Skibsted, L.H. (2009). *Baicalin in Radical Scavenging and Its Synergistic Effect with β -Carotene in Antilipoxidation*. J. Agric. Food Chem. 57, 7118-7124.

- Liu, P., Han, F., Duan, B., Deng, T., Hou, X., Zhao, M. (2013). *Purification and antioxidant activities of baicalin isolated from the root of huangqin (Scutellaria baicalensis gorsii)*. J. Food Sci. Technol. 50, 615-619.
- Liu, R., Zhang, H., Yuan, M., Zhou, J., Tu, Q., Liu, J., Wang, J. (2013). *Synthesis and Biological Evaluation of Apigenin Derivatives as Antibacterial and Antiproliferative Agents*. Molecules 18, 11496-11511.
- Liu, Y., He, X., Liu, X., Zuo, H., Li, Z., Wu, Z., Xiang, C., Lai, X. (2012). *Synthesis of baicalin-copper and baicalin-aluminium complex and its bioactivity*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 37, 1296-1302.
- Looker, J.H., Hanneman, W.W. (1962). *Physical and Chemical Properties of Hydroxyflavones. I. Infrared Absorption Spectra of Monohydroxyflavones and Their O-Methyl and O-Acetyl Derivatives^{1,2}*. J. Org. Chem. 27, 381-389.
- Lu, H., Chie, Y., Yang, M., Lee, C., Fu, J., Yang, J., Tan, T., Wu, S., Ma, Y., Ip, M., Chung, J. (2010). *Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway*. Int. J. Oncol. 36, 1477-1484.
- Lu, H., Hsueh, S., Ho, Y., Kao, M., Yang, J., Chiu, T., Huang, S., Lin, C., Chung, J. (2007). *ROS mediates baicalin-induced apoptosis in human promyelotic leukemia HL-60 cells through the expression of the Gadd153 and mitochondrial-dependent pathway*. Anticancer Res. 27, 117-126.
- Lysek, N., Kinscherf, R., Claus, R., Lindel, T. (2003). *L-5-Hydroxytryptophan: Antioxidant and Anti-Apoptotic Principle of the Intertidal Sponge Hymeniacidon heliophila*. Z. Naturforsch. C. 58, 568-572.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L. (2008). *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Anal. Chim. Acta 613, 1-19.
- Mahdi, A.A. (2002). *Free radicals and other antioxidants*. In: Singh, S.P. (ed). A Textbook of Biochemistry. New Delhi, CBS, 3rd ed., pp. 545-555.
- Majewska, M., Skrzycki, M., Podsiad, M.G., Czeczot, H. (2011). *Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: An In vitro Study*. Acta Pol. Pharm. Drug Res. 68, 611-615.
- Maret, W. (2016). *The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures*. Int. J. Mol. Sci. 17, 1-8.
- Mariappan, G., Sundaraganesan, N., Manoharan, S. (2012). *The spectroscopic properties of anticancer drug Apigenin investigated by using DFT calculations, FT-IR, FT-Raman and NMR analysis*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 95, 86-99.
- Marković, Z.S., Dimitrić-Marković, J.M., Milenković, D., Filipović, N. (2011). *Structural and electronic features of baicalein and its radicals*. Monatsh. Chem. 142, 145-152.
- Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutat. Res. 113, 173-215.

