



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**“ESTUDIO ESTRUCTURAL, ESPECTROSCÓPICO Y DETERMINACIÓN DE  
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPLEJOS METÁLICOS CON  
COMPUESTOS BIOACTIVOS.”**

---

**Lic. María Soledad Islas**

Directora: Dra. Patricia A.M. Williams

Codirectora: Dra. Evelina G. Ferrer

**Año 2014**

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

Año 2014

## AGRADECIMIENTOS

---

*Quisiera agradecerles a las instituciones y personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral*

- Al Director del CEQUINOR, Prof. Dr. Dr. Carlos O. Della Védova por permitirme desarrollar día a día el este trabajo de Tesis Doctoral en el CEQUINOR.*
- Al CONICET por otorgarme las becas de Tipo I y Tipo II (o de Finalización de Doctorado) para el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral.*
- A la ANPCyT, CONICET, UNLP y CICPBA por el otorgamiento de subsidios y fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.*
- A mis directoras Patricia y Evelina, por su paciencia, por estar disponibles siempre y por haberme acompañado en cada paso a lo largo de estos cinco años en todo lo que necesité tanto dentro, como fuera del laboratorio. Gracias por todas esas grandes enseñanzas en aspectos científicos (y en otros menos académicos). Por haberme enseñado un modo de trabajo, todo esto se los debo a ustedes.*
- A Luciana, por haberme enseñado las técnicas experimentales, y por entenderme y acompañarme en cada paso (y en cada crisis) relacionadas a esta tesis. Gracias por el día a día en el laboratorio, por las grandes charlas y consejos y por permitirme trabajar en un ambiente tan cómodo desde el primer día.*
- A Ignacio Esteban por su gran sinceridad, por sus críticas constructivas a este trabajo, por ser un excelente compañero de laboratorio a pesar de todo y por su amistad que tanto valoro.*
- A Carlitos por los cálculos de DFT y por sus sabios y graciosos consejos de la vida.*
- Al grupo del Dr. Rodríguez Puyol de la Universidad de Alcalá de Henares (UAH) por haberme recibido cálidamente durante mi estadía en la UAH, para realizar los ensayos biológicos de los sartanes. En especial, muchas gracias a Ali y a Paloma por su gran compañía en el laboratorio durante esos dos meses, y por haberme hecho sentir como en casa a tantos miles de kilómetros.*
- A Martín y Vero por su ayuda incondicional en todos los aspectos a lo largo de estos años, por escucharme y acompañarme (hasta en las ideas más locas).*

- *Al comité de Brujas del CEQUINOR: Bea, Betty, Eli, Sonia y Anita, por cada uno de los mediodías y charlas que compartimos y fundamentalmente por permitirme expresar y/o exaltar mis cualidades artísticas.*
- *A los becarios del CEQUINOR (LDD, LDT, LQT, gases, el 32 y el 12), por las charlas de pasillo y por los momentos compartidos fuera del ámbito laboral. Gracias en especial a María Rosa y a Cristian por los mediodías y las tortas!*
- *A mis compañeros de cátedra, de Analítica Instrumental (Alejandra, Sonia, Edgardo, Dani, Christian y Esteban) por haberme hecho pasar tantos momentos que voy a recordar siempre. Y gracias también a mis compañeros de Química Inorgánica, por haberme recibido tan bien este último año.*
- *A mis papás por acompañarme siempre, en cada una de las decisiones que tomé en mi vida (incluso irme a vivir a otra ciudad) por haberme enseñado a perseguir lo que se quiere y por ser incondicionales en todos los aspectos. Si llegué hasta acá es porque ustedes estuvieron siempre a mi lado.*
- *Al Ruli Poposo, por hacerme reír tanto, por acompañarme toda la vida y por traerme a la realidad cada vez que lo necesité.*
- *A mis abuelos y a mi familia, a Anto, Hilda, Ale y Raúl por haber estado presente ahora y en tantos momentos de mi vida.*
- *A Flor y a Tomy, por ser de esos hermanos que se eligen, por tantos años y por su amistad, que a pesar de la distancia sigue tan presente como hace tantos años. No me alcanzan las palabras para decirles lo importantes que son en mi vida y que fueron a lo largo de estos 5 años.*
- *A Julia por haber sido además de mi vecina, mi apoyo en esta ciudad, por los mates improvisados e interminables, por las charlas, los viajes y los consejos.*
- *A los tiernitos, Maxi, Valen, Gonza y Ale por su amistad a pesar de la distancia.*
- *A Nico, Valen, Leo y Marcos por haberme acompañado en los inicios de este camino en la química y por seguir estando presentes hoy en día.*
- *A las más jugosas, Sofi, Mili, Cin y las Flores, por las largas charlas, los viajes y los torneos, y a los Masters en recuperación por compartir conmigo su filosofía de vida.*
- *A toda esa gente que fui conociendo por fuera del laboratorio, y que me ayudó en esos momentos en los que necesitaba dispersarme, a los ángeles (del IBBM), por haberme integrado tan rápido, y a las chicas de la Asociación por permitirme expresarme y hacer algo de lo que disfruto tanto.*

## **OBJETIVOS**

i) Introducción.....	1
ii) Sistemas a estudiar.....	3
iii) Objetivos generales.....	5
iv) Objetivos específicos.....	5
v) Bibliografía.....	6

## **CAPÍTULO I: Complejos de coordinación de sartanes con cobre(II)**

1.1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1.1. Hipertensión y antihipertensivos.....	7
1.1.1.1. Hipertensión arterial.....	7
1.1.1.2. Sistema renina-angiotensina.....	8
1.1.1.2.1. Receptores de la angiotensina.....	9
1.1.1.3. Desarrollo de antihipertensivos.....	10
1.1.1.3.1. Bloqueadores del receptor de la Ang II.....	12
1.1.1.3.1.1. Diferencias entre los distintos sartanes.....	13
1.1.1.3.1.1.1. Diferencias farmacodinámicas.....	13
1.1.1.3.1.1.2. Diferencias en sus propiedades farmacocinéticas.....	16
1.1.1.3.1.2. Relación estructura-actividad.....	18
1.1.1.4. Función endotelial.....	21
1.1.1.5. Relación sartanes y cáncer.....	22
1.1.2. Radicales libres y daño oxidativo.....	24
1.1.2.1. Definición y clasificación.....	24
1.1.2.2. Fuentes y reacciones de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS).....	25
1.1.2.3. Química y bioquímica de los principales ROS y RNS.....	25
1.1.2.4. Estrés oxidativo.....	28
1.1.2.4.1. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo.....	28
1.1.2.4.2. Relación entre el estrés oxidativo y el cáncer.....	30
1.1.3. Cobre.....	32
1.1.3.1. Aspectos de la química del cobre.....	32
1.1.3.1.1. Estados de oxidación y geometría.....	32
1.1.3.1.2. Espectros electrónicos característicos para cobre.....	33
1.1.3.1.3. Espectro infrarrojo (FTIR).....	34
1.1.3.1.4. Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	35
1.1.3.2. Aspectos biológicos del cobre.....	36
1.1.3.2.1. Generalidades.....	36
1.1.3.2.2. Absorción y transporte del cobre.....	37

1.1.3.2.3.	Enzimas dependientes de cobre.....	37
1.1.3.2.4.	Homeostasis de cobre.....	38
1.1.3.2.5.	Cobre y enfermedades asociadas.....	40
1.1.3.2.5.1.	Enfermedades genéticas.....	40
1.1.3.2.5.2.	Enfermedad cardiovascular.....	41
1.1.3.2.5.3.	Cáncer y carcinogénesis.....	42
1.1.3.2.6.	Cobre en tratamientos antihipertensivos.....	43
1.1.4.	Complejos de coordinación de cobre(II) con sartanes.....	44
1.1.4.1.	Antecedentes.....	44
1.1.4.2.	Razones para complejar sartanes.....	44
1.2.	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA.....	47
1.2.1.	Cobre(II) y candesartán (CuCand).....	47
1.2.1.1.	Características fisicoquímicas y comerciales del candesartán.....	47
1.2.1.2.	Síntesis del CuCand.....	47
1.2.1.3.	Estudios en fase sólida.....	48
1.2.1.3.1.	TGA-DTA.....	48
1.2.1.3.2.	Reflectancia difusa.....	49
1.2.1.3.3.	FTIR y Raman.....	49
1.2.1.3.4.	EPR.....	53
1.2.1.3.5.	Estructura propuesta para el CuCand sólido.....	54
1.2.1.4.	Estudios en solución.....	54
1.2.1.4.1.	UV-vis y estabilidad .....	54
1.2.1.4.2.	Variación con el pH.....	55
1.2.1.4.3.	Titulación espectrofotométrica.....	56
1.2.1.4.4.	Estructura propuesta para el CuCand en solución....	57
1.2.2.	Cobre (II) y tritilcandesartán (CuTCand).....	58
1.2.2.1.	Características fisicoquímicas del tritilcandesartán.....	58
1.2.2.2.	Síntesis del CuTCand.....	58
1.2.2.3.	Estudios en fase sólida.....	59
1.2.2.3.1.	TGA-DTA.....	59
1.2.2.3.2.	Reflectancia difusa.....	59
1.2.2.3.3.	FTIR y Raman.....	60
1.2.2.3.4.	EPR.....	63
1.2.2.3.5.	Estructura propuesta para el CuTCand sólido.....	63
1.2.2.4.	Estudios en solución.....	64
1.2.2.4.1.	UV-vis y estabilidad.....	64
1.2.2.4.2.	Variación con el pH.....	65
1.2.2.4.3.	Titulación espectrofotométrica.....	66
1.2.2.4.4.	EPR y estructura propuesta para el CuTCand en solución.....	67
1.2.3.	Cobre (II) e irbesartán (CuIrb).....	68
1.2.3.1.	Características fisicoquímicas y comerciales del Irbesartán.....	68
1.2.3.2.	Síntesis del CuIrb.....	68
1.2.3.3.	Estudios en fase sólida.....	69
1.2.3.3.1.	TGA-DTA.....	69
1.2.3.3.2.	Reflectancia difusa.....	69
1.2.3.3.3.	FTIR y Raman.....	70
1.2.3.3.4.	EPR.....	72

1.2.3.3.5. Estudio computacional y estructuras propuestas para el Culrb sólido.....	73
1.2.3.4. Estudios en solución.....	75
1.2.3.4.1. UV-vis y estabilidad.....	75
1.2.3.4.2. Variación con el pH.....	76
1.2.3.4.3. Titulación espectrofotométrica.....	77
1.2.3.4.4. Estructura propuesta para el Culrb en solución.....	78
1.2.4. Cobre (II) y telmisartán (CuTIm).....	79
1.2.4.1. Características fisicoquímicas y comerciales del telmisartán.....	79
1.2.4.2. Síntesis del CuTIm.....	79
1.2.4.3. Estudios en fase sólida.....	80
1.2.4.3.1. TGA-DTA.....	80
1.2.4.3.2. Reflectancia difusa.....	80
1.2.4.3.3. FTIR y Raman.....	81
1.2.4.3.4. EPR.....	84
1.2.4.3.5. Estructura cristalina del CuTIm.....	85
1.2.4.3.6. Estructura propuesta para el sólido policristalino.....	89
1.2.4.4. Estudios en solución.....	89
1.2.4.4.1. UV-vis y estabilidad.....	89
1.2.4.4.2. Variación con el pH.....	91
1.2.4.4.3. Titulación espectrofotométrica.....	93
1.2.4.4.4. EPR en solución.....	93
1.2.4.4.5. Estructura propuesta para el CuTIm en solución.....	95
1.2.5. Resumen.....	96
1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	98
1.3.1. Actividad antioxidante total (TAA).....	100
1.3.2. Capacidad para secuestrar el radical DPPH• .....	106
1.3.3. Capacidad para secuestrar el radical peroxilo (ROO•).....	110
1.3.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.....	114
1.3.5. Resumen de las capacidades antioxidantes.....	120
1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	122
1.4.1. Actividad antiproliferativa: Ensayo de MTT.....	122
1.4.1.1. Cobre(II) con candesartán (CuCand).....	122
1.4.1.2. Cobre(II) con telmisartán (CuTIm).....	124
1.4.1.3. Cobre(II) con irbesartán (Culrb).....	125
1.4.1.4. Resumen de la actividad antitumoral.....	126
1.4.2. Ciclo celular.....	128
1.4.3. Actividad antihipertensiva (contracción celular).....	132
1.4.4. Medidas de actividad antimicrobiana.....	135
1.4.5. Conclusiones.....	137
1.5. BIBLIOGRAFÍA.....	138

## **CAPÍTULO II: Complejo de coordinación de naringenina con oxidovanadio(IV)**

2.1. INTRODUCCIÓN.....	142
2.1.1. Vanadio.....	142
2.1.1.1. Aspectos de la química del vanadio.....	142
2.1.1.1.1. Generalidades.....	142
2.1.1.1.2. Estados de oxidación y geometría.....	143

2.1.1.1.3.	Espectros electrónicos característicos para el catión V(IV)O <sup>+2</sup> .....	143
2.1.1.1.4.	Espectro infrarrojo (FTIR).....	144
2.1.1.1.5.	Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	145
2.1.1.2.	Aspectos biológicos del vanadio.....	146
2.1.1.2.1.	Generalidades .....	146
2.1.1.2.2.	Absorción, excreción y almacenamiento de vanadio	147
2.1.1.2.3.	Deficiencia y exceso de vanadio en animales superiores.....	148
2.1.1.2.4.	Usos terapéuticos de los compuestos de vanadio....	148
2.1.1.2.5.	Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio.....	149
2.1.2.	Flavonoides.....	152
2.1.2.1.	Generalidades.....	152
2.1.2.2.	Estructura de los flavonoides.....	153
2.1.2.3.	Características estructurales y actividad antioxidante.....	153
2.1.2.4.	Naringenina.....	155
2.1.3.	Complejos de oxidovanadio(IV) con flavonoides.....	156
2.2.	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL VONar.....	157
2.2.1.	Síntesis del complejo VONar.....	157
2.2.2.	Estudios en fase sólida.....	157
2.2.2.1.	TGA-DTA.....	157
2.2.2.2.	Reflectancia difusa.....	158
2.2.2.3.	Espectroscopía FTIR.....	158
2.2.2.4.	Resonancia paramagnética electrónica (EPR) y medidas magnéticas.....	160
2.2.2.5.	Estructura propuesta para el sólido.....	162
2.2.3.	Estudios en solución.....	163
2.2.3.1.	Variación con el pH.....	163
2.2.3.2.	Titulación espectrofotométrica.....	167
2.3.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	169
2.3.1.	Capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC).....	169
2.3.2.	Capacidad para secuestrar el radical DPPH <sup>•</sup> .....	170
2.3.3.	Capacidad para secuestrar el radical peróxido (ROO <sup>•</sup> ).....	171
2.3.4.	Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.....	172
2.3.5.	Capacidad secuestrante del radical OH <sup>•</sup> .....	173
2.3.6.	Resumen de la capacidad antioxidante.....	173
2.4.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	175
2.4.1.	Actividad anticancerígena.....	175
2.4.2.	Interacción con la seroalbúmina bovina (ABS).....	178
2.5.	BIBLIOGRAFÍA.....	183

### **CAPÍTULO III: Complejos de coordinación de ácido 3-cumarín carboxílico con Zn(II)**

3.1.	INTRODUCCIÓN.....	186
3.1.1.	Zinc.....	186
3.1.2.	Cumarinas.....	187
3.1.3.	1,10- fenantrolina.....	188

3.1.4. Fosfatasa alcalina.....	188
3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS.....	191
3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y RAMAN).....	193
3.3.1. Variación con el pH por FTIR.....	201
3.3.2. Resumen análisis espectroscópico.....	203
3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i> .....	204
3.4.1. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.....	204
3.4.2. Efecto antimicrobiano.....	206
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	209

#### **CAPÍTULO IV: Materiales y métodos**

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	210
4.1.1. Análisis elemental.....	210
4.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)..	210
4.1.3. Espectros electrónicos (UV-vis).....	210
4.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR).....	211
4.1.5. Espectros Raman.....	211
4.1.6. Espectros De reflectancia difusa.....	211
4.1.7. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	211
4.1.8. Determinación de estructuras cristalinas.....	211
4.2. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN.....	212
4.2.1. Estudios de estabilidad en solución.....	212
4.2.2. Titulaciones espectrofotométricas y variación del espectro electrónico con el pH.....	212
4.3. MEDIDAS DE LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES.....	213
4.3.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.....	213
4.3.2. Ensayo de la actividad anti radical DDPH <sup>•</sup> .....	213
4.3.3. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS <sup>•+</sup> .....	213
4.3.4. Actividad secuestrante del radical OH <sup>•</sup> .....	214
4.3.5. Inhibición del radical peroxilo (ROO <sup>•</sup> ).....	214
4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	215
4.4.1. Cultivo de líneas celulares.....	215
4.4.1.1. Líneas celulares derivadas de cáncer de próstata.....	215
4.4.1.2. Líneas celulares derivadas de cáncer de mama.....	215
4.4.1.3. Otras líneas celulares.....	216
4.4.2. Ciclo celular por citometría de flujo.....	216
4.4.3. Ensayos de viabilidad celular.....	216
4.4.3.1. Cristal violeta.....	216
4.4.3.2. MTT.....	217
4.4.4. Determinación de los cambios en el área superficial planar celular (PCSA).....	217
4.4.5. Ensayos antimicrobianos.....	217
4.4.6. Ensayos de análisis de imágenes de alto contenido.....	218
4.4.7. Ensayo de LDH.....	219
4.4.8. Medidas de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL).....	219
4.4.9. Medidas de afinidad a la seroalbúmina bovina (ABS).....	219
4.4.10. Análisis estadístico.....	220
4.5. BIBLIOGRAFÍA.....	221
<b>ANEXO: Publicaciones.....</b>	<b>222</b>

### **i) Introducción:**

Los seres vivos contienen aproximadamente 3% de metales en sus cuerpos, los que ejercen funciones muy importantes para la vida<sup>1</sup>. El estudio de estos sistemas ha dado origen a la disciplina Química Bioinorgánica. Muchos iones metálicos están involucrados en procesos enzimáticos (Fe, Cu, Zn), o poseen funciones estructurales (Ca, Zn), algunos participan en reacciones fotoquímicas o de transferencia de electrones (Cu, Mg, Mn, Fe) así como otros participan del transporte y acumulación de oxígeno (Fe y Cu). Por otra parte, algunos metales catalizan la activación de moléculas de bajo peso molecular como oxígeno y nitrógeno (Fe, Cu, Mo)<sup>2-6</sup>. Si bien los compuestos metálicos fueron utilizados empíricamente desde el año 1500 AC<sup>2</sup> como sustancias curativas, el desarrollo de una rama de la Química Medicinal apunta al diseño racional de ligandos que coordinan iones metálicos para mejorar los efectos benéficos del metal o de los ligandos<sup>3-7</sup>. La bioactividad de estos compuestos depende de la lipofilicidad, solubilidad en medios biológicos, estabilidad, estado de oxidación y esfera de coordinación de los metales, naturaleza de los ligandos y características del sitio activo. El desarrollo científico generó complejos metálicos útiles para tratar diferentes enfermedades tales como: anemia (Fe, Co), artritis (Au, Cu), diabetes (V, Mo, Zn, Cr) y cáncer (Pt, Cu, V), problemas nutricionales derivados del defecto de metales, como raquitismo (Ca) y suplementación de compuestos metálicos. Enfermedades infecciosas como tuberculosis (Au), sífilis (Hg), úlceras (Bi), tratamientos psiquiátricos (sales de litio), complejos metálicos antibióticos para enfermedades infecciosas.

En particular, el cobre es un oligoelemento esencial que se concentra en hígado, cerebro, corazón, músculos, hígado y huesos. Como todo elemento esencial, su deficiencia produce condiciones patológicas como la enfermedad de Menkes, y su exceso la enfermedad de Wilson<sup>4,8-11</sup>. El metal es constituyente de muchas enzimas, tales como ceruloplasmina (donde el cobre juega un papel importante en la oxidación del hierro y su deficiencia genera anemia y anormalidades óseas)<sup>12-14</sup>, lisil-oxidasa (esencial para formación de colágeno y elastina), superóxido dismutasa (protección antioxidante), citocromo c oxidasa (producción de energía), y tirosinasa (pigmentación)<sup>9</sup>. El cobre ejerce una función vital en la biosíntesis de huesos y tejido conectivo<sup>15,16</sup>. Se estableció empíricamente que los huesos quebrados sueldan más rápido cuando se suministran suplementos de cobre<sup>9,17</sup>. Las enfermedades cardiovasculares se relacionan con el nivel de cobre en la dieta humana: su deficiencia puede incrementar la concentración de colesterol en plasma, generando riesgo cardiovascular<sup>18,19</sup>. Por otro lado, la deficiencia de cobre deprime la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y de otras enzimas antioxidantes que dependen de cobre<sup>20</sup>. La función del cobre en el

## OBJETIVOS

control de procesos inflamatorios es bien conocida<sup>21-24</sup>. Como respuesta fisiológica a la inflamación se incrementa el cobre en suero y la ceruloplasmina aumenta su concentración transportando el cobre a enzimas no hepáticas de cobre, y otras actividades enzimáticas decrecen por la disminución de cobre debido a su incorporación a la ceruloplasmina. Una enfermedad inflamatoria de articulaciones es la artritis reumatoidea y desde la antigüedad se utilizan brazaletes de cobre para su tratamiento<sup>25</sup>. También se eleva el nivel de cobre en suero en animales y humanos con cáncer y se sugirió que es una respuesta fisiológica diseñada para activar enzimas de cobre en células tumorales para inhibir su crecimiento<sup>26</sup>.

Otro metal esencial (aunque su esencialidad en humanos es controvertida<sup>27,28</sup>) es el vanadio. Se ha estudiado su función en sistemas biológicos así como también su función en aplicaciones catalíticas y farmacéuticas. Se encontró que el vanadio está presente en el sitio activo de haloperoxidasas y nitrogenasas y los complejos de vanadio se sabe que inhiben distintas enzimas incluyendo fosfatasas, ATPasas, nucleasas, quinasas, y otras<sup>29</sup>. En la década del 70, se encontró que el vanadio(V) inhibía las fosfohidrolasas. A partir de esa fecha, se reportaron diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* de complejos antidiabéticos de vanadio<sup>30</sup>. En estos estudios se demostró que al contrario de la insulina, los compuestos de vanadio no generan hipoglicemia en animales diabéticos<sup>31</sup>. La facilidad de conversión entre oxidovanadio(IV)  $[\text{VO}]^{2+}$ , V(IV) y vanadatos  $[\text{HVO}_4]^{2-}$  y  $[\text{H}_2\text{VO}_4]^{-}$ , V(V), las dos formas de vanadio presentes en equilibrio en el cuerpo humano, permite la interacción con moléculas biológicas. Además de sus funciones biológicas en organismos vivos, el vanadio es un elemento interesante por sus aplicaciones terapéuticas en una variedad de enfermedades muchas de ellas con base inflamatoria.

El Zn es el segundo biometal de transición más abundante en el ser humano y del cual se conocen la mayor cantidad de metaloenzimas, participando, además como estabilizador estructural. El Zn influye en el desarrollo y crecimiento del organismo y su exceso no es perjudicial. Además, su acción insulinomimética se ha demostrado recientemente<sup>32</sup>.

Los complejos de metales esenciales con ligandos con actividad biológica y/o farmacológica pueden mejorar las propiedades de los ligandos y de los metales aislados. Los complejos de cobre muestran propiedades para el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas como úlceras gastrointestinales, cáncer y diabetes y muchos complejos muestran actividad SOD, y poseen actividad antiinflamatoria, algunos con actividad más marcada y menor toxicidad que los compuestos sin complejar<sup>33</sup>. Algunos agentes complejantes que carecen de actividad farmacológica, se activan por complejación con cobre. Esto puede deberse a que el ligando se comporte como transportador de cobre o por formación del complejo que interfiere con el proceso inflamatorio<sup>24,26,33-37</sup>. En la búsqueda de sustancias metálicas antineoplásicas menos tóxicas, se desarrollaron drogas basadas en cobre las que mostraron gran potencial antitumoral. Los complejos de cobre tienen menor efectos colaterales que las sustancias con Pt<sup>38</sup>. Las células tumorales poseen cantidades menores a las normales de SOD y el tratamiento con la enzima nativa bovina Cu-SOD decrece el crecimiento de algunos tumores. Numerosos complejos de cobre que poseen propiedades superóxido dismutasa similares poseen propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas<sup>39</sup>. Por lo

## OBJETIVOS

tanto se ensayaron diferentes complejos de Cu con actividad SOD para tratamientos antitumorales<sup>39-41</sup>.

La presión sanguínea alta es un factor de riesgo modificable de enfermedades vasculares. Para ello, se suministran sustancias antihipertensivas que la disminuyen. El grupo de los sartanes son productos farmacéuticos orales potentes, usados para el tratamiento de la hipertensión arterial<sup>42</sup>. Fueron diseñados como enlazantes selectivos y bloqueantes de receptor tipo 1 de angiotensina II, interfiriendo con el sistema renina-angiotensina, un importante regulador de la presión sanguínea normal<sup>43</sup>. Estudios recientes reportaron que los derivados de sartanes tuvieron el potencial de inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata<sup>44</sup>. Teniendo en cuenta que estas sustancias tienen variadas propiedades, independientemente de sus efectos antihipertensivos<sup>45</sup>, es interesante ensayar en nuestro laboratorio la síntesis y caracterización de sus complejos de cobre(II) y el estudio de las propiedades antineoplásicas de los complejos y ligandos en líneas celulares derivadas de cáncer de próstata. Estudios preliminares en otros sistemas celulares fueron llevados a cabo con losartán<sup>46</sup> y valsartán<sup>47</sup>.

Además de las bien conocidas propiedades antidiabéticas de complejos de vanadio<sup>48</sup> también fueron descritas sus propiedades antitumorales<sup>49,50</sup>. Previamente a este trabajo de Tesis Doctoral, en el grupo de investigación se ha encontrado que determinados complejos de oxidovanadio(IV) exhiben comportamiento más deletéreo en la proliferación de células osteoblásticas tumorales que en las normales<sup>51,52</sup>. Es por eso que se busca formar complejos de oxidovanadio(IV) con ligandos naturales con propiedades antioxidantes (flavonoides), caracterizarlos en fase sólida y acuosa, para poder determinar si mejoran las propiedades antitumorales de dichas sustancias polihidroxiladas (antioxidantes seleccionados).

### **ii) Sistemas a estudiar**

Se trata de obtener nuevos compuestos de metales de transición que sean aptos para la evaluación estructural y que presenten buenas perspectivas para mejorar las actividades biológicas y/o farmacológicas de los compuestos orgánicos coordinados.

Como se mencionó más arriba, el cobre es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, contenido en un gran número de metaloproteínas y que como es sabido, los complejos de diversos metales de transición con diferentes ligandos farmacológicamente activos, mejoran las propiedades de dichos fármacos aumentando la biodisponibilidad y disminuyendo los efectos no deseados. El diseño de complejos de Cu que imitan la actividad de la enzima superóxidodismutasa (SOD), y con efectos antitumorales, está siendo estudiado en la actualidad. En particular se propone el estudio de complejos de Cu con sustancias antihipertensivas derivadas de sartanes: telmisartán, irbesartán, candesartán y su derivado, tritil candesartán.

Se sabe que los componentes de procesos inflamatorios, tales como radicales libres, causan daño tisular, presentándose en diversas enfermedades degenerativas tales como alteraciones del sistema nervioso central (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, diversos cánceres, etc). Como parte del tratamiento de estas enfermedades, se considera importante la disminución de

## OBJETIVOS

los radicales libres usando agentes antioxidantes. En particular, las sustancias naturales polihidroxiladas como flavonoides y cumarinas ejercen una gran variedad de efectos biológicos, tales como acciones antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, antivirales y anticarcinogénicas. Además, por ser compuestos oxigenados pueden actuar como agentes quelantes de metales de transición cumpliendo eventualmente un papel relevante en la biodisponibilidad (captación y transporte) y en la respuesta tóxica de algunos elementos. El interés en estudiar la interacción de los mismos con oxidovanadio(IV) radica principalmente en las características también anticarcinogénicas demostradas para otros compuestos del metal. Es así que se propone sintetizar complejos de oxidovanadio(IV) con antioxidantes naturales como flavonoides su posterior estudio de los efectos biológicos.

Asimismo, se estudiaron sistemas modelo que incluyen complejos ternarios del biometal Zn(II) con ligandos como el ácido cumarin-3-carboxílico y derivados nitrogenados, como la fenantrolina que imita los sitios de unión cuando el metal coordina con aminoácidos y péptidos naturales para evaluar sus propiedades inhibitorias o estimulantes de enzimas y sus propiedades antimicrobianas.

## OBJETIVOS

### **iii) Objetivos generales**

- 1) Modificar la acción biológica de fármacos o sustancias bioactivas por complejación.
- 2) Seleccionar biometales capaces de coordinar con los grupos funcionales de los diferentes compuestos.
- 3) Sintetizar y caracterizar los complejos obtenidos. Determinar su comportamiento en solución simulando condiciones fisiológicas.
- 4) Determinar sus acciones enzimáticas similares y efectos antioxidantes.
- 5) Investigar los efectos biológicos antimicrobianos, antihipertensivos y antitumorales. Evaluar su posible mecanismo de acción.

### **iv) Objetivos específicos**

- 1) Sintetizar complejos de metales de transición (especialmente de Cu, V y Zn) con ligandos con interés farmacológico (sartanes) y biológico (flavonoides y cumarinas), respectivamente.
- 2) Caracterizar los complejos obtenidos (en fase sólida y en solución, y simulando condiciones fisiológicas).
- 3) Analizar los efectos de actividades antioxidantes de los ligandos y complejos en sistemas acelulares: actividad superóxidodismutasa (SOD) similar, ensayos de actividad anti radicalaria usando el radical DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), ABTS<sup>•+</sup> usando la sal de amonio derivada del ácido 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico), radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>) y efectos sobre la enzima fosfatasa alcalina.
- 4) Investigar los efectos antimicrobianos en cepas de bacterias y hongos. Estudiar el efecto antihipertensivo de los complejos de sartanes sobre la contracción de células mesangiales. Y estudiar el efecto de los complejos sobre la proliferación y el ciclo celular en distintas líneas celulares (derivadas de cáncer de próstata, de cáncer de mama y cáncer de pulmón).

## v) Bibliografía

- (1) Miyake, A.; Bokman, A. H.; Schweigert, B. S. *J. Biol. Chem.* **1954**, *211*, 391–404.
- (2) Williams, D. R. *Chem. Rev.* **1972**, *72*, 203–213.
- (3) Frausto da Silva, J. R. R.; Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*; Clarendon Press: New York, 1991.
- (4) Baran, E. J. *Química bioinorgánica*; 1st ed.; McGraw-Hill Interamericana, 1994.
- (5) Williams, R. J. P. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1908–1924.
- (6) Ahmad, S.; Isab, A. A.; Ali, S.; Al-Arfaj, A. R. *Polyhedron* **2006**, *25*, 1633–1645.
- (7) Orvig, C.; Abrams, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2201–2204.
- (8) Sorenson, J. R. J. *Med. Bio.* **1985**, *63*, 40–43.
- (9) Solomons, N. *J. Am. Coll. Nutr.* **1985**, *4*, 83–105.
- (10) Harris, E. D. *Trace Elements in Health*; Rose, J., Ed.; Butterworths: London, 1983.
- (11) Gubler, C. J.; Lahey, M. E.; Cartwright, G. E.; Wintrobe, M. M. *J. Clin. Invest.* **1953**, *32*, 405–414.
- (12) Nagano, T.; Toyoda, T.; Tanabe, H.; Nagato, T.; Tsuchida, T.; Kitamura, K. A. G. *Int. Med.* **2005**, *44*, 554–559.
- (13) Harless, W.; Crowell, E.; Abraham, J. *Am. J. Hematol.* **2006**, *81*, 546–549.
- (14) Fong, T.; Vij, R.; Vijayan, A.; DiPersio, J.; Blinder, M. *Haematologica* **2007**, *92*, 1429–1430.
- (15) Gacheru, S. N.; Trackman, P. C.; Shah, M. A.; O’Gara, C. Y.; Spacciopoli, P.; Greenaway, F. T.; Kagan, H. M. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 19022–19027.
- (16) Romero-Chapman, N.; Lee, J.; Tinker, D.; Uriu-Hare, J. Y.; Keen, C. L.; Rucker, R. R. *Biochem. J.* **1991**, *275*, 657–662.
- (17) Dollwet, H. H. A.; Sorenson, J. R. J. *Tr. Elem. Med.* **1985**, *2*, 80–87.
- (18) Klevay, L. M. *Med. Hypotheses* **1987**, *24*, 111–119.
- (19) Klevay, L. M.; Inman, L.; Johnson, L. K.; Lawler, M.; Mahalko, J. R.; Milne, D. B.; Lukaski, H. C.; Bolonchuk, W.; Sandstead, H. H. *Metabolism* **1984**, *33*, 1112–1118.
- (20) Balevska, P. S.; Russanov, E. M.; Kassabova, T. A. *Int. J. Biochem.* **1981**, *13*, 489–493.
- (21) Milanino, R.; Passarella, E.; Velo, G. P. In *Advances in Inflammation Research*; Weissmann, G.; Samuelsson, B.; Paoletti, R., Eds.; Raven Press: New York, 1979; pp. 281–291.
- (22) Milanino, R.; Conforti, A.; Franco, L.; Marrella, M.; Velo, G. P. *Agents Actions* **1985**, *16*, 504–513.
- (23) Milanino, R.; Buchner, V. *Rev. Environ. Heal.* **2006**, *21*, 153–215.
- (24) Sorenson, J. R. J. In *Metal Ions in Biological Systems*; Sigel, H., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1982; pp. 77–124.
- (25) Jackson, G. E.; May, P. M.; Williams, D. R. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1978**, *40*, 1189–1194.
- (26) Sorenson, J. R. J. *Copper and Zinc in Inflammation*; Milanino, R.; Rainsford, K. D.; Velo, G. P., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989; p. 69.
- (27) Tracey, A. S.; Crans, D. C. *Vanadium Compounds: Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*; ACS Sympos.; Oxford University Press: New York, 1998.
- (28) Saatchi, K.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Pink, M.; Yuen, V. G.; McNeill, J. H.; Orvig, C. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 2689–2697.
- (29) N.D., C. *Vanadium in Biological Systems*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1990.
- (30) Thompson, K. H.; McNeill, J. H.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2561–2572.
- (31) Mahroof-Tahir, M.; Brezina, D.; Fatima, N.; Choudhary, M. I. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 589–599.
- (32) Castillo-Blum, S. E.; Barbra-Berhrens. *N. Coord. Chem. Rev.* **2000**, *196*, 3–30.
- (33) Sorenson, J. R. J. *Met. Ions Biol. Syst.* **1976**, *14*, 77–124.
- (34) Sorenson, J. R. J. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 135–148.
- (35) Sorenson, J. R. J.; Oberley, L. W.; Crouch, R. K.; Kensler, T. W.; Kishore, V.; Leuthauser, S. W. C.; O. T. D.; Pezeshk, A. *Biol. Tr. Elem. Res.* **1983**, *5*, 257–273.
- (36) Berthon, G. *Agents Actions* **1993**, *39*, 210–217.
- (37) Weder, J. E.; Dillon, C. T.; Hambley, T. V.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Biffin, J. R.; Regtop, H. L.; Davies, N. M. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 95–126.
- (38) Wang, T.; Guo, Z. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 525–537.
- (39) Sorenson, J. R. J. *Biology of Copper Complexes*; Humana Press: Clifton, 1987.
- (40) Oberley, L. W.; Buettner, G. R.; Bueftner, G. R.; LW, O.; GR., B. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1141–1149.
- (41) Urquiola, C.; Gambino, D.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Cerecetto, H.; González, M.; de Cerain, A. L.; Monge, A.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 119–126.
- (42) Wong, P. C.; Barnes, T. B.; Chiu, A. T.; Christ, D. D.; Duncia, J. V.; Herblin, W.F.; Timmermans, P. B. *Cardiovasc. Drug Rev.* **1991**, *9*, 317–339.
- (43) Moen, M. D.; Wagstaff, A. J. *Drugs* **2005**, *65*, 2657–2674.
- (44) Funao, K.; Matsuyama, M.; Kawahito, Y.; Sano, H.; Chargui, J.; Touraine, J. L.; Nakatani, T.; R., Y. *Oncol. Reports* **2008**, *20*, 295–300.
- (45) Díez, J. *Clin. Ther.* **2006**, *28*, 832–848. **2006**, *28*, 832–848.
- (46) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Barrio, D. A.; Lezama, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6418–6424.
- (47) Etcheverry, S. B.; Di Virgilio, A. L.; Nascimento, O. R.; Williams, P. A. M. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 25–33.
- (48) Sakurai, H. *Clin. calcium* **2005**, *15*, 49–57.
- (49) Evangelou, A. M. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 249–265.
- (50) Chakraborty, T.; Chatterjee, A.; Rana, A.; Dhachinamoorthi, D.; Kumar P, A.; Chatterjee, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 48–59.
- (51) Etcheverry, S. B.; Barrio, D. A.; Cortizo, A. M.; P.A.M., W. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *88*, 94–100.
- (52) Barrio, D. A.; Williams, P. A. M.; Cortizo, A. M.; Etcheverry, S. B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 459–468.



# **CAPÍTULO I**

---

## **Complejos de coordinación de sartanes con cobre(II)**

---

## 1.1. INTRODUCCIÓN

---

### **1.1.1. HIPERTENSIÓN Y ANTIHIPERTENSIVOS**

#### **1.1.1.1. Hipertensión arterial**

La presión sanguínea está regulada por varios mecanismos ya que necesita mantenerse dentro de ciertos parámetros para evitar que ocurran efectos adversos. La falta de regulación puede originar en un caso hipotensión (presión baja) lo que causa una perfusión inadecuada a los órganos, y desemboca en la disfunción o muerte de tejidos. En el otro extremo está la hipertensión (presión alta) que puede causar un daño significativo en órganos y vasos sanguíneos. Es el principal factor de riesgo para enfermedades y fallas cardíacas, accidentes cerebrovasculares, y fallas renales.

Se considera que existen dos tipos de hipertensión:

- Hipertensión primaria, o esencial: afecta al 90-95% de los casos y se caracteriza por la falta de existencia de causas para el aumento de la presión sanguínea. Ocurre por una acumulación de factores ambientales no genéticos (estrés, ingesta de sal) y por múltiples polimorfismos genéticos en el tono vasomotor o la regulación del volumen sanguíneo (con una importante componente hereditaria).
- Hipertensión secundaria: afecta al 5-10% restante de los casos, y tiene causas conocidas, como enfermedad renal intrínseca, anomalías endócrinas, malformaciones vasculares, etc<sup>1</sup>.

No existe ningún medio de curar la hipertensión primaria pero el tratamiento adecuado puede modificar su evolución. Existen una serie de medidas generales como la sedación, el reposo adicional, la disminución del estrés, el adelgazamiento, la restricción de sodio en la dieta. Estas medidas son importantes y en ciertos casos de hipertensiones leves bastan para un adecuado control de la tensión arterial. Sin embargo, en la mayoría de los casos, es necesario además, el empleo de algún tipo de medicación antihipertensiva.

La hipertensión se considera clínicamente significativa cuando la presión diastólica es mayor a 89 mm Hg o cuando la presión sistólica es mayor a 139 mm Hg<sup>1</sup>. Basados en este criterio, un tercio de la población mundial se encuentra afectada según la Organización Mundial de la Salud. En nuestro país, según la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial (SAHA), el 42% de los argentinos entre 35 y 75 años es hipertenso, este porcentaje en cifras equivale a entre 8 y 10 millones de personas. De este total, el 40% lo ignora, mientras que, según el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), solo 1

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

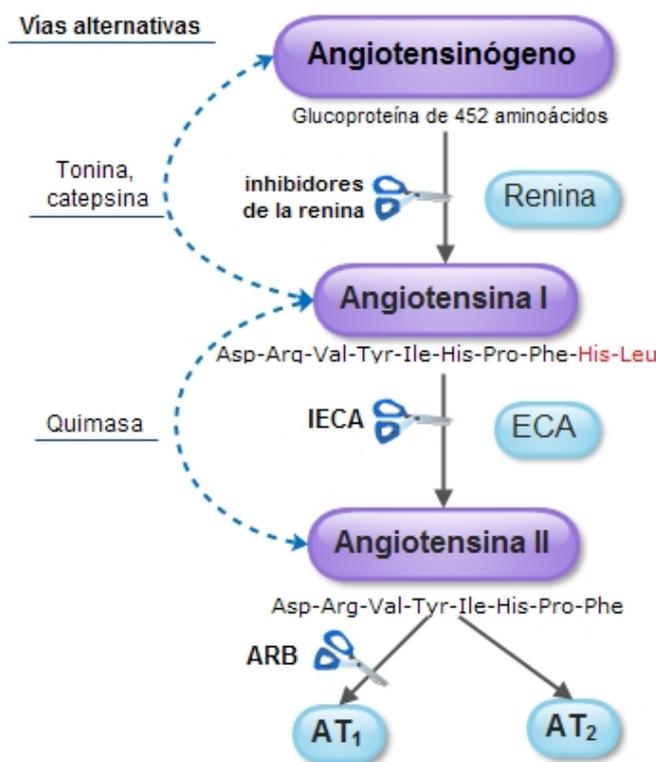
de cada 5 hipertensos tiene controlada la presión mediante algún tipo de medicación<sup>2</sup>.

### 1.1.1.2. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. Este sistema es una compleja cascada enzimática que termina en la formación de angiotensina II (Ang II) (**Esquema 1**).

La cascada se inicia con el clivaje del angiotensinógeno, una glucoproteína de 452 aminoácidos, mediado por la renina, y que da como resultado la angiotensina I (Ang I), un decapeptido inactivo. Posteriormente, la Ang I se convierte en Ang II, un octapéptido, por medio de la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Si bien esta es la vía principal, existen vías enzimáticas alternativas que pueden originar Ang II como producto. Enzimas distintas a la renina (tonina, catepsina) son capaces de generar Ang I a partir del angiotensinógeno y enzimas distintas a la ECA (quimasa, entre otras) pueden generar Ang II a partir de Ang I.

A través de estas vías sintéticas se generan también otros péptidos de angiotensina que tienen efectos biológicos, sin embargo, la Ang II es el principal producto final del sistema<sup>3</sup>. En el paso final, la Ang II generada se une a su receptor. Aunque se conocen varios subtipos de receptores de la Ang II, la mayoría de los efectos conocidos, tales como la vasoconstricción, pueden ser atribuidos al receptor subtipo 1 de la angiotensina II (AT<sub>1</sub>).



**Esquema 1.** Sistema renina-angiotensina

### 1.1.1.2.1. Receptores de la angiotensina

Los receptores de la Ang II tipo 1 (AT<sub>1</sub>) y tipo 2 (AT<sub>2</sub>) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales constan de siete hélices transmembrana que intercambian bucles intracelulares y extracelulares<sup>4,5</sup>. Un resumen de sus principales efectos se encuentra en el **esquema 2**.

Los receptores AT<sub>1</sub> se encuentran principalmente en el corazón, la glándula adrenal, cerebro, hígado y riñones. Su rol principal es el de regular tanto la presión sanguínea, como el volumen de fluidos y mantener el balance de electrolitos. Los receptores AT<sub>2</sub> se encuentran expresados en gran medida en los fetos en desarrollo, pero esa expresión disminuye rápidamente después del nacimiento. En adultos, los receptores AT<sub>2</sub> están presentes solo en niveles muy bajos y se encuentran en su mayoría en el corazón, glándulas adrenales, útero, ovario, riñones y cerebro<sup>6</sup>.

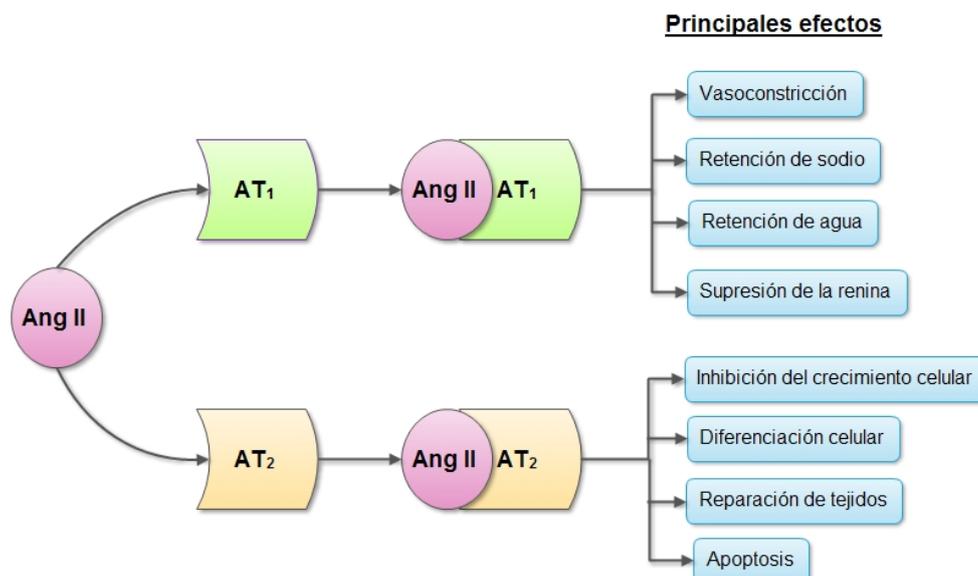
Todos los efectos clínicos conocidos de la Ang II están mediados por el receptor AT<sub>1</sub>. El rol fisiológico del receptor AT<sub>2</sub> solo se comprende parcialmente. Las funciones atribuidas al receptor AT<sub>2</sub> incluyen la inhibición del crecimiento celular, promoción de la diferenciación celular y apoptosis<sup>7,8</sup>.

La estimulación de los receptores AT<sub>2</sub> es importante ya que:

- Aumenta la liberación de óxido nítrico (NO), bradiginina y prostaglandinas que presentan propiedades vasodilatadoras y antiproliferativas<sup>9-13</sup>. Es decir, que la estimulación de los receptores AT<sub>2</sub> produce una respuesta vasodilatadora que se opone a la vasoconstricción mediada por la estimulación de los receptores AT<sub>1</sub>.

- Inhibe el crecimiento y la proliferación de células musculares cardíacas<sup>14</sup> y lisas vasculares<sup>15</sup> y endoteliales<sup>7</sup> induce la apoptosis de los fibroblastos<sup>16</sup> y activa diversas colagenasas.

- Regula la activación del sistema renina-angiotensina a través de la inhibición de la síntesis de renina<sup>17</sup>.



**Esquema 2.** Principales efectos de la Ang II en los receptores subtipo AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

### **1.1.1.3. Desarrollo de antihipertensivos**

En 1898, Robert Tigerstedt y su estudiante, Per Bergman, experimentaron inyectando extractos de riñón a conejos y observaron un aumento en la presión sanguínea. Esto les sugirió que los riñones producen una proteína, que llamaron renina, a la que le atribuyeron el efecto de elevar la presión arterial.

Luego, en 1939, se encontró que la renina no era la causante del aumento de la presión sanguínea, sino que se trataba de una enzima que catalizaba la conversión de un péptido inactivo, el angiotensinógeno, en angiotensina I (Ang I), que posteriormente sufría una transformación en angiotensina II (Ang II), y que esta última era la responsable del incremento de la presión sanguínea.

Los primeros antihipertensivos que se desarrollaron fueron los inhibidores de la renina, que prevenían la formación de Ang I y Ang II, bloqueando el sistema desde su origen. Estos compuestos eran análogos peptídicos estables con un enlace escindible similar al del angiotensinógeno, pero que a diferencia de este, inhibían la actividad de la renina y no interferían en otras rutas metabólicas. En los últimos años, se desarrolló el Aliskerin, que fue el primer inhibidor de la renina no peptídico de bajo peso molecular, oralmente activo, aprobado por la FDA. Este fármaco proveía un potencial nuevo tratamiento para la hipertensión, no solo reducía la actividad enzimática de la renina, sino que también producía la interrupción de su síntesis<sup>18</sup>.

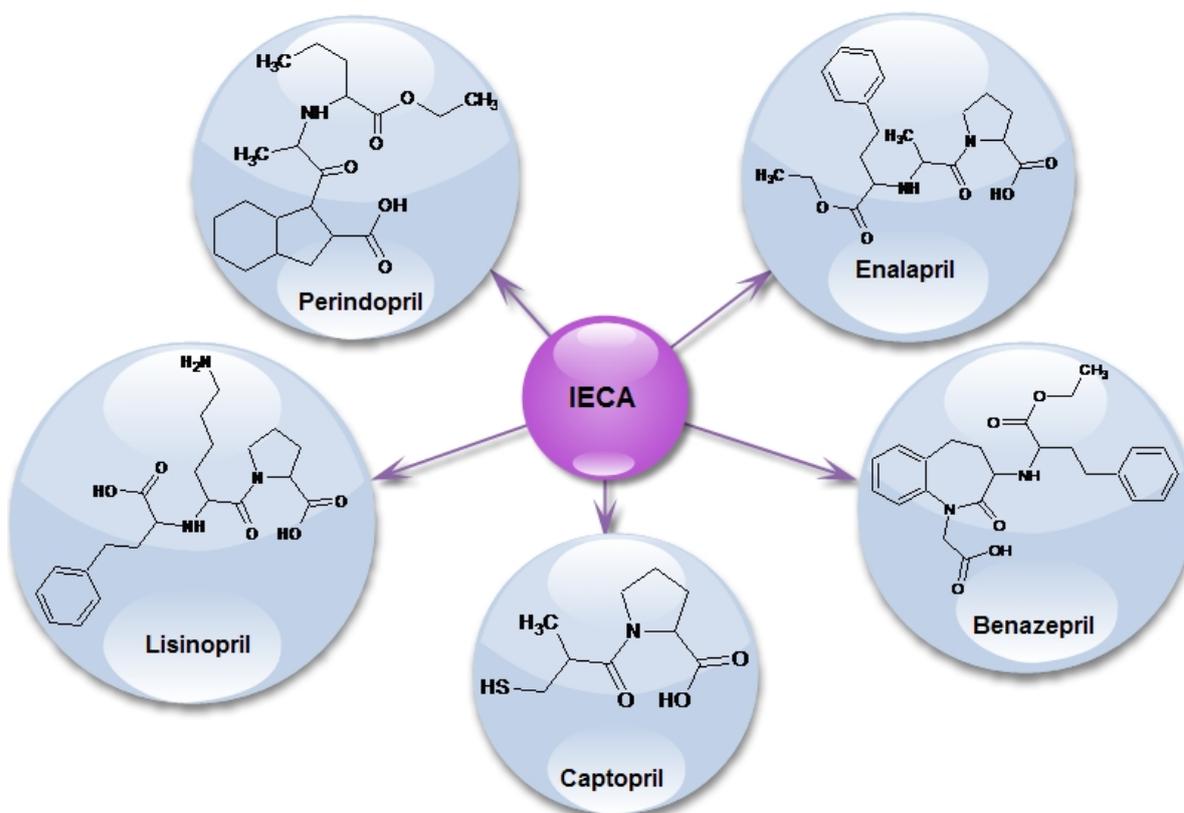
Con el avance de las investigaciones, en la década de 1970, se observó que los individuos con niveles altos de actividad de renina en plasma, incrementaban el riesgo de sufrir infarto de miocardio y accidente cerebrovascular y que, aunque se bloqueara la actividad de la renina, la Ang II se generaba por alguna vía alternativa, y su acumulación producía daños en el corazón y en los riñones<sup>3</sup>.

Se desarrolló entonces una nueva clase de antihipertensivos, cuyo efecto residía en ser antagonistas de la Ang II. El primer péptido que fue administrado en humanos, fue la saralasin, se encontró que esta proteína era capaz de reducir la presión sanguínea en pacientes hipertensos con altos niveles de renina. Desafortunadamente, no era posible el tratamiento de la hipertensión a largo plazo ya que este péptido antagonista tenía una muy baja biodisponibilidad oral y una corta duración de su acción<sup>19</sup>.

Hacia finales de la de los 70 y principio de los 80 se centró el foco de atención en la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), una metaloproteasa de zinc anclada en membrana, con dos dominios homólogos, cada uno con un sitio activo. Esta peptidasa cliva el penúltimo enlace peptídico de varios sustratos oligopeptídicos, entre ellos la Ang I, originando así la Ang II. Para contrarrestar su efecto, se desarrollaron los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)<sup>20</sup>. El primer IECA identificado fue un nonapéptido presente en el veneno de serpiente, que solo podía ser administrado vía intravenosa, lo que originaba una gran desventaja para el

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

tratamiento de una enfermedad crónica como la hipertensión. Para solucionar este problema, se diseñó y sintetizó el captopril, que fue el primer IECA oralmente activo, cuya estructura y actividad se correlacionaba con la del veneno de serpiente<sup>21</sup>. El captopril tiene un residuo de prolina que se une con la enzima y un grupo tiol que le permite la coordinación a los iones Zn(II) de la ECA. Posteriormente al desarrollo de este fármaco, se desarrollaron varios compuestos relacionados estructuralmente, con el fin de usarlos para el tratamiento de la hipertensión. Algunos ejemplos de esta clase de fármacos que contienen el residuo de prolina son el enalapril, benazepril, lisinopril y perindopril (**Fig. 1**). Los IECA se pueden clasificar de acuerdo a aquellos que contienen un grupo tiol, carboxil o fosforil. En conclusión, estos inhibidores interactúan también con los sitios de unión presentes en el sitio activo de la ECA<sup>18</sup>.



**Figura 1.** Principales inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

Posteriormente, a principios de 1980, estudiando la respuesta de la presión sanguínea a la Ang II en ratas, se descubrió que una serie de derivados no peptídicos del ácido 5-imidazol acético bloqueaban el efecto de la Ang II. Se encontraron dos compuestos, el S-8307 y el S-8308, con alta especificidad por el receptor de la Ang II, y se concluyó así que sus estructuras imitaban el farmacóforo de la Ang II<sup>22</sup>. Luego, utilizando el modelado molecular, y a través de una serie inteligente de modificaciones graduales para aumentar la biodisponibilidad oral, selectividad y duración, se obtuvo el losartán, que fue el primer fármaco diseñado de este tipo. En 1995, la FDA aprobó su uso clínico en Estados Unidos, y desde entonces han sido aprobados seis sartanes más<sup>23</sup>. Los principales puntos de inhibición de los diferentes tipos de antihipertensivos se muestran en el **esquema 1**.

### **1.1.1.3.1. Bloqueadores del receptor de la Ang II**

El descubrimiento y desarrollo de los sartanes o bloqueadores del receptor de la angiotensina II (ARBs) es un ejemplo del diseño racional de fármacos, y de cómo ese diseño puede ser utilizado para obtener un mayor conocimiento de los sistemas fisiológicos, permitiendo, en este caso el reconocimiento de los distintos subtipos de receptores de la Ang II a partir de las moléculas con las que interactuaban<sup>21,24</sup>.

Los sartanes, también conocidos como antagonistas de los receptores de la Ang II (ARA II), son un grupo de fármacos ampliamente utilizados en la actualidad en tratamientos clínicos y que están indicados principalmente en el tratamiento de hipertensión leve a moderada, fallas cardíacas crónicas y prevención de infartos secundarios<sup>25</sup>. Actúan bloqueando los efectos de la hormona Ang II, dando como resultado una disminución en la presión sanguínea.

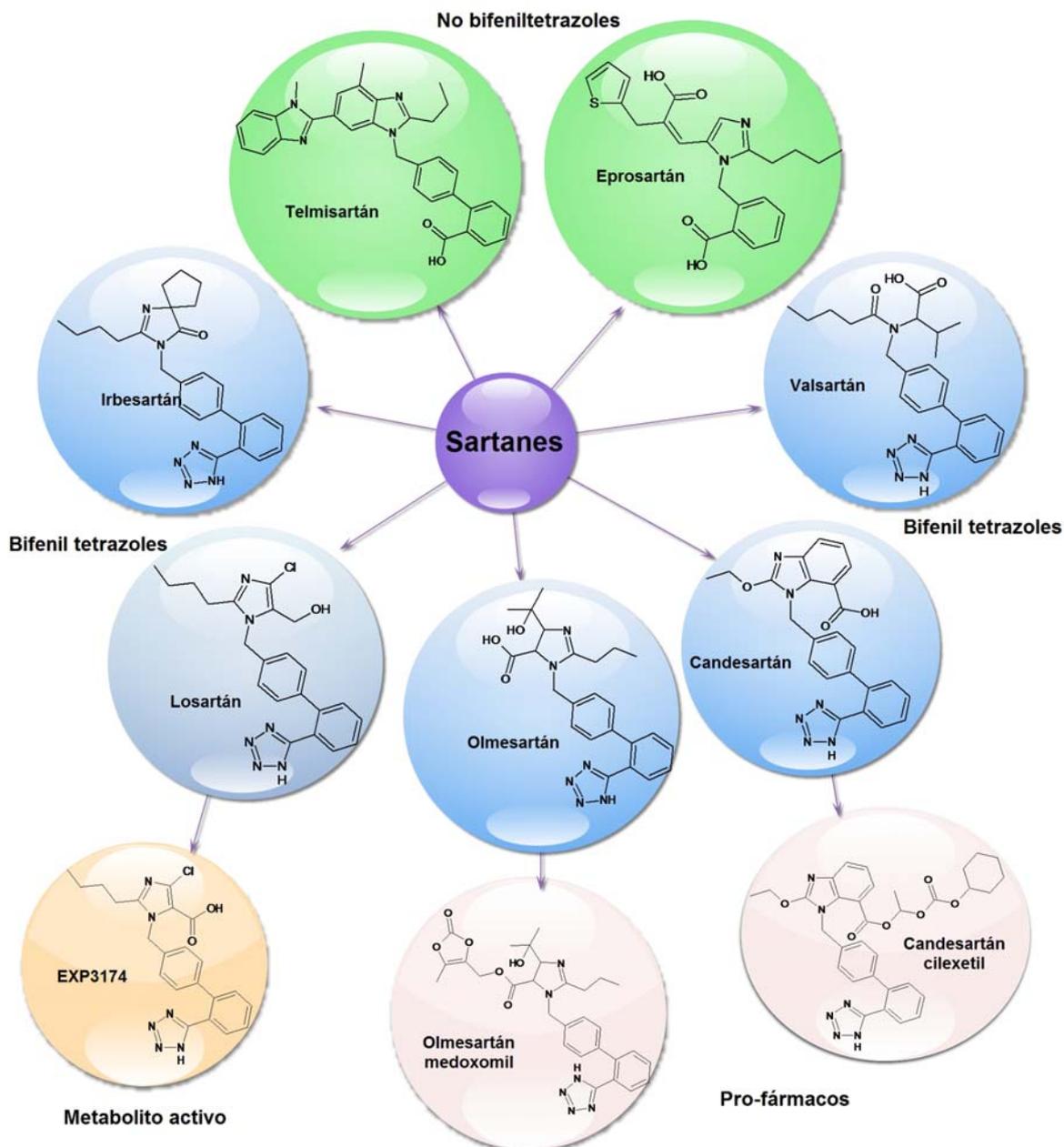
Bloquear los receptores de la angiotensina, como hacen los sartanes, tiene en teoría dos ventajas sobre sólo inhibir la ECA (como actúan los IECA):

- No se produce acumulación de quininas (en especial bradiquininas) ni de Ang I, por lo cual se evitan los posibles efectos adversos derivados de este fenómeno, en especial la tos<sup>26</sup>.
- El bloqueo es más completo, porque no sólo antagoniza la angiotensina II producida por la ECA, sino también la generada por vías enzimáticas alternativas<sup>20</sup>.

La estructura de los sartanes es similar a la de la Ang II, se unen a los receptores AT<sub>1</sub> produciendo un bloqueo competitivo y selectivo e inhibiendo las acciones mediadas por la Ang II, independientemente de cuál sea su vía de síntesis. Su afinidad por los receptores AT<sub>1</sub> es 10.000-30.000 veces mayor que por los AT<sub>2</sub>, por lo que en concentraciones fisiológicas no bloquean a los AT<sub>2</sub><sup>27-36</sup>. En presencia de un sartán, la Ang II sintetizada puede estimular los receptores AT<sub>2</sub>, que no se encuentran bloqueados y cuya expresión, además, puede haberse incrementado tras el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>.

Dado que los sartanes imitan la Ang II, la mayoría de ellos, incluyendo el losartán, tienen estructuras moleculares comunes (**Fig. 2**). En general, la mayoría de los sartanes están compuestos por un núcleo heterocíclico apropiadamente sustituido, acoplado a un grupo ácido (carboxílico o tetrazólico) conteniendo también un sistema bifenílico y una unión metileno. Algunos de ellos están relacionados estructuralmente, por ejemplo, si el cloruro y el grupo etóxido del losartán se reemplazan por un grupo ciclopentilo, se obtiene el irbesartán. Losartán, irbesartán, valsartán y candesartán contienen un grupo tetrazol unido a un metilo y a un bifénilo.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos



**Figura 2.** Principales sartanes (bifenil tetrazoles y no bifeniltetrazoles) con sus derivados (profármacos o metabolito activo).

### 1.1.1.3.1.1. Diferencias entre los distintos sartanes

Desde un punto de vista farmacológico, las diferencias existentes entre los distintos sartanes podrían ser farmacodinámicas o farmacocinéticas.

#### 1.1.1.3.1.1.1. Diferencias farmacodinámicas:

**1) Diferencias estructurales:** Los sartanes pertenecen a dos grupos químicos: los bifeniltetrazoles, entre los que se incluyen losartán, valsartán, irbesartán y candesartán, y los no bifeniltetrazoles, que incluyen eprosartán y telmisartán. Candesartán cilexetil y olmesartán medoxomilo son profármacos que se convierten durante el proceso de absorción en candesartán y

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

olmesartán, respectivamente, mientras que losartán es un fármaco activo que se convierte en un metabolito activo, el EXP3174 (**Fig. 2**).

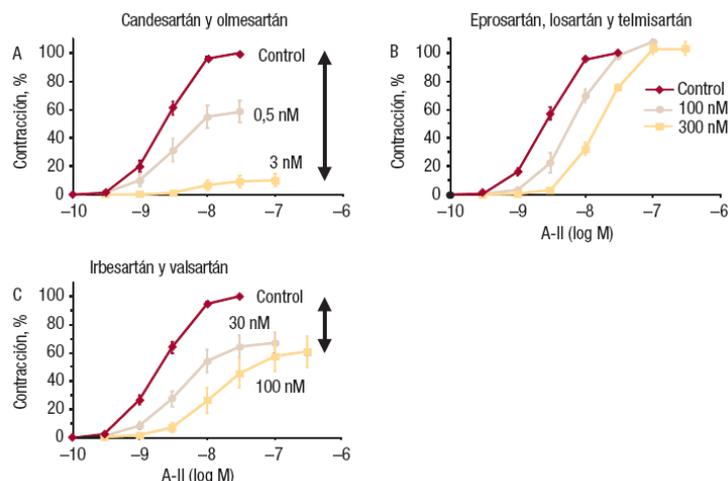
**2) Diferencias en potencia y de selectividad:** Estudios de fijación realizados en membranas de distintos tejidos (hepatocitos de rata, aorta de conejo, pulmón de rata) permiten analizar la potencia de los sartanes para desplazar a la [<sup>125</sup>I]Ang-II (angiotensina marcada con <sup>125</sup>I) de su lugar de unión a los receptores AT<sub>1</sub> (Ki) y para inhibir en un 50% la amplitud de la respuesta vasoconstrictora en preparaciones vasculares aisladas (IC<sub>50</sub>). Como muestra la **tabla 1**, existen importantes variaciones en la potencia de los sartanes, que explican las marcadas diferencias en las dosis efectivas de estos fármacos<sup>28-36</sup>. En cualquier caso, su afinidad por el receptor AT<sub>1</sub> se encuentra en el rango nanomolar, lo que confirma la gran potencia de los sartanes para bloquear la unión de la Ang II a sus receptores AT<sub>1</sub>.

**Tabla 1.** Diferencias de afinidad e interacción con el receptor AT<sub>1</sub>

Fármaco	Ki (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	V <sub>dis</sub> (min)	Índice T/P
Candesartán	0,49-0,64	0,1	152	>80
Eprosartán	1,4-3,9	9,43	-	70-85
EXP3174	1,3-3,7	-	31	-
Irbesartán	0,8-1,5	8,5	17	70
Losartán	5-40	8,4	2,5	50-70
Olmesartán	0,8	-	-	60-80
Telmisartán	0,83-3,7	0,33	75	>50
Valsartán	2,7-3,2	9,26	56	66

Ki: constante de inhibición del receptor AT<sub>1</sub>. IC<sub>50</sub>: concentración que inhibe en un 50% la contracción inducida por Ang II. V<sub>dis</sub>: velocidad de disociación del receptor. Índice T/P: índice pico/valle. Extraído de <sup>37</sup>

**3) Diferencias en el tipo de bloqueo:** En arterias aisladas, la adición de concentraciones crecientes de Ang II al medio de incubación estimula los receptores AT<sub>1</sub> y produce una respuesta vasoconstrictora que nos permite construir una curva dosis-respuesta (CDR) característica. Si tras incubar las arterias con un sartán repetimos la CDR, podemos ver que las curvas adoptan 3 morfologías bien distintas<sup>28-36,38</sup> (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Distintos tipos de curvas dosis-respuesta de los sartanes a la Ang II<sup>39</sup>

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

En presencia de dosis crecientes de losartán, eprosartán y telmisartán se produce un desplazamiento progresivo de la CDR de la Ang II hacia la derecha, pero no se modifica la pendiente de las CDR y la Ang II sigue produciendo una respuesta vasoconstrictora máxima. Estas características indican que estos fármacos se comportan como antagonistas competitivos y reversibles que presentan una rápida velocidad de disociación del receptor AT<sub>1</sub> (**tabla 2**), ya que si eliminamos el fármaco del medio de incubación la Ang II vuelve a producir su respuesta máxima al cabo de unos 15 min. En presencia de candesartán u olmesartán se observa cómo a medida que aumenta su concentración en el medio de incubación se produce una progresiva reducción del efecto máximo de la Ang II y un desplazamiento de las CDR hacia abajo y hacia la derecha, de tal forma que la respuesta vasoconstrictora de la Ang II se bloquea por completo. Si ahora eliminamos el fármaco y adicionamos Ang II al medio de incubación, es necesario que transcurran varias horas para que la respuesta vasoconstrictora de la Ang II vuelva a alcanzar su máximo. Ello indica que el candesartán se une con una alta afinidad por el receptor AT<sub>1</sub>, pero se disocia del mismo muy lentamente. Los restantes sartanes, incluido el metabolito EXP3174, producen un desplazamiento progresivo de la CDR de la Ang II hacia la derecha sin modificar su pendiente, pero a la respuesta máxima de la Ang II disminuye en un 30-50%<sup>28-36</sup>. Estas distintas morfologías se deben a la diferencias en la velocidad con la que cada sartán se disocia del receptor. Como se muestra en la **tabla 2**, la velocidad de disociación del losartán de los receptores AT<sub>1</sub> es de 2,5 min, por lo que al añadir concentraciones crecientes de Ang II se establece rápidamente un nuevo estado de equilibrio y se alcanza la respuesta máxima. En el otro extremo está candesartán, que se disocia muy lentamente (> 2 h), mientras que otros fármacos (valsartán e irbesartán) ocupan una situación intermedia. Teóricamente, un sartán que se libere muy lentamente del receptor AT<sub>1</sub> tendría más posibilidades de controlar la presión a lo largo de las 24 h y tras la supresión del tratamiento permitiría que la presión arterial se recupere más lentamente que los ARA-II que se disocian muy rápidamente, aspectos que se han demostrado en modelos experimentales<sup>40</sup>.

**Tabla 2.** Características farmacocinéticas de los sartanes<sup>25,27-37,41</sup>

	<i>Candesartán n cilixetil</i>	<i>Eprosartán n</i>	<i>Irbesartán n</i>	<i>Losartán n</i>	<i>Olmesartán medoxomil o</i>	<i>Telmisartán n</i>	<i>Valsartán n</i>
<b>Profármaco</b>	Si	No	No	No	Si	No	No
<b>Biodisponibilidad (%)</b>	42	15	60-80	33	25	50	23
<b>Semivida (h)</b>	9	5-7	12-17	0,5-2	14	24	6-9
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	3-4	1-2	1,5-2	0,5-2	1,5-2,5	2-3	1-2
<b>UPP (%)</b>	99	98	95	99	99	99	95
<b>Metabolito Activo</b>	Candesartán	No	No	EXP3174	Olmesartán	No	No
<b>Tipo de antagonismo</b>	NC	C	NC	C	-	NC	NC
<b>Velocidad de disociación</b>	Lenta	Rápida	Lenta	Rápida	-	Lenta	Lenta
<b>Eliminación</b>	30	7	20	30	35-50	2	15

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

renal (%)							
Eliminación biliar (%)	60	90	80	70	50-65	98	85
Dosis (mg/día)	4-32	600	75-300	12,5-100	10-40	40-80	80-160

T<sub>max</sub>: tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima. UPP: unión a proteínas plasmáticas. C: competitivo. NC: no competitivo.

**4) Diferencias en su efectividad clínica. Efectos antihipertensivos:** En pacientes hipertensos, los sartanes disminuyen las resistencias vasculares periféricas y la presión arterial<sup>27,29-36,42</sup>. La disminución de la presión arterial alcanza su efecto máximo al cabo de unas 2-4 h y valores estables al cabo de 4-6 semanas, controlan la presión arterial a lo largo de 24 h tras la administración de una dosis diaria.

En estudios comparativos, la efectividad de los sartanes es similar a la de los IECA (captopril, enalapril, lisinopril), bloqueadores beta (atenolol), antagonistas del calcio (amlodipino, felodipino, nifedipino) y tiacidas (hidroclorotiacida)<sup>29-36</sup>. Diversos ensayos clínicos han demostrado que candesartán, irbesartán, olmesartán y telmisartán son más efectivos que el losartán para reducir la presión arterial<sup>29-36,43</sup>. Además, mientras que los efectos del candesartán persistían claramente más allá de 24 h, los del losartán disminuían rápidamente.

### 1.1.1.3.1.1.2. Diferencias en sus propiedades farmacocinéticas

Las principales características farmacocinéticas de los sartanes se resumen en la **tabla 2**.

El losartán es el prototipo de antagonista del receptor AT<sub>1</sub>, altamente selectivo. Se obtuvo por derivados de las series de ácido 5-benzimidazol acético de Takeda los cuales habían demostrado ser por sí mismos, antagonistas débiles de la Ang II<sup>29</sup>. El losartán compite por la unión al receptor AT<sub>1</sub>, mientras que no tiene afinidad, ni propiedades de antagonismo parcial para el receptor AT<sub>2</sub>. Su principal metabolito activo es el EXP3174. Cuando se lo administra de manera intravenosa, EXP3174 es entre 10 y 20 veces más potente que el losartán y tiene una mayor duración de su acción. El losartán se absorbe bien por vía oral, pero sufre un importante efecto de primer paso hepático, por lo que su biodisponibilidad es sólo del 33%, y alcanza su C<sub>máx</sub> al cabo de 1 h. Se une en un 99% a proteínas plasmáticas y se biotransforma rápidamente en el hígado; el 14% de la dosis administrada se convierte en el EXP3174. Éste alcanza su C<sub>máx</sub> al cabo de 2-4 horas y presenta una semivida más prolongada (9 h) que el losartán, por lo que es la causa de muchas de las acciones de éste. El losartán se elimina por vía biliar (65% en heces) y por secreción tubular renal (35%), aunque menos del 5% se encuentra de forma inalterada en orina.

El valsartán es un antagonista no heterocíclico en el cual el imidazol del losartán ha sido reemplazado por un aminoácido acetilado. Se absorbe de forma muy variable por vía oral (biodisponibilidad 23%); alcanza su C<sub>máx</sub> al cabo de 1-2 h. La absorción del fármaco disminuye un 40% cuando se ingiere

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

con la comida, por lo cual es el único sartán cuya ingesta está indicada en ayunas. Se une en un 95% a proteínas plasmáticas y se elimina por heces (85%) y orina (15%); su semivida es de 6-9 h<sup>39</sup>.

El candesartán es un potente antagonista de acción prolongada<sup>44</sup>. A causa de su pobre absorción oral, se sintetizó un ester del candesartán que actúa como profármaco, llamado candesartán cilexetil, se hidroliza rápidamente en la pared intestinal y en el hígado originando el metabolito activo (candesartán) cuya afinidad por los receptores AT<sub>1</sub> es 80 veces más grande que el losartán y cerca de 10 veces más grandes que el EXP3174. La absorción del candesartán es rápida y alcanza concentraciones plasmáticas máximas (C<sub>máx</sub>) a las 3-4 h de su administración. Se une a proteínas plasmáticas en un 99%, presenta una semivida de 9 h y se elimina sin biotransformar por vía renal (56%) y fecal (26%); el resto (17%) se biotransforma en el hígado en metabolitos inactivos<sup>39</sup>.

El telmisartán es directamente activo, se absorbe rápidamente por vía oral (biodisponibilidad = 43%), alcanza su C<sub>máx</sub> al cabo de 0,5-1 h. Se une en un 99% a proteínas plasmáticas y se biotransforma en el hígado en metabolitos inactivos; el 98% de la dosis administrada se elimina por vía fecal, por lo que no es preciso reajustar la dosis en pacientes con insuficiencia renal moderada; su semivida es de 24 h<sup>39</sup>.

El irbesartán es un fármaco oralmente activo que tiene una acción más prolongada que el losartán y el valsartán<sup>45</sup>, tiene una alta afinidad por el receptor AT<sub>1</sub> mientras que no tiene afinidad por el receptor AT<sub>2</sub><sup>46</sup>. El irbesartán se absorbe de forma rápida y completa por vía oral y su biodisponibilidad (60-80%) no se modifica por alimentos o antiácidos, alcanzando su C<sub>máx</sub> al cabo de 1,5-2 h. Se une en un 95% a proteínas plasmáticas y se biotransforma en el hígado, donde sufre procesos de oxidación y glucuronización. Presenta una semivida de 15-17 h y se elimina en forma de metabolitos inactivos por la bilis (80%) y la orina (20%)<sup>39</sup>.

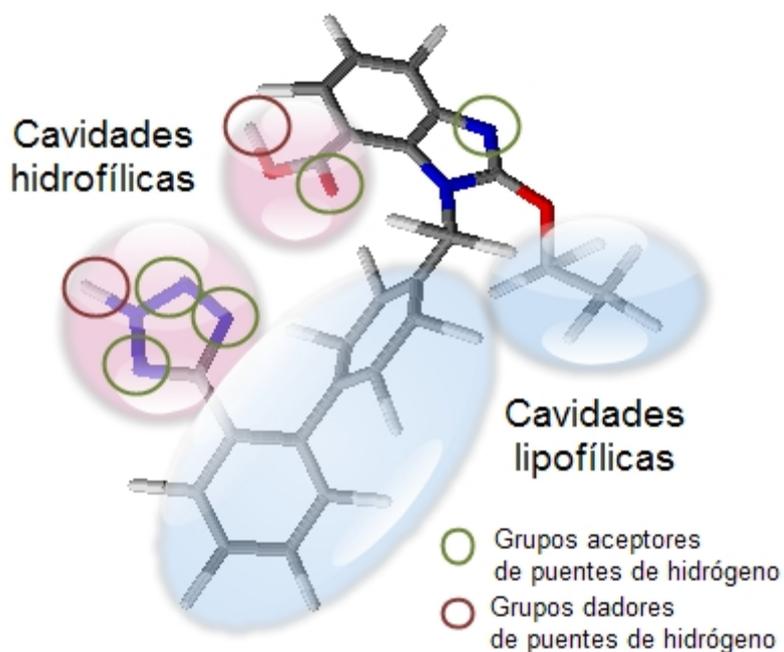
El eprosartán se absorbe de forma incompleta por vía oral (biodisponibilidad 15%), alcanzando su C<sub>máx</sub> al cabo de 1-2 h. Se une en un 98% a proteínas plasmáticas y presenta una semivida de 5-7 h. El fármaco no se biotransforma por el sistema citocromo P450 en el hígado, por lo que un 90% de la dosis administrada se elimina sin modificar por heces y un 10% por vía renal.

El olmesartán medoxomil es un profármaco que en la pared intestinal sufre una rápida desesterificación y se convierte en su metabolito activo, el olmesartán. Presenta una biodisponibilidad oral del 25%, y alcanza por esta vía su C<sub>máx</sub> al cabo de 2 h. Se une en un 99% a proteínas plasmáticas, se excreta sin biotransformar por vía biliar (50-65%) y renal (35-50%) y presenta una semivida de unas 14 h.

### 1.1.1.3.1.2. Relación estructura-actividad

Una familia de fármacos que presenta una actividad biológica concreta, comparte un grupo de átomos o un fragmento estructural que es el responsable de su acción. Este fragmento, también llamado farmacóforo, es el mismo en la mayoría de los sartanes, por lo que la diferencia en sus efectos bioquímicos y fisiológicos, se le atribuye a los diferentes sustituyentes de las moléculas.

La actividad del fármaco depende de su afinidad por el sitio del receptor  $AT_1$  y del período de tiempo que se une a ese sitio. En principio, cuanto mayor sea el número de interacciones con el receptor, mayor será su actividad antagonista *in Vitro*. Bajo esta premisa, se han estudiado los sartanes teniendo en cuenta los grupos funcionales que los forman y su relación con las regiones lipofílicas o hidrofílicas del receptor  $AT_1$ . A modo de ejemplo, se tomó el candesartán en el que se marcaron las zonas típicas de interacción con el receptor  $AT_1$  (**Fig. 4**)



**Figura 4.** Estructura del candesartán con sus principales regiones de interacción con el receptor  $AT_1$ <sup>25,47</sup>.

Ohno y colaboradores han propuesto mediante análisis computacional el tipo de interacción entre los distintos aminoácidos que forman parte del receptor  $AT_1$  (**Tabla 3**) y los tres grupos funcionales que comparten la mayoría de los sartanes y de los que depende su bioactividad<sup>48</sup>:

- **Anillo benzimidazólico:** Permite una interacción del tipo lipofílica por su extremo bencílico, mientras que por su extremo imidazólico interacciona con los aminoácidos Lys<sup>199</sup>, Tyr<sup>113</sup>, Gln<sup>257</sup> del receptor mediante uniones del tipo puente de hidrógeno en donde los átomos de nitrógeno se comportan como aceptores. Este grupo no está presente en el EXP3174, en el irbesartán, ni en el olmesartán, fue reemplazado en cada caso por un sustituyente distinto, por

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

lo que su interacción con los aminoácidos mencionados anteriormente será diferente.

- **Bifenil metilo:** Es la región hidrofóbica más importante de la molécula, interacciona con los aminoácidos Phe<sup>182</sup> y Phe<sup>171</sup> presentes en una de las cavidades lipofílicas del receptor. Es un sustituyente que proporciona muy buena absorción oral, y es el único que permanece invariable en todos los sartanes, con excepción del eprosartán.

- **Anillo tetrazólico:** Es una de las regiones más polares de la molécula, el anillo se une a través de su hidrógeno al receptor AT<sub>1</sub> formando enlaces del tipo puente de hidrógeno con el aminoácido Tyr<sup>184</sup>. Simultáneamente, el anillo también forma enlaces del tipo ión-dipolo con el aminoácido His<sup>256</sup> del receptor. Esta estructura, sin embargo, no es común a todos los sartanes, ya que en el caso del telmisartán ha sido exitosamente reemplazado por un ácido carboxílico, manteniendo interacciones similares con los aminoácidos Tyr<sup>184</sup> e His<sup>256</sup>.

**Tabla 3.** Interacciones de los distintos sartanes con los aminoácidos del receptor AT<sub>1</sub><sup>48</sup>.

Residuo	Telmisartán	Candesartán	Valsartán	EXP3174	Irbesartán
Phe <sup>171</sup>	CH	CH	HC	HC	HC
Phe <sup>182</sup>	CH	CH	HC	HC	HC
Tyr <sup>184</sup>	PH	PH	PH	PH	PH
Lys <sup>199</sup>	ID	ID	ID	ID	ID
His <sup>256</sup>	ID	ID	ID	ID	ID
Tyr <sup>113</sup>	PH	PH	PH	PH	
Gln <sup>257</sup>	PH	PH	PH		
Val <sup>116</sup>	CH				
Phe <sup>204</sup>	CH				
Phe <sup>208</sup>	CH				
Trp <sup>253</sup>	CH				

CH: contacto hidrofóbico. PH: puente de hidrógeno. ID: ión-dipolo.

De esta tabla se puede extraer que el telmisartán es el que mayor cantidad de interacciones con el receptor AT<sub>1</sub> presenta. Este modo único de unión se debe a contactos hidrofóbicos que puede establecer su segundo grupo benzimidazólico (el más distante de la función ácida) con los aminoácidos Val<sup>116</sup>, Phe<sup>208</sup> y Trp<sup>253</sup>. Así, la gran lipofilicidad molecular<sup>49</sup> y el gran volumen de distribución<sup>50</sup> del telmisartán se debe en parte al dominio benzimidazólico distante. Además, fue reportado que el telmisartán tenía la menor constante de disociación del receptor AT<sub>1</sub>, comparado con varios sartanes. Esta única porción benzimidazólica distante del telmisartán, podría también explicar su gran actividad antagonista del receptor AT<sub>1</sub> *in Vitro*<sup>51</sup>.

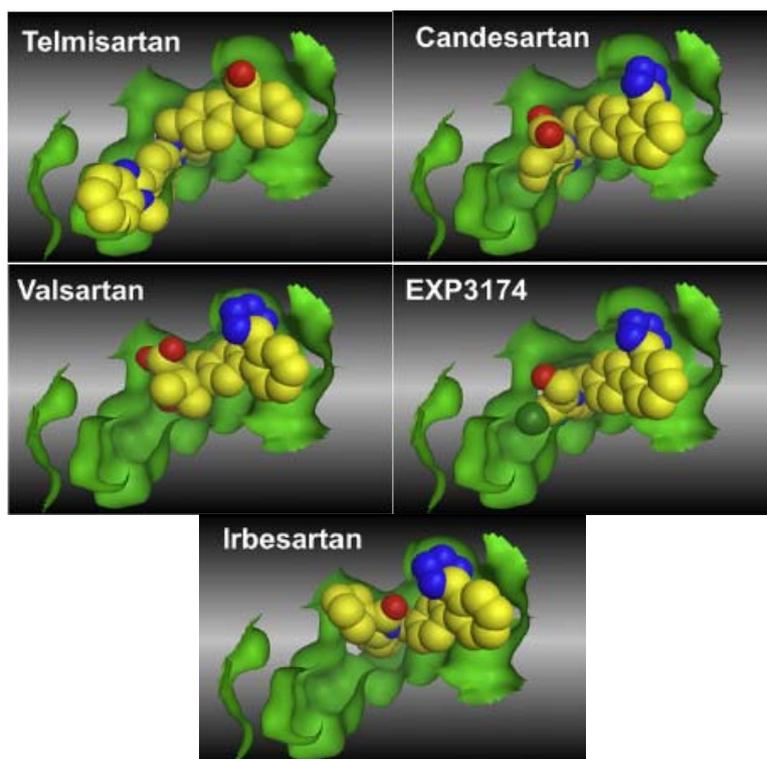
El estudio de Ohno y colaboradores no menciona diferencias en la afinidad del candesartán con respecto al valsartán, sin embargo, Bhuiyan y colaboradores, que compararon la interacción del candesartán, valsartán y

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

losartán con el receptor  $AT_1$ <sup>52</sup>, establecieron también por métodos computacionales que a causa de su conformación, el candesartán tiene un número mayor de sitios que interaccionan con el receptor con respecto al valsartán, lo que le otorga una mayor afinidad por el receptor  $AT_1$ , mientras que el losartán es el que menor cantidad de interacciones presentaba y por lo tanto el de menor afinidad por el receptor  $AT_1$ . Berellini et. al. concuerdan con respecto a la relación entre el candesartán y el losartán, ellos concluyeron que el candesartán, debido a sus interacciones hidrofóbicas muy fuertes se une de una manera mucho más eficiente que el losartán al receptor  $AT_1$ <sup>47</sup>.