- Martin, C.J. (1995). *Reaction of the coordinate complexes of inositol hexaphosphate with first row transition series cations and Cd(II) with calf intestinal alkaline phosphatase*. J. Inorg. Biochem. 58, 89-107.
- Martin, C.J., Evans. W.J. (1991). *Reversible inhibition of intestinal alkaline phosphatase by inositol hexaphosphate and its Cu(II) coordinate complexes*. J. Inorg. Biochem. 3, 177-184.
- Martínez Medina, J.J., Islas, M.S., López Tévez, L.L, Ferrer, E.G. Okulik, N.B., Williams P.A.M. (2014). *Copper(II) complexes with cyanoguanidine and o-phenanthroline: Theoretical studies, in vitro antimicrobial activity and alkaline phosphatase inhibitory effect*. J. Mol. Struct. 1058, 298-307.
- Martínez Medina, J.J., Naso, L.G., Pérez, A.L., Rizzi, A., Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2017). *Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium(IV) complex*. J. Inorg. Biochem. 166, 150-161.
- Martínez-Ramos, I., Maya-Mendoza, A., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A. (2005). *Global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus*. J. Cell. Biochem. 96, 79-88.
- Martini, N., Parente, J.E., Toledo, M.E., Escudero, G.E., Laino, C.H., Martínez Medina, J.J., Echeverría, G.A., Piro, O.E., Lezama, L., Williams, P.A.M., Ferrer, E.G. (2017). *Evidence of promising biological-pharmacological activities of the sertraline-based copper complex: (SerH₂)₂[CuCl₄]*. J. Inorg. Biochem. 174, 76-89.
- Masella, B.R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*. J. Nutr. Biochem. 16, 577-586.
- Merrick, J.P., Moran, D., Radom, L. (2007). *An Evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors*. J. Phys. Chem. A 111, 11683-11700.
- Micera, G., Garribba, E. (2012). *The effect of the functional, basis set, and solvent in the simulation of the geometry and spectroscopic properties of V^{IV}O²⁺ complexes. chemical and biological applications*. Int. J. Quantum Chem. 112, 2486-2498.
- Minenkov, Y., Singstad, Å., Occhipinti, G., Jensen, V. R. (2012). *The accuracy of DFT-optimized geometries of functional transition metal compounds: a validation study of catalysts for olefin metathesis and other reactions in the homogeneous phase*. Dalton Trans. 41, 5526-5541.
- Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S. (2006). *A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (Artemia salina)*. Pharmacologyonline 3, 633-638.
- Moon, J.K., Shibamoto, T. (2009). *Antioxidant assays for plant and food components*. J. Agric. Food Chem. 57, 1655-1666.
- Moorhouse, P.C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G., Guttetidge, J.M.C. (1987). *Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers*. FEBS Lett. 213, 23-28.

- Moriyama, Y., Ohta, D., Hachiya, K., Mitsui, Y., Takeda, K. (1996). *Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins*. J. Protein. Chem. 15, 265-272.
- Mosmann, T. (1983). *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. J. Immunol. Methods 65, 55-63.
- Naso, L.G., Ferrer, E.G., Lezama, L., Rojo, T., Etcheverry, S.B., Williams, P.A.M. (2010). *Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: relationship with the radical scavenger activity*. J. Biol. Inorg. Chem. 15, 889-902.
- Naso, L.G., Lezama, L., Rojo, T., Etcheverry, S.B., Valcarcel, M., Roura, M., Salado, C., Ferrer, E.G., Williams P.A.M. (2013). *Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antioxidant and specific anticancer agents*. Chem-Biol. Interact. 206, 289-301.
- Naso, L.G., Lezama, L., Valcarcel, M., Salado, C., Villacé, P., Kortazar, D., Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2016a). *Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium(IV) complex with luteolin*. J. Inorg. Biochem. 157, 80-93.
- Naso, L.G., Martínez, V.R., Lezama, L., Salado, C., Valcarcel, M., Ferrer, E.G., Williams, P.A.M. (2016b). *Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium(IV) complex. Interactions with bovine serum albumin*. Bioorg. Med. Chem. 24, 4108-4119.
- Nayak, M.K., Agrawal, A.S., Bose, S., Naskar, S., Bhowmick, R., Chakrabarti, S., Sarkar, S., Chawla-Sarkar, M. (2014). *Antiviral activity of baicalin against influenza virus H1N1-pdm09 is due to modulation of NS1-mediated cellular innate immune responses*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 1298-1310.
- Neuman, N.I., Franco, V.G., Ferroni, F.M., Baggio, R., Passeggi, M.C.G., Rizzi, A.C., Brondino, C.D. (2012). *Single crystal EPR of the mixed-ligand complex of copper(II) with L-glutamic acid and 1,10-phenanthroline: a study on the narrowing of the hyperfine structure by exchange*. J. Phys. Chem. A. 116, 12314-12320.
- Onishi, M. (1989). *Photometric Determination of Traces of Metals, Part II*. 4th ed., J.Wiley, New York.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M. (2013). *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*. J. Amer. Coll. Nutr. 22, 18-35.
- Pankuch, G.A., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C. (2003). *Postantibiotic Effects of Garenoxacin (BMS-284756) against 12 Gram-Positive or -Negative Organisms*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1140-1142.
- Parihar, S., Gupta, S.K., Jadeja, R.N., Jha, P.K. (2014). *A comparative study of experimental and theoretical results of conformations of oxovanadium(IV) complexes with 4-acyl pyrazolone ligands using DFT method*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 128, 447-451.

- Parr, R.G., Yang, W. (1989). *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, Clarendon Press: Oxford; New York.
- Patel, M.N., Gandhi, D.S., Parmar, P.A. (2011). *Synthesis, biological aspects and SOD mimic activity of square pyramidal copper(II) complexes with the 3rd generation quinolone drug sparfloxacin and phenanthroline derivatives*. Inorg. Chem. Commun. 14, 128-132.
- Patil, R.H., Babu, R.L., Kumar, M.N., Kumar, K.M.K., Hegde, S.M., Ramesh, G.T., Sharma, S.C. (2015). *Apigenin inhibits PMA-induced expression of pro-inflammatory cytokines and AP-1 factors in A549 cells*. Mol. Cell Biochem. 403, 95-106.
- Peisach, J., Blumberg, W.E. (1974). *Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins*. Arch. Biochem. Biophys. 165, 691-708.
- Perez, C.A., Wei, Y., Guo, M. (2009). *Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin*. J. Inorg. Biochem. 103, 326-332.
- Peters, K.G., Davis, M.G., Howard, B.W., Pokross, M., Rastogi, V., Diven, C., Greis, K.D., Eby-Wilkens, E., Maier, M., Evdokimov, A., Soper, S., Genbauffe, F. (2003). *Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); unliganded vanadium (VO₄) as the active component*. J. Inorg. Biochem. 96, 321-330.
- Price, W.D., Jockusch, R.A., Williams, E.R. (1997). *Is Arginine a Zwitterion in the Gas Phase?* J. Am. Chem. Soc. 119, 11988-11989.
- Recio Despaigne, A.A., Da Costa, F.B., Piro, O.E., Castellano, E.E., Louro, S.R.W., Beraldo, H. (2012). *Complexation of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones to copper(II) as an effective strategy for antimicrobial activity improvement*. Polyhedron 38, 285-290.
- Recio Despaigne, A.A., Da Silva, J.G., da Costa, P.R., dos Santos, R.G., Beraldo, H. (2014). *ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells*. Molecules 19, 17202-17220.
- Rehder, D. (2008). *Bioinorganic Vanadium Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Ren, Z., Yu, H., Li, J., Shen, J., Du, W. (2015). *Suitable parameter choice on quantitative morphology of A549 cell in epithelial-mesenchymal transition*. Biosci. Rep. 35, 1-7.
- Rescott, D.L., Nix, D.E., Holden, P., Schentag, J.J. (1988). *Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 450-453.
- Rizzi, A.C., Neuman, N.I., González, P.J., Brondino, C.D. (2016). *EPR as a Tool for Study of Isolated and Coupled Paramagnetic Centers in Coordination Compounds and Macromolecules of Biological Interest*. Eur. J. Inorg. Chem. 2016, 192-207.
- Rodríguez-Mercado, J.J., Roldán-Reyes, E., Altamirano-Lozano, M. (2003). *Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells*. Toxicol. Lett. 144, 359-369.