El irbesartán según Ohno y colaboradores es el que menor cantidad de interacciones con el receptor presenta y por lo tanto se espera que tenga una baja afinidad por el receptor  $AT_1$ , aunque esta baja afinidad no se comprueba en ensayos *in-vitro*, en los que se observa una baja constante experimental de inhibición (**Tabla 1**).

La conformación propuesta por Ohno y colaboradores de los sartanes dentro del receptor  $AT_1$  se muestra en la **figura 5**. En todos los casos se observa que la conformación del sartán tiende a cerrarse uniendo los extremos hidrofílicos.



**Figura 5.** Modo de unión propuesto para cada sartán al receptor  $AT_1$  (en verde). Los colores amarillo, azul y rojo indican átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno de cada sartán respectivamente<sup>48</sup>.

Desde el punto de vista de la Química de Coordinación, los extremos polares de los sartanes son apropiados para complejar metales formando quelatos o puentes. Si los complejos obtenidos tuvieran una conformación más parecida a la conformación que adopta el sartán dentro del receptor, se podría

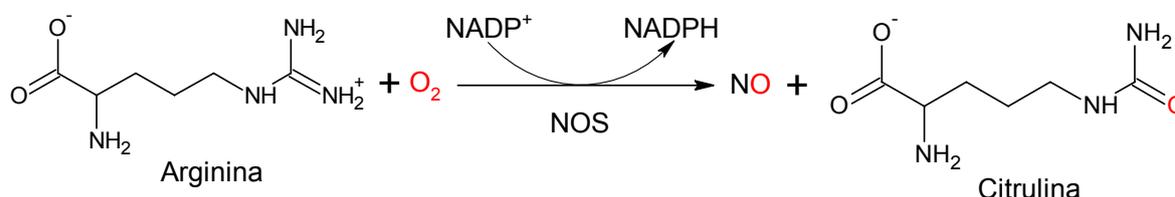
## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

mejorar la afinidad, bloqueando de manera más eficiente el receptor e incrementando la actividad como antihipertensivo del sartán sin complejar.

### 1.1.1.4. Función endotelial

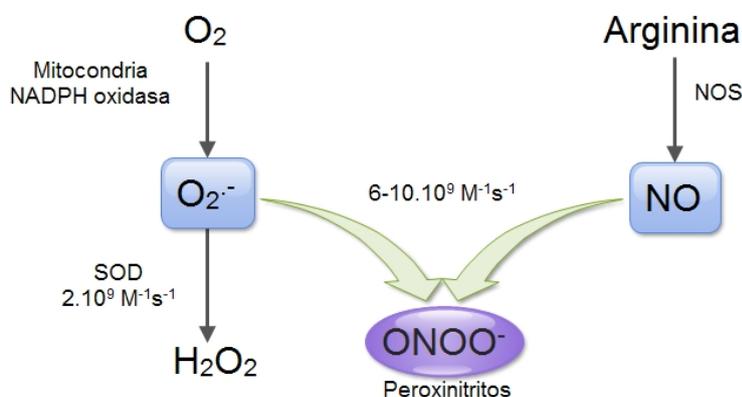
El tejido que recubre los vasos sanguíneos, o endotelio, permite el intercambio de nutrientes y desechos, entre otras múltiples funciones que se encuentran en continua investigación. Son diversos los factores que pueden modificar esas funciones y provocar un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas lo que se conoce como disfunción endotelial que da origen a múltiples enfermedades entre las que se encuentra la hipertensión<sup>53</sup>.

El endotelio es el encargado de producir varios factores de relajación, siendo el más importante y mejor caracterizado, el óxido nítrico (NO) que se produce por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) sobre el aminoácido arginina, produciendo citrulina (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Obtención del óxido nítrico (NO) por la acción de la NO sintasa (NOS) sobre el aminoácido arginina.

Los radicales libres (**sección 1.1.2**) dañan la función endotelial ya que disminuyen la disponibilidad del NO o sus efectos biológicos. La evidencia disponible parece indicar que la disfunción endotelial asociada con la hipertensión primaria o esencial se caracteriza por la disminución de la disponibilidad de NO. Aunque no es la única ruta patológica, uno de los mecanismos más relevantes que causan la disminución de la disponibilidad de NO es la producción de estrés oxidativo. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente aniones superóxido, se combinan y destruyen el NO produciendo peroxinitratos (**Fig. 7**).



**Figura 7.** Reacción de formación de peroxinitratos (ONOO<sup>-</sup>) a partir del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el óxido nítrico (NO).

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

Por otro lado, es posible que la Ang II pueda influir fuertemente en la función o disfunción endotelial, dependiendo de la predominancia o actividad de los dos subtipos de receptores ( $AT_1$  y  $AT_2$ ) o de la disponibilidad de NO. Se sabe que cuando el péptido se une a los receptores  $AT_1$  causa una disminución del NO<sup>54</sup>, mientras que cuando se une al receptor  $AT_2$  puede promover la síntesis de NO en células endoteliales<sup>55</sup>.

Fukai y colaboradores demostraron que la Ang II induce un incremento en los ROS, en particular, el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que conlleva a una disminución de la disponibilidad de NO, dañando la vasodilatación dependiente del endotelio y promoviendo la vasoconstricción. En el organismo, la mayor defensa antioxidante contra el radical  $O_2^{\cdot-}$  son las enzimas superóxido dismutasas (SOD)<sup>56</sup>. Mediante su acción se reducen los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  previniendo así la inactivación oxidativa del NO liberado por el endotelio<sup>57</sup>, ya que la reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con la SOD es mucho más favorable que con el NO ( $k_{SOD} = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $k_{NO} = 6-10 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente). En algunos modelos de ratas con hipertensión inducida por Ang II, el tratamiento con SOD y con compuestos SOD miméticos disminuyeron la presión arterial, lo que sugiere que la inactivación oxidativa del NO contribuye al aumento de la presión sanguínea<sup>58-61</sup>.

Por lo tanto, los fármacos antihipertensivos deben ser reconsiderados también en términos del efecto específico sobre la función endotelial. Los estudios experimentales muestran que la mayoría de los agentes disponibles tienen el potencial de mejorar la relajación endotelio dependiente<sup>62,63</sup> por diversos mecanismos, incluyendo la activación de la enzima NOS, sus propios efectos antioxidantes o mediante la disminución de la producción de ROS<sup>64</sup>.

### **1.1.1.5. Relación sartanes y cáncer**

Aunque se sabe hace un tiempo considerable que la Ang II promueve el crecimiento de tumores y la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, el bloqueo de los receptores de la Ang II por medio de los sartanes solo ha sido considerado en los últimos años como opción terapéutica contra el cáncer<sup>65</sup>.

La Ang II tiene un rol importante en el desarrollo de un tumor, principalmente a través de la regulación de la permeabilidad vascular e infiltración celular, sumado a su rol en la angiogénesis<sup>66,67</sup>. Es decir que el sistema renina-angiotensina, en particular la señalización Ang II-receptor  $AT_1$  juegan un papel protagónico en la migración, invasión y metástasis aunque esta respuesta no es universal a todos los subtipos de tumores.

En modelos preclínicos, la reducción a través del uso de bloqueadores del receptor  $AT_1$  está ligado a la reducción del crecimiento del tumor, así como también la reducción de la vascularización de tumores primarios y metástasis en un amplio rango de lesiones malignas incluyendo cáncer de pulmón, ovarios, pecho, vejiga, próstata, gástrico y renal<sup>68</sup>.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Hipertensión y antihipertensivos

El rol del receptor  $AT_2$  en el desarrollo y la progresión de un tumor, no ha sido determinado de manera concluyente. Se sabe que su activación induce la apoptosis en células sanas, pero aun se requiere una mayor cantidad de estudios para determinar su efecto en células cancerígenas.

A futuro, los antagonistas del receptor  $AT_1$  usados en la clínica actualmente como potentes fármacos antihipertensivos, deberían ser consideradas como herramientas potenciales en futuras estrategias anticáncer<sup>66</sup>.

## **1.1.2. RADICALES LIBRES Y DAÑO OXIDATIVO**

### **1.1.2.1. Definición y clasificación**

Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones desapareados en su última órbita. Puede tener carga positiva, negativa o neutra<sup>69</sup>. El conjunto de estas moléculas se caracteriza por la inestabilidad ya que tienden a reaccionar con moléculas adyacentes donando, sustrayendo o incluso compartiendo sus electrones externos. Estas reacciones no solo producen cambios en la molécula vecina sino que, a veces, un electrón no apareado pasa a la molécula blanco generando un segundo radical libre u otras especies reactivas del oxígeno conocidas como ROS (del inglés, Reactive Oxygen Species) que pueden luego reaccionar con otras moléculas. La alta reactividad de los ROS se debe a la generación de reacciones en cadena amplificando muchas veces sus efectos. Los radicales son descritos en la literatura con un punto como superíndice (R<sup>•</sup>) para distinguirlos de otros metabolitos del oxígeno<sup>70</sup>. Muchas de estas especies están centradas en oxígeno y algunas de ellas en nitrógeno y pueden clasificarse en radicales y no radicales (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Especies reactivas de oxígeno, radicales y no radicales.

<b>RADICALES</b>		<b>NO RADICALES</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Símbolo</b>
Oxígeno (birradical)	O <sub>2</sub> <sup>••</sup>	Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Anión superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Peróxidos orgánicos	ROOH
Hidroxilo	OH <sup>•</sup>	Ácido hipocloroso	HClO
Peroxilo	ROO <sup>•</sup>	Ozono	O <sub>3</sub>
Alcoxilo	RO <sup>•</sup>	Aldehídos	HCOR
Óxido nítrico	NO <sup>•</sup>	Oxígeno singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
		Peroxinitrito	ONOOH

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

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

### **1.1.2.2. Fuentes de ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS)**

Los ROS y las especies reactivas de nitrógeno o RNS (del inglés, Reactive Nitrogen Species) pueden ser producidos por fuentes endógenas o a partir de sustancias exógenas. Las potenciales fuentes endógenas incluyen mitocondrias, metabolismo del citocromo P-450, peroxisomas y activación celular inflamatoria<sup>71</sup>.

La mitocondria se encuentra particularmente involucrada en el metabolismo de la célula mediante señales de transducción y la regulación de la producción de ROS. Esta producción, a su vez está modulada por varios factores tales como la cadena de transporte de electrones, el contenido de antioxidantes liposolubles, hidrosolubles, la concentración de O<sub>2</sub> y NO y la disponibilidad de dadores de electrones. Además de las ROS, las mitocondrias son una fuente importante de RNS derivadas del NO<sup>72</sup>.

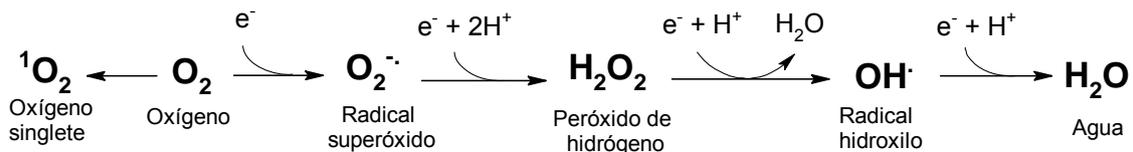
Los microsomas y peroxisomas son también fuente de ROS. Los primeros son responsables del 80 % de la concentración de peróxido de hidrógeno producido *in vivo* en sitios hiperóxicos. Una fuente endógena adicional de ROS son los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. Los macrófagos activados a través del “estallido respiratorio” provocan un aumento rápido pero transitorio de varios ROS entre los que se encuentran: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sup>•</sup>.

Los factores externos que incrementan los niveles de ROS y RNS son la contaminación ambiental (agua y aire), el humo de cigarrillo, el alcohol, los metales pesados o metales de transición (Cd, Hg, Fe, As, Pb), ciertos fármacos (ciclosporina, gentamicina, bleomicina), los solventes industriales, la cocción (carne ahumada, aceite usado, grasas) y la radiación (UV, gamma, rayos X). Después de penetrar en el cuerpo por diferentes vías estos compuestos son metabolizados o descompuestos a radicales libres<sup>73</sup>.

### **1.1.2.3. Química y bioquímica de los principales ROS y RNS**

El fenómeno de la toxicidad del oxígeno, referido como la paradoja de la aerobiosis, es inherente a su estructura atómica. El oxígeno molecular es un birradical que genera agua tras la adición secuencial de cuatro electrones y cuatro protones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En este proceso, en el que se produce gran cantidad de energía en forma de ATP, pueden también generarse moléculas parcialmente reducidas con uno, dos y tres electrones. Todas estas formas de ROS (**Fig. 8**) causan lesiones oxidativas a las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN). Las lesiones se manifiestan como peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas, modificaciones en el ADN (alteración de bases, roturas de las cadenas, intercambios entre las cromátidas hermanas, etc.), cruzamientos entre las proteínas y el ADN, carbonilación proteica y pérdida de los grupos -SH de las proteínas, etc.

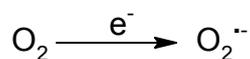
## 1.1. INTRODUCCIÓN: Radicales libres y daño oxidativo



**Figura 8.** Esquema general de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Debido a su importancia biológica, algunas de estas ROS, como el radical superóxido, el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, y los radicales orgánicos, en conjunto con la RNS más abundante, el óxido nítrico, se detallan a continuación:

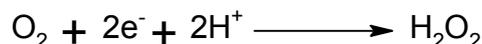
- **Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):** Este radical es producido en el cuerpo durante la respiración aeróbica, a través de reacciones enzimáticas (xantinaoxidasa, la citocromo P-450, NADPH-oxidasa) o no enzimáticas (metabolismo de ciertas drogas, etc.)



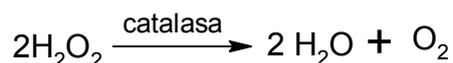
Por sí mismo no es tan reactivo sobre biomoléculas como proteínas, polipéptidos o ADN (ácido desoxirribonucleico) pero puede ayudar en la generación de otros radicales como radical  $OH^{\cdot}$  y peroxinitrito (**Fig. 7**). Dentro de los mecanismos biológicos para eliminar este radical, el de mayor importancia es el que intervienen las enzimas superóxido dismutasas (SOD), catalizando la siguiente reacción y aumentando su velocidad aproximadamente cuatro órdenes de magnitud en sistemas biológicos:



- **Peróxido de hidrógeno:** Puede generarse por dismutación del superóxido, tanto espontáneamente, como por acción de la SOD (mencionado anteriormente). El  $H_2O_2$  puede generarse también por la reducción enzimática del oxígeno, según la siguiente reacción:



Para eliminar este producto tóxico, existen dos enzimas fundamentales, que suelen trabajar en conjunto con las SOD que son la catalasa y la glutatión peroxidasa que catalizan la descomposición del  $H_2O_2$  en agua y otros productos, según:



- **Radical hidroxilo:** Es un radical ampliamente reactivo, es considerado la especie más oxidante y tiene una vida media de menos de 1 ns en solución acuosa. Así, *in vivo*, reacciona cerca de su sitio de formación y puede afectar ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, principalmente uniéndose a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. La producción de este radical cerca

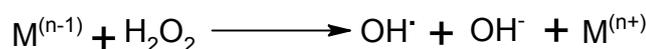
## 1.1. INTRODUCCIÓN: Radicales libres y daño oxidativo

del ADN podría conducir al mismo a reaccionar con las bases del ácido nucleico o con el esqueleto de desoxirribosa produciendo daño en las bases o rotura de las cadenas<sup>71</sup>.

El radical hidroxilo puede formarse mediante varias reacciones. Entre ellas, descomposición del agua por radiación ionizante para generar átomos de hidrógeno y OH<sup>•</sup>, la descomposición fotolítica de alquil hidroperóxidos, y la reacción de Haber-Weiss, catalizada por metales, que genera radicales OH<sup>•</sup> a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En el primer paso de la reacción se produce la reducción de un metal, típicamente hierro y la oxidación del superóxido a oxígeno molecular.



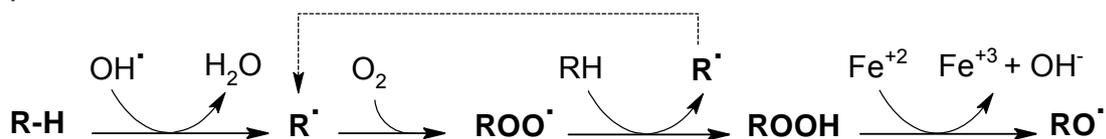
Y en un segundo paso ocurre una reacción de Fenton:



La reacción global que ocurre es:



- **Radicales orgánicos: (R<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>):** Son especies de alta energía con un potencial de reducción en el rango de +0,77 a 1,44 V. Los ROO<sup>•</sup> participan en el clivaje del ADN y en la modificación de esqueletos proteicos, también actúan sinérgicamente con el radical superóxido para dañar al ADN<sup>71</sup>. La química de este tipo de moléculas depende de la naturaleza del grupo R, del medio ambiente local, de la concentración de oxígeno y otros reactivos. Se producen cuando las ROS atacan a moléculas orgánicas, particularmente lípidos insaturados, generando especies reactivas de estas moléculas que a su vez dañan a moléculas vecinas produciendo una reacción en cadena como la que se describe a continuación:



- **Óxido nítrico (NO<sup>•</sup>):** es un radical reactivo muy abundante que actúa en una variedad de procesos biológicos, entre los cuales se encuentran: neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso (**sección 1.1.1.4**) y regulación inmune. A nivel del sistema nervioso, la molécula gaseosa actúa como mensajero sintetizándose en cuestión de segundos y difundiendo rápidamente a las neuronas adyacentes. Sin embargo, a través de su combinación con el radical superóxido para dar peroxinitrito (**Fig. 7**), ejerce daño tisular<sup>74</sup>. La sobreproducción de especies reactivas de nitrógeno es conocido como “estrés nitrosativo” y ocurre cuando la generación de estas especies en un sistema excede la habilidad del mismo de neutralizarlos y eliminarlos. El estrés nitrosativo puede conducir a reacciones de nitrosilación las cuales pueden llevar a la alteración de la estructura de las proteínas e inhibir su normal funcionamiento.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Radicales libres y daño oxidativo

El NO<sup>•</sup> es generado en los tejidos por óxido nítrico sintasas específicas (NOSs), que metabolizan arginina a citrulina (**Fig. 6**) vía reacción oxidativa de cinco electrones<sup>75</sup>. Este radical tiene una vida media de unos pocos segundos en ambientes acuosos. Está bien establecido que la diferencia entre los efectos protectores y deletéreos del mismo está determinada por la concentración, tiempo de exposición y tipo celular<sup>76</sup>.

### **1.1.2.4. Estrés oxidativo**

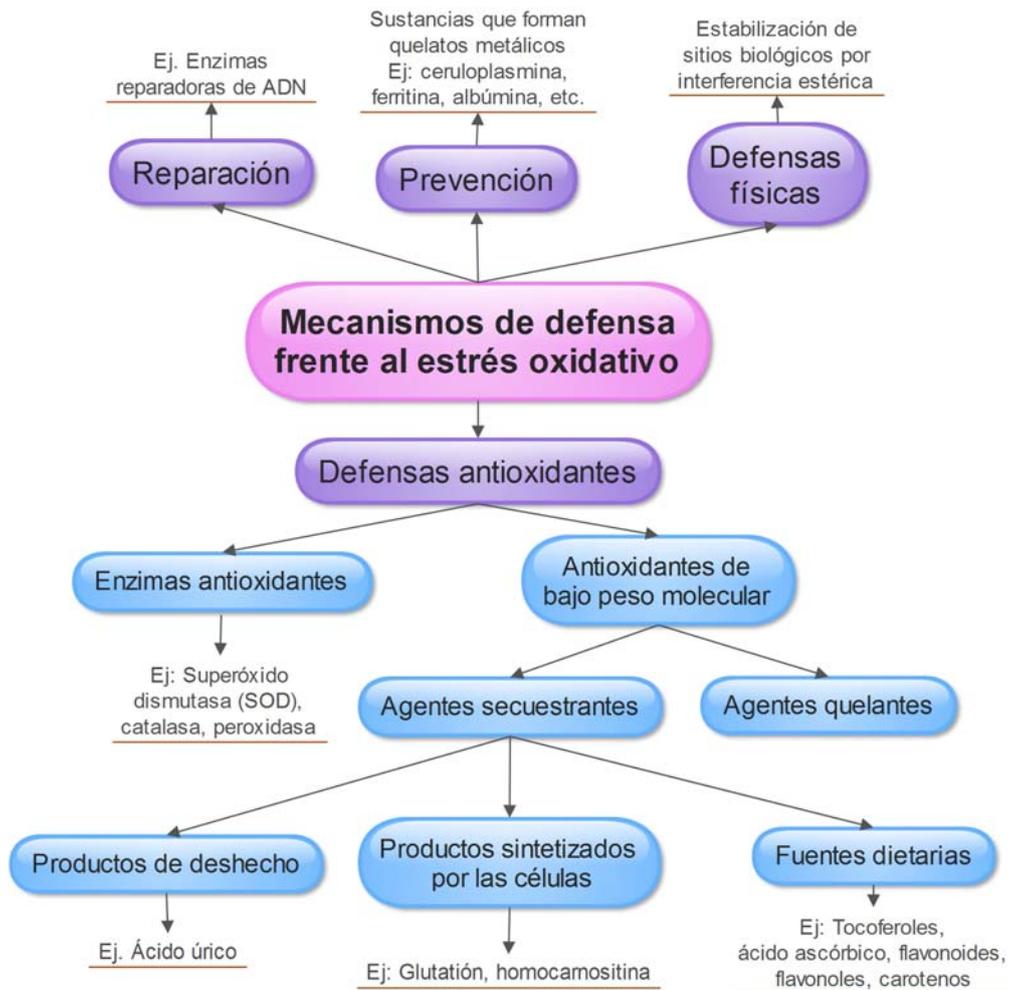
El estrés oxidativo frecuentemente se define como un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos (oxidantes) y su eliminación por mecanismos protectores (antioxidantes)<sup>77</sup>, es decir, este estado se traduce en un aumento de la producción de oxidantes o una disminución en la producción de antioxidantes. El daño incluye modificación oxidativa de macromoléculas, muerte celular por necrosis o apoptosis, lesión estructural de tejidos, etc. Particularmente lípidos, proteínas y ADN son moléculas “blanco” para el mecanismo de oxidación. Las modificaciones en el ADN pueden conducir a mutaciones, rupturas de doble o simple cadena y eventualmente a muerte celular. Además, las oxidaciones en las proteínas conducen a un funcionamiento defectuoso de enzimas, las cuales son incapaces de cumplir con sus funciones. Por su parte los lípidos, que son constituyentes importantes de las membranas celulares y los ácidos grasos insaturados, son fácilmente oxidados pudiendo comenzar una cadena de reacciones que conducen a comprometer la integridad celular<sup>78</sup>.

Aunque los ROS están predominantemente implicados en el daño celular también desempeñan un papel fisiológico importante ya sea en la señalización o en la regulación intracelular (actúan como segundos mensajeros). Se ha demostrado claramente que los ROS interfieren con la expresión de algunos genes y en las vías de transducción de señales. Debido a que los ROS son oxidantes por naturaleza, influyen en el estado redox y dependiendo de la concentración, causan una respuesta positiva (proliferación celular) o negativa (detención del crecimiento o muerte celular)<sup>71</sup>.

#### **1.1.2.4.1. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo**

La exposición continua a diversos tipos de estrés oxidativo provenientes de diferentes fuentes conduce a las células y al organismo entero a desarrollar mecanismos de defensa para la protección contra metabolitos reactivos (**Esquema 3**).

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Radicales libres y daño oxidativo



**Esquema 3.** Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo.

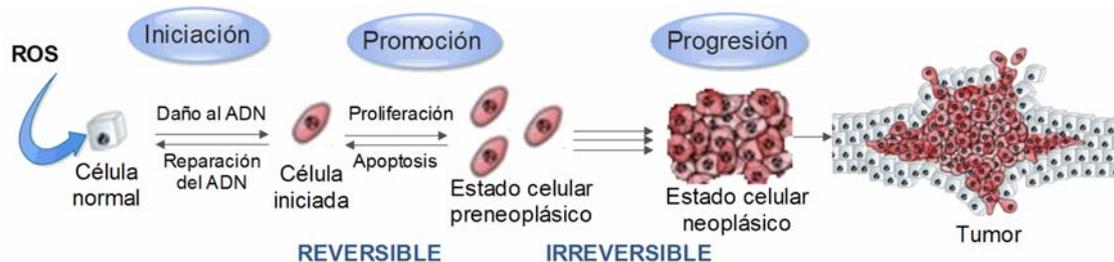
Los mecanismos abarcan actividades directas e indirectas. El grupo de acción directa está constituido por enzimas, principalmente SOD, catalasa y peroxidasa. El enfoque indirecto puede involucrar el control de la producción endógena de ROS. Un sistema eficiente de reparación consiste en el uso de enzimas y pequeñas moléculas que reparan sitios dañados en macromoléculas. Otro sistema implica la utilización de moléculas que pueden donar átomos de hidrógeno a otras que están dañadas, un ejemplo de ello es la donación de un átomo de hidrógeno por el ascorbato o tocoferol a un ácido graso radical que fue atacado con anterioridad por un radical y perdió un hidrógeno. Las defensas físicas como las membranas, les permiten a las células defenderse del daño oxidativo. Por otro lado, compuestos como los tocoferoles pueden proporcionar una mayor estabilidad a las membranas celulares y la interferencia estérica puede prevenir que los ROS se acerquen a destino. Entre los diversos mecanismos de defensa, aquellos que implican antioxidantes son muy importantes debido a la eliminación directa de los pro-oxidantes y a la variedad de los mismos. Este sistema contiene dos grupos principales: enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular. Dentro del segundo grupo existen también moléculas que actúan indirectamente formando complejos de coordinación tipo quelato con metales que catalizan reacciones de oxidación y aquellas que accionan directamente

(agentes secuestrantes). Estos últimos presentan grandes ventajas ya que al ser pequeños atraviesan las membranas y pueden localizarse cerca de los blancos biológicos<sup>70</sup>.

### 1.1.2.4.2. Relación entre el estrés oxidativo y el cáncer

El daño oxidativo asociado a diferentes macromoléculas está implicado en la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades, entre las que se encuentran: aterosclerosis, cáncer, disfunción pulmonar, cataratas, artritis, enfermedades inflamatorias, diabetes, shock, trauma, isquemia, enfermedad renal, hemodiálisis, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria y colitis, enfermedad de Parkinson, reacciones a medicamentos, Alzheimer, enfermedad cardiovascular, lesiones dermatológicas, envejecimiento y obesidad<sup>77,79</sup>.

En relación al cáncer, se considera al daño oxidativo sobre el ADN como el factor molecular más importante en el proceso de carcinogénesis. Diversos estudios están enfocados en el rol de los ROS en la inducción, promoción y progresión de cáncer. Este proceso es complejo, con múltiples etapas que involucra el pasaje desde una célula sana a un estado precanceroso hasta finalmente llegar a un estadio temprano de cáncer (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Modelo de 3 etapas en el mecanismo de carcinogénesis.

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

El otro mecanismo representa un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. Si el daño al ADN es demasiado grande, existe un proceso que elimina selectivamente las células alteradas. Este proceso se denomina apoptosis y es una muerte celular programada que lleva a importantes cambios morfológicos. Durante la proliferación celular, la proteína p53 juega un papel primordial verificando la integridad del ADN. Se desencadenan mecanismos que eliminan, por ejemplo, las bases oxidadas del ADN que causan mutaciones. Cuando el daño celular es importante, la proteína p53

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Radicales libres y daño oxidativo

desencadena la muerte celular por apoptosis, pero si este proceso no es controlado puede resultar perjudicial para el organismo, conduciendo a la destrucción de las células sanas. Por lo tanto, existe un sistema de regulación que involucra factores pro-apoptóticos (p53) y anti-apoptóticos. El proceso carcinogénico se describe como un desequilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular desplazado hacia la proliferación celular.

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

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

**1.1.3. COBRE****1.1.3.1. Aspectos de la química del cobre****1.1.3.1.1. Estados de oxidación y geometría**

El cobre es probablemente uno de los metales de transición cuya química de coordinación ha sido más estudiada. De los metales de la primera serie de transición, se caracteriza por ser el menos reactivo. Dependiendo de su estado de oxidación, los complejos de cobre que forma presentan distinta geometría y número de coordinación. En la **tabla 5** se resumen los principales estados de oxidación y la estereoquímica del cobre.

**Tabla 5.** Estados de oxidación y estereoquímica del cobre.

Estado de oxidación (configuración electrónica)	Número de coordinación	Geometría
<b>Cu(I)</b> (d <sup>10</sup> )	2 3 4	Lineal Trigonal plana Tetraédrica
<b>Cu(II)</b> (d <sup>9</sup> )	4 5 6	Tetraédrica distorsionada o plano cuadrada Bipirámide trigonal o pirámide cuadrada Octaédrica distorsionada
<b>Cu(III)</b> (d <sup>8</sup> )	4 5 6	Plano cuadrada Bipirámide trigonal Octaédrica

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<sup>80</sup>.

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<sup>10</sup> 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.

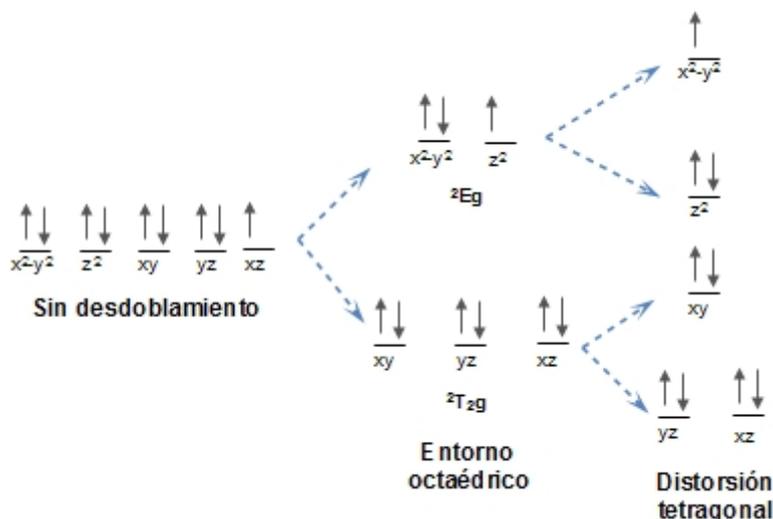
En el estado de oxidación +2 el ión cúprico, o Cu(II), tiene una configuración d<sup>9</sup>, y puede presentar lo que se conoce como efecto o distorsión Jahn-Teller por lo que, cuando se encuentra un entorno de coordinación tetragonal, presenta generalmente 4 enlaces cortos en el plano ecuatorial y uno o dos enlaces más largos en el plano axial<sup>81</sup>.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

Con un estado de oxidación +3, el Cu(III) es inestable y se forma por la reacción de Cu(II) en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o del anión ascorbato. Se ha demostrado que el Cu(III) está presente en reacciones relacionadas con procesos biológicos que involucran cuproenzimas (ej. Hemocianina y tirosinasa) y donde intervienen péptidos como ligandos<sup>82</sup>. El estado de oxidación +4 es raro, se conoce su presencia en la red cristalina  $\text{Cs}_2\text{CuF}_6$ <sup>83</sup>.

### 1.1.3.1.2. Espectros electrónicos característicos para cobre

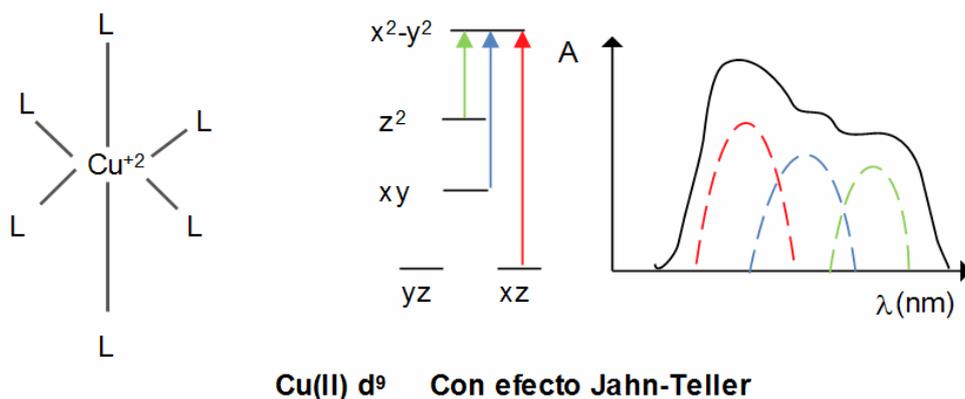
El Cu(II) posee la configuración electrónica  $[\text{Ar}]3d^9$ , que conduce a la existencia de un único término espectral ( $^2D$ ). En presencia de un campo de ligandos, este término se desdobra para dar distintos niveles, cuyo número y energía depende del tipo de ligandos, del número de coordinación y de la geometría adoptada por el complejo<sup>84</sup>. Así, para un campo de ligandos idealmente octaédrico, dicho término se desdobra en dos niveles:  $^2E_g$  y  $^2T_{2g}$ . Los 9 electrones d del cobre (Cu(II)) se distribuyen entre los 5 orbitales d, quedando un lugar vacío en uno de los orbitales de mayor energía. Debido a esta ocupación desigual de los orbitales Eg, el complejo sufre distorsión por efecto Jahn Teller, dando lugar a una elongación tetragonal a lo largo del eje z y a una contracción en el plano ecuatorial<sup>85</sup>. Esto resulta en una geometría octaédrica elongada, según el eje z que genera un prisma tetragonal. En el **esquema 4** se muestra el desdoblamiento de los orbitales d en un entorno tetragonal elongado según el eje z, en el cual se observa que el electrón desapareado ocuparía el orbital  $d_{x^2-y^2}$ .



**Esquema 4:** Desdoblamiento de orbitales d para un ión  $d^9$

Este desdoblamiento, genera tres posibles transiciones d-d en la región del visible, frecuentemente, en los espectros de complejos de cobre(II) aparecen bandas con hombros, debido al solapamiento de algunas de esas transiciones (**Fig. 10**). La región del espectro en la que aparecen estas bandases entre 600 y 900 nm, por lo que en general, todos los complejos de cobre(II) son de color verde o azul.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre



**Cu(II)  $d^9$  Con efecto Jahn-Teller**

**Figura 10.** Geometría de un complejo de cobre(II) con distorsión tetragonal y transiciones posibles, originadas en la región del visible para el cobre(II) con efecto Jahn-Teller.

Los estados fisiológicamente más importantes del cobre son (I) y (II), siendo este último el más frecuente. Los distintos tipos de Cu que podemos encontrar en los sistemas biológicos son<sup>86</sup>:

- **Cobre de tipo 1:** presenta una única banda de absorción en la región del visible, muy intensa, alrededor de los 600 nm, con coeficiente de absorción molar unas trescientas veces más elevado que el de los complejos usuales de Cu (II). La banda de absorción se debe al color azul que caracteriza a las proteínas que contienen este tipo de cobre.

- **Cobre de tipo 2:** es paramagnético y posee el espectro electrónico típico de los complejos de Cu(II), con distorsión Jahn-Teller. Por este motivo, suelen presentar más de una banda en la región del visible debido a las distintas transiciones posibles originadas por la distorsión tetragonal. Los espectros electrónicos de compuestos que contienen cobre(II) suelen verse como bandas deformadas, con hombros.

- **Cobre tipo 3:** consiste en un centro dinuclear de cobre con un fuerte acoplamiento antiferromagnético, lo que torna diamagnético al sistema, y por lo tanto, no permite su detección por espectroscopia EPR. Estos sistemas se caracterizan por presentar una banda de absorción muy intensa alrededor de los 300 nm.

### 1.1.3.1.3. Espectro Infrarrojo (FTIR)

El estudio de el espectro infrarrojo para el caso de complejos de cobre permite identificar, además de las bandas características para cada tipo de ligando, las frecuencias de estiramiento típico derivados del enlace del cobre al ligando.

Por lo general, este tipo de estiramientos que se relacionan con el centro metálico de complejos de coordinación aparecen en la región baja del espectro infrarrojo, y en el infrarrojo lejano. Las frecuencias características de vibración de cada enlace dependen tanto del metal, como del átomo coordinado. Así por ejemplo, el estiramiento Cu-S se encuentran a menores frecuencias (ej:  $310 \text{ cm}^{-1}$ <sup>87</sup>), mientras que el estiramiento Cu-N se encuentra a frecuencias ligeramente mayores (ej:  $407 \text{ cm}^{-1}$ <sup>88</sup>,  $420 \text{ cm}^{-1}$ <sup>87</sup>). El estiramiento Cu-O por su

parte se encuentra usualmente en frecuencias mayores que los anteriores ( $450\text{ cm}^{-1}$ <sup>89</sup>), aunque en complejos que presentan una alta resonancia como el flavonoide quercetina, el estiramiento Cu-O se observa a frecuencias mucho mayores ( $603\text{ cm}^{-1}$ <sup>90</sup>).

### 1.1.3.1.4. Espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

El espectro EPR de un complejo de coordinación puede brindar información valiosa con respecto a estados de oxidación del metal, tipo de ligando y simetría. El cobre(II) es un metal con configuración  $d^9$ , que es paramagnético y tiene un momento magnético nuclear distinto de cero ( $I=3/2$ ).

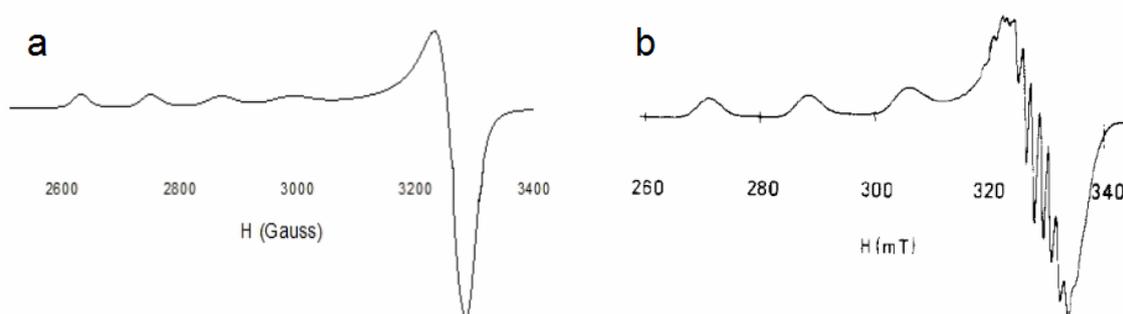
- **Señal:** Solamente los átomos paramagnéticos presentan señal en el EPR. En muchos casos, esto permite distinguir entre dos estados de oxidación cuando solamente uno de ellos es paramagnético. Por ejemplo, el cobre posee dos formas catiónicas estables y solo el cobre(II) muestra señal ya que el cobre(I) es diamagnético.

- **Factor de desdoblamiento espectroscópico (tensor  $g$ ):** Depende de la orientación de la molécula con el campo magnético externo, lo que brinda información acerca de la geometría molecular. El ión cobre(II) suele presentar geometría de octaedro elongado por efecto Jahn-Teller. En este caso, cuando el eje  $z$  de una molécula se alinea con el campo magnético externo, el valor de  $g$  se conoce como  $g_{||}$  o  $g_z$ , mientras que a los valores de  $g$  en los ejes  $x$  e  $y$  se los conoce como  $g_x$  y  $g_y$  respectivamente, o, dado que ambos son perpendiculares al eje  $z$  y al campo magnético externo se los llama  $g_{\perp}$ . En este entorno octaédrico distorsionado, la anisotropía generada para los valores de  $g$  puede expresarse como  $g_x=g_y \neq g_z$ . Los cuatro ligandos dispuestos aproximadamente en un plano (que incluye al ión metálico) presentarán una mayor interacción, mientras que los otros dos ligandos dispuestos en una línea recta perpendicular al plano (disposición axial) más alejados y más débilmente unidos al centro metálico presentarán una influencia menor sobre las propiedades magnéticas y ópticas del complejo. Para estos complejos, la secuencia  $g_{||} > g_{\perp} > 2,00$  indica que el electrón desapareado del ion Cu(II) ocupará preferentemente el orbital  $d_{x^2-y^2}$ <sup>91</sup> (**Esquema 4**). A su vez, según Kivelson y Neiman<sup>92</sup>, el valor de  $g_{||}$  está sensiblemente relacionado con el grado de covalencia en la interacción metal-ligando, de modo que generalmente se cumple que en un entorno iónico  $g_{||} > 2,3$ , mientras que en un entorno covalente,  $g_{||} < 2,3$ . Por otra parte, si se quiere evaluar el grado de interacción entre los centros de Cu(II) y la geometría en los sólidos cristalinos, para dos valores de  $g$ , donde el menor valor de  $g$  sea  $> 2,0$ , se calcula el parámetro  $G = (g_{||}-2)/(g_{\perp}-2)$ . Si el valor resulta entre 4,0-4,5 la interacción sería despreciable<sup>84</sup>.

- **Constante de acoplamiento hiperfina (A):** Se observa debido a la interacción del electrón desapareado con su propio núcleo, siempre que este último tenga momento magnético nuclear distinto de cero ( $I \neq 0$ ). Esto origina un desdoblamiento característico dando origen a una estructura hiperfina como la que se observa en la **figura 11a**, y brinda información sobre la identidad del núcleo del ión o átomo. Para el caso de un complejo de cobre(II) con elongación tetragonal, de manera similar a lo que ocurre con los valores de  $g$ , la interacción hiperfina es anisotrópica ( $A_x=A_y \neq A_z$ ).

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

Simultáneamente, puede existir otro desdoblamiento adicional de la señal cuando el electrón desapareado interactúa con núcleos de átomos vecinos (con  $I \neq 0$ ) dando origen a una estructura superhiperfina. Esto, para el caso de los complejos, da información sobre el átomo del ligando que está coordinando al metal. Este tipo de estructuras se observan comúnmente para los complejos de cobre(II) con ligandos nitrogenados ( $I=1$ ), como es el caso del complejo de cobre con imidazol, cuyo espectro presenta este tipo de desdoblamientos en la región de  $g \perp$  (**Fig. 11b**).



**Figura 11.** Espectro EPR en banda X de a)  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , con estructura hiperfina y b) sistema cobre(II)-imidazol<sup>93</sup> con estructura superhiperfina.

### 1.1.3.2. Aspectos biológicos del cobre

#### 1.1.3.2.1. Generalidades

El cobre (Cu) es el tercer mineral traza más abundante en el cuerpo humano, luego del hierro y el zinc. Es esencial para los organismos vivos, forma parte de todos los aspectos del metabolismo, incluyendo la fosforilación oxidativa mitocondrial, la desintoxicación de radicales libres, síntesis y desnaturalización de neurotransmisores, formación de pigmentos, síntesis del tejido conectivo y metabolismo del hierro<sup>94,95</sup>.

El cobre es un metal de transición que se caracteriza por tener un potencial redox para la reacción entre el Cu(II) y el Cu(I) de solo 0,158V en agua. La utilidad biológica del cobre, deriva principalmente de su capacidad para cambiar fácilmente de su forma oxidada a su forma reducida. Por esta razón es utilizado por un gran número de enzimas, probablemente más de 300 en humanos, involucradas en reacciones oxidativas<sup>96</sup>.

El interés en el metabolismo de cobre en humanos comenzó en la década de 1920, cuando se observó y dilucidó cual era su rol en la síntesis de hemoglobina<sup>97</sup>. Se encuentra en todos los organismos vivos tanto en estado oxidado Cu(II) como en estado reducido Cu(I), debe incorporarse en la dieta, la necesidad de cobre en adultos se reporta generalmente como 1 mg por día<sup>98</sup>. Los alimentos que contienen cobre en mayor concentración son el chocolate, los crustáceos y mariscos, frutas secas, nueces, semillas y granos, mientras que las frutas, verduras y carne (músculos) poseen una menor concentración del metal<sup>99</sup>. El agua dulce no contaminada contiene escasa concentración de Cu mientras que el agua de mar posee una mayor cantidad y dicho valor

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

aumenta con la profundidad, lo que explica la alta concentración de Cu en pescados y mariscos que habitan en el fondo oceánico<sup>100</sup>.

### 1.1.3.2.2. Absorción y transporte del cobre

En el cuerpo humano, el cobre se encuentra en cantidades relativamente grandes. Un adulto de 70 Kg contiene cerca de 110 mg de cobre, la mayor parte (46 mg) en el esqueleto y médula ósea, 26 mg en músculos esqueléticos, 10 mg en el hígado, 8,8 mg en el cerebro y 6 mg en la sangre<sup>99</sup>.

El cobre se absorbe en el estómago, en el duodeno y en todo el intestino delgado<sup>99</sup>. El tracto gastrointestinal no solo recibe 1 mg por parte de la dieta<sup>98,101</sup> sino que se reciclan y liberan mayores cantidades (4,5 mg/día aprox.) a través de la saliva, bilis y jugos gástricos<sup>102</sup>.

Los iones cobre, una vez que entran en el torrente sanguíneo se unen inmediatamente a transportadores de cobre en su camino desde el intestino hasta el hígado. El 65% del cobre circulante se encuentra unido a la ceruloplasmina; la albúmina, se encarga del transporte de aproximadamente un 17% bajo la forma de Cu(I) y, al ser una proteína muy versátil, representa la mayor fuente intercambiable del metal. Las macroglobulinas o símil-transcupreína por su parte, acarrearán el 10% del total de cobre circulante mientras que la transferrina, una enzima transportadora de hierro, puede unir dos átomos de cobre, haciéndolo con mayor afinidad que la albúmina. Finalmente, el cobre puede unirse también a diferentes aminoácidos, péptidos y ácidos grasos, aunque la evidencia sugiere que esos complejos no son relevantes en condiciones fisiológicas<sup>96</sup>.

### 1.1.3.2.3. Enzimas dependientes de cobre

El cobre se encuentra asociado con varias enzimas intracelulares y extracelulares que están involucradas en diversos procesos metabólicos. La mayoría de las características de una severa deficiencia de cobre puede ser explicada por el fallo de una o más enzimas dependientes de ese metal.

En condiciones fisiológicas normales, la mayor parte del cobre en el cuerpo humano, se encuentra formando parte de enzimas redox, involucrados como cofactores. Las enzimas más conocidas son: la ceruloplasmina que es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre<sup>103</sup>; la citocromo c oxidasa, que es la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones; la superóxido dismutasa (SOD) que es una enzima antioxidante capaz de remover los radicales superóxido de los tejidos<sup>99</sup>. Un resumen de las principales enzimas dependientes del cobre, sus funciones y las posibles consecuencias de su deficiencia se muestran en la **tabla 6**.

**Tabla 6.** Principales enzimas dependientes del cobre, función y posibles consecuencias de su deficiencia. Adaptada de<sup>104,105</sup>

Nombre común	Función	Posibles consecuencias de su deficiencia
Citocromo C oxidasa	Cadena transportadora de electrones	Debilidad muscular, desórdenes en corazón y

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

		cerebro
<b>Superóxido dismutasa (SOD)</b>	Desintoxicación de radicales libres	Daño en las membranas, otros daños por radicales libres
<b>Tirosinasa</b>	Producción de melanina	Falta de pigmentación
<b>Dopamina β- hidroxilasa</b>	Producción de catecolaminas	Defectos neurológicos, posible hipotermia
<b>Lisil oxidasa</b>	Cross-linking de colágeno y elastina	Defectos en el tejido conectivo
<b>Ceruloplasmina</b>	Transporte de cobre e hierro	Acumulación de hierro y daño neurológico
<b>Metalotionina</b>	Almacenamiento de cobre	Disminución del almacenamiento de cobre en el cuerpo
<b>Factor de coagulación V</b>	Coagulación sanguínea	Tendencia al sangrado
<b>Enzima desconocida</b>	Cross-linking de la keratina (puentes disulfuro)	Cabello anormal

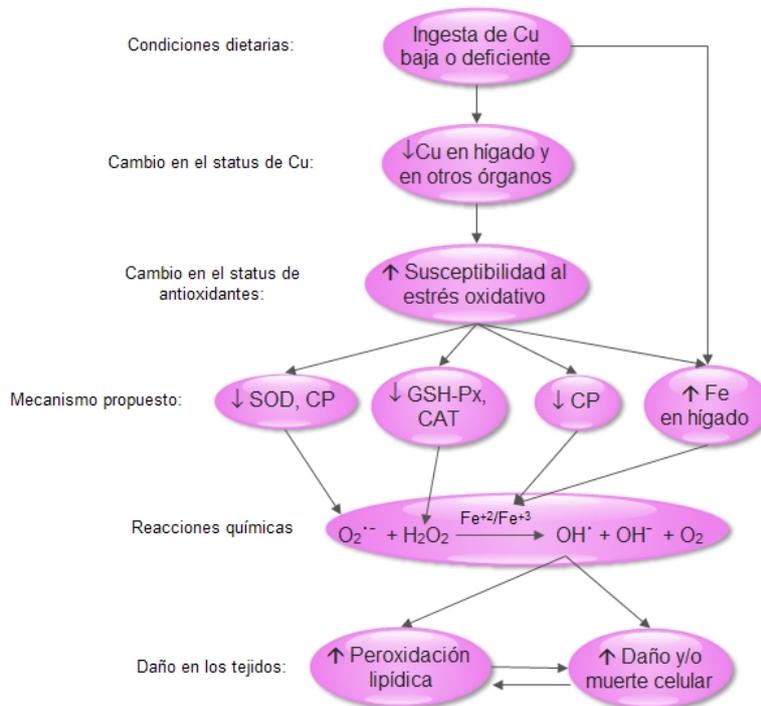
El cobre interviene también en muchas funciones no enzimáticas, como por ejemplo, la angiogénesis (generación de nuevos vasos sanguíneos)<sup>106</sup>, la mielinización del sistema nervioso central y la actividad de las endorfinas<sup>107</sup>. También juega un rol esencial en el desarrollo cerebral, por lo que pacientes afectados por la enfermedad de Menkes, que se caracteriza por una deficiencia congénita de cobre, presentan una desmielinización y neurodegeneración<sup>108,109</sup>. El cobre también es esencial en la reproducción, regulación de la expresión de genes y crecimiento y desarrollo normal del organismo<sup>110</sup>.

### 1.1.3.2.4. Homeostasis de cobre

La homeostasis consiste en la capacidad de mantener una condición interna estable, es una forma de estado estacionario dinámico que se hace posible gracias a mecanismos de autorregulación que tienen todos los seres vivos. Las fallas en la homeostasis del cobre, tanto en defecto como en exceso, generan diferentes trastornos, como los que se mencionan a continuación.

La deficiencia de cobre afecta directa o indirectamente los componentes del sistema de defensa antioxidante. La actividad de la SOD disminuye, lo que incrementa la cantidad de aniones superóxido, incrementando el nivel de ROS generando daño oxidativo a los lípidos, ADN y proteínas, lo que ha sido demostrado en todos los modelos animales y de cultivo celular. Este aumento en los organismos a la susceptibilidad al estrés oxidativo, genera una disminución en la actividad de distintas enzimas como la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) por lo que se acumula una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno, simultáneamente disminuye la actividad de la ceruloplasmina por lo que aumentan los niveles de hierro como  $Fe^{+2}$ . De esta manera se dan las condiciones propicias para la generación del radical hidroxilo que puede atacar tanto el ADN como los lípidos, desencadenando en última instancia la muerte celular. Un resumen de las principales consecuencias de una ingesta deficiente de cobre se muestra en el **esquema 5**.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre



**Figura 5.** Modelo teórico del cobre como nutriente antioxidante. CAT, catalasa; CP, ceruloplasmina; Cu, cobre; Fe, hierro; GSH-Px, glutatión peroxidasa; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical anión superóxido; OH<sup>•</sup> radical hidroxilo; SOD, superóxido dismutasa<sup>104</sup>.

Además de la disminución de la actividad CuZn-SOD, se ha postulado que la deficiencia de cobre induce una disminución en la actividad de la citocromo c oxidasa y la inactivación oxidativa del complejo I (NADH ubiquinona óxidoreductasa) lo que contribuye adicionalmente en el incremento de la producción de ROS en animales con deficiencia de cobre<sup>111</sup>.

Similar a lo que ocurre con la deficiencia, un exceso de cobre puede resultar en estrés oxidativo, y consecuentemente daño de los tejidos. Esto es en parte, una consecuencia de la reactividad redox, es decir la habilidad del cobre libre o complejos de cobre de bajo peso molecular para catalizar la ruptura del peróxido de hidrógeno, produciendo el radical hidroxilo, según la siguiente reacción:



Simultáneamente, el cobre se puede unir directamente a tioles libres y cisteínas, dando como resultado, la oxidación y subsecuente entrecruzamiento entre las proteínas disminuyendo su actividad<sup>111</sup>. Las concentraciones altas de cobre también pueden causar un aumento del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, lo que contribuye a enfermedades neurodegenerativas.

Es por lo mencionado anteriormente que es necesaria una gran regulación en los niveles de cobre en el organismo. Mantener constante el nivel de cobre en el cuerpo depende de un balance entre la absorción intestinal y la excreción biliar, esta última puede incrementarse sustancialmente cuando se ingiere un exceso de cobre<sup>112</sup>. Es por esto que los efectos tóxicos asociados al cobre en individuos que no sufren la enfermedad de Wilson son raros. Diversos

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

estudios en los que se evaluó el efecto de la ingesta de cobre en el límite del consumo máximo tolerable (UL), tanto en primates y en humanos, demostraron que un consumo de 10 mg/día (UL actual) no presentaba ningún tipo de efectos adversos detectable. Ninguna de las dosis, o variaciones en el tiempo del estudio mostraron cambios detectables en sangre, función hepática o indicadores de estrés oxidativo<sup>113</sup>. Además de esto, un número de nutrientes puede interactuar con el cobre alterando su toxicidad. La información disponible muestra que la vitamina E protege contra el daño oxidativo inducido por el cobre. Dietas ricas en ácido ascórbico y Zn pueden reducir la toxicidad del cobre, incorporado por la ingesta, al igual que los beta carotenos y polifenoles<sup>114</sup>.

### **1.1.3.2.5. Cobre y enfermedades asociadas**

La regulación de la captación, transporte y excreción de cobre se encuentra fuertemente controlada<sup>115,116</sup>, lo que provoca que en condiciones fisiológicas, el nivel de cobre intracelular sea extraordinariamente restringido<sup>117</sup>. Los defectos en la homeostasis del cobre son directamente responsables de distintas patologías humanas, tanto genéticas, como la enfermedad de Wilson o la de Menkes<sup>115</sup>, así como también cáncer<sup>118</sup>, Diabetes Mellitus<sup>119</sup>, enfermedad de Alzheimer<sup>120</sup>, defectos estructurales y funcionales cardiovasculares, desórdenes en el metabolismo de los huesos y enfermedades musculares<sup>121</sup>.

A continuación se describen brevemente la relación del cobre con las enfermedades genéticas, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, estas últimas relacionadas con el objeto de estudio de la presente tesis.

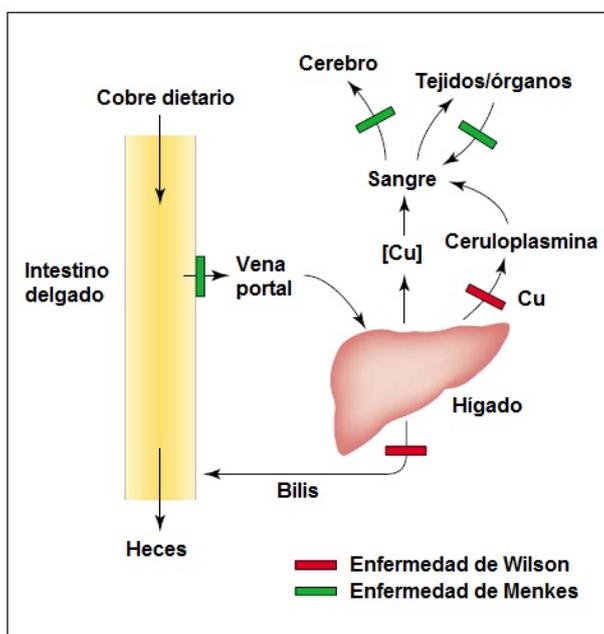
#### **1.1.3.2.5.1. Enfermedades genéticas**

Se han identificado dos anormalidades genéticas relacionadas con el metabolismo del cobre: La enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson. Un resumen de las principales vías del cobre en el organismo y sus puntos de bloqueo se muestran en la **figura 12**.

- **Enfermedad de Menkes:** Es un desorden letal multisistémico recesivo ligado al cromosoma X, caracterizado por un déficit generalizado de cobre. Sus características clínicas derivan de la disfunción de varias enzimas dependientes de cobre. La enfermedad se debe a mutaciones en un gen (ATP-7A) que codifica una proteína intracelular transportadora de cobre (ATPasa de tipo P). Los síntomas incluyen retraso del crecimiento intrauterino y deterioro neurológico progresivo, con aparición de hipotonía axial, espasticidad, convulsiones e hipotermia, que aparecen durante los primeros meses de vida. Se llama también el “síndrome del cabello ensortijado” debido al aspecto del mismo<sup>122</sup>. Danks y colaboradores<sup>123</sup> encontraron que los pacientes que padecen esta enfermedad presentan niveles reducidos de cobre hepático, urinario y sérico y disminución de la absorción de cobre pero la concentración de este elemento en eritrocitos es normal y presentan un correcto manejo del metal administrado por vía intravenosa.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

- **Enfermedad de Wilson:** es un trastorno del metabolismo del cobre que se hereda de forma autosómica recesiva. Es causada por mutaciones en el gen ATP-7B que codifica para una ATPasa tipo P implicada en el transporte de cobre dentro del hepatocito, tanto al interior del aparato de Golgi para su incorporación a la apoceruloplasmina como en la excreción biliar del exceso de metal del organismo. El defecto en la función de esta proteína da lugar a la acumulación progresiva de cobre, primero en el hígado y posteriormente en el encéfalo y en otros tejidos, con manifestaciones clínicas principalmente hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y oftalmológicas. En ausencia de tratamiento, esta enfermedad progresa hacia la muerte debido a los efectos tóxicos por daño oxidante<sup>124</sup>.



**Figura 12.** Vías del cobre en el cuerpo y los bloqueos de las enfermedades de Wilson y Menkes. Los eritrocitos absorben el cobre en el intestino delgado y difunden a través de la superficie basolateral de esas células hacia la circulación portal. Este último proceso es defectuoso en pacientes con la enfermedad de Menkes, lo que resulta en una acumulación de cobre en los eritrocitos en conjunto con una deficiencia de cobre en el cuerpo. En condiciones normales, el hígado toma la mayor parte del recién absorbido, mientras que, en caso de exceso en el consumo de cobre, se excreta por la bilis. Este proceso se encuentra bloqueado en la enfermedad de Wilson, así como también la entrega de cobre a la ceruloplasmina, la principal proteína transportadora de cobre en la sangre. El transporte de cobre al cerebro está bloqueado en pacientes con la enfermedad de Menkes, lo que genera las anomalías neurológicas severas, características de esta enfermedad<sup>105</sup>.

### 1.1.3.2.5.2. Enfermedad cardiovascular

Desde hace al menos 40 años se ha postulado que hay una relación directa entre el nivel de cobre en la dieta humana y la incidencia de las enfermedades cardiovasculares<sup>125</sup> ya que se encuentra asociado al metabolismo de lípidos<sup>126</sup>. La deficiencia de cobre incrementa la susceptibilidad a la peroxidación de las lipoproteínas y el tejido coronario, estos hechos proveen una fuerte evidencia de que el cobre juega un papel vital en la protección del sistema cardiovascular del daño y las enfermedades mediadas por radicales libres<sup>127</sup>. Numerosas investigaciones en modelos animales,

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

incluyendo humanos han demostrado que la deficiencia de cobre puede incrementar significativamente la concentración de colesterol en plasma<sup>128,129</sup>. Como consecuencia de este incremento, los niveles del colesterol LDL aumentan, mientras que disminuyen los niveles del colesterol HDL, dando como resultado un incremento del riesgo cardiovascular<sup>129</sup>.

Por otro lado, el corazón y los vasos sanguíneos son particularmente vulnerables a la deficiencia de cobre ya que en esas condiciones, la función de la lisil oxidasa se ve disminuída, generando defectos en el tejido conectivo. Las alteraciones en la morfología cardíaca incluyen: miocitos agrandados, desarreglos en las miofibrillas, láminas basales fragmentadas en la interfaz capilar-miocitos y proliferación hinchazón y fragmentación mitocondrial. Adicionalmente, en corazones con deficiencia de cobre se observan anomalías electrocardiográficas, alteraciones en las contracciones y en la función respiratoria mitocondrial<sup>111</sup>.

El cobre también tiene incidencia en la regulación de la presión arterial, se sabe que la disminución en los niveles de cobre, ocasiona una disminución en la actividad de la CuZn-SOD, lo que origina un aumento en la concentración del radical anión superóxido que, además de aumentar la producción de ROS, reacciona con el óxido nítrico (NO) formando peróxinitritos y disminuyendo la vasodilatación dependiente del endotelio (**Sección 1.1.1.4**). Estudios en ratas con dieta restringida de cobre mostraron un aumento en la presión arterial, comparándolas con ratas con un consumo adecuado de cobre<sup>130</sup>.

Por lo tanto, el cobre juega un papel importante en la enfermedad cardiovascular, ya que aumenta los factores de riesgo como son el estrés oxidativo, que no solo disminuye la vasodilatación dependiente del endotelio, sino que también aumenta la susceptibilidad a la peroxidación de los lípidos del tejido coronario. Mientras que defectos en el tejido conectivo ligados a la disminución de la actividad de la lisil oxidasa generan alteraciones en la morfología cardíaca.

### **1.1.3.2.5.3. Cancer y carcinogénesis**

Dado que se ha propuesto que los radicales libres tienen un rol importante en el proceso de la carcinogénesis (**Sección 1.1.2.4.2**) y que el cobre es un componente esencial de varias enzimas endógenas antioxidantes, se han investigado los efectos de los niveles de cobre en la dieta en relación con el desarrollo del cáncer. Estudios con ratas que fueron alimentadas con dietas bajas en cobre, mostraron una mayor incidencia en tumores de colon inducidos por carcinógenos, en comparación con las ratas alimentadas con una dieta rica en cobre<sup>131</sup>. Si bien hay estudios que muestran que el nivel de cobre en el suero suele ser elevado en animales y en humanos con cancer<sup>132</sup>, no ocurre una activación de enzimas antioxidantes, como la SOD. En un estudio que compara la actividad de la CuZn SOD en células, reportó que la mayoría de las células tumorales tienen actividad SOD disminuída, en comparación con las células normales<sup>133</sup>. Lo que se propone entonces, es que la elevación del cobre en el suero es una respuesta fisiológica, diseñada para activar la SOD u

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

otras enzimas antioxidantes dependientes del cobre en células cancerígenas para disminuir la cantidad de ROS, inhibiendo así su crecimiento.

A causa de lo mencionado anteriormente, se han sintetizado y estudiado numerosos complejos de cobre con propiedades SOD miméticas y que han demostrado tener efectos anticáncer, anticarcinogénico y antimutagénico tanto *in Vitro* como *in vivo*. Además, hay cierta evidencia experimental que los complejos de cobre pueden rediferenciar las células tumorales en células normales<sup>134</sup>.

### **1.1.3.2.6. Cobre en tratamientos antihipertensivos**

Estudios en ratas espontáneamente hipertensas que fueron tratadas con distintos antihipertensivos, como el indapamida y amlodipina de la familia de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) durante 45 días demostraron que se reducían significativamente los niveles de zinc en suero, eritrocitos e hígado, mientras que también disminuyeron los niveles de cobre en los riñones, en comparación con el grupo control sin tratamiento. Lo que proponían es que el uso prolongado de antihipertensivos como los IECA puede tener efectos colaterales como pueden ser los desbalances en la homeostasis de los electrolitos. Suplementando la dieta de las ratas con cobre y zinc, en conjunto con los IECA, se observó una reducción significativa de la presión sanguínea, lo que aumenta la efectividad del tratamiento cuando se lo compara con el tratamiento IECA solo<sup>135</sup>.

Aunque este estudio resulta alentador para emplear complejos de cobre con fármacos antihipertensivos en el tratamiento de la hipertensión, la utilización de compuestos con cobre para tratar una enfermedad crónica suele ser controversial, en parte debido a la toxicidad del metal.

Sin embargo, esta toxicidad se observa recién en concentraciones muy altas ya que en el límite del consumo diario recomendado de cobre, no se observan síntomas<sup>113</sup>. Adicionalmente, una dieta rica en antioxidantes como la vitamina E, ácido ascórbico o zinc, podría permitir un consumo mayor de cobre por día<sup>114</sup>, lo que potencialmente permitiría aumentar la dosis de un fármaco que contiene cobre en caso de ser necesario.

#### **1.1.4. COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE COBRE(II) CON SARTANES**

##### **1.1.4.1. Antecedentes**

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, un tratamiento conjunto de un antihipertensivo con cobre podría mejorar el efecto del antihipertensivo aislado (**sección 1.1.3.2.6**). Este estudio es particularmente interesante si los antihipertensivos utilizados son los sartanes, dado que se ha demostrado que por ser bloqueadores del receptor AT<sub>1</sub> tienen propiedades antiangiogénicas en algunos tipos de cáncer (**sección 1.1.1.5**). Es así que en nuestro grupo se ha trabajado con anterioridad a este trabajo de Tesis Doctoral con los complejos de coordinación de cobre(II) con el losartán y el valsartán obteniéndose los siguientes resultados que se resumen a continuación:

- **Complejo de Cu(II) con losartán (LosCu)<sup>136</sup>**: Se sintetizó un complejo de coordinación binuclear, de fórmula molecular [Cu(Los)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> derivado de la sal de potasio del losartán. La estructura propuesta indica que el Cu(II) está coordinado a través de los átomos de nitrógeno del anillo tetrazólico del losartán. Se encontró que el LosCu mostraba actividad superóxido dismutasa moderada, mientras que el losartán no tenía ningún efecto. Además, se testeó el efecto en la citotoxicidad en dos líneas celulares; las MC3T3E1, derivadas de calvaria de ratón y las UMR106, tumorales, derivadas de osteosarcoma de ratón. El complejo mostró en ambas líneas una mayor disminución en la proliferación celular que el losartán o el cobre(II), demostrando así una mayor citotoxicidad, aunque esta diferencia tiene magnitud similar en ambas líneas celulares. Se estudiaron también los cambios en la morfología celular, en los que se observaron, solamente por parte del complejo, alteraciones morfológicas como la condensación del citoplasma y la pérdida de conexión con las células vecinas. Ni el cobre(II), ni el losartán fueron capaces de realizar este tipo de cambios en la morfología celular.

- **Complejo de Cu(II) con valsartán (CuVals)<sup>137</sup>**: Se sintetizó un complejo binuclear de fórmula molecular [Cu(vals)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>DMSO]<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, en el que dos centros metálicos de cobre(II) se encuentran coordinados a través de los grupos carboxilato del valsartán que actúan como puentes. El CuVals muestra un mayor efecto inhibitorio en la proliferación celular que el valsartán o el Cu(II), testeado en las líneas celulares MC3T3E1 y UMR106. La inhibición a tiempos cortos de exposición al tratamiento (24hs) es más pronunciada en la línea MC3T3 que en UMR106, mientras que para períodos largos de exposición (48-72hs) las células MC3T3E1 recuperan su viabilidad celular, mientras que los efectos citotóxicos en la línea celular tumoral se ven intensificados. Los efectos deletéreos observados se encuentran en paralelo con los cambios morfológicos.

##### **1.1.4.2. Razones complejar sartanes**

En este trabajo de Tesis Doctoral se propone realizar complejos de coordinación del biometal cobre(II) con el candesartán, telmisartán e irbesartán basándonos en la idea de que los complejos de coordinación pueden mejorar las propiedades del fármaco aislado, ya sea a través de una modificación favorable de su estructura o por los cambios en la biodisponibilidad.

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

Los complejos metálicos han sido ampliamente utilizados en clínica durante siglos y el gran suceso alcanzado con agentes antitumorales basados en platino promovió el desarrollo de drogas basadas en metales. Particularmente, el cobre es un elemento esencial que está involucrado en varias funciones biológicas. Todos los tejidos del cuerpo lo necesitan para sus funciones metabólicas normales. Puede reducir inflamaciones, fortalecer el tejido conectivo, restaurar el color del pelo y el metabolismo oxidativo de energía, así como también combatir los parásitos y el cáncer. Se ha observado un nivel de cobre en suero usualmente elevado en animales y humanos con cáncer, asociado con un decrecimiento en la concentración de enzimas antioxidantes dependientes de cobre<sup>132</sup>. Además, en relación a la salud cardiovascular, el cobre es esencial tanto por su rol en las enzimas antioxidantes como Cu-Zn superóxidodismutasa y la ceruloplasmina, como también para la lisil oxidasa, esencial para la fortaleza e integridad de los vasos sanguíneos del corazón. La deficiencia de cobre produce muchas de las mismas anomalías que se presentan en la enfermedad cardiovascular<sup>138</sup>.

Por lo tanto, según la evidencia anteriormente descrita, se proponen estudiar la función de complejos de coordinación de cobre(II) con candesartán, telmisartán e irbesartán en varios mecanismos de relevancia desde el punto de vista biológico y en comparación con los sartanes de origen.

Con respecto a la relación estructura-actividad de los sartanes, se observa en la **sección 1.1.1.3.1.2** que al momento de la unión al receptor AT<sub>1</sub> los extremos polares parecen cerrarse, favoreciendo la exposición de los grupos lipofílicos como el anillo bifenilo. Esos extremos polares son apropiados para complejar formando quelatos o puentes con un metal del estilo del cobre(II). Por lo tanto, si la conformación del complejo generado es más parecida a la conformación dentro del receptor, se propone que el complejo sintetizado podría tener una mayor afinidad por el receptor, y por lo tanto un mejor efecto antihipertensivo que el sartán sin complejar.

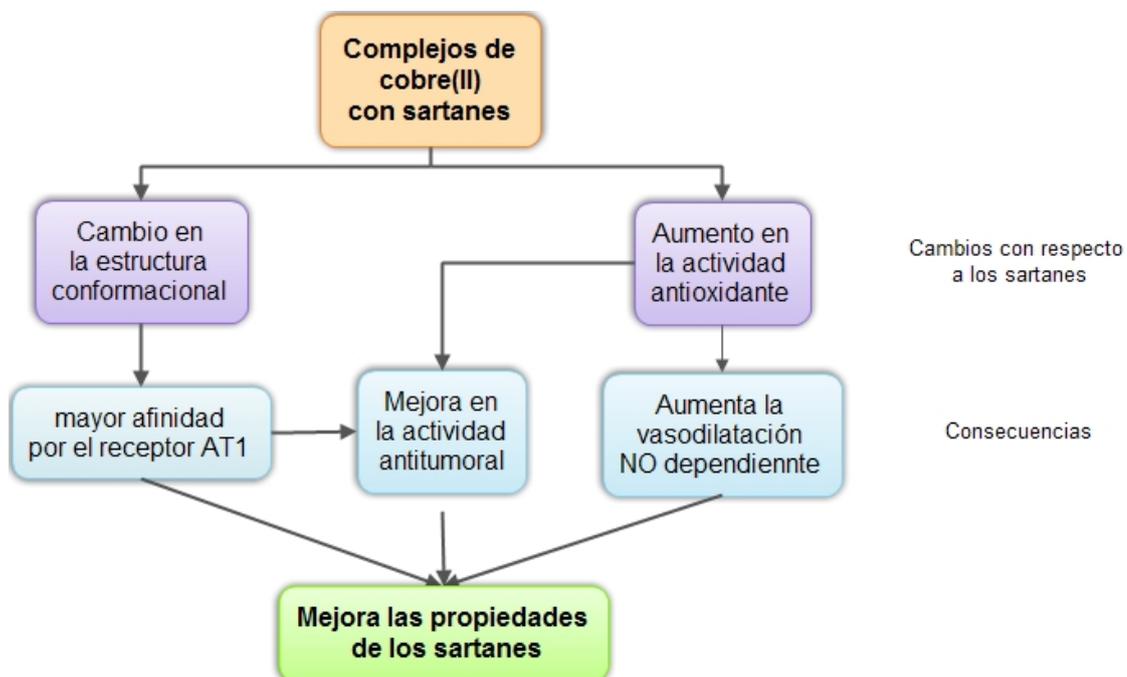
Por otro lado, numerosos complejos de coordinación de cobre con ligandos de interés biológico, demostraron mejorar las propiedades antioxidantes de sus ligandos de origen<sup>18</sup>. En este caso, los complejos de coordinación de cobre con sartanes que se sintetizan, podrían mejorar las propiedades antioxidantes del sartán que les dio origen, como la actividad SOD similar, entre otros. Se propone entonces que si el complejo tiene una buena actividad antioxidante, podría mejorar el efecto del sartán como antihipertensivo, no solo mediante su acción de bloqueante del receptor AT<sub>1</sub>, sino evitando también la disminución del NO, un importante vasodilatador, generado por el endotelio.

Finalmente, se propone estudiar el efecto de los complejos de coordinación en tres líneas celulares tumorales de cáncer de próstata, LNCaP, PC3 y DU145 basándonos en dos razones diferentes; por un lado, el daño oxidativo sobre el ADN es considerado el factor molecular más importante en el proceso de carcinogénesis; un compuesto con actividad antioxidante como pueden ser los complejos de sartanes, podría reducir la cantidad de ROS, interfiriendo así en la inducción, promoción o progresión de cáncer. Por otro

## 1.1. INTRODUCCIÓN: Cobre

lado, dado que las tres líneas de cáncer de próstata expresan los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ <sup>139</sup> resultan ser un muy buen modelo para determinar la relación entre la capacidad de bloquear el receptor  $AT_1$  con la actividad anticancerígena tanto de los complejos de coordinación, como de los sartanes.

Las razones por las cuales se propone la mejora de las propiedades de los sartanes a través de la complejación se resumen en el **esquema 6**.



**Esquema 6.** Fundamentos propuestos para complejar sartanes

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

### 1.2.1. COBRE(II) Y CANDESARTÁN (CuCand)

#### 1.2.1.1. Características fisicoquímicas y comerciales del candesartán

El candesartán (**Fig. 1a**) cuyo nombre según IUPAC es ácido 2-etoxi-3-[[4-[2-(2H-tetrazol-5-il)fenil]fenil]metil]benzimidazol-4-carboxílico es un bloqueador de los receptores de la angiotensina II (ARB) que pertenece estructuralmente a la familia de los bifenil tetrazoles. La molécula de candesartán puede sufrir dos desprotonaciones, la primera por parte de su grupo ácido carboxílico ( $pK_{a1} < 2$ ) y la segunda del anillo tetrazólico ( $pK_{a2}$  3,9)<sup>140</sup>. Esta doble desprotonación originaría una molécula cargada negativamente, que sería susceptible de complejar con el ión cobre(II).

Como se mencionó anteriormente, el candesartán se absorbe pobremente cuando se administra de manera oral por lo que no se comercializa como tal, en su lugar, se diseñó un éster que actúa como prodroga, el candesartán cilexetil (**Fig. 1b**) que se hidroliza rápida y completamente en la pared intestinal liberando candesartán. El candesartán cilexetil se comercializa como medicamento para tratar la hipertensión arterial. Dentro de las marcas más importantes se encuentran: Atacand®, Parapres®, Blopress®. Este fármaco, también se comercializa combinado con diuréticos para lograr un efecto aditivo antihipertensivo. Las preparaciones combinadas tienen varios nombres comerciales, entre ellos: Atacand HCT®, Ratacand Plus®.

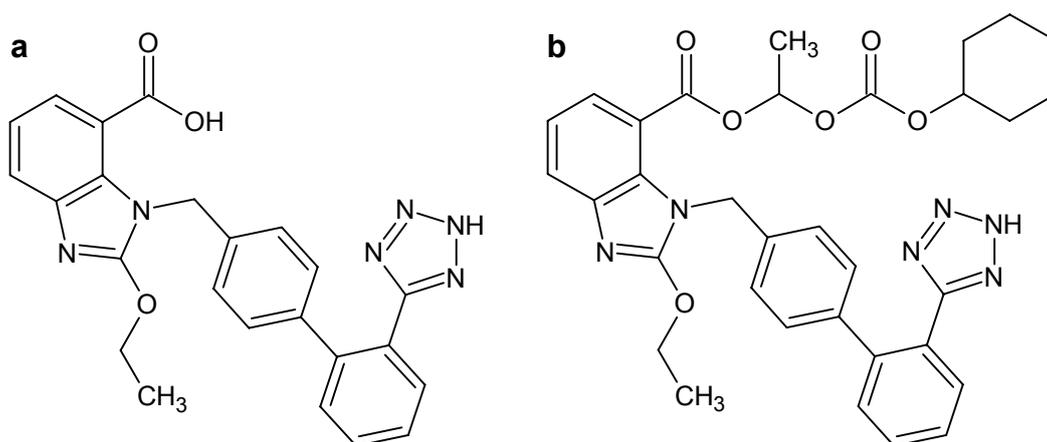


Figura 1. Estructuras moleculares de a) candesartán y b) candesartán cilexetil

#### 1.2.1.2. Síntesis del CuCand:

La síntesis del complejo [CuCand.4H<sub>2</sub>O] (CuCand) se realizó a partir del candesartán (**Fig. 1a**) ya que es el metabolito activo. Se sintetizó mediante el

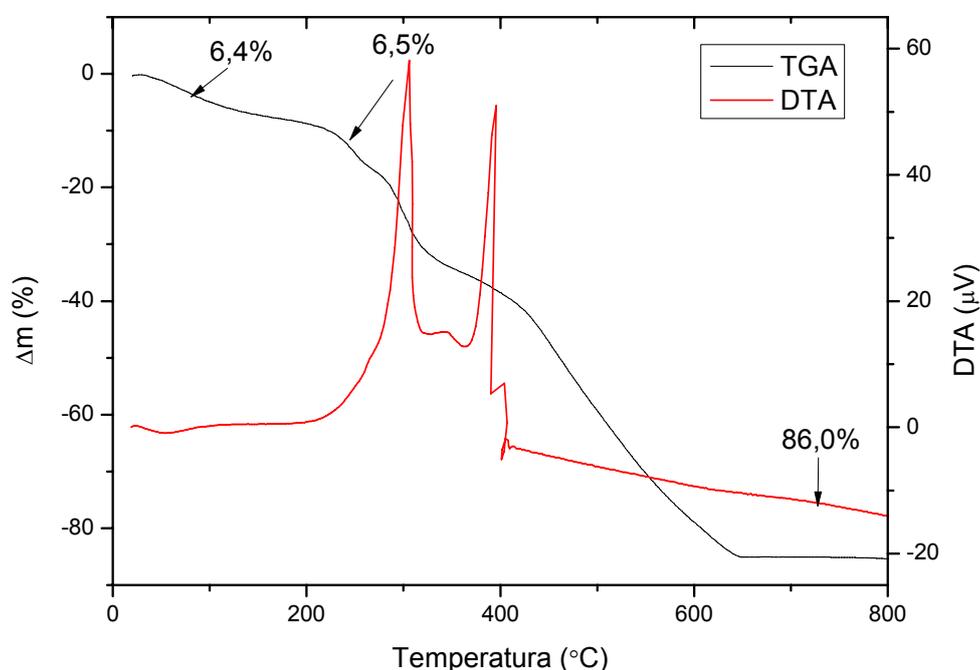
## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

agregado de una solución etanólica de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1 mmol, 5 ml) a una solución etanólica de candesartán (1 mmol, 10 ml). La solución resultante se mantuvo bajo agitación a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  y se llevó a pH 7-8 con solución acuosa 1 M de NaOH. Cuando el volumen se redujo cerca de un 80% se le agregó a la preparación 5 ml de agua y se obtuvo un precipitado verde que se filtró y lavó varias veces con agua y se secó en estufa a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Anal. calc. ( $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{N}_6\text{Cu}$ ) %:C 50,2; H, 4,5; N, 14,6. Exp. %: C 49,9; H, 4,4; N, 14,2.

### 1.2.1.3. Estudios en fase sólida

#### 1.2.1.3.1. TGA-DTA

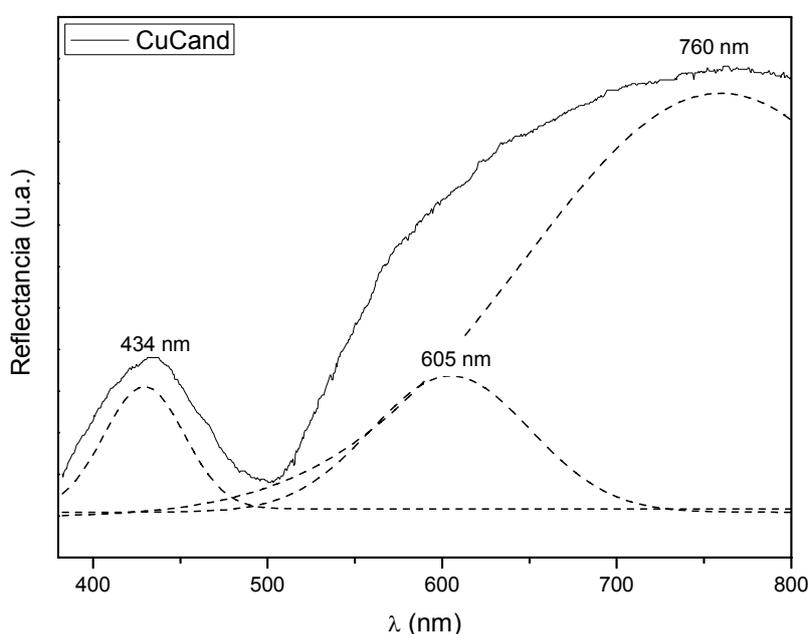
El análisis termogravimétrico del CuCand (**Fig. 2**) plantea la pérdida de un porcentaje (Calc. 6,3%, Exp.6,4%) de la masa total a temperaturas menores a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Esta pérdida, que está acompañada por un pico endotérmico en el DTA, puede relacionarse con la pérdida de dos moléculas lábiles de agua. Si así fuera, de las 4 moléculas de agua presentes en el complejo las de mayor labilidad se corresponden a las dos moléculas de agua localizadas en la posición axial del octaedro que conforma el complejo que, por efecto Jahn-Teller, se espera se pierdan a menores temperaturas que las dos moléculas de agua restantes, que en posición ecuatorial, se pierden generalmente en el rango entre  $100$  y  $200\text{ }^\circ\text{C}$  (Calc. 6,3%, Exp. 6,5%). A  $800\text{ }^\circ\text{C}$  la pérdida de peso (Calc. 86,1 %, Exp. 86,0 %) representa la formación de CuO, como residuo final, caracterizado por espectroscopía FTIR.



**Figura 2.** Curva termogravimétrica (TGA) (línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA) (línea roja) del complejo sólido  $[\text{CuCand}(\text{H}_2\text{O})_4]$  (CuCand) en atmósfera de  $\text{O}_2$ .

### 1.2.1.3.2. Reflectancia difusa

El complejo de candesartán con cobre(II) es un polvo de color verde que presenta en su espectro experimental de reflectancia difusa tres bandas, una localizada en 434 nm y dos bandas solapadas, una de ellas con máximo máximo en 605 nm y la otra de mayor intensidad en 760nm (**Fig. 3**). Estas tres bandas se asignan a transiciones electrónicas del tipo d-d. De acuerdo con el desdoblamiento generado por efecto Jahn-Teller, de las tres bandas, la de menor energía (760 nm) se asigna a una transición  $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , mientras que la banda que aparece como un hombro en 605 nm se asigna a una transición  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ . Por último, la banda de mayor energía en 434 nm se le asigna a la transición  $d_{xz,yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ .



**Figura 3.** Espectro de reflectancia difusa experimental para el complejo sólido  $[\text{CuCand}(\text{H}_2\text{O})_4]$  (línea sólida) y fiteo de la banda ancha de máximo en 760nm en sus respectivas bandas componentes (línea punteada).