- Rodríguez-Montelongo, L., De la Cruz-Rodríguez, L., Fariás, R.N., Mass, E.M. (1993). *Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 77-84.
- Ross, P.D., Subramanian, S. (1981). *Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability*. *Biochemistry* 20, 3096-3102.
- Rossi, M., Meyer, R., Constantinou, P., Caruso, F., Castelbuono, D., O'Brien, M., Narasimhan, V. (2001). *Molecular Structure and Activity Toward DNA of Baicalein, a Flavone Constituent of the Asian Herbal Medicine "Sho-saiko-to"*. *J. Nat. Prod.* 64, 26-31.
- Rowe, F., Vargas Superti, S., Machado Scheibe, R., Dias, C.G. (2002). *Agar diffusion, agar dilution, Etest, and agar screening test in the detection of methicillin resistance in staphylococci*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 45-48.
- Russo, N., Toscano, M., Uccella, N. (2000). *Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3232-3237.
- Sak, K. (2014). *Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types*. *Pharmacogn. Rev.* 8, 122-146.
- Sakharov, I.Y.; Makarova, I.E., Ermolin, G.A. (1988). *Purification and characterization of intestinal alkaline phosphatase from harp seal*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 90, 709-714.
- Samsonowicz, M., Regulska, E. (2017). *Spectroscopic study of molecular structure, antioxidant activity and biological effects of metal hydroxyflavonol complexes*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 173, 757-771.
- Sanna, D., Ugone, V., Lubinu, G., Micera, G., Garribba, E. (2014). *Behavior of the potential antitumor V(IV)O complexes formed by flavonoid ligands. 1. Coordination modes and geometry in solution and at the physiological pH*. *J. Inorg. Biochem.* 140, 173-184.
- Saraste, A., Pulkki, K. (2000). *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. *Cardiovasc. Res.* 45, 528-537.
- Selvaraj, S., Krishnaswamy, S., Devashya, V., Sethuraman, S., Krishnan, U.M. (2014) *Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents*. *Med Res Rev.* 34, 677-702.
- Selbin, J., Holmes Jr., L.H., McGlynn, S.P. (1963). *Electronic Structures, Spectra and Magnetic Properties of Oxycations-IV: Ligation Effects on the Infra-red Spectrum of the Vanadyl Ion*. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 25, 1359-1369.
- Shang, Y., Li, H. (2010). *Studies of the interaction between apigenin and bovine serum albumin by spectroscopic methods*. *Russ. J. Gen. Chem.* 80, 1710-1717.
- Sheldrick, GM. (1997). *SHELXS-97. Program for crystal structure resolution*. Göttingen, Germany: University of Göttingen.
- Shi, J., Cao, H. (2011). *Molecular structure-affinity relationship of dietary flavonoids for bovine serum albumin*. *Braz. J. Pharmacogn.* 21, 594-600.

- Shi, X., Li, X., Gui, M., Zhou, H., Yang, R., Zhang, H., Jin, Y. (2010). *Studies on interaction between flavonoids and bovine serum albumin by spectral methods*. J. Lumin. 130, 637-644.
- Shukla, S., Gupta, S. (2010). *Apigenin: a promising molecule for cancer prevention*. Pharm Res. 27, 962-978.
- Si, C.L., Lu, Y.Y., Zhang, Y., Xu, J., Qin, P.P., Sun, R.C., Ni, Y.H. (2011). *Antioxidative low molecular weight extractives from Triploid Populus tomentosa xylem*. Bioresources 6, 232-242.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). *Studies on antioxidant activities of mucuna seed (Mucuna pruriens var utilis) extract and various non-protein amino/imino acids through in vitro models*. J. Sci. Food Agric. 83, 1517-1524.
- Simic, M.G., Taylor, K.A., Ward, J.F., von Sonntag, C. (2013). *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Springer, Boston, MA.
- Solomon, E.I., Lowery, M.D. (1993). *Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry*. Science 259, 1575-1581.
- Souza, A.C.R., Ferreira, R.C., Gonçalves, S.S., Quindós, G., Eraso, E., Bizerra, F.C., Briones, M.R.S., Colombo, A.L. (2012). *Accurate Identification of Candida parapsilosis (Sensu Lato) by Use of Mitochondrial DNA and Real-Time PCR*. J.Clin. Microbiol. 50, 2310-2314.
- Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C.D., Soley, B.S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D.A., Correr, C.J., Otuki, M.F. (2016) *Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review*. J. Ethnopharmacol. 178, 289-296.
- Srinivas, N.R. (2010). *Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives*. Xenobiotica 40, 357-367.
- Stephens, N.G., Parsons, A., Schofield, P.M., Kelly, F., Cheeseman, K., Mitchinson, M.J., Brown, M.J. (1996). *Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)*. 346, 781-786.
- Stewart, J.J.P. (1989a). *Optimization of parameters for semiempirical methods. I. Method*. J. Comput. Chem. 10, 209-220.
- Stewart, J.J.P. (1989b). *Optimization of parameters for semiempirical methods. II. Applications*. J. Comput. Chem. 10, 221-264.
- Stoll, S., Schweiger, A. (2006). *EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR*. J. Magn. Reson. 178, 42-55.
- Stubblings, W.J., Bostock, J.M., Ingham, E., Chopra, I. (2004). *Assessment of a microplate method for determining the post-antibiotic effect in Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 54, 139-143.

- Suksrichavalit, T., Prachayasittikul, S., Nantasenamat, C., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, V. (2009). *Copper complexes of pyridine derivatives with superoxide scavenging and antimicrobial activities*. Eur. J. Med. Chem. 44, 3259-3265.
- Sullivan, L.B., Chande, N.S. (2014). *Mitochondrial reactive oxygen species and cancer*. Cancer Metabol. 2, 1-12.
- Szliszka, E., Czuba, Z.P., Jernas, K., Król, W. (2008). *Dietary Flavonoids Sensitize HeLa Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)*. Int. J. Mol. Sci. 9, 56-64.
- Tan, M., Zhu, J., Pan, Y., Chen, Z., Liang, H., Liu, H., Wang, H. (2009). *Synthesis, Cytotoxic Activity, and DNA Binding Properties of Copper (II) Complexes with Hesperetin, Naringenin, and Apigenin*. Bioinorg. Chem. Appl. 2009, 1-9.
- Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Oliveira, A.J.B., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P. (2006). *Antibacterial activity of indole alkaloids from Aspidosperma ramiflorum*. Braz. J. Med. Biol. Res. 39, 387-391.
- Tang, L., Jia, W., Zhang, D. (2014). *The effects of experimental conditions of fluorescence quenching on the binding parameters of apigenin to bovine serum albumin by response surface methods*. Luminescence 29, 344-351.
- Tarragó, T., Kichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., Giralt, E. (2008). *Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor*. Bioorg. Med. Chem. 16, 7516-7524.
- Topală, T., Bodoki, A., Oprean, L., Oprean, R. (2014). *Bovine serum albumin interactions with metal complexes*. Clujul Med. 87, 215-219.
- Trávníček, Z., Vančo, J., Hošek, J., Buchtík, R., Dvořák, Z. (2012). *Cellular responses induced by Cu(II) quinolinonato complexes in human tumor and hepatic cells*. Chem. Cent. J. 6, 160-172.
- Uivarosi, V., Munteanu, A.C. (2017). *Flavonoid Complexes as Promising Anticancer Metallo drugs*. En: Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health, Dr. José Justino (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/67879.
- Uivarosi, V., Barbuceanu, S.F., Aldea, V., Arama, C.C., Badea, M., Olar, R., Marinescu, D. (2010). *Synthesis, Spectral and Thermal Studies of New Rutin Vanadyl Complexes*. Molecules 15, 1578-1589.
- Urquiza, N.M., Manca, S.G., Moyano, M.A., Arrieta Dellmans, R., Lezama, L., Rojo, T., Naso, L.G., Williams, P.A.M., Ferrer, E.G. (2010). *Copper(II) complexes of methimazole, an anti Grave's disease drug. Synthesis, characterization and its potential biological behavior as alkaline phosphatase inhibitor*. Biometals 23, 255-264.
- Urquiza, N.M., Naso, L.G., Martínez Medina, J.J., Moyano, M.A., Lezama, L., Williams, P.A.M., Ferrer, E.G. (2016). *Pharmacological activities of a propylthiouracil compound structurally modified by coordination with copper(II)*. J. Coord. Chem. 69, 1293-1312.