### 1.2.1.3.3. FTIR y Raman

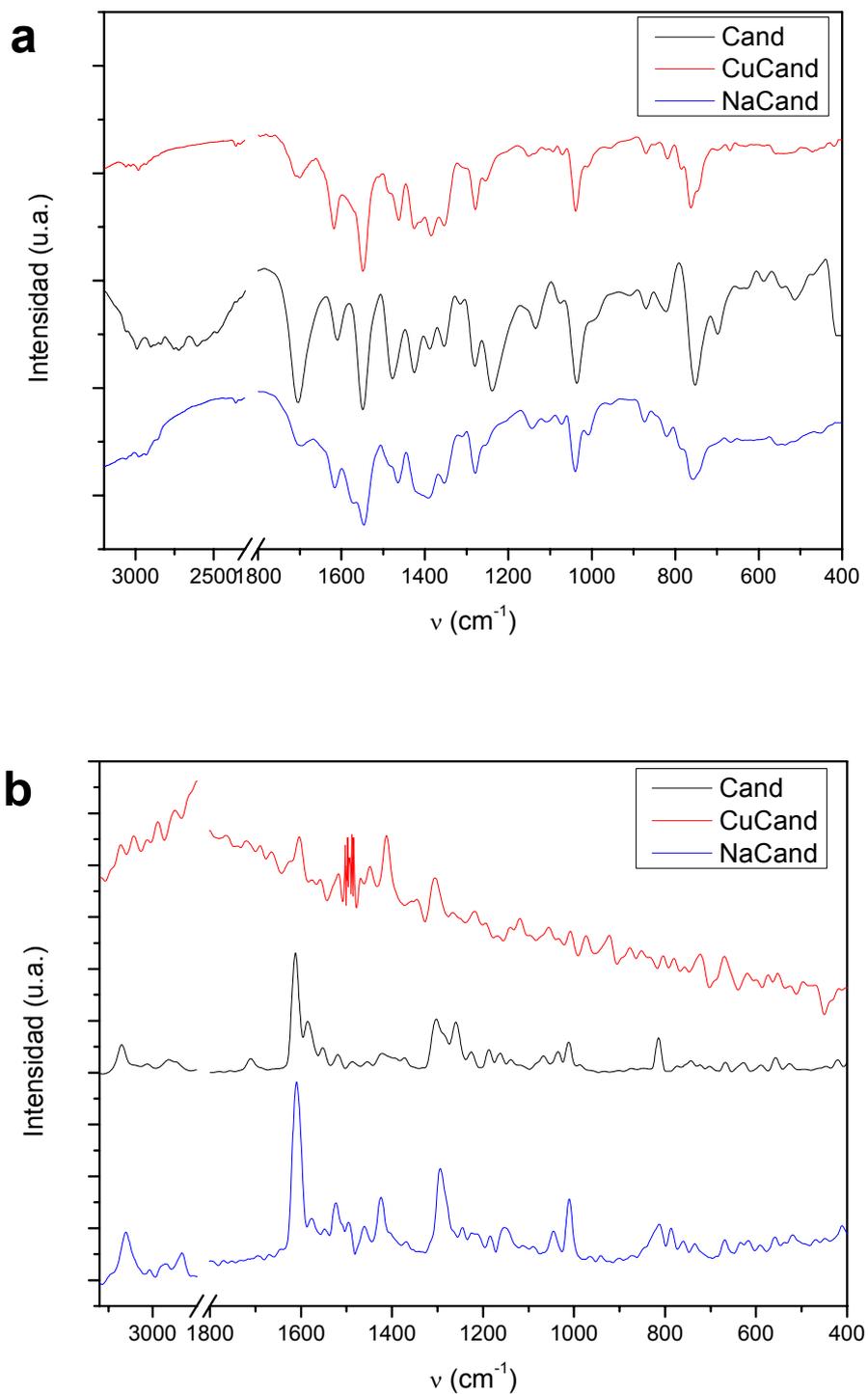
En una primera etapa, se estudió el patrón de los espectros vibracionales FTIR (**Fig. 4a**) y Raman (**Fig. 4b**) del candesartán (Cand) y su sal de sodio ( $\text{Na}_2\text{Cand}$ ) mediante el método del funcional de densidad B3LYP con el set de bases 6-31+G(d,p)<sup>141</sup>. El mismo se realizó para poder asignar los modos vibracionales de los principales grupos funcionales de la molécula y analizar los corrimientos que puedan derivar de la desprotonación del resto carboxílico y anillo tetrazólico. Con estos datos, se asignaron los espectros del complejo de candesartán con cobre(II) (CuCand). Las frecuencias vibracionales detectadas experimentalmente así como las asignaciones tentativas surgidas del estudio realizado se encuentran en la **tabla 1**.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

En el espectro FTIR, se sabe en general que los modos vibracionales típicos del candesartán que pertenecen al grupo NH localizado en el anillo tetrazólico ( $\text{NH}_{\text{tz}}$ ) se corren, desaparecen o se reducen en intensidad luego de la desprotonación y/o coordinación del mismo ( $1479 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1238 \text{ cm}^{-1}$  y  $1134 \text{ cm}^{-1}$ ). Como puede observarse, el espectro infrarrojo de la sal de sodio también difiere en algo con el del complejo, donde se presentan corrimientos del orden de  $5\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$  en aquellas bandas que están relacionadas a la coordinación del Cu(II) con el centro tetrazólico. Otras de las bandas correspondientes al grupo  $\text{NH}_{\text{tz}}$  no cambian luego de la desprotonación ya que son modos vibracionales combinados con otros de fuerte intensidad, como pueden ser el estiramiento C=C o los modos simétricos del  $\text{COO}^-$  ( $1550 \text{ cm}^{-1}$  y  $1350 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>141</sup>.

En el espectro FTIR se observa el mismo comportamiento con las bandas que corresponden al grupo carboxílico del candesartán ( $1705 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1426 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1212 \text{ cm}^{-1}$ ,  $823 \text{ cm}^{-1}$ , y  $1260 \text{ cm}^{-1}$  (esta última se observa en Raman)). Estas bandas disminuyen su intensidad luego de la formación de la sal o del complejo. Por otra parte, aunque el espectro Raman para el CuCand es muy ruidoso y exhibe cierto grado de fluorescencia, hay ciertas bandas que pueden ser observadas, cuando se las compara con el CuCand o el Cand. En el espectro Raman, la banda del candesartán en  $1260 \text{ cm}^{-1}$  (con componentes de los modos vibracionales correspondientes a los movimientos de flexión del grupo COH y NCH) aparece como una banda débil para el  $\text{Na}_2\text{Cand}$  con corrimiento hacia el azul ( $18 \text{ cm}^{-1}$ ) y con una intensidad media para el complejo de cobre. Pueden observarse nuevas bandas, o un aumento en la intensidad de las mismas para el CuCand y  $\text{Na}_2\text{Cand}$  correspondientes a modos vibracionales asociados a flexiones del grupo carboxilato en  $1463 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1384 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1151 \text{ cm}^{-1}$  y  $849 \text{ cm}^{-1}$ . Además las bandas asociadas al modo vibracional originado por el estiramiento antisimétrico del grupo carboxilato se ubican en  $1647 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{Cand}$ ) y  $1649 \text{ cm}^{-1}$  (CuCand) y las bandas que corresponden al estiramiento simétrico están en  $1354 \text{ cm}^{-1}$  y  $1352 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Considerando que la magnitud del desdoblamiento ( $\Delta\nu = \nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}}$ ) es indicativo del modo de coordinación, el cálculo realizado en nuestro caso para la sal de sodio es de  $293 \text{ cm}^{-1}$  y para el complejo CuCand es de  $297 \text{ cm}^{-1}$  lo que sugiere un modo monodentado de coordinación para el complejo de cobre<sup>142</sup>.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA: CuCand



**Figura 4.** Espectros experimentales de **a)** FTIR y **b)** Raman de: Cand (negro), CuCand (rojo) y Na<sub>2</sub>Cand (azul).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

**Tabla 1.** Asignación de las principales bandas del espectro FTIR y Raman del candesartán protonado (H<sub>2</sub>Cand), sal de sodio del candesartán (Na<sub>2</sub>Cand), y el complejo de cobre (CuCand) (posiciones de las bandas en cm<sup>-1</sup>).

Asignaciones tentativas	H <sub>2</sub> Cand		CuCand		Na <sub>2</sub> Cand	
	FTIR	Raman	FTIR	Raman	FTIR	Raman
$\nu$ C=O + $\delta$ COH	1705 vs	1710 m	1703 w		1698 w	
$\nu$ C=C + $\nu$ C=N <sub>Bz</sub> + $\nu_{as}$ COO <sup>-</sup>			1649 sh		1647 sh	
$\nu$ C=C + $\nu$ C=N <sub>Bz</sub>	1610 m	1613 vs 1608 sh	1617 m	1613 vs 1605 sh	1616 m	1613 vs 1608 sh 1605 vs
$\delta_{ip}$ NNH <sub>tz</sub> + $\delta_{ip}$ CCH <sub>arom</sub> + $\nu$ C=C	1549 vs	1552 m	1548 vs	1540 m	1546 vs	1548 w
$\delta_{ip}$ CCH <sub>arom</sub> + scissor CH <sub>2</sub> + def CH <sub>3</sub> + $\nu$ C-C <sub>tz-biph</sub>	1517 sh	1519 w	1516 sh	1524 m	1525 sh	1524 m 1509 m
$\delta$ NNH + $\nu$ C-C <sub>tz-biph</sub> + $\delta_{ip}$ CCH <sub>arom</sub>	1479 s	1487 w	1484 m		1489 m	1486 vw
$\delta$ NNH + $\delta$ CCH <sub>ip</sub> + scissor CH <sub>2</sub> + $\delta$ COH + $\nu$ CN <sub>Bz</sub>	1461 sh	1454 w	1463 m	1456 w	1463 m	1461 w
$\nu$ C=N <sub>Bz,tz</sub> + $\delta_{ip}$ CCH <sub>Bz</sub> + $\omega$ CH <sub>2</sub> + $\tau$ CH <sub>2</sub> + $\delta$ COH	1426 s	1422 w	1426 m 1408 m	1427 m 1415 s	1426 m 1406 sh	1426 m
$\delta_s$ CH <sub>3</sub> + $\omega$ CH <sub>2</sub> + $\nu$ CN <sub>Bz</sub> + $\nu$ C-COO <sup>-</sup>	1387 m	1372 w	1384 s		1389 s	1391 vw
$\delta$ NNH + $\omega$ CH <sub>2</sub> + $\nu$ C=C + $\nu$ CN <sub>Bz</sub> + $\nu_s$ COO <sup>-</sup>	1353 m	1355 sh	1352 m	1357 w	1354 m	1360 sh
$\delta$ COH + $\tau$ CH <sub>2</sub> + $\delta$ CCH + $\delta$ NCH + $\nu$ CN <sub>Bz</sub>		1260 s		1278 m		1260 w
$\nu$ NN + $\nu$ NH + $\delta$ NNH	1238 vs	1226 m	1252 w	1253 m 1226 w	1244 w	1245 m 1226 w
$\nu$ CO (COH) + $\nu$ NN + $\delta$ CCH <sub>arom</sub>	1212 sh 1190 sh	1187 m		1200 vw 1182 vw	1211 sh	1210 w 1185 w
$\delta_{ip}$ CCH <sub>arom</sub> + $\rho$ CH <sub>2</sub> + $\omega$ CH <sub>2</sub> + $\delta_{ip}$ NNH + $\nu$ CN <sub>Bz</sub> + $\nu$ (Bz)C - C(COO <sup>-</sup> )	1134 m 1112 sh	1139 w 1119 w	1151 m 1114 w	1152 w 1117 w	1141 m 1109 w	1148 m 1112 w
$\delta$ NNN + $\delta$ NCN + $\delta_{op}$ CCH + $\nu$ (Bz)C - C(COO <sup>-</sup> )	1039 s 1002 sh	1013 m	1040 s 1009 w	1012 s	1040 s 1009 w	1012 s
$\delta_{op}$ COH + $\delta_{op}$ CCH <sub>Bz</sub> + $\delta$ CCC (Et) + $\pi$ CCOO (COO <sup>-</sup> )	823 m	814 s	849 m 820 w	825 w	849 m 820 w	812 m
$\gamma_{op}$ NH + $\delta_{op}$ CCH + $\delta_{ip}$ CCC <sub>arom</sub> + $\pi$ NNCC	754 s	773 w	786 m 763 s	789 w 751 vw	787 m 760 s	787 m 760 w
$\delta$ OCO (COOH) + $\delta$ (Bz)COC (Et)	698 m	702 w	697 vw		694 w	
$\pi$ NNNH + Biph breath	674 sh	668 w				
Biph breath			670 w	685 vw	666 w	669 w

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

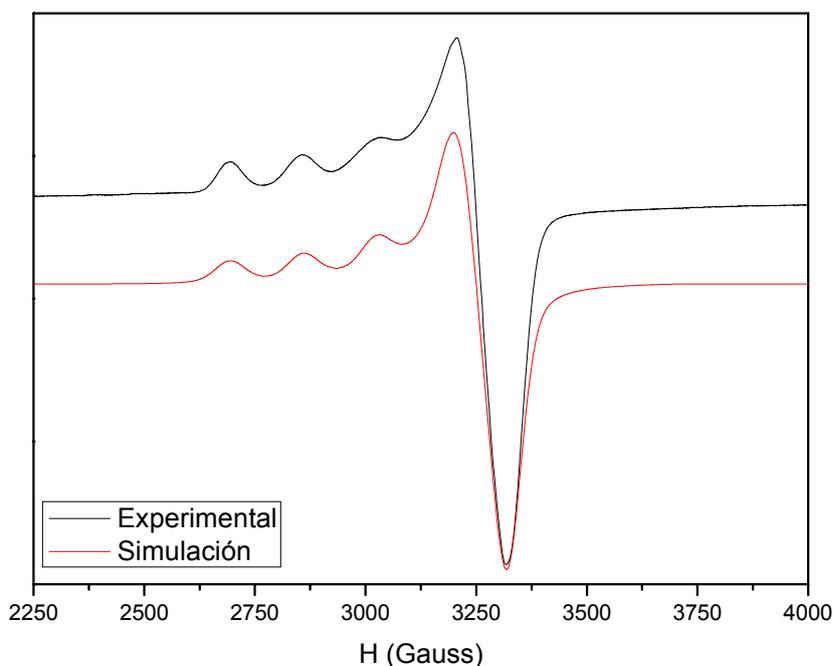
**Negrita:** principales modos del H<sub>2</sub>Cand. **Negrita:** principales modos del Na<sub>2</sub>Cand y el CuCand. Abreviaturas: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; vw: muy débil; sh, hombro. v, estiramiento; δ, flexión; ω, meneo; τ, torsión; ρ balanceo; π, deformación fuera del plano (4 átomos); s, simétrica; as, antisimétrica; arom, aromático; op, fuera del plano; ip, en el plano. Bz, benzimidazol; biph, bifenilo; tz, tetrazol; breath, respiración.

### 1.2.1.3.4. EPR

Se midió a temperatura ambiente el espectro de EPR en banda X y en banda Q del polvo del CuCand. La muestra policristalina en banda X (**Fig. 5**) muestra un patrón de desdoblamiento hiperfino de cuatro líneas debido al acoplamiento del electrón desapareado del núcleo del <sup>63</sup>Cu (I = 3/2).

La simulación del espectro EPR muestra que el complejo exhibe un tipo de señal monomérica con simetría axial. Los parámetros calculados para el Hamiltoniano de Spin son:  $g_{\parallel} = 2,283$  ( $A_{\parallel} = 176 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) y  $g_{\perp} = 2,061$  ( $A_{\perp} = 15 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). La tendencia que muestran los valores de g ( $g_{\parallel} > g_{\perp}$ ) es consistente con un complejo de Cu(II) con una geometría de bipirámide cuadrada con un estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$ <sup>84</sup>. El valor más bajo de  $g_{\parallel} > 2,04$  es característico de un ión cobre(II) con geometría de octaedro de base cuadrada axialmente elongado.

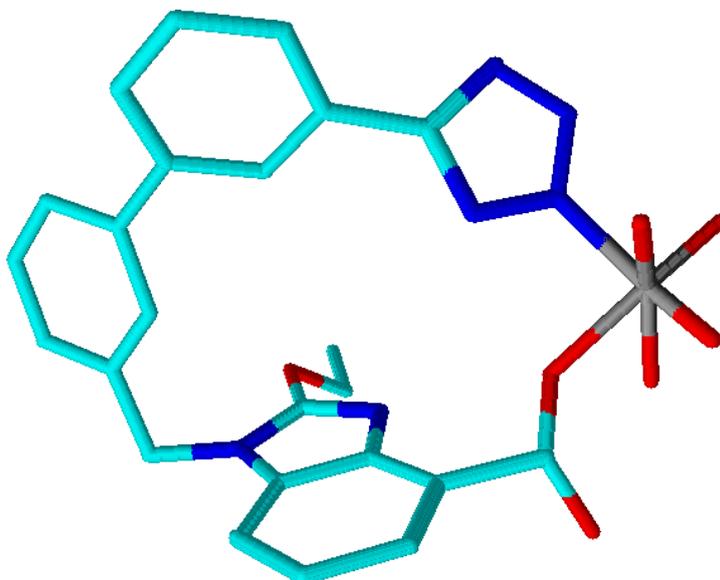
Los valores simulados para la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino (A) son similares a los encontrados para complejos de Cu(II) con cromóforos que contienen N y O como átomos donores en la esfera de coordinación<sup>137,143,144</sup>. Adicionalmente, el valor de  $G = 4,64$  para el complejo ( $G = (g_{\parallel} - 2)/(g_{\perp} - 2)$ ) indica que es factible despreciar la interacción entre los centros Cu(II) en el polvo microcristalino.



**Figura 5.** Espectro de EPR (banda X) del polvo del complejo [CuCand(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] (CuCand) a 300 K (negro) y espectro simulado (WINEPR SimFonia) (rojo).

### **1.2.1.3.5. Estructura propuesta para el CuCand sólido**

La estructura del CuCand en fase sólida se propuso a partir de las medidas descritas anteriormente ya que no fue posible obtener un cristal ordenado que permitiera la determinación de su estructura mediante rayos X. El complejo es insoluble en agua y muy soluble en etanol, DMSO y dimetil formamida (DMF). El análisis elemental de C, H, N y el análisis térmico están en concordancia con una estequiometría L:M 1:1 que posee 4 moléculas de agua en su esfera de coordinación. A partir de los espectros FTIR y Raman se obtuvo evidencia de la interacción del metal con los grupos carboxilato y el N desprotonado del resto tetrazol del ligando y a partir del espectro EPR se postuló una estructura octaédrica con deformación tetragonal donde la constante de acoplamiento hiperfino se encuentra dentro de los valores esperados para el entorno de coordinación propuesto. Sobre la base de los estudios realizados, la estructura propuesta para el complejo se muestra en la **figura 6**.



**Figura 6.** Estructura propuesta en el sólido para el [CuCand.4H<sub>2</sub>O] (CuCand).

### **1.2.1.4. Estudios en solución**

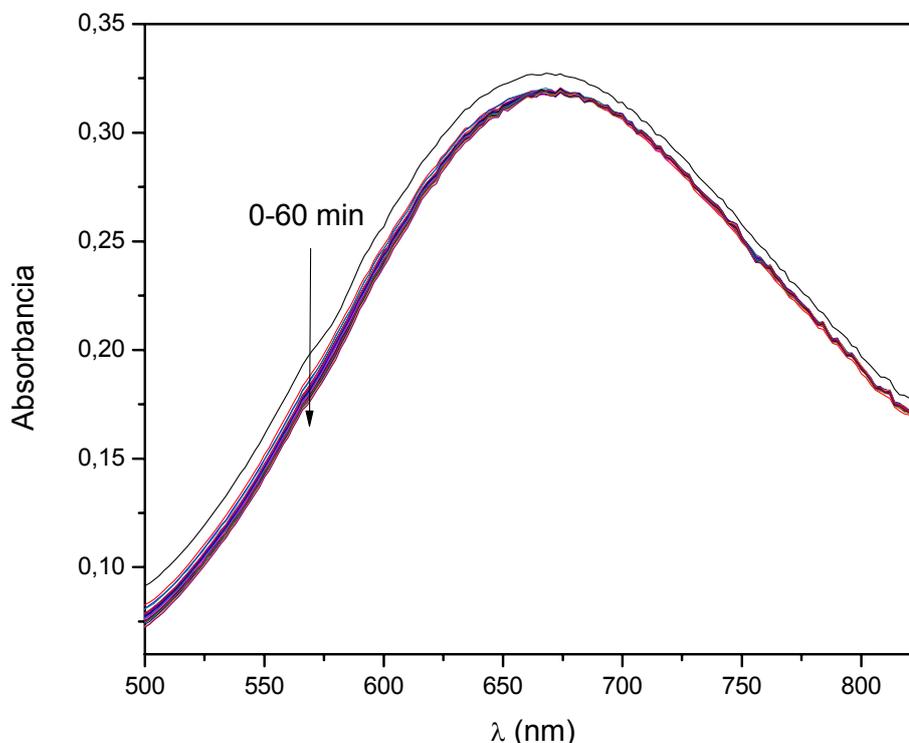
#### **1.2.1.4.1. UV-vis y estabilidad**

El espectro UV-vis del CuCand, a pH 8,4 en solución etanólica, exhibe una banda localizada en 670 nm ( $\epsilon = 100,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Este espectro es diferente al del sólido obtenido mediante reflectancia difusa, lo que sugiere cambios en la esfera de coordinación del complejo luego de la disolución del mismo donde probablemente se reemplacen las moléculas de agua del entorno del complejo por moléculas de etanol.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad del complejo siguiendo los cambios de la banda en 670 nm en función del tiempo, en solución etanólica, a

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

una concentración  $5 \times 10^{-3}$  M (**Fig. 7**). Dado que la absorbancia solo se reduce aproximadamente un 3% durante los 60 min del experimento, se supuso que el complejo es estable, al menos en las condiciones experimentales ensayadas, lo que permite proceder con la determinación de las propiedades antioxidantes y antihipertensivas en ese solvente.

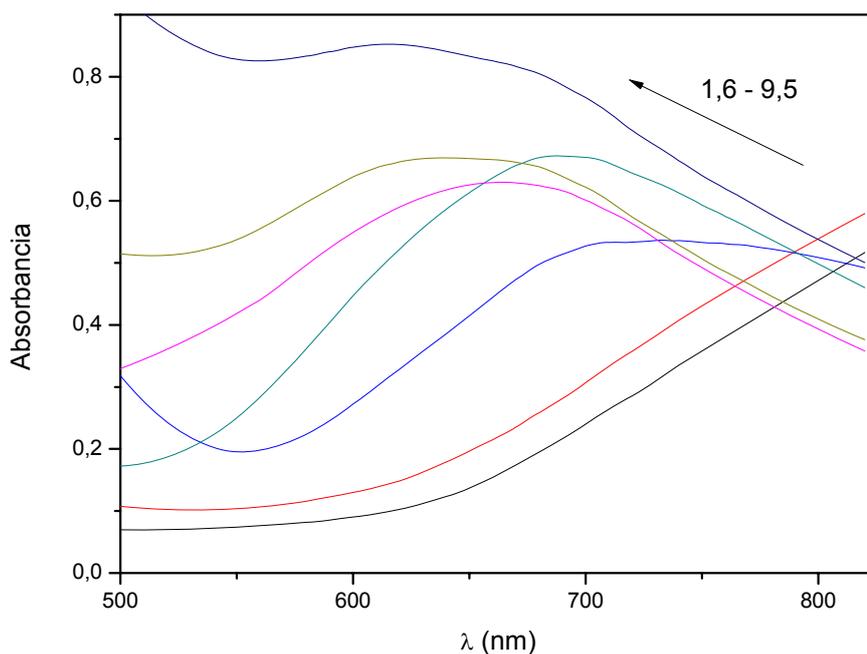


**Figura 7.** Espectro electrónico del CuCand ( $5 \times 10^{-3}$  M) en solución etanólica a distintos tiempos entre 0 y 60 min. La flecha indica el sentido de desplazamiento de las curvas.

### 1.2.1.4.2. Variación con el pH

Se midió el espectro en la región visible del espectro de una solución etanólica 1:1 de candesartán y cobre(II) (0,025 M) a diferentes valores de pH (**Fig. 8**). A valores bajos de pH el espectro se corresponde con el del  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en solución etanólica. En el rango de pH entre 6 y 9 las bandas que aparecen en 670 nm indican la formación del complejo 1:1 L:M e solución. Luego, a valores mayores de pH se observa turbidez probablemente debido a la formación de hidróxidos o alcóxidos de cobre(II).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand

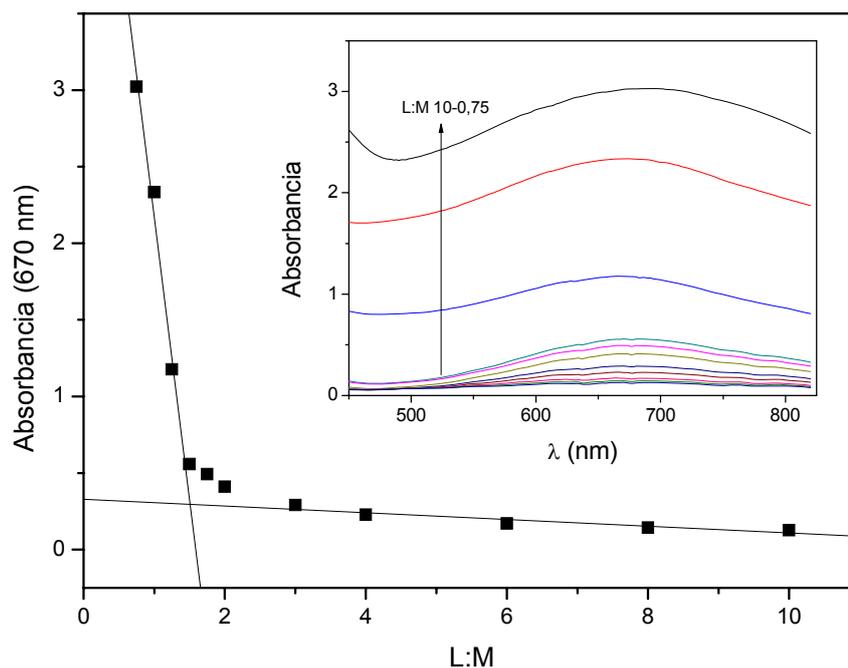


**Figura 8.** Determinación espectrofotométrica de la formación del complejo en solución etanólica. Espectro en la región visible de una mezcla de soluciones en relación 1:1 de candesartán y cobre (0,0025 M) a diferentes valores de pH. La flecha indica el corrimiento de la banda en el espectro al aumentar el pH.

### 1.2.1.4.3. Titulación espectrofotométrica

Para establecer la estequiometría del complejo que se forma en solución se aplicó el método de la razón molar. A una solución 0,025 M de candesartán se le agregaron cantidades crecientes de una solución 0,5 M de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se registró su espectro de absorbancia luego de cada agregado (**Fig. 9**). La relación ligando:metal (L:M) fue variada desde 10 hasta 0,75 y el pH ajustado a un valor de 8,4 con una solución de NaOH 0,1 M. Se determinó la estequiometría final, dando como resultado una relación L:M= 1:1, en concordancia con relación metal/ligando en el complejo sólido.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuCand



**Figura 9.** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo en solución determinado a 670 nm mediante el método de la razón molar. Inset: espectro UV-vis de candesartán (0,01 M) con la adición de 0,5 M de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O con relación ligando metal (L:M) desde 10 a 0,75 (pH 8,4) en etanol. La flecha indica el incremento en la adición del metal.

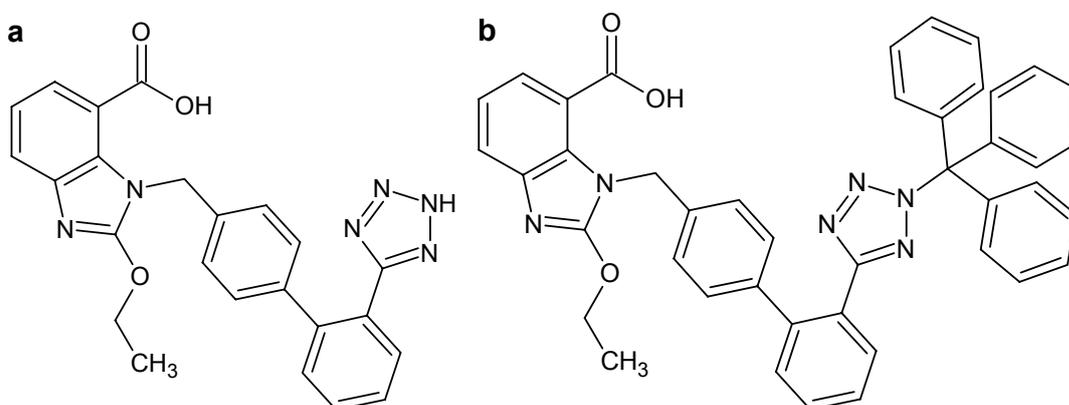
### 1.2.1.4.4. Estructura propuesta para el CuCand en solución

De acuerdo con lo observado mediante espectroscopía electrónica de las soluciones etanólicas del complejo, se propone una estructura similar a la del estado sólido (**Fig. 6**), con relación 1:1 M:L, aunque se propone también que las moléculas de agua que coordinan en el complejo se reemplazan por moléculas de etanol. Sin embargo, con los estudios realizados no puede precisarse cuantas de los cuatro moléculas de agua se intercambian.

**1.2.2. COBRE (II) Y TRITILCANDESARTAN (CuTCand)****1.2.2.1. Características fisicoquímicas del tritilcandesartán**

El tritilcandesartán (**Fig. 10a**) es un derivado del candesartán (**Fig. 10b**) que se obtiene como intermediario en la síntesis del candesartán cilexetil. Luego de sintetizar el candesartán, se utiliza un grupo protector como es el trifeníl metano (tritilo) que bloquea el nitrógeno del grupo tetrazólico. En un paso posterior se produce la acetilación del grupo ácido, formando el tritilcandesartán cilexetil, y por último se trata el compuesto con un ácido de Lewis selectivo, de manera que solo hidroliza el grupo tritilo obteniendo finalmente el candesartán cilexetil<sup>145</sup>.

Con la idea de mejorar los efectos biológicos del candesartán y su biodisponibilidad, se han realizado numerosas modificaciones a su estructura. Se ha demostrado que la metilación del anillo tetrazólico con la consecuente pérdida del grupo ácido, produce una reducción de la potencia de la droga en 1000 unidades de magnitud. A partir de esto se puede concluir que la interacción iónica con el receptor de la angiotensina II es más probable que las interacciones por puente de hidrógeno<sup>146</sup>. Con el fin de ayudar a establecer una relación estructura-actividad, se propone trabajar con el complejo de cobre(II) con el tritilcandesartán, en el cual, el hidrógeno tetrazólico se encuentra bloqueado (figura 1b) y por tanto no puede intervenir en la coordinación con el metal. De este modo, mediante la comparación con el candesartán y su complejo de cobre, se puede establecer cierta relación entre los grupos funcionales presentes y su actividad biológica como antihipertensivo, antioxidante o antitumoral.



**Figura 10.** Estructuras del a) candesartán (Cand) y b) tritilcandesartán (TCand)

**1.2.2.2. Síntesis**

Se sintetizó el complejo  $[\text{Cu}_2(\text{TCand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand) a partir de una solución etanólica de TCand (**Fig. 10b**) (1 mmol, 10 ml) calentando a 70°C y agregando una solución etanólica de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,5 mmol, 5 ml) mientras se agitaba. El pH fue ajustado a 7 mediante la adición de una solución acuosa 1M de NaOH. Luego se concentró la mezcla por evaporación hasta obtener un volumen final de 5 ml. Se le agregó a continuación 10 ml de agua y

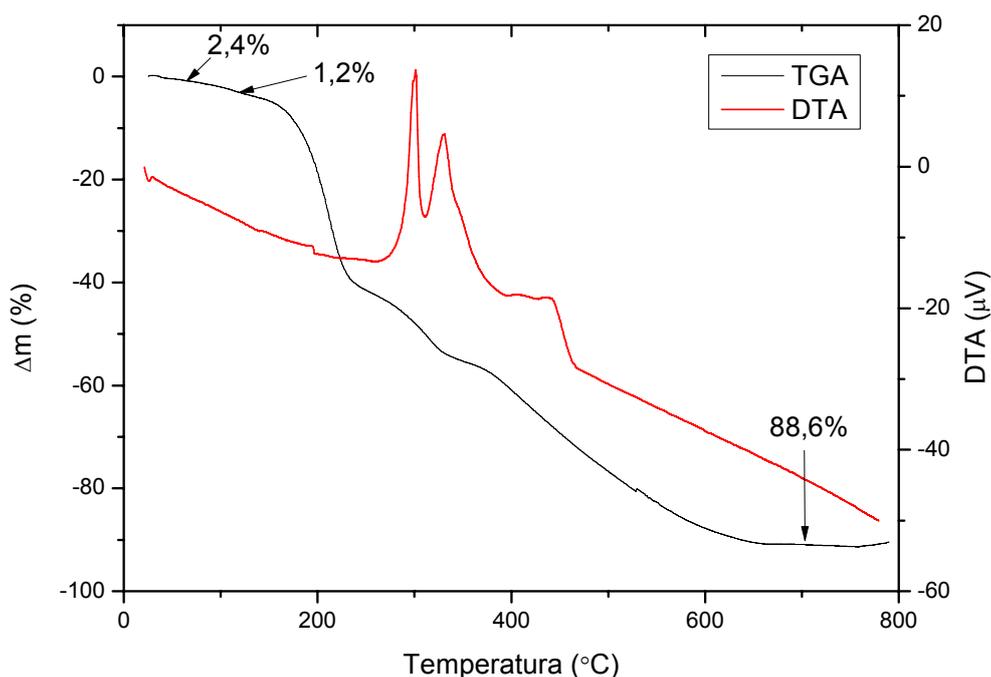
## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

el sólido verde obtenido se filtró, se lavó con agua y se secó a 60°C. Anal. Calc. %: C, 69,7; H, 4,9; N, 11,3. Exp. %: C, 70,0; H, 4,8; N, 11,2.

### 1.2.2.3. Estudios en fase sólida

#### 1.2.2.3.1. TGA-DTA

Mediante el análisis termogravimétrico (TGA) (**Fig. 11**) se determinó que las cuatro moléculas de cristalización del complejo se perdieron a una temperatura de 80 °C acompañadas de un pico endotérmico en el DTA (pérdida de peso, 2,4%) a su vez que las dos moléculas de agua de coordinación, como era de esperar, se perdieron a una mayor temperatura (140 °C, pérdida de peso, 2,4%). La pérdida total de peso calculada experimentalmente relacionada a las moléculas de agua es del 3,6 % y se correlaciona razonablemente bien con el valor teórico calculado (3,6 %). La curva de calentamiento indica que a una temperatura mayor de 800 °C se obtiene un residuo estable que identificado por FTIR da cuenta de la presencia de CuO. Para este proceso, se encontró una buena correlación entre el valor experimental de la pérdida total de masa  $\Delta m_{\text{exp}}=86,8\%$  y el valor calculado,  $\Delta m_{\text{calc}}=86,9\%$ .



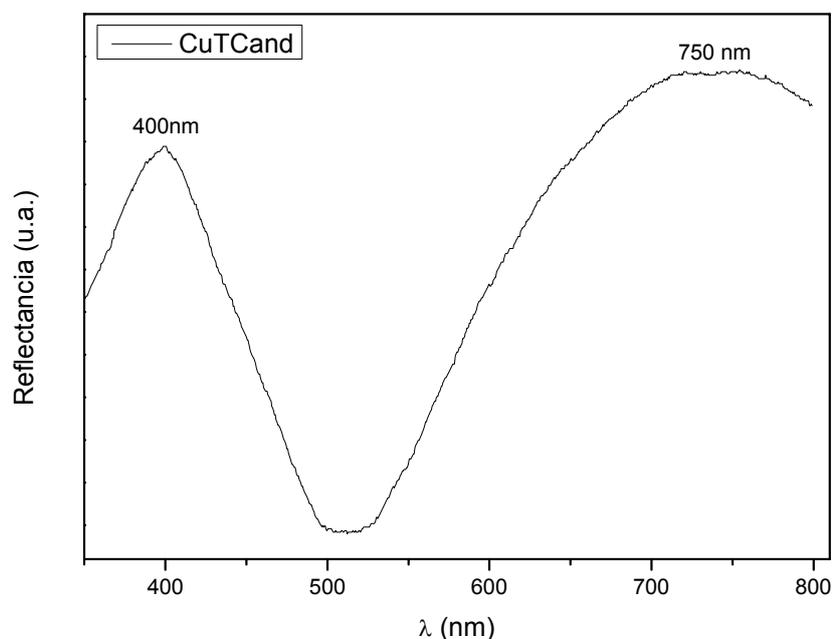
**!Figura 11.** Curva termogravimétrica (TGA) (línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA) (línea roja) del complejo sólido  $[\text{Cu}_2(\text{Tcand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand) en atmósfera de  $\text{O}_2$ .

#### 1.2.2.3.2. Reflectancia difusa

En el espectro de reflectancia difusa se observan dos bandas definidas, una localizada a 400 nm y la otra en 750 nm (**Fig. 12**). La presencia de interacciones entre los centros metálicos en el CuTCand se puede suponer por la aparición de la banda típica de alta intensidad que aparece alrededor de 400

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

nm<sup>137,141</sup>. En particular, el complejo de CuTCand muestra un patrón similar al del complejo de valsartán con cobre (380 nm-750 nm) lo que sería indicativo de un complejo dimérico. Las esferas de coordinación de ambos complejos metálicos se componen por átomos de oxígeno provenientes de grupos carboxilatos puentes y moléculas de agua como ligandos como se discutirá más adelante.



**Figura 12.** Espectro de reflectancia difusa para el complejo sólido  $[\text{Cu}_2(\text{Tcand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand)

### 1.2.2.3.3. FTIR y Raman

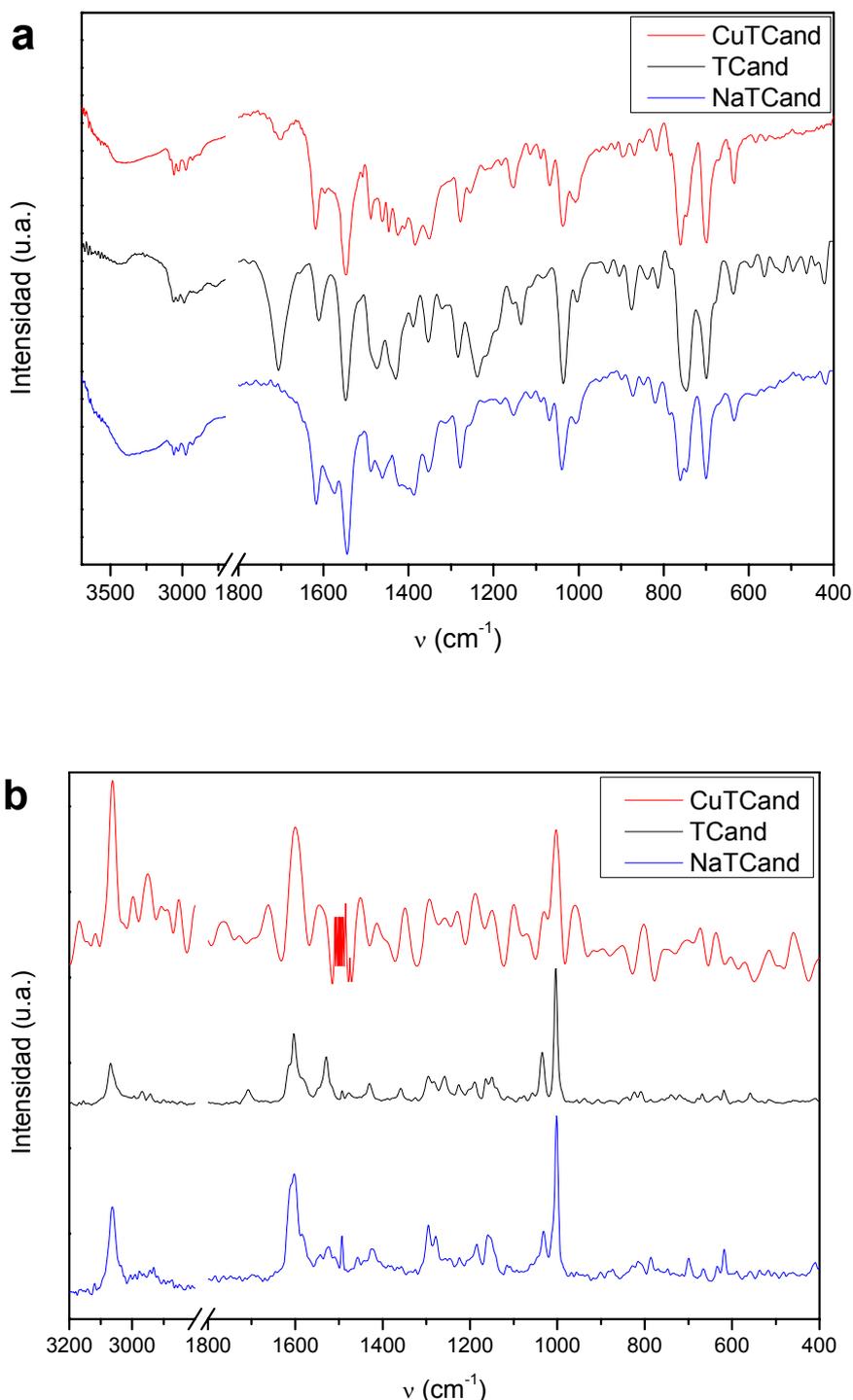
Se realizó la medida de los espectros de FTIR (**Fig. 13a**) y Raman (**Fig. 13b**) del tritil candesartán (TCand), su sal de sodio (NaTCand) y el complejo de cobre (CuTCand) y se estudiaron los principales cambios entre las tres especies.

Las asignaciones para el tritil candesartán se realizaron por comparación con los modos vibracionales del candesartán y de su sal de sodio. Las principales diferencias entre los dos sartanes son las vibraciones típicas del grupo tritilo y la ausencia de los modos vibracionales asignados al resto N-H del anillo tetrazol protonado (**Tabla 2**).

Las bandas observadas a  $750\text{ cm}^{-1}$  y  $700\text{ cm}^{-1}$  son típicas de los anillos bencénicos monosustituídos (C-H aromáticos fuera del plano) como es el caso del grupo tritilo<sup>147</sup>. Las bandas debido al grupo carboxílico que se presentan en  $1705\text{ cm}^{-1}$ ,  $1475\text{ cm}^{-1}$ ,  $1430\text{ cm}^{-1}$ ,  $1238\text{ cm}^{-1}$ ,  $1187\text{ cm}^{-1}$  (Raman) y  $874\text{ cm}^{-1}$  se corren o aparecen con menor intensidad en la sal de sodio o en el complejo con cobre. Por otro lado, las bandas relacionadas al ligando TCand en su forma desprotonada aparecen en la sal de sodio a  $1618\text{ cm}^{-1}$ ,  $1416\text{ cm}^{-1}$ ,  $1389\text{ cm}^{-1}$ ,  $1152\text{ cm}^{-1}$  y  $1067\text{ cm}^{-1}$  y se modifican respecto a las del complejo con cobre

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

fundamentalmente en la región de  $1445\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$ . Además, la diferencia calculada entre las frecuencias vibracionales asignadas a los movimientos de estiramiento simétrico y antisimétrico es de  $202\text{ cm}^{-1}$  para la sal de sodio y  $173\text{ cm}^{-1}$  para el complejo. La diferencia menor en el valor de  $(\Delta\nu=\nu_{\text{as}}-\nu_{\text{s}})$  para los modos de estiramiento del grupo carboxilato en el complejo indican una coordinación del tipo puente  $\text{RCOO}^-$  entre los centros metálicos<sup>142</sup>.



**Figura 13.** Espectros experimentales de **a)** FTIR y **b)** Raman del TCand (negro), CuTCand (rojo) y NaTCand (azul)

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

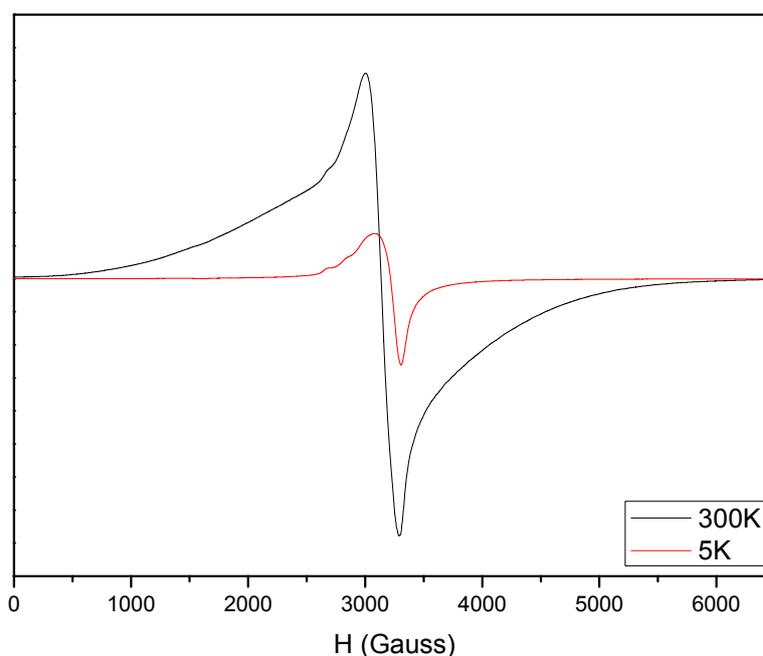
**Tabla 2.** Asignación de las principales bandas del espectro FTIR y Raman del tritil candesartán protonado (HTCand), tritil candesartán de sodio (NaTCand) y el complejo de cobre (CuTCand) (posiciones de las bandas en  $\text{cm}^{-1}$ )

Asignación	HTCand		CuTCand		NaTCand	
	FTIR	Raman	FTIR	Raman	FTIR	Raman
$\nu \text{C=O} + \delta \text{COH}$	1705 s	1708 m	1701 w			
$\nu \text{C=C} + \nu \text{C=N}_{\text{Bz}}$ $\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$	1608 m	1603 s	1618 s 1595 m, sh	1600 s	1618 s 1578 s	1609 sh 1603 s
$\delta_{\text{ip}} \text{CCH}_{\text{arom}} + \nu$ $\text{C=C} + \nu \text{C-C}_{(\text{biph}, \text{tetraz})}$	1547 vs	1529 m	1547 vs	1557 vw	1547 vs	1543 vw
$\delta_{\text{ip}} \text{CCH}_{\text{arom}} + \text{scissor}$ $\text{CH}_2 + \text{def CH}_3 + \nu$ $\text{C-C}_{\text{tz-biph}}$	1519 vw	1519 sh	1510 vw	1528 w	1516 vw	1526 w 1511 w
$\nu \text{C-C}_{\text{tz-biph}} + \delta_{\text{ip}}$ $\text{CCH}_{\text{arom}}$	1481 sh	1493 m	1491 m		1484 m	
$\delta \text{CCH}_{\text{ip}} + \text{scissor}$ $\text{CH}_2 + \delta \text{COH} + \nu$ $\text{CN}_{\text{Bz}}$	1475 s 1439 s, sh	1467 m 1461 m	1463 m		1463 m 1457 sh	1461 w
			1445 s	1449 m	1416 m	1423 w
$\nu \text{C=N}_{\text{Bz,tz}} + \delta_{\text{ip}}$ $\text{CCH}_{\text{Bz}} + \omega \text{CH}_2 + \tau$ $\text{CH}_2 + \delta \text{COH} + \nu_{\text{s}}$ $\text{COO}^-$	1430 s	1430 w	1427 m 1412 w	1405 m	1405 sh	1411 w
$\delta_{\text{s}} \text{CH}_3 + \omega \text{CH}_2 + \nu$ $\text{CN}_{\text{Bz}} + \nu \text{C-COO}^-$	1388 m	1360 w	1389 s	1378 w	1389 s	1391 vw
$\omega \text{CH}_2 + \nu \text{C=C} + \nu$ $\text{CN}_{\text{Bz}}$	1353 m	1359 w	1353 m	1334 sh 1316 w	1354 m 1313 w	
$\tau \text{CH}_2 + \delta \text{CCH} + \delta$ $\text{NCH} + \nu \text{CN}_{\text{Bz}}$	1284 m	1297 m 1285 sh	1277 m	1282 w	1278 m	1296 m 1280 m
$\delta \text{COH} + \nu \text{NN}$	1238 vs	1257 m 1226 m	1255 w	1257 m	1259 sh	1245 m 1226 w
$\nu \text{CO (COH)}$ $+ \nu \text{NN} + \delta \text{CCH}_{\text{arom}}$	1216 sh 1196 sh	1187 m	1220 w 1208 sh	1210 w		1202 vw 1185 w
$\delta_{\text{ip}} \text{arom CCH} + \rho \text{CH}_2$ $+ \omega \text{CH}_2 +$ $\nu \text{CN}_{\text{Bz}} + \nu (\text{Bz})\text{C} -$ $\text{C(COO)}$	1153 sh 1136 m 1112 sh	1150 m 1139 w 1119 w	1153 m 1115 w	1160 w 1134 w	1152 m 1112 w	1160 m 1153 sh
$\delta \text{NNN} +$ $\delta \text{NCN} + \delta_{\text{op}} \text{CCH} +$ $\nu (\text{Bz})\text{C} - \text{C(COO)}$	1072 sh 1038 s 1005 m	1004 s	1068 m 1038 s 1008 m	1003 s	1067 m 1040 s 1009 m	1002 vs
$\delta_{\text{op}} \text{COH} + \delta_{\text{op}}$ $\text{CCH}_{\text{Bz}}$ $+ \delta \text{CCC (Et)} + \pi$ $\text{CCOO (COO)}$	874 m 840 w 813 w	814 s	872 w 849 vw 820 w	813 w	874 w 818 w	814 w
$\delta_{\text{op}} \text{CH (trityl)} + \delta_{\text{op}}$ $\text{CCH} + \delta_{\text{ip}} \text{CCC}_{\text{arom}}$	750 vs	740 w	748 sh 760 vs	780 w	785 sh 755 s	787 w 750 vw
$\delta_{\text{op}} \text{CH (trityl)} + \delta$ $\text{OCO (COOH)} + \delta$ $(\text{Bz})\text{COC (Et)}$	700 s		700 vs	700 w	701 vs	700 w
Biph breath	675 sh	668 w	670 sh	656 w	670 sh	667 vw

**Negrita:** principales modos del HTCand. **Negrita:** principales modos del NaTCand y el CuTCand. Abreviaturas: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; vw, muy débil; sh, hombro.  $\nu$ , estiramiento;  $\delta$ , flexión;  $\omega$ , meneo;  $\tau$ , torsión;  $\rho$  balanceo;  $\pi$ , deformación fuera del plano (4 átomos); s, simétrica; as, antisimétrica; arom, aromático; op, fuera del plano; ip, en el plano. Bz, benzimidazol; biph, bifenilo; tz, tetrazol; breath, respiración.

### 1.2.2.3.4. EPR

Se realizó el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a distintas temperaturas para el compuesto binuclear  $[\text{Cu}_2(\text{TCand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand). La determinación realizada a 300K muestra el ensanchamiento en la línea centrada en 3200 Gauss lo que indicaría la presencia de una interacción spin-spin antiferromagnética<sup>144,148</sup> (**Fig. 14, negro**). La naturaleza del intercambio del acoplamiento de los pares Cu-Cu es evidente por la dependencia térmica de la intensidad del espectro EPR. Cuando la temperatura disminuye, el estado triplete queda despoblado y como consecuencia, decae la intensidad del espectro. A 5K (**Fig. 14, rojo**) se observa una pequeña señal que corresponde a la presencia de una pequeña cantidad de impureza monomérica. Esta señal se encuentra usualmente en complejos dinucleares de cobre con carboxilatos<sup>149</sup>.



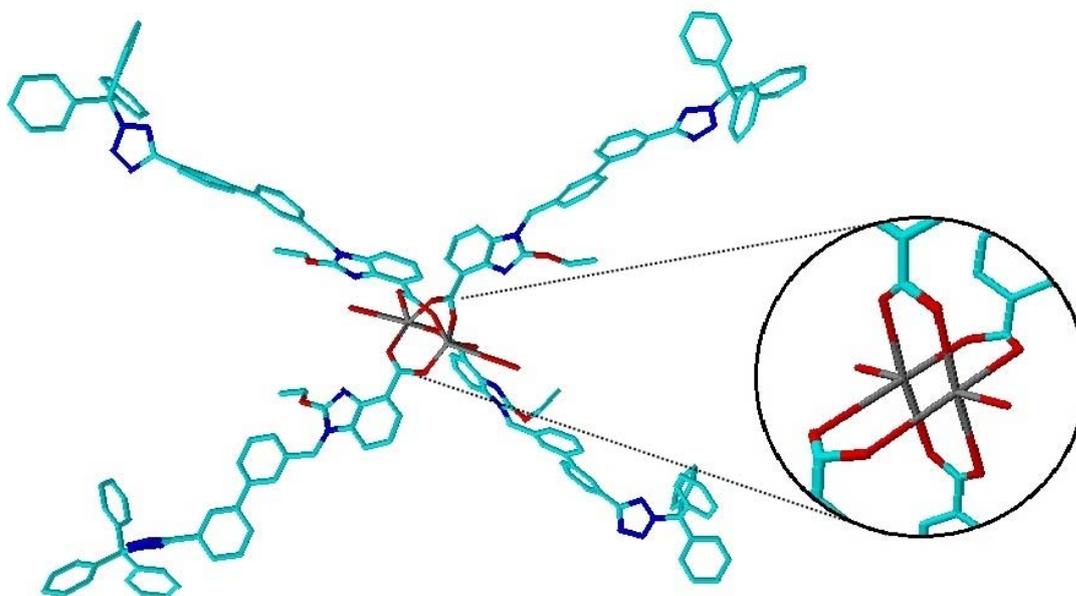
**Figura 14.** EPR del polvo (banda X) del complejo  $[\text{Cu}_2(\text{Tcand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand) a 300 K (negro) y a 5 K (rojo).

### 1.2.2.3.5. Estructura propuesta para el CuTCand sólido

El complejo obtenido es insoluble en agua y soluble en etanol, DMSO y dimetilformamida (DMF). El análisis elemental muestra una estequiometría M:L 1:2 y el análisis térmico confirma la presencia de cuatro moléculas de agua de hidratación y dos moléculas de agua de cristalización por cobre. Mediante el análisis de los espectros vibracionales FTIR y Raman, se tuvo evidencia de la interacción del metal con el grupo carboxilato, mientras que la geometría y nuclearidad del complejo se dedujeron del espectro electrónico de EPR. En conjunto, se dio cuenta de un complejo binuclear con una coordinación a través de los grupos carboxilato actuando como puentes. La estructura propuesta es la de la **figura 15**. Desafortunadamente, tampoco pudieron obtenerse cristales

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

ordenados que permitieran la determinación estructural mediante difracción de rayos X.



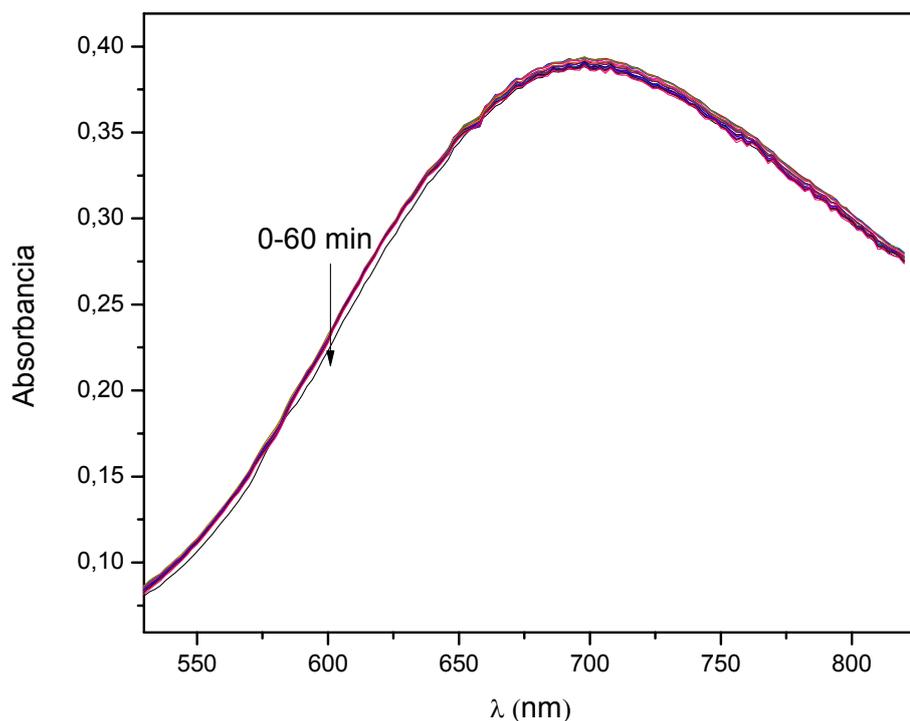
**Figura 15.** Estructura propuesta para el complejo sólido del  $[\text{Cu}_2(\text{Tcand})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CuTCand).

### 1.2.2.4. Estudios en solución

#### 1.2.2.4.1. UV-vis y estabilidad

La disolución del complejo CuTCand en etanol, muestra un espectro con bandas localizadas en 690 nm, ( $\epsilon=202,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), mientras que para el determinado utilizando DMSO como solvente se observa un pequeño corrimiento hacia el azul de aproximadamente 10 nm el cual puede atribuirse a efectos solvatocrómicos a consecuencia del cambio de solvente. Se midió la estabilidad del complejo por un período 0-60 min en solución etanólica ( $4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) y en DMSO (no mostrado). En ninguno de los casos se observaron cambios en la intensidad durante los 60 minutos. Para la estabilidad del complejo en solución etanólica (**Fig. 16**) se observó que la banda en 690 nm redujo su absorbancia solamente un 1,3% luego de 60 min, por lo que se supuso la estabilidad del complejo por al menos 60 min.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand

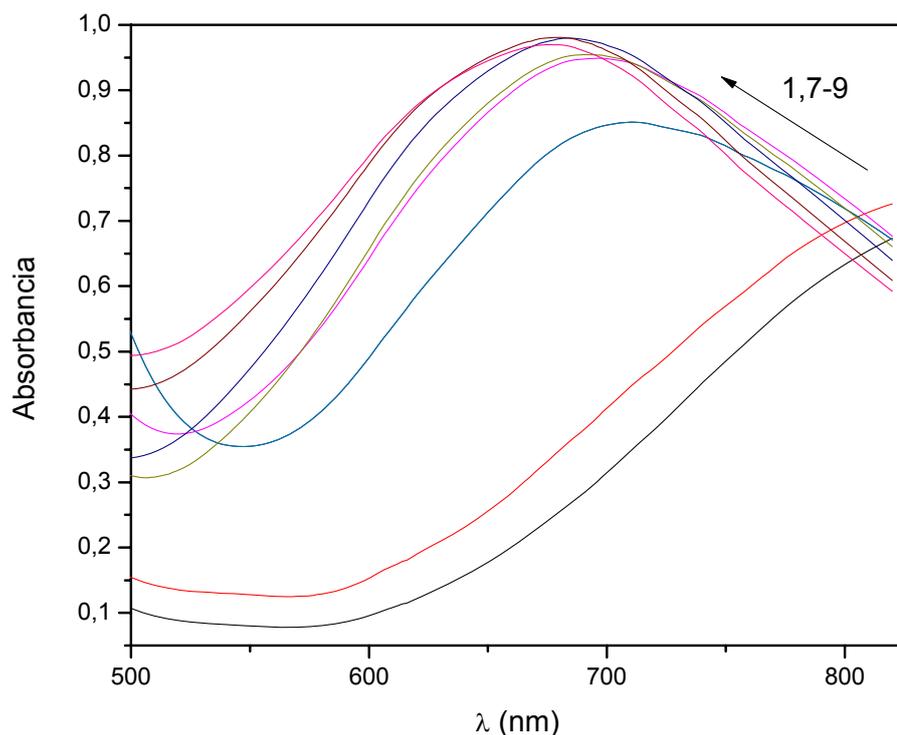


**Figura 16.** Estabilidad del CuTCand a una concentración de  $4 \cdot 10^{-3}$  M en solución etanólica a distintos tiempos entre 0 y 60 min. La flecha indica el sentido de desplazamiento de las curvas.

### 1.2.2.4.2. Variación con el pH

Se realizó la variación con el pH de una mezcla de soluciones etanólicas de tritil candesartán (0,025 M) y de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,0125 M). Los cambios espectrales a los distintos pH se muestran en la **figura 17**. Puede verse que la formación del complejo ocurre a pH entre 4 y 8. A valores más altos de pH la observación experimental indica la formación de turbidez, probablemente debido a la formación de algún hidróxido o alcóxido de cobre(II).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand



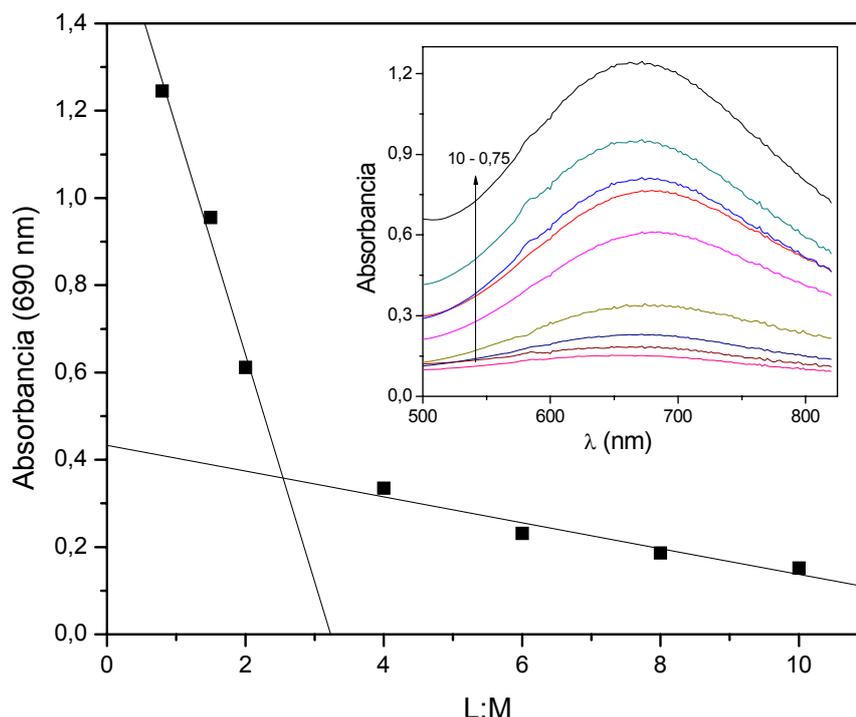
**Figura 17.** Determinación espectrofotométrica de la formación del complejo en solución etanólica. Espectro en el visible de una mezcla de soluciones en relación 2:1 de tritil candesartán (0,025M) y cobre(II) (0,0125 M) a diferentes valores de pH. La flecha indica el corrimiento del espectro al aumentar el pH.

### 1.2.2.4.3. Titulación espectrofotométrica

Se aplicó el método de la razón molar para establecer la estequiometría para la formación de los complejos en solución. Se registró el espectro de absorción de distintas soluciones etanólicas de concentración 0,025 M de tritil candesartán con distintos agregados de una solución etanólica de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Se varió la relación ligando-metal (L:M) desde 10:1 hasta 0,75:1. En todos los casos se ajustó el pH a 7 con una solución 0,1 M de NaOH.

Como resultado se obtuvo para el complejo en solución una estequiometría de 2:1 (L:M) a pH 7 (**Fig. 17**).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTCand



**Figura 17.** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo en solución a 690 nm mediante el método de la razón molar. Inset: espectro UV-vis de tritol candesartán (0,01 M) con la adición de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con relación ligando metal (L:M) desde 10 a 0,75 (pH 7) en etanol. La flecha indica el incremento en la adición del metal.

### **1.2.2.4.4. EPR y estructura propuesta para el CuTCand en solución**

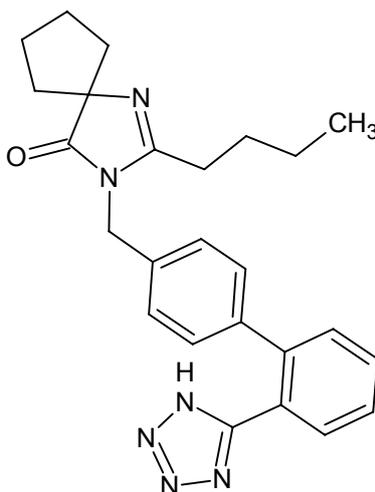
En el espectro de EPR en solución (no mostrado) se observa una señal de muy baja resolución. De la observación del espectro, se descartó la formación de proporciones sustanciales de complejo monomérico (debido a la ruptura del puente carboxilato) a causa de la ausencia de señales monoméricas. Esto sugiere que el complejo conserva su composición dinuclear después de la disolución. Además del espectro de EPR, la titulación espectrofotométrica sugiere una relación L:M de 2:1. Por estas razones, la estructura propuesta para el complejo de CuTCand en solución es la de un complejo binuclear con estructura similar a la del sólido (**Fig. 15**).

### **1.2.3. COBRE(II) E IRBESARTAN (CuIrb)**

#### **1.2.3.1. Características fisicoquímicas y comerciales del irbesartán**

El irbesartán (**Fig. 18**) es una molécula de nombre según IUPAC es 2-butyl-3-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)fenil]fenil}metil)-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-ona cuyo uso principal es el tratamiento contra la hipertensión. Pertenece a la familia de los ARB y se encuentra estructuralmente dentro del grupo de los bifenil tetrazoles. La molécula puede sufrir una sola desprotonación, en anillo tetrazólico, lo que genera una molécula cargada negativamente (pKa 4,6)<sup>140</sup>. Además de esta carga neta sobre la molécula, hay distintas densidades electrónicas que son capaces de coordinar con cationes como es el cobre(II), como las que rodean al átomo de oxígeno del grupo carbonílico o a los átomos de nitrógeno, principalmente el nitrógeno del resto imídico.

El irbesartán se comercializa como medicamento para tratar la hipertensión arterial. Dentro de las marcas más importantes se encuentran: Avapro®, Aprovel®, Adana®. El Irbesartán también se comercializa combinado con diuréticos como la hidroclorotiazida para lograr un efecto aditivo antihipertensivo.



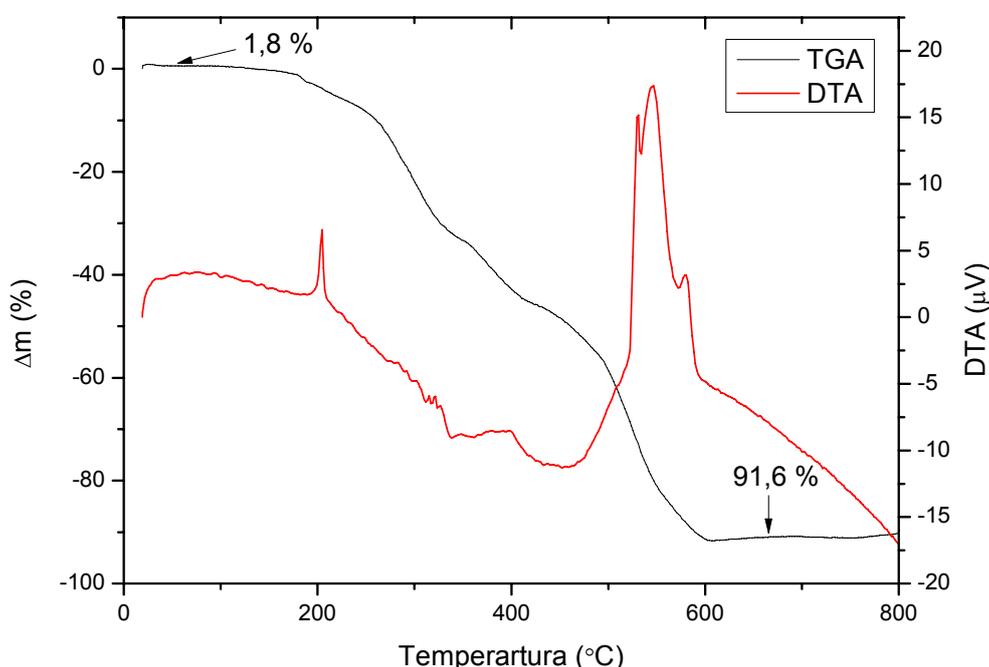
**Figura 18.** Estructura molecular del irbesartán

#### **1.2.3.2. Síntesis**

Se obtuvo el complejo [Cu(Irb)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] disolviendo el irbesartán (**Fig. 18**) en etanol 96 % (0,5 mmol en 10 ml) bajo agitación continua, alcalinizando hasta pH cercano a 6 con NaOH 1 M y agregándole una solución etanólica de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,25 mmol en 3 ml). Posteriormente el pH se volvió a ajustar a 6 con NaOH y se obtuvo un precipitado pulverulento de color verde que se filtró, se lavó varias veces con etanol y se secó en estufa a 60 °C. Anal. Calc. %: C, 64,1; H, 5,9; N, 17,9. Exp. %: C, 63,8; H, 5,8; N, 17,7.

**1.2.3.3. Estudios en fase sólida****1.2.3.3.1. TGA-DTA**

Se realizó el análisis termogravimétrico del complejo Culrb (**Fig. 19**), se plantea la pérdida de un porcentaje de la masa total de alrededor del 2 % a temperaturas menores a 100 °C (Calc. 1,9%, Exp.1,8%) que se corresponde con la presencia de una molécula de agua. Si bien se plantea que esta molécula de agua forma parte del entorno de coordinación (mediante los estudios teóricos de DFT), se encuentra unida al centro metálico muy débilmente, y es por esta razón que se pierde a baja temperatura. A 800°C la pérdida de peso total (Calc. 91,5 %, Exp. 91,6 %) coincide con la formación de CuO, como residuo final, caracterizado por espectroscopía FTIR.

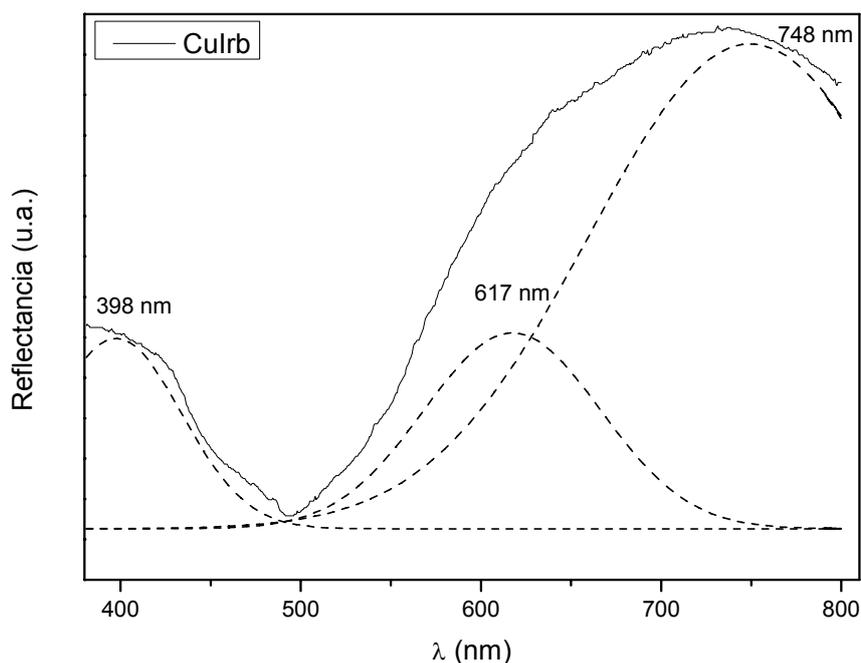


**Figura 19.** Curva termogravimétrica (TGA) para el Culrb (negro) y diferencial termogravimétrica (DTA) (rojo) para el complejo sólido de  $[\text{Cu}(\text{Irb})_2(\text{H}_2\text{O})]$  en atmósfera de  $\text{O}_2$ .

**1.2.3.3.2. Reflectancia difusa**

Se realizó la reflectancia del complejo sólido de color verde del Culrb (**Fig. 20**). El espectro de reflectancia muestra una banda ancha entre 500-810nm con máximo en 720 nm. Con la finalidad de realizar una asignación más certera del mismo se procedió al ajuste por deconvolución, observándose la presencia de tres bandas localizadas en 348 nm, 612 nm y 748 nm. Estas bandas se asignan a transiciones del tipo d-d. De acuerdo con el desdoblamiento generado por efecto Jahn-Teller, de las tres bandas, la de menor energía (748 nm) se asigna a una transición  $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , mientras que la banda que aparece como un hombro en 612 nm se asigna a una transición  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ . Por último, la banda de mayor energía en 348 nm se le asigna a la transición  $d_{xz,yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ .

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 20.** Espectro de reflectancia difusa experimental para el complejo sólido [Cu(Irb)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] (línea sólida) y fiteo de la banda ancha de máximo en 720 nm en sus respectivas bandas componentes (línea punteada).

### 1.2.3.3.3. FTIR y Raman

Se realizó el espectro FTIR del irbesartán y de su complejo de cobre (**Fig. 21a**) y se efectuó la asignación de las bandas para el Culrb, comparándolo con el irbesartán sin complejar que había sido previamente estudiado mediante cálculos teóricos<sup>150</sup>. Los principales cambios en las bandas y asignaciones teóricas se muestran en la **tabla 3**. La banda ancha alrededor de 3400 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento N-H del irbesartán, mientras que en el caso del complejo, la banda ancha con mayor intensidad que la del ligando se asigna al estiramiento O-H correspondiente a la molécula de agua coordinada. En la región entre 2800-3100 cm<sup>-1</sup> se observan diferentes modos de estiramiento C-H y no se encontraron diferencias significativas entre ambos. Los cambios principales en el espectro corresponden a las bandas producidas por los estiramientos C=O y C=N. En el primer caso, la banda en 1733 cm<sup>-1</sup> para el irbesartán sufre un corrimiento hacia el rojo en el complejo, por lo que aparece en 1724 cm<sup>-1</sup>. Además las frecuencias observadas para el estiramiento C=N se encuentran en 1619 y 1633 cm<sup>-1</sup> para el irbesartán y para el Culrb respectivamente, este corrimiento hacia el azul se debe a la coordinación del átomo de nitrógeno al metal. Por otro lado, las bandas asignadas a modos de estiramiento y flexión del anillo tetrazólico cambian su intensidad o posición debido a la complejación y desprotonación.

El análisis de los modos vibracionales de las frecuencias características de las bandas del complejo se realizó también mediante espectroscopía Raman. Los espectros del complejo Culrb se muestran en la **figura 21b**. Las

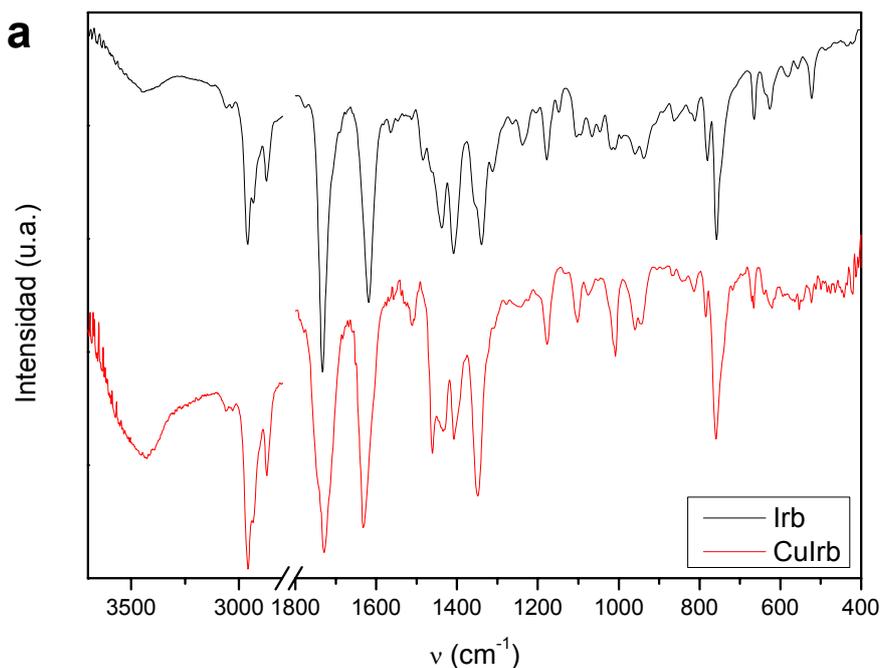
## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

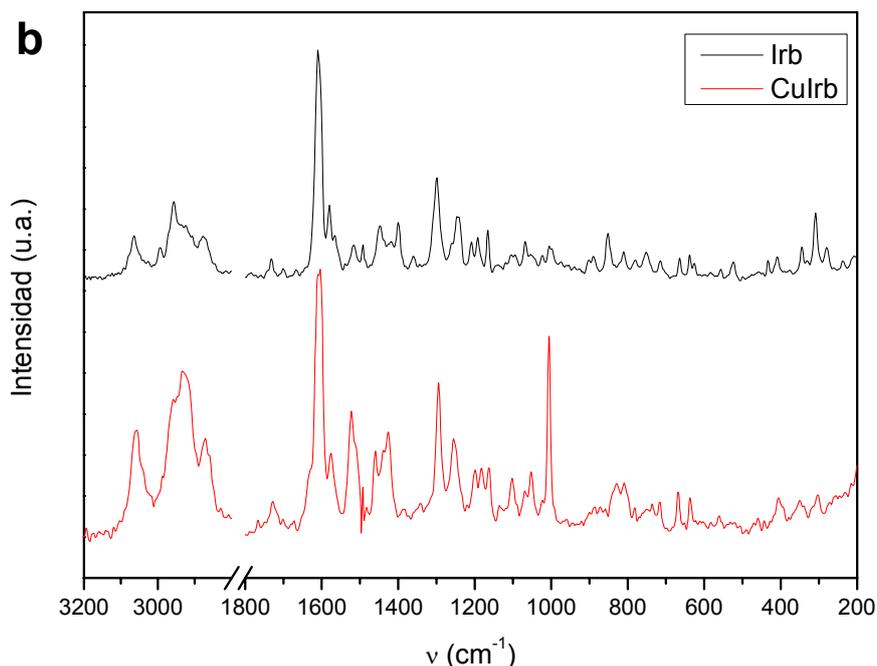
principales asignaciones se encuentran en la **tabla 3**. Para el irbesartán, la banda que se encuentra en  $1400\text{ cm}^{-1}$  se asigna a un modo de flexión NNH del anillo tetrazólico y esta banda desaparece en el espectro Raman del complejo. Además, dos bandas adicionales del Culrb relacionadas con el anillo tetrazólico, incrementan su intensidad Raman cuando se las compara con el irbesartán sin complejación. Estas bandas, situadas en  $1053\text{ cm}^{-1}$  y  $1006\text{ cm}^{-1}$  se asignan a modos flexión NNN y modos estiramiento NN.

**Tabla 3.** Asignaciones propuestas de los diferentes modos vibracionales (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de los espectros de Raman y FTIR del irbesartán y de su complejo de cobre(II).

Asignaciones tentativas	Culrb		Irb	
	FTIR	Raman	FTIR	Raman
$\nu$ NH $\nu$ OH	3455 (br, s)		3426 (br, m)	
$\nu$ C=O	1724 (vs)	1730 (w)	1733 (vs)	1730 (w)
$\nu$ C=N	1633 (vs)	1610 (vs)	1619 (vs)	1605 (vs)
$\delta$ CNH ip arom	1511 (w)	1510 (m)	1512 (vw)	1516 (w)
$\delta$ NNH + $\nu$ CCH ip + $\nu$ CN	1460 (s) 1434 (s)	1459 (s) 1426 (s)	1484 (m) 1462 w 1437 (s)	1490 (m)
$\delta$ NNH + $\nu$ CCH ip	1407 (sh) 1399 (s)		1409 (s)	1400 (s)
$\delta$ NNH + $\nu$ NN + $\nu$ CC puente bifenilo	1240 (w)		1238 (m)	1242 (s)
$\delta$ NNN + $\nu$ NN	1050 (vw)	1053 (m) 1006 (s)	1047 (m)	1053 (w) 1006 (w)
$\delta$ NNN	1013 (m) 1008 (m)		1018 (m) 1009 (m)	994 (w)

Abreviaturas: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; vw: muy débil; sh, hombro.  $\nu$ , estiramiento;  $\delta$ , flexión; arom, aromático; ip, en el plano.



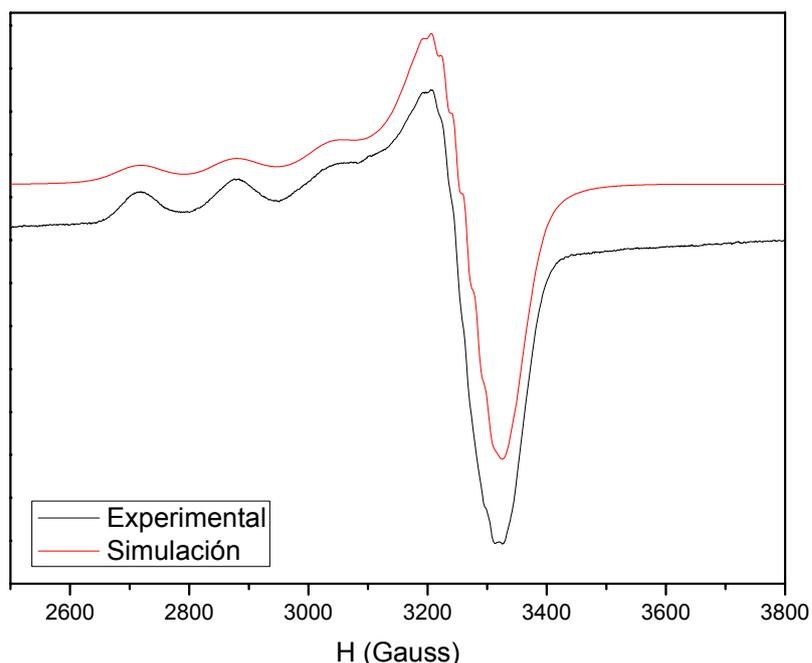


**Figura 21.** Espectros de **a)** FTIR y **b)** Raman del Irb (negro) y del Culrb (rojo).

#### **1.2.3.3.4. EPR**

Se midió el espectro EPR en banda X del Culrb en polvo a temperatura ambiente (**Fig. 22**). El espectro muestra un patrón de desdoblamiento hiperfino de cuatro líneas debido al acoplamiento del electrón desapareado con el núcleo de  $^{63}\text{Cu}$  ( $I = 3/2$ ). Los parámetros para el Hamiltoniano de Spin calculados fueron,  $g_{\parallel} = 2,270$  ( $A_{\parallel} = 170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) y  $g_{\perp} = 2,059$  ( $A_{\perp} = 17 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). El valor simulado para la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino ( $A$ ) concuerda con entornos de coordinación similar (complejos con cromóforos que contienen cuatro nitrógenos como átomos donores en la esfera de coordinación)<sup>151</sup>. De acuerdo con Hathaway<sup>84</sup> ( $G=(g_{\parallel}-2)/(g_{\perp}-2)$ ), un valor de  $G$  como en nuestro caso de 4,58 indica que no hay interacción entre los centros de cobre(II).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 22.** Espectro de EPR (banda X) del polvo del complejo CuIrb ( $[\text{Cu}(\text{Irb})_2(\text{H}_2\text{O})]$ ) a 300 K experimental (negro) y espectro simulado por WINEPR SimFonia (rojo).