- Valdameri, G., Trombetta-Lima, M., Worfel, P.R., Pires, A.R.A., Martinez, G.R., Noletto, G.R., Cadena, S.M.S.C., Sogayar, M.C., Winnischofer, S.M.B., Rocha, M.E.M. (2011). *Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells*. Chem-Biol. Interact. 193, 180-189.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem. Biol. Interact. 160, 1-40.
- Van Norren, K., Van Hoorn, E.C., Leuvenink, H.G.D., Hofman, Z. (2006). *Compositions suitable for the treatment of damage caused by Ischemia/reper-fusion or oxidative stress*. Patent Application Publication. US 2006/0270615 A1.
- Vojta, D., Dominković, K., Miljanić, S., Spanget-Larsen, J. (2017). *Intramolecular hydrogen bonding in myricetin and myricitrin. Quantum chemical calculations and vibrational spectroscopy*. J. Mol. Struct. 1131, 242-249.
- Wagner, C.C., Baran, E.J. (2004). *Spectroscopic and Magnetic Behaviour of the Copper (II) Complex of L-Tryptophan*. Acta Farm. Bonaerense 23, 339-342.
- Wakahara, A., Kido, M., Fujiwara, T., Tomita, K. (1973). *Structural Studies of Tryptophan Metabolites by X-ray Diffraction Method. I. The Crystal and Molecular Structure of 5-Hydroxy-DL-Tryptophan*. Bull. Chem. Soc. Jpn. 46, 2475-2480.
- Wang, W., Pu, X., Zheng, W., Wong, N.B., Tian, A. (2003). *Some theoretical observations on the 1:1 glycine zwitterion–water complex*. J. Mol. Struct. THEOCHEM 626, 127-132.
- Wang, X., Zhao, Y., Zhong, X. (2014). *Protective Effects of Baicalin on Decidua Cells of LPS-Induced Mice Abortion*. J. Immunol. Res. 2014, 1-6.
- Weber, O.A., Simeon, V. (1971). *Tryptamine, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan complexes of proton and some divalent metal ions*. J. Inorg. Nucl. Chem. 33, 2097-2101.
- Wei, X., Yang, J., Wu, C. (2006). *Anxiolytic Effect of Baicalin in Mice*. Asian J. Tradit. Med. 1, 3-4.
- Williams, P.A.M. (2014). *Metal complexes of the antihypertensive drugs that inhibit the renin-angiotensin system*. Curr. Trends Med. Chem. 7, 97-104.
- Williams, P.A.M., Baran, E.J. (2008). *Vanadium detoxification: On the interaction of oxovanadium(IV) and other vanadium species with 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate*. J. Inorg. Biochem. 102, 1195-1198.
- Williams, P.A.M., Barrio, D.A., Etcheverry, S.B. (1999). *Interactions of vanadyl(IV) with dithiothreitol and thioglycolic acid. Their action on alkaline phosphatase activity*. J. Inorg. Biochem. 75, 99-104.
- Wolniak, M., Oszmiański, J., Wawer, I. (2008). *Solid-state NMR studies and DFT calculations of flavonoids: baicalein, baicalin and wogonoside*. Magn. Reson. Chem. 46, 215-225.