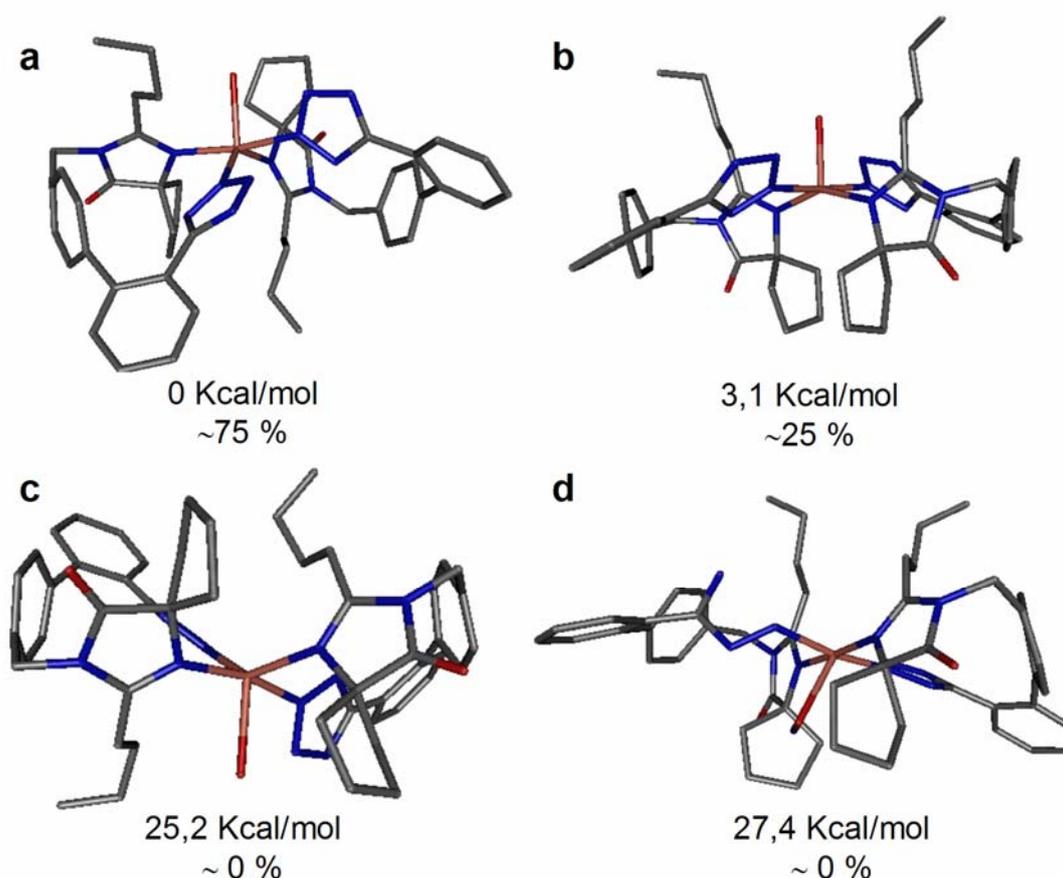
### **1.2.3.3.5. Estudio computacional y estructuras propuestas para el CuIrb sólido**

De acuerdo con los ensayos experimentales realizados en los que se observó la presencia de una molécula de agua en el complejo (TGA-DTA), una relación de dos moléculas de irbesartán por cada átomo de cobre(II) (análisis elemental), un entorno de coordinación de cuatro nitrógenos (EPR) interacción con los sitios nitrogenados (FTIR y Raman), se propusieron cuatro estructuras posibles, dos de ellas con las cadenas orgánicas alifáticas de cada ligando orientadas hacia el mismo lado, y otras dos con dichas cadenas en posiciones opuestas. En cada una de las dos anteriores se propuso que la molécula de agua coordine al centro metálico por encima del plano ecuatorial o por debajo del mismo. Dada la imposibilidad de obtener un cristal que permitiera la determinación de la estructura del complejo mediante rayos X se realizó, mediante estudios computacionales, la determinación de las estructuras más estables.

A través del cálculo computacional fundamentado en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) se estudió la superficie de energía potencial de los cuatro complejos posibles. Las optimizaciones se llevaron a cabo usando el funcional de la densidad de Truhlar M06-L<sup>152</sup> con el set de bases LanL2DZ, que hace uso del set de bases de Dunning D95V sobre todos los átomos<sup>153</sup>. Además de la conformación más estable para cada uno de los cuatro isómeros, se obtuvo la energía de cada molécula, en Kcal/mol. Se le asignó 0 a la más estable de las cuatro (**Fig. 23a**) y los restantes valores se informaron de manera relativa al primero. La estructura siguiente en energía tiene 3,1 kcal/mol

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

mayor que la anterior (**Fig. 23b**). Los restantes isómeros tienen energías muy superiores a los anteriores, con 25,3 y 27,4 Kcal/mol respectivamente por lo que es menos probable que se obtengan en las condiciones de síntesis a temperatura ambiente. Además, se calculó el porcentaje teórico que se obtendría de cada especie, de acuerdo a la ley de distribución de Boltzmann, obteniendo, a temperatura ambiente, aproximadamente un 75 % del isómero más estable (**Fig. 23a**) y un 25 % del segundo isómero de menor energía (**Fig. 23b**), mientras que el porcentaje de las dos especies de mayor energía (**Fig. 23c y 23d**) es prácticamente igual a cero. Por esta razón, se propone que el sólido obtenido a temperatura ambiente es una mezcla de los dos isómeros de menor energía en una relación 3:1 de acuerdo con la ley de distribución de Boltzmann.

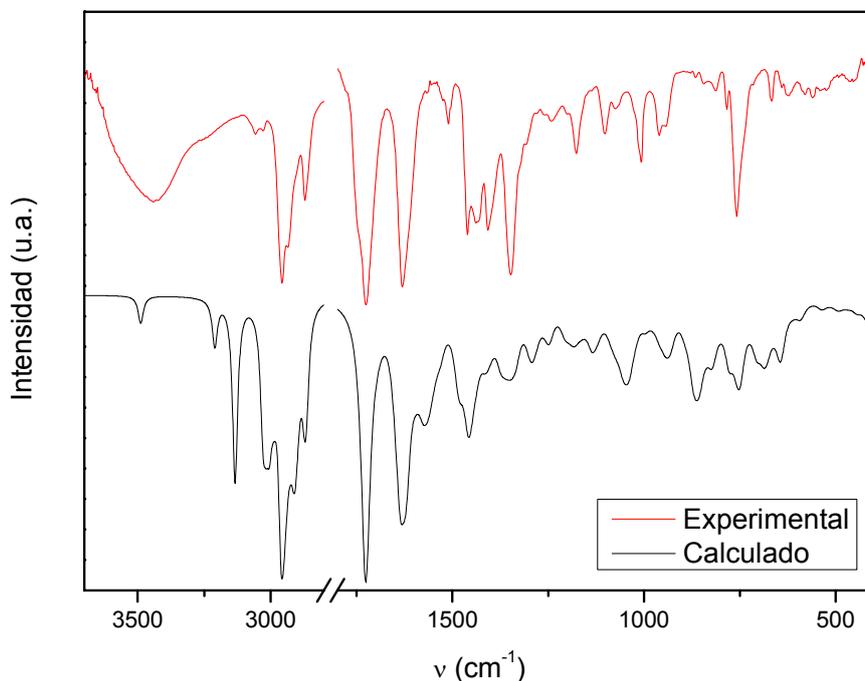


**Figura 23.** Estructuras de los cuatro isómeros del CuTIm obtenidos mediante análisis computacional con las diferencias de energías con respecto al isómero más estable (a), y el porcentaje de cada isómero de acuerdo con la ley de distribución de Boltzmann.

También se calcularon las frecuencias de vibración, al mismo nivel de teoría de todas las especies involucradas, a los efectos de verificar que se encuentran en un mínimo de la superficie de energía potencial. Los cálculos se efectuaron simulando el entorno de solvente, usando el Modelo del Continuo Polarizable (PCM) tal como está implementado en el paquete de programas de Gaussian<sup>154</sup>. Se tomaron las dos estructuras de menor energía y se calcularon los espectros vibracionales teóricos de los dos complejos optimizados. Una vez obtenidos, se sumaron ponderados. El espectro FTIR resultante se correlaciona satisfactoriamente con el experimental (**Fig. 24**). Las asignaciones

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

en la **tabla 3** fueron comparadas mediante la animación de los modos vibracionales de las dos estructuras más estables.



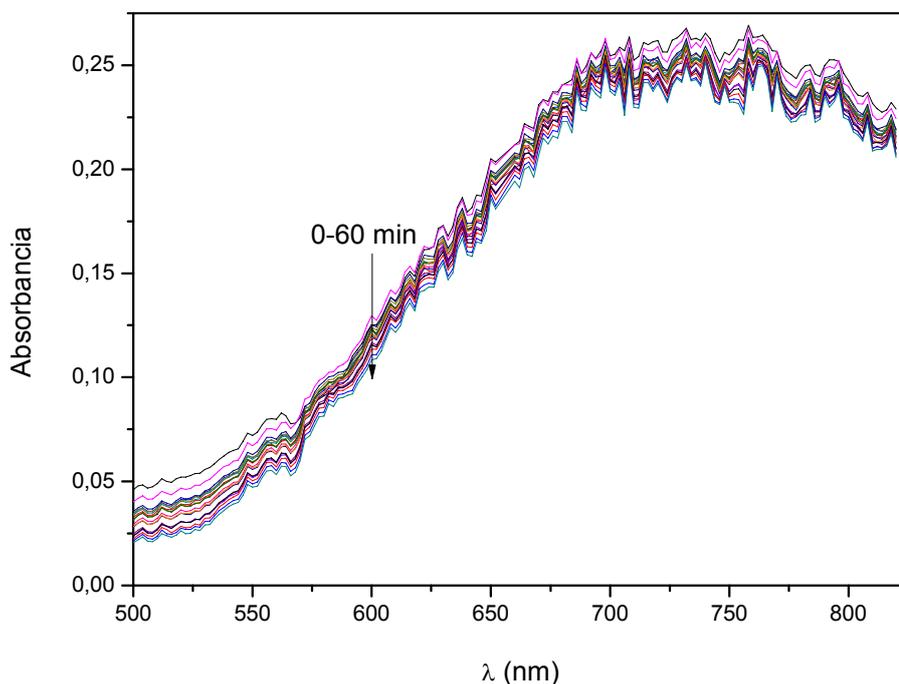
**Figura 24.** Espectro FTIR del complejo CuIrb experimental (rojo) y calculado (negro).

### **1.2.3.4. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN**

#### **1.2.3.4.1. UV-vis y estabilidad**

La disolución del complejo CuIrb en DMSO muestra un espectro con una banda con un máximo localizado en 732 nm ( $\epsilon = 66,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La estabilidad del complejo en solución con DMSO se evaluó midiendo la absorbancia de la banda a 732 nm durante 60 min (**Fig. 25**). La absorbancia solo decreció aproximadamente un 7% luego de los 60 min. Por lo tanto, se puede asegurar la estabilidad del complejo en el rango de tiempo necesario para realizar los ensayos en soluciones con DMSO.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

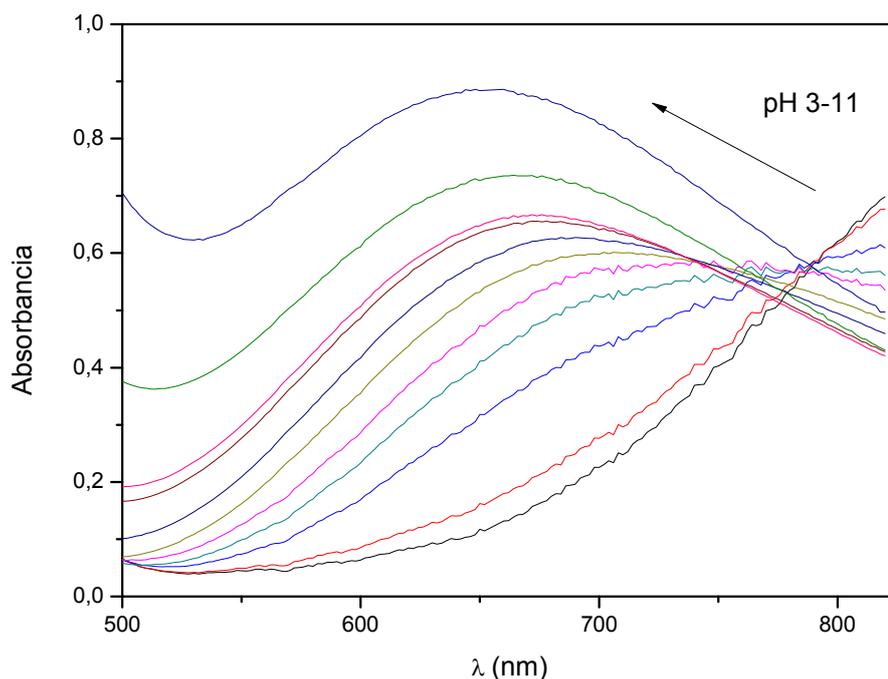


**Figura 25.** Estabilidad del complejo CuIrb ( $4 \cdot 10^{-3}$  M) en solución de DMSO a distintos tiempos entre 0 y 60 min. La flecha indica el sentido de desplazamiento de las curvas

### 1.2.3.4.2. Variación con el pH

Se midió el espectro electrónico en la región visible de una solución 2:1 de irbesartán (0,05 M) y cobre (0,025 M) en DMSO a diferentes valores de pH (**Fig. 26**). Para mantener el medio anhidro, se alcalinizó con metóxido de sodio. A valores bajos de pH, entre 3 y 4, se observa el espectro típico del cobre(II) libre. En el rango de pH entre 4 y 7 las bandas se desplazan hacia 732 nm y este espectro se corresponde con el obtenido por disolución del CuIrb. Luego, a pH por encima de 7, se observa un corrimiento hacia el azul, la banda se desplaza hacia 650 nm, y se observa turbidez debido a la formación de un precipitado azul insoluble.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

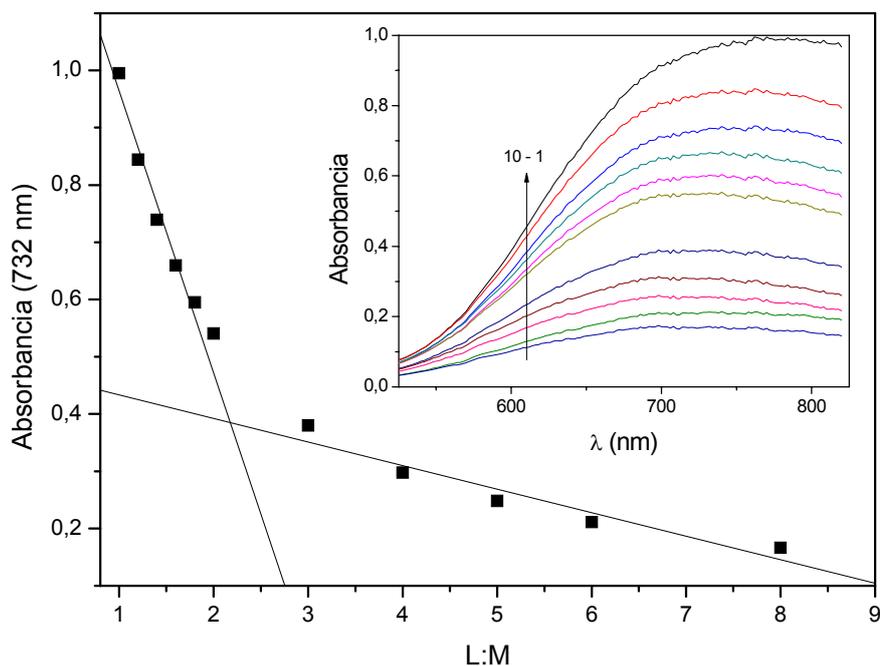


**Figura 26.** Determinación espectrofotométrica de la formación de los complejos  $[\text{Cu}(\text{Irb})_2(\text{H}_2\text{O})]$  en solución DMSO. Espectro en el visible de una mezcla de soluciones en relación 2:1 de irbesartán (0,05M) y cobre (0,025 M) a diferentes valores de pH. La flecha indica el corrimiento del espectro al aumentar el pH.

### 1.2.3.4.3. Titulación espectrofotométrica

Se realizó la titulación espectrofotométrica para detectar la formación en solución del complejo de irbesartán y cobre(II) (**Fig. 27**) usando diferentes relaciones ligando-metal en soluciones en DMSO en el rango L:M comprendido entre 10 y 1 a pH 6, ajustando el pH con metóxido de sodio para mantener el medio anhidro y midiendo la absorbancia de la banda localizada en 723 nm. Se determinó una estequiometría final de 2:1 (L:M) que resulta ser la misma que la existente para complejo sólido.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 27.** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo en solución a 732 nm mediante el método de la razón molar. Inset: espectro UV-vis de irbesartán (0,01 M) con la adición de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con relación ligando metal (L:M) desde 10 a 1 (pH 6) en DMSO. La flecha indica el incremento en la adición del metal.

### 1.2.3.4.4. Estructura propuesta para el CuIrb en solución

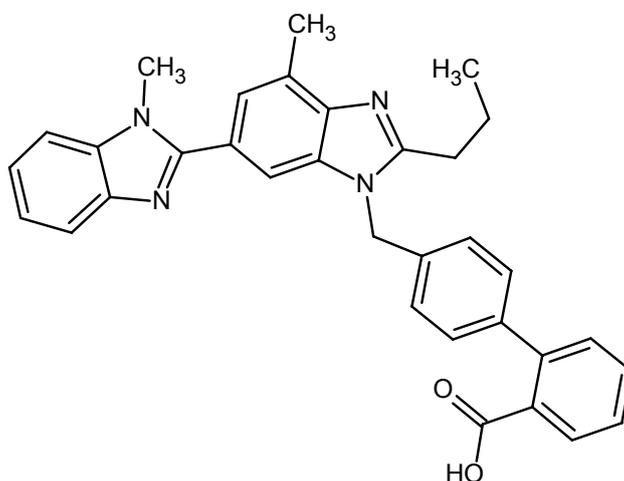
De acuerdo con los resultados obtenidos de la titulación espectrofotométrica donde se registra la formación del CuIrb en solución, a una relación L:M de 2:1 en DMSO, y del espectro electrónico obtenido a partir de la disolución del sólido con las mismas características al obtenido a partir de irbesartán y cobre(II) en las condiciones de síntesis, y al espectro de reflectancia difusa, se propone que en solución a pH fisiológico podría existir un equilibrio de los isómeros (**Fig. 23**), calculados por estudios teóricos de DFT, sin descartar la solvatación en la sexta posición de coordinación.

### **1.2.4. COBRE (II) Y TELMISARTÁN (CuTIm)**

#### **1.2.4.1. Características fisicoquímicas y comerciales del telmisartán**

El telmisartán (**Fig. 28**), cuyo nombre según IUPAC es ácido 4'-((1,4'-dimetil-2'-propil(2,6'-bi-1H-benzimidazol-1'-il)metil)-(1,1'-bifenil)-2-carboxílico, pertenece a la familia de los no bifeniltetrazoles y dado que es un ácido, puede sufrir una desprotonación con un  $pK_a=4,4^{140}$  lo que genera una molécula con una carga negativa. La complejación con un catión como el cobre(II) puede ocurrir no solo involucrando esta carga negativa, sino que también pueden intervenir las densidades electrónicas en la región de los nitrógenos, principalmente de aquellos que componen el grupo imina.

El telmisartán se comercializa bajo el nombre de Micardis® o Dinortes®, entre otros. También se comercializa combinado con diuréticos para lograr un efecto aditivo antihipertensivo. Las preparaciones combinadas tienen varios nombres comerciales, entre ellos: Micardis Plus®, Actelsar HCT®.



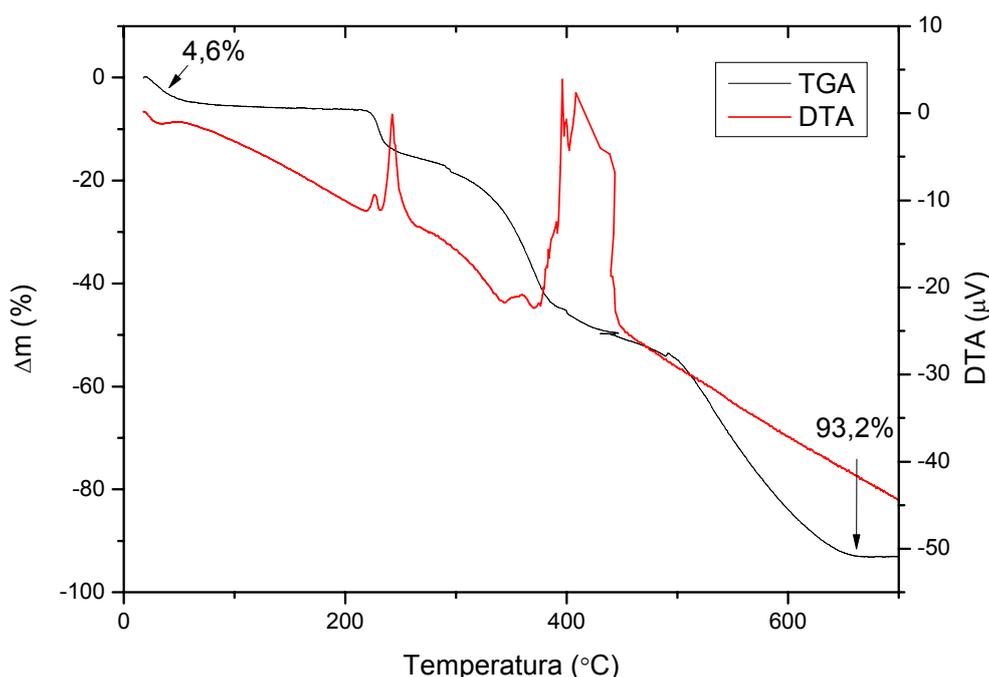
**Figura 28.** Estructura del telmisartán

#### **1.2.4.2. Síntesis del CuTIm**

A una solución de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en etanol (0,5 mmol, 5 ml) se le agregó una solución etanólica de telmisartán (**Fig. 28**) (1 mmol, 10 ml) bajo agitación continua. La suspensión formada se redisolvió mediante la adición de NaOH 1M hasta alcanzar un pH de 7. Luego se le agregaron 15 ml de agua y el precipitado formado se separó por filtración y luego se lavó con agua y se secó a 60°C. El precipitado sólido obtenido se redisolvió en etanol, la solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante al menos una semana de donde se obtuvieron cristales azules de las aguas madres, aptos para ser estudiados mediante difracción de rayos X. Anal. Calc. ( $[\text{Cu}_8(\text{TIm})_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ )%: C, 69.2; H, 5.6; N, 9.8. Exp.%: C, 69.0; H, 5.3; N, 9.7.

**1.2.4.3. Estudios en fase sólida****1.2.4.3.1. TGA-DTA**

El análisis termogravimétrico confirma la presencia de tres moléculas lábiles de agua por átomo de cobre (**Fig. 29**), acompañada por un pico endotérmico ancho en el DTA A 100°C. Pérdida exp.: 4,6%. Calc. 4,7%. A 700°C el producto final obtenido acompañado de una pérdida de masa de 93,2 %, exp (93,1 %, calc.) representa la formación de CuO, el que pudo ser caracterizado por espectroscopía FTIR.

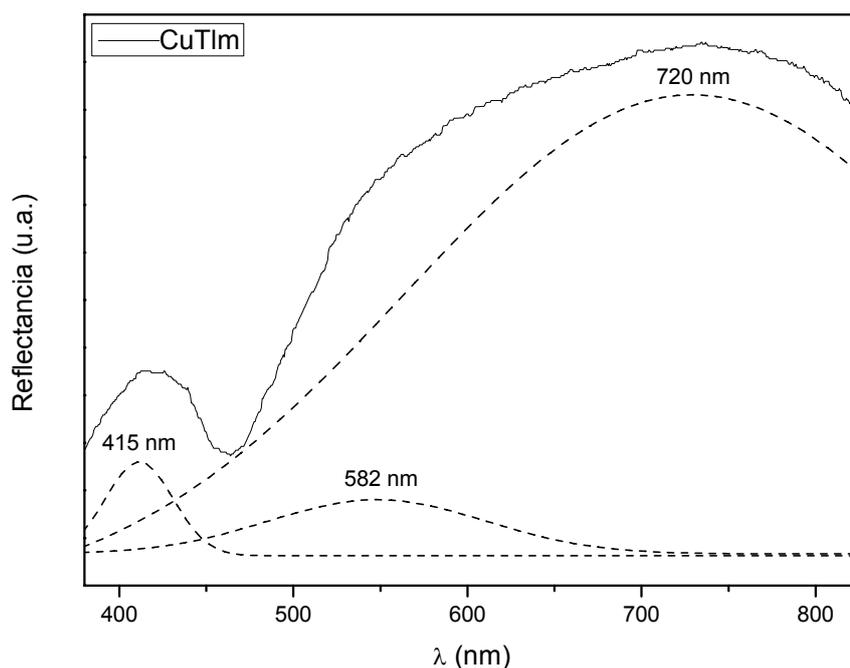


**Figura 29.** Curva termogravimétrica (TGA) (línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA) (línea roja) del complejo sólido en polvo  $[Cu_8TIm_{16}] \cdot 24H_2O$  (CuTIm) en atmósfera de  $O_2$ .

**1.2.4.3.2. Reflectancia difusa**

El espectro de reflectancia difusa (**Fig. 30**), tanto del polvo como del cristal, muestra tres bandas, una en 415 nm y la otra en 720 nm con un hombro en 582 nm. Estas bandas se asignan a transiciones del tipo d-d. De acuerdo con el desdoblamiento generado por efecto Jahn-Teller, de las tres bandas, la de menor energía (720 nm) se asigna a una transición  $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , mientras que la banda que aparece como un hombro en 582 nm se asigna a una transición  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ . Por último, la banda de mayor energía en 415 nm se asigna a la transición  $d_{xz,yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ .

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 30.** Espectro de reflectancia difusa experimental para el complejo sólido en polvo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  (CuTIm) (línea sólida) y ajuste de la banda ancha de máximo en 720 nm en sus respectivas bandas componentes (línea punteada).

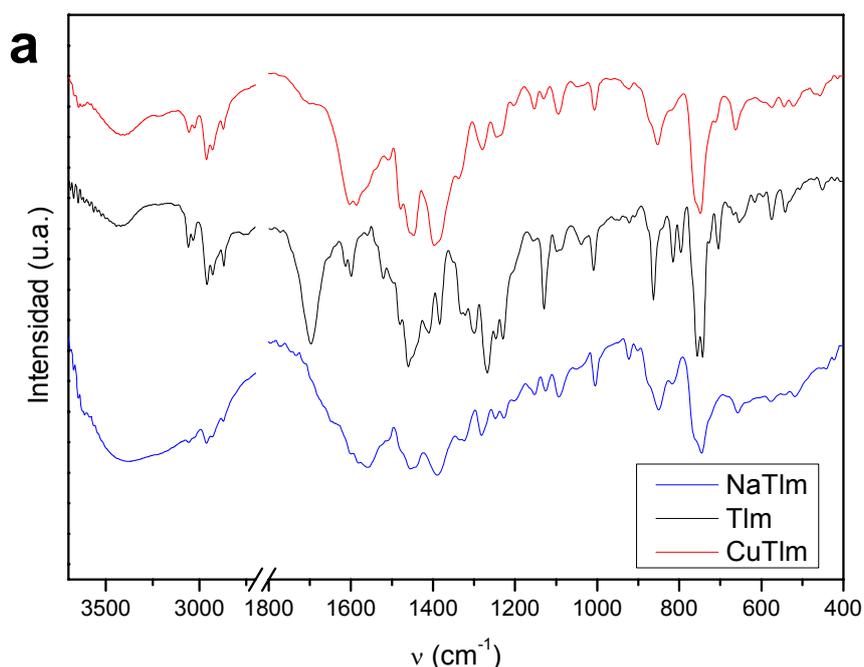
### 1.2.4.3.3. FTIR y Raman

Se realizaron los espectros FTIR (**Fig. 31a**) y Raman (**Fig. 31b**) para el telmisartán (TIm), la sal de sodio (NaTIm) y el complejo de cobre (CuTIm). Las principales vibraciones características del telmisartán y su complejo de cobre, obtenidas mediante el espectro de FTIR y Raman se muestran en la **tabla 4**. Las asignaciones se realizaron de acuerdo a los valores de la literatura<sup>142,155,156</sup>. El espectro del telmisartán se comparó también con el espectro del irbesartán<sup>150</sup>, candesartán y valsartán<sup>141</sup> con las asignaciones vibracionales experimentales previas realizadas para el valsartán y su complejo de cobre<sup>157</sup>.

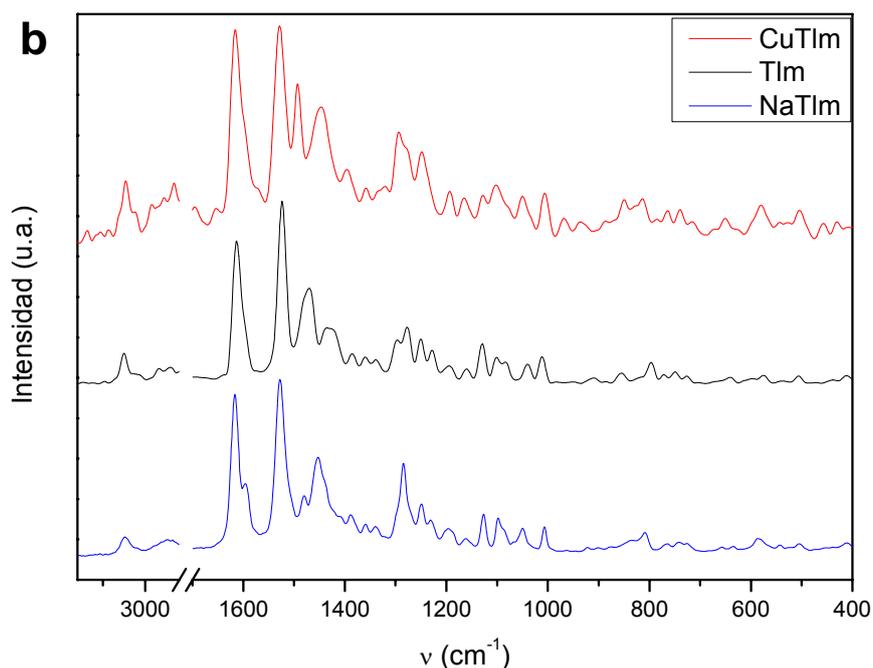
Las bandas localizadas en el rango de  $4000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a modos de estiramientos del grupo O-H y vibraciones del grupo C-H. La banda ancha que se observa por FTIR para el CuTIm en  $3389\text{ cm}^{-1}$  se asignó al estiramiento de los O-H de las moléculas de agua lo que enmascara los cambios en esta región. La banda fuerte localizada en  $1696\text{ cm}^{-1}$  (FTIR) está asociada con el estiramiento C=O del grupo carboxílico la cual disminuye notablemente su intensidad ante la formación del complejo. En cambio, se observan nuevas bandas asignadas al estiramiento antisimétrico y simétrico del grupo carboxilato generado por desprotonación y/o coordinación. Éstas bandas aparecen en  $1587\text{ cm}^{-1}$  (s, FTIR), y en  $1395\text{ cm}^{-1}$  (vs, FTIR) y  $1396\text{ cm}^{-1}$  (m, Raman) respectivamente. La diferencia entre las frecuencias antisimétricas y simétricas que como ya mencionáramos nos permite sugerir un modo de coordinación del grupo carboxilato, fue de  $\Delta = 192\text{ cm}^{-1}$ , lo que sugiere una

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA: CuTIm

coordinación monodentada de éste grupo al centro metálico<sup>142</sup>. Las bandas típicas relacionadas al componente benzimidazol (Bz) de la molécula se encuentran en el rango de 1600-1400  $\text{cm}^{-1}$ , en la misma región que las bandas características del grupo bifenilo<sup>158,159</sup>. Estos modos están acoplados con movimientos de meneo, torsión y flexión de los restos  $-\text{CH}_3$  y  $-\text{CH}_2$  de la molécula. La desaparición de las bandas características del grupo Bz ubicadas en 1481  $\text{cm}^{-1}$ (s) y 1468  $\text{cm}^{-1}$ (s) en el espectro del Raman del telmisartán en conjunto con la aparición de una nueva banda en 1448  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro Raman del CuTIm indican cambios estructurales en los anillos del grupo Bz los que pueden ser debidos a la posible interacción del cobre(II) con el N del resto de Bz. Las bandas con intensidades fuerte/media (FTIR/Raman) localizadas en 1297  $\text{cm}^{-1}$  y que tienen componentes de modos de flexión del grupo  $-\text{COH}$ <sup>160,161</sup> y modos de estiramientos del resto CN (Bz) del telmisartán reducen su intensidad por complejación. Cambios similares se observan para los modos vibracionales que involucran aquellos grupos (estiramiento del resto C-O y del grupo C-N (Bz) en el rango entre 1234-1125  $\text{cm}^{-1}$ ) lo que indica una interacción entre el metal y el ligando. Para concluir, los corrimientos observados en las bandas del resto CN (Bz) y la desaparición de los modos vibracionales derivados del grupo carboxílico sugerirían que la unión del metal con el telmisartán ocurre a través de esos grupos funcionales.



## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 31.** Espectros experimentales de **a)** FTIR y **b)** Raman del TIm (negro), CuTIm (rojo) y NaTIm (azul)

**Tabla 4.** Asignaciones propuestas de los diferentes modos vibracionales (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de los espectros de Raman y FTIR del telmisartán y de su complejo de cobre(II).

Asignaciones tentativas	CuTIm		TIm	
	FTIR	Raman	FTIR	Raman
$\nu$ O-H			3403 (w)	
$\nu$ O-H ( $\text{H}_2\text{O}$ )	3389 (br,m)			
$\nu$ C-H <sub>arom</sub>	3221 (m)			
$\nu$ CH <sub>arom iph</sub>	3055 (w)	3058 (m)	3059 (w)	3063 (m)
$\nu$ CH <sub>arom oph</sub>	3026 (w)		3033 (w)	
$\nu$ CH <sub>as</sub> CH <sub>3</sub>	2961 (m)	2977 (w)	2959 (m)	2959 (w)
$\nu$ CH <sub>as</sub> CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	2930 (m)	2945 (w)	2928 (m)	2926 (w)
$\nu$ CH <sub>s</sub> CH <sub>3</sub>	2871 (m)	2916 (m)	2870 (w)	2896 (w)
$\nu$ C=O (COOH)	1706 (w)		1696 (s)	
$\nu$ C=C + $\nu$ CN <sub>Bz</sub>		1614 (vs)	1613 (w)	1613 (vs)
	1602 (s)	1595 (m)	1600 (w)	1600 (m)
$\nu_{\text{as}}$ COO <sup>-</sup>	1587 (s)			
Modos benzimidazol-bifenilo (ver texto)	1572 (m)		1560 (vw)	
	1558 (m)			
	1534 (m)	1528 (vs)	1522 (w)	1523 (vs)
	1516 (m)		1517 (sh,m)	
	1507 (m)			

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

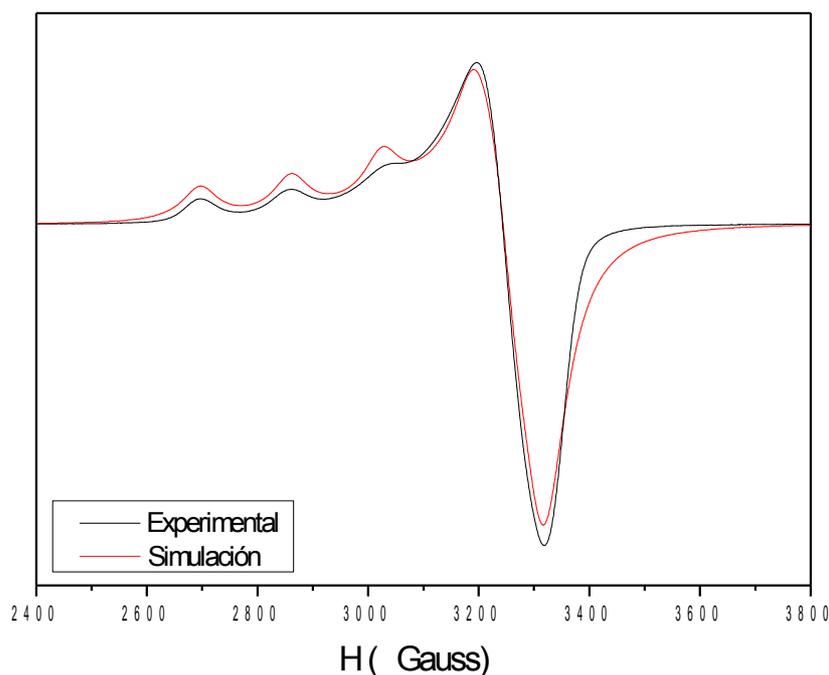
	1480 (s)		1479 (s)	1481 (sh,s)
	1455 (sh,vs)	1448 (s)	1456 (vs)	1468 (s)
	1445 (vs)	1439 (m)	1444 (s)	1435 (m)
	1409 (s)		1413 (s)	1424 (sh,m)
$\nu_s \text{ COO}^-$	1395 (vs)	1396 (m)		
$\delta_{ip} \text{ CCH} + \nu \text{ C-C}_{\text{bifenilo}}$	1382 (vs)	1357 (w)	1383 (m)	1386 (w) 1360 (w)
$\omega \text{ CH}_2 + \rho \text{ CH}_2$	1338 (s)	1326 (w)	1332 (s)	1339 (w)
$\delta \text{ COH} + \delta \text{ CCH}$			1323 (m)	
			1305 (s)	
$\delta \text{ COH} + \delta \text{ CCH} + \tau \text{ CH}_2 + \nu \text{ C-C}_{\text{bz}} + \nu \text{ CN}_{\text{bz}}$		1296 (w)	1297 (s)	1297 (m)
	1277 (m)	1277 (m)	1267 (vs)	1277 (m)
	1245 (w)	1247 (m)	1246 (s)	1250 (m)
$\nu \text{ C-O (COH)} + \delta \text{ CCH}_{\text{arom}}$	1234 (w)		1230 (s)	1228 (w)
$\delta_{ip \text{ arom}} \text{ CCH} + \rho \text{ CH}_2 + \omega \text{ CH}_2 + \nu \text{ CN}_{\text{bz}}$	1130 (vw)	1125 (sh,w)	1129 (m)	1129 (m)
	1092 (w)	1101 (m)	1089 (w)	1101 (m)

Abreviaciones: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; vw: muy débil; sh, hombro.  $\nu$ , estiramiento;  $\delta$ , flexión;  $\omega$ , meneo;  $\tau$ , torsión;  $\rho$  balanceo; s, simétrico; as, antisimétrico; arom, aromático; op, fuera del plano; ip, en el plano; bz, benzimidazol.

### 1.2.4.3.4. EPR

Se midió el espectro EPR en banda X, a temperatura ambiente del polvo del complejo  $[\text{Cu}_8(\text{TIm})_{16}]\cdot 24\text{H}_2\text{O}$  (**Figura 32, negro**). La señal anisotrópica del EPR de la muestra policristalina muestra un patrón de desdoblamiento hiperfino de cuatro líneas debido al típico acoplamiento del electrón desapareado del núcleo de  $^{63}\text{Cu}$  ( $I = 3/2$ ). La simulación de la señal del espectro de EPR se muestra en la **figura 32 (en rojo)** y da cuenta que el complejo exhibe un tipo de señal monomérica, con una simetría axial cuyos parámetros del Hamiltoniano de Spin son  $g_{\parallel} = 2,28$ ,  $g_{\perp} = 2,061$  y  $A_{\parallel} = 175 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ,  $A_{\perp} = 10 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , valores típicos para un complejo de Cu(II) con geometría de octaedro elongado o cuadrado plano de acuerdo en concordancia con un estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$ .

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 32.** Espectro de EPR en banda X a 293 K del polvo del complejo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  (línea sólida) y del espectro simulado (línea roja) con el programa WINEPR SimFonia.

El valor de la componente paralela de la constante de acoplamiento hiperfino ( $A$ ) es comparable con la encontrada en diferentes complejos de  $\text{Cu}(\text{II})$  con cromóforos que contienen átomos de nitrógeno y oxígeno en la esfera de coordinación del centro metálico<sup>162-165</sup>

Teniendo en cuenta los parámetros de EPR y la aproximación de Blumberg-Peisach<sup>166</sup>,  $f = g_{\parallel}/A_{\parallel}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (siendo  $f$  el factor de distorsión tetragonal) para el sistema estudiado  $\text{CuO}_2\text{N}_2$  tiene un valor de  $f = 130,3$  que sugiere para el complejo una geometría cuadrado plana (valores de  $f$  mayores a 135 indican entornos de octaedro elongado) encontrándose el ligando ubicado en el plano ecuatorial. Además, de acuerdo con Hathaway<sup>84</sup>, una relación de los valores de  $G = 4,59$  ( $G = (g_{2-1})/(g_{\perp} - 2)$ ) para el complejo  $\text{CuTIm}$  sugiere que no hay interacción significativa entre los centros de cobre.

Este resultado magnético está de acuerdo también con lo determinado de la estructura cristalina (la que se describe a continuación) ya que los iones  $\text{Cu}(\text{II})$  están tan separados uno del otro (cerca de  $10,5 \text{ \AA}$ ) por lo que no puede llevarse a cabo un intercambio significativo. En la estructura puede observarse que los iones se encuentran unidos a través de la molécula de telmisartán lo que genera un camino electrónico muy extendido como para que tenga lugar un super intercambio apreciable.

### **1.2.4.3.5. Estructura cristalina del CuTIm**

Los cristales de  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  son inestables ya que se convierten en polvo cuando se los remueve de las aguas madres en condiciones

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

ambientales normales. Para evitar esto, y poder determinar la estructura cristalina, se montó el monocristal con una gota de aceite sintético el que luego se enfrió a 120 K utilizando un dispositivo con nitrógeno líquido para una mejora en la definición.

Las medidas experimentales demuestran que el cristal difracta pobremente en altos ángulos, lo que hizo dificultoso realizar una determinación estándar y el refinamiento de la estructura. A partir de una comparación con una estructura similar<sup>167</sup> se pudo resolver el patrón de difracción, obteniendo así la información estructural. Los datos de la estructura cristalina se encuentran en la **tabla 5**. Los datos estructurales completos del cristal se depositaron en el Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) bajo el número de referencia CCDC 987885.

**Tabla 5.** Datos del cristal y resultados de la estructura de refinamiento para el  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}]_n \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ .

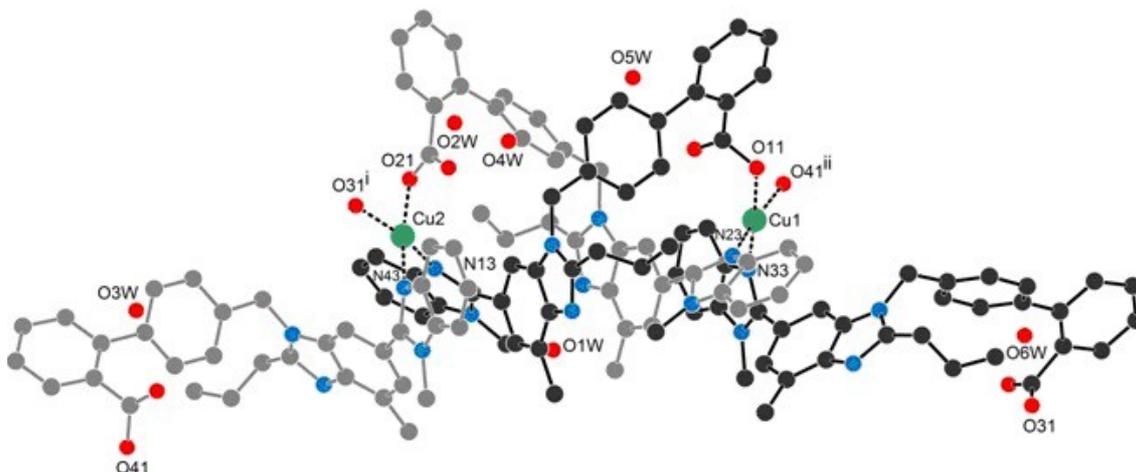
<b>Fórmula empírica</b>	$\text{C}_{528} \text{H}_{488} \text{Cu}_8 \text{N}_{64} \text{O}_{56}$
<b>Peso fórmula</b>	9134.14
<b>Temperatura</b>	120(2) K
<b>Longitud de onda</b>	1.54184 Å
<b>Sistema cristalino</b>	Tetragonal
<b>Grupo espacial</b>	$P4/ncc$ (# 130)
<b>Dimensiones de la celda unidad</b>	a = 47.335(1) Å b = 47.335(1) Å c = 30.894(3) Å.
<b>Volumen</b>	69221(7) Å <sup>3</sup>
<b>Z, densidad (calculada)</b>	4, 0.876 Mg/m <sup>3</sup>
<b>Coefficiente de absorción</b>	0.691 mm <sup>-1</sup>
<b>F(000)</b>	19136
<b>Tamaño del cristal</b>	0.37 x 0.37 x 0.22 mm <sup>3</sup>
<b>θ - rango para la recolección de datos</b>	3.01 to 36.35°
<b>Rangos de índice</b>	-31 ≤ h ≤ 36, -36 ≤ k ≤ 30, -23 ≤ l ≤ 23
<b>Reflexiones colectadas</b>	42551
<b>Reflexiones independientes</b>	8238 [R(int) = 0.1111]
<b>Reflexiones observadas [<math>I &gt; 2\sigma(I)</math>]</b>	4469
<b>Completitud a θ = 36.35°</b>	99.9 %
<b>Max. y min. transmisión</b>	1.0000 and 0.4321
<b>Método de refinamiento</b>	Matriz completa de mínimos cuadrados de F <sup>2</sup>
<b>Datos / restricciones / parámetros</b>	8238 / 82 / 465
<b>Bondad del ajuste en F<sup>2</sup></b>	1.532
<b>Índices R finales<sup>a</sup> [<math>I &gt; 2\sigma(I)</math>]</b>	R1 = 0.1832, wR2 = 0.4301
<b>Índices R (todos los datos)</b>	R1 = 0.2270, wR2 = 0.4755
<b>Pico dif. más grande y hueco</b>	0.890 and -0.512 e.Å <sup>-3</sup>

$$^a R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}, \quad wR_2 = \frac{[\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2]}{\sum w(|F_o|^2)^2}]^{1/2}$$

El contenido de la unidad asimétrica del cristal ( $[\text{Cu}_2\text{TIm}_4]_n \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) se muestra en el diagrama ORTEP<sup>168</sup> de la **figura 33** y las distancias y ángulos alrededor de los dos átomos independientes de cobre se muestran en la **tabla 6**. Los iones de Cu(II) están prácticamente en un entorno cuadrado plano, *cis*-coordinado a dos átomos de oxígeno del grupo carboxilato (la distancia Cu-O

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

es de 1,97(2) y 1,99(2) Å para el Cu1 y 1,97(1) y 1,99(2) Å para el Cu2) y para los dos átomos de N del benzimidazol terminal (distancia Cu-N es de 1,84(1) y 1,99(1) Å para el Cu1 y 2,06(2) y 1,99(2) Å para Cu2), respectivamente, pertenecientes a los cuatro distintos ligandos telmisartán cargados negativamente.



**Figura 33.** Fragmento molecular Independiente del complejo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ . Para una mayor claridad, no se muestran los átomos de H. Los átomos de cobre, oxígeno y nitrógeno se muestran en verde, rojo y azul respectivamente. Operaciones de simetría del cristal: (i)  $y, 3/2 - x, z$ ; (ii)  $3/2 - y, x, z$

**Tabla 6.** Longitud de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor de los iones de cobre(II) en  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ .

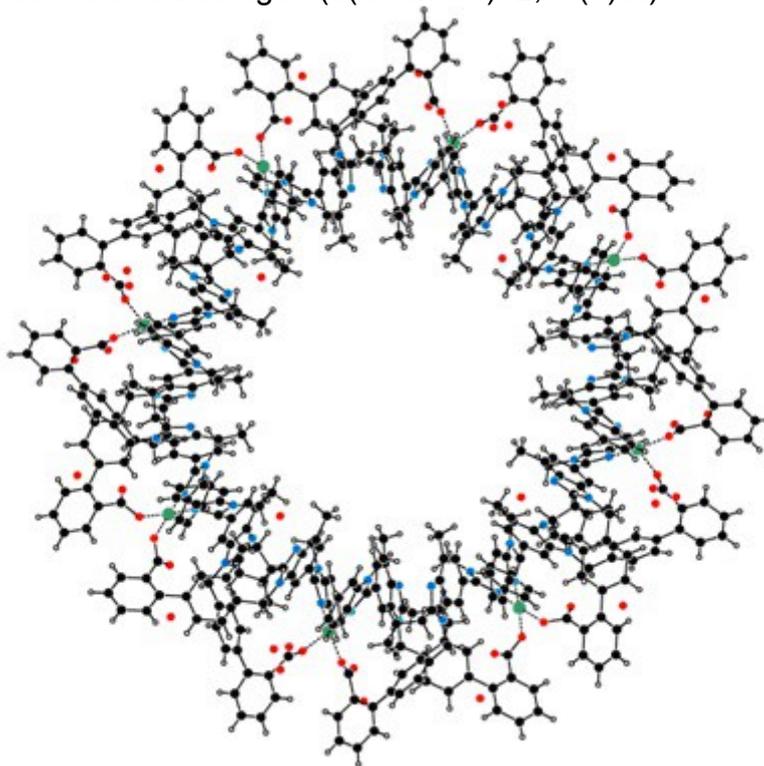
Cu(1)-N(23)	1.84(1)	O(41)#1-Cu(1)-O(11)	86.9(6)
Cu(1)-N(33)	1.99(1)	N(23)-Cu(1)-N(33)	89.9(5)
Cu(1)-O(11)	1.97(2)	O(41)#1-Cu(1)-N(33)	90.8(5)
Cu(1)-O(41)#1	1.94(1)	O(11)-Cu(1)-N(33)	174.5(6)
Cu(2)-N(13)	2.06(2)	O(21)-Cu(2)-O(31)#2	85.6(5)
Cu(2)-N(43)	1.99(2)	O(21)-Cu(2)-N(43)	167.9(6)
Cu(2)-O(21)	1.97(1)	O(31)#2-Cu(2)-N(43)	93.0(7)
Cu(2)-O(31)#2	1.99(2)	O(21)-Cu(2)-N(13)	90.9(6)
N(23)-Cu(1)-O(41)#1	174.3(5)	O(31)#2-Cu(2)-N(13)	161.4(7)
N(23)-Cu(1)-O(11)	92.9(6)	N(43)-Cu(2)-N(13)	94.1(7)

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: (#1)  $y, -x+3/2, z$ ; (#2)  $-y+3/2, x, z$ .

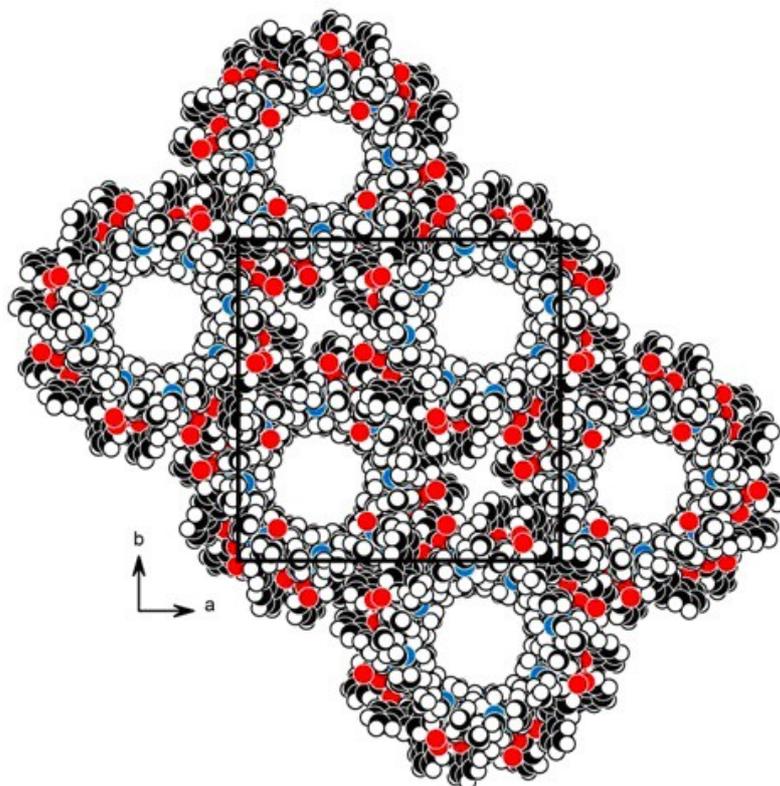
El fragmento molecular  $\text{Cu}_2\text{TIm}_4$  presenta un eje de rotación cuaternario ( $C_4$ ) lo que permite la formación de una estructura de mayores dimensiones, como es la del complejo octanuclear de Cu(II) cuya fórmula es  $\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}$  como se muestra en la **figura 34**. Esto puede verse como un anillo macrocíclico con una estructura doble helicoidal con el ligando (L) adyacente que da vueltas a través de los iones de cobre(II). La conformación helicoidal está permitida por la relativa libertad rotacional de la molécula cargada del telmisartán alrededor de los enlaces  $\sigma$  que unen los grupos. De hecho, el ángulo de torsión alrededor de los enlaces fenil-metileno, fenil-fenilbenzóico y fenil-COO muestran una variación máxima alrededor de los cuatro ligandos de  $75(3)^\circ$ ,  $73(1)^\circ$ , y  $42(2)^\circ$

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

respectivamente. El ángulo de torsión alrededor del enlace que une los grupos benzimidazol muestra una pequeña variación de  $25(3)^\circ$ . Hay ocho vueltas de la hélice alrededor del complejo con ligeras diferencias en la inclinación definida por la distancia entre los cobres vecinos ( $10,842(4)$  y  $10,472(4)$  Å). Esto le confiere al complejo una forma toroidal con un diámetro promedio (definido por la distancia entre dos átomos de cobre relacionados por una simetría  $C_2$ ) de  $27,837(6)$  Å lo que genera un nano hueco hidrofóbico alineado por los grupos benzimidazol metilo, de dimensiones transversales en el rango de  $15,81(4)$  a  $19,84(4)$  Å (distancias entre carbonos de metilos opuestos relacionados por una simetría  $C_2$ ). El complejo  $Cu_8TIm_{16}$  se encuentra en un arreglo cristalino con canales que se extienden a través del sólido a lo largo del eje c del cristal (**Fig. 35**). Estos tubos nanométricos moleculares, a su vez, están empaquetados para dar origen a pequeños canales intersticiales subnanométricos, bordeadas por anillos fenilbenzoicos, que corren a lo largo de los 4 ejes cristalográficos. Los átomos de oxígeno de las moléculas de agua de cristalización están a una distancia de contacto con los aceptores de puentes de hidrógeno. Cuatro de ellas están cerca de los átomos de oxígeno de un carboxilato no enlazado al metal (las distancias  $Ow...O$  están en el rango desde  $2,86(2)$  a  $3,00(3)$  Å) la quinta molécula de agua se encuentra a una distancia de  $2,90(2)$  Å del átomo de N del benzimidazol y la sexta está en contacto cercano con un átomo de oxígeno de otra molécula de agua ( $d(Ow...Ow)=2,95(5)$  Å).



**Figura 34.** Vista completa del complejo de Cu(II) octanuclear  $[Cu_8TIm_{16}]\cdot 24H_2O$ , obtenido del fragmento independiente  $[Cu_2TIm_4]\cdot 6H_2O$  representado en la Figura 2 a través de las operaciones de simetría  $C_4$  para el cristal.



**Figura 35.** Vista del empaquetamiento especial del  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}]\cdot 24\text{H}_2\text{O}$  a lo largo del eje C tetragonal mostrando los nanocanales definidos por la forma toroidal del complejo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}]$ . También se muestra el canal intersticial sub nanométrico alrededor del cuarto eje cristalino producido por el empaquetamiento de los nanotubos en la red.

### **1.2.4.4.6. Estructura propuesta para el sólido policristalino**

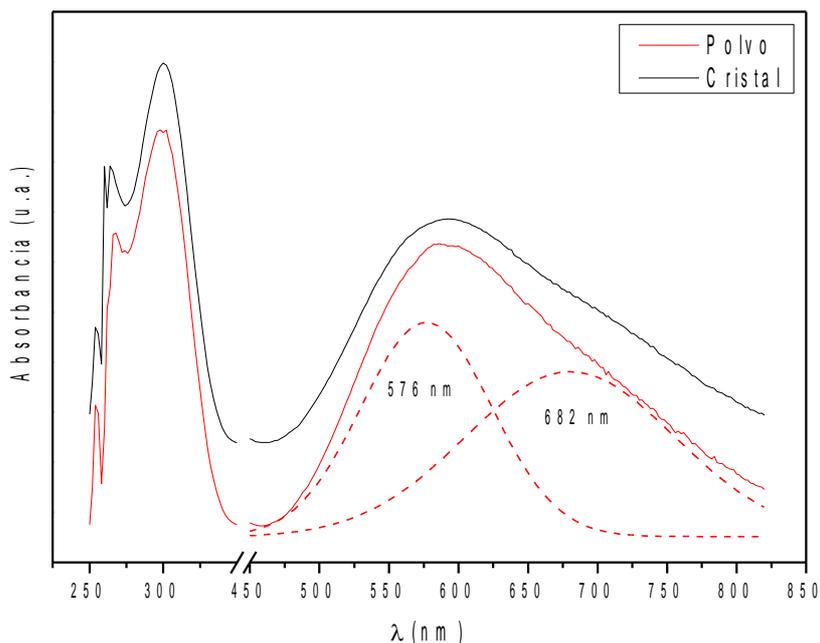
La estructura propuesta para la muestra microcristalina del CuTIm en polvo, considerando la estequiometría del compuesto M:L 1:2 (análisis elemental), la presencia de tres moléculas de agua (determinaciones de TGA) y la caracterización espectroscópica del complejo sólido: geometría cuadrado plana con un entorno  $\text{CuO}_2\text{N}_2$  sin interacciones entre los centros de cobre (medidas de EPR) y la interacción de los grupos carboxilato y del N del resto de Bz del ligando (observaciones derivadas del FTIR y Raman) se encuentran de acuerdo con la estructura determinada por difracción de rayos X de la muestra cristalina. El espectro de reflectancia difusa del polvo y de los cristales de CuTIm muestran el mismo patrón, por lo tanto se propone que la estructura del complejo como polvo microcristalino es la misma que la que se muestra en el cristal.

### **1.2.4.4. Estudios en solución**

#### **1.2.4.4.1. UV-vis y estabilidad**

El espectro UV-vis del complejo determinado usando como solvente DMF (**Fig. 36**), tanto del polvo, como del cristal, muestra dos bandas, una localizada en 576 nm ( $\epsilon = 9,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y la otra en 682 nm (sh) ( $\epsilon = 5,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

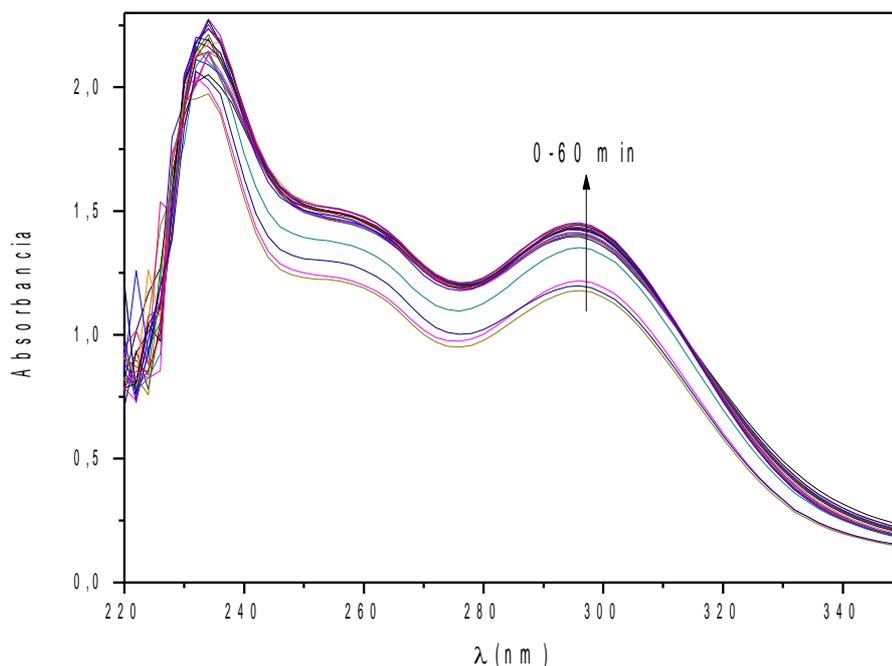
## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 36.** Espectro UV-vis del CuTIm disuelto en DMF, en negro se muestra el cristal disuelto y en rojo el polvo. Se muestra la absorbancia en unidades arbitrarias ya que las concentraciones en la región del UV son distintas a las de la región del visible.

Como se sabe, es de gran relevancia al momento de realizar estudios biológicos comprobar la estabilidad del complejo en el solvente a utilizar. En este caso, los estudios de estabilidad se realizaron en dimetilformamida (DMF). Se observó que el complejo era estable en dicho solvente. Luego de 5 hs de disolución la absorbancia del complejo disminuyó cerca de un 8% (no mostrado). Por otro lado, se determinó la estabilidad del complejo en las condiciones experimentales de los ensayos biológicos, esto es, disuelto en una mezcla 0,5% DMSO en PBS. Como se utilizó una concentración de 40 $\mu$ M, la banda sobre la que se estudió la estabilidad está localizada en el rango del UV (295 nm) (**Fig. 37**). Dado que la absorbancia medida a 295 nm varía alrededor de un 4% en 60 min y que el tiempo de manipulación del complejo antes de la adición a las células es cercano a los 15 min, se puede suponer que el complejo permanece estable en disolución de 0,5% DMSO/PBS.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

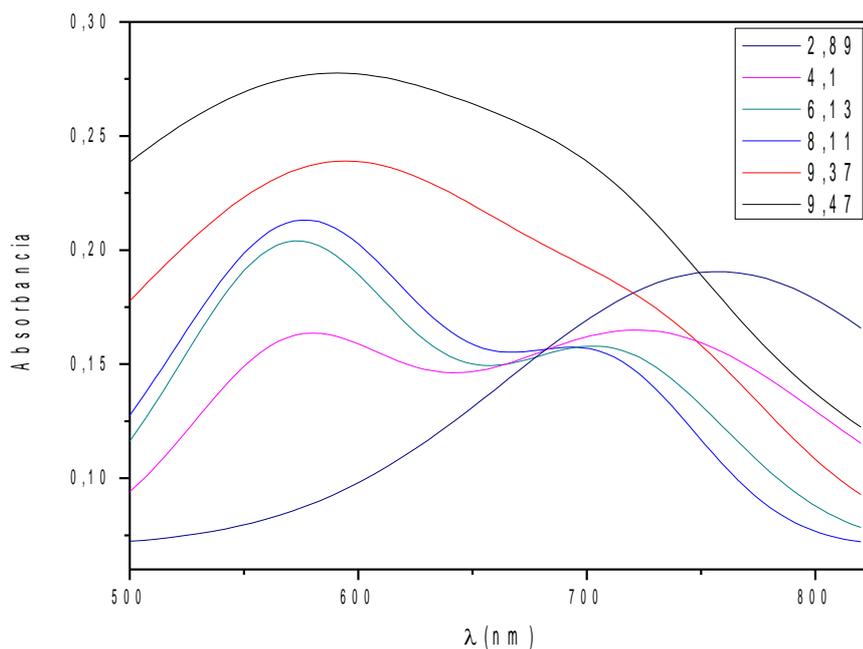


**Figura 37.** Estabilidad del CuTIm a una concentración de  $4 \cdot 10^{-5}$  M en solución de 0,5% DMSO en PBS a distintos tiempos entre 0 y 60 min. La flecha indica el sentido de desplazamiento de las curvas

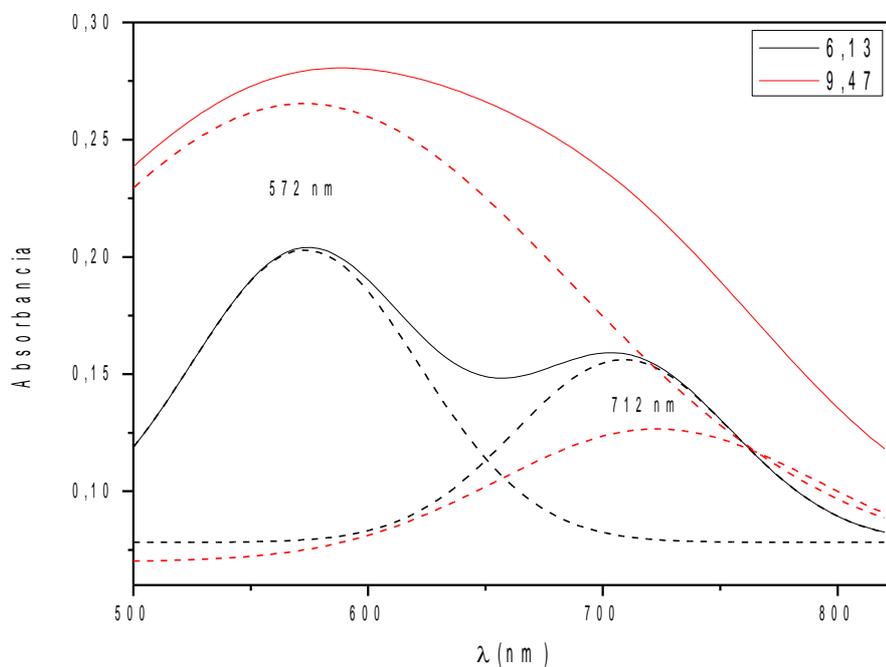
### 1.2.4.4.2. Variación con el pH

La formación del complejo se observa también a diferentes valores de pH en solución etanólica en relación L:M 2:1 (**Fig. 38**), variando el pH con metóxido de sodio, para mantener el medio anhidro. A valores de pH ácidos se observa el típico espectro electrónico del cobre(II) libre ( $\lambda_{\max} > 820$  nm) lo que indica que a ese pH no hay interacción observable con el ligando. A mayores valores de pH se observa un corrimiento hipsocrómico de la banda que se puede atribuir a la formación del complejo apareciendo dos bandas nuevas localizadas en 572 nm y 712 nm (sh), observándose además como a medida que aumenta el pH la banda de 572 nm crece notablemente en intensidad, mientras que la banda en 712 nm decrece. Esto puede detectarse del fiteo realizado sobre las bandas del espectro a dos valores distintos, pH 6,13 y 9,47 (**Fig. 39**). Estas bandas características permanecen sin alteraciones hasta pH cercanos a 8. A valores de pH mayores que 8 se observa experimentalmente la formación de un precipitado probablemente a causa de la descomposición del complejo y la consecuente formación del óxido o hidróxido de cobre(II).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



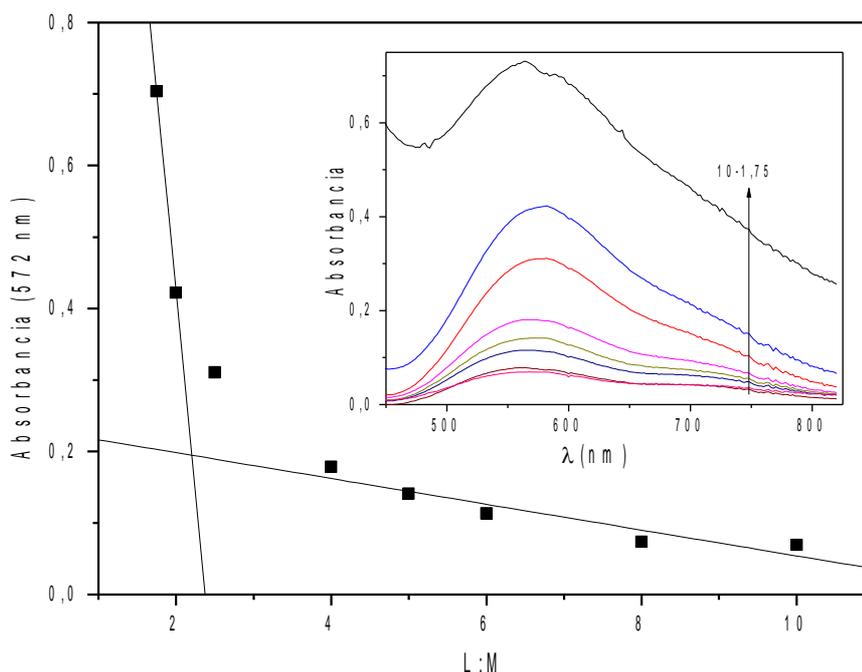
**Figura 38.** Determinación espectrofotométrica de la formación del complejo en solución etanólica. Espectro electrónico en la región visible de una mezcla de soluciones en relación 2:1 de telmisartán (0,004 M) y cobre (0,002 M) a diferentes valores de pH. La flecha indica el corrimiento del espectro al aumentar el pH.



**Figura 39.** Fiteo de las bandas localizadas en la región visible para el complejo formado en etanol a pH 6,13 (negro) y pH 9,47 (rojo).

**1.2.4.4.3. Titulación espectrofotométrica**

El espectro UV-vis de una solución etanólica de telmisartán 6,25 mM a pH 7 (ajustado utilizando metóxido de sodio) y a diferentes concentraciones de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en relación L:M entre 10 y 1,75 (**Figura 40, inset**) muestra dos bandas de absorción electrónica localizadas en 572 nm y 712 nm (sh). La diferencias que resulta de la comparación con el espectro de reflectancia difusa pueden deberse a efectos solvatocrómicos. Mediante el método de la razón molar se determinó la estequiometría del complejo formado en solución determinándose una relación L:M 2:1 que resulta ser coincidente con la relación encontrada en el complejo sólido (**Fig. 40**).



**Figura 40.** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo en solución a 572 nm mediante el método de la razón molar. Inset: espectro UV-vis de telmisartán (0,00625 M) con la adición de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con relación ligando metal (L:M) desde 10 a 1,75 (pH 7) en etanol. La flecha indica el incremento en la adición del metal.

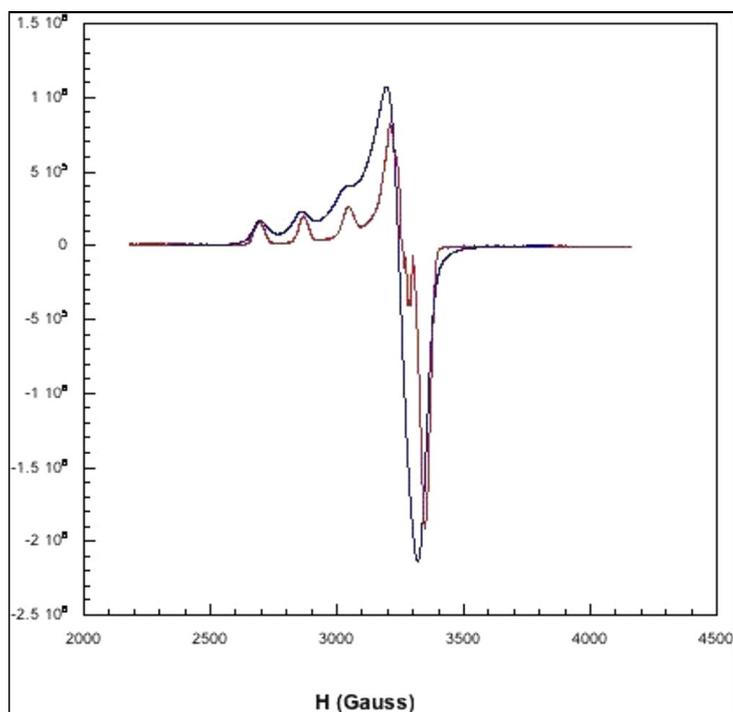
**1.2.4.4.4. EPR en solución**

Para evaluar la naturaleza de las especies formadas luego de la disolución del complejo  $[\text{Cu}_3\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ , se registró el espectro de EPR en DMF (100  $\mu\text{M}$ ) a 140 K (**Fig. 41**) y se comparó con el obtenido para el estado sólido. En la **figura 41** se puede ver que cuando se normalizan los campos, el polvo (azul) y el espectro en solución con DMF (rojo) se solapan razonablemente bien. Para la simulación del espectro en solución, se calcularon los parámetros del Hamiltoniano de Spin,  $g_{\parallel} = 2,27$ ,  $g_{\perp} = 2,051$ , y  $A_{\parallel} = 188,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ,  $A_{\perp} = 27 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . Nuevamente, son valores típicos de un complejo de cobre(II) con una geometría de octaedro elongado o cuadrado plano con el metal en el estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$ . Teniendo en cuenta la aproximación de los parámetros de EPR de Blumberg-Peisach<sup>166</sup> el valor de  $f =$

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

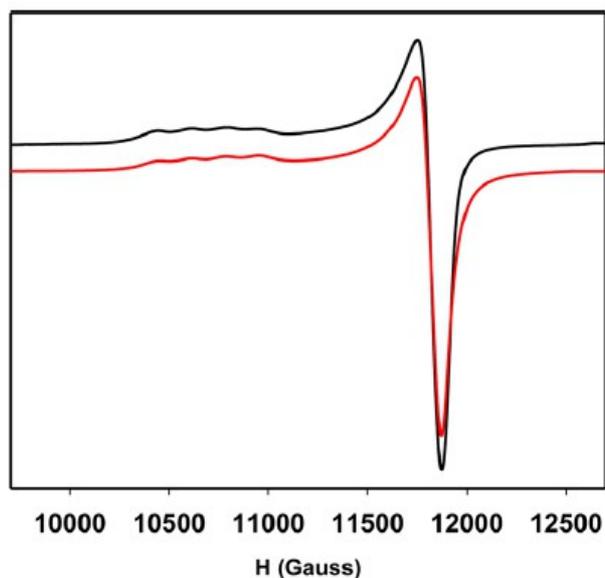
$g_{\parallel}/A_{\parallel}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 120,4 es indicativo de entornos cuadrados planos. Este resultado es consistente con las medidas de rayos X. Asimismo, los valores encontrados para la constante de acoplamiento hiperfino ( $A$ ) están de acuerdo con un entorno ecuatorial de ligandos con restos de nitrógeno y oxígenos en la esfera de coordinación próxima del Cu(II) ( $\text{CuO}_2\text{N}_2$ )<sup>169,170</sup>.

Por otro lado, también se analizó el espectro EPR en banda Q del complejo en estado sólido (**Fig. 42**) y se calcularon los valores del Hamiltoniano de Spin,  $g_{\parallel} = 2,276$ ,  $g_{\perp} = 2,058$  y  $A_{\parallel} = 185 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ,  $A_{\perp} = 20 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , los que resultan ser muy cercanos a aquellos valores obtenidos cuando el espectro fue medido en DMF. En conclusión estos resultados de EPR sugieren que la estructura del complejo no se modifica sustancialmente y básicamente retiene la estructura del complejo en estado sólido luego de su disolución en DMF.



**Figura 41.** Espectro EPR del polvo en banda X a 273 K del complejo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}]\cdot 24\text{H}_2\text{O}$  (azul) y espectro EPR del sólido disuelto en DMF (100  $\mu\text{M}$ ) a 140 K (rojo).

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm



**Figura 42.** Espectro EPR en banda Q del polvo a 293 K del complejo  $[\text{Cu}_8\text{TIm}_{16}] \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  (Línea negra) y espectro simulado (línea roja) con el programa WINEPR SimFonia.

### **1.2.4.4.5. Estructura propuesta para el CuTIm en solución**

De acuerdo con los ensayos realizados, tanto en solución etanólica, como en DMF, se observa que el complejo presenta una relación L:M de 2:1 (titulación espectrofotométrica) como en el sólido. Por espectroscopia de EPR pudo determinarse que coinciden los espectros del sólido con el de solución, por lo que se postula que la estructura del sólido es retenida en la disolución.

### **1.2.5. RESUMEN**

Se han obtenido y caracterizado cuatro complejos de cobre(II) con tres sartanes distintos (candesartán, irbesartán y telmisartán) y un profármaco (tritolcandesartán). Para obtener los complejos en todos los casos se partió de una solución etanólica de los ligandos, al agregar el cobre(II) y ajustar el pH, algunos de los complejos formados eran insolubles o poco solubles en etanol, por lo que se separaron directamente por filtración (CuIrb y CuTIm), mientras que en otros casos, dada la buena solubilidad en etanol, fue necesario el agregado de agua para obtener el precipitado (CuCand y CuTCand). El rango de pH de síntesis para todos los complejos estuvo entre 6 y 8, el necesario para desprotonar el sartán, sin ser tan alto como para formar hidróxidos u óxidos de cobre(II).

Una vez obtenidos y secos, los complejos mostraron color verde en su mayoría (con excepción del CuTIm que es azul). Para los complejos sin interacción entre los centros metálicos (CuCand, CuIrb y CuTIm) se observaron tres bandas mediante reflectancia difusa, que fueron asignadas a las transiciones d-d predichas para un metal con configuración electrónica  $d^9$ , con efecto Jahn-Teller. El complejo binuclear CuTCand mostró solamente dos bandas, debido a otro tipo de transiciones en las que están involucradas las interacciones entre los dos centros metálicos.

Los complejos obtenidos tienen en su mayoría una relación 2:1 entre el ligando y el metal, con excepción del complejo CuCand cuya relación es 1:1. El candesartán en particular es el único de los sartanes capaz de sufrir una doble desprotonación, actuando como un ligando bidentado con dos cargas negativas netas en su molécula. Si bien los otros sartanes actúan como ligandos bidentados, sufren una sola desprotonación por lo que coordinan con una sola carga negativa neta en la molécula por un lado, y mediante un átomo rico en densidad electrónica por el otro. Es por esto que, para neutralizar la carga del catión, en ausencia de otros aniones (determinado por análisis elemental) se necesitan dos ligandos por cada cobre(II), obteniéndose así la relación 2:1.

Con respecto a la solubilidad, todos son solubles en DMSO, siendo este solvente el único en el que se pudo disolver el CuIrb. Esto es importante para realizar los ensayos biológicos, ya que es preferible trabajar con un solo solvente para testear el efecto de los complejos en sistemas biológicos. Es de destacar que en estos ensayos la concentración final del DMSO nunca supera el 0,5 %. Adicionalmente, el etanol y el DMF pueden ser utilizados para disolver algunos de los complejos.

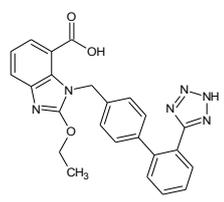
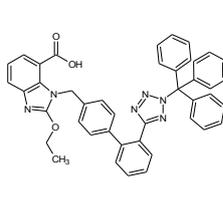
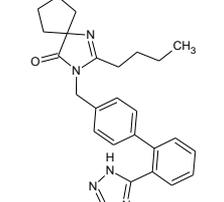
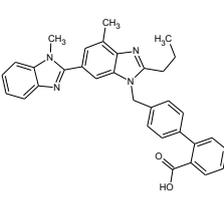
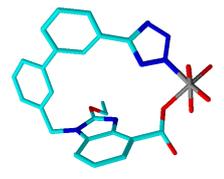
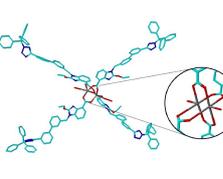
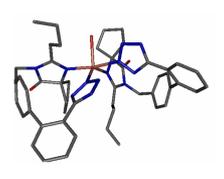
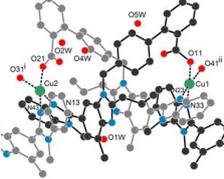
El espectro electrónico en la región del visible, realizado en solución al pH de síntesis muestra una banda en la mayoría de los casos, dos para el CuTIm, con coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) bajos, lo que es indicativo de las transiciones d-d en entornos octaédricos u octaédricos deformados.

Según los distintos ensayos realizados en solución, en todos los casos, se propuso que la estructura en solución es la misma que en el sólido.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA: CuTIm

Un resumen con las principales características de los ligandos y de los complejos en fase sólida y en solución se muestran en la **tabla 7**.

**Tabla 7.** Resumen de las principales características de los ligandos y de los complejos obtenidos, en fase sólida y en solución.

Ligando		Nombre	Candesartán	Tritilcandesartán	Irbesartán	Telmisartán
		Estructura ligando				
		Tipo de droga	Fármaco	Profármaco	Fármaco	Fármaco
		Tipo de ligando	Bidentado	Monodentado	Bidentado	Bidentado
		Familia	Bifeniltetrazoles	Bifeniltetrazoles	Bifeniltetrazoles	No bifeniltetrazoles
Complejo		Nombre complejo	<b>CuCand</b>	<b>CuTCand</b>	<b>Culrb</b>	<b>CuTIm</b>
		Color	verde	verde	verde	azul
		Fórmula	[CuCand(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ]	[Cu <sub>2</sub> (Tcand) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].4H <sub>2</sub> O	[Cu(Irb) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]	[Cu <sub>8</sub> TIm <sub>16</sub> ].24H <sub>2</sub> O
		Estructura complejo				
		Tipo de complejo	mononuclear	binuclear	mononuclear	octanuclear
		Bandas (sólido)	434 nm 605 nm 760 nm	400 nm (Intensa) 750 nm	348 nm 612 nm 748 nm	415 nm 582 nm 720 nm
		Rel L:M	1:1	2:1	2:1	2:1
		Solubilidad	EtOH DMSO	EtOH DMSO	DMSO	EtOH (baja) DMSO DMF
		pH obtención	7-8	7	6	7
		UV-vis (ε)	670 nm (ε=100,2M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	690 nm (ε=202,6M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	732 nm (ε=66,2M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	576 nm (ε=9,4 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) 682 nm (sh) (ε=5,2 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
(solvente)	(EtOH)	(EtOH)	(DMSO)	(DMF)		

EtOH: etanol; DMSO: dimetil sulfóxido; DMF: dimetilformamida

## 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

---

En el transcurso de su evolución, los organismos aeróbicos han desarrollado una red de defensa muy eficiente contra el estrés oxidativo. Es por esta razón que, en contraste con lo que ocurre con las comidas que se deterioran rápidamente aun en la heladera, los humanos pueden vivir casi 100 años al aire, en presencia de oxígeno y a temperatura ambiente sin sufrir un gran deterioro por las condiciones oxidantes con las que convive. De acuerdo con un número creciente de evidencias, el estrés oxidativo está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades y desórdenes. Debido a esto, en los últimos años se ha centrado la atención en el rol que juegan los antioxidantes en el mantenimiento de la salud humana, tanto en la prevención, como en el tratamiento de enfermedades<sup>171,172</sup>.

Los antioxidantes pueden definirse como una sustancia presente en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, que retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato<sup>173</sup>. En relación a su origen, los antioxidantes pueden ser clasificados en naturales, como los que se encuentran en las comidas, frutas y bebidas, o sintéticos, como un gran número de suplementos desarrollados por las compañías farmacéuticas. Para poder medir la eficiencia de la capacidad de esos antioxidantes, se han evaluado un gran número de métodos y variaciones<sup>174</sup>, sin embargo muchas veces, se encuentra que hay una falta de correlación entre las actividades determinadas sobre el mismo material mediante diferentes ensayos, o entre actividades determinadas por el mismo ensayo en diferentes laboratorios. Esto es entendible ya que existen múltiples especies activas y mecanismos de reacción, involucrados en el estrés oxidativo en el cuerpo humano, y por lo tanto, no existe un método simple y universal que permita evaluar la capacidad antioxidante de una manera apropiada y cuantitativa.

La capacidad de un compuesto antioxidante para secuestrar radicales libres debería ser evaluada por dos factores que son la velocidad de secuestrar los radicales y el número de radicales que cada molécula de antioxidante puede secuestrar. Estos dos parámetros, que están determinados por la estructura química del antioxidante y del radical libre en cuestión, pueden medirse por la reacción con un radical libre estable como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>)<sup>175</sup> o como el catión radical 2,2'-azinobis(ácido-3-etilbenztiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), que es estable y se usa de manera similar aunque, a diferencia del anterior, el catión radical ABTS<sup>•+</sup> se genera antes de la medida a partir de ABTS<sup>176,177</sup>.

La capacidad de un antioxidante o mezclas que contienen compuestos antioxidantes para secuestrar radicales libres han sido evaluados mediante una

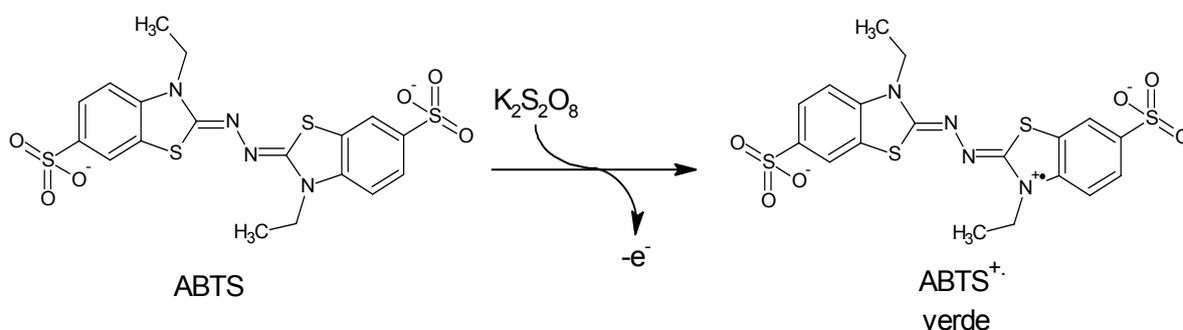
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

gran variedad de métodos competitivos usando un compuesto de referencia como sonda. Varios métodos se han desarrollado y aplicado, entre ellos, la capacidad de absorbanza del radical oxígeno (ORAC) y la capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC). En ambos casos se mide la actividad frente al radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) generado. En el ensayo típico de ORAC se mide la fase *lag* siguiendo el decaimiento de la fluorescencia o de la absorbanza de una sonda como la fluoresceína o piranina en función del tiempo en ausencia o en presencia de un antioxidante<sup>178-180</sup>. El tiempo que transcurre antes de que exista una notable reducción en la absorbanza o fluorescencia por consumo de la sonda, es lo que se denomina *fase lag*<sup>181</sup>, cuanto mayor sea este tiempo, mejor antioxidante será el compuesto.

En nuestro caso, hemos evaluado la actividad antioxidante del tritilcandesartán (TCand), candesartán (Cand), telmisartán (TIm) e irbesartán (Irb) así como también de sus respectivos complejos de cobre(II) CuTCand, CuCand, CuTIm y CuIrb y de la sal de cobre(II) a partir de la cual se formaron, el  $\text{CuCl}_2$ . Los radicales sobre los que se evaluó la actividad antioxidante fueron el  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , el  $\text{DPPH}^\bullet$ , el  $\text{ROO}^\bullet$ , y la actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.

**1.3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TAA)**

La actividad total antioxidante se midió usando el coeficiente antioxidante equivalente (TEAC) de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A partir de la reacción entre el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolino-6- sulfónico) y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) se genera un radical color verde azulado del  $ABTS^{+\cdot}$  (**Esquema 1**). El radical generado tiene máximos de absorción en 645 nm, 734 nm y 815 nm, siendo el más usado para la determinación el de 734 nm. Cuando se le adiciona algún antioxidante se produce una decoloración, el  $ABTS^{+\cdot}$  se reduce a ABTS ya sea por donación de un átomo de hidrógeno o de un electrón por parte del antioxidante. Posteriormente, se determina el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión  $ABTS^{+\cdot}$  en función de la concentración de antioxidante. Y por último, en caso de ser posible, se calcula el TEAC a partir de la reactividad relativa del antioxidante a estudiar frente al trolox en las mismas condiciones de la técnica<sup>182</sup>.

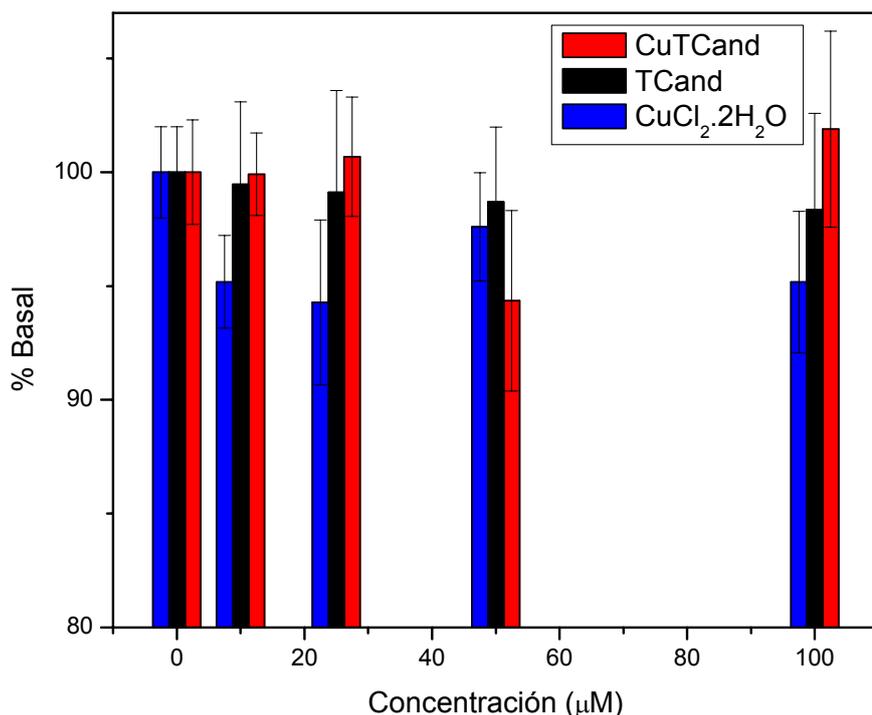


**Esquema 1.** Estructura y formación del catión radical  $ABTS^{+\cdot}$  a partir de ABTS y peroxidisulfato de potasio.

El ensayo de TAA se realizó sobre los sartanes: Tcand, Cand, Tlm e Irb, sus complejos de cobre(II): CuTCand, CuCand, CuTlm y CuIrb, y sobre el  $CuCl_2$ . Para establecer la actividad antioxidante, en todos los casos se midió la absorbancia del radical catión  $ABTS^{+\cdot}$  a 734 nm con adiciones crecientes de los compuestos mencionados anteriormente, en concentraciones desde 10  $\mu M$  hasta 100  $\mu M$ , con un tiempo de reacción de 6 min. Se los comparó con la absorbancia a 734 nm de un basal sin ningún agregado. Luego se graficó el cociente porcentual entre estas dos absorbancias (% Basal) en función de la concentración ( $\mu M$ ). En todos los casos los resultados se expresan como el promedio del porcentaje con respecto al basal de todas las medidas realizadas en tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar ( $n=9$ ).

Tanto el TCand, como el CuTCand no presentan actividad antioxidante frente al catión radical  $ABTS^{+\cdot}$  en concentraciones hasta 100  $\mu M$  (**Fig. 1**). Para esta concentración el TCand inhibe un 1,6%, mientras que el CuTCand no produce inhibición alguna. Estas diferencias, tanto del TCand con respecto al control, como la que hay entre el TCand, CuTCand o  $CuCl_2$  a 100  $\mu M$  no son significativas desde el punto de vista estadístico.

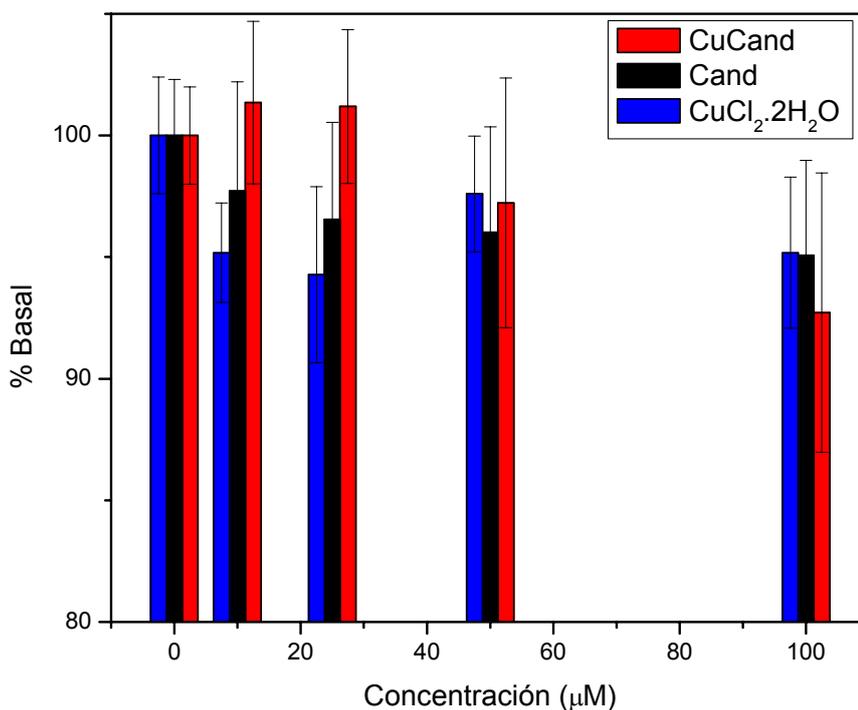
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Actividad antioxidante total (TAA)



**Figura 1.** Ensayo de la actividad antioxidante total para el CuTCand (rojo), TCand (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul).

Las medidas de la TAA para el Cand y el CuCand (**Fig. 2**) muestran que a una concentración de 100 μM el Cand secuestra un 4,9 % de los cationes radicales ABTS<sup>•+</sup>, mientras que el CuCand secuestra un 7,3% y el CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O un 4,8%. Sin embargo estas diferencias, al igual que en el caso anterior no son significativas desde el punto de vista estadístico. Desde el punto de vista de la relación estructura-actividad, puede observarse por comparación entre el Cand y el TCand que el primero parecería tener una mejor actividad antioxidante que el segundo, cuyo anillo imidazólico se encuentra unido a un grupo tritilo. Para el caso de sus complejos de coordinación ocurre algo similar, el complejo mononuclear CuCand parecería tener una mayor actividad antioxidante que el complejo binuclear CuTCand.

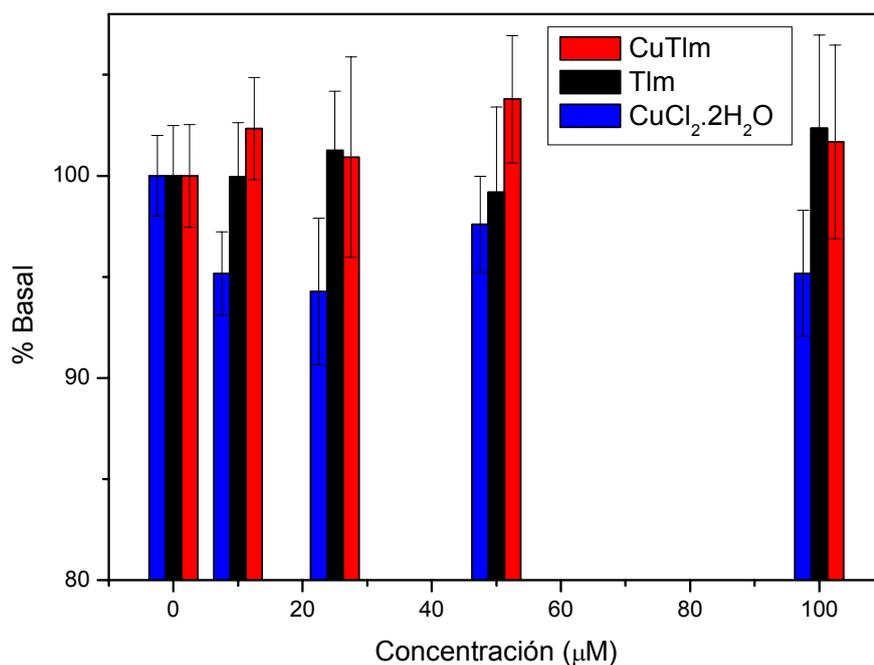
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Actividad antioxidante total (TAA)



**Figura 2.** Ensayo de la actividad antioxidante total para el CuCand (rojo), Cand (negro) y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

Por otro lado, también se evaluó la actividad antioxidante total para el caso del CuTlm y el Tlm (**Fig. 3**). En este caso, ni el Tlm, ni el CuTlm secuestran radicales ABTS<sup>•+</sup> en concentraciones hasta 100 μM. En ninguna de las concentraciones ensayadas se observa para estos dos compuestos diferencias significativas entre si, o con respecto al control, desde un punto de vista estadístico en las condiciones de reacción empleadas. Los valores reportados en la bibliografía difieren para el telmisartán ya que se informa que la concentración necesaria para inhibir el radical ABTS<sup>•+</sup> en un 50% es IC<sub>50</sub>=37,5μM<sup>183</sup>. En este ensayo, si bien utilizan un método similar, no especifican tiempo de reacción que emplean, lo que no permite establecer una comparación directa con los valores obtenidos en el presente ensayo.

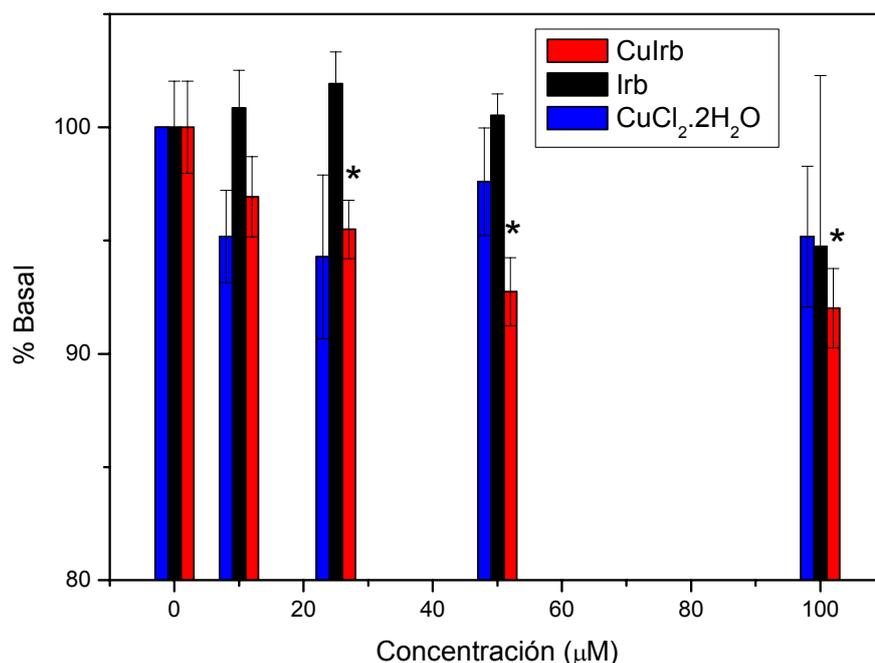
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Actividad antioxidante total (TAA)



**Figura 3.** Ensayo de la actividad antioxidante total para el CuTIm (rojo), TIm (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul).

Finalmente se midió también la TAA para el Irb y su complejo Culrb en concentraciones hasta 100 μM (**Fig. 4**). A la concentración máxima testada, el Culrb secuestra un 8,0 %, mientras que el Irb un 5,3 %. Para el caso del complejo Culrb, en concentraciones mayores a 25 μM ya se observan diferencias significativas con respecto al control sin antioxidante, mientras que el Irb no tiene diferencias con respecto al control en ninguna de las concentraciones ensayadas. Para este último, se encontró un valor reportado en la bibliografía ( $IC_{50}=7,6 \mu M^{184}$ ) que difiere con los que hemos observado en nuestro ensayo. Sin embargo, y al igual que para el caso del telmisartán, no se informa el tiempo de reacción empleado, por lo que estos resultados no son comparables directamente con los que hemos obtenido.

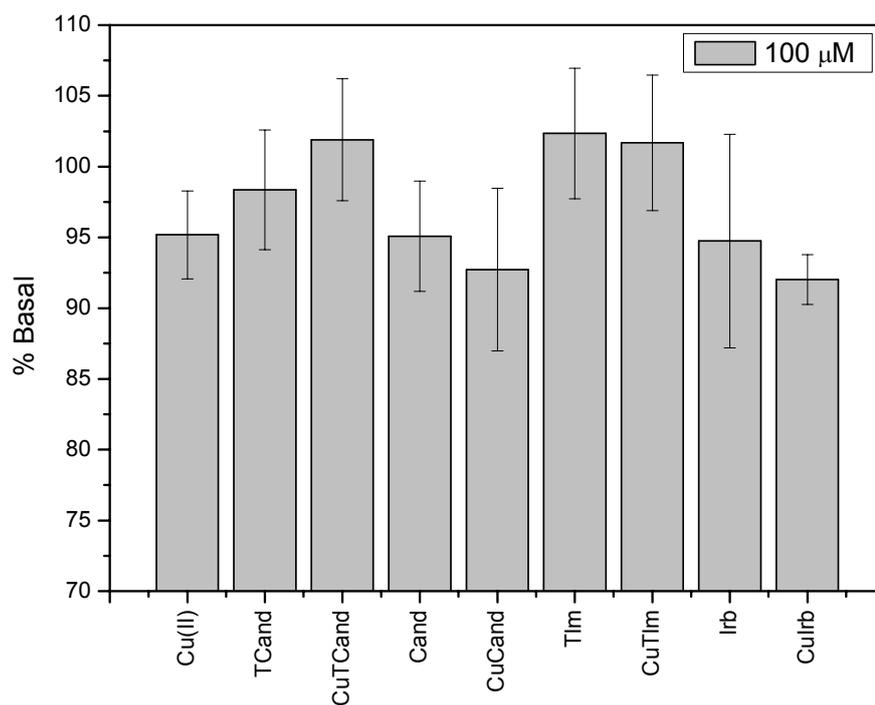
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Actividad antioxidante total (TAA)



**Figura 4.** Ensayo de la actividad antioxidante total para el Culrb (rojo), Irb (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul). \* Diferencias significativas con respecto al control sin agregados.

De los resultados obtenidos se desprende que ninguno de los compuestos mencionados anteriormente tiene una gran capacidad para secuestrar el radical ABTS<sup>•+</sup> en concentraciones hasta 100μM y en las condiciones experimentales empleadas<sup>182</sup> (**Fig. 5**). El único compuesto que presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin agregados es el Culrb que, además, es el compuesto testeado con mayor actividad antioxidante total (8,0 %). Aunque todas las TAA obtenidas fueron muy bajas, se puede distinguir que los compuestos mononucleares, como el Culrb y el CuCand presentan una mayor actividad antioxidante que aquellos complejos binucleares, como el CuTIm y el CuTCand. No obstante, esta es una tendencia que también muestran los ligandos que le dan origen a esos complejos, ya que para el Irb y el Cand, la actividad antioxidante es ligeramente mayor que para el TCand y para el TIm. Estas tendencias deben tomarse como insinuaciones, ya que como se mencionó anteriormente, son todas muy pequeñas y en su mayoría sin significancia estadística. Es por esta razón, que carece de sentido realizar el cálculo del valor de TEAC ya que las pendientes obtenidas en todos los casos son cercanas a cero.

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Actividad antioxidante total (TAA)

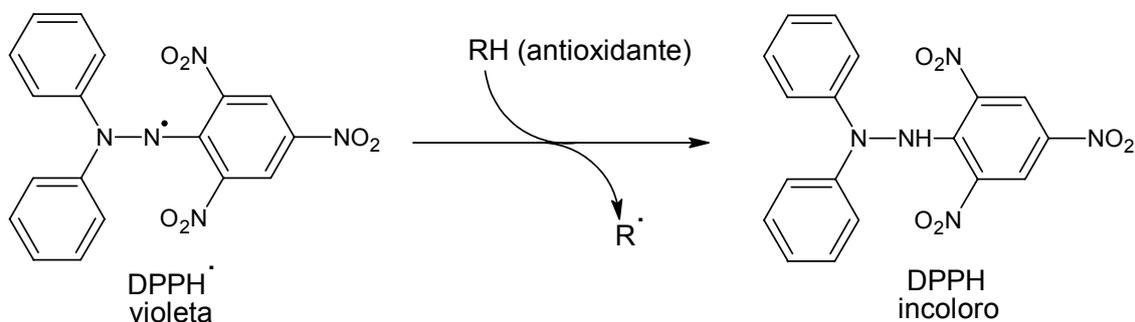


**Figura 5.** Ensayo de la actividad antioxidante total para todos los sartanes y sus complejos de cobre (II) testeados para una concentración de 100 μM.

### 1.3.2. CAPACIDAD DE SECUESTRAR EL RADICAL DPPH\*

La capacidad antioxidante de los compuestos frente al radical DPPH\* (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue medida por el método de Yamaguchi y colaboradores<sup>185</sup>. Este ensayo es ampliamente utilizado para el estudio de la actividad de antioxidantes naturales debido a su alta sensibilidad y simpleza.

El DPPH\* es un radical libre estable, que disuelto en metanol posee color violeta. Un agente antioxidante (que en teoría es un donador de hidrógeno o de electrones) puede reducir este radical (por transferencia de un átomo de hidrógeno o por transferencia de un electrón seguida de la transferencia de un átomo de hidrógeno) lo que produce una disminución del color inicial. En el **esquema 2** se muestra el mecanismo por el cual el radical DPPH\* acepta un hidrógeno proveniente de un antioxidante<sup>186</sup>.



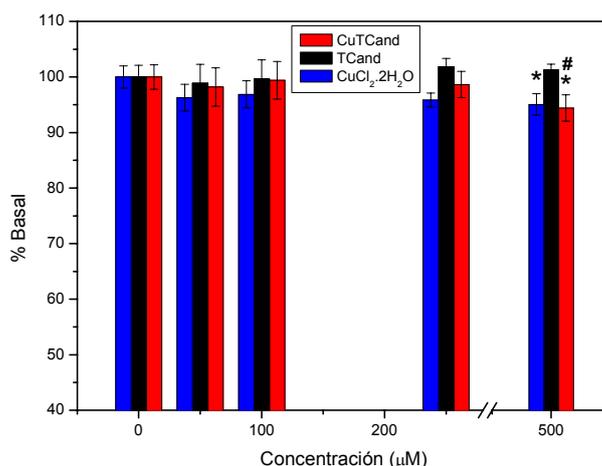
**Esquema 2.** Reacción entre un antioxidante (RH) y el radical DPPH\* para formar DPPH\*.

Se llevó a cabo el ensayo de capacidad de secuestrar el radical DPPH\* para los sartanes TCand, Cand, TIm e Irb. Así como también para sus respectivos complejos de cobre(II): CuTCand, CuCand, CuTIm y CuIrb y la sal de cobre que les dio origen: el  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Para establecer la capacidad antioxidante frente al radical DPPH\* se midió la absorbancia a 517 nm de las soluciones con el radical y con cantidades crecientes de los compuestos a testear y se la comparó con la absorbancia del radical sin ningún agregado. El cociente porcentual de estas dos absorbancias (% Basal) se graficó en función de la concentración de compuestos ( $\mu\text{M}$ ). En todos los casos los resultados se expresan como el promedio del porcentaje con respecto al basal de todas las medidas realizadas en tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar ( $n=9$ ).

Cuando se evaluó la actividad antioxidante frente al radical DPPH\* para el caso del TCand y el complejo CuTCand (**Fig. 6**) se observó que el TCand no presentaba actividad en concentraciones hasta 500  $\mu\text{M}$ . El CuTCand por su parte, a la misma concentración, secuestra un 5,6% de los radicales, comportándose de manera similar al  $\text{CuCl}_2$  (5,0%). En este caso, aunque de una manera muy sutil, la complejación con cobre(II) mejora significativamente (desde el punto de vista estadístico) la actividad antioxidante frente al radical DPPH\* del sartán que le dio origen en concentraciones de 500  $\mu\text{M}$ .

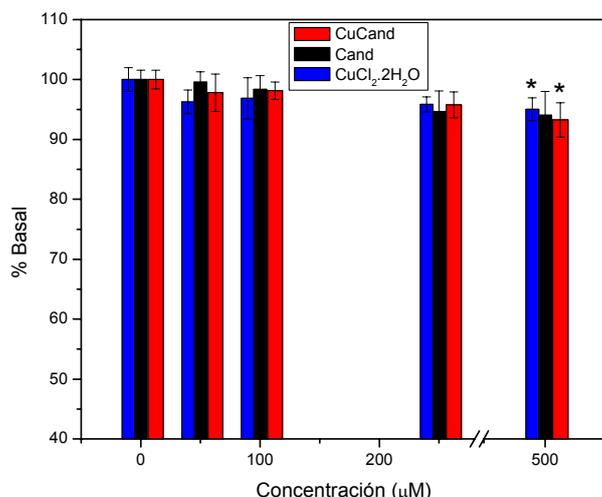
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Capacidad de secuestrar el radical DPPH\*



**Figura 6.** Determinación de la capacidad para secuestrar radicales DPPH\* para el CuTCand (rojo), TCand (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul). \* Diferencias significativas con respecto al control sin agregados. # Diferencias significativas con respecto al ligando de origen a la misma concentración.

Por su parte, las medidas de capacidad secuestrante del radical DPPH\* para el Cand y CuCand (**Fig. 7**) muestran, al igual que en el caso anterior, una pobre capacidad antioxidante frente a este radical. A una concentración de 500 μM, el Cand secuestra un 6,0%, mientras que el CuCand un 6,7%, ligeramente por encima del valor del cobre(II) (5,0%). Solamente la diferencia del CuCand y del cobre(II) son significativas con respecto al control sin ningún agregado, mientras que a 500 μM no hay diferencias entre los tres compuestos. Es por esto que no se puede afirmar, desde un punto de vista estadístico, que la complejación mejora las propiedades del sartán en este caso.

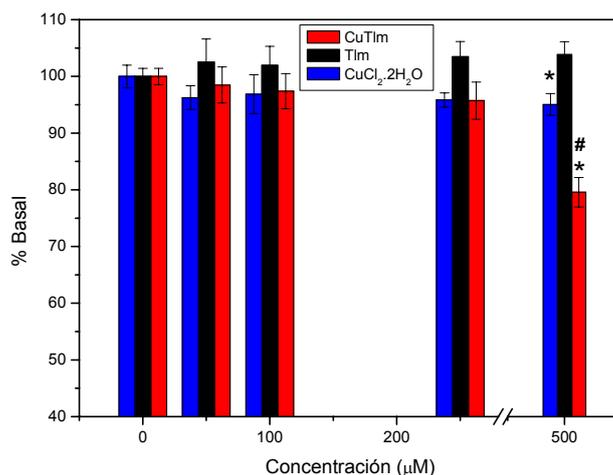
Por otro lado, se puede apreciar que el Cand es ligeramente mejor secuestrante que su profármaco TCand en concentraciones altas, mientras que los complejos CuCand y CuTCand prácticamente no tienen diferencias entre si.



**Figura 7.** Determinación de la capacidad para secuestrar radicales DPPH\* para el CuCand (rojo), Cand (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul) \* Diferencias significativas con respecto al control sin agregados.

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Capacidad de secuestrar el radical DPPH\*

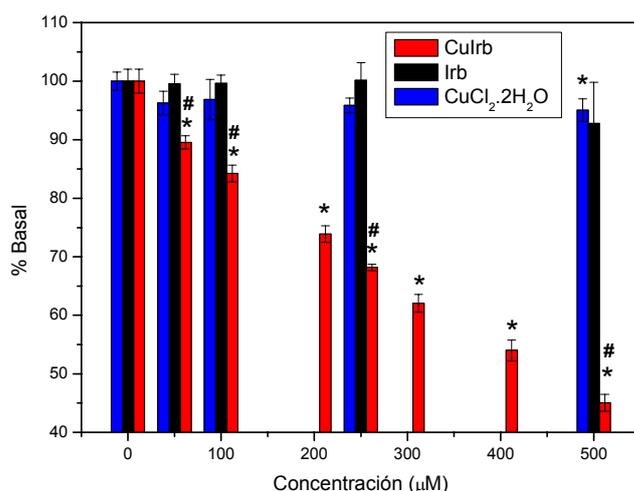
La actividad frente al radical DPPH\* también se ensayó para el TIm y el CuTIm (**Fig. 8**). Para este caso se encontró que el TIm no exhibe capacidad antioxidante frente a este radical en las concentraciones testeadas (hasta 500  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, su complejo de cobre(II), el CuTIm, secuestra un 20,4%, este valor difiere tanto del control sin agregados, como del cobre(II) y del TIm a 500  $\mu\text{M}$  de una manera estadísticamente significativa. Aunque estos valores no indican una capacidad antioxidante alta para el CuTIm, la mejora como secuestrante de radicales DPPH\* con respecto al TIm, es notoria a concentraciones altas.



**Figura 8.** Determinación de la capacidad para secuestrar radicales DPPH\* para el CuTIm (rojo), TIm (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul). \* Diferencias significativas con respecto al control sin agregados. # Diferencias significativas con respecto al ligando de origen a la misma concentración.

Por último, se realizó el ensayo de capacidad antioxidante sobre el Irb y el Culrb (**Fig. 9**). Aunque sin que se aprecie diferencia estadísticamente significativa, el Irb muestra una ligera actividad a 500  $\mu\text{M}$ , secuestrando un 7,2% de los radicales en comparación con el control sin agregados. Sin embargo, al testear la capacidad antioxidante frente al radical DPPH\* del Culrb, se observó una disminución notoria de la cantidad de radicales, no solamente en la mayor concentración testeada, sino en concentraciones menores. El complejo presenta diferencias significativas desde el punto de vista estadístico con respecto al control y con respecto al Irb en todas las concentraciones testeadas (desde 50 a 500  $\mu\text{M}$ ). A diferencia del Irb, el Culrb a 500  $\mu\text{M}$  secuestra un 55,0%, lo que indica que es cerca de 8 veces mejor secuestrante que el ligando. Este es el único caso en el que se pudo calcular un valor de IC<sub>50</sub>, es decir, una concentración para la cual el complejo, en este caso, secuestra el 50% de los radicales. El IC<sub>50</sub> para el Culrb es de 425 $\mu\text{M}$ . Lo que en líneas generales indica que se trata de un pobre secuestrante (ac. ascórbico IC<sub>50</sub>=24,1<sup>185</sup>, medido por el mismo método), pero en este contexto de los sartanes, es una mejora muy significativa.

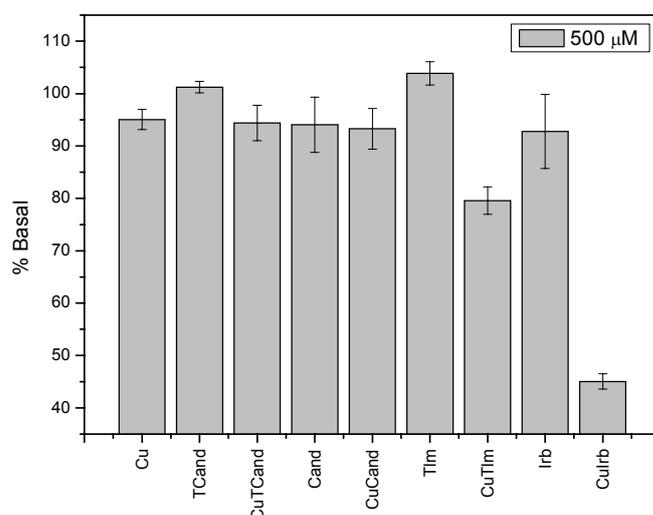
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Capacidad de secuestrar el radical DPPH\*



**Figura 9.** Determinación de la capacidad para secuestrar radicales DPPH\* para el CuIrb (rojo), Irb (negro) y CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (azul). \* Diferencias significativas con respecto al control sin agregados. # Diferencias significativas con respecto al ligando de origen a la misma concentración.

Comparando el comportamiento de los sartanes y de sus complejos de cobre frente al radical DPPH\* (**Fig. 10**) se puede concluir que ni el TCand, Cand, TIm o Irb presentan actividad significativa frente a este radical desde el punto de vista estadístico. En relación a estos resultados, no se encontraron valores reportados en la literatura que permitieran realizar una comparación con los valores obtenidos.

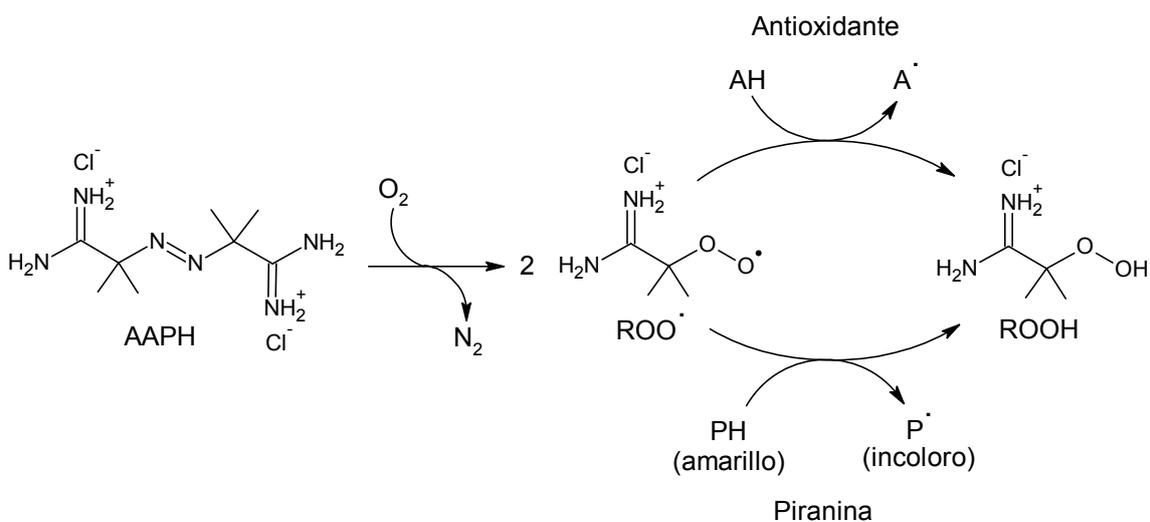
Por otro lado, si se comparan los complejos de cobre(II), se observa que el CuTCand, CuTIm y CuIrb mejoran la capacidad de secuestrar radicales DPPH\* del ligando de origen. Si bien no se puede afirmar que se trate de compuestos con gran actividad antioxidante, en este contexto, el CuIrb es el compuesto testeado con mayor capacidad secuestrante de radicales (IC<sub>50</sub> = 425 μM).



**Figura 10.** Ensayo de la capacidad para secuestrar radicales DPPH\* de todos los sartanes y sus complejos de cobre(II) testeados a una concentración de 500 μM.

**1.3.3. Ensayo de inhibición del radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>)**

Este ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes de secuestrar al radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>), el cual se genera por descomposición térmica del AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro) por término de 30 minutos a 37 °C (**Esquema 3**)<sup>187,188</sup>. El AAPH fue elegido por su habilidad de generar radicales libres a un ritmo constante por largos períodos de tiempo (vida media, 175 hs). Se utilizó un método espectrofotométrico en el cual se usó la piranina como molécula blanco del radical peroxilo. La piranina tiene un color amarillo con una banda característica en 454 nm que al reaccionar con el radical se forma un compuesto incoloro, y espectrofotométricamente se observa una disminución de la absorbancia de la banda característica con el tiempo. Cuando se le añade un compuesto con propiedades antioxidantes se genera una competencia entre el antioxidante y la piranina por el radical peroxilo. Durante el tiempo en el que el antioxidante secuestra el radical peroxilo, la piranina permanece sin reaccionar y la absorbancia de la banda en 454 nm permanece sin cambios. Este tiempo (en minutos) que transcurre antes de que exista una notable reducción en la absorbancia por consumo de la piranina, es lo que se denomina *fase lag*<sup>181</sup>. Los datos obtenidos se presentan como valor de *fase lag* (min) en función de la concentración de los compuestos. Cuanto mejor es un antioxidante, mayor será su *fase lag* aun a concentraciones bajas.



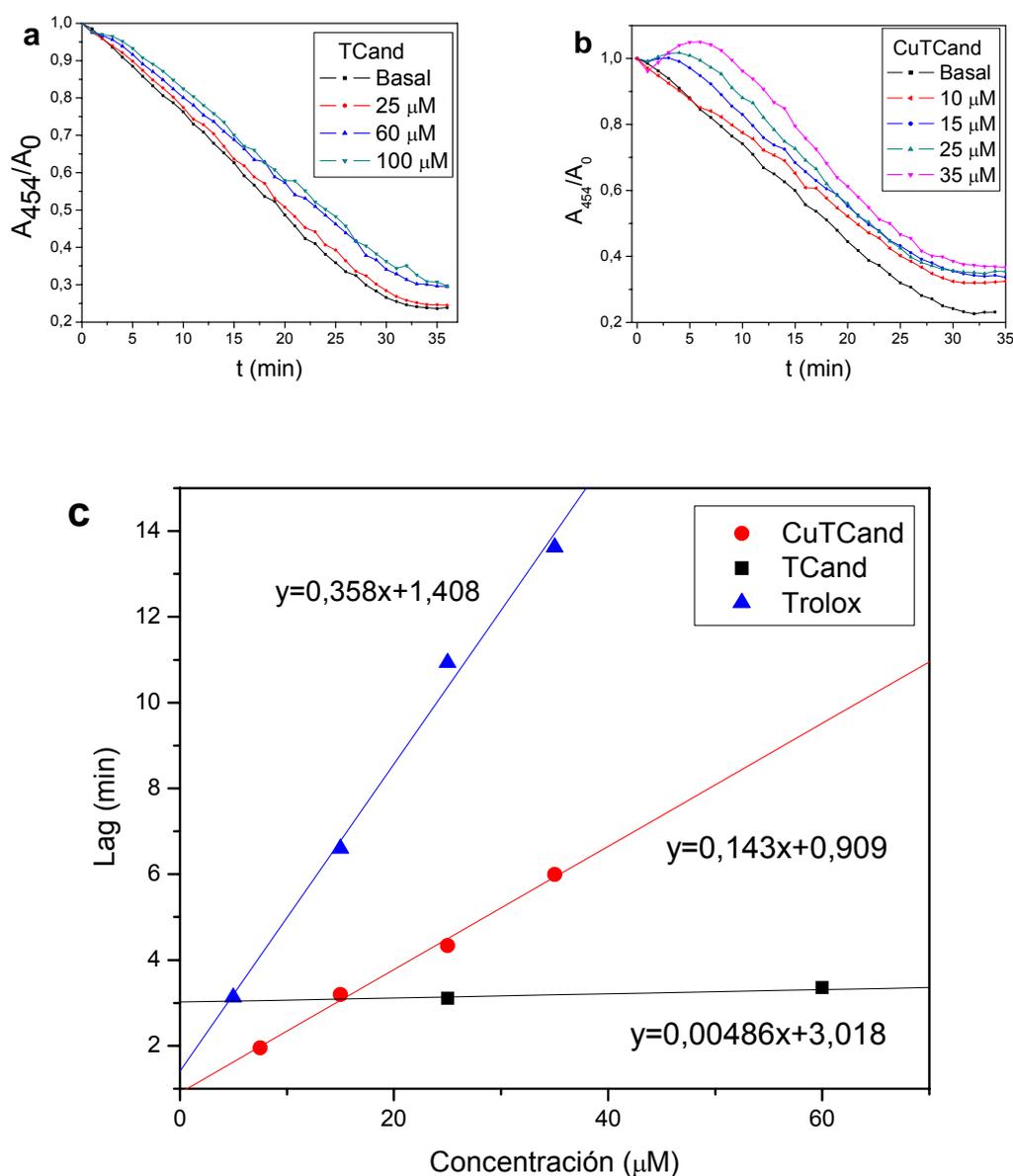
**Esquema 3.** Reacción de formación del radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>) a partir del AAPH. Se muestra también la reacción de competencia entre un antioxidante y la piranina por el radical generado.

El ensayo de poder secuestrante de radical peroxilo se realizó sobre el TCand, Cand, TIm, Irb y sobre sus complejos de cobre(II) CuTCand, CuCand, CuTIm y Culrb.

El profármaco TCand muestra una *fase lag* muy pequeña de alrededor de 3 min (**Fig. 11a**), que varía ligeramente con la concentración. Sin embargo, el CuTCand muestra una *fase lag* notable aún en concentraciones bajas del complejo (**Fig. 11b**). En este caso, con el fin de cuantificar la actividad antioxidante, y compararla con un antioxidante de referencia como es el trolox

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Inhibición del radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>)

(análogo soluble de la vitamina E), se realizó el gráfico de fase *lag* (min) en función de la concentración de compuesto (**Fig. 11c**). Se compararon las pendientes del CuTCand, TCand y el trolox y se observó que, si bien el trolox es el mejor antioxidante, el CuTCand mejora marcadamente la actividad del ligando de origen. De las regresiones lineales realizadas, se observa que el CuTCand tiene una pendiente que es cerca del 50% del valor de la del trolox, el valor TEAC es 0,399 (obtenido por el cociente de las pendientes) mientras que para el caso del TCand el TEAC $\approx$ 0.

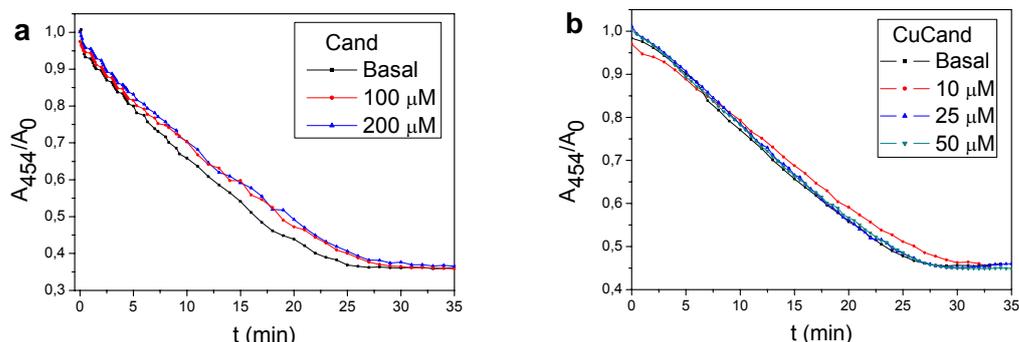


**Figura 11.** Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical ROO<sup>•</sup> para el a) TCand y b) CuTCand. C) cálculo de la fase *lag* en función de la concentración para el CuTCand (rojo), TCand (negro) y trolox (azul).

Para el caso del Cand y el CuCand, no se observa capacidad de secuestrar radicales peroxilo a las concentraciones testeadas. Las concentraciones que se utilizaron del complejo CuCand son bajas debido a la insolubilidad en las condiciones del ensayo (**Fig. 12a**). El Cand por su parte,

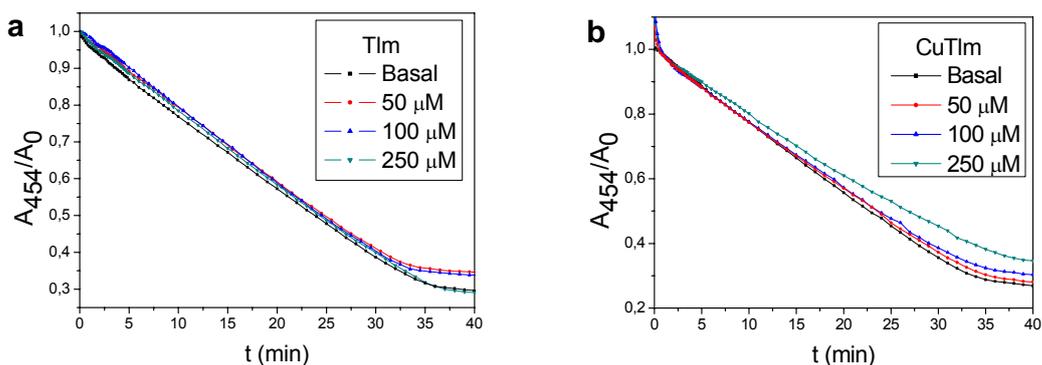
### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Inhibición del radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )

tampoco presenta variaciones en la fase *lag* en concentraciones hasta  $200 \mu\text{M}$  (**Fig. 12b**)



**Figura 12.** Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical  $\text{ROO}^\bullet$  para el a) Cand y b) CuCand.

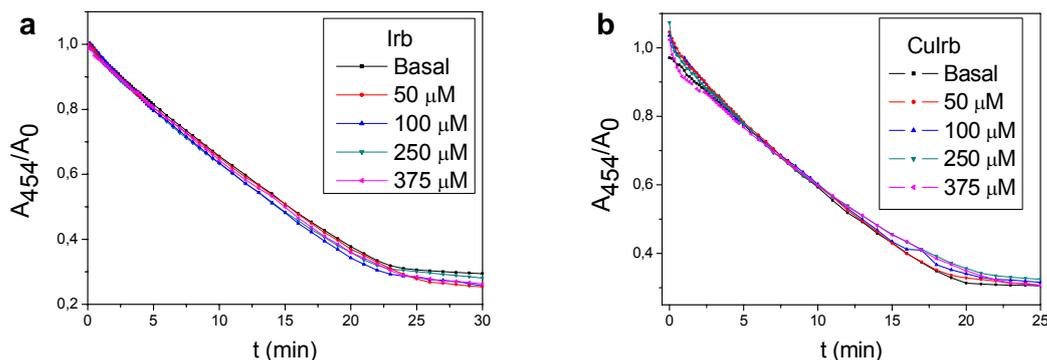
Por otra parte, ni el TIm, ni el CuTIm muestran variaciones en la fase *lag*, en las concentraciones hasta  $250 \mu\text{M}$  (**Fig. 13**). Por lo tanto se concluye que ninguno de los dos tiene capacidad para secuestrar el radical peroxilo. Además, dada la similitud de las curvas para ambos compuestos, se observa que la complejación no produce una mejora sobre el comportamiento del ligando solo.



**Figura 13.** Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical  $\text{ROO}^\bullet$  para el a) TIm y b) CuTIm.

Por último, se realizó el ensayo para el Irb y el Culrb, al igual que los casos anteriores. No se observó ninguna capacidad para secuestrar los radicales peroxilo en concentraciones hasta  $375 \mu\text{M}$  (**Fig. 14**). Del mismo modo que el anterior, cuando se comparan las curvas para el Irb (**Fig. 14a**) con el IrbCu (**Fig. 14b**) tampoco se observan diferencias en su forma, por lo que la complejación no estaría modificando la actividad del ligando frente al radical  $\text{ROO}^\bullet$ .

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Inhibición del radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )



**Figura 14.** Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical  $\text{ROO}^\bullet$  para el a) Irb y b) Culrb.

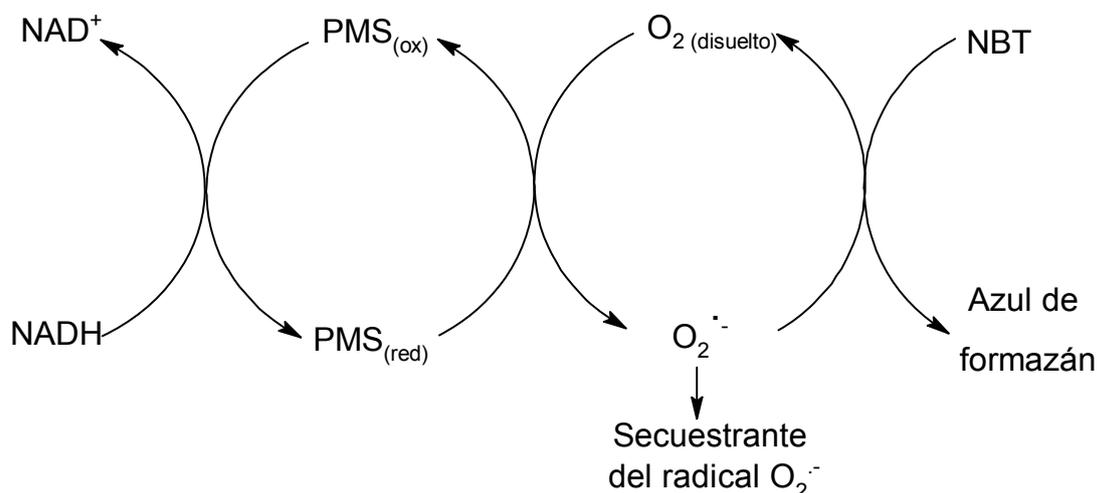
En este ensayo de la capacidad para secuestrar radicales  $\text{ROO}^\bullet$  se observó que los sartanes en general no presentan actividad. Con excepción del TCand, cuya capacidad secuestrante es ligeramente superior al resto, no se observaron diferencias entre los tipos de curvas para el Cand, TIm e Irb.

Por el lado de los complejos de cobre(II), el único que permitió determinar la fase *lag* y compararlo con un antioxidante de referencia como el trolox fue el CuTCand, cuya actividad mejora por complejación cuando se lo compara con su ligando de origen. El resto de los complejos: CuCand, CuTIm y Culrb no muestran capacidad como secuestrantes frente a este radical.

#### 1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) SÍMIL.

Se determinó la capacidad de dismutar los radicales superóxido mediante un método no enzimático en el cual se mide la capacidad SOD símil generando el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a través del sistema nitroazul de tetrazolio (NBT)/ fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH).

La reacción comienza con la reducción del PMS a partir de la acción de un donador de H como el NADH. Una vez reducido, el PMS reacciona con el oxígeno disuelto, para generar el radical  $O_2^{\bullet-}$ . De esta manera, los radicales generados son capaces de reducir el NBT a azul de formazán, lo que incrementa la absorbancia medida a 560 nm. Cuando la enzima SOD o un compuesto con actividad SOD símil están presentes en el medio de reacción, secuestran los radicales superóxido, lo que resulta en una inhibición de la formación de azul de formazán (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Mecanismo para la actividad SOD-símil utilizando en sistema NBT/NADH/PMS<sup>189</sup>.

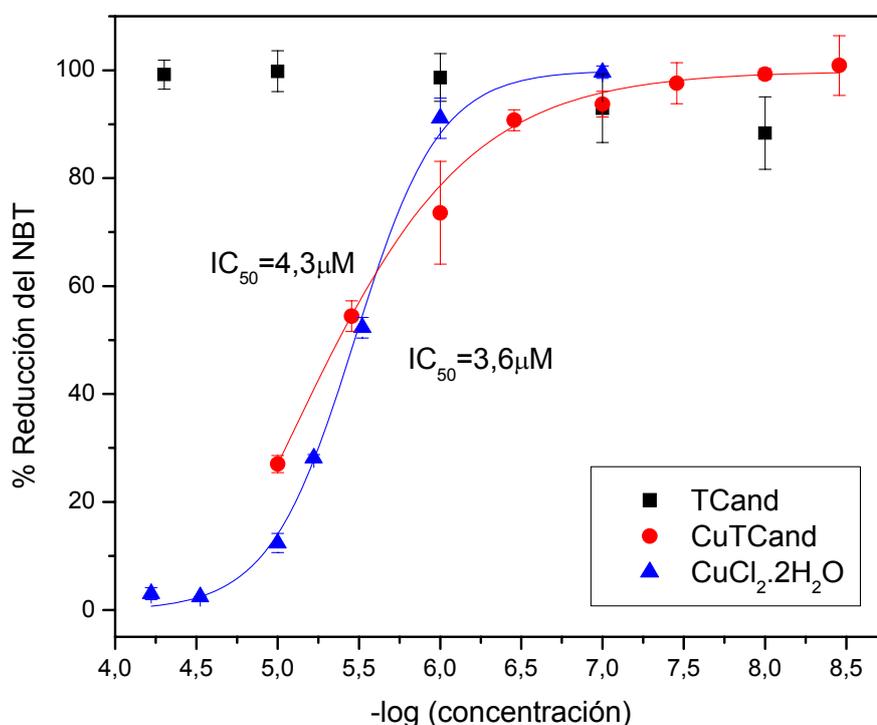
La determinación de la posible actividad SOD símil de los compuestos se midió sobre el Tcand, Cand, TIm e Irb, así como también de sus complejos con cobre(II): CuTcand, CuCand, CuTIm y CuIrb, y de la sal de cobre  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ . Para obtener la concentración de complejo que secuestra un 50 % de los radicales  $O_2^{\bullet-}$  ( $IC_{50}$ ) se graficó el porcentaje de reducción de NBT en función del  $-\log$  de la concentración de los compuestos testeados<sup>189</sup>. En todos los casos los resultados se expresan como el promedio de todas las medidas realizadas en tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar ( $n=9$ ). A estos valores se les ajustó una curva sigmoidea generada por la función de Botzmann a partir de la cual se tomó el valor de  $IC_{50}$ .

La actividad SOD medida por este método para la enzima bovina, arrojó un valor de  $IC_{50}=0,21 \mu M$ <sup>190</sup>. Por otro lado, para el caso del  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , su valor de  $IC_{50}$  resulta llamativamente bajo ( $3,6 \mu M$ ) (**Fig. 15-18**) y es similar al valor reportado para otra sal de cobre ( $1,1 \mu M$ )<sup>191</sup>. Para explicar esto, Huber y

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Determinación de la actividad SOD símil

colaboradores<sup>192</sup> sostienen que el Cu(II), además de presentar la capacidad para disminuir la concentración de superóxido, podría producir la oxidación del producto de reducción del NBT. De este modo, la alta actividad SOD encontrada para los iones Cu(II) en las soluciones de trabajo se debería a reacciones que ocurren entre el Cu(II) y el azul de formazán, reduciendo la cantidad producida y dando lugar a una errónea interpretación de la actividad.

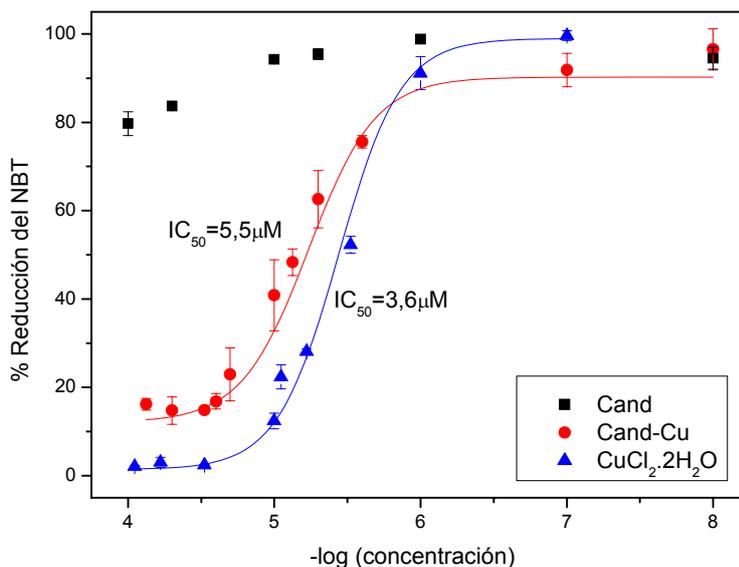
Para el caso del profármaco TCand se determinó la actividad SOD símil y no se observó una disminución en la generación de azul de formazán con respecto al control sin agregados en concentraciones hasta 100  $\mu\text{M}$ . El CuTCand por su parte, muestra una disminución en la reducción del NBT, lo que permitió cuantificar su capacidad de secuestrar el radical superóxido a partir de su  $\text{IC}_{50}=4,3 \mu\text{M}$  (**Fig. 15**). Este valor es ligeramente superior al observado para el cobre, pero muestra una gran variación en la actividad como secuestrante del radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con respecto al TCand.



**Figura 15.** Determinación de la actividad SOD-símil para el TCand (negro), CuTCand (rojo) y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

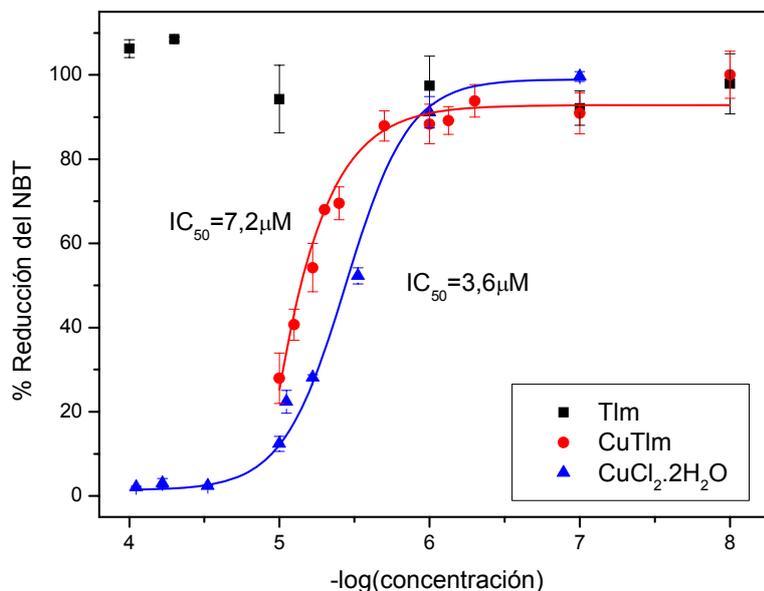
Cuando se estudió la actividad SOD símil que tenía el Cand y el CuCand (**Fig. 16**), se encontró que el Cand presenta una ligera actividad SOD símil. A una concentración de 100 $\mu\text{M}$  secuestra un 20% de los radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y es, de los sartanes estudiados, el que mayor actividad frente a estos radicales muestra. Por otro lado, su complejo de cobre(II), el CuCand, exhibe un  $\text{IC}_{50}=5,5 \mu\text{M}$ , lo que demuestra, en este caso también, una mejora de la actividad SOD símil cuando se lo compara con el sartán que le dio origen, evidenciando nuevamente un efecto sinérgico por formación del complejo con cobre.

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Determinación de la actividad SOD símil



**Figura 16.** Determinación de la actividad SOD-símil para el Cand (negro), CuCand (rojo) y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

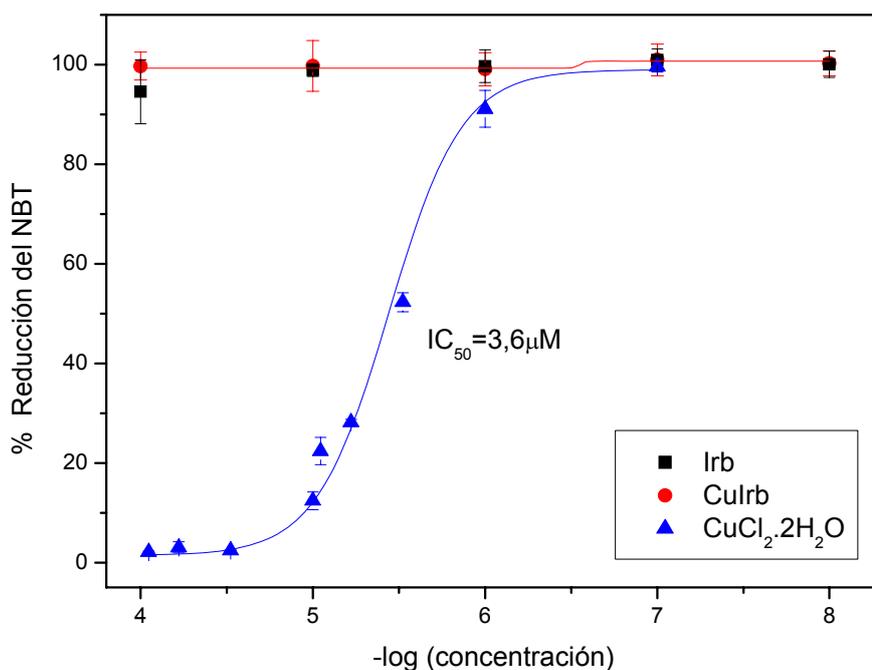
Al determinar la capacidad para secuestrar radicales superóxido para el TIm y el CuTIm (**Fig. 17**), se encontró que el TIm no presenta actividad en concentraciones hasta 100 μM. Por el contrario, el CuTIm se comporta como un compuesto SOD mimético, observándose un IC<sub>50</sub>=7,2 μM. Esto muestra una vez más que las propiedades antioxidantes del ligando mejoran debido a la complejación.



**Figura 17.** Determinación de la actividad SOD-símil para el TIm (negro), CuTIm (rojo) y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Determinación de la actividad SOD símil

Por último, también se determinó la actividad SOD símil para el Irb su complejo, el Culrb (**Fig. 18**). Para el ligando, se encontró que, al igual que los sartanes anteriores, no presenta actividad SOD símil. Sin embargo, a diferencia de los anteriores complejos de cobre(II), el Culrb tampoco muestra actividad SOD símil en las concentraciones testeadas (hasta 100  $\mu\text{M}$ ). Por lo que en este caso, la complejación con cobre(II) no genera diferencias en la capacidad para secuestrar radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



**Figura 18.** Determinación de la actividad SOD-símil para el Irb (negro), Culrb (rojo) y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

De lo determinado anteriormente, se puede concluir que los sartanes TCand, Cand, TIm e Irb no presentan actividad SOD símil, siendo de este grupo el Cand el de mayor actividad ya que inhibe un 20% la reducción del NBT a 100  $\mu\text{M}$ . Los complejos de cobre(II), con excepción del Culrb, muestran un aumento en la capacidad para secuestrar radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con respecto a sus ligandos de origen. Los valores obtenidos de IC<sub>50</sub> para el CuTCand, CuCand, CuTIm resultaron ser mayores que el valor obtenido para la SOD bovina, lo que indica que se tratan de compuestos con menor capacidad secuestrante que la enzima. Sin embargo, estos valores también muestran que la complejación mejora notoriamente la actividad del ligando de origen, cuyo IC<sub>50</sub> no pudo ser determinado.

Por otro lado, debido a que la actividad SOD de los agentes miméticos potenciales puede evaluarse a través de una gran variedad de métodos empleando tanto ensayos directos como indirectos, resulta muy dificultosa la comparación de los resultados obtenidos con los valores reportados en la bibliografía. Los valores de IC<sub>50</sub> dependen del reactivo que se utiliza, del detector (en este caso NBT) y de su concentración. Es por este motivo que el valor de IC<sub>50</sub> no es apropiado para realizar comparaciones con los datos de

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Determinación de la actividad SOD símil

literatura ya que dicho valor es menor a medida que disminuye la concentración de detector. Para valores de  $IC_{50}$  es posible calcular el valor de constante cinética (K) que es independiente tanto de la naturaleza del detector como de su concentración<sup>193</sup>. Esta constante es, para el caso del NBT,  $K_{NBT} = 5,94 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ <sup>194</sup>. Sabiendo además que la concentración utilizada para el detector es 300  $\mu M$ , se calculan los valores de K para los distintos ligandos y sus complejos de cobre(II) a partir de la siguiente fórmula:

$$K = K_{NBT} \times [NBT] / IC_{50}$$

En la **tabla 1** se resumen los valores obtenidos para los  $IC_{50}$  y K. En algunos casos, debido a la insolubilidad de los compuestos a alta concentraciones en el medio de reacción, no fue posible determinar un valor puntual y para el caso del  $IC_{50}$  solo se informa un rango en el que se encuentra el valor (mayor a la máxima concentración testeada). En estos casos en los que falta de un valor determinado de  $IC_{50}$ , no se pudo calcular la constante cinética. Los valores obtenidos de K se grafican en la **figura 19**, en la que se observa que el CuTCand, CuCand, CuTIm y  $CuCl_2$  (Cu(II)) tienen una constante cerca de 20 veces menor que la SOD bovina, lo que indica una capacidad menor para secuestrar los radicales  $O_2^{\bullet+}$  que la enzima, aunque mayor al sartán de origen. Entre ellos, el cobre(II) es el de mayor constante, con un valor experimental obtenido ( $4,9 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ ) similar al valor reportado en la bibliografía ( $2,7 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ )<sup>191</sup>. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, su determinación puede ser errónea dado que el Cu(II) puede oxidar al producto de la reacción del NBT. En valor de constante decreciente, luego del cobre(II), le siguen el CuTCand, CuCand, y en último lugar el CuTIm, que es el que muestra menor constante y por lo tanto una menor actividad SOD símil. De todos modos, y de acuerdo con la clasificación de Roberts y Robinson<sup>195</sup> se puede clasificar los complejos de cobre(II) con sartanes como agentes SOD símil potentes dado que generan valores de  $IC_{50}$  menores a 20  $\mu M$ .

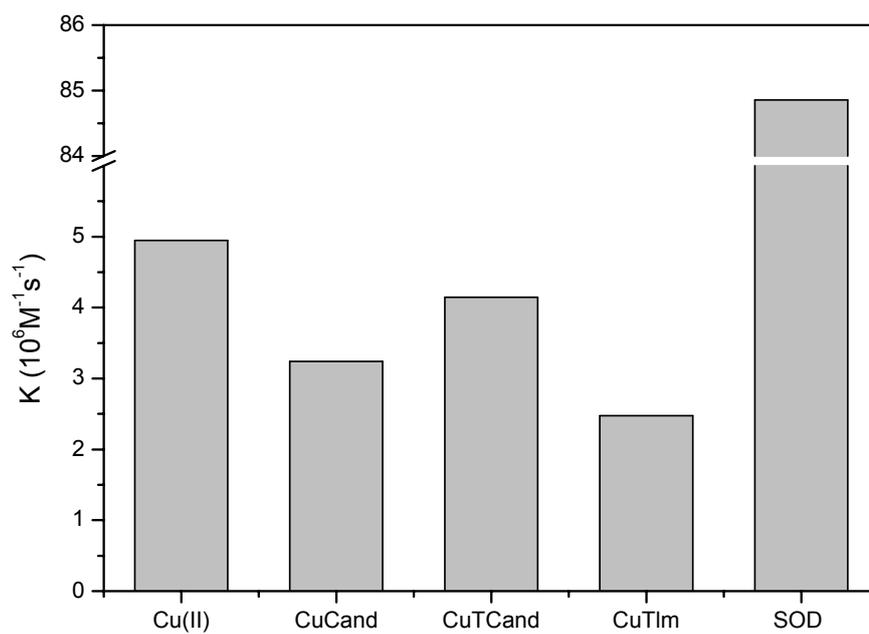
**Tabla 1.** Valores de  $IC_{50}$  y constantes cinéticas (K) para los distintos ligandos y sus complejos con cobre(II).

	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	K ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Cu	3,6	$4,9 \times 10^6$
TCand	>50*	#
CuTCand	4,3	$4,1 \times 10^6$
Cand	>100*	#
CuCand	5,5	$3,2 \times 10^6$
TIm	>100*	#
CuTIm	7,2	$2,5 \times 10^6$
Irb	>100*	#
Culrb	>100*	#
SOD	0,21 <sup>190</sup>	$8,5 \times 10^6$

\* $IC_{50}$  no determinado por la baja actividad SOD símil.

# No calculado.

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Determinación de la actividad SOD símil



**Figura 19.** Gráfico de barras representando los valores de las constantes cinéticas obtenidas para los compuestos con actividad SOD símil y su comparación con la enzima SOD bovina.

**1.3.5. RESUMEN DE LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES**

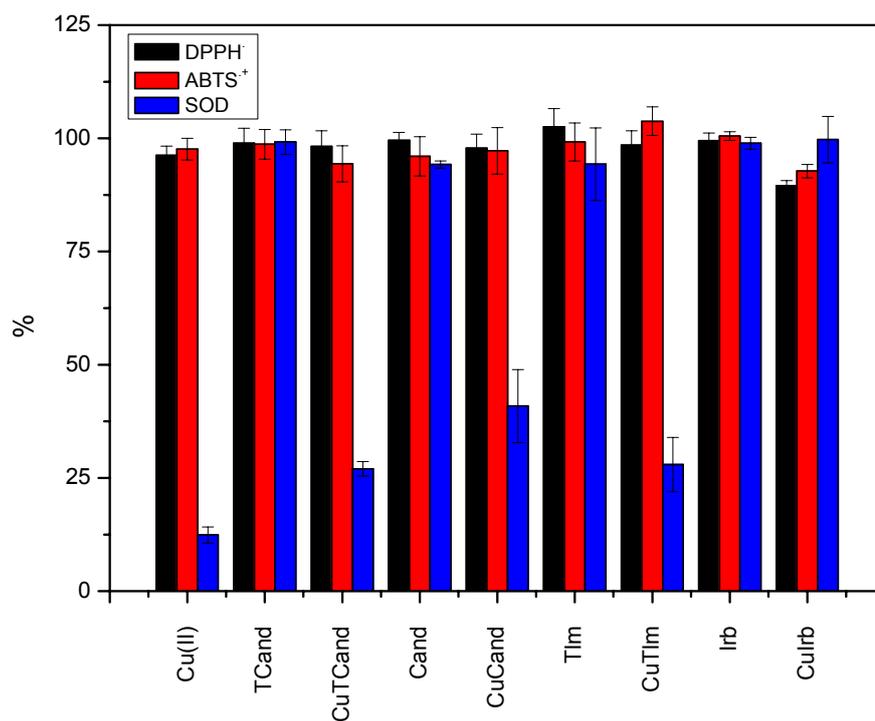
Los sartanes estudiados en este caso muestran nula o baja actividad antioxidante frente a los radicales ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La complejación con cobre(II) mejora en muchos de los casos la capacidad para secuestrar estos radicales. La diferencia más notable ocurre en la determinación de la actividad SOD similar (frente a los radicales O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Un resumen de los resultados obtenidos a partir de las medidas antioxidantes se muestra en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Resumen de las actividades de los compuestos frente a los diferentes radicales testeados.

Compuesto	DPPH <sup>•</sup> (500 μM)	ABTS <sup>•+</sup> (100 μM)	SOD similar (IC <sub>50</sub> , μM)	ROO <sup>•</sup> (TEAC)
Cu(II)	95,04	95,18	3,6	No realizado
TCand	101,25	98,36	>50	≅0
CuTCand	94,4	101,89	4,3	0,40
Cand	94,05	95,08	>100	≅0
CuCand	93,27	92,72	5,5	≅0
TIm	103,87	102,35	>100	≅0
CuTIm	79,57	101,68	7,2	≅0
Irb	92,77	94,74	>100	≅0
Culrb	45,05	92,02	>100	≅0

Debido a las características del medio de reacción, la concentración máxima de cada compuesto que se midió en los diferentes ensayos fue diferente. Para el caso de los radicales DPPH<sup>•</sup> se pudo estudiar la capacidad secuestrante en concentraciones hasta 500 μM, mientras que para la técnica de ABTS<sup>•+</sup> solo se pudo llegar hasta 100 μM a causa de la poca solubilidad de los compuestos bajo las condiciones experimentales del método, lo que impidió realizar medidas a mayor concentración. Algo similar ocurrió para el caso de la determinación de la actividad SOD similar, en ese ensayo, las concentraciones máximas estuvieron en el rango de 50-100 μM. Es por esta razón que, con el fin de realizar una comparación gráfica de la reactividad de los compuestos testeados frente a los distintos radicales, se eligió una concentración de 50 μM para realizar un gráfico del porcentaje de reducción del radical seleccionado en función de los distintos compuestos (**Fig. 20**). En este gráfico de la **figura 20** se excluye la actividad frente al radical ROO<sup>•</sup> debido a que el único compuesto que tiene actividad es el CuTCand.

### 1.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Resumen de las capacidades antioxidantes

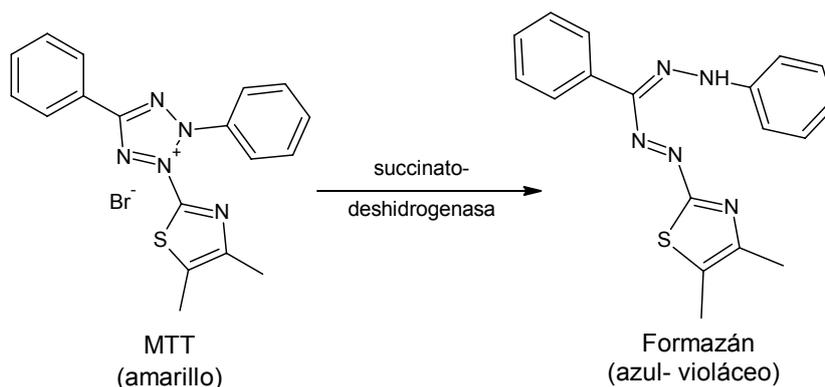


**Figura 20.** Porcentaje de radical secuestrado en función del compuesto a una concentración 50  $\mu\text{M}$ . Radical DPPH• (negro), ABTS•+ (rojo) y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (azul).

## 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 1.4.1. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA: ENSAYO DE MTT

Este ensayo permite medir la supervivencia y la proliferación celular. Está basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado azul-violáceo (formazán) (**Esquema 1**), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Para que ocurra la reacción la célula tiene que ser metabólicamente activa, en caso contrario no ocurrirá la reducción. De esta manera, la cantidad de células vivas es proporcional a la coloración del formazán producido.



**Esquema 1.** Reacción de reducción del MTT realizada por la enzima succinato deshidrogenasa para convertirlo en formazán.

Se realizó el ensayo de MTT utilizando tres líneas celulares de cáncer de próstata en diferentes estadios. Las LNCaP, que son las menos agresivas, andrógeno dependientes, derivadas de un nódulo linfático, y las PC3 y las DU145, ambas andrógeno independientes, en un estadio más avanzado del cáncer, derivadas de metástasis en hueso y cerebro respectivamente. En todas las líneas, se estudió el efecto del candesartán, telmisartán e irbesartán, así como también de sus complejos de cobre(II): CuCand, CuTlm y Culrb, y de la sal CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en concentraciones crecientes desde 25 hasta 100 μM.

#### 1.4.1.1. Cobre(II) con candesartán (CandCu)

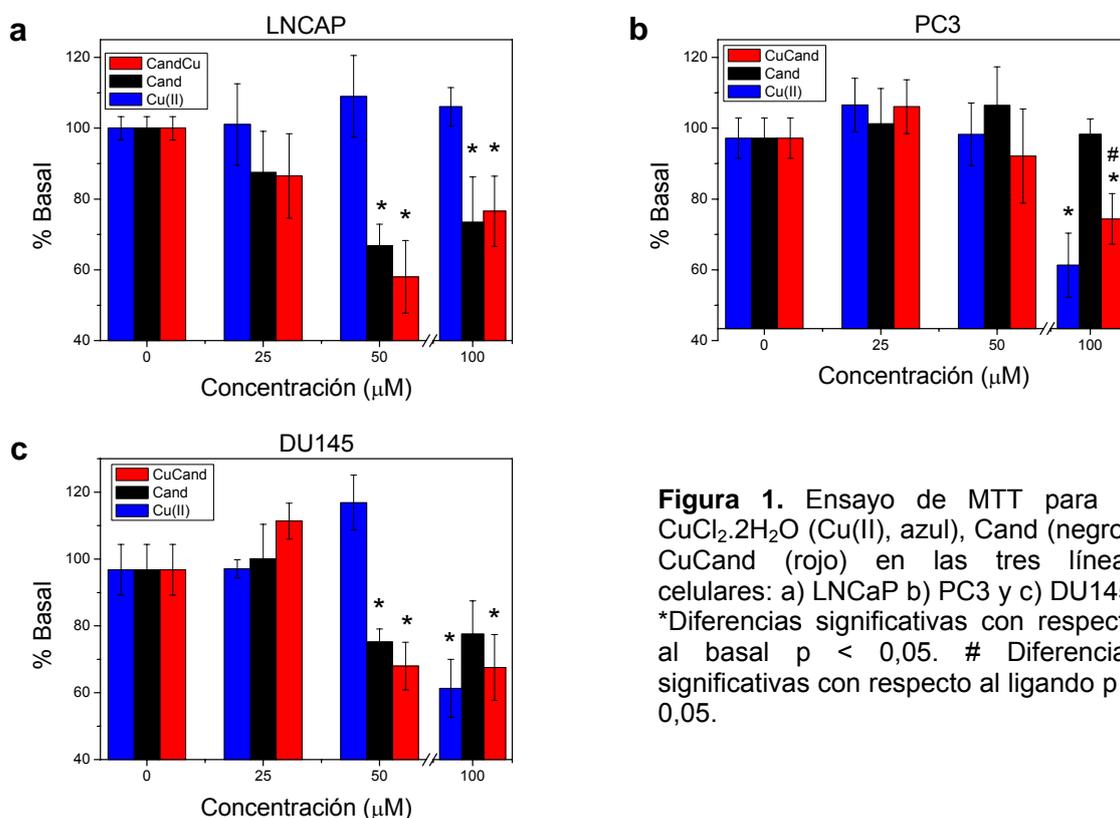
En la línea LNCaP, se observa, que a 100 μM, el efecto que producen Cand y CuCand en la disminución del metabolismo celular es aproximadamente del mismo orden de magnitud (un 27 y un 24 % respectivamente) mientras que a 50 μM el efecto demostrado por CuCand (42

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antiproliferativa: Ensayo de MTT

%) es superior respecto del del ligando (33 %). El cobre(II) por su parte no muestra una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular en esta línea en ninguna de las concentraciones ensayadas (**Fig. 1a**).

Por otro lado, en la línea celular PC3, el Cu(II) disminuye la viabilidad significativamente en un 39 % para la concentración máxima testeada mientras que el Cand no presenta una variación de su capacidad metabólica en ninguna de las concentraciones ensayadas. El CuCand por su parte, presenta el mayor efecto a 100  $\mu$ M mostrando una disminución de un 26 % siendo este valor diferente al del Cand desde el punto de vista estadístico (**Fig. 1b**).

En la línea celular DU145, se genera una disminución en el metabolismo celular cuando se lo trata con 100  $\mu$ M de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , CuCand y Cand de un 39, 23 y 13 % respectivamente, no siendo esta diferencia con respecto al control significativa desde el punto de vista estadístico para el candesartán (**Fig. 1c**).



**Figura 1.** Ensayo de MTT para el  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Cu(II), azul), Cand (negro), CuCand (rojo) en las tres líneas celulares: a) LNCaP b) PC3 y c) DU145. \*Diferencias significativas con respecto al basal  $p < 0,05$ . # Diferencias significativas con respecto al ligando  $p < 0,05$ .

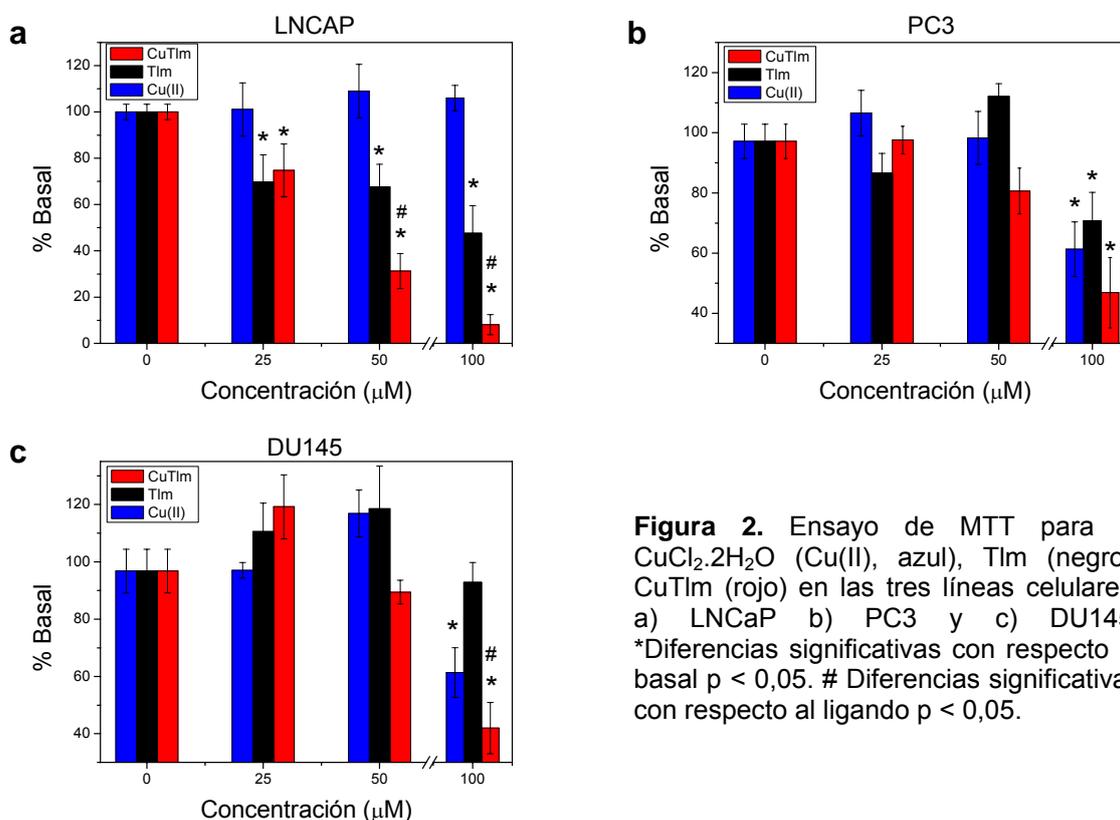
Con respecto a la citotoxicidad en las células de cáncer de próstata, se observa que el CuCand a 100  $\mu$ M disminuye la viabilidad celular de una manera similar para las tres líneas celulares (entre un 23 y un 26 %) mientras que el Cand tiene un comportamiento variable en las diferentes líneas. El Cu(II) por su parte, parece tener una mayor toxicidad en las líneas celulares andrógeno independientes como son las PC3 y las DU145. Debido a la complejación, el CuCand solo mejora significativamente la actividad antitumoral con respecto al Cand a 100  $\mu$ M en la línea PC3.

### 1.4.1.2. Cobre(II) con telmisartán (CuTIm)

Con la idea de evaluar el posible efecto antitumoral del telmisartán (TIm) y su derivado con cobre (CuTIm) se realizó el ensayo de MTT a diferentes concentraciones de compuesto (**Fig. 2**). En la línea LNCaP se observa tanto para el TIm como para el CuTIm una gran disminución de la viabilidad celular incluso a 25  $\mu\text{M}$  (**Fig. 2a**). El CuTIm es, de los compuestos testeados, el que presenta una mayor citotoxicidad en esta línea celular. A 100  $\mu\text{M}$  tiene un efecto deletéreo muy marcado ya que disminuye la actividad metabólica en un 92 % con respecto al basal. A esa misma concentración, el TIm disminuye solo un 52 %, mientras que el cobre(II) no tiene efectos. En este caso, el complejo se comporta como un mejor agente antitumoral que el TIm, tanto a 50 como a 100  $\mu\text{M}$ .

Para la línea celular PC3 se observa un efecto menos marcado que para las LNCaP, en este caso, solamente se observan diferencias significativas en los tres compuestos a 100  $\mu\text{M}$ , a esta concentración, la disminución de la viabilidad es de un 29 % para el TIm y de un 53 % para el CuTIm (**Fig. 2b**). Estas diferencias son significativas desde el punto de vista estadístico con respecto al basal, pero no lo son entre si.

En la línea celular DU145, se observa que el TIm no presenta diferencias significativas en las concentraciones testeadas. Sin embargo el CuTIm disminuye la viabilidad a 100  $\mu\text{M}$  en un 58 % con respecto al control (**Fig. 2c**). A esta concentración y al igual que en la línea LNCaP, el CuTIm se comporta como mejor agente antitumoral que el TIm.



**Figura 2.** Ensayo de MTT para el  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Cu(II), azul), TIm (negro), CuTIm (rojo) en las tres líneas celulares: a) LNCaP b) PC3 y c) DU145. \*Diferencias significativas con respecto al basal  $p < 0,05$ . # Diferencias significativas con respecto al ligando  $p < 0,05$ .

De lo visto anteriormente, se puede decir que el CuTIm disminuye notoriamente la viabilidad celular en las distintas líneas. El efecto más marcado se encuentra en las LNCaP, una línea andrógeno dependiente, mientras que en las demás líneas disminuye el metabolismo en más de un 50 % con respecto al basal. El TIm por su parte muestra diferencias significativas con respecto al control en las líneas LNCaP y PC3, mientras que en las DU145 que son las más agresivas de las tres líneas, no muestra efecto antitumoral. En general se puede concluir que el CuTIm aumenta la citotoxicidad con respecto al Cu(II) y al TIm en las tres líneas celulares de cáncer de próstata, aunque este aumento no sea significativo desde el punto de vista estadístico en las PC3, si lo es en las restantes dos líneas.