- Wu, S.M., Wu, H.Y., Wu, Y.J., Liu, L., Cai, R.P., Xu, Y.J. (2012). *Effects of Baicalin and Ligustrazine on airway inflammation and remodeling and underlying mechanism in asthmatic rats*. Adv. Biosci. Biotechnol. 3, 585-591.
- Xiao, J.B., Chen, J.W., Cao, H., Ren, F.L., Yang, C.S., Chen, Y., Xu, M. (2007). *Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method*. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry 191, 222-227.
- Xu, Q., Deng, D., Cao, Z., Xie, Q., Liang, J., Lu, J. (2010). *Interaction Between Serum Albumin and Four Flavones by Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking*. Chinese J. Anal. Chem. 38, 483-487.
- Xu, Y., Xin, Y., Diao, Y., Lu, C., Fu, J., Luo, L., Yin, Z. (2011). *Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells*. PLoS One 6, 1-12.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T.C., Terao, J. (1998). *HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1201-1204.
- Yang, J., Yang, X., Li, M. (2012). *Baicalin, a natural compound, promotes regulatory T cell differentiation*. BMC Complement. Altern. Med. 12, 1-7.
- Yang, S., Fu, Y., Wu, X., Zhou, Z., Xu, J., Zeng, X., Kuang, N., Zeng, Y. (2014). *Baicalin prevents Candida albicans infections via increasing its apoptosis rate*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 451, 36-41.
- Yang, X., Yang, J., Zou, H. (2013). *Baicalin Inhibits IL-17-Mediated Joint Inflammation in Murine Adjuvant-Induced Arthritis*. Clin. Dev. Immunol. 2013, 1-8.
- Yi, T., Chen, Q., He, X., So, S., Lo, Y., Fan, L., Xu, J., Tang, Y., Zhang, J., Zhao, Z., Chen, H. (2013). *Chemical quantification and antioxidant assay of four active components in Ficus hirta root using UPLC-PAD-MS fingerprinting combined with cluster analysis*. Chem. Cent. J. 115, 1-9.
- Zhang, J.a., Pan, M., Jiang, J., She, Z., Fan, Z., Su, C. (2011). *Syntheses, crystal structures, and antimicrobial activities of thioether ligands containing quinoline and pyridine. terminal groups and their transition metal complexes*. Inorg. Chim. Acta. 374, 269-277.
- Zhang, J.a., Yin, Z., Ma, L.w., Yin, Z.q., Hu, Y.y., Xu, Y., Wu, D., Permatasari, F., Luo, D., Zhou, B.r. (2014). *The Protective Effect of Baicalin against UVB Irradiation Induced Photoaging: An In Vitro and In Vivo Study*. PLoS ONE 9, 1-13.
- Zhao, L., Wei, Y., Huang, Y., He, B., Zhou, Y., Fu, J. (2013). *Nanoemulsion improves the oral bioavailability of baicalin in rats: in vitro and in vivo evaluation*. Int. J. Nanomedicine 8, 3769-3779.
- Zhao, M., Ma, J., Zhu, H., Zhang, X., Du, Z., Xu, Y., Yu, X. (2011). *Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90*. Mol. Cancer 10, 104-118.

-
- Zhao, X., Liu, Y., Niu, L., Zhao, C. (2012). *Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine Serum Albumin With Surfactants and Apigenin*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 94, 357-364.
- Zheng, P., Chiang, L., Lin, C. (2005). *Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells*. Life Sci. 76, 1367-1379.
- Zhu, H.Y., Han, L., Shi, X.L., Wang, B.L., Huang, H., Wang, X., Chen, D.F., Ju, D.W. (2015). *Feng MQ. Baicalin inhibits autophagy induced by influenza A virus H3N2*. Antiviral Res. 113, 62-70.
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., Kizek, R. (2012). *Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients*. Onc. Lett. 4, 1247-1253.

Publicaciones

A partir de este trabajo de Tesis Doctoral se desprenden tres publicaciones en revistas científicas y una comunicación en un congreso internacional:

- Juan J. Martínez Medina, Luciana G. Naso, Ana L. Pérez, Alberto Rizzi, Evelina G. Ferrer y Patricia A.M. Williams (2017): *Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium(IV) complex*. Journal of Inorganic Biochemistry, 166, 150-161.
- Juan J. Martínez Medina, Luciana G. Naso, Ana L. Pérez, Alberto Rizzi, Nora B. Okulik, Evelina G. Ferrer y Patricia A.M. Williams (2017): *Apigenin oxidovanadium(IV) cation interactions. Synthesis, spectral, bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer studies*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 344, 84-100.
- Juan J. Martínez Medina, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams y Nora B. Okulik (2017). *Theoretical investigation of the conformational space of baicalin*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 76, 181–191.
- Juan J. Martínez Medina, Luciana G. Naso, Alberto Rizzi, Evelina G. Ferrer y Patricia A.M. Williams. *Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and the oxidovanadium(IV) complex*. 13th European Biological Inorganic Chemistry (EuroBIC 13). Budapest, Hungría. 24 de agosto al 2 de septiembre de 2016.