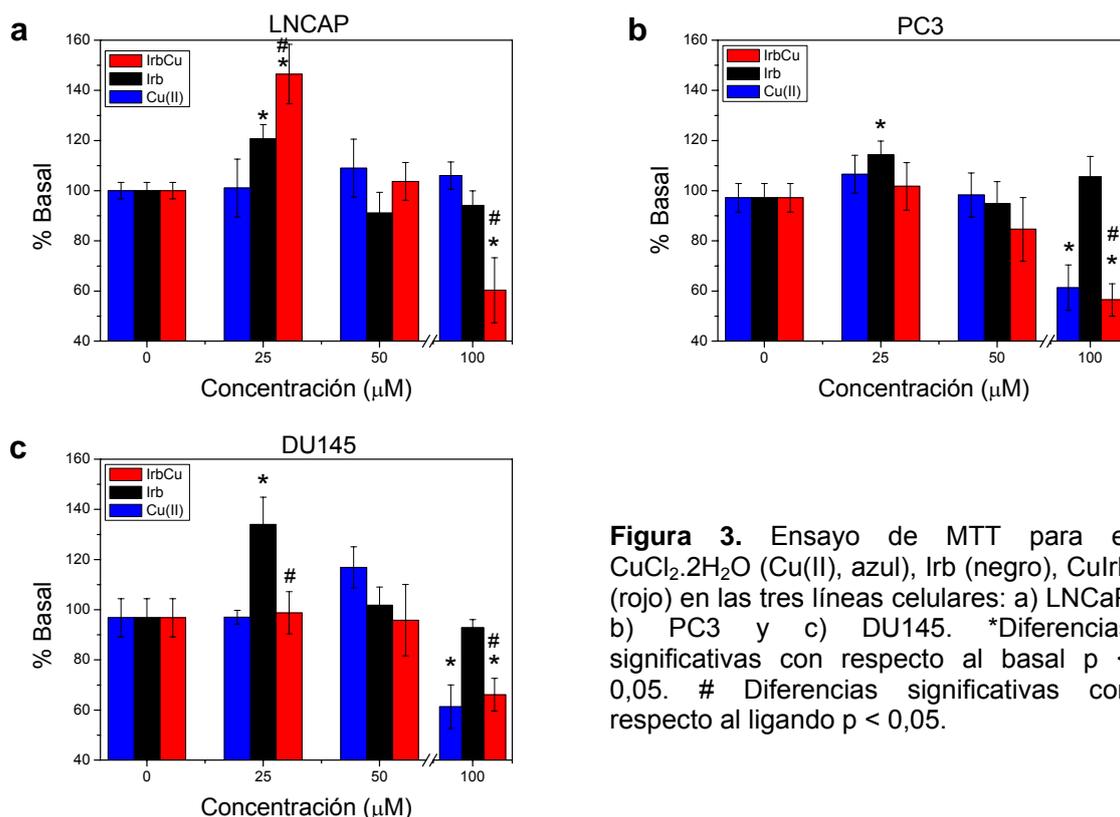
##### **1.4.1.3. Cobre(II) con irbesartán (Culrb)**

En el ensayo de viabilidad celular en LNCaP se observa para Culrb un comportamiento bifásico, ya que tiene efectos proliferativos a bajas concentraciones y efectos deletéreos a altas. A 25  $\mu\text{M}$ , hay un aumento de la viabilidad de un 46 % mientras que el Irb a la misma concentración aumenta en un 21 %. Sin embargo, a 100  $\mu\text{M}$ , el Culrb inhibe un 40 % la viabilidad celular según el ensayo de MTT. El Irb por su parte no muestra diferencias significativas con respecto al control en concentraciones distintas a 25  $\mu\text{M}$ . En esta línea celular, el Culrb mejora por complejación las propiedades antitumorales del Irb a altas concentraciones (**Fig. 3a**).

En el caso de las PC3, se observa para el IrbCu una disminución de la viabilidad en función de la concentración, siendo significativa solamente a 100  $\mu\text{M}$  donde inhibe un 44 % (**Fig. 3b**). El Irb por su parte muestra un efecto proliferativo a 25  $\mu\text{M}$ , con un aumento del 14 % con respecto al basal, mientras a 50 o 100  $\mu\text{M}$  que no se observan variaciones. En concentraciones altas (100  $\mu\text{M}$ ) se observa que el Culrb mejora significativamente las propiedades antitumorales del Irb en la línea PC3.

Por último, cuando se trata la línea celular DU145 con Irb se observa, al igual que los casos anteriores, un comportamiento proliferativo a concentraciones bajas mientras que a 50 y a 100  $\mu\text{M}$  no hay cambios significativos en la viabilidad celular con respecto al control (**Fig. 3c**). Por otro lado, el Culrb no muestra el comportamiento proliferativo en concentraciones bajas. Solamente muestra diferencias en una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en la que inhibe la viabilidad en un 34 %. El tratamiento de esta línea celular con Culrb a 100  $\mu\text{M}$  muestra una mejora en el efecto antitumoral del Irb debido a la complejación.

## 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antiproliferativa: Ensayo de MTT



Como conclusión, el Culrb inhibe la viabilidad celular en las tres líneas en concentraciones alrededor de 100  $\mu\text{M}$  mientras que el ligando no tiene efectos a esa concentración. El Irb estimula la proliferación celular en bajas concentraciones en las tres líneas, mostrando un aumento significativo a 25  $\mu\text{M}$  mientras que el Culrb solo muestra este efecto en las LNCaP (andrógeno dependientes). En las tres líneas también se observó que a 100  $\mu\text{M}$  el Culrb mejora significativamente las propiedades antitumorales del irbesartán debido a la complejación.

### 1.4.1.4. Resumen de la actividad antitumoral

De las medidas realizadas para medir la viabilidad celular mediante la técnica de MTT en tres líneas celulares de cáncer de próstata en diferentes estadios, se pueden realizar ciertas observaciones adicionales al comparar todos los compuestos testeados a una misma concentración (**Fig. 4**). En este caso, se eligió 100  $\mu\text{M}$  ya que es la concentración en la que mayor cantidad de diferencias estadísticamente significativas se encontraron.

Para el caso del cobre se observa que no tiene efectos en la línea LNCaP (una línea andrógeno dependiente, en un estadio inicial del cáncer de próstata) mientras que tiene un efecto moderado en las líneas PC3 y DU145, ambas andrógeno independientes y en un estadio más avanzado del cáncer.

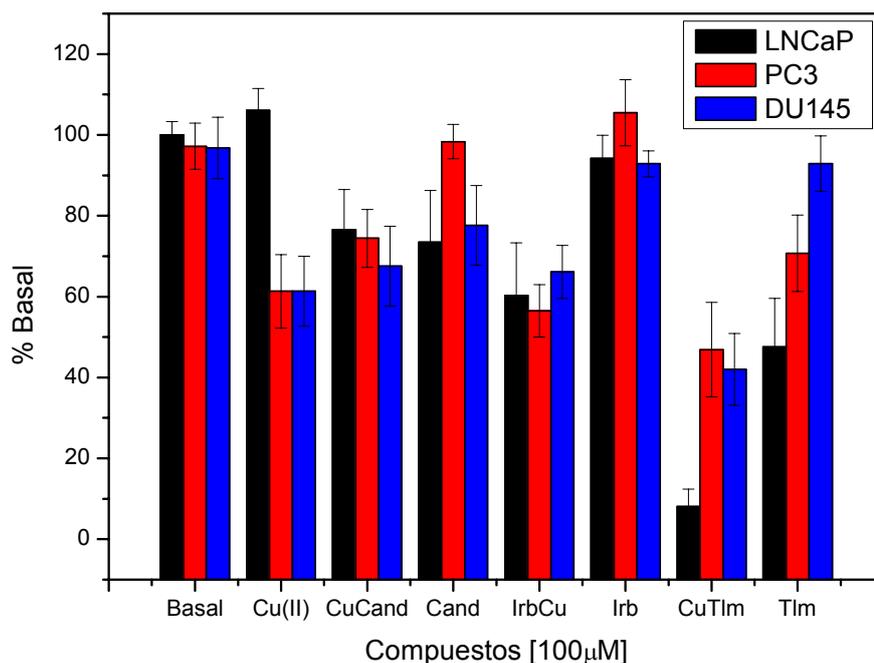
El CuCand por su parte muestra una disminución moderada del metabolismo celular con respecto al basal, aunque no tiene diferencias significativas entre las tres líneas. El Cand tiene un efecto según el ensayo de

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antiproliferativa: Ensayo de MTT

MTT entre moderado y leve. En las líneas LNCaP y DU145 hay una disminución moderada de la viabilidad celular, mientras que en las PC3 no hay cambios con respecto al basal.

Para el Culrb, al igual que para el complejo de CuCand, se observa una disminución moderada del metabolismo celular, en este caso tampoco hay diferencias significativas entre las tres líneas celulares. Sin embargo, si se lo compara con el Irb sin complejar, se observa claramente que hay diferencias en las tres líneas. El Irb no presenta variaciones con respecto al basal, mientras que el Culrb mejora por complejación la actividad antitumoral en células de cáncer de próstata de su ligando de origen.

Por último, el CuTIm es el compuesto testeado que muestra una mayor disminución del metabolismo celular en general en las tres líneas de cáncer de próstata. Dentro de las líneas, en LNCaP tiene un efecto mucho mayor que para las dos líneas andrógeno independientes. El TIm muestra en líneas generales una citotoxicidad menor que el complejo cuando se compara cada línea entre sí. En este caso también puede decirse que la complejación con cobre(II) mejora la actividad antitumoral del ligando.



**Figura 4.** Ensayo de MTT en las tres líneas celulares: LNCaP (negro), PC3 (rojo) y DU145 (azul) para el control y todos los compuestos testeados en una concentración de 100 μM.

### **1.4.2. CICLO CELULAR**

La citometría de flujo es una técnica que se basa en la utilización de un láser para efectuar el recuento y la clasificación de las células según sus características morfológicas y/o en presencia de marcadores, como el yoduro de propidio (IP).

El IP es un agente intercalante de las moléculas de ADN, siendo también una molécula fluorescente que se utiliza como fluorocromo para teñir las células. El citómetro posteriormente cuantifica la intensidad de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de fluorocromo, y este a su vez a la cantidad de ADN en la célula.

El IP no puede atravesar las membranas celulares, por lo que para la técnica empleada en este caso, se permeabilizó previamente la membrana, utilizando un detergente, para permitir la tinción no solo de los fragmentos, sino también del ADN de las células en los distintos estadios del ciclo celular.

Brevemente, el ciclo celular consta de 4 fases en las que el contenido de ADN de cada célula varía. En este caso utilizamos células humanas, diploides (con número doble de cromosomas ( $2n$ )), derivadas de cáncer de próstata. El contenido de ADN en estas células se dice que es  $2c$ , debido a que tiene el doble de contenido de ADN que las gametas, durante el ciclo celular, este valor de  $2c$  se duplica hasta llegar a  $4c$ . Mediante un histograma, en el que se grafica contenido de ADN en función de la cantidad de células o fragmentos, se pueden observar la poblaciones en las distintas fases celulares (**Esquema 2**).

- **Fase G1:** Ocurre el crecimiento celular acompañado de la síntesis de proteínas y ARN. En cuanto a la carga genética, es  $2n\ 2c$ . Existe dentro de esta fase, un estado  $G_0$ , especial de reposo en el que las células no se disponen a dividirse y por lo tanto, no sintetizan proteínas. Tanto la fase  $G_0$  como la  $G_1$  tienen el mismo contenido de ADN, por lo tanto, se observan juntas en el histograma como el pico principal en condiciones normales.

- **Fase S:** Se produce la replicación o síntesis de ADN, donde cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. En el histograma es una región donde la célula tiene contenido de ADN variable entre  $2n\ 2c$  y  $2n\ 4c$ .

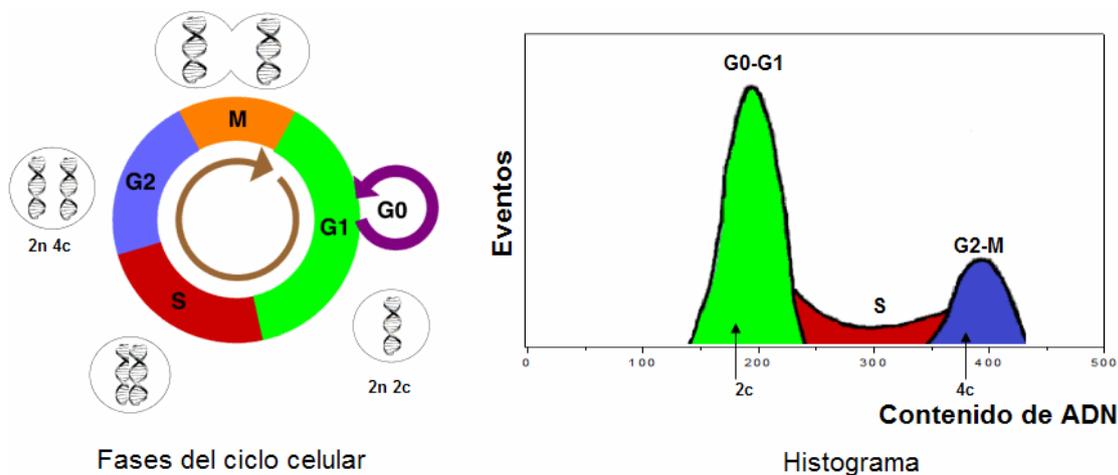
- **Fase G2:** Se continúa con la síntesis de proteínas y ARN. La carga genética es  $2n\ 4c$  ya que se ha duplicado el material genético.

- **Fase M:** Ocurre la división celular, se divide en dos células hijas idénticas, cada una con carga genética  $2n\ 2c$ . La fase  $G_2$  junto con la fase  $M$  se observa en el histograma como un pico con contenido de ADN igual a  $2n\ 4c$ .

Dentro del histograma, la presencia de un pico sub  $G_1$  es indicativo de contenido de ADN menor a  $2c$ , es decir, fragmentos. Por lo general, la necrosis genera pequeñas fracciones celulares y de ADN, mientras que en la apoptosis, al ser una muerte celular programada y con un mayor orden, los fragmentos suelen ser de un mayor tamaño. Este método, utilizando solamente yoduro de propidio en células permeabilizadas permite, luego de descartar los fragmentos

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Ciclo celular

ADN de tamaño muy pequeño, sugerir la apoptosis mientras que una tinción conjunta con Anexina V permitiría su confirmación.



**Esquema 2.** Fases del ciclo celular con su contenido de ADN e histograma tipo observado por citometría de flujo con tinción de IP.

Se realizó el ensayo de ciclo celular para los mismos compuestos y líneas celulares que en el ensayo de MTT. Se testeó el efecto del Cand, TIm, Irb y los complejos CuCand, CuIrb, CuTIm y de la sal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en concentraciones de  $50 \mu\text{M}$  en las líneas LNCaP, PC3 y DU145.

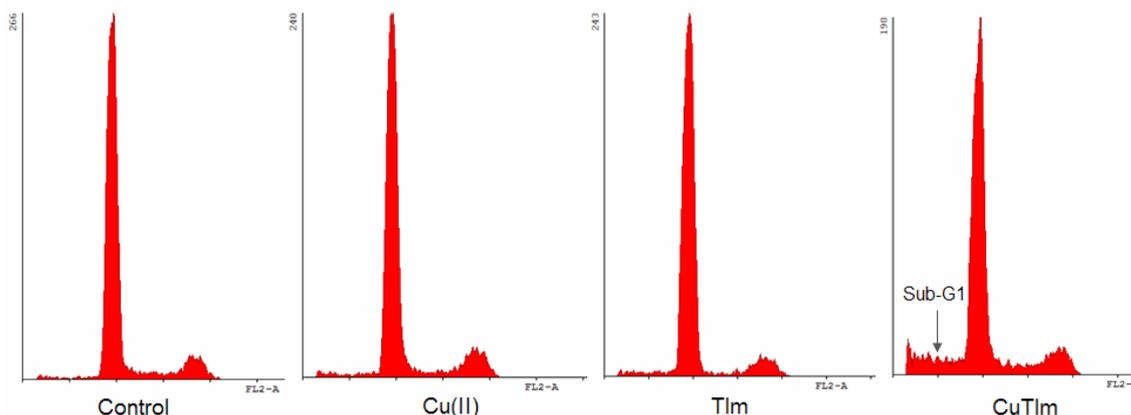
La concentración de trabajo ( $50 \mu\text{M}$ ) se seleccionó en base a la viabilidad observada en el ensayo de MTT. A esta concentración no se observa una gran disminución de la viabilidad celular por lo que, si se desea estudiar la manera en que los compuestos afectan el ciclo celular, en principio es necesario que la célula esté en condiciones metabólicas activas.

Por acción de los compuestos puede ocurrir que la célula se detenga en alguna de las fases del ciclo, sin poder continuar con el proceso de división. Este proceso es conocido como arresto del ciclo celular y se observaría como una variación en la relación del tamaño de los picos del histograma.

En nuestro caso, no se observó para ninguno de los compuestos testeados arresto celular para una concentración de  $50 \mu\text{M}$  (no mostrados). Dentro de los cambios que se ven respecto a un histograma normal es la aparición, en algunos casos, de un aumento en la población en la región sub-G1 y que es indicativo de muerte celular.

En particular, en este tipo de aumento de la población en la región sub-G1 se observa para el caso del CuTIm en la línea celular LNCaP (**Fig. 5**) el porcentaje de la población en esta región es de un 12,1 % para el complejo, y difiere significativamente con los valores para TIm (3,8 %) y para el Cu (4,5 %) (valores obtenidos por promedio de 3 ensayos diferentes). Por otro lado, para las líneas PC3 y DU145 no se observa la aparición de un pico en la región sub-G1 para ninguno de los compuestos testeados.

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Ciclo celular



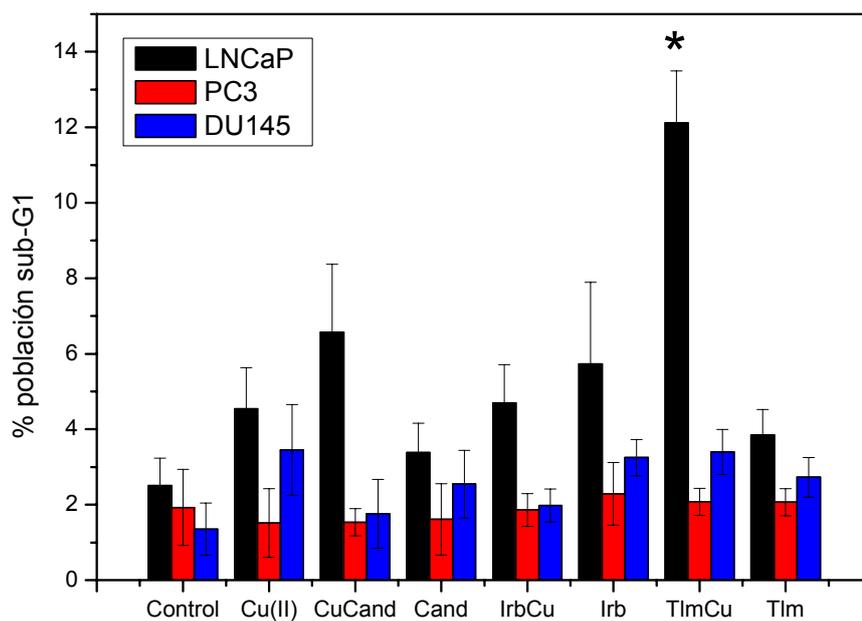
**Figura 5.** Histograma para células LNCaP teñidas con ioduro de propidio sin tratamiento (Control) y luego de 24 hs de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Cu(II)), TIm, CuTIm. Los fragmentos de ADN de bajo peso molecular fueron excluidos del histograma. Al menos 10000 eventos fueron colectados.

A partir de los histogramas obtenidos por citometría de flujo, al igual que para el caso del CuTIm se calculó mediante un software el porcentaje de población en cada estadio con respecto al total. En la **figura 6** se muestra el porcentaje de células en un estadio sub-G1 para todos los compuestos en las tres líneas celulares. En este gráfico se puede observar que las líneas DU145 y PC3 no muestran un aumento significativo de la población en la región sub-G1 con respecto al control, mientras que en la línea celular LNCaP, este porcentaje es mayor en relación a las otras líneas, esto puede deberse a que las LNCaP es una línea celular andrógeno dependiente, en un estadio inicial del cáncer y por lo tanto pueden ser más sensibles al tratamiento con los distintos compuestos. Dentro de esta línea celular, se observa que el CuTIm provoca el mayor aumento de la población sub-G1 de los compuestos testeados, el CuCand también aumenta con respecto al control. Sin embargo, no muestra diferencias significativas con respecto al Cand.

Por otra parte, si se observa este ensayo de ciclo celular en conjunto con el ensayo de MTT descrito anteriormente, para la línea celular LNCaP a 50  $\mu\text{M}$ , se puede ver que para el caso del CuTIm que la disminución de la actividad metabólica, según el ensayo de MTT, se corresponde con un aumento en la muerte celular. Para este complejo en particular, se propone un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis, que se sugiere a partir del tamaño de los fragmentos de ADN en la región sub-G1. Al igual que para el CuTIm, el CuCand muestra una disminución de la actividad metabólica en MTT, acompañado de un aumento de la población sub-G1, aunque en menor medida que el complejo anterior.

Si bien para Culrb se observa disminución de viabilidad celular a 100  $\mu\text{M}$ , los ensayos de citometría de flujo se realizaron a una concentración donde no se observa un marcado efecto antitumoral (50  $\mu\text{M}$ ) y por eso no se alcanza a ver un aumento de la muerte celular por la técnica de citometría de flujo.

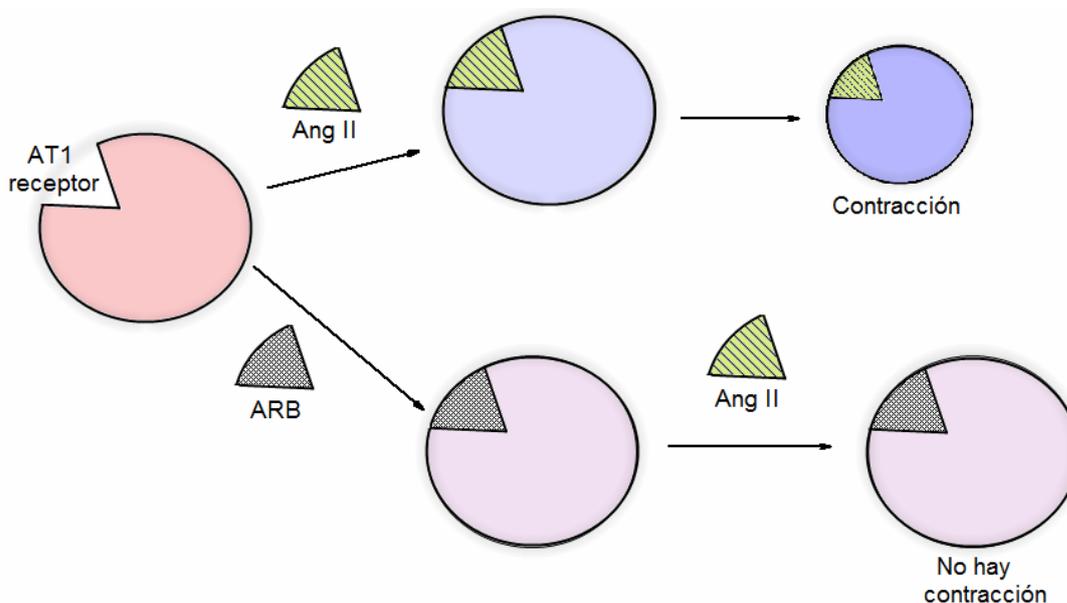
#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Ciclo celular



**Figura 6.** Porcentaje de la población en la región sub-G1 para los compuestos testados con una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , en las tres líneas celulares de cáncer de próstata: LNCaP (negro), PC3 (rojo) y DU145 (azul). \*Diferencias significativas con respecto al ligando ( $p < 0,05$ ).

### **1.4.3. ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA (CONTRACCIÓN CELULAR)**

Según lo desarrollado en la **sección 1.1.1.2.1**; cuando la angiotensina II (Ang II) se une al receptor  $AT_1$  (receptor tipo 1 de la angiotensina) se activan mecanismos dentro de la célula que desencadenan en la contracción celular. Los sartanes se encuentran dentro del grupo de los ARB (bloqueadores del receptor de la angiotensina II) se denominan así, debido a que se unen al receptor  $AT_1$  y luego de esta unión, no se desencadena la contracción celular. La unión entre el ARB y el receptor  $AT_1$  es más estable que la originada por la unión de la Ang II, por esta razón, una vez que el receptor  $AT_1$  se encuentra bloqueado por el ARB, la Ang II no puede unirse a la célula y por lo tanto, ésta no se contrae (**Esquema 3**).



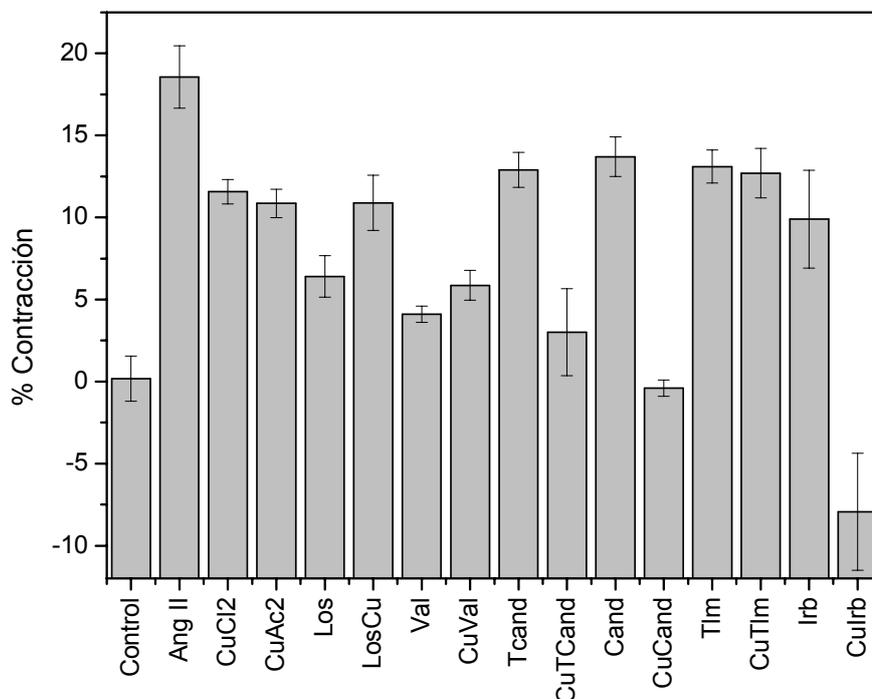
**Esquema 3.** Unión de la Ang II o de un ARB al receptor  $AT_1$  y su efecto en la contracción celular

Para poder estudiar el efecto en la contracción debido a complejación de los sartanes con cobre(II), en comparación con la actividad de los sartanes (ARB) sin complejar, se llevó a cabo el ensayo de contracción celular. Para tal fin, se utilizaron células mesangiales humanas (CMH) que fueron pretratadas con los compuestos durante 30 min y luego se les agregó Ang II en una concentración de  $10^{-6}$  M. Utilizando un microscopio se tomaron dos fotografías, una a tiempo cero y la otra luego de 30 min del agregado de la Ang II. Utilizando un software apropiado, se midieron los cambios en el área superficial planar celular (PCSA) para una misma célula en las dos fotografías. Este procedimiento se repitió con entre 6 y 9 células por fotografía, y el experimento fue realizado por triplicado. Para cada experimento se realizaron controles, a los cuales no se les realizó ningún pretratamiento con los compuestos. Al control positivo se le adicionó Ang II, mientras que al control negativo no, luego se calcularon los cambios en la PCSA de la manera anteriormente descrita.

En particular, se estudió el efecto del trítel candesartán (TCand), candesartan (Cand), telmisartan (TIm) e irbesartan (Irb), de sus respectivos

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antihipertensiva (contracción celular)

complejos con cobre(II); CuTCand, CuCand, CuTIm y Culrb, y de la sal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Además de los complejos sintetizados en el presente trabajo de tesis, se amplió la serie con los complejos obtenidos previamente con losartán (Los) y valsartán (Val):  $\text{LosCu}^{136}$  y  $\text{CuVals}^{137}$ , y la sal de cobre a partir de la cual se sintetizaron:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Para todos los compuestos la concentración utilizada fue  $10^{-8}$  M (Fig. 7).



**Figura 7.** Porcentaje de reducción del área superficial planar celular con respecto al control cuando se trata con Ang II ( $10^{-6}$  M) luego de la incubación previa de las células con los diferentes compuestos ( $10^{-8}$  M) durante 15 min. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

El control negativo no presenta variaciones en el área superficial celular, como consecuencia, el porcentaje de contracción es de 0 %. Para el control positivo, al que se le realizó solamente el agregado de Ang II, se observa la máxima contracción con un valor promedio de 18,6 %. Las dos sales de cobre, generan una contracción similar, siendo 11,6 % y 10,9 % para el  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  respectivamente.

Si tenemos en cuenta al losartán y su complejo de cobre(II), se observa que el sartán sin complejar tiene un efecto mayor, ya que la contracción es de un 6,4 %, mientras que el LosCu tiene una mayor contracción por efecto de la Ang II de un 10,9 % y por lo tanto no mejora las propiedades del fármaco en este ensayo.

El valsartán y el CuVals, tienen un comportamiento similar al caso anterior, ya que por complejación con cobre(II), no se mejoran las propiedades como bloqueantes del sartán. Para el Vals la contracción es de un 4,1 % mientras que para el CuVals es de un 5,9 % estos valores sin embargo, no son diferentes desde el punto de vista estadístico.

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antihipertensiva (contracción celular)

Para el profármaco tritil candesartán, a diferencia de los dos casos anteriores, se observa una mejora importante debido a la complejación. El TCand seguido del tratamiento con Ang II produce una contracción del 12,9 % sin embargo, el CuTCand disminuye este valor, contrayendo solo un 3,0 % con respecto al basal, esta diferencia estadísticamente significativa muestra para el caso del complejo una capacidad para inhibir la contracción de cerca de cuatro veces la capacidad del ligando.

Por otro lado, las células pretratadas con el fármaco candesartán, se contraen un 13,7 % luego del agregado de Ang II, similar a su profármaco el tritil candesartán. El efecto obtenido por complejación con cobre(II) disminuye, al igual que el caso anterior, la contracción, siendo en este caso 0,4 %, sin diferencias significativas con respecto al control negativo en el que no se agregó Ang II. Este valor indicaría que el CuCand está bloqueando el receptor AT<sub>1</sub> de una manera más eficiente que el sartan sin complejar ya que el agregado posterior de Ang II no provoca contracción celular.

La variación de la contracción celular para el telmisartán es muy parecida, en valor a su complejo el CuTIm y sin diferencias estadísticamente significativas, siendo 13,1 % para el primero y 12,7 % para el segundo. Esto indica que no se producen cambios en la estructura del ligando que mejoren la afinidad por el sitio activo.

Por su parte, las células pretratadas con irbesartán tiene una contracción luego del agregado con Ang II de un 9,9 %, pero, llamativamente su complejo de cobre, el Culrb presenta un valor de -7,9 %. Este valor, menor que el control negativo (0 %) y se debe a que el área superficial celular medida a los 30 min es mayor que la inicial a t=0 min, por lo que en lugar de ocurrir una contracción, está ocurriendo una dilatación.

Como conclusión de las propiedades contráctiles, se observa que los complejos mononucleares Culrb y CuCand mejoran notoriamente las propiedades del sartán de origen. A diferencia de los complejos octanucleares y binucleares CuTIm, LosCu, y CuVals que no solo no mejoran, sino que en el caso del complejo con losartán, las propiedades bloqueantes del fármaco disminuyen por complejación. Una excepción de esto es el complejo binuclear de CuTCand que mejora las propiedades del TCand aunque sin ser tan notorio como para los complejos mononucleares. Este ligando, no obstante, no se usa como fármaco activo sino como intermediario de la síntesis del candesartán. De todos modos, el complejo CuTIm mantiene la propiedad antihipertensiva del telmisartán y además posee propiedades antitumorales y antimicrobianas como se discutirá más adelante.

De acuerdo a lo mencionado en la **sección 1.1.1.3.1.2**, cuando un ARB se une al receptor de la Ang II la molécula se curva exponiendo las partes hidrofóbicas que entran en contacto con el receptor, y cerrándose sobre sus partes polares. Los complejos quelatos del Culrb y CuCand favorecen estas conformaciones por lo que es probable que se deba a esto su mayor capacidad como bloqueante.

**1.4.4. MEDIDAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

El cobre es un metal conocido desde la antigüedad por sus propiedades antimicrobianas<sup>196</sup>. Es por eso que se han evaluado las propiedades tanto de este metal, como de distintos complejos de coordinación con cobre frente a diversos patógenos. Varios complejos de cobre(II) mejoraron la actividad del ligando debido a la complejación<sup>197</sup>. Por otro lado, teniendo en cuenta que algunas enfermedades coronarias son causadas por agentes microbianos (ej. endocarditis infecciosa causada por *Staphylococcus aureus*) la combinación de un antimicrobiano con un fármaco antihipertensivo podría ser de suma utilidad en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos<sup>198</sup>.

Basándonos en la idea de que la complejación de sartanes con algunos elementos de transición pueden ser una estrategia promisoriosa para el desarrollo de nuevos agentes antihipertensivos que mejoren las propiedades antimicrobianas, se propuso evaluar y comparar las actividades antimicrobianas de los ligandos Cand, TCand, TIm e Irb, los complejos de cobre(II) (CuCand, CuTCand, CuTIm y Culrb) y la sal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el ensayo de la mínima concentración inhibitoria (CIM) en el que se compararon las placas que contenían las soluciones a testear en diferentes concentraciones con placas en las que se observaba el crecimiento microbiano (control positivo). Las CIMs se definieron como la menor concentración del complejo (en  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) que inhibe el crecimiento visible del organismo testeado. Estos efectos se testearon en cinco cepas de bacterias derivadas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*. Por el lado de la actividad antifúngica, las CIMs se evaluaron en tres cepas de hongos (*Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida albicans*). Las concentraciones de compuestos testeados estuvieron en el rango comprendido entre 2,93  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Debemos tener en cuenta que está establecido que la actividad antibacteriana se considera significativa cuando los valores de CIM son de 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  o menores. Cuando la CIM está en el rango de 100 a 500  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  la actividad antibacteriana se considera moderada, cuando la CIM están entre 500 a 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  se considera débil, y cuando la CIM es de 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  se considera inactivo<sup>199,200</sup>. Los valores de CIMs obtenidos se muestran en la

**Tabla 3.**

**Tabla 3.** Mínima concentración inhibitoria (CIM, en  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) para el metal  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , los ligandos Cand, TCand, TIm e Irb, y los complejos CuCand, CuTCand, CuTIm y Culrb en distintas cepas microbianas.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	375	375	375	375	375	>1500	>1500	>1500
Cand	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	1500	>1500	>1500
CuCand	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	1500	1500	>1500
TCand	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500
CuTCand	>1500	>1500	>1500	>1500	>1500	1500	1500	>1500
Irb	>1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Culrb	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
TIm	>1500	>1500	750	93,75	750	750	1500	750
CuTIm	>1500	1500	1500	187,5	750	750	1500	750

#### 1.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: Actividad antimicrobiana

En la **Tabla 3** puede observarse que el cobre(II) muestra actividad antibacteriana pero no antifúngica, como es de esperar de acuerdo al uso del cobre desde la antigüedad como un excelente antibiótico natural. Los valores de CIMs obtenidos se encuentran de acuerdo con los reportados en la bibliografía para algunas de las cepas de hongos y bacterias<sup>189,201-205</sup>.

Con respecto a los sartanes y los complejos de cobre(II), se observa que en su mayoría no presentan actividad antimicrobiana, con excepción del TIm y del CuTIm. Estos últimos, si bien no tienen actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. tropicalis*, muestran una actividad muy leve en las cepas de *S. epidermis*, *C. albicans* y *C. papsilosis*. Los datos más llamativos se observaron en *E. faecalis*, donde el TIm mostró una leve actividad antibacteriana, mientras que el complejo con cobre(II) no mostró ninguna actividad. En la cepa de *S. aureus*, también se observó una mayor actividad para el TIm que para el CuTIm, pero en este caso, el valor de CIM es llamativamente bajo, la actividad del ligando y del complejo frente a esta cepa bacteriana es mayor incluso que para la sal de cobre(II).

En líneas generales, ni los complejos, ni los ligandos mostraron una fuerte actividad antimicrobiana en las cepas testeadas, con excepción de la cepa de *S. aureus* en las que el CuTIm y el TIm mostraron una actividad moderada. En este caso, no se observó una mejora de la actividad con la complejación, sino que por el contrario, la CIM observada para el TIm fue menor (al igual que en *E. faecalis*) que para el CuTIm. Sin embargo este complejo mantiene la actividad antimicrobiana, además de comportarse como agente antihipertensivo y antitumoral.

**1.4.5. CONCLUSIONES**

Como ya se mencionó en la **sección 1.1.1.5**, existe evidencia que el sistema renina-angiotensina (RAS) juega un rol crucial en el mantenimiento de la homeostasis vascular. La estimulación de los receptores tipo 1 (AT<sub>1</sub>) de la angiotensina II (Ang II) actúa pro-angiogénicamente incrementando los niveles del factor vascular endotelial de crecimiento (VEGF). Es decir que la Ang II puede promover la angiogénesis, un determinante importante en el crecimiento y propagación de muchos cánceres humanos. Estudios en animales y experimentos en cultivo mostraron que los bloqueantes de AT<sub>1</sub> produjeron efectos antiproliferativos. Como los componentes de RAS fueron también identificados en próstata, se sugirió el bloqueo del receptor AT<sub>1</sub> produce la inhibición del crecimiento tumoral en las líneas celulares de cáncer de próstata.

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas biológicas realizadas sobre los sartanes y sus complejos de coordinación con cobre(II) puede verse una potencialidad en el tratamiento de enfermedades. En principio, para pacientes con cáncer de próstata que sufren además hipertensión podría suministrarse irbesartán en forma de complejo con cobre(II) (CuIrb) para mejorar ambas enfermedades. El uso del complejo de telmisartán (CuTIm) permite mantener el efecto antihipertensivo del fármaco aislado pero mejora notablemente la capacidad antitumoral del mismo, en mayor medida que en el caso anterior, tal vez porque en este caso se mejora también la capacidad antioxidante del complejo. Sin embargo, para obtener mayor información sobre posibles terapias se hace necesaria, en esta etapa, una prueba en animales hipertensos con cáncer de próstata para poder observar la posible viabilidad de un tratamiento conjunto de este tipo a nivel clínico.

Un resumen de los principales cambios de los complejos con respecto a los sartanes de origen se muestra en la **tabla 1**. Como puede observarse, no fue posible establecer una relación entre la actividad contráctil y la actividad antitumoral. Una de las explicaciones que se proponen es que el complejo disminuye la proliferación mediante una vía que no involucra el receptor AT<sub>1</sub>. Sin embargo, para poder obtener mejores conclusiones, sería necesario realizar una mayor cantidad de ensayos, entre los que deberían incluirse el de afinidad del complejo por el receptor, y ensayos que permitan determinar el tipo de muerte celular que está ocurriendo, ya sea por necrosis o apoptosis, además de la realización de los ensayos *in Vivo*.

**Tabla 1.** Cambios con respecto al sartán de origen

<b>Compuesto</b>	<b>Actividad antihipertensiva</b>	<b>Actividad antitumoral</b>
<b>CuCand</b>	+	+
<b>CuTIm</b>	=	+++
<b>CuIrb</b>	++	++
<b>CuVals</b>	--	NT
<b>LosCu</b>	--	NT

NT: no testeado en células de cáncer de próstata

- (1) Mitchell, R.; Kumar, V.; Fausto, N.; Abbas, A. K.; Aster, J. C. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*; Saunders Elsevier, 2011.
- (2) Czubaj, F. El 42% de los argentinos adultos sufre hipertensión crónica. *La Nación*, 2013, 31.
- (3) Burnier, M.; Brunner, H. R. *Lancet*. **2000**, 355, 637–645.
- (4) Gasparo, M. D. E.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 415–472.
- (5) Hunyady, L.; Ji, H.; Jagadeesh, G.; Zhang, M.; Gáborik, Z.; Mihalik, B.; Catt, K. J. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 54, 427–434.
- (6) Dinh, D. T.; Frauman, A. G.; Johnston, C. I.; Fabiani, M. E. *Clin. Sci.* **2001**, 100, 481–492.
- (7) Stoll, M.; Steckelings, U. M.; Paul, M.; Bottari, S. P.; Metzger, R.; Unger, T. *J Clin Invest.* **1995**, 95, 651–657.
- (8) Meffert, S.; Stoll, M.; Steckelings, U. M.; Bottari, S. P.; Unger, T. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1996**, 122, 59–67.
- (9) Timmermans, P. B.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Benfield, P.; Carini, D. J.; Lee, R. J.; Wexler, R. R.; Saye, J. A.; Smith, R. D. *Pharmacol. Rev.* **1993**, 45, 205–251.
- (10) Greindling, K. K.; Lassegue, B.; Alexander, R. W. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, 36, 281–306.
- (11) Horiuchi, M.; Akishita, M.; Dzau, V. J. *Hypertens.* **1999**, 33, 613–621.
- (12) Jaiswal, N.; Diz, D. I.; Tallant, E. A.; Khosla, M. C.; Ferrario, C. M. *Am. J. Hypertens.* **1991**, 4, 228–233.
- (13) Siragy, H. M. *Am. J. Hypertens.* **2002**, 15, 1006–1014.
- (14) Booz, G. W.; Baker, K. M. *Hypertens.* **1996**, 28, 635–640.
- (15) Nakajima, M.; Hutchinson, H. G.; Fujinaga, M.; Hayashida, W.; Morishita, R.; Zhang, L.; Horiuchi, M.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 10663–10667.
- (16) Horiuchi, M.; Akishita, M.; Dzau, V. *Endocr Res.* **1998**, 24, 307–314.
- (17) Siragy, H. M.; Xue, C.; Abadir, P.; Carey, R. M. *Hypertens.* **2005**, 45, 133–137.
- (18) Williams, P. A. M. *Curr. Trends Med. Chem.* **2014**, 7, 97–104.
- (19) Dutta, A. S. In *Advances in Drug Research*; 1991; Vol. 21, pp. 145–286.
- (20) Enrique López de Coca y Fernández-Valencia. *Boletín Farmacoter. Castilla la Mancha* **2000**, 1, 1–8.
- (21) Adam, M. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **2005**, 36, 513–537.
- (22) Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Price, W. A.; Thoolen, M. J.; Carini, D. J.; Johnson, A. L.; Taber, R. I.; Timmermans, P. B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, 247, 1–7.
- (23) Jackson, E. K. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*; L.L., B.; J.S., L.; K.L., P., Eds.; 11th ed.; McGraw Hill: New York, 1996; pp. 789–821.
- (24) Smith, R. D.; Timmermans, P. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1994**, 3.
- (25) Aulakh, G. K.; Sodhi, R. K.; Singh, M. **2007**, 81, 615–639.
- (26) Lieberman, E.; Kaplan, N. *Hipertensión clínica*; 3ª ed.; Waverly Hispánica, 2000.
- (27) Burnier, M. *Circ.* **2001**, 103, 904–912.
- (28) Tamargo, J. *Med. Clin.* **2000**, 114, 6–13.
- (29) Goa, K.; Wagstaff, A. *Drugs* **1996**, 51, 820–845.
- (30) Croom, K.; Curran, M.; Goa, K.; Perry, C. *Drugs* **2004**, 64, 999–1028.
- (31) Abbott, K.; Trespalacios, F.; Agodoa, L.; Taylor, A.; Bakris, G. *Arch. Intern. Med.* **2004**, 164, 2465–2471.
- (32) Tamargo, J. *Hipertensión*. **2001**, 18, S19–36.
- (33) Sharpe, M.; Jarvis, B.; Goa, K. *Drugs* **2001**, 61, 1501–1529.
- (34) Easthope, S.; Jarvis, B. *Drugs* **2002**, 62, 1253–1287.
- (35) Wellington, K.; Faulds, D. *Drugs* **2002**, 62, 1983–2005.
- (36) Unger, T.; McInnes, G.; Neutel, J.; Böhm, M. *Drugs* **2004**, 64, 2731–2739.
- (37) Tamargo, J.; Caballero, R.; Gómez, R.; Núñez, L.; Vaquero, M.; Delpón, E. *Rev. Española Cardiol.* **2006**, 6, 10–24.
- (38) Sachinidis, A.; Ko, Y.; Weisser, P.; Meyer zu Brickwedde, M.; Düsing, R.; Christian, R.; Wiecezorek, A.; Vetter, H. *J Hypertens.* **1993**, 11, 155–162.
- (39) Tamargo, J.; Caballero, R.; Gómez, R.; Núñez, L.; Vaquero, M.; Delpón, E. *Rev. Española Cardiol.* **2006**, 6, 10–24.
- (40) Ojima, M.; Inada, Y.; Shibouta, Y.; Wada, T.; Sanada, T.; Kubo, K.; Nishikawa, K. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, 319, 137–146.
- (41) Csajka, C.; Buclin, T.; Brunner, H.; Biollaz, J. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, 32, 1–29.
- (42) Schiffrin, E. L. *Am. J. Med.* **2014**, 113, 409–418.
- (43) Meredith, P. *Blood Press Suppl.* **2001**, 3, 11–17.
- (44) Sever, P. *J Hum hypertens* **1997**, 11, s91–s95.
- (45) Gillis, J.; Markham, A. *Drugs* **1997**, 54, 885–902.
- (46) Herbert, J.-M.; Delisée, C.; Dol, F.; Schaeffer, P.; Cazaubon, C.; Nisato, D.; Chatelain, P. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 251, 143–150.
- (47) Berellini, G.; Cruciani, G.; Mannhold, R. **2005**, 1, 4389–4399.
- (48) Ohno, K.; Amano, Y.; Kakuta, H.; Niimi, T.; Takakura, S.; Orita, M.; Miyata, K.; Sakashita, H.; Takeuchi, M.; Komuro, I.; Higaki, J.; Horiuchi, M.; Kim-Mitsuyama, S.; Mori, Y.; Morishita, R.;

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Yamagishi, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 434–437.
- (49) Wiene, W.; Entzeroth, M.; Meel, J. C. A.; Stangier, J.; Busch, U.; Ebner, T.; Schmid, J.; Lehmann, H.; Matzek, K.; Kempthorne-Rawson, J.; Gladigau, V.; Haeu, N. H. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2006**, *18*, 127–154.
- (50) Kurtz, T. W.; Pravenec, M. *J. Hypertens.* **2004**, *22*, 2253–2261.
- (51) H, K.; K, S.; M, S.; S., Y. *Int J Clin Pharmacol Res.* **2005**, *25*, 41–46.
- (52) Bhuiyan, M. A.; Ishiguro, M.; Hossain, M.; Nakamura, T.; Ozaki, M.; Miura, S.-I.; Nagatomo, T. *Life Sci.* **2009**, *85*, 136–140.
- (53) Badimón, L.; Martínez-González, J. *Rev. Española Cardiol.* **6**, 21–30.
- (54) Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Münzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Griendling, K. K.; Harrison, D. G. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1916–1923.
- (55) Wiemer, G.; Scholkens, B.; Busse, R. *Pharm Pharmacol Lett* **1993**, *3*, 24–27.
- (56) Fukai, T.; Ushio-fukai, M. *Antioxid Redox Signal.* **2011**, *15*, 1583–1606.
- (57) Ozumi, K.; Sudhakar, V.; Kim, H. W.; Chen, G.-F.; Kohno, T.; Finney, L.; Vogt, S.; McKinney, R. D.; Ushio-fukai, M.; Fukai, T. *Hypertension* **2012**, *60*, 476–486.
- (58) Laursen, J. B.; Rajagopalan, S.; Galis, Z.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Harrison, D. G. *Circ.* **1997**, *95*, 588–593.
- (59) Schnackenberg, C. G.; Welch, W. J.; Wilcox, C. S. *Hypertens.* **1998**, *32*, 59–64.
- (60) Chu, Y. In *Hypertension SE - 23*; Fennell, J.; Baker, A., Eds.; Humana Press, 2005; Vol. 108, pp. 351–361.
- (61) Gongora, M. C.; Qin, Z.; Laude, K.; Kim, H. W.; McCann, L.; Rodney, J.; Dikalov, S.; Fukai, T.; Harrison, D. G.; Folz, J. R. *Hypertension* **2006**, *48*, 473–481.
- (62) Lüscher, T.; Vanhoutte, P.; Raij, L. *Hypertension* **1987**, *6*, 193–197.
- (63) Tschudi, M. R.; Criscione, L.; Novosel, D.; Pfeiffer, K.; Lüscher, T. F. *Circ.* **1994**, *89*, 2212–2218.
- (64) Taddei, S.; Virdis, A.; Ghiadoni, L.; Sudano, I.; Salvetti, A. *Drugs* **2002**, *62*, 265–284.
- (65) Abali, H.; Güllü, I. H.; Engin, H.; Haznedaroğlu, I. C.; Erman, M.; Tekuzman, G. *Med. Hypotheses* **2014**, *59*, 344–348.
- (66) Deshayes, F.; Nahmias, C. *Trends Endocrinol. Metab.* **2005**, *16*, 293–299.
- (67) Chow, L.; Rezmann, L.; Catt, K. J.; Louis, W. J.; Frauman, a G.; Nahmias, C.; Louis, S. N. S. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *302*, 219–229.
- (68) George, A. J.; Thomas, W. G.; Hannan, R. D. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 745–759.
- (69) Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC Recommendations, 2005.
- (70) Kohen, R.; Nyska, A. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620–650.
- (71) Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40.
- (72) Kowaltowski, A. J.; de Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 333–343.
- (73) Pham-huy, L. A.; He, H.; Pham-huy, C. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4*, 89–96.
- (74) Pricci, F.; Leto, G.; Amadio, L.; Iacobini, C.; Cordone, S.; Catalano, S.; Zicari, A.; Sorcini, M.; Di Mario, U.; Pugliese, G. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 683–694.
- (75) Ghafourifar, P.; Cadenas, E. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 190–195.
- (76) Poliandri, A. H. B.; Machiavelli, L. I.; Quinteros, A. F.; Cabilla, J. P.; Duvilanski, B. H. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 679–688.
- (77) Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616.
- (78) Lykkesfeldt, J.; Svendsen, O. *Vet. J.* **2007**, *173*, 502–511.
- (79) Percival, M. *Clin. Nutr. Insight* **1996**, *1*, NUT031.
- (80) Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry*; 5th ed.; John Wiley and Sons: New York, 1988.
- (81) R.C. Conry. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2005.
- (82) Hogarth, G.; Pateman, A.; Redmond, S. P. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, *306*, 232–236.
- (83) Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Inorganic Chemistry*; 2nd ed.; Pearson Education Limited: Edimburgh, 2005.
- (84) Hathaway, B. J.; Billing, D. E. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143–207.
- (85) Solomon, E. I. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8012–8025.
- (86) Baran, E. J. *Química bioinorgánica*; 1st ed.; McGraw-Hill Interamericana, 1994.
- (87) Urquiola, C.; Gambino, D.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Cerecetto, H.; González, M.; de Cerain, A. L.; Monge, A.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 119–126.
- (88) Banerjee, S.; Mondal, S.; Chakraborty, W.; Sen, S.; Gachhui, R.; Butcher, R. J.; Slawin, A. M. Z.; Mandal, C.; Mitra, S. *Polyhedron* **2009**, *28*, 2785–2793.
- (89) Torre, R. M. T.; Friet, E.; Viera, I.; Kremer, E.; Baran, E. J. *Acta Farm. Bonaer.* **1993**, *12*, 73–78.
- (90) Bukhari, S. B.; Memon, S.; Mahroof-Tahir, M.; Bhangar, M. I. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *71*, 1901–1906.
- (91) Verquin, G.; Fontaine, G.; Abi-Aad, E.; Zhilinskaya, E.; Aboukais, A.; Bernier, J.-L. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2007**, *86*, 272–278.
- (92) Kivelson, D.; Neiman, R. *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 149.
- (93) Bonomo, R.; Riggi, F.; Di Bilio, A. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2510–2512.
- (94) Pena, M.; Lee, J.; Thiele, D. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1251–1260.
- (95) Madsen, E.; Gitlin, J. D. *Annu. Rev. Neurosci.* **2007**, *30*, 317–337.
- (96) Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Faa, G. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 876–889.
- (97) Hart, E. B.; Steenbock, H.; Waddell, J.; Elvehjem, C. A. *J. Biol. Chem.* **1928**, *77*, 797–833.
- (98) Marsh, M. N.; Riley, S. A. In *Slisenger and Fordstran's Gastrointestinal and Liver Disease*;

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Feldman, M.; Slesinger, M. H.; Scharschmidt, B. F., Eds.; WBSaunders Co., 1998; p. 1471.
- (99) Linder, M.; Hazegh-Azam, M. *Am J Clin Nutr* **1996**, *63*, 797S–811.
- (100) Dunham, R.; Smith, H. E. *Proc. Water Qual. Technol. Conf.* **1992**, 341–352.
- (101) Turnlund, J.; Keyes, W.; Anderson, H.; Acord, L. *Am J Clin Nutr* **1989**, *49*, 870–878.
- (102) Wapnir, R. *Am J Clin Nutr* **1998**, *67*, 1054S–1060.
- (103) Musci, G.; Polticelli, F.; Calabrese, L. In *Copper Transport and Its Disorders SE - 15*; Leone, A.; Mercer, J. B., Eds.; Springer US, 1999; Vol. 448, pp. 175–182.
- (104) Johnson, M. A.; Fischer, J. G.; Kays, S. E. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 1–31.
- (105) Mercer, J. F. *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 64–69.
- (106) Lane, T. F. *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 929–943.
- (107) Österberg, R. *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *12*, 309–347.
- (108) Kodama, H.; Murata, Y.; Kobayashi, M. *Pediatr. Int.* **1999**, *41*, 423–429.
- (109) Kodama, H.; Fujisawa, C. *Metallomics* **2009**, *1*, 42.
- (110) Linder, M. C. *New York Plenum Press* **1991**.
- (111) Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 268–298.
- (112) Lewis, K. O. *Gut* **1973**, *14*, 221–232.
- (113) De Romaña, D. L.; Olivares, M.; Uauy, R.; Araya, M. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2011**, *25*, 3–13.
- (114) Gaetke, L. *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163.
- (115) Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D. J. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 176–185.
- (116) Schlieff, M. L.; Gitlin, J. D. *Mol. Neurobiology* **2006**, *33*, 81–90.
- (117) Rae, T.; Schmidt, P.; Pufahl, R.; Culotta, V.; O'Halloran, T. *Science (80-. )* **1999**, *284*, 805–808.
- (118) Erler, J. T.; Bennewith, K. L.; Nicolau, M.; Dornhöfer, N.; Kong, C.; Le, Q.-T.; Chi, J.-T. A.; Jeffrey, S. S.; Giaccia, A. J.; Dornhofer, N. *Nature* **2006**, *440*, 1222–1226.
- (119) Zheng, Y.; Li, X.-K.; Wang, Y.; Cai, L. *Hemoglobin* **2008**, *32*, 135–145.
- (120) Kang, J.; Lin, C.; Chen, J.; Liu, Q. *Chem. Biol. Interact.* **2004**, *148*, 115–123.
- (121) Ding, X.; Xie, H.; Kang, Y. J. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 301–310.
- (122) Tumer, Z.; Moller, L. B. *Eur J Hum Genet* **2010**, *18*, 511–518.
- (123) Danks, D.; Campbell, P.; Stevens, B.; Mayne, V.; Cartwright, E. *Pediatrics* **1972**, *50*, 188–201.
- (124) Hernández Villén, D.; López Martínez, S. *Rev. Lab. Clin.* **2011**, *04*, 102–111.
- (125) Klevay, L. M. *Am J Clin Nutr* **1975**, *28*, 764–774.
- (126) Klevay, L. M.; Hyg., S. D. *Am J Clin Nutr* **1973**, *26*, 1060–1068.
- (127) Rayssiguier, Y.; Gueux, E.; Bussiere, L.; Mazur, A. J. *Nutr.* **1993**, *123*, 1343–1348.
- (128) Klevay, L. M.; Inman, L.; Johnson, L. K.; Lawler, M.; Mahalko, J. R.; Milne, D. B.; Lukaski, H. C.; Bolonchuk, W.; Sandstead, H. H. *Metabolism* **1984**, *33*, 1112–1118.
- (129) Klevay, L. M. *Med. Hypotheses* **1987**, *24*, 111–119.
- (130) Medeiros, D. M. *Nutr. Res.* **1987**, *7*, 231–235.
- (131) DiSilvestro, R. a.; Greenson, J. K.; Liao, Z. *Exp. Biol. Med.* **1992**, *201*, 94–97.
- (132) Inutsuka, S.; Araki, S. *Cancer* **1978**, *42*, 626–631.
- (133) Oberley, L. W.; Buettner, G. R.; Bueftner, G. R.; LW, O.; GR., B. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1141–1149.
- (134) Sorenson, J. R. J. *Prog. Med. Chem.* **1989**, *26*, 437–568.
- (135) Suliburska, J.; Bogdanski, P.; Jakubowski, H. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *738*, 326–331.
- (136) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Barrio, D. a.; Lezama, L.; Rojo, T.; Williams, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6418–6424.
- (137) Etcheverry, S. B.; Di Virgilio, A. L.; Nascimento, O. R.; Williams, P. A. M. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 25–33.
- (138) Klevay, L. M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1980**, *355*, 140–151.
- (139) Chow, L.; Rezmann, L.; Imamura, K.; Wang, L.; Catt, K.; Tikellis, C.; Louis, W. J.; Frauman, A. G.; Louis, S. N. S. *Prostate* **2008**, *68*, 651–660.
- (140) Cagigal, E.; Gonza, L.; Alonso, R. M.; Jime, R. M. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 477–486.
- (141) Islas, M. S.; Franca, C. A.; Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. *Vib. Spectrosc.* **2012**, *62*, 143–151.
- (142) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B, 5th ed.*, 1997.
- (143) Kohzuma, T.; Odani, A.; Morita, Y.; Takani, M.; Yamauchi, O. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 3854–3858.
- (144) Mino, Y.; Ishida, T.; Ota, N.; Inoue, M.; Nomoto, K.; Yoshioka, H.; Takemoto, T.; Sugiura, Y.; Tanaka, H. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 3440–3444.
- (145) Zupancic, S. *Process for the preparation of candesartan cilexetil*, 2012.
- (146) Andrews, P. R.; Craik, D. J.; Martin, J. L. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648–1657.
- (147) Parker, F. S. *Plenum Press. New York* **1983**.
- (148) Nagy, N. V.; Szabó-Plánka, T.; Tircsó, G.; Király, R.; Arkosi, Z.; Rockenbauer, A.; Brücher, E. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1655–1666.
- (149) Kovala-Demertzi, D.; Skrzypek, D.; Szymańska, B.; Galani, A.; Demertzis, M. A. *Inorganica Chim. Acta* **2005**, *358*, 186–190.
- (150) Franca, C. A.; Etcheverry, S. B.; Diez, R. P.; Williams, P. A. M. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *2009*, 1296–1300.
- (151) Van Albada, G. A.; Quiroz-Castro, M. E.; Mutikainen, I.; Turpeinen, U.; Reedijk, J. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, *298*, 221–225.
- (152) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *120*, 215–241.
- (153) Dunning, T. H.; Hay, P. J. *Methods of Electronic Structure Theory*, Schaefer, H. F., Ed.; 3rd ed.; Plenum press, 1977.
- (154) Casida, M. E.; Jamorski, C.; Casida, K. C.; Salahub, D. R. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439.
- (155) Sampath, A.; Reddy, A. R.; Yakambaram, B.; Thirupathi, A.; Prabhakar, M.; Reddy, P. P.; Reddy, V. P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 405–412.

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- (156) Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *Acad. Press. Bost.* **1991**.
- (157) Islas, M. S.; Lezama, L.; Griera, M.; Cortes, M. A.; Rodriguez, M.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *123*, 23–33.
- (158) Morgan, K. J. *J. Chem. Soc.* **1961**, 2343–2347.
- (159) Gudasi, K. B.; Shenoy, R. V.; Vadavi, R. S.; Patil, M. S.; Patil, S. A.; Hanchinal, R. R.; Desai, S. A.; Lohithaswa, H. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2006**, *2006*, 1–8.
- (160) Wolff, H.; Muller, H.; Wolff, E. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2192–2196.
- (161) Antony, J.; Helden, G. Von; Meijer, G.; Schmidt, B. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 014305.
- (162) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Barrio, D. A.; Lezama, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6418–6424.
- (163) Abuhijleh, A. L. *J. Mol. Struct.* **2010**, *980*, 201–207.
- (164) Stokowa-Softys, K.; Jeżowska-Bojczuk, M. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *127*, 73–78.
- (165) De Miranda, J. L.; Felcman, J. *Polyhedron* **2003**, *22*, 225–233.
- (166) Peisach, J.; Blumberg, W. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- (167) Zhao, J.; Mi, L.; Hu, J.; Hou, H.; Fan, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15222–15223.
- (168) Johnson, C. K. *Oak Ridge Natl. Lab. Tennessee, USA* **1976**, Report ORNL–5318.
- (169) Xie, Y.; Bu, W.; Chan, A. S.-C.; Xu, X.; Liu, Q.; Zhang, Z.; Yu, J.; Fan, Y. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, *310*, 257–260.
- (170) Nakai, M.; Sekiguchi, F.; Obata, M.; Ohtsuki, C.; Adachi, Y.; Sakurai, H.; Orvig, C.; Rehder, D.; Yano, S. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1275–1282.
- (171) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*; 4<sup>o</sup> ed.; Oxford UK, 2007.
- (172) Papas, A. M. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*; CRC Press, 1998; p. 672.
- (173) Halliwell, B. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 3–20.
- (174) Niki, E. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 503–515.
- (175) Butkovic, V.; Klasinc, L.; Bors, W. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2816–2820.
- (176) Cano, A.; Alcaraz, O.; Acosta, M.; Arnao, M. B. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 103–109.
- (177) Van den Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; Van den Berg, H.; Bast, A. *Food Chem.* **1999**, *66*, 511–517.
- (178) Cao, G.; Prior, R. L. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1309–1315.
- (179) Glazer, A. N. *FASEB J.* **1988**, *2*, 2487–2491.
- (180) Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626.
- (181) Hapner, C. D.; Deuster, P.; Chen, Y. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186*, 275–279.
- (182) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- (183) Eslami, H.; Sharifi, A. M.; Rahimi, H.; Rahati, M. *Neurosci. Lett.* **2014**, *558*, 31–36.
- (184) Wang, M.; Zhao, X.; GAI, C.; LIU, H.; XU, Y.; LI, J. *Chem. Res. Chinese Univ.* **2011**, *27*, 1–5.
- (185) Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; Terao, J. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1201–1204.
- (186) Moon, J.-K.; Shibamoto, T. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.
- (187) Magalhães, L. M.; Segundo, M. a; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 1–19.
- (188) Huang, W.-Y.; Majumder, K.; Wu, J. *Food Chem.* **2010**, *123*, 635–641.
- (189) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 128–132.
- (190) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Rivadeneira, J.; Salinas, V.; Williams, P. A. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 435–447.
- (191) Schepetkin, I.; Potapov, A.; Khlebnikov, A.; Kirpotina, L.; Quinn, M. T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 499–513.
- (192) Amma, E. L.; Roberts, J.; Huber, K. R.; Sridhar, R.; Griffith, E. H. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1987**, *915*, 267–276.
- (193) Durot, S.; Policar, C.; Cisnetti, F.; Lambert, F.; Renault, J.; Pelosi, G.; Blain, G.; Korri-yousoufi, H.; Mahy, J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 3513–3523.
- (194) Liao, Z.-R.; Zheng, X.-F.; Luo, B.-S.; Shen, L.-R.; Li, D.-F.; Liu, H.-L.; Zhao, W. *Polyhedron* **2001**, *20*, 2813–2821.
- (195) Roberts, N. A.; Robinson, P. A. *J. Rheumatol* **1985**, *24*, 128–136.
- (196) Grass, G.; Rensing, C.; Solioz, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1541–1547.
- (197) Ng, N. S.; Leverett, P.; Hibbs, D. E.; Yang, Q.; Bulanadi, J. C.; Wu, M. J.; Aldrich-Wright, J. R. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 3196–3209.
- (198) Denadai, Â. M. L.; de Oliveira, A. M.; Daniel, I. M. P.; Carneiro, L. A.; Ribeiro, K. C.; Beraldo, H. de O.; da Costa, K. J. R.; da Cunha, V. C.; Cortés, M. E.; Sinisterra, R. D. *Supramol. Chem.* **2012**, *24*, 204–212.
- (199) Tanaka, J. C. A.; Silva, C. C. da; Oliveira, A. J. B. de; Nakamura, C. V.; Filho., B. P. D. *Braz J Med Biol Res* **2006**, *39*, 387–391.
- (200) Aliero, A. A.; Ibrahim., A. D. In *Salmonella: A Diversified Superbug*; Kumar, Y., Ed.; In Tech: Croatia, 2012; pp. 1–26.
- (201) Suksrichavalit, T.; Prachayasittikul, S.; Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3259–3265.
- (202) Patel, M.; Gandhi, D.; Parmar, P. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64*, 1276–1288.
- (203) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2012**, *31*, 445–460.
- (204) Recio Despaigne, A. A.; Da Costa, F. B.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Louro, S. R. W.; Beraldo, H. *Polyhedron* **2012**, *38*, 285–290.
- (205) Chen, J. Y.; Ren, X. X.; Mao, Z. W.; Le, X. Y. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 2182–2191.

## **CAPÍTULO II**

---

### **Complejo de coordinación de naringenina con oxidovanadio(IV)**

---

## 2.1.1. VANADIO

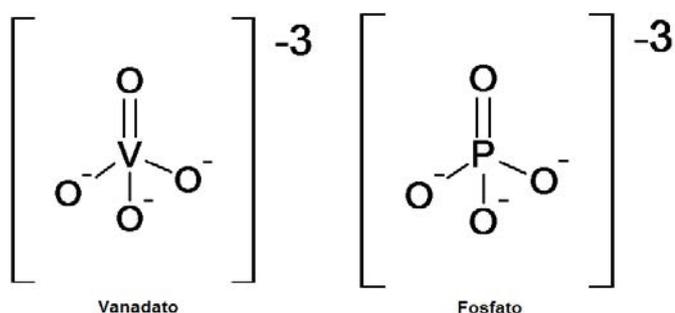
### 2.1.1.1. Aspectos de la química del vanadio

#### 2.1.1.1.1. Generalidades

El elemento debe su nombre a la diosa escandinava Vanadis, diosa de la belleza y la fertilidad. En 1801, el Químico Andrés Manuel del Río habló sobre un nuevo elemento, sin embargo fue en 1830 cuando el sueco Nils Sefstrom lo descubrió. El vanadio en su estado puro es un metal gris-plateado brillante, suave y dúctil y es uno de los 22 elementos más abundante en la corteza terrestre, océanos, suelo y combustibles fósiles<sup>1</sup>.

El vanadio posee una geometría bien definida de su esfera de coordinación interna con respecto a los estados de oxidación habituales del metal [V(III), V(IV), V(V)], mientras que la esfera externa no está bien delimitada. La donación de un par de electrones desde los ligandos a la esfera interna del metal, le confiere a la unión un alto grado de carácter covalente.

Una de las características más relevantes e interesantes del vanadato es su similitud en cuanto a carga y estructura con el fosfato. En la **figura 1** se muestran las analogías estructurales entre las formas desprotonadas. Se ha demostrado que el vanadato puede formar vínculos estéricos de manera análoga al fosfato y esto puede ser la base de muchos efectos biológicos, particularmente la inhibición enzimática<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Analogías entre el vanadato y el fosfato.

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

### 2.1.1.1.2. Estados de oxidación y geometría

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. En la **tabla 1** se resumen los principales estados de oxidación y la estereoquímica del vanadio<sup>3</sup>.

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

Estado de oxidación y (configuración electrónica)	Número de coordinación	Geometría
V(III) (d <sup>2</sup> )	3 4 5 6 7	Planar Tetraédrica Bipirámide trigonal Octaédrica Bipirámide pentagonal
V(IV) (d <sup>1</sup> )	4 5 6 7 8	Tetraédrica Bipirámide trigonal Octaédrica Bipirámide pentagonal Dodecaédrica
V(V) (d <sup>0</sup> )	3 4 5 6 7	Planar Tetraédrica Bipirámide trigonal Octaédrica Bipirámide pentagonal

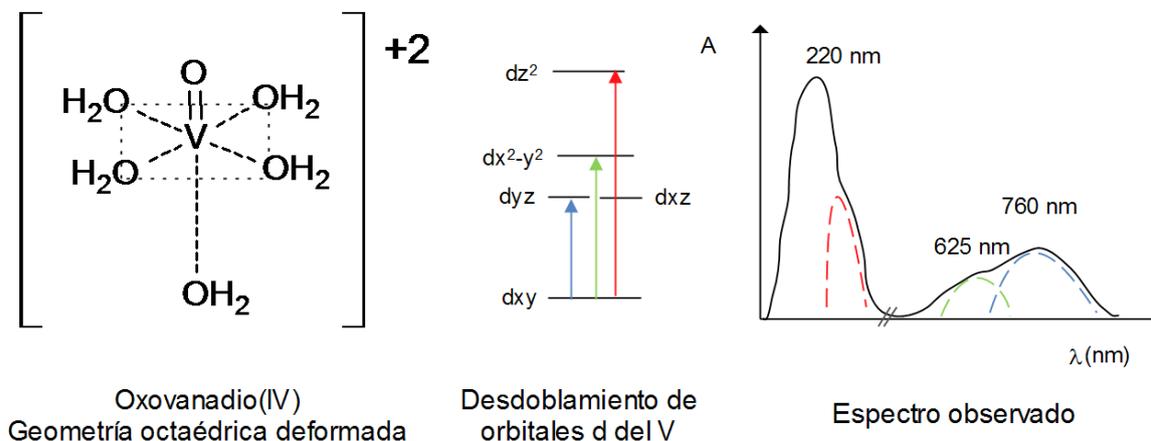
Las especies de vanadio monoméricas y poliméricas tetravalentes y pentavalentes pueden estar presentes en soluciones acuosas y su composición depende del pH y de la concentración del metal. En presencia de agentes oxidantes el vanadio está presente como  $\text{HVO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  a concentraciones micromolares cerca del pH neutro mientras que la presencia de agentes reductores intracelulares o extracelulares (por ejemplo glutatión) reduce el anión al catión  $\text{V(IV)O}^{2+}$  en pocos minutos.

### 2.1.1.1.3. Espectros electrónicos característicos para el catión $\text{V(IV)O}^{2+}$

El catión oxidovanadio(IV) se encuentra en solución como catión  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  con geometría octaédrica (**Fig 2**). Para estudiar los orbitales moleculares, Ballhausen y Gray<sup>4</sup> tomaron en cuenta que el enlace  $\text{V}=\text{O}$  es muy fuerte, que las 4 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  en el plano son equivalentes y que la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  en la posición axial se encuentra débilmente unida al centro

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

metálico. Si se acepta este modelo, los orbitales d del vanadio se desdoblan como se indica en la **figura 2**.



**Figura 2.** Geometría y transiciones electrónicas esperadas para el catión oxidovanadio(IV).

Cabe esperar entonces que se produzcan tres bandas correspondientes a transiciones d-d desde el orbital  $d_{xy}$ , ocupado con un electrón, a los restantes orbitales vacíos. La banda de absorción localizada en 760 nm corresponde a la transición  $d_{xy} \rightarrow (d_{xz}, d_{yz})$  y la banda de absorción situada en 625 nm a una transición  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$  que se observa en la mayoría de los casos como un hombro de la banda principal. La banda de mayor energía, correspondiente a la transición  $d_{xy} \rightarrow d_z^2$ , no siempre se aprecia ya que suele solaparse con bandas de transferencia de carga en la zona espectral del ultravioleta. En esta región se manifiesta una banda a 220 nm y un hombro a 240 nm, que se atribuyen a la transferencias de carga del grupo V=O. La banda a 220 nm corresponde a la transición de un electrón desde orbitales  $p_\pi$  del oxígeno a orbitales  $d_{xz}, d_{zy}$  del vanadio y el hombro a 240 nm a una transferencia al orbital  $d_{xy}$ <sup>4</sup>.

### 2.1.1.1.4. Espectro infrarrojo (FTIR)

Con el fin de encontrar una región característica en la región del infrarrojo para el estiramiento del grupo V=O, Selbin y colaboradores<sup>5</sup> realizaron un estudio sobre 51 complejos de oxovanadio(IV), registrando sus espectros infrarrojos en la región de 5000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , tanto en estado sólido como en solución. De los resultados obtenidos se deduce que la frecuencia de estiramiento del grupo V=O oscila en un margen de  $985 \pm 60 \text{ cm}^{-1}$  (**Tabla 2**), observando, además, que el efecto de las fuerzas reticulares resulta prácticamente despreciable en el desplazamiento de las frecuencias, ya que esta variación no es superior a  $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$  entre el producto sólido y la solución. Sin embargo, los ligandos unidos al  $\text{V(IV)O}^{2+}$  ejercen un marcado efecto en la frecuencia de estiramiento del enlace V=O y las modificaciones que se producen permiten deducir las características estructurales y de enlace del compuesto.

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

**Tabla 2.** Algunas frecuencias de estiramiento V=O para compuestos de oxidovanadio(IV)

Compuesto	$\nu(\text{V}=\text{O}) \text{ cm}^{-1}$
$[\text{VO}(\text{hesp})(\text{OH})_3]\text{Na}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	931
$\text{VO}(\text{ox}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	986
$\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1003, 1017, 975
$\text{VO}(\text{acac})_2$	996
$\text{VO}(\text{mal}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1000
$\text{VO}(\text{malon}) \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	990
$\text{VOCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	990
$\text{VOBr}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	996
$\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{ClO}_4)_2$	1005

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

El enlace V=O es un enlace múltiple que consta de un enlace  $\sigma$  superpuesto a otro de donación  $p_\pi \rightarrow d_\pi$  de oxígeno a vanadio. El grado de donación depende de la tendencia que presenta el átomo de oxígeno a ceder electrones y el átomo de vanadio a aceptarlos. El oxígeno cede electrones a consecuencia de su elevada densidad electrónica por tener la capa de valencia llena y ser un átomo de escaso volumen. Esta tendencia a ceder electrones del oxígeno no se modifica por los ligandos coordinados al grupo  $\text{V}(\text{IV})\text{O}^{2+}$  mientras que las propiedadesceptoras del átomo de vanadio sí resultan afectadas por los ligandos, ya que al coordinarse estos por intermedio de enlaces  $\sigma$ , aumenta la densidad electrónica en el átomo de vanadio, por lo que presentará menor tendencia a aceptar electrones, resultando menor la donación  $p_\pi \rightarrow d_\pi$ . Con ello se produce una disminución en la fuerza del enlace, desplazándose a menores frecuencias de estiramiento. Por lo tanto, cuanto mayor es la capacidad dadora  $\sigma$  de los ligandos menor será el orden de enlace V=O, esto se observa principalmente en los complejos de oxidovanadio(IV) con azúcares desprotonados<sup>6,7</sup>.

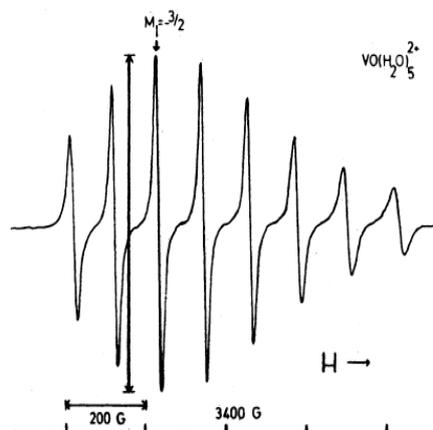
### **2.1.1.1.5. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)**

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una herramienta poderosa que provee información sobre la composición elemental, la nuclearidad (presencia de muchos centros magnéticos) y la estructura electrónica de los estados paramagnéticos<sup>8</sup>. Muestra la transición entre los estados de espín electrónicos separados por la presencia de un campo magnético externo. La energía de la separación entre estos estados depende del valor de la constante giromagnética  $g$ . En el caso de un electrón libre es 2,0023, mientras que para oxidovanadio(IV) es menor (1,95).

Estos estados electrónicos son luego separados por la interacción con el espín nuclear (acoplamiento hiperfino). En el caso del oxidovanadio(IV), el espín del núcleo de  $^{51}\text{V}$  es  $I=7/2$  y los estados son divididos en  $2I+1 = 8$  estados energéticos diferentes, separados por la constante de acoplamiento hiperfino,  $A$ . Esta constante, (específicamente  $A_{||}$ ) permite correlacionar con el tipo y número de ligandos presentes en el plano ecuatorial. Las reglas de

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

selección para las transiciones electrónicas son  $\Delta M_s = \pm 1$  y  $\Delta M_l = 0$ . Esto da lugar a la formación de un espectro de 8 líneas para el oxidovanadio(IV) (**Fig. 3**)<sup>8</sup>.



**Figura 3.** Espectro de resonancia paramagnética electrónica de 8 líneas propio de la especie  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  a temperatura ambiente<sup>8</sup>.

### 2.1.1.2. Aspectos biológicos del vanadio

#### 2.1.1.2.1. Generalidades

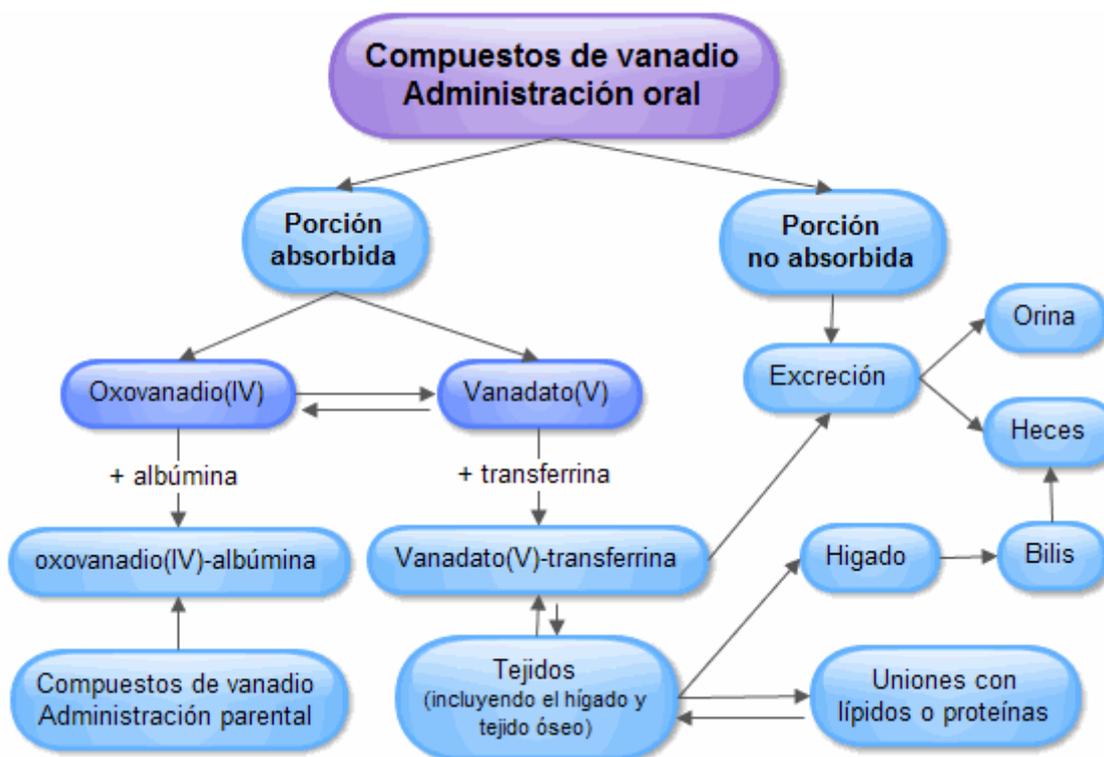
En 1911, Henze descubrió que ciertos organismos invertebrados marinos sésiles, denominados ascidias, poseían altos niveles de vanadio en sus células sanguíneas. Estos niveles ascienden hasta una concentración de 100 mM, un millón de veces más que el valor encontrado en el agua de mar. A pesar que no se conoce con exactitud la función de este elemento en dichos organismos, se postula que participa en la transducción de señales, almacenamiento de energía y defensa contra la depredación<sup>9,10</sup>.

En 1986, se descubrió en una bacteria del suelo llamada *Azotobacter chroococcum* una enzima nitrogenasa que posee vanadio en su sitio activo en vez de molibdeno. Si bien no se conoce concretamente la función del metal, se cree que la presencia del mismo surgió como una adaptación a ambientes ácidos o de baja temperatura<sup>11</sup>. También existe una familia de enzimas, las haloperoxidasas, que contienen vanadio en su sitio activo y que están presentes en algas, líquenes y hongos<sup>12</sup>.

Este elemento traza es considerado como esencial para algunos animales superiores, mientras que en humanos, su esencialidad es controversial. Mientras algunos lo incluyen en el grupo de otros 40 micronutrientes esenciales<sup>13,14</sup>, otros afirman que esta esencialidad no ha sido establecida aun<sup>15</sup>. 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<sup>16</sup>.

**2.1.1.2.2. Absorción, excreción y almacenamiento del vanadio**

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



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

Varios informes demuestran que el vanadio es absorbido pobremente en el tracto gastrointestinal (solo un 10 %). Diversos estudios sugieren que la mayor parte del vanadio ingerido se transforma en la forma catiónica en el medio ácido estomacal antes de ser absorbido en el duodeno a través de un mecanismo desconocido. El vanadio en forma de vanadato(V) aniónico ( $\text{VO}_3^-$ ) puede ser absorbido en gran parte (alrededor de cinco veces más que el oxidovanadio(IV)) a través del sistema de transporte aniónico<sup>17</sup>. El vanadato intracelular puede ser reducido a  $\text{V(IV)O}^{2+}$  por varios reductores fisiológicos como el glutatión (GSH), catecoles y otros constituyentes celulares<sup>18</sup>. Luego ambas especies, vanadato(V) y oxidovanadio(IV) son transportados por proteínas a través de la sangre hacia los tejidos. Finalmente el vanadio absorbido se excreta por heces y a través de la bilis y la orina.

La suplementación oral e intraperitoneal en modelos animales demostró que el vanadio se acumula en cerebro, páncreas, pulmones, testículos, corazón, bazo, hígado y principalmente en huesos<sup>2,19</sup>.

Estudios *in vitro* demostraron que aquellas drogas que contienen vanadio ejercen un efecto estimulador sobre líneas celulares osteoblásticas.

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

Sin embargo, aún no se han determinado los efectos *in vivo* de los compuestos de vanadio sobre la incorporación de este elemento a los huesos<sup>20</sup>.

### **2.1.1.2.3. Deficiencia y exceso de vanadio en animales superiores**

La deficiencia de vanadio en organismos superiores puede causar un gran impacto. En cabras, por ejemplo, diversos reportes demostraron que aquellas que habían sido alimentadas con dietas deficientes en vanadio exhibían tasas de aborto altas y disminución en la producción de leche<sup>21</sup>. Otras alteraciones bioquímicas en estos animales incluyen disminución de los niveles de enzimas como isocitrato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, creatinina sérica, betalipoproteínas y glucosa sérica. Dentro de las anomalías físicas se incluyen hinchazón de las articulaciones y deformaciones esqueléticas en los miembros anteriores. También se ha reportado que los compuestos de vanadio modulan los niveles de hormonas tiroideas en la sangre, debido a esto si los animales son privados de este elemento exhiben disminución del peso de la glándula tiroidea, lo que disminuye la relación (peso de la tiroidea/peso corporal). Los compuestos de vanadio también afectan el metabolismo de la glucosa y los lípidos. En ciertos animales como pollos y ratas, los síntomas de deficiencia son retardo en el crecimiento, deterioro de la reproducción, alteración del metabolismo de los lípidos e inhibición de la Na(I)/ K(I) ATPasa en el riñón, el cerebro y en el corazón<sup>17</sup>.

Por otro lado, la administración de compuestos de vanadio en seres humanos y animales revela que este elemento puede ejercer diversos efectos tóxicos. Los estudios en animales (principalmente en ratas y ratones) demostraron que dichos efectos están relacionados con la especie, la dosis, la ruta y la duración de la administración, así como con la naturaleza del compuesto. La toxicidad aguda en animales por ingestión de compuestos de vanadio lleva a disturbios nerviosos, parálisis de los miembros, falla respiratoria, convulsiones, deposiciones sanguinolentas y muerte<sup>22</sup>. En gatos la administración de NaVO<sub>3</sub> por vía intravenosa produjo vasoconstricción renal y disminución de la filtración glomerular<sup>23</sup>. En humanos, cuando se administraron estos compuestos a personas que sufrían diabetes mellitus o enfermedad de las arterias coronarias en tratamientos a corto plazo (máximo de 4 semanas), el efecto secundario más común fue una leve perturbación gastrointestinal. Por inhalación, los síntomas principales son irritación de los ojos y del tracto respiratorio superior con sangrado nasal, tos, rinitis y dolor de garganta.

### **2.1.1.2.4. Usos terapéuticos de los compuestos de vanadio**

Los posibles usos farmacológicos del vanadio incluyen disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos, efectos diuréticos y natriuréticos, efectos anticancerígenos, contracción de los vasos sanguíneos, mejora de la afinidad del oxígeno por la mioglobina y la hemoglobina<sup>18,23</sup>.

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

Se han reportado varios trabajos que indican que la administración exógena de vanadato(V) y oxidovanadio(IV) puede disminuir los niveles de glucosa, estimular la ingesta de hexosas, y la oxidación de la glucosa, es decir que estos compuestos pueden actuar como agentes insulino-miméticos<sup>22</sup>. Por otro lado, Wang y colaboradores demostraron que un compuesto de vanadio (bis(maltolato)oxidovanadio(IV)) logró aumentar la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo y disminuir el apetito y la grasa corporal por disminución de los niveles del NPY (neuropéptido hipotalámico Y) en el hipotálamo. Esto sugiere que este complejo puede ser utilizado como un agente anti-obesidad<sup>24</sup>.

Otro de los usos del vanadio, particularmente el  $\text{VOSO}_4$  es el de mejorar el rendimiento de los atletas que realizan levantamiento de pesas. Fawcett y colaboradores<sup>25</sup> estudiaron posibles efectos colaterales como anemia y alteraciones en los glóbulos blancos, sin encontrar efectos observables.

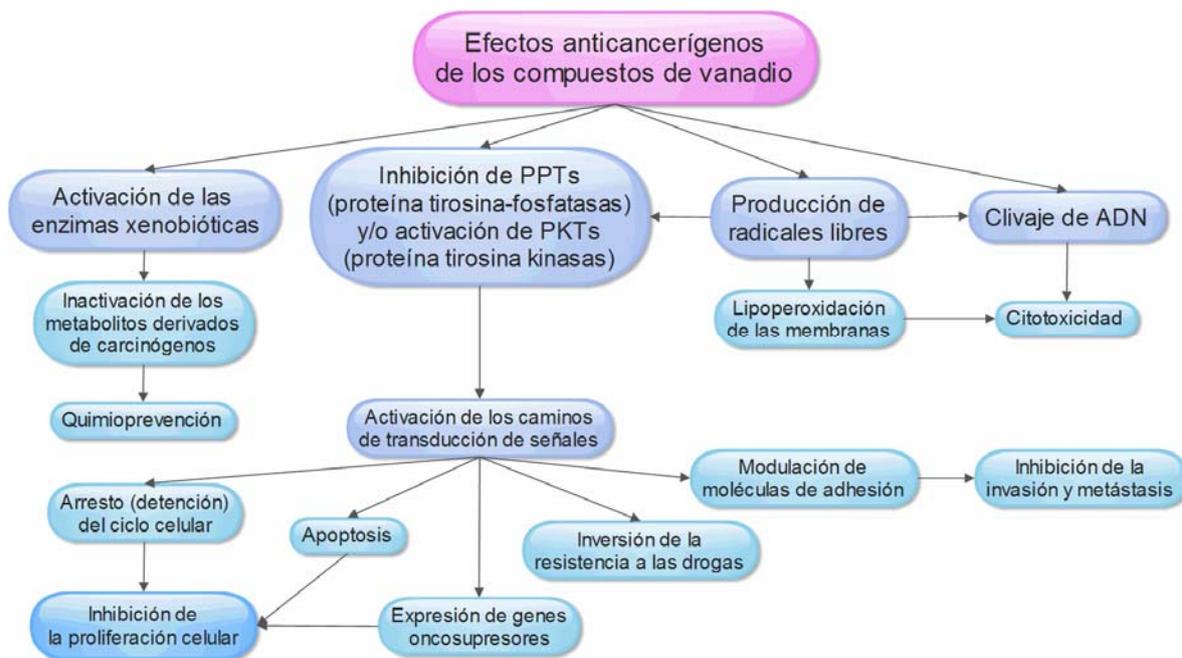
### **2.1.1.2.5. Efectos anticancerígenos de compuestos de vanadio**

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

- Reducción de la tasa de crecimiento celular (efecto antiproliferativo).
- Acciones citotóxicas y/o citostáticas, expresadas por necrosis o apoptosis.
- Reducción y/o inhibición de la invasión o potencial metastásico de las células.
- Disminución o ausencia de potencia para inducir la resistencia celular.

Algunos compuestos de vanadio son capaces de cumplir con estas condiciones, ya sean ejercidas en conjunto o por separado, a través de una variedad de mecanismos celulares<sup>26</sup>. Los mecanismos por los cuales actúan estos compuestos se encuentran resumidos en el **esquema 2**.

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio



**Esquema 2.** Presentación esquemática de las acciones a través de las cuales ejercen sus efectos antitumorales los compuestos de vanadio<sup>27</sup>.

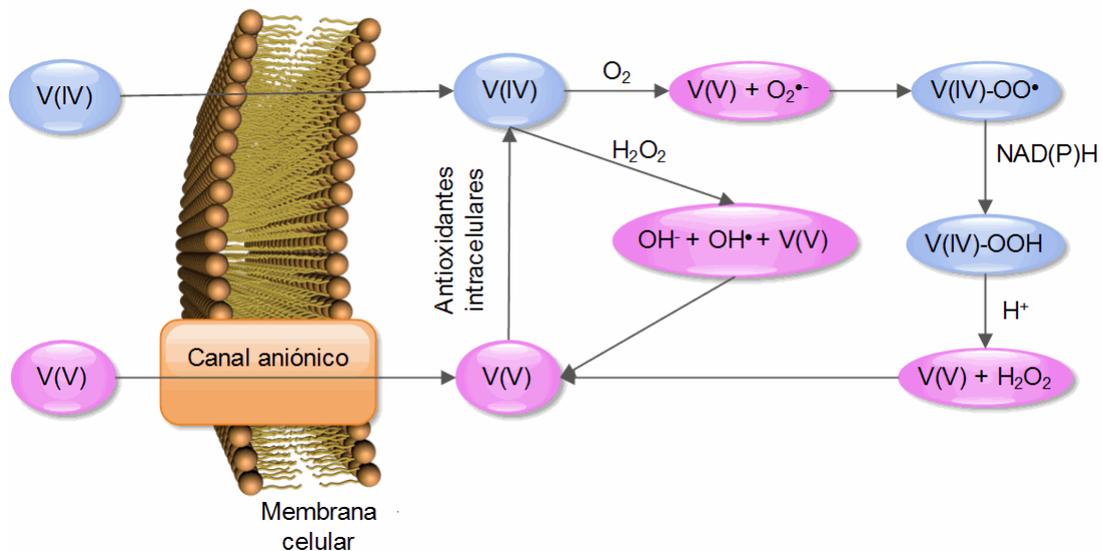
La regulación por parte de los compuestos de vanadio de las vías de señalización celular puede influir, en la muerte celular programada o apoptosis<sup>27</sup>. La necrosis y la apoptosis son dos mecanismos que llevan a la muerte celular por vías diferentes. La necrosis es el resultado de efectos citotóxicos los cuales inducen inflamación en las células pero no se observan cambios morfológicos en los núcleos, sino que la muerte se debe a que se daña la membrana celular y hay pérdida de citoplasma y contenido nuclear. En el otro caso, la apoptosis, se caracteriza principalmente por la condensación citoplasmática y nuclear, fragmentación del núcleo, presencia de burbujas en las membranas y también aparecen los denominados “cuerpos apoptóticos” (fragmentos citosólicos que contienen restos picnóticos de núcleos). Si bien este es un proceso fisiológico, la regulación inapropiada del mismo puede dar lugar a diversas condiciones patológicas, entre las que se encuentra el cáncer.

Otro mecanismo está basado en que, dada la similitud entre vanadato y fosfato (**Fig. 1**), los compuestos de vanadio inhiben a las proteínas tirosina fosfatasas<sup>28</sup>. Estas proteínas podrían estar involucradas en el arresto o detención del ciclo celular por lo que el efecto antiproliferativo del vanadio (tanto en líneas celulares normales como tumorales) podría deberse a la inhibición de estas proteínas<sup>27</sup>.

También existe evidencia que indica que los complejos de vanadio inducen la ruptura del ADN, pero no reaccionando directamente con sus componentes sino a través de la producción de radicales libres. A través de estudios de EPR se demostró que los radicales OH<sup>•</sup> generados cuando el oxidovanadio(IV) reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son los que participan en la ruptura del ADN<sup>26</sup>. Este mecanismo que involucra radicales libres es uno de los

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Vanadio

mecanismos principales que generan los efectos anticancerígeno y citotóxicos del vanadio. Dentro de la célula ocurre una interconversión entre vanadio(IV) y vanadio(V). Los compuestos de este metal generan un estrés oxidativo según se describe en la **esquema 3**. El V(IV) una vez que atraviesa la membrana celular puede oxidarse a V(V) ya sea por la presencia de  $O_2$  o de  $H_2O_2$ , generando el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en el primer caso o el radical  $OH^{\bullet}$  en el segundo. Por otro lado, el V(V) puede ingresar a la célula mediante un canal aniónico y reducirse luego a V(IV) mediante antioxidantes intracelulares o mediante el  $O_2^{\bullet-}$  formando con este último peroxo compuestos de V(IV) (V(IV)- $OO^{\bullet}$ ). Estos peroxo compuestos pueden reaccionar con NAD(P)H y  $H^+$  oxidando nuevamente el V(IV) a V(V) y produciendo  $H_2O_2$ .



**Esquema 3.** Especies inorgánicas de vanadio, su interconversión en el citoplasma y generación de radicales libres<sup>29</sup>

### **2.1.2. FLAVONOIDES**

#### **2.1.2.1. Generalidades**

Son un grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular<sup>30</sup>. Generalmente se encuentran en plantas como derivados glicosilados y contribuyen a los colores azul, rojo y naranja brillantes presentes en hojas, flores y frutas. Además de pertenecer a vegetales y frutas, los flavonoides se encuentran en semillas, frutos secos, cereales, especias y diferentes plantas medicinales así como en bebidas como vino (especialmente vino tinto), té y cerveza (en bajos niveles)<sup>31</sup>.

Se han identificado más de 4000 tipos de flavonoides en plantas vasculares, los cuales varían en tipo y cantidad debido a cambios en el ritmo de crecimiento, maduración y condiciones de las mismas. Las plantas producen flavonoides para protección contra parásitos fúngicos, herbívoros, patógenos e injuria oxidativa, además sirven de guía a los insectos para que lleguen hacia su alimento y producen estímulos para favorecer la polinización.

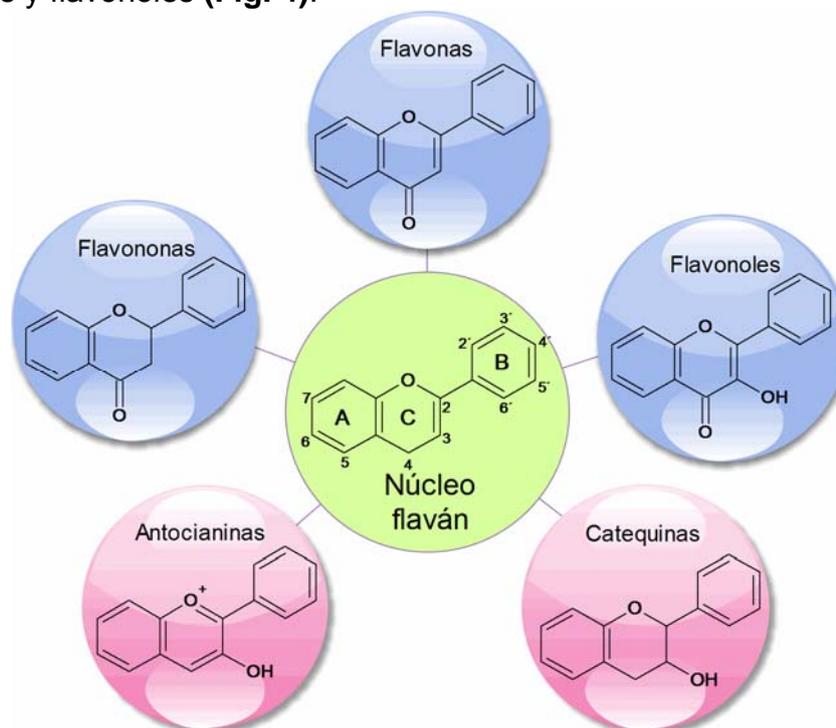
Algunos flavonoides poseen actividades antilipoperoxidantes, antitumorales, antiplaquetarias, antiisquémicas, antialérgicas y antiinflamatorias. Hay varios informes que muestran que los flavonoides inhiben la actividad de una serie de enzimas, incluyendo la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, monooxigenasa, xantina oxidasa, succinoxidasa mitocondrial, NADH-oxidasa, fosfolipasa A<sub>2</sub> y proteínas quinasas. Estos efectos biológicos se cree que provienen de las propiedades antioxidantes de estos compuestos y la inhibición de las enzimas podría deberse a una reacción de los flavonoides con los radicales libres generados en el sitio activo de las mismas.

Cuando se combinaron los flavonoides con agentes anticancerígenos, se encontró que se obtenían mejores resultados en el tratamiento de quimioterapia contra el cáncer<sup>32</sup>. En contraste con los efectos benéficos, se demostró *in vitro* que, algunos flavonoides son mutagénicos; esto, aparentemente, se debe a la actividad pro-oxidante de los mismos que se contraponen con la actividad antioxidante<sup>33</sup>.

En los últimos años se han modificado sus propiedades por complejación con metales ya que, debido a sus estructuras, pueden actuar como agentes quelantes. Para estos complejos de coordinación se han encontrado mejoras en las propiedades biológicas<sup>34</sup>. Los iones metálicos interactúan preferentemente con los grupos cetona e hidroxilo del esqueleto flavonol y, para los flavonoides O-glicosilados, que poseen azúcares unidos al grupo OH, los iones metálicos pueden interactuar a través de los grupos OH de las gliconas, de acuerdo a las condiciones experimentales empleadas durante la síntesis<sup>35</sup>. Estos complejos metálicos mejoran las propiedades biológicas de los flavonoides, desarrollando nuevos agentes antitumorales y antioxidantes.

### 2.1.2.2. Estructura de los flavonoides

La estructura de los flavonoides se basa en un núcleo flaván (**Fig. 4**), que consta de tres anillos denominados A, B y C. El anillo A se condensa con un anillo de seis miembros (C), que en la posición 2 tiene como sustituyente a un grupo benceno (B). El anillo C puede ser un heterociclo pirano dando lugar a antocianinas y catequinas, o pirona que conduce a la formación de flavonas, flavononas y flavonoles (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Estructura del núcleo flaván y de las principales familias de flavonoides.

La naturaleza química de los flavonoides depende de la clase de estructura, grado de hidroxilación, otras sustituciones y conjugaciones y del grado de polimerización. En las plantas son relativamente resistentes al calor, oxígeno, sequedad y moderado grado de acidez pero pueden ser modificados por la luz. La fotoestabilidad de esas moléculas depende de la naturaleza del grupo OH unido al átomo de carbono del anillo C denominado C-3. La ausencia o glicosilación de esos grupos resulta en un aumento de la fotoestabilidad del flavonoide<sup>36</sup>.

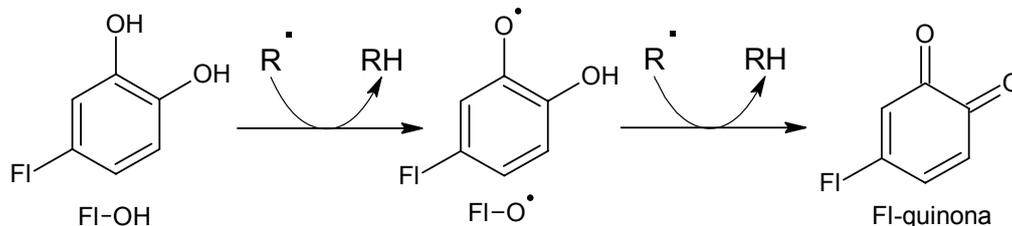
Mientras que las distintas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y en el patrón de sustitución del anillo C, los compuestos individuales entre clases se diferencian en el patrón de sustitución de los anillos A y B<sup>31</sup>.

### 2.1.2.3. Características estructurales y actividad antioxidante

Los flavonoides pueden actuar como antioxidantes mediante un gran número de vías, la más importante parece ser aquella en la que actúa como agentes secuestrantes de los radicales libres conocidos como especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (**Sección 1.1.2.**), como hidroxilo, peróxido

## 2.1. INTRODUCCIÓN: Flavonoides

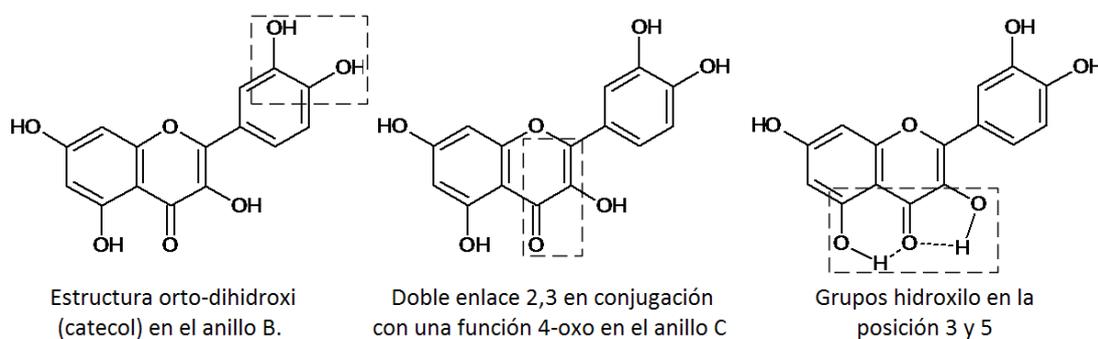
y peroxinitrito interrumpiendo así las reacciones en cadena que llevan a un daño en los tejidos. La actividad antioxidante de flavonoides y sus metabolitos *in vitro* depende de la disposición de los grupos funcionales sobre la estructura del núcleo<sup>37</sup>. La presencia de grupos hidroxilo en los flavonoides les permite donar un átomo de hidrógeno y un electrón a esas especies reactivas radicalarias, formando un radical mucho más estable debido a la alta deslocalización del electrón desapareado (**Fig. 5**).



**Figura 5.** Acción secuestrante de radicales (R<sup>•</sup>) por parte del flavonoide. El radical libre FI-O<sup>•</sup> puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo la estructura de quinona estable<sup>31</sup>.

A causa de este mecanismo, en el que se genera un radical estable, hay ciertas características estructurales que ayudan a generar una mayor deslocalización y por lo tanto, generan una mayor eficiencia en la capacidad secuestrante. Las principales características estructurales pueden resumirse en las siguientes<sup>38</sup>:

- 1) Una estructura orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B necesaria para la deslocalización del electrón, una vez generado el radical.
- 2) Doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C en combinación con el grupo 4-oxo de dicho anillo. Aquellos compuestos que tengan ambas características presentan una fuerte actividad antioxidante ya que se generan estructuras de hiperconjugación sobre la molécula entera.
- 3) Grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 proveen un puente de hidrógeno con el grupo 4-oxo. Los flavonoides con un grupo OH en la posición 3 del anillo C son planares, pero los que carecen de este grupo están levemente torcidos. La planaridad permite la conjugación, la deslocalización electrónica, y el correspondiente aumento de la estabilidad del radical fenoxilo del flavonoide. Uno de los flavonoides que reúne las condiciones es la quercetina (**Fig. 6**), es por esta razón que este compuesto se toma como referente de una sustancia con fuerte capacidad antioxidante<sup>37</sup>.



**Figura 6.** Flavonoide quercetina con las principales características estructurales necesarias para una mayor eficiencia como secuestrante de radicales libres<sup>39</sup>.

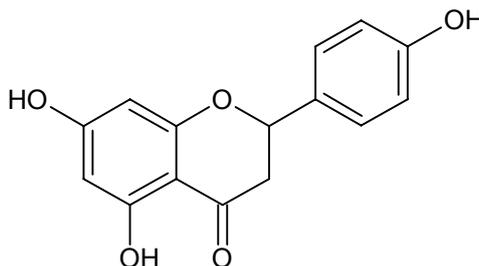
## 2.1. INTRODUCCIÓN: Flavonoides

La importancia de otros grupos OH es menos clara pero más allá del aumento del número de estos grupos, la sustitución en el anillo A se correlaciona poco con la actividad antioxidante. La presencia de un grupo OH en la posición 5 del átomo de C (5-OH) del anillo B puede contribuir a dichos efectos. También, el grupo OH en la posición 3 del anillo C es muy importante en la actividad antioxidante de los flavonoides.

Por otro lado, los compuestos polifenólicos pueden convertirse en moléculas prooxidantes<sup>40</sup>. Bajo ciertas circunstancias, los flavonoides son capaces de promover la oxidación de otros compuestos ya que pueden reaccionar con iones metálicos con reacciones del tipo Fenton. Las propiedades prooxidantes o antioxidantes de un flavonoide en particular dependen sobre todo de su concentración<sup>38</sup>.

### 2.1.2.4. Naringenina

La naringenina (**Fig. 7**) es una flavonona (4',5,7, trihidroxiflavanona) que se encuentra en el pomelo, naranja y piel de tomates<sup>41</sup>. Como todos los flavonoides, tiene propiedades antioxidantes, sin embargo, la falta del doble enlace entre los carbonos 2 y 3, sumado a la falta de grupos OH en posición 3, 3' o 5' permite suponer que sus propiedades antioxidantes serán menos notorias que las de quercetina.



**Figura 7.** Naringenina (4',5,7, trihidroxiflavanona))

Se ha observado que este flavonoide y sus complejos metálicos tienen efectos biológicos como antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales<sup>42-44</sup>. Por ejemplo, el complejo de cobre con naringenina mejora la velocidad de inhibición de la proliferación de la línea celular HepG2 respecto al ligando de un modo relativamente significativo<sup>45</sup>.

### **2.1.3. COMPLEJOS DE ÓXIDOVANADIO(IV) CON FLAVONOIDES**

La actividad antitumoral del cisplatino (cis-diamino-dicloroplatino(II)) fue descubierta hace más de 40 años y desde ese momento dicho compuesto fue utilizado como un fármaco quimioterapéutico potente. El cisplatino juega un papel fundamental en el tratamiento frente a algunos tipos de cáncer: testículo, vejiga, ovario, cuello, cabeza, colorectal y pulmón<sup>46</sup>. Debido a que ciertos tipos de tumores malignos presentan resistencia al tratamiento con el cisplatino, se sintetizaron los denominados compuestos de platino de segunda generación<sup>47</sup>.

A partir de estos descubrimientos se comenzó a estudiar la aplicación de diferentes complejos metálicos como agentes terapéuticos. En particular, una gran variedad de compuestos de vanadio han sido sintetizados, en un esfuerzo por ofrecer una mejor tolerancia, una acción más potente, una mayor selectividad y menor toxicidad en los tratamientos terapéuticos por ejemplo en diabetes, osteogénesis y cáncer<sup>48</sup>.

Existe evidencia que complejos de vanadio con diversos ligandos ejercen una acción citotóxica muy fuerte frente a diversos tipos de cáncer. Dong y colaboradores sintetizaron 4 complejos de vanadio utilizando como ligandos 1,10-fenantrolina y 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y encontraron que estos compuestos exhiben una potente actividad citotóxica sobre las células de leucemia linfoblástica aguda. Dicha actividad está modulada por el entorno de coordinación<sup>49</sup>. El complejo sulfato de bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) oxidovanadio(IV) o Metvan es un agente anticancerígeno potente, cuya propiedad es inducir la apoptosis de células de leucemia humana, células de mieloma múltiple y una serie de tumores sólidos derivados de pacientes con cáncer<sup>50</sup>. También existen reportes de un nuevo complejo de oxidovanadio(IV) con curcumina, el cual es más efectivo que el ligando libre frente a células de linfoma de ratón<sup>51</sup>.

Además de estos ejemplos, en nuestro grupo de trabajo, se testeó el complejo de oxidovanadio(IV) con hesperidina, frente a dos líneas tumorales, UMR106 (derivadas de osteosarcoma de rata) y Caco-2 (adenocarcinoma de colon) observándose que mejora el efecto antiproliferativo del ligando lo cual se correlaciona con alteraciones morfológicas que se traducen en apoptosis<sup>52</sup>.

Con respecto a los flavonoides, como se mencionó anteriormente, son compuestos con actividad antioxidante. Se sabe que el daño oxidativo a diferentes macromoléculas se encuentra asociado a la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer, es por eso que se han intentado diferentes terapias anticancerígenas empleando flavonoides<sup>53</sup>. Este efecto, sumado a lo mencionado para complejos de vanadio, llevó a nuestro grupo de investigación a estudiar anteriormente complejos de coordinación de oxidovanadio(IV) con distintos flavonoides como crisina, silibinina, morina y quercetina<sup>54-59</sup>.

En el presente trabajo de tesis, se propone estudiar el complejo de coordinación de oxidovanadio(IV) con el flavonoide naringenina, para determinar la relación entre la estructura del complejo y las actividades biológicas. Posteriormente, se busca comparar estas actividades con las reportadas previamente para los otros complejos de oxidovanadio(IV) con los flavonoides estudiados previamente.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL VONar

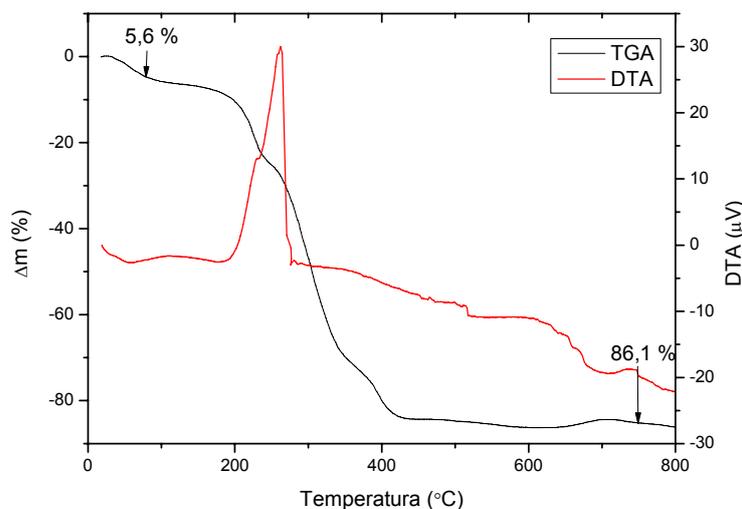
### 2.2.1. Síntesis del complejo VONar

La síntesis del complejo  $[\text{VO}(\text{nar})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]_n$  (VONar) se realizó a partir de una solución de naringenina disuelta en etanol absoluto (0,5 mmol, 3 ml), el pH se llevó a 8 mediante el agregado de una solución de hidróxido de amonio (solución al 30 % de amoníaco en agua) en etanol absoluto ( $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ ). Luego se le agregó una solución acuosa de  $\text{VOCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,25 mmol, 500  $\mu\text{l}$ ) bajo agitación continua, se ajustó el pH de la solución verde a 8 con  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{EtOH}$ . Para prevenir procesos de oxidación tanto de naringenina como de oxidovanadio(IV) debido al oxígeno atmosférico, se realizó la síntesis en atmósfera de nitrógeno. Luego de la evaporación del etanol, causada por el flujo de nitrógeno a temperatura ambiente, se obtuvo un precipitado verde amarillento que se filtró y se lavó varias veces con agua y se secó en estufa a 60 °C. Anal. Calc.: C: 55.7 %; H: 4.0 %; V: 7.9 %; Exp: C: 55.6 %; H: 4.0 %; V: 7.8 %.

### 2.2.2. Estudios en fase sólida

#### 2.2.2.1. TGA-DTA

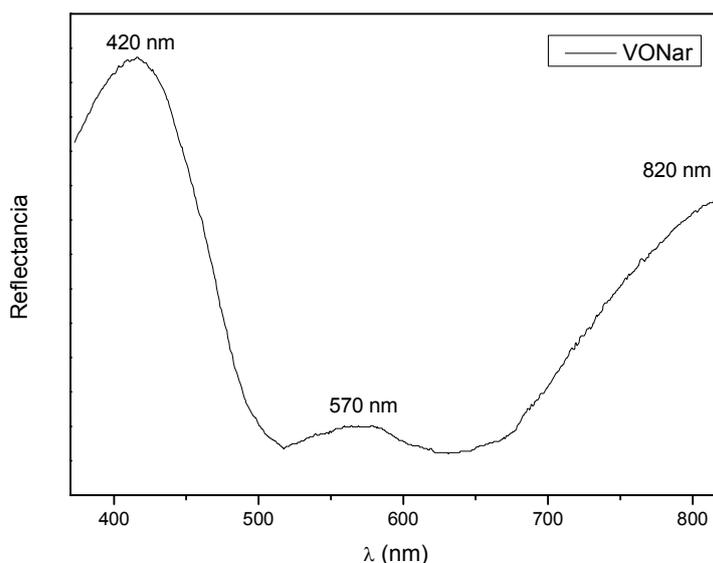
El análisis termogravimétrico del complejo VONar (**Fig. 8**) confirma la presencia de dos moléculas de agua lábiles (pérdida experimental: 85,9 %, calculada: 86,1 %, acompañada de un pico endotérmico, DTA, a 60 °C). A 600 °C la pérdida total (85,9 %, calculada; 86,1 %, experimental) está de acuerdo con la formación de  $\text{V}_2\text{O}_5$  caracterizado por medidas de espectroscopía FTIR.



**Figura 8.** Curva termogravimétrica (TGA) (línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA) (línea roja) el complejo sólido  $[\text{VO}(\text{nar})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]_n$  (VONar) en atmósfera de  $\text{O}_2$ .

### 2.2.2.2. Reflectancia difusa

El espectro de reflectancia difusa de la muestra policristalina del complejo VONar (**Fig. 9**) muestra tres bandas que se asignan a transiciones d-d. La primera de ellas, en 420 nm, se asigna a la transición  $d_{xy} \rightarrow d_z^2$ , la banda en 570 nm se asigna una transición  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ . La última banda observada (de menor energía) en 820 nm se asigna a la transición  $d_{xy} \rightarrow (d_{xz}, d_{yz})$ .



**Figura 9.** Espectro de reflectancia difusa experimental para el complejo sólido en polvo microcristalino  $[\text{VO}(\text{nar})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]_n$  (VONar).

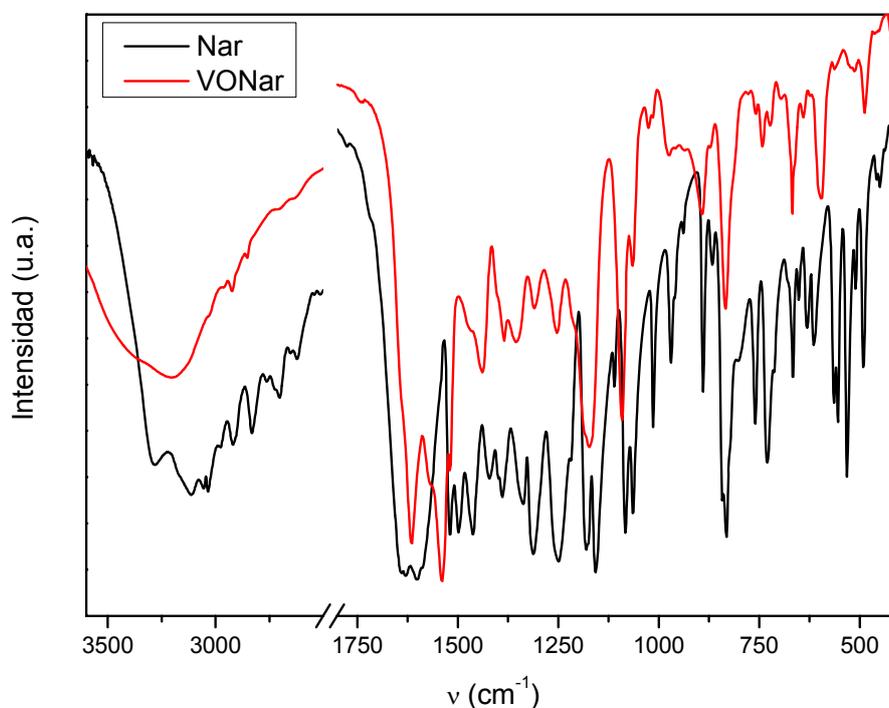
### 2.2.2.3. Espectroscopía FTIR

Se midió el espectro FTIR del complejo obtenido de VONar y se lo comparó con el de la naringenina (**Fig. 10**). Para este nuevo complejo, se observaron corrimientos en las bandas en comparación con el ligando, de manera similar a lo que se observa para otros complejos de flavonoides con vanadio<sup>54-57</sup>. El espectro en particular es comparable con el del complejo VO-Crisina ya que tienen una estructura similar (con excepción de la presencia del doble enlace  $\text{C}2=\text{C}3$  y la ausencia del grupo  $4'\text{-OH}$ ). La banda del estiramiento característico  $\text{C}=\text{O}$  de la naringenina se corre de  $1634 \text{ cm}^{-1}$  a  $1614 \text{ cm}^{-1}$  debido a la coordinación, mostrando su interacción con el centro metálico. La banda asociada a los modos de deformación vibracional de los grupos  $5\text{-OH}$  y  $7\text{-OH}$  ( $1601 \text{ cm}^{-1}$ ) de la naringenina aparece como un hombro de baja intensidad en el complejo. Estos resultados sugieren que el catión  $\text{V}=\text{O}$  coordina a través del oxígeno carbonílico y el grupo  $5\text{-OH}$  del anillo A. La formación de este quelato es responsable del incremento de la longitud del enlace  $\text{C}=\text{O}$  lo que conlleva a un corrimiento de  $20 \text{ cm}^{-1}$  hacia menores longitudes de onda de la banda originada por este modo vibracional de estiramiento. Las nuevas bandas localizadas en  $1540 \text{ cm}^{-1}$  y  $1441 \text{ cm}^{-1}$  se han asignado a estiramientos simétricos y antisimétricos del  $\text{C}5\text{-O}5$  en el sitio quelante. La banda del

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

estiramiento C-O-C del anillo C en  $1251\text{ cm}^{-1}$  no se modifica por la coordinación con el metal, indicando la ausencia de una interacción de este grupo con el centro metálico.

La banda ancha en  $973\text{ cm}^{-1}$  que se encuentra solapada con las banda del ligando en  $968\text{ cm}^{-1}$  ha sido asignada al estiramiento característico del V=O. Esta posición de la banda es típica para el ión oxidovanadio(IV) coordinado con los grupos C=O y OH de los flavonoides en una forma quelante. En relación a la frecuencia de estiramiento del grupo V=O, la formación de un compuesto polimérico que forma cadenas del tipo  $\text{V=O}\cdots\text{V=O}\cdots\text{V=O}$  (ver discusión de espectroscopia de EPR, **sección 2.2.2.4**), provoca un elongamiento del enlace V=O, y por tanto se espera en consecuencia una baja frecuencia de estiramiento que generalmente se da alrededor de  $890\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ <sup>60</sup>. En nuestro caso, se observa en el espectro FTIR (KBr) que la banda localizada en  $890\text{ cm}^{-1}$  se ensancha un poco y corre su máximo ligeramente hacia  $897\text{ cm}^{-1}$ . Para verificar la localización de la misma se procedió a medir el espectro utilizando nujol ya que es conocido el hecho que la molienda manual utilizada para la preparación de las muestras de FTIR en pastilla de KBr provoca la ruptura parcial del polímero para dar fragmentos de las cadenas poliméricas con la consecuente disminución de la intensidad de la banda típica del polímero y el aumento de la intensidad de la banda del estiramiento V=O (alrededor de  $970\text{ cm}^{-1}$ ) característica de la especie monomérica. De esta manera pudimos comprobar (en espectro medido en nujol, no se muestra) el aumento de intensidad de la banda localizada en  $897\text{ cm}^{-1}$  (que se encontraba solapada con la banda del ligando en el espectro con KBr) la cual es típica para los complejos de vanadio de este tipo.

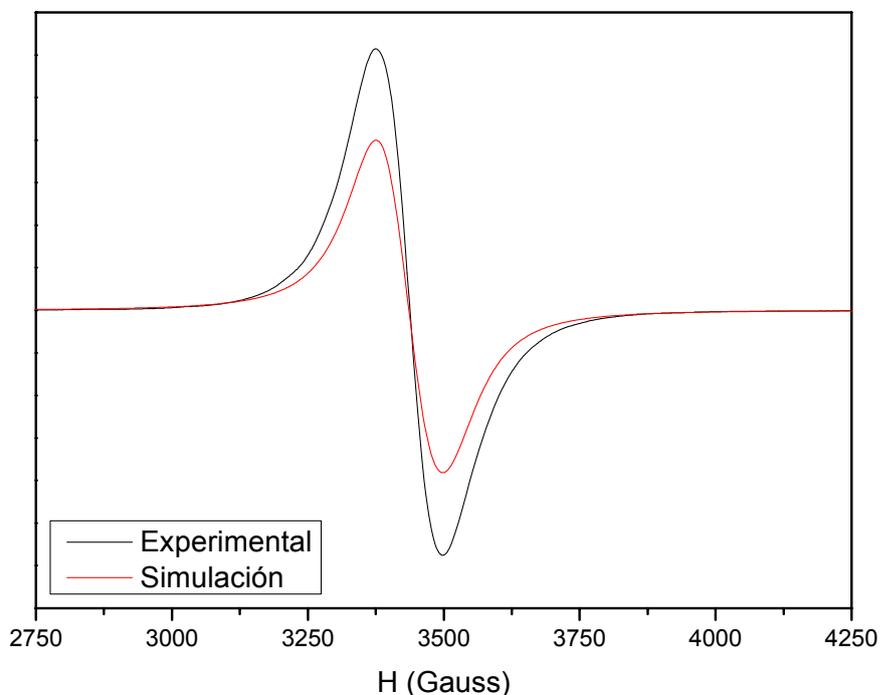


**Figura 10.** Espectros experimentales FTIR de Nar (negro) y VONar (rojo).

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

### 2.2.2.4. Resonancia paramagnética electrónica (EPR) y medidas magnéticas

Se midió el espectro EPR en banda X a temperatura ambiente de la muestra policristalina del complejo VONar (**Fig. 11**). El espectro cuasi-isotrópico consiste en una línea ancha debido a interacciones mutuas de los sitios  $V^{IV}O$  (núcleos de  $^{51}V$  ( $I=7/2$ ) 100 % abundantes) típicos para complejos de vanadio (IV). La simulación predice una señal originada a partir de un cromóforo de vanadio es consistente con el ión oxidovanadio(IV) en un entorno de campo ligando axial o pseudoaxial. Los parámetros del Hamiltoniano de spin  $g_{\parallel}=1,968$  y  $g_{\perp}=1,976$  ( $g_{iso}=1,973$ ) reflejan una pequeña anisotropía. Este espectro puede ser atribuido a un intercambio magnético entre los cromóforos de  $V^{IV}O$  con diferentes orientaciones, sugiriendo la presencia de arreglos polinucleares<sup>54</sup>.



**Figura 11.** Espectro de resonancia paramagnética electrónica experimental (negro) y simulación (rojo) de la muestra del complejo de  $[VO(nar)_2 \cdot 2H_2O]_n$  (VONar) medido a temperatura ambiente en banda X.

La observación de la línea de EPR que correspondería a una resonancia colectiva se podría relacionar con una constante de interacción (J) entre iones magnéticos (localizados en diferentes sitios de red) mayor que la diferencia entre sus energías Zeeman.

Por esta razón, se realizaron medidas de susceptibilidad magnética del complejo entre 5 y 300 K. La variación térmica de la inversa de la susceptibilidad magnética molar ( $\chi_m^{-1}$ ) y el producto  $\chi_m T$  se muestran en la **figura 12**. Sobre todo el rango de temperatura, la susceptibilidad magnética

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

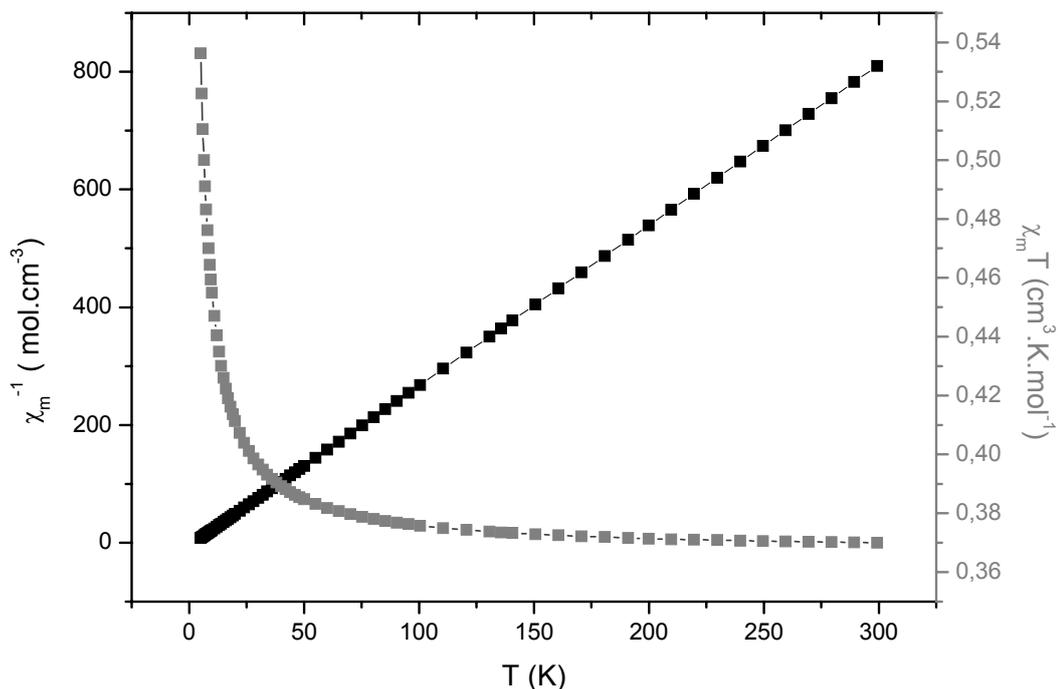
cumple la ley de Curie-Weiss ( $\chi_m = C_m / T - \theta$ ) con  $C_m = 0,37 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$  y  $\theta = +2,1 \text{ K}$ . La constante de Curie observada concuerda con la calculada con el valor de  $g$  ( $0,36 \text{ cm}^3 \text{ K mol}^{-1}$ ). El momento magnético efectivo crece continuamente con el aumento de temperatura, más rápidamente a temperaturas menores de 20 K. Los dos factores, la intersección positiva de la temperatura y el incremento del momento magnético efectivo a bajas temperaturas están de acuerdo con la presencia de interacciones ferromagnéticas débiles en el compuesto. Como se carece de datos cristalográficos para el compuesto se usaron diferentes modelos para ajustar el comportamiento magnético observado y determinar la naturaleza de los arreglos polinucleares: dímeros, cadenas o capas. Finalmente, los datos experimentales pudieron ser modelados usando la siguiente expresión analítica que describe el comportamiento de cadenas regulares con  $S = 1/2$  usando un Hamiltoniano de Heisenberg isotrópico:  $H = -2J\sum S_i S_{i+1}$

$$\chi_m = \frac{Ng^2\beta^2}{4kT} \left( \frac{1 + A_1x + A_2x^2 + A_3x^3 + A_4x^4 + A_5x^5}{1 + B_1x + B_2x^2 + B_3x^3 + B_4x^4} \right)^{2/3}$$

Con  $x = J/k$  ;  $A_1=5,798$  ;  $A_2=16,902$  ;  $A_3=29,377$  ;  $A_4=29,833$  ;  $A_5=14,037$  ;  $B_1=2,798$  ;  $B_2=7,009$  ;  $B_3=8,654$  ;  $B_4=4,574$  y donde  $N$  y  $k$  son las constantes de Avogadro y de Boltzmann, respectivamente, y  $\beta$  es el magnetón de Bohr.

El mejor ajuste se obtuvo minimizando el factor  $R$ ,  $R = \sum[\chi_m T^{\text{exp}} - \chi_m T^{\text{cal}}]^2 / \sum[\chi_m T^{\text{exp}}]^2$ . Como se observa en la **figura 12**, se obtiene un acuerdo excelente con los datos experimentales y teóricos usando  $g = 1,98$  y  $J/k = +0,6 \text{ K}$  ( $R=1,5 \times 10^{-5}$ ). Por lo tanto, el comportamiento magnético de este compuesto se corresponde con las interacciones propagadas sobre cadenas regulares de iones  $\text{VO}^{2+}$ . Este resultado también concuerda con la falta de observación de la típica señal a “campo mitad” en el espectro de EPR y confirma la ausencia de entidades diméricas en el sistema.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA



**Figura 12.** Dependencia de la temperatura con la susceptibilidad magnética ( $\chi_m$ ) y del producto con la temperatura ( $\chi_m \cdot T$ ) para el VONar.

### 2.2.2.5. Estructura propuesta para el sólido

La estructura propuesta para el complejo de coordinación VONar, tuvo en cuenta los ensayos mencionados anteriormente. En resumen, el análisis elemental muestra una relación de 2 ligandos por cada metal, mientras que el análisis termogravimétrico da cuenta de dos moléculas de agua de hidratación. Por otro lado, mediante espectroscopía FTIR, se observaron corrimientos con respecto al ligando en las bandas relacionadas al doble enlace C=O y al 5-OH de la naringenina, por lo que se propone que el flavonoide está actuando como ligando quelato con el catión oxidovanadio(IV). Finalmente, la señal de EPR muestra señales correspondientes a arreglos polinucleares, las medidas de susceptibilidad magnética sugieren que se trata de interacciones muy débiles en cadena del tipo  $\cdots V=O \cdots V=O \cdots V=O$  confirmándose esto último por FTIR con el comportamiento de las bandas relacionadas al estiramiento del enlace  $\nu(V=O)$ .

Por estas razones, la estructura propuesta para el monómero del complejo de VONar es la que se muestra en la **figura 13**.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

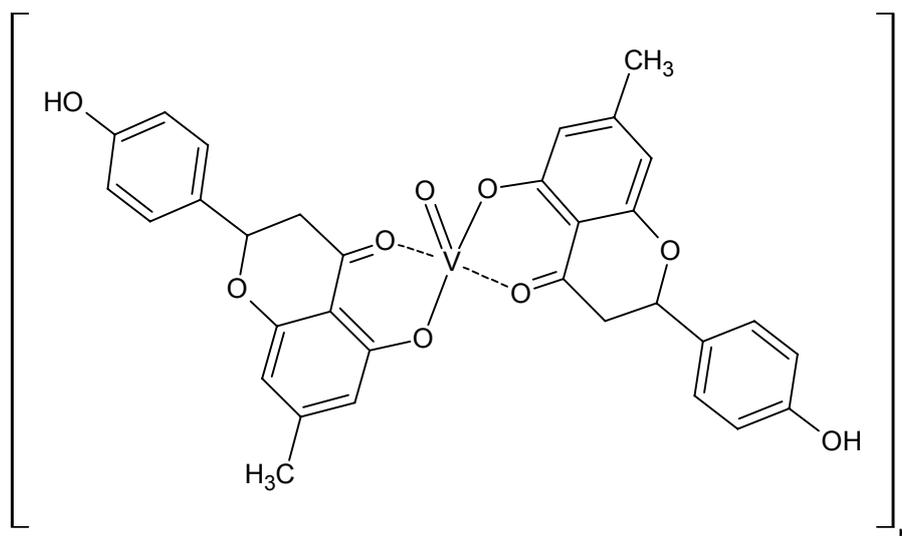


Figura 13. Estructura propuesta para el complejo sólido VONar

### 2.2.3. Estudios en solución

#### 2.2.3.1. Variación con el pH

La naringenina muestra dos bandas de absorción dependientes del pH en la región del UV. La banda en el rango de 290-330 nm corresponde a la porción del anillo B (banda I), mientras que la banda entre 225-250 nm corresponde al anillo A (banda II) (**Fig. 14**). La flavanona tiene un anillo heterocíclico y saturado C con una falta de conjugación entre los anillos A y B con la consecuente separación de los orbitales HOMO y LUMO de los anillos A y B. Esta ausencia de conjugación conlleva a un corrimiento hacia el azul de la banda principal, en relación a otros flavonoides<sup>61,62</sup>.

Las constantes de desprotonación para la naringenina en solución acuosa a 25 °C son:  $pK_{a1} = 6,7$ ,  $pK_{a2} = 9,1$ ;  $pK_{a3} = 13,0$ . Mediante el análisis espectral se demostró previamente que el  $pK_2$  corresponde a la ionización del grupo 4'-OH (anillo B),  $pK_{a1}$  al 5-OH y el  $pK_{a3}$  al 7-OH, estos últimos del anillo A<sup>63</sup> (**Fig. 14**)

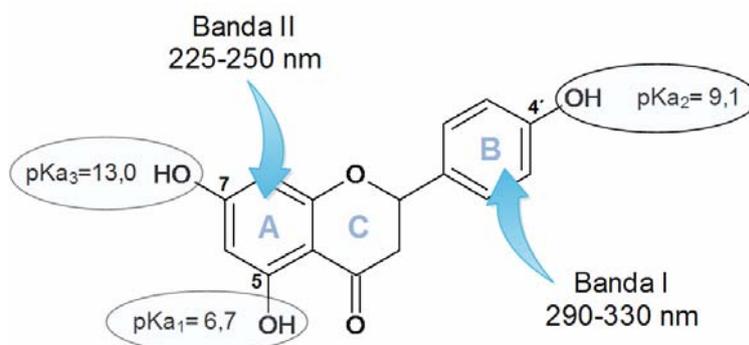
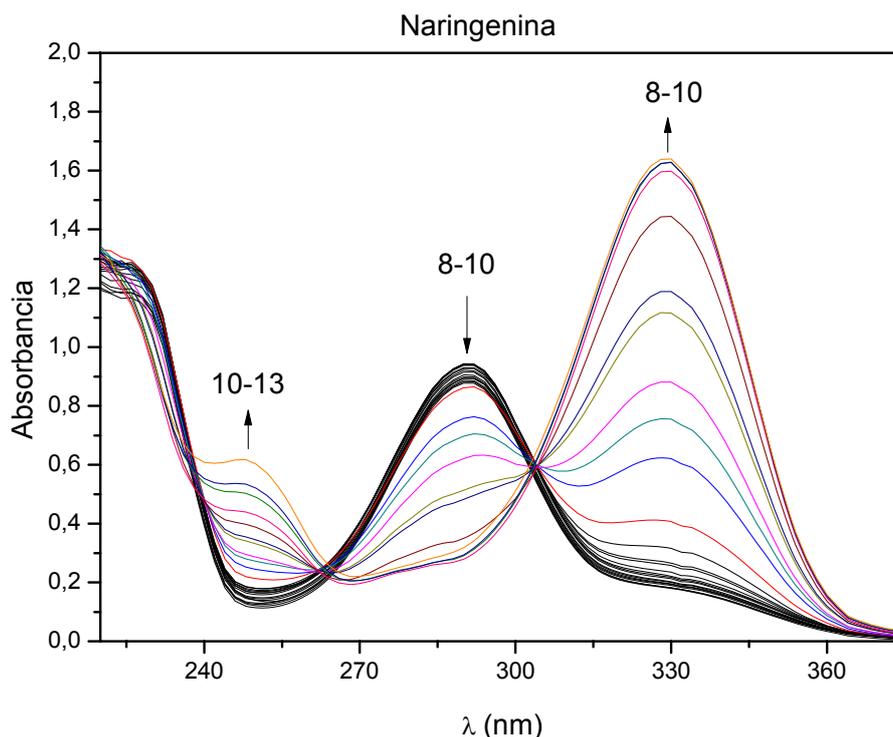


Figura 14. Resumen de las principales bandas características en el espectro electrónico observadas en la región UV de la naringenina y de sus valores de pKa.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

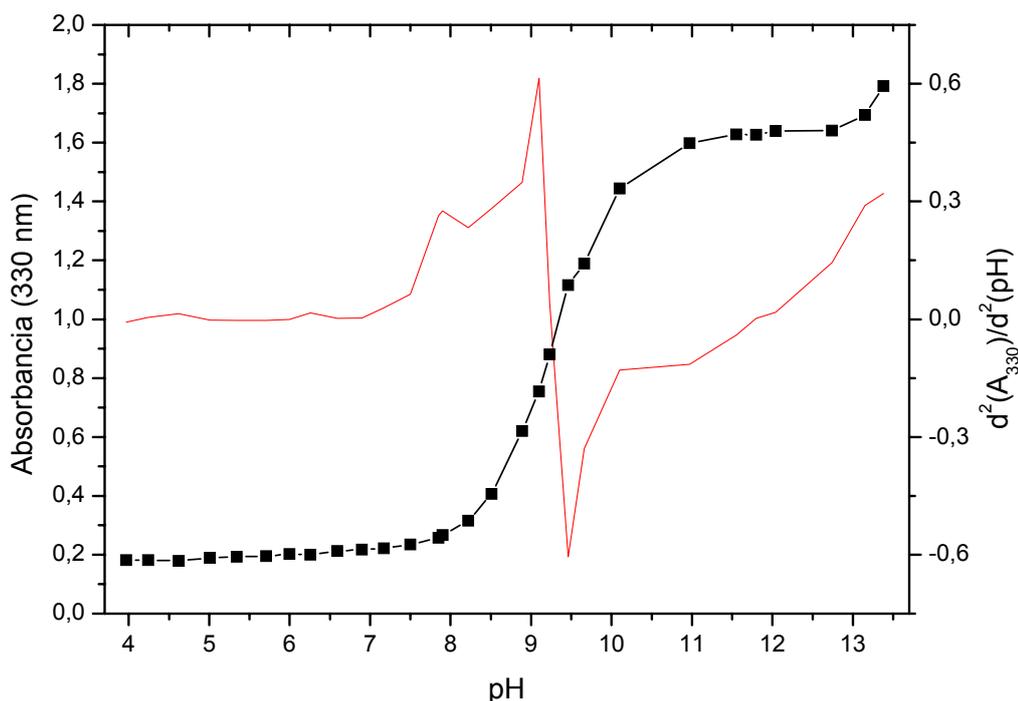
. El espectro electrónico de la naringenina en solución etanólica depende también del pH (**Fig. 15**) y puede relacionarse con lo determinado previamente en solución acuosa. La banda en 250 nm incrementa su intensidad a valores de pH mayores a 10 lo que es indicativo de una tercera desprotonación, perteneciente al anillo A (7-OH). La banda de 290 nm disminuye su intensidad a pH entre 8 y 10 debido a un corrimiento hacia 330 nm (banda que incrementa su intensidad en el mismo rango de pH) con un claro punto isosbético que indica la presencia de dos formas de la naringenina en equilibrio ( $\text{narH}_2^-$  y  $\text{narH}^{2-}$ ). Este corrimiento está de acuerdo con un cambio electrónico en el anillo B, demostrando la ionización del grupo 4'-OH ( $\text{pK}_{a2} = 9,1$ ).



**Figura 15.** Espectro de la variación del pH de una solución de naringenina en etanol ( $4 \times 10^{-5}$  M), el pH se ajustó con la mínima cantidad necesaria de NaOH (1 M) y HCl (1 M). En negro se agrupan los espectros en el rango de pH entre 3 y 8. Las flechas muestran las variaciones de las curvas en los distintos rangos de pH entre 8 y 13.

Para medir los valores de  $\text{pK}_a$ , se graficaron los cambios en la absorbancia a 330 nm en función del pH (**Fig. 16**). El único valor que pudo ser determinado correctamente fue el  $\text{pK}_{a2}$ , realizando la derivada segunda de la curva logarítmica. Para esta nueva función, se observó el cambio de signo, correspondiente al  $\text{pK}_{a2}$  en un valor de 9,2 es similar a lo reportado previamente<sup>64</sup>. El valor de  $\text{pK}_{a3}$  no pudo ser obtenido por determinación directa. A partir del gráfico de la variación de la absorbancia a 250 nm vs. pH se observan indicios de que la tercera desprotonación ocurre con un  $\text{pK}_{a3}$  cercano a 13 (no mostrado), similar a lo reportado.

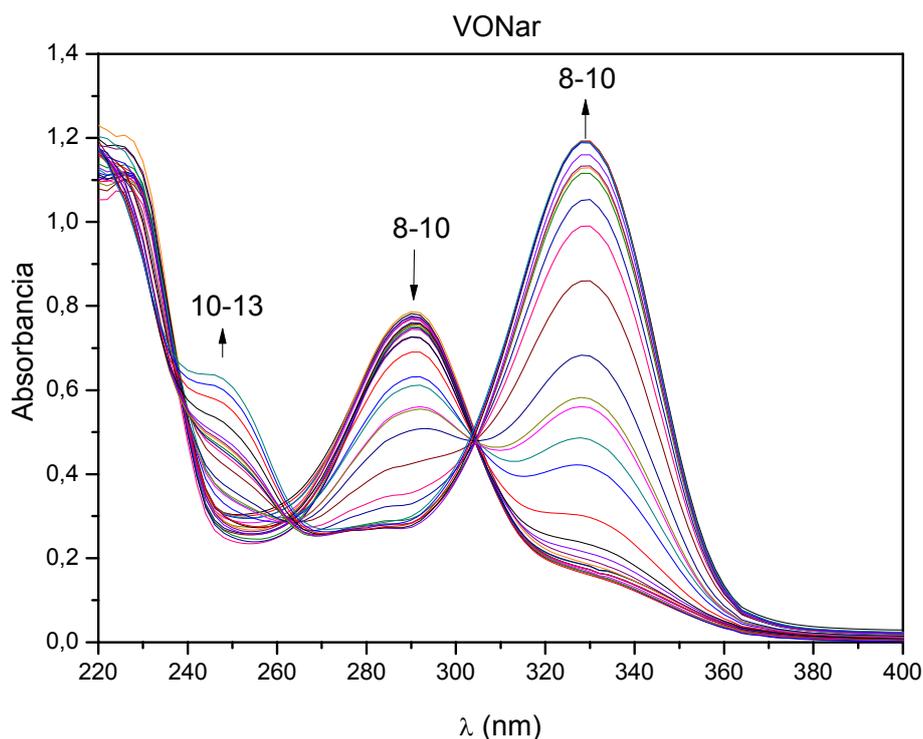
## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA



**Figura 16.** Efecto del pH en la absorbancia de la naringenina ( $\lambda = 330$  nm, negro) y determinación del segundo pKa por el método de la derivada segunda (rojo).

Después de la interacción con el ión oxidovanadio(IV), no se observan cambios apreciables en el espectro UV-vis a diferentes valores de pH. La coordinación del metal ha sido determinada a partir de la formación de un nuevo sistema de anillos de seis miembros entre el ión metálico y los átomos de oxígeno 5-OH y 4-oxo, que afecta las transiciones del anillo A (225 nm). El corrimiento de esta banda hacia menor energía parece ser el equivalente a lo que ocurre en la naringenina a valores de pH mayores que 10. La ausencia del doble enlace C2-C3 en el flavonoide hace que el anillo no sea planar y que no sea posible la conjugación entre los anillos B y C. Es por esta razón que se encontró el mismo patrón de variación de la banda I con el pH, tanto para Nar, como para VONar (**Fig. 17**), lo que es indicativo de una falta de interacción del anillo B con el centro metálico.

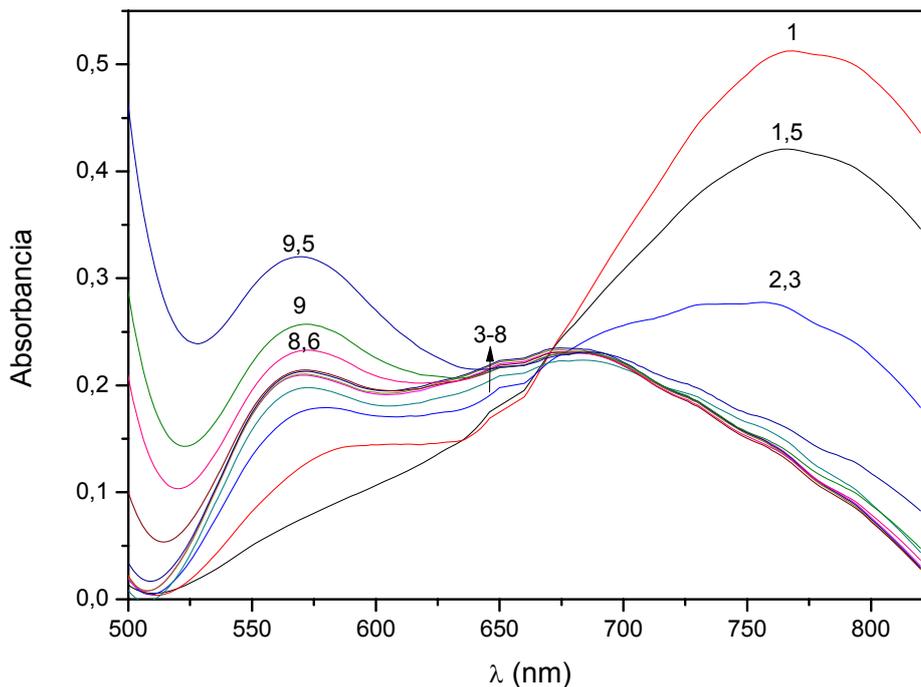
## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA



**Figura 17.** Espectros electrónicos de una solución etanólica de naringenina ( $4 \times 10^{-5}$  M) y  $\text{VOCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 10^{-5}$  M) ajustando el pH con la mínima adición de NaOH 1 M y HCl 1 M. Las flechas muestran las variaciones de las curvas en los distintos rangos de pH entre 8 y 13.

Con el fin de demostrar la coordinación del flavonoide con el catión metálico, por espectroscopía electrónica, se realizó la variación con el pH en la región del visible de una mezcla de soluciones etanólicas de oxidovanadio(IV) (0,015 M) y naringenina (0,03 M) (**Fig. 18**) en la que se observa la interacción del ligando con el metal. A valores de pH menores que 3, se observa un espectro típico de  $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ , mientras que a mayores valores, entre 3,5 y 8, las bandas del oxidovanadio(IV) a 620 nm y a 760 nm se corren a 576 nm, asignada a una transición  $3d_{xy} \rightarrow 3d_{x^2-y^2}$  ( $\epsilon = 14,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y a 680 nm, asignada a la transición  $3d_{xy} \rightarrow 3d_{xz,yz}$  ( $\epsilon = 15,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) con un patrón similar a otros complejos de flavonoides con oxidovanadio(IV). El desplazamiento de la banda de menor energía podría deberse a la pérdida en solución de la estructura en cadena postulada para el complejo sólido con el consecuente ingreso del solvente (etanol) en la sexta posición de coordinación. A valores de pH mayores a 8, se observan procesos de hidrólisis del catión oxidovanadio(IV).

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

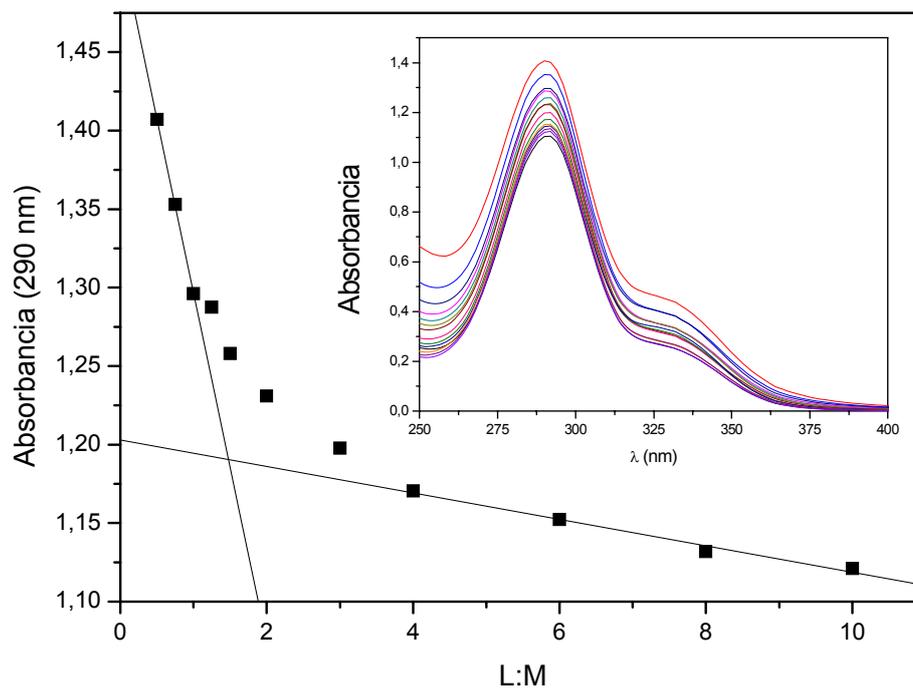


**Figura 18.** Espectro de absorción electrónica del VOCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ( $1,5 \times 10^{-2}$  M) y de la naringenina ( $3 \times 10^{-2}$  M) en solución etanólica, para diferentes valores de pH, ajustados con NH<sub>4</sub>(OH) 1,5 M y HCl 1M.

### 2.2.3.2. Titulación espectrofotométrica

Para determinar la estequiometría en solución del nuevo complejo sintetizado, se utilizó el método de la razón molar, observando las variaciones del espectro electrónico con el agregado creciente de metal en distintas relaciones (**Fig. 19, inset**). Tomando los máximos de las curvas en 290 nm y graficando en función de la relación ligando:metal (L:M), se obtuvo para este complejo, un valor de 2:1 (**Fig. 19**).

## 2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA



**Figura 19.** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo VONar por el método de la razón molar a 290 nm. Inset: Espectros electrónicos de las soluciones etanólicas de naringenina ( $5 \times 10^{-5}$  M) con la adición de  $\text{VOCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en una relación ligando-metal (L:M) desde 10 a 0,5. El pH se ajustó en 8 con una solución etanólica 5% de  $\text{NH}_4(\text{OH})$ .

### **2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

---

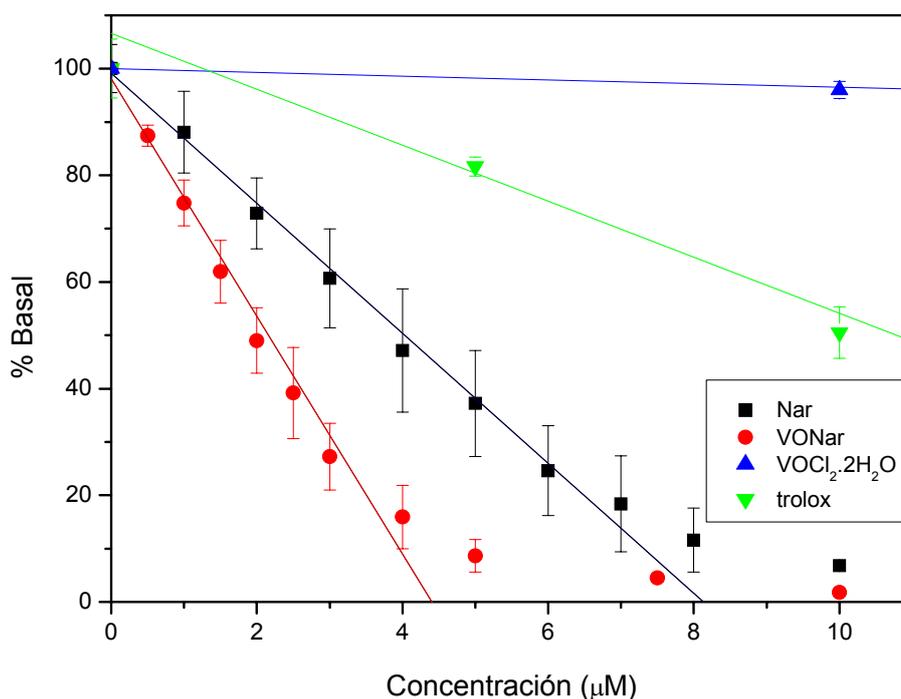
De acuerdo con la relación existente entre la estructura de los flavonoides y su actividad se puede ver que la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3 en las flavanonas, y la ausencia de la estructura catecol en el anillo B conlleva a un decrecimiento en su capacidad como antioxidante<sup>65</sup>. Además, debido a que los flavonoides tienen la habilidad de capturar electrones a través de sus grupos hidroxilo, la presencia de un doble enlace C2-C3 les confiere también una mayor estabilidad una vez que se forma el radical, previniendo así la propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres de oxígeno<sup>66</sup>. Es por esta razón que se espera que la naringenina, que no contiene el grupo 3-OH ni el doble enlace C2-C3 en su estructura, tenga una baja actividad antioxidante.

Para evaluar y comparar la capacidad antioxidante de la naringenina y de su complejo con vanadio (VONar), se realizaron medidas de capacidad secuestrante de radicales formados, como ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, peróxido (ROO<sup>•</sup>), radical OH<sup>•</sup>, y medidas de actividad SOD símil.

#### **2.3.1. Capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC)**

La capacidad de la naringenina y del complejo VONar de suprimir el radical catión ABTS<sup>•+</sup> se muestra en la **(Fig. 20)**. Se observó que tanto la naringenina, como el complejo VONar secuestran este radical. Si se lo compara con el trolox, se puede apreciar una mayor pendiente. Para cuantificar este valor, se dividen las pendientes de las rectas por el valor de la pendiente de trolox para todos los compuestos testeados. Este cociente se conoce como capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) y tiene un valor de 1 para el trolox. El valor calculado para la naringenina fue de 2,45, cercano a la mitad del valor de uno de los mejores flavonoides antioxidantes como es la quercetina. Este valor encontrado experimentalmente, que se encuentra dentro del rango de los diferentes valores reportados de TEAC que van desde 1,14 hasta 2,69<sup>31,37,67,68</sup>, es considerado bajo para los flavonoides, y demuestra la significancia de la insaturación del enlace C2-C3. Para el caso del complejo VONar, el valor de TEAC se incrementa, siendo 4,74 y duplicando de esta manera el valor observado para la naringenina. Es por esto, que en este caso, similar a lo anterior, la complejación mejora la actividad antioxidante del ligando.

### 2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

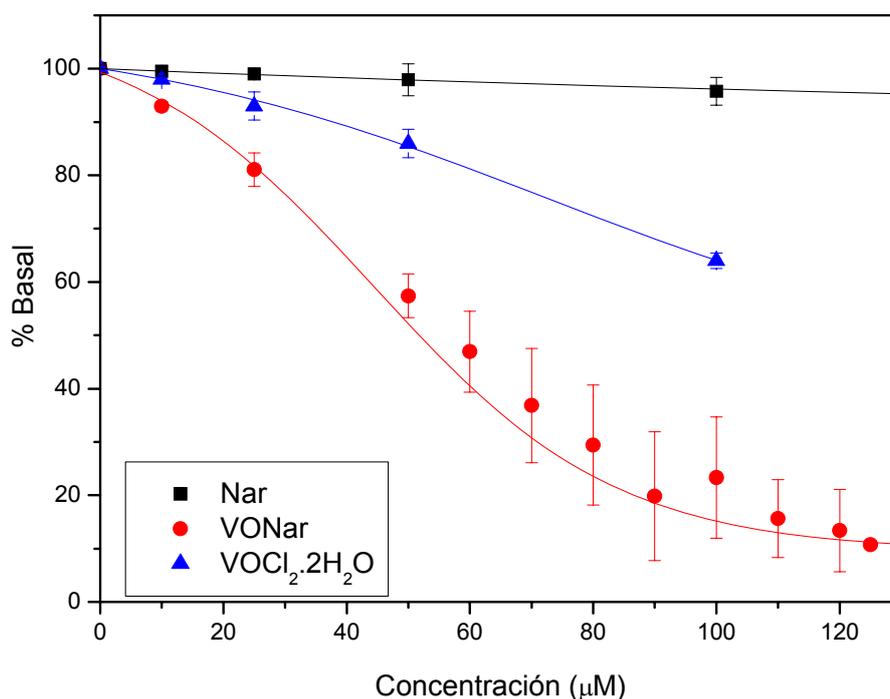


**Figura 20.** Ensayo de la actividad antioxidante total para el VONar (rojo), Nar (negro), VOCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul) y trolox (verde).

#### **2.3.2. Capacidad para secuestrar el radical DPPH<sup>•</sup>**

A partir de las medidas de capacidad secuestrante de radicales DPPH<sup>•</sup> para naringenina (**Fig. 21**), se determinó que el porcentaje de radicales secuestrados a una concentración 100 μM fue muy bajo ( $4 \pm 2$  %). Cuando los antioxidantes interaccionan con el DPPH<sup>•</sup> pueden transferir un electrón o átomo de hidrógeno para neutralizar el carácter de radical libre. La poca capacidad de la naringenina para secuestrar el radical DPPH<sup>•</sup> también ha sido explicada a causa de la ausencia del grupo O-dihidroxilo en el anillo B<sup>68-70</sup>. El complejo de vanadio por su parte, mejora notablemente la actividad, tanto de la naringenina como del catión oxidovanadio(IV) frente a este radical. La concentración de complejo que secuestra un 50% de los radicales DPPH<sup>•</sup> (IC<sub>50</sub>) fue 51,4 μM.

### 2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



**Figura 21.** Determinación de la capacidad para secuestrar radicales DPPH<sup>•</sup> para el VONar (rojo), Nar (negro) y VOCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

#### **2.3.3. Capacidad para secuestrar el radical peroxilo (ROO<sup>•</sup>)**

La capacidad secuestrante de los radicales peroxilo, tanto para la naringenina, como para el complejo VONar se muestra en la (**Fig. 22**). El ensayo se realizó a partir de la generación de estos radicales mediante descomposición térmica del AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropano)dihidrocloruro)<sup>71</sup>. Se midió espectrofotométricamente el retraso en el consumo de una sonda, como la piranina, (fase lag) calculado como el tiempo en el que el compuesto testeado consume los radicales peroxilo antes de que estos radicales reaccionen con la piranina<sup>72</sup>. Como resultado, la fase lag puede ser usada para determinar la capacidad de una sustancia para secuestrar los radicales peroxilo. No se encontró actividad de la naringenina frente a estos radicales. Sin embargo, para el complejo VONar si se encontró una pequeña fase lag dependiente de la concentración, a 100 μM el valor es de 2,9 min.

### 2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

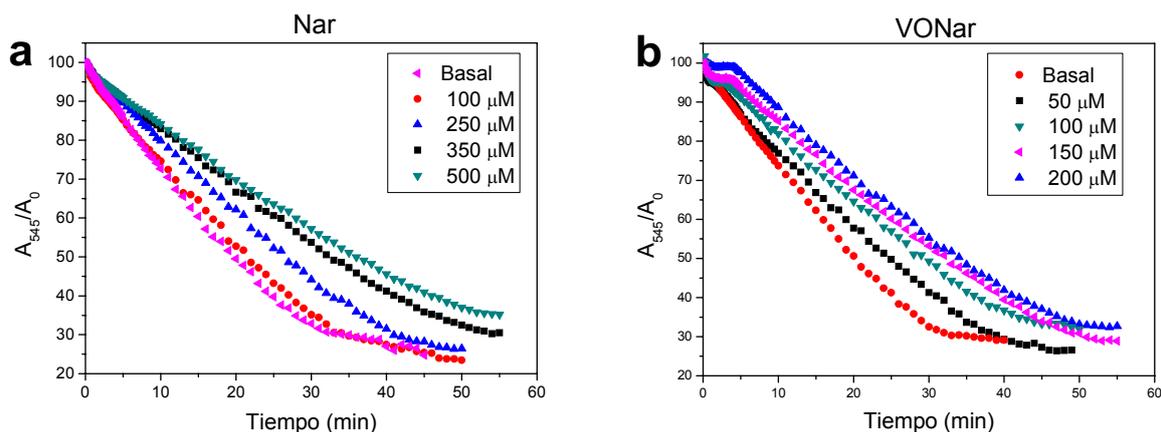


Figura 22. Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical  $\text{ROO}^\bullet$  para a) Nar y b) VONar.

#### 2.3.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) símil

La actividad SOD superóxidodismutasa símil (**Fig. 23**) se define como la concentración de compuesto testeado que produce un 50% de inhibición de la reducción del NBT (valor  $\text{IC}_{50}$ ). El poder reductor del radical superóxido medido para naringenina resultó ser mayor a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  similar a lo reportado previamente<sup>41,73-76</sup> (éstos valores determinan que la sustancia no posee actividad SOD símil). El comportamiento del complejo resultó similar al del ligando, y no se observaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones testeadas.

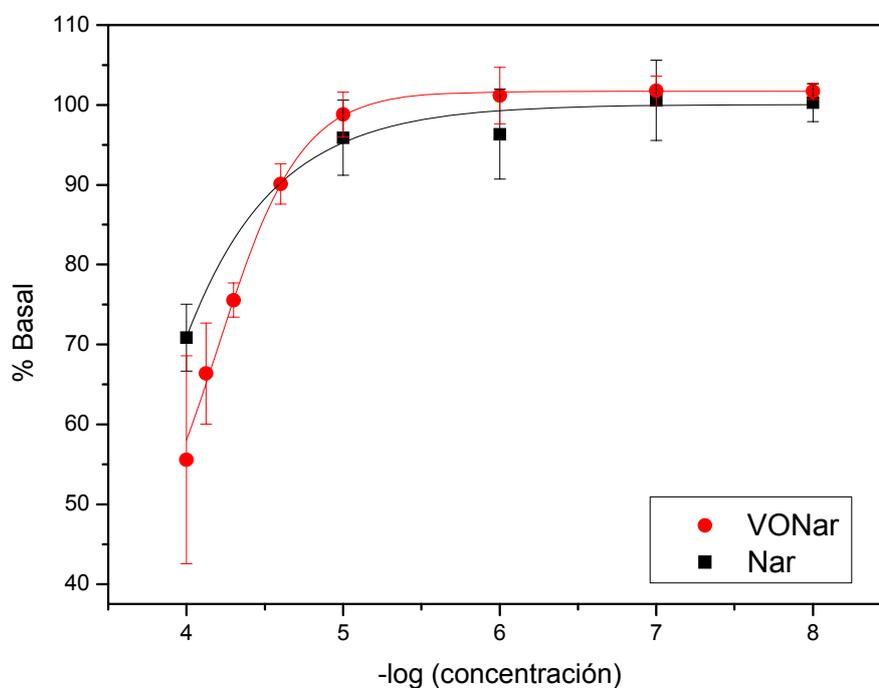
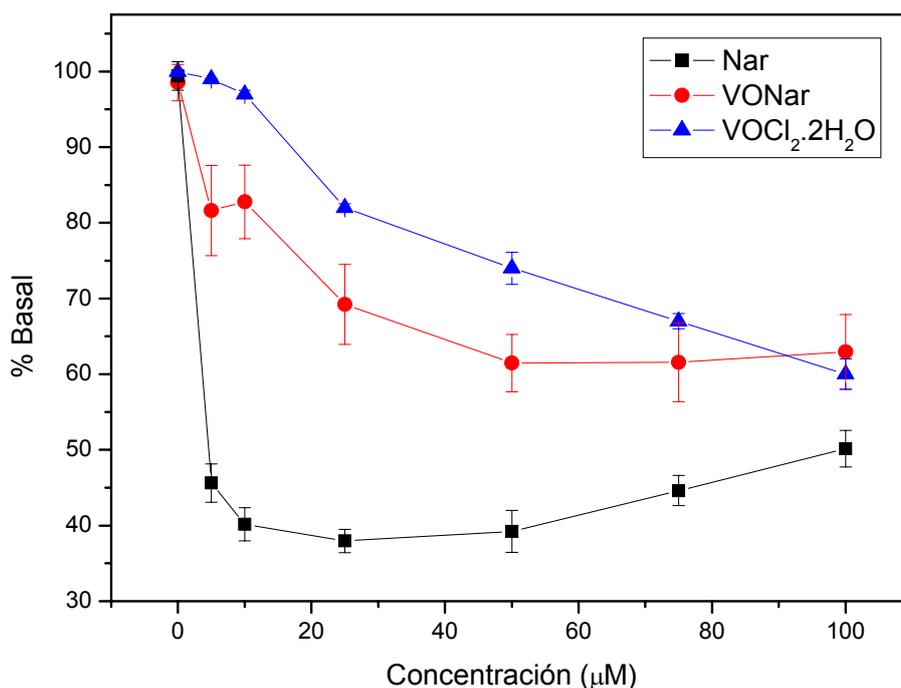


Figura 23. Ensayo de la actividad SOD símil para el VONar (rojo) y Nar (negro).

### 2.3.5. Capacidad secuestrante del radical OH<sup>•</sup>

La **figura 24** muestra la capacidad de la naringenina y del VONar de secuestrar radicales OH<sup>•</sup>. Para el flavonoide naringenina, se ha reportado previamente un comportamiento moderado como secuestrante de este radical<sup>75,77</sup>. Esto se encuentra de acuerdo con nuestras medidas (50% a una concentración de 100 μM). La complejación en este caso no mejora, sino que empeora la capacidad de secuestrar estos radicales, secuestrando a la máxima concentración probada solo un 37 % de los radicales.



**Figura 24.** Ensayo de la capacidad para secuestrar el radical OH<sup>•</sup> para Nar (negro), VONar (rojo) y VOCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul).

### 2.3.6. Resumen de la capacidad antioxidante

A modo de resumen de esta sección en la que se evaluó la capacidad antioxidante de la naringenina y de su complejo VONar, se puede concluir que las capacidades antioxidantes del flavonoide, en varios de los casos, se mejoraron por complejación con el catión oxidovanadio(IV) (**tabla 3**). La capacidad de secuestrar radicales DPPH<sup>•</sup> de la naringenina se incrementa por formación del complejo desde 4 a 67 % (a 100 μM). El valor de TEAC, obtenido de la relación de pendientes relativas al trolox para el complejo muestra dos veces el valor del ligando, similar también al valor de quercetina. Ambos, ligando y complejo, mostraron baja actividad SOD. El valor de IC<sub>50</sub> en ambos casos no pudo ser determinado debido a la baja solubilidad de ambos compuestos en concentraciones mayores a 100 μM. El complejo también exhibe actividad frente a los radicales peroxilo. Se ha observado un incremento

### 2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

en el tiempo de inducción (fase lag) de la reacción de una manera dosis-dependiente. La pendiente de la línea recta obtenida en este ensayo mostró que el VONar es más eficiente secuestrando radicales peroxilo que el trolox pero menos eficiente que el catión oxidovanadio(IV), y mucho menos que el flavonoide quercetina<sup>78</sup>. Por el contrario, luego de la complejación se observó una ligera disminución en la capacidad de secuestrar radicales OH<sup>•</sup> (desde 50 a 37 % para el ligando y en complejo respectivamente, a 100 µM).

**Tabla 3.** Porcentaje del poder secuestrante de radicales libres para la naringenina, VONar y oxidovanadio(IV). Los valores se expresan como la media ± la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Compuesto	DPPH <sup>•a</sup>	TEAC <sup>b</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-c</sup>	OH <sup>•a</sup>	ROO <sup>•</sup>
naringenina	4 ± 2	2,4	> 100	50 ± 2	-
VONar	67 ± 11	4,7	> 100	37 ± 5	2,9 <sup>d</sup>
V(IV)O <sup>2+</sup>	37 ± 2	0,2	15	38 ± 2	6,4 <sup>d</sup>
SOD <sub>nativa</sub>			0,2		

<sup>a</sup> porcentaje de capacidad secuestrante a 100 µM; <sup>b</sup> Equivalente de la capacidad antioxidante de Trolox; <sup>c</sup> actividad SOD símil (IC<sub>50</sub> (µM)); <sup>d</sup> fase lag (min) a 100 µM.

Finalmente, se compararon estos valores con los reportados previamente en nuestro grupo para los flavonoides crisina, silibinina, y morina, y sus complejos con vanadio (**Tabla 4**). En esta comparación, queda en evidencia lo mencionado anteriormente, que por su estructura la naringenina tiene una menor actividad frente a los radicales testeados. Este pobre efecto antioxidante es más notorio en los radicales DPPH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> y actividad SOD símil. Si bien el complejo mejora estas actividades en la mayoría de los casos, si se los compara con los complejos de los otros flavonoides, se puede observar que la actividad frente a los radicales es ligeramente menor que el promedio para los radicales DPPH<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> y actividad SOD símil. Sin embargo, tiene el mayor valor de TEAC de los complejos testeados. También resulta en evidencia que la modificación estructural del ligando por coordinación con el oxidovanadio(IV) produce en algunos casos la alteración de la falta de actividad del ligando.

**Tabla 4.** Comparación de todos los flavonoides y complejos con oxidovanadio(IV) testeados en nuestro grupo de investigación.

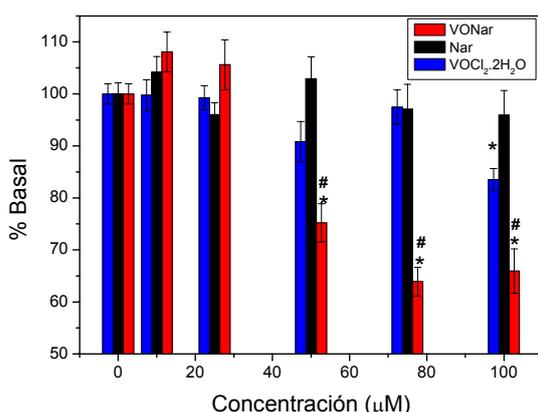
Flavonoide/ complejo	DPPH <sup>•a</sup>	ABTS <sup>•+b</sup> (TEAC)	O <sub>2</sub> <sup>-•b</sup>	OH <sup>•a</sup>	ROO <sup>•</sup>
Crisina / VOcrisina <sup>55</sup>	18 / 45	0,9 / 3,9	* / *	50 / 75	ND
Silibinina / VOsilibinina <sup>56</sup>	16 / 83	1,8 / 1,8	3,2 / 0,3	24 / 45	5,0 <sup>c</sup> / 11,9 <sup>c</sup>
Morina / VOmorina <sup>57</sup>	88 / 90	2,0 / 1,9	66 / 54	30 / 60	5,2 <sup>d</sup> / 1,8 <sup>d</sup>
Hesperidina/VOhesperidina <sup>52</sup>	25 / 30	0,7/0,6	2,2 / 15	ND	ND
Naringenina / VONaringenina	4 / 67	2,4 / 4,7	* / *	50 / 37	* / 2,9 <sup>d</sup>
V(IV)O <sup>2+</sup>	37		15	38	6,4 <sup>d</sup>
SOD <sub>nativa</sub>			0,2		

<sup>a</sup> (100-% basal) a 100 µM; <sup>b</sup> Actividad SOD símil (IC<sub>50</sub> (µM)); <sup>c</sup> ORAC<sub>relativo</sub>; <sup>d</sup> Fase lag (min); \* no presenta actividad; ND no determinado

**2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA****2.4.1. Actividad anticancerígena**

Como se mencionó anteriormente, existe un interés creciente en estudiar la actividad anticancerígena de complejos de vanadio. Con respecto al ligando, ha sido reportado previamente que la naringenina disminuye significativamente la actividad antitumoral frente a varias líneas celulares como A549 (adenocarcinoma de pulmón), C26 (carcinoma de colon), B16 (melanoma), LLC (carcinoma de pulmón de Lewis), Hela (adenocarcinoma de cervix), HT-1080 (fibrosarcoma), entre otras. La causa de este efecto antitumoral ha sido asignada a la presencia del grupo 5-OH en el anillo A<sup>79-81</sup>.

Con el fin de evaluar esta actividad antitumoral de la naringenina, el VONar y el catión  $V(IV)O^{2+}$ , se realizó el ensayo de proliferación determinado por el ensayo de cristal violeta en la línea tumoral A549 derivada de adenocarcinoma de pulmón (**Fig. 25**). Mediante el ensayo de proliferación hemos determinado que el ligando libre no tiene un efecto citotóxico en la viabilidad celular, mientras que el catión  $V(IV)O^{2+}$  inhibe solamente un 16% de la viabilidad celular a una concentración de 100  $\mu M$ . El VONar por su parte, disminuye significativamente la viabilidad en células de cáncer de pulmón (35 % a 100  $\mu M$ ) indicando que la complejación mejora las potenciales propiedades farmacológicas del ligando.



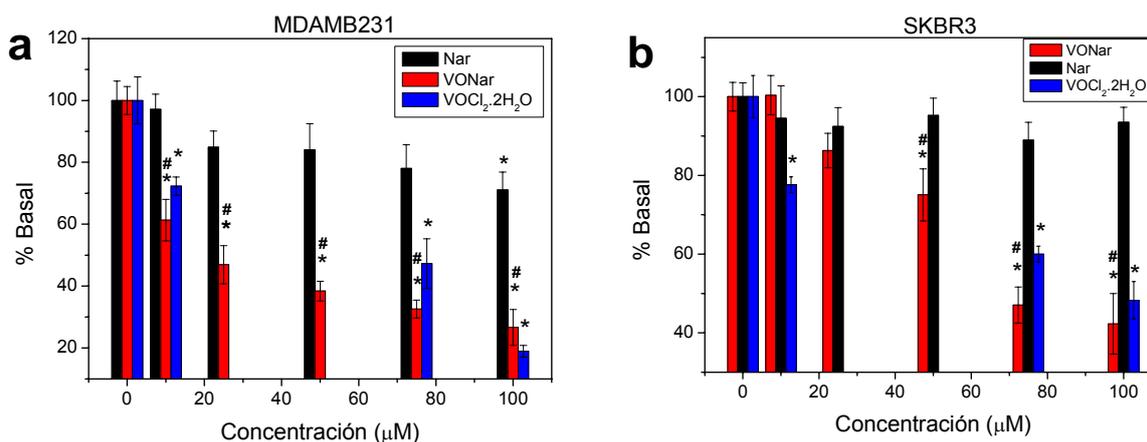
**Figura 25.** Ensayo de proliferación celular por el método de cristal violeta en la línea celular A549 para la naringenina (negro), el complejo VONar (rojo) y el  $VOCl_2 \cdot 2H_2O$  (azul). Las células se incubaron en DMEM libre de suero (basal) o con diferentes concentraciones de los compuestos a 37°C durante 24 hs. Los resultados se expresan como el porcentaje del nivel basal  $\pm$  el error estándar de las medias (SEM). \*Diferencias significativas con respecto al basal  $p < 0,05$ . # Diferencias significativas con respecto al ligando  $p < 0,05$ .

Por otro lado, se testeó mediante el ensayo de MTT, el efecto de la naringenina frente a la línea celular SKBR3 derivada de cáncer de mama (**Fig. 26**) y se encontró que este flavonoide no se comporta como un agente citotóxico, mientras que en otra línea celular derivada de cáncer de mama (MDAMB231) aumenta su efecto deletéreo (30 % de inhibición celular a 100  $\mu M$ ). Ha sido demostrado previamente que la presencia de un doble enlace C2-

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

C3 es una característica importante para algunas actividades farmacológicas y para inducir la citotoxicidad en diferentes líneas celulares<sup>82</sup>. La naringenina ha demostrado ser no citotóxica en otras líneas celulares de cáncer de mama, con un valor alto de IC<sub>50</sub> (>100 μM), probablemente debido también a la presencia de un enlace simple C2-C3<sup>83-85</sup>.

Por otro lado, el complejo de VONar actúa como un potencial agente antitumoral frente a ambas líneas, con un IC<sub>50</sub> de 73 μM y 20 μM para SKBR3 y MDAMB231 respectivamente. Por lo que puede asumirse que la complejación mejora los efectos citotóxicos, siendo mayor en flavonoides con bajo poder antioxidante. Además se testeó el comportamiento del V(IV)O<sup>2+</sup> en las mismas líneas celulares, mostrando una menor actividad que el complejo (IC<sub>50</sub> 96 μM<sup>57</sup> y 68 μM<sup>59</sup> para SKBR3 y MDAMB231, respectivamente). La complejación del metal con el flavonoide mejora los efectos deletéreos en la viabilidad celular en líneas tumorales, probablemente debido a la estructura planar extendida inducida por la conjugación p-π\* que resulta de la formación de un anillo quelato de 6 miembros (**Figura 13**). Esta estructura planar podría inducir cambios mecanísticos tales como el daño en el ADN<sup>86</sup>.



**Figura 26.** Ensayo de MTT para la naringenina (negro), el complejo VONar (rojo) y el VOCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (azul) en la línea celular a) MDAMB231, cultivadas en medio RPMI libres de endotoxinas y b) SKBR3, cultivadas en medio Mc Coy libre de endotoxinas. Las células se incubaron solas (basal) o con diferentes concentraciones de compuestos a 37°C durante 24 hs. Los resultados se expresan como el porcentaje del nivel basal ± el error estándar de la media (SEM). \*Diferencias significativas con respecto al basal p < 0,05. # Diferencias significativas con respecto al ligando p < 0,05.

Con la idea de confirmar una posible vía de muerte celular, se investigaron los efectos de los compuestos en la producción intracelular de ROS, interrupción del potencial mitocondrial de membrana, daño en ADN (H2AX) y liberación de LDH. Se estudió el mecanismo de acción en líneas celulares de cáncer, trabajando en concentraciones de 25 μM y con 24 hs de incubación, con la idea de tener un número razonable de células viables (**Tabla 5**).

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

**Tabla 5.** Efecto de naringenina, VONar y el catión  $V(IV)O^{2+}$  (25  $\mu M$ ) sobre los posibles mecanismos de acción en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama humanas MDAMB231 y SKBR3.

% Basal	MDAMB231			SKBR3		
	Nar	VONar	$V(IV)O^{2+}$	Nar	VONar	$V(IV)O^{2+}$
LDH	190 $\pm$ 30	305 $\pm$ 40	80 $\pm$ 5	253 $\pm$ 43	258 $\pm$ 49	99 $\pm$ 28
ROS	96 $\pm$ 7	157 $\pm$ 23	220 $\pm$ 15	94 $\pm$ 10	153 $\pm$ 20	90 $\pm$ 0
TMRM	97 $\pm$ 2	124 $\pm$ 5	115 $\pm$ 3	95 $\pm$ 3	96 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2
H2AX	100 $\pm$ 3	156 $\pm$ 19	150 $\pm$ 20	94 $\pm$ 24	137 $\pm$ 10	138 $\pm$ 20

Las medidas de liberación de LDH (daño en la membrana plasmática) se llevaron a cabo con el kit de detección de citotoxicidad (LDH). Ensayo de análisis de imágenes de alto contenido: Especies reactivas de oxígeno (ROS) se determinaron usando la sonda  $H_2DFF-DA$ , el potencial de ruptura del potencial de membrana mitocondrial con la sonda TMRM y la fosforilación de la histona H2AX (daño en ADN) con un método inmunohistoquímico.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima anclada a membrana, y por tanto su determinación es una medida indicativa de la integridad de la membrana. La presencia de LDH en el medio de cultivo se asocia frecuentemente a un daño en la membrana celular y por lo tanto se puede aplicar para detectar apoptosis<sup>87</sup>. Tanto para la línea MDAMB231, como para SKBR3, se encontraron niveles significativos de LDH en el medio de cultivo celular cuando se trató con una concentración 25  $\mu M$  de naringenina. Esto indica que un posible mecanismo de la baja muerte celular observada, podría deberse a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. El VONar produce el mismo efecto en ambas líneas celulares, aunque ligeramente mayor en la línea MDAMB231.

Por otro lado, se sabe que muchos tipos de células cancerígenas tienen niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando se la compara con células normales<sup>28</sup>. Varios reportes muestran que una gran cantidad de fitoquímicos fenólicos, entre los que se incluyen los flavonoides, pueden alterar los niveles de ROS<sup>81</sup>. Los niveles de producción intracelular de ROS se midieron usando una sonda fluorescente sensible a la oxidación ((5-6)-carboxi-2',7'-difluorodihidrofluoresceindiacetato o  $H_2DFF-DA$ ) que reconoce varias especies oxidantes como peróxidos, superóxidos y óxido nítrico<sup>88</sup>. En la **tabla 5** se muestra que la naringenina no modifica los niveles de ROS mientras que el VONar los incrementa ligeramente para ambas líneas celulares.

Por otra parte, la disminución del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) causa la ruptura de la membrana mitocondrial externa y contribuye a la liberación del citocromo C. Luego, el citocromo C liberado activa la caspasa 9, lo que conduce a la apoptosis<sup>89</sup>. Los compuestos testeados no afectaron el potencial mitocondrial de membrana (medido a partir de la tetrametilrodamina metil éster, o sonda TMRM), lo que indica que el proceso de muerte celular no involucra una vía apoptótica mitocondrial.

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Por último, ha sido reportado previamente para células mamíferas que la fosforilación de un subtipo de histona H2A, llamada H2AX, en la posición de la Ser139, ocurre en respuesta a la ruptura de la doble hebra de ADN<sup>90</sup>. También ha sido previamente determinado que las flavonas con doble enlace C2=C3 y estructura planar son capaces de intercalarse con el ADN dañándolo<sup>91</sup>. En la **tabla 5** se muestra que el VONar produce un incremento de la fosforilación de histonas con daño simultáneo en el ADN produciendo muerte celular. Además, tanto el flavonoide, como el oxidovanadio(IV) produce la pérdida de la integridad de membrana plasmática detectado por las medidas de liberación de LDH. Como resultado, se encontró que este último efecto es mayor para el complejo y que podría ser explicado sobre la base de una mayor interacción con el ADN debido a la quelación del metal a través de los grupos C=O y OH, generando una estructura planar de seis miembros con deslocalización del electrón en el anillo A. Alternativamente, el daño al ADN podría además producir un aumento en el nivel celular de ROS.

Por otro lado, el catión  $V(IV)O^{2+}$  evidencia daño en el ADN en ambas líneas celulares debido a la fosforilación de histonas, lo que incrementa la producción de ROS en la línea celular MDAMB231. Al contrario del efecto del complejo, la vía de muerte celular del  $V(IV)O^{2+}$  no está asociada con daño en la membrana plasmática.

### **2.4.2. Interacción con la seroalbúmina bovina (ABS)**

La albúmina plasmática es la proteína a la que mayor cantidad de fármacos se unen, por lo que actúa como proteína de unión, transporte y liberación del fármaco en el organismo. Un fármaco puede unirse a las proteínas plasmáticas en un mayor o en un menor grado, dependiendo de diferentes factores, como el pH del plasma, la concentración de proteínas plasmáticas, la concentración del fármaco, la presencia de otro agente con mayor afinidad por el número limitado de sitios de unión con la proteína. El grado de unión con las proteínas plasmáticas y la afinidad de un fármaco por un sitio de unión no específico son de gran importancia clínica. De igual importancia es la facilidad con la que los fármacos se disocian de las proteínas plasmáticas. Aquellos que se unen fuertemente, tienden a tener una vida media mucho mayor, ya que se liberan gradualmente desde el reservorio de proteína plasmática.

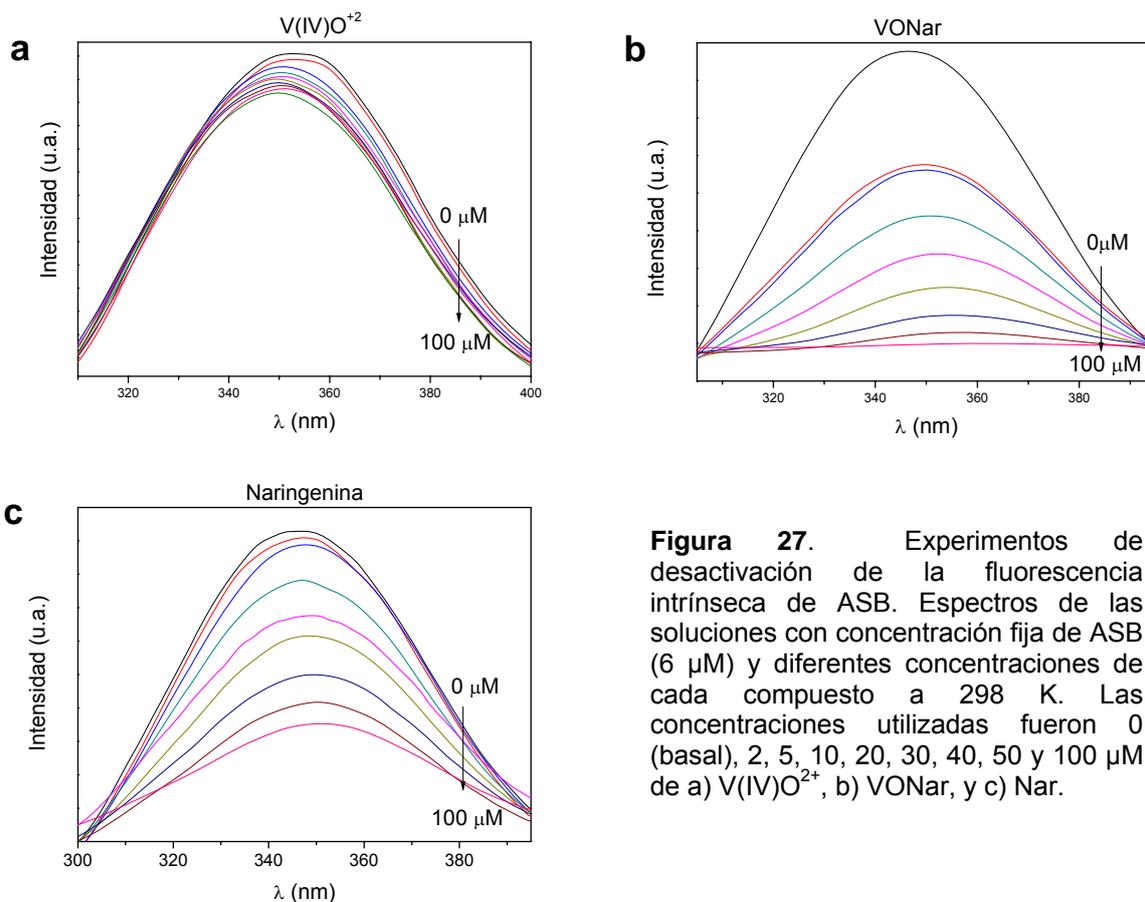
En nuestros estudios, se investigó en primer lugar, el grado de unión del complejo con la albúmina por medio de la técnica de fluorescencia. A posteriori, se investigaron los cambios conformacionales luego de su interacción con naringenina, el catión oxidovanadio(IV) y el complejo VONar, y se lo comparó con los valores reportados previamente para el catión oxidovanadio(IV) y el ligando<sup>58</sup>.

La técnica de fluorescencia puede ser usada fácilmente como una herramienta poderosa para el estudio de las interacciones, dado que una de las especies que interactúa exhibe una fluorescencia intrínseca la cual varía cuando se une a diferentes compuestos. Cuando una solución de ABS se excita a 280 nm, se observa una banda de fluorescencia en 346 nm. Esta

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

banda se debe a dos residuos triptófano (Trp): Trp134 y Trp 212. Adicionalmente hay dos clases de sondas fluorescentes intrínsecas en la ABS: tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Por lo general, la fluorescencia de la Phe no se observa fácilmente, mientras que la fluorescencia de la Tyr se observa entre 300 y 310 nm, y no se observa en concentraciones de ABS mayores a  $4 \times 10^{-6}$  M. Este hecho ha sido explicado debido a la desactivación (“quenching”) de la fluorescencia del resto Tyr por parte del Trp, debido a la eficiencia en la transferencia de energía del Tyr al Trp (efecto de quenching interno)<sup>92</sup>. La **figura 27** muestra la desactivación de la fluorescencia en soluciones que contienen ABS a una concentración fija de 6  $\mu$ M cuando se adicionan en forma gradual y creciente diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos estudiados. Puede apreciarse que la adición tanto de naringenina (**Fig. 27c**), como de VONar (**Fig. 27b**) causan una reducción progresiva de la intensidad de fluorescencia, lo que indica que ambos complejos interactúan con la ASB produciendo un corrimiento batocrómico (hacia el rojo) de la longitud de onda del máximo de emisión (de 346 a 351 nm, y de 346 a 357 nm, respectivamente). El corrimiento hacia el rojo podría deberse probablemente a la pérdida de la estructura compacta del subdominio hidrofóbico donde se localiza el triptófano<sup>93</sup>. El efecto del catión libre  $V(IV)O^{+2}$  sobre la fluorescencia de la ABS se muestra en la **figura 27a**. Como fue reportado previamente, los resultados muestran que el incremento en las concentraciones de  $V(IV)O^{+2}$  apenas cambia la intensidad de fluorescencia de la ASB. Al agregar solución de  $V(IV)O^{+2}$  se observa un pequeño corrimiento hacia el azul del máximo de emisión de fluorescencia, lo que conduce a un 10% de desactivación de la fluorescencia a 100  $\mu$ M y sugiere que la unión se encuentra asociada probablemente a cambios en el entorno dieléctrico de al menos uno de los dos anillos indol en ABS<sup>58</sup>.

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA



**Figura 27.** Experimentos de desactivación de la fluorescencia intrínseca de 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 y 100 μM de a) V(IV)O<sup>2+</sup>, b) VONar, y c) Nar.

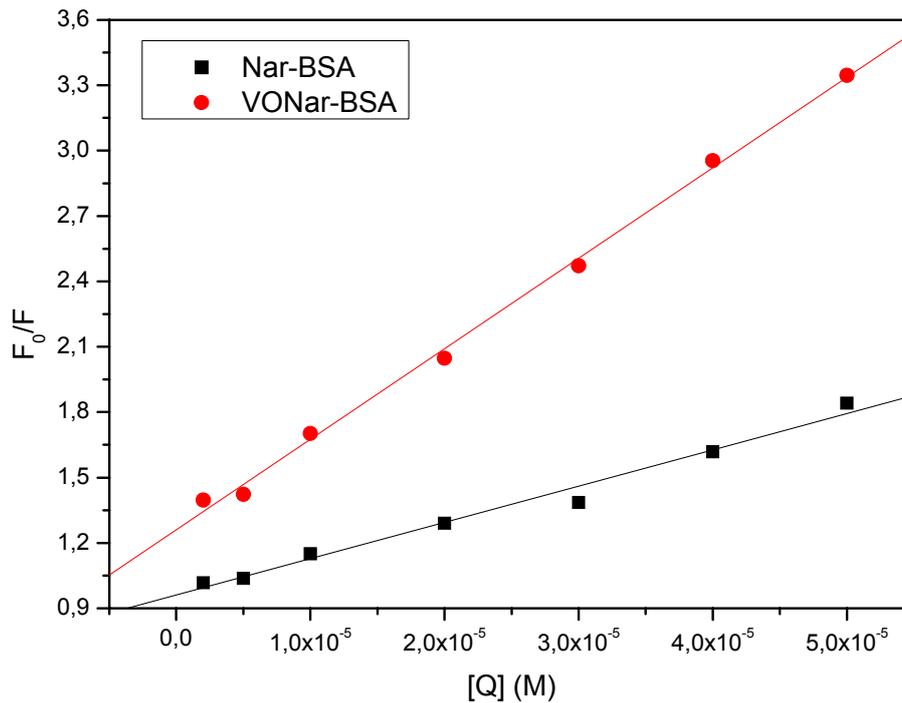
La desactivación de la fluorescencia puede darse por medio de un proceso considerado dinámico (como resultado de un encuentro difusivo entre el desactivador y el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado) o estático (como resultado de la formación de un complejo fluorescente en el estado fundamental (desactivador-fluoróforo)). El proceso dinámico de fluorescencia está descrito por la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]$$

En esta ecuación  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del desactivador (“quencher”), respectivamente.  $[Q]$  es la concentración del quencher, y  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer<sup>92</sup>. Teniendo en cuenta la relación que existe entre la constante de velocidad de la biomolécula  $K_q$  y la constante de quenching dinámico  $K_{sv}$  ( $K_q = K_{sv}/\tau_0$  donde  $\tau_0$  es el promedio de vida de la biomolécula sin quencher), y considerando que el tiempo de vida de fluorescencia de un biopolímero es de  $10^{-8}$  s (valor medio estimado),  $K_q$  puede ser calculada usando esta ecuación.

Es importante notar que la curva de Stern-Volmer debe ser lineal tanto para el proceso estático, como para el dinámico. En el rango lineal de las curvas de Stern-Volmer (**Fig. 28**), todos los  $K_q$  promedio fueron mucho mayores que  $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (**Tabla 6**), lo que indica el proceso de desactivación de la fluorescencia sería estático originándose la formación de un complejo entre el compuesto y la ABS.

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA



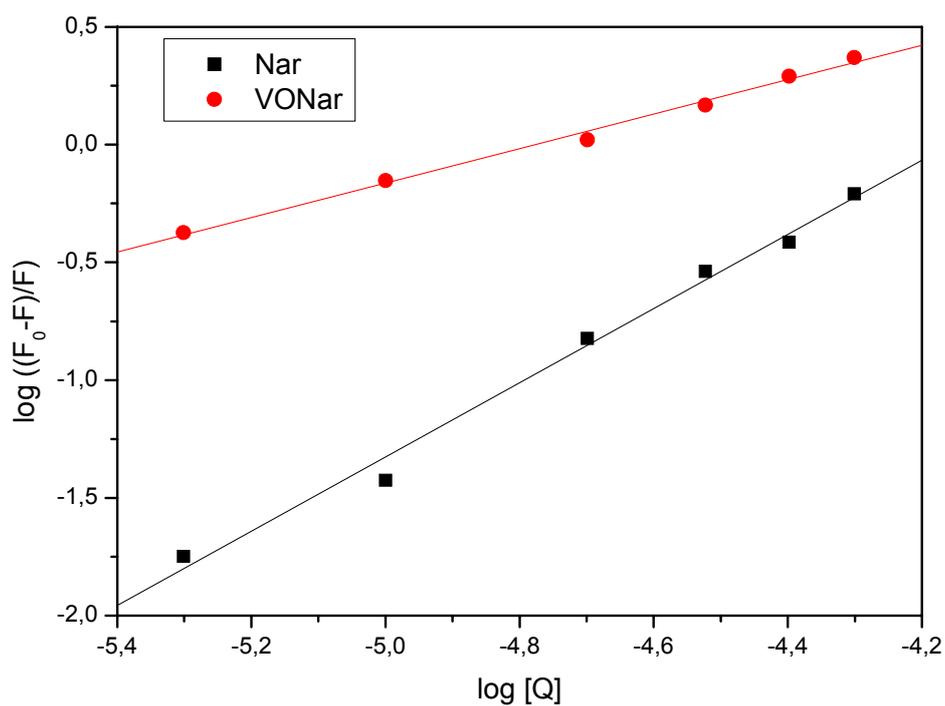
**Figura 28.** Gráfico de Stern-Volmer para la desactivación de la fluorescencia de la ABS con diferentes concentraciones de naringenina y VONar. Sistema naringenina-ABS (negro) y VONar-ABS (rojo).

El valor de la constante de unión,  $K_a$ , es importante para entender la distribución del fármaco en el plasma<sup>94</sup>. La constante y los sitios de unión ( $n$ ) se pueden calcular mediante la ecuación de doble logaritmo:

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

Donde  $K_a$  y  $n$  son la constante de unión y el número de sitios de unión con la ASB respectivamente. Los valores de  $K_a$  y  $n$  que se obtuvieron en ausencia y en presencia de iones metálicos de los gráficos de la **figura 29**, se listan en la **tabla 6**. El complejo presenta una constante de unión menor ( $3,15 \times 10^3$ ) que la naringenina libre ( $1,05 \times 10^5$ ) lo que puede deberse a la existencia de impedimentos estéricos debido al gran tamaño molecular del complejo de VONar en comparación con naringenina. El valor de los sitios de unión se aproxima en ambos casos a uno. Luego, ha sido demostrado que el complejo metálico muestra una unión más débil a la proteína, lo que tiende a tener una menor vida media que la naringenina por lo que puede ser liberado más rápidamente desde el reservorio de proteína plasmática. El valor de  $K_a$  para la naringenina se encuentra de acuerdo con la información de la literatura<sup>95</sup>.

## 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA



**Figura 29.** Gráfico del  $\log (F_0-F)/F$  en función del  $\log [Q]$  para naringenina (negro) y VONar (rojo).

**Tabla 6.** Valores de  $K_{sv}$ ,  $K_q$ ,  $K_a$  y  $n$  para la interacción de unión de Nar y VONar con la ASB en buffer fosfato (20 mM, pH 7,4).

	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1} s^{-1})$	$K_a$	$n$
<b>Nar</b>	$1.66 \times 10^4$	$1.66 \times 10^{12}$	$1,05 \times 10^5$	1,18
<b>VONar</b>	$4.15 \times 10^4$	$4.15 \times 10^{12}$	$3.15 \times 10^3$	0,73

- 
- (1) Fickl, H.; Theron, A. J.; Grimmer, H.; Oommen, J.; Ramafi, G. J.; Steel, H. C.; Visser, S. S.; Anderson, R. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 146–155.
- (2) Tsiani, E.; Fantus, I. *Trends Endocrinol. Metab.* **1997**, *8*, 51–58.
- (3) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*; 2nd ed.; Butterworth-Heinemann, 1997.
- (4) Ballhausen, C. J.; Gray, H. B. *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 111–122.
- (5) Selbin, J.; Holmes, L. H.; McGlynn, S. P. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1963**, *25*, 1359–1369.
- (6) Williams, P. A. M.; Etcheverry, S. B.; Baran, E. *J. Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 41–47.
- (7) Etcheverry, S. B.; Williams, P. A. M.; Baran, E. *J. Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 131–138.
- (8) Smith, T. S.; LoBrutto, R.; Pecoraro, V. L. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *228*, 1–18.
- (9) Henze, M.; Hoppe-Seyers, Z. *Physiol. Chem.* **1911**, *72*, 494–501.
- (10) Ueki, T.; Michibata, H. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2249–2257.
- (11) Robson, R. L.; Eady, R. R.; Richardson, T. H.; Miller, R. W.; Hawkins, M.; Postgate, J. R. *Nature* **1986**, *322*, 388–390.
- (12) Butler, A.; Walker, J. V. *Chem. Rev.* **1998**, *93*, 1937–1944.
- (13) Chakraborty, T.; Chatterjee, A.; Rana, A.; Dhachinamoorthi, D.; Kumar P, A.; Chatterjee, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 48–59.
- (14) Sabbioni, E.; Kueera, J.; Pietra, R.; Vesterberg, O. *Sci. Total Environ.* **1996**, *188*, 49–58.
- (15) Bishayee, A.; Waghay, A.; Patel, M. A.; Chatterjee, M. *Cancer Lett.* **2010**, *294*, 1–12.
- (16) García, G. B. *Acta Toxicol. Argent.* **2006**, *14*, 32–36.
- (17) Mukherjee, B.; Patra, B.; Mahapatra, S.; Banerjee, P.; Tiwari, A.; Chatterjee, M. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 135–143.
- (18) Liu, J.; Reuland, D. J.; Rosenhein, L.; Cao, Z. X.; Franklin, L. A.; Ganguli, S. *Metabolism* **1997**, *46*, 562–572.
- (19) Baran, E. J. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 1–10.
- (20) Facchini, D. M.; Yuen, V. G.; Battell, M. L.; McNeill, J. H.; Grynopas, M. D. *Bone* **2006**, *38*, 368–377.
- (21) Badmaev, V.; Prakash, S.; Majeed, M. *J. Altern. Complement. Med.* **1999**, *5*, 273–291.
- (22) Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Jorge, A. P.; de Sousa, E.; Horst, H.; Woehl, V. M.; Pizzolatti, M. G.; Szpoganicz, B.; Silva, F. R. M. B. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *163*, 177–191.
- (23) Larsen, J.; Thomsen, O. *Acta Physiol. Scand.* **1980**, *110*, 367–374.
- (24) Wang, J.; Yuen, V. G.; McNeill, J. H. *Metabolism.* **2001**, *50*, 667–673.
- (25) Fawcett, J. P.; Farquhar, S. J.; Thou, T.; Shand, B. I. *Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *80*, 202–206.
- (26) Sakurai, H. *Environ. Heal. Perspect.* **1994**, *102*, 35–36.
- (27) Evangelou, A. M. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 249–265.
- (28) Wang, Q.; Liu, T.-T.; Fu, Y.; Wang, K.; Yang, X.-G. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 1087–1097.
- (29) Korbecki, J.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Chlubek, D. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 195–200.
- (30) Cook, N. C.; Samman, S. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
- (31) Pietta, P. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035–1042.
- (32) Mohan, A.; Narayanan, S.; Sethuraman, S.; Maheswari Krishnan, U. *Anticancer Agents Med Chem.* **2013**, *13*, 281–295.
- (33) Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. **1996**, 95–100.
- (34) Selvaraj, S.; Krishnaswamy, S.; Devashya, V.; Sethuraman, S.; Krishnan, U. M. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 677–702.
- (35) Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. In *Handbook on flavonoids: Dietary Sources, Properties and Health Benefits*; Yamane, K.; Kato, Y., Eds.; Nova science publishers: New York, 2011; pp. 145–190.
- (36) Aisling Aherne, S.; O'Brien, N. M. *Nutrition* **2002**, *18*, 75–81.
- (37) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
- (38) Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N.; Bou, I. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523.
- (39) Croft, K. D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *854*, 435–442.
- (40) Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749–760.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- (41) Tripoli, E.; Guardia, M. La; Giammanco, S.; Majo, D. Di; Giammanco, M. *Food Chem.* **2007**, *104*, 466–479.
- (42) So, F. V.; Guthrie, N.; Chambers, A. F.; Moussa, M.; Carroll, K. K. *Nutr. Cancer* **1996**, *26*, 167–181.
- (43) Pereira, R. M. S.; Andrades, N. E. D.; Paulino, N.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Marcucci, M. C.; Favero, G. M.; Novak, E. M.; Bydlowski, S. P. *Molecules* **2007**, *12*, 1352–1366.
- (44) Wang, H.; Yang, Z.; Wang, B. *Transit. Met. Chem.* **2006**, *31*, 470–474.
- (45) Tan, M.; Zhu, J.; Pan, Y.; Chen, Z.; Liang, H.; Liu, H.; Wang, H. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2009**, *2009*, 347872.
- (46) Köberle, B.; Tomicic, M. T.; Usanova, S.; Kaina, B. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1806*, 172–182.
- (47) Bakhtiar, R.; Ochiai, E.-I. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1999**, *32*, 525–540.
- (48) Benítez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Moreno, V.; Lorenzo, J.; Avilés, F. X.; Garat, B.; Gambino, D. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1386–1394.
- (49) Dong, Y.; Narla, R. K.; Sudbeck, E.; Uckun, F. M. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *78*, 321–330.
- (50) D’Cruz, O. J.; Uckun, F. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 1829–1836.
- (51) Mohammadi, K.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Storr, T.; Martins, C.; Polishchuk, E.; Yuen, V. G.; McNeill, J. H.; Orvig, C. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2217–2225.
- (52) Etcheverry, S. B.; Ferrer, E. G.; Naso, L.; Rivadeneira, J.; Salinas, V.; Williams, P. A. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 435–447.
- (53) Romagnolo, D. F.; Selmin, O. I. *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* **2012**, *31*, 206–238.
- (54) 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. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 791–801.
- (55) Naso, L.; Ferrer, E. G.; Lezama, L.; Etcheverry, S. B.; Williams, P. A. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 889–902.
- (56) Naso, L.; Ferrer, E.; Butenko, N.; Cavaco, I.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S.; Williams, P. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 653–668.
- (57) Naso, L. G.; Lezama, L.; Rojo, T.; Etcheverry, S. B.; Valcarcel, M.; Roura, M.; Salado, C.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *206*, 289–301.
- (58) Naso, L. G.; Valcarcel, M.; Roura-Ferrer, M.; Kortazar, D.; Salado, C.; Lezama, L.; Rojo, T.; González-Baró, A. C.; Williams, P. A. M.; Ferrer, E. G. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *135*, 86–99.
- (59) Naso, L.; Valcarcel, M.; Villacé, P.; Roura-Ferrer, M.; Salado, C.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2414.
- (60) Aiello, I.; Ghedini, M.; Zanchini, C. *Inorganica Chim. Acta* **1997**, *255*, 133–137.
- (61) Jabbari, M.; Gharib, F. *J. Mol. Liq.* **2012**, *168*, 36–41.
- (62) Rajendran, M.; Ravichandran, R.; Devapiriam, D. *Int. J. Comput. Appl.* **2013**, *77*, 18–25.
- (63) Farajtabar, A.; Gharib, F. *Chem. Pap.* **2013**, *67*, 538–545.
- (64) Martínez, C. H. R.; Dardonville, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 142–145.
- (65) Sichel, G.; Corsaro, C.; Scalia, M.; Di Bilio, A. J.; Bonomo, R. P. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 1–8.
- (66) Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuño, A.; Río, J. A. Del. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4505–4515.
- (67) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- (68) Ajay, M.; Cheng, H. M.; Mustafa, A. M.; Mustafa, M. R. *Malaysian J. Sci.* **2005**, *24*.
- (69) Burda, S.; Oleszek, W. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2774–2779.
- (70) Khanduja, K. L.; Bhardwaj, A. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2003**, *40*, 416–422.
- (71) Huang, W.-Y.; Majumder, K.; Wu, J. *Food Chem.* **2010**, *123*, 635–641.
- (72) Mino, Y.; Ishida, T.; Ota, N.; Inoue, M.; Nomoto, K.; Yoshioka, H.; Takemoto, T.; Sugiura, Y.; Tanaka, H. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 3440–3444.
- (73) Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, a J.; Vanden Berghe, D. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 71–76.
- (74) Orallo, F.; Camiña, M.; Alvarez, E.; Basaran, H.; Lugnier, C. *Planta Med.* **2005**, *71*, 99–107.
- (75) Cavia-Saiz, M.; Busto, M. D.; Pilar-Izquierdo, M. C.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M.; Muñiz, P. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1238–1244.
- (76) Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1226–1233.
- (77) Rafat, H. S.; Josiane, C.; Pierre, C. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2489–2491.
- (78) Hapner, C. D.; Deuster, P.; Chen, Y. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186*, 275–279.
- (79) Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5434–5440.
- (80) Manthey, J. A.; Guthrie, N. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5837–5843.
- (81) Lee, E.-R.; Kang, Y.-J.; Choi, H.-Y.; Kang, G.-H.; Kim, J.-H.; Kim, B.-W.; Han, Y. S.; Nah, S.-Y.; Paik, H.-D.; Park, Y.-S.; Cho, S.-G. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 2394–2398.
- (82) Chidambara Murthy, K. N.; Kim, J.; Vikram, A.; Patil, B. S. *Food Chem.* **2012**, *132*, 27–34.
- (83) Yadegarynia, S.; Bremer, M.; White, J. *FASEB J.* **2009**, *23*, 712.6.
- (84) Lee, W.-J.; Chen, W.-K.; Wang, C.-J.; Lin, W.-L.; Tseng, T.-H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *226*, 178–191.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- (85) Kanno, S.; Tomizawa, A.; Hiura, T.; Osanai, Y.; Shouji, A.; Ujibe, M.; Ohtake, T.; Kimura, K.; Ishikawa, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 527–530.
- (86) Wang, B.; Yang, Z.-Y.; Wang, Q.; Cai, T.-K.; Crewdson, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1880–1888.
- (87) Prabhakaran, R.; Kalaivani, P.; Huang, R.; Poornima, P.; Vijaya Padma, V.; Dallemer, F.; Natarajan, K. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 233–247.
- (88) Gunasekar, P. G.; Kanthasamy, A. G.; Borowitz, J. L.; Isom, G. E. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 2016–2021.
- (89) Cheng, A.-C.; Huang, T.-C.; Lai, C.-S.; Pan, M.-H. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *509*, 1–10.
- (90) Podhorecka, M.; Skladanowski, A.; Bozko, P. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2011*, 1–9.
- (91) Webb, M. R.; Ebeler, S. E. *Biochem. J.* **2004**, *384*, 527–541.
- (92) Bi, S.; Yan, L.; Pang, B.; Wang, Y. *J. Lumin.* **2012**, *132*, 132–140.
- (93) Kandagal, P. B.; Kalanur, S. S.; Manjunatha, D. H.; Seetharamappa, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 260–267.
- (94) Zhang, Y.; Shi, S.; Sun, X.; Xiong, X.; Peng, M. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1529–1537.
- (95) Shi, J.; Cao, H. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 594–600.

## **CAPÍTULO III**

---

### **Complejos de coordinación de ácido 3-cumarín carboxílico con Zn(II)**

---

### **3.1.1. Zinc**

El zinc (Zn) es un elemento que se encuentra en la naturaleza en forma de minerales, mayoritariamente como sulfuros o carbonatos. Es el segundo metal traza esencial para humanos, animales, plantas y microorganismos, luego del hierro, pero se diferencia de este último en que presenta solo un estado de oxidación<sup>1</sup>. El cuerpo humano tiene entre 2 y 3 g de este metal por 70 kg de peso y se requieren entre 10 y 20 mg diarios de zinc en la dieta aunque las mujeres embarazadas y aquéllas en período de lactancia requieren una ingesta algo mayor. Se encuentra ampliamente distribuido en distintos tipos de alimentos, sobre todo en los derivados del reino animal, el pan integral, las legumbres secas y, en particular, en los mariscos<sup>2</sup>.

Las distintas funciones que cumple el zinc (catalítica, estructural y de regulación) definen el papel biológico que desempeña el mismo. Se conoce que, aproximadamente 300 enzimas requieren del zinc (ácido de Lewis fuerte) para su actividad metabólica (función catalítica). Además, este elemento desempeña funciones estructurales en las metaloproteínas, por ejemplo, en la enzima Cu,Zn-SOD.

Por otro lado, el Zn se une a un complejo tetraédrico con cuatro cisteínas tomando una disposición estructural que se ha dado en llamar “*dedos de zinc*” de suma importancia pues se han localizado en muchos receptores de membrana y en factores de transcripción. El alto interés por las proteínas con dedos de zinc radica en su capacidad para constituir objetivos potenciales para terapéuticos farmacológicos y además por estar involucrado en la función de la membrana celular. Es importante en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y en la división celular<sup>3,4</sup>.

Por otro lado se sabe que el Zn posee un importante papel en el sistema inmune<sup>5,6</sup>. Al cumplir un papel tan importante en el metabolismo, su déficit provoca múltiples complicaciones. En las últimas décadas ha ido aumentando el uso de zinc como uno de los posibles medicamentos para combatir los desórdenes de crecimiento debido a la malnutrición. Su deficiencia puede ocasionar también mala cicatrización de las heridas, enanismo, malformaciones fetales y desórdenes en el sistema inmunológico. Algunas personas padecen anorexia y dificultades fisiológicas por esta deficiencia; los síntomas pueden aliviarse por consumo de zinc<sup>7</sup>. Como todo elemento esencial su exceso se ha asociado con bajos niveles de cobre, alteraciones en la función del hierro y disminución de la función inmunológica y de los niveles del colesterol bueno.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Como parte del estudio de las interacciones de los biometales con moléculas “modelo” que generen sitios similares a los sitios enzimáticos, se comenzó con el estudio de la interacción del Zn con ligandos que contengan oxígeno en su esfera de coordinación. Es por esta razón que se propone estudiar complejos de Zn(II) con el ácido 3-cumarín carboxílico (HCCA) como ligando donador de oxígenos. Además de esto, con el fin de simular el sitio de unión de los complejos con las proteínas, se utilizan frecuentemente ligandos quelantes con nitrógenos como es el caso de la fenantrolina. Por lo que, en adición a lo anterior, se propone sintetizar complejos ternarios de Zn(II) que incluyan, además del HCCA, la fenantrolina.

#### **3.1.2. Cumarinas**

Al igual que los flavonoides, las cumarinas son moléculas heterocíclicas asociadas con efectos benéficos para la salud humana como la reducción del riesgo de cáncer, diabetes, y enfermedades cardiovasculares y cerebrales. Estos efectos están relacionados al poder de secuestrar radicales libres (antioxidantes), junto con otros posibles mecanismos como sus propiedades anti-inflamatorias y la interacción con diferentes enzimas. Se ha encontrado que tanto las cumarinas sintéticas como las naturales y sus derivados, poseen gran potencial terapéutico y actividades farmacológicas como agentes antibacteriales, antioxidantes anticoagulantes, antimutagénicos, antibióticos, anticarcinogénicos, antimicrobianos, antiinflamatorios y anti-HIV<sup>8</sup>.

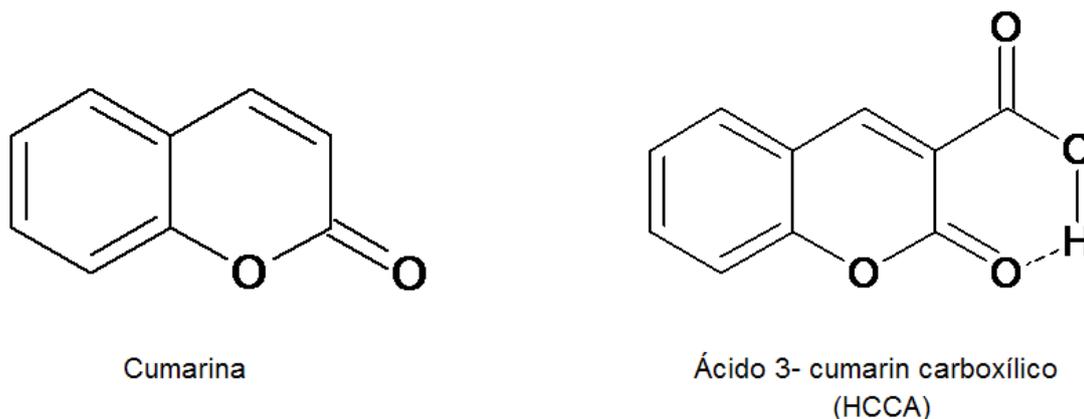
Las cumarinas o derivados de la cumarina (**Fig. 1**) se encuentran en la naturaleza principalmente en las plantas, son compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno y pertenecen a la familia de las benzopironas. Estos derivados pueden originar una gran variedad de complejos metálicos con diferentes modos de coordinación, propiedades espectroscópicas y aplicaciones potenciales. En particular, la complejación de ligandos derivados de las cumarinas con varios iones metálicos del bloque d han sido reconocidos como rutas promisorias en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos<sup>9</sup>. Además, las cumarinas han sido utilizadas como cromóforos de indicadores fluorescentes en sistemas biológicos, aditivos de comidas y cosméticos, abrillantadores ópticos, colorantes para láseres y células solares sensibilizadas por colorantes<sup>10</sup>.

Un caso particular de cumarina sustituida es el ácido 3-cumarín carboxílico (HCCA) (**Fig. 1**). Desde el punto de vista de la complejación, puede actuar como ligando monodentado (a través del grupo carboxilato) o como ligando bidentado (a través de los grupos carboxilato y carbonilo). Otra de las características químicas del HCCA es que es una molécula altamente conjugada que tiene la posibilidad de crear un puente de hidrógeno intramolecular.

El HCCA y sus derivados poseen varias aplicaciones en fluorescencia y en medicina<sup>11</sup>. Se ha demostrado que son inhibidores selectivos de la monoamina oxidasa<sup>11</sup> y exhiben fuerte actividad antifúngica<sup>12</sup> y antibacteriana. El HCCA ha sido reportado como un detector del radical hidroxilo generado químicamente o a través de radiación gama<sup>13</sup>. Sus complejos metálicos han

### 3.1. INTRODUCCIÓN

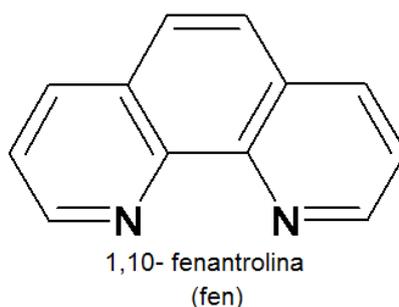
demostrado actividades biológicas promisorias (en algunos casos aun mayores que los ligandos cumarínicos) y valiosas propiedades luminiscentes<sup>10</sup>.



**Figura 1.** Estructura de la cumarina y su derivado sustituido el ácido 3- cumarín carboxílico.

#### **3.1.3. 1,10 - fenantrolina**

La 1,10–fenantrolina, u o-fenantrolina (fen) (**Fig. 2**) es un clásico ligando bidentado para iones metálicos de transición que ha jugado un importante rol en el desarrollo de la química de coordinación y que aun tiene un interés considerable como material de partida versátil tanto para la química orgánica, como para la inorgánica. La 1,10-fenantrolina es una molécula planar, hidrofóbica cuyos átomos de nitrógeno se encuentran bien ubicados para actuar cooperativamente en la unión con un catión. Estas características estructurales determinan su habilidad para la coordinación con iones metálicos. Tiene una gran facilidad para formar complejos octaédricos con los metales de transición<sup>14</sup>.



**Figura 2.** Estructura de la 1,10- fenantrolina (fen).

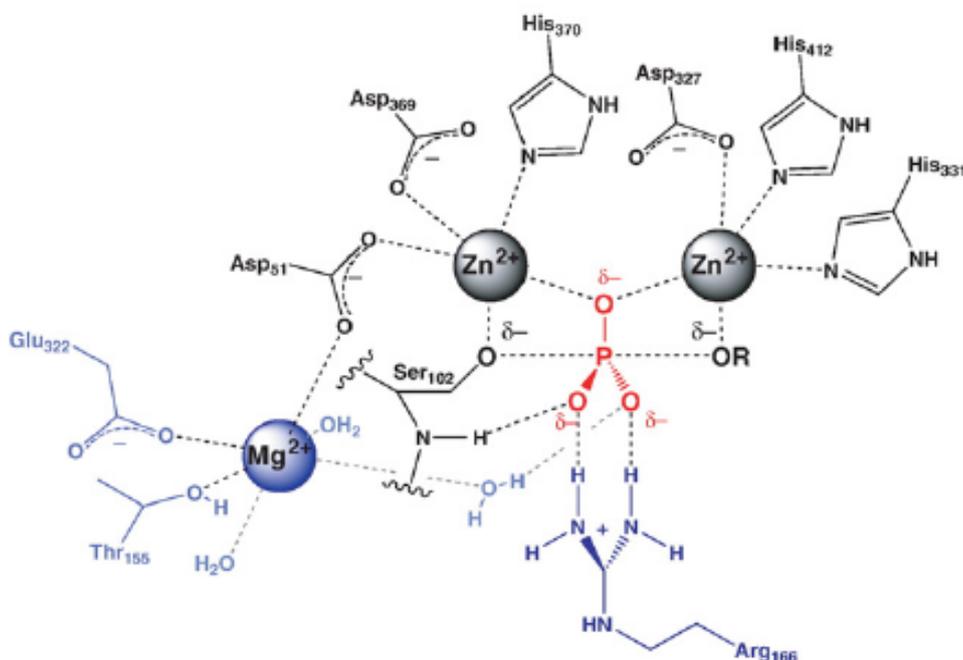
#### **3.14. Fosfatasa alcalina**

Una de las enzimas dependientes de Zn más importantes es la Fosfatasa Alcalina (FAL) es una enzima que se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, pero sobre todo se presenta en el hígado, las vías biliares y los huesos. Es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfato de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un

### 3.1. INTRODUCCIÓN

entorno alcalino. La actividad de la FAL en el suero se correlaciona usualmente con enfermedades de hígado y es un marcador de diferenciación osteoblástica<sup>15</sup>.

La enzima extraída de la mucosa intestinal bovina es una metaloenzima homodimérica que contiene dos iones Zn(II) y un magnesio (Mg(II)) en el sitio activo. A modo de ilustración se muestra el sitio activo de la FAL en *Escherichia coli*, análogo al de la enzima bovina en la **figura 3**. Cuando la enzima cataliza la hidrólisis del fosfomonoéster, la serina 102 coordinada al átomo de Zn forma el intermediario fosfoserilo el que subsecuentemente es atacado por el Zn(II)-OH<sup>-</sup> adyacente para completar la hidrólisis y reproducir la forma libre de serina para reiniciar el ciclo catalítico. La actividad máxima de la enzima se logra a pH alrededor de 8, mientras que el paso limitante de la velocidad es la liberación del grupo fosfato inorgánico. A valores de pH menores de 5,5, el intermediario fosforilo es estable.



**Figura 3.** Iones involucrados en el centro activo de la enzima fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*<sup>16</sup>.

Se determinó que la apo-enzima preparada usando el agente quelante EDTA exhibe un dramático decrecimiento en su actividad hidrolasa, junto con cambios conformacionales en su estructura cuaternaria y no se obtiene una reversión de su actividad por la adición de iones bivalentes. Por otro lado, el ligando quelante o-fenantrolina (fen) también produce inhibiciones de la FAL intestinal bovina. Este efecto se explicó a través de un mecanismo dependiente del tiempo en el que el ión Zn(II) que es requerido por FAL es removido lentamente, dejando inactiva a la enzima. Este efecto se encontró con carácter reversible en discrepancia al comportamiento del EDTA<sup>17,18</sup>.

El efecto del Zn(II) sobre la enzima (aislada de diferentes fuentes como *E. coli*, *S. Cerevisiae*, bovina o humana) es contradictorio en la literatura. Si

### 3.1. INTRODUCCIÓN

bien el agregado de Mg(II) produce un aumento de la velocidad de reacción de hidrólisis de sustrato por la enzima, el agregado de Zn(II) estimula la velocidad y luego la deprime produciéndose además pérdida de la estructura molecular<sup>19</sup>. Se encontró que a concentraciones hasta 1 mM la velocidad se incrementa<sup>20</sup>. La explicación a esta respuesta involucra una interacción competitiva entre los iones Zn(II) y Mg(II). Cuando se aumenta la concentración de Zn(II), este metal se une al sitio de unión de Mg(II) con mayor afinidad, desplazándolo. Este efecto se produce cuando la concentración de Zn(II) es mayor a 3 mM.

Además fue reportado que la adición de Zn(II) en concentraciones 2 mM también produce una inhibición de la enzima. Se postuló que el Zn(II) podría unirse a otro sitio en la enzima e inducir cambios conformacionales que reducen la eficiencia catalítica de la enzima y la habilidad para la enzima de reconocer y unirse al sustrato. Por ejemplo, podría unirse al sitio de la enzima donde el Mg(II) se une normalmente. Se concluye entonces que aún cuando se requieren bajas concentraciones para la catálisis, si el Zn(II) está presente en cantidades excesivas, podría desplazar al Mg(II) del sitio activo impidiendo que dicho catión produzca sus efectos estabilizantes<sup>21</sup>. Por otra parte, un estudio *in-vivo* en ratas mostró activación de la actividad fosfatasa alcalina luego de la administración oral de sulfato de zinc (1mg Zn(II)/100g) durante 3 días en el homogeneizado del tejido femoral<sup>22</sup>.

## 3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

---

Los métodos de síntesis, tanto de los complejos binarios, como ternarios y la sal de potasio, se detallan a continuación. Cabe mencionar que tanto la sal de potasio como el complejo binario ZnCCA (pH 6) fueron preparados con fines comparativos para el desarrollo de los estudios realizados.

- **KCCA:** El HCCA se disolvió en agua, bajo agitación continua y calentamiento a 60°C. A la solución preparada se le agregó KOH hasta ajustar el pH a 9. Finalmente la sal se obtuvo como un precipitado de color blanco mediante el agregado de acetona a la solución amarilla formada.

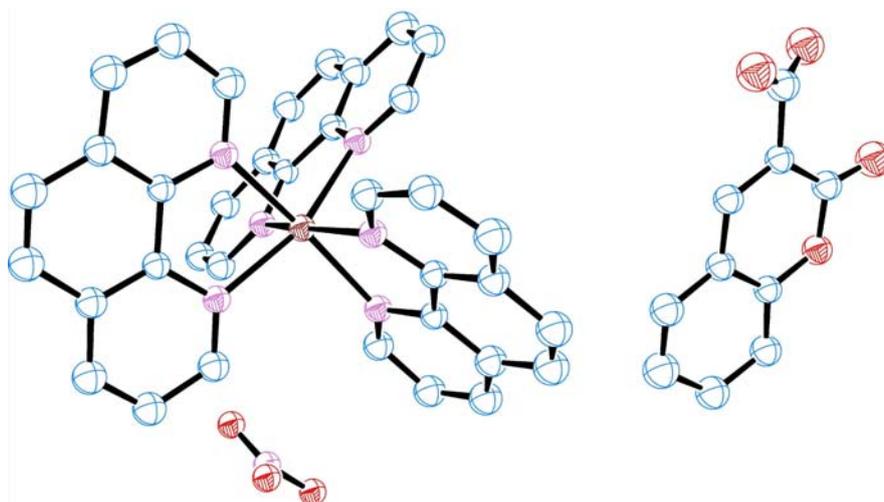
- **ZnCCA:** A partir de una misma preparativa, se obtuvieron dos precipitados diferentes mediante la variación del pH. Brevemente, se disolvieron 2 mmoles de HCCA en 15 mL de agua, alcalinizando con NaOH 1 M hasta pH=6. A la solución resultante se le adicionó 1 mmol de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> disuelto previamente en 2 mL de agua bidestilada y se ajustó el pH de la suspensión hasta 6. Se separó esta suspensión formada en dos fracciones, una de ellas se filtró, obteniendo un precipitado blanco a pH 6 [Zn(CCA)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (ZnCCA pH 6). Análisis elementales para ZnC<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>10</sub> (479,4 g/mol) Calc.: C, 50,0; H, 2,9. Exp.: C, 49,9; H, 2,9. A la otra fracción de la suspensión se la continuó alcalinizando hasta pH 10 donde el precipitado tomó un color amarillento que posteriormente se filtró [Zn<sub>2</sub>(CCA)(OH)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] (ZnCCA pH 10). Análisis elementales para Zn<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>9</sub> (406,6 g/mol) Calc.: C, 29,5; H, 2,9. Exp.: C, 29,6; H, 2,8. Ambos precipitados se lavaron varias veces con agua y se secaron en estufa a 60 °C. La fórmula final responde también al estudio termogravimétrico, donde se observa la pérdida de dos moléculas de agua, con un residuo final de 41 %, coincidente con la formación de ZnO (demostrado también por FTIR).

- **ZnCCAFen:** Al preparar el complejo ternario, al igual que como ocurrió con el binario, se obtuvieron dos complejos diferentes mediante la variación del pH de síntesis. Se disolvieron 2 mmoles de HCCA en 10 mL de agua bidestilada bajo agitación continua a la que se alcaliniza con NaOH 1 M hasta un valor de pH de 6. A posteriori sobre dicha solución se agregan 2 mmoles de fenantrolina disueltos previamente en 3 ml de etanol común. A la solución incolora resultante se le adiciona 1 mmol de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> disuelto en 2 ml de agua bidestilada. De manera inmediata se observa la formación de un precipitado de color blanco. La suspensión se separa en dos fracciones, a una de ellas se le ajusta el pH a 6 con NaOH 1 M y se separa una parte de ese precipitado, obteniéndose así el complejo ternario de pH 6 del [Zn(CCA)<sub>2</sub>fen].4H<sub>2</sub>O. Análisis elementales ZnC<sub>32</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub> (695,3 g/mol) Calc.: N, 4,0; C, 55,0; H, 3,7. Exp.: N, 4,1; C, 54,9; H, 3,7. A la segunda fracción de la suspensión se le continúa agregando NaOH 1 M hasta alcanzar un valor de pH 10, en ese punto, el precipitado cambia su color a un amarillo tenue, el que se separa por filtración obteniéndose otro complejo ternario diferente: [Zn(CCA)fen(OH)].2H<sub>2</sub>O. Análisis elementales ZnC<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (487,3 g/mol) Calc.: N, 5,7; C, 54,1; H, 3,7.

### 3.2. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS

Exp.: N, 5,8; C, 54,0; H, 3,6. Ambos precipitados de complejos ternarios se lavaron varias veces con agua bidestilada y se secaron en estufa a una temperatura de 60 °C.

• **[Zn(fen)<sub>3</sub>](CCA)(NO<sub>3</sub>)**: Se disolvieron a pH 5, 2 mmoles de HCCA en 10 ml de agua bidestilada, bajo agitación, alcalinizando con NaOH 1 M a pH= 6. A dicha solución se le agrega 1 mmol de fenantrolina disuelta en 3 ml de etanol común y 1 mmol de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> disuelto en 2 ml de agua bidestilada, pH final 5, obteniéndose un primer precipitado que luego se ser estudiado, se descarta. A partir de la cristalización lenta de las aguas madres se obtuvieron monocristales que responden a la fórmula [Zn(fen)<sub>3</sub>](CCA)(NO<sub>3</sub>). En la estructura resuelta por difracción de RX se observó que el anión CCA<sup>-</sup> formado durante la preparación no participa en la coordinación al metal, sino que actúa como contraión, fuera de la esfera de coordinación, de la misma manera que lo hace el nitrato. Por otro lado, los 3 ligandos fenantrolina coordinan octaédricamente con el Zn(II) tal como se muestra en la **figura 4**.



**Figura 4.** Estructura cristalina del complejo [Zn(fen)<sub>3</sub>](CCA)(NO<sub>3</sub>)

## 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y RAMAN)

Se realizó el estudio vibracional, mediante espectroscopía FTIR y Raman de los diferentes complejos de Zn(II) obtenidos en distintas condiciones de síntesis, tanto ternarios como binarios. Si bien se tomaron los espectros FTIR de todos los compuestos, no se pudieron obtener los espectros Raman de ninguno de los complejos ternarios. En la **tabla 1** se muestran las principales bandas con sus asignaciones tentativas para los distintos compuestos.

**Tabla 1.** Principales modos vibracionales observados y asignaciones tentativas de los compuestos con Zn y HCCA estudiados.

	HCCA	ZnCCA(OH) <sub>3</sub> (pH 10)	Zn(CCA) <sub>2</sub> (pH 6)	ZnCCAfenOH (pH 10)	Zn(CCA) <sub>2</sub> fen (pH 6)	Cristal	KCCA
$\nu$ OH	3056 (s)	3447 (s,br)	3227 (s, br)	3513 (s) 3350 (s, br)	3150 (s, br)	3400 (s, br)	3433 (s,br)
$\nu$ C=O carbonilo	1683 (vs) <b>1671 (w)</b>	1740 (vs) 1724 (sh) <b>1745 (s)</b>	1667 (vs) <b>1676 (m)</b>	1733 (vs) 1720 (sh)	1669 (vs)	1722 (vs) 1708 (sh)	1732 (vs) 1704 (sh) <b>1738 (w)</b>
$\nu$ C=O (COOH)	1745 (vs) <b>1738 (w)</b>						
$\nu_{as}$ COO		1567 (s) <b>1566 (vs)</b>	1562 (s) <b>1568 (s)</b>	1567 (s)	1563 (vs)	1596 (sh)	1597 (sh) <b>1599 (sh)</b>
$\nu$ CC + $\delta$ CCH	1619 (s) <b>1615 (vs)</b> 1609 (sh) 1585 (sh) 1564 (vs) <b>1568 (vs)</b>	1625 (s) 1610 (s) <b>1616 (s)</b> 1593 (s)	1614 (s) 1610 (sh) <b>1609 (vs)</b> 1585 (s)	1625 (s) 1610 (s) 1585 (vs)	1626 (s) 1605 (s) 1584 (s) 1537 (vs)	1625 (s) 1606 (s) 1596 (s)	1626 (s) 1599 (vs) 1569 (m) <b>1616 (vs)</b> <b>1569 (s)</b>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>						1371 (s)	
$\nu_s$ COO <sup>-</sup>		1385 (s) <b>1395 (w)</b>	1399 (s) <b>1395 (w)</b> <b>1369 (m)</b>	1384 (s)	1372 (vs)	1384 (s)	1390 (s) <b>1374 (m)</b>
fen				1517 (m) 1431 (s) 1142 (m) 1104 (m) 847 (vs) 726 (vs)	1524 (vs) 1431 (vs) 1158 (m) 1107 (m) 844 (vs) 724 (vs)	1519 (vs) 1426 (vs) 1141 (m) 1103 (m) 848 (vs) 724 (vs)	
( $\nu_{as}$ - $\nu_s$ ) COO <sup>-</sup>		182	163	183	191	212	207

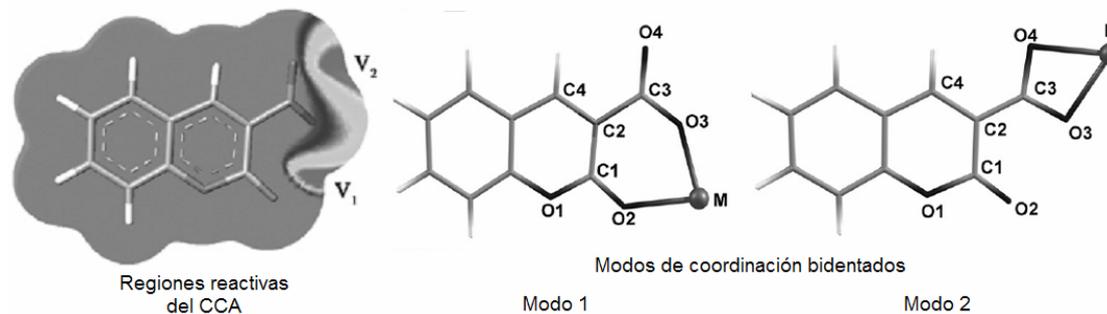
Abreviaturas: vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil; sh, hombro.  $\nu$ , estiramiento;  $\delta$ , flexión; s, simétrica; as, antisimétrica. **Negrita:** frecuencias observadas en Raman.

De los resultados obtenidos, se observa que la interpretación de los espectros FTIR y Raman hecha solamente desde un punto de vista empírico es incierta para sugerir el modo de unión metal-ligando para el caso de las cumarinas conjugadas<sup>10</sup>. Las principales dificultades que se presentan se deben a la abundancia de bandas en el espectro, la presencia de más de un átomo donador con posibilidades de varios modos de unión y grupos donadores involucrados en sistemas conjugados con puentes de H. Es por esta razón que Georgieva y colaboradores<sup>10</sup> han realizado numerosos estudios teóricos para poder comprender el modo de unión de complejos de coordinación con

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)

cumarinas. A partir de estos cálculos computacionales de geometría y frecuencia, se ha demostrado que los corrimientos observados cuando se comparan los espectros FTIR de un complejo con el ligando (HCCA) no es una indicación directa de la coordinación de ese grupo con el metal. La asignación de las bandas correspondientes a los estiramientos de los modos de estiramiento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  carbonílicos y carboxílicos es bastante difícil ya que sus posiciones se intercambian, dependiendo de su participación en la coordinación con el metal o en puentes de hidrógeno. Es por esta razón, que es más correcto comparar el espectro del complejo con el del ligando desprotonado (CCA) sin embargo, esto no es accesible experimentalmente<sup>23</sup> por lo que se sustituye con la sal de potasio KCCA, ya que se ha establecido que su comportamiento vibracional se asemeja al del CCA y su espectro FTIR experimental permite predecir el modo de unión del ligando en los complejos metálicos<sup>10</sup>. En este estudio también se comparó el anión del ácido cumarín carboxílico que se obtuvo como contraanión del complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})_3]^{2+}$ .

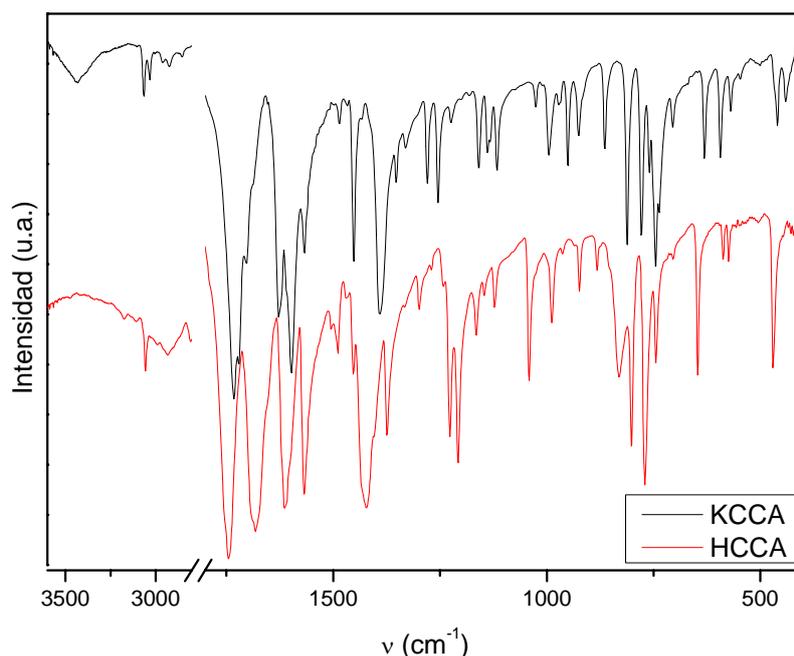
El anión CCA es un sistema polidentado que contiene tres potenciales átomos donores para coordinar con iones metálicos (un oxígeno carbonílico ( $\text{C}=\text{O}$ ) y dos oxígenos carboxílicos ( $\text{COO}$ )) y por lo tanto, son posibles diferentes modos de unión, monodentados o bidentados. Distintos estudios computacionales<sup>24</sup> muestran dos regiones reactivas que sugieren dos posibles modos de unión bidentados: a través de un oxígeno carboxílico y el oxígeno carbonílico (modo 1), o a través de los átomos de oxígeno carboxílicos (modo 2) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Regiones reactivas del CCA y modos de coordinación bidentados posibles<sup>24</sup>.

La principales diferencias entre la especie protonada y la desprotonada, se encuentran en las bandas que se asignan a modos de vibración del estiramiento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de la lactona y a modos de vibración del grupo ácido carboxílico. Para el HCCA el carbonilo de la lactona se encuentra involucrado en un puente de hidrógeno intramolecular (**Fig. 1**). Cuando esta molécula sufre una desprotonación, se genera un corrimiento de la frecuencia de estiramiento hacia mayores valores (de  $1683 \text{ cm}^{-1}$  a  $1722 \text{ cm}^{-1}$ ). La otra diferencia importante entre las dos especies se encuentra en el estiramiento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  del ácido carboxílico del HCCA, localizado en  $1745 \text{ cm}^{-1}$  (**Fig. 5**). Cuando se forma el anión carboxilato dicho modo cambia a los modos de estiramiento antisimétrico y simétrico ( $\nu_{\text{as}}$  y  $\nu_{\text{s}}$ ) que se observan a menores frecuencias. Además, la diferencia entre estos dos valores es indicativa del modo de unión del carboxilato al metal, pudiendo ser bidentada, monodentada, iónico o puente<sup>25</sup>.

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)



**Figura 5.** Comparación de los espectros FTIR del ácido carboxílico HCCA (negro) y su sal de potasio KCCA (rojo).

En su estudio computacional, Georgieva y colaboradores<sup>23</sup> proponen una interacción entre el ión  $K^+$  y el CCA a través de los tres oxígenos disponibles (**tabla 2**), es por esta razón que las frecuencias de vibración obtenidas a partir de la optimización de esta geometría propuesta difieren de las que hemos observado experimentalmente. En nuestro caso, de acuerdo con el espectro FTIR obtenido, proponemos una interacción electrostática del  $K^+$  solamente a través de los dos oxígenos del carboxilato, mientras que el  $\nu(C=O)$  de la lactona no intervendría. Las diferencias en las frecuencias asignadas están de acuerdo con las diferencias de estructuras propuestas ya que la  $\nu(C=O)$  de la lactona se encuentra a mayores frecuencias en el espectro experimental (de acuerdo con una menor interacción con el catión), mientras que la  $\nu_{as}(C=O)$  experimental está a menores frecuencias que las predichas por el estudio computacional (de acuerdo con una mayor interacción del carboxilato con el centro metálico).

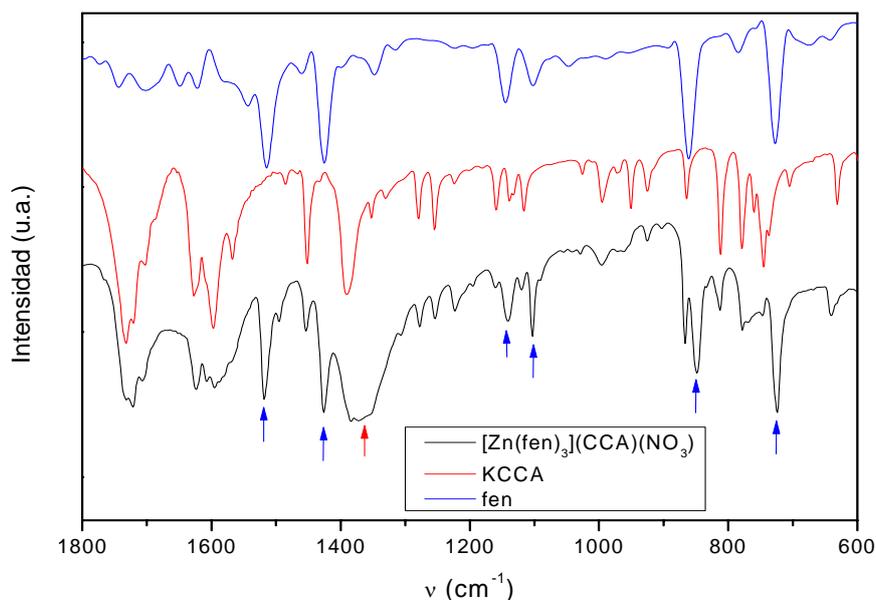
**Tabla 2.** Frecuencias y asignaciones de algunos modos vibracionales teóricos<sup>23</sup> y experimentales para la sal de potasio KCCA.

Asignación	teórica ( $cm^{-1}$ ) <sup>23</sup>	experimental ( $cm^{-1}$ )
$\nu(C=O)$ lactona	1718	1732
$\nu_{as}(COO^-)$	1668	1597
$\nu_s(COO^-)$	1378	1390

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)

Similar al comportamiento del CCA en la sal de potasio, es el observado para el cristal obtenido para el complejo  $[\text{Zn}(\text{fen})_3](\text{CCA})(\text{NO}_3)$ , en el que según la estructura obtenida por RX (**Fig. 4**) el CCA no se encuentra coordinando al metal, por lo tanto, se encuentra desprotonado en una red cristalina con un catión de gran tamaño como es el  $[\text{Zn}(\text{fen})_3]^{+2}$ , en este caso, la interacción del catión con el carbonilo de la lactona se vuelve prácticamente imposible, por lo que las bandas observadas por FTIR del cristal corresponderían a un CCA puramente iónico, cuya interacción electrostática ocurre a través del grupo carboxilato. La diferencia observada entre los valores de las frecuencias de los estiramientos simétricos y antisimétricos del carboxilato es de  $212 \text{ cm}^{-1}$ , que se encuentra de acuerdo con una interacción del tipo iónica. Una diferencia mayor que este valor indicaría una coordinación de  $\text{COO}^-$  a través de un solo átomo de oxígeno (monodentada) y una diferencia menor a  $212 \text{ cm}^{-1}$ , indica coordinación por los dos átomos de oxígeno (bidentada o puente)<sup>25</sup>. Las asignaciones propuestas se encuentran en la **tabla 2**.

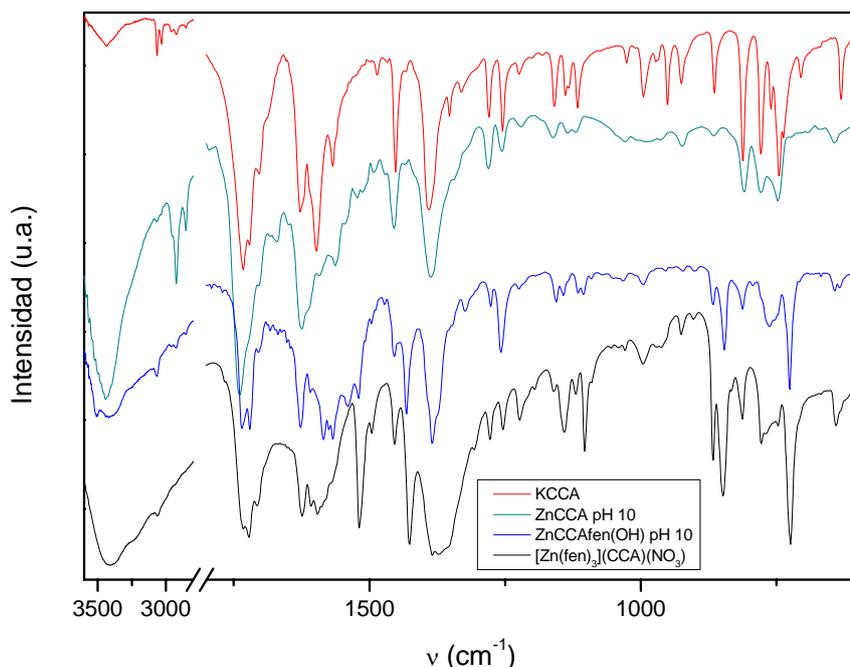
Por comparación del espectro FTIR del monocristal de  $[\text{Zn}(\text{fen})_3](\text{CCA})(\text{NO}_3)$  con el KCCA obtenido experimentalmente, se ven claras similitudes en las posiciones de las bandas correspondientes al CCA, sin embargo, el cristal tiene bandas adicionales que corresponden a la fenantrolina y al nitrato (**Fig. 6**). Por comparación con el espectro experimental de la fenantrolina, se asignan las bandas del cristal en  $1519, 1426, 1141, 1103, 848$  y  $724 \text{ cm}^{-1}$  al ligando coordinado. Por el lado del nitrato, solo puede distinguirse en este espectro una banda intensa, en  $1371 \text{ cm}^{-1}$ <sup>25</sup>, mientras que las bandas de menores frecuencias están solapadas con las del CCA o la fen por lo que no pueden asignarse claramente. Cabe destacar que la banda localizada en  $1371 \text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento asimétrico  $\nu_3$  del ion nitrato, considerando que se encuentra en la estructura como anión, y que por lo tanto posee simetría  $D_{3h}$ .



**Figura 6.** Comparación de los espectros FTIR del cristal de  $[\text{Zn}(\text{fen})_3](\text{CCA})(\text{NO}_3)$  (negro), de la sal de potasio KCCA (rojo) y de la fenantrolina (azul). Las flechas indican la localización de las bandas en el cristal asignadas a modos de estiramiento de la fenantrolina (azul) y del anión nitrato (roja).

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)

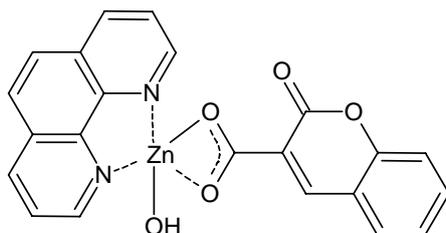
Una vez que se tuvieron las asignaciones para el KCCA y para el cristal  $[\text{Zn}(\text{fen})_3](\text{CCA})(\text{NO}_3)$ , se procedió a comparar estos espectros con el de la muestra policristalina de ZnCCAfén obtenida a pH 10 (**Fig. 7**). Si bien las posiciones de las bandas correspondientes al CCA son similares para ambos complejos, en la muestra policristalina no se observan las bandas correspondientes al anión nitrato.



**Figura 7.** Comparación de los espectros FTIR del cristal de  $[\text{Zn}(\text{fen})_3](\text{CCA})(\text{NO}_3)$  (negro), de la muestra policristalina del complejo ternario ZnCCAfén(OH) obtenido a pH 10 (azul), del complejo binario ZnCCA obtenido a pH 10 (verde) y de la sal de potasio KCCA (rojo).

De acuerdo con el análisis elemental, el complejo tendría una fórmula molecular propuesta  $[\text{Zn}(\text{fen})\text{CCA}(\text{OH})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (**Fig. 8**) en la que, tanto la fenantrolina como el CCA se encuentran coordinando al Zn(II). En el espectro FTIR se observa una banda intensa en  $3513 \text{ cm}^{-1}$  que se le asigna al modo de estiramiento del grupo OH, adicionalmente, en  $3350 \text{ cm}^{-1}$  la banda ancha se le asigna a los modos de estiramientos de las moléculas de agua de hidratación. Por otro lado, la banda más intensa del espectro,  $1733 \text{ cm}^{-1}$ , se le asigna al grupo C=O de la lactona, de acuerdo a este valor de frecuencia, se propone que este grupo no interviene en la coordinación, ni interacciona a través de puentes de hidrógeno. Por otro lado, la diferencia entre los valores de las frecuencias de estiramiento simétrico y antisimétrico para el grupo carboxilato es de  $183 \text{ cm}^{-1}$ , menor al encontrado para el cristal, es por esta razón que se propone que el CCA está actuando como un ligando bidentado<sup>25</sup>. Las frecuencias correspondientes a estiramientos relacionados con la fenantrolina se encuentran en las mismas posiciones que para el cristal, ya que la coordinación propuesta es la misma en ambos casos.

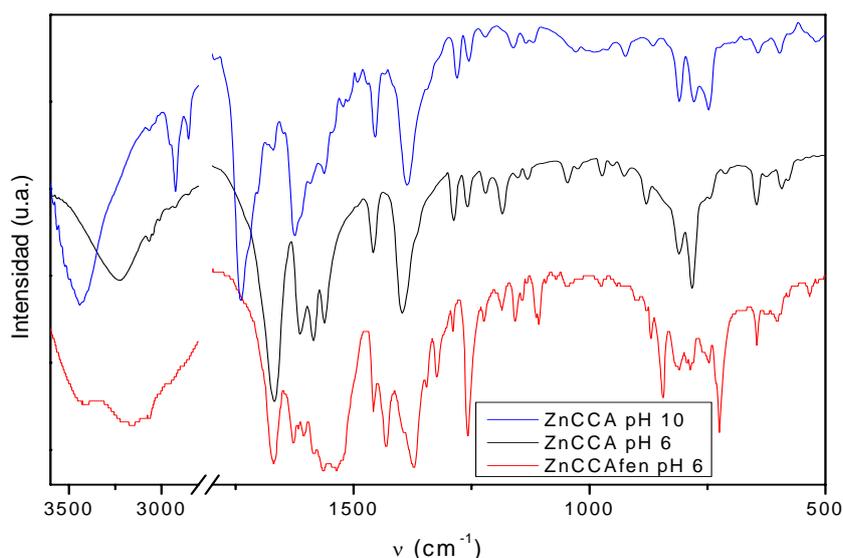
### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)



**Figura 8.** Estructura propuesta para el complejo ZnCCAfen obtenido a pH 10.

Posteriormente, se compararon los espectros con el de la muestra policristalina de ZnCCA obtenida a pH 10 (**Fig. 7**), dada la similitud con los espectros anteriores (con excepción de las bandas correspondientes a la fenantrolina) y de acuerdo con el análisis elemental y el estudio termogravimétrico, se propone que el complejo tendría una fórmula molecular  $[Zn_2CCA(OH)_3(H_2O)_2]$ , es decir, que se trataría de un complejo binuclear. De acuerdo con el espectro FTIR, se propone que el CCA está coordinando al Zn(II) a través del carboxilato, sin que intervenga el carbonilo de la lactona. Es por esta razón, que la banda observada en  $1740\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento  $\nu(C=O)$  del resto carbonilo de la lactona, mientras que la diferencia entre los valores de las frecuencias simétricas y antisimétricas para el grupo carboxilato es de  $182\text{ cm}^{-1}$  lo que puede indicar, tanto la presencia de un carboxilato puente, como una coordinación bidentada. La presencia de dos iones Zn por fórmula sería indicativa de la presencia de un puente del grupo carboxilato del único ligando cumarín-3-carboxilato entre los dos centros metálicos.

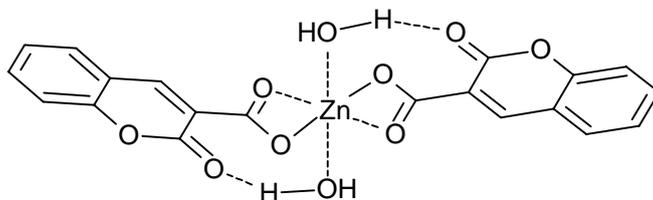
Por otro lado, como se mencionó en la parte de la síntesis, se preparó el complejo a pH 6 que había sido previamente reportado<sup>9</sup>. Este complejo (ZnCCA pH 6) muestra un espectro diferente al de pH 10, principalmente en la zona de las bandas correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo de la lactona y a modos vibracionales del grupo carboxilato (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Comparación del espectro del complejo binario ZnCCA a pH 6 (negro) y a pH 10 (azul) con el complejo ternario ZnCCAfen obtenido a pH 6 (rojo).

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)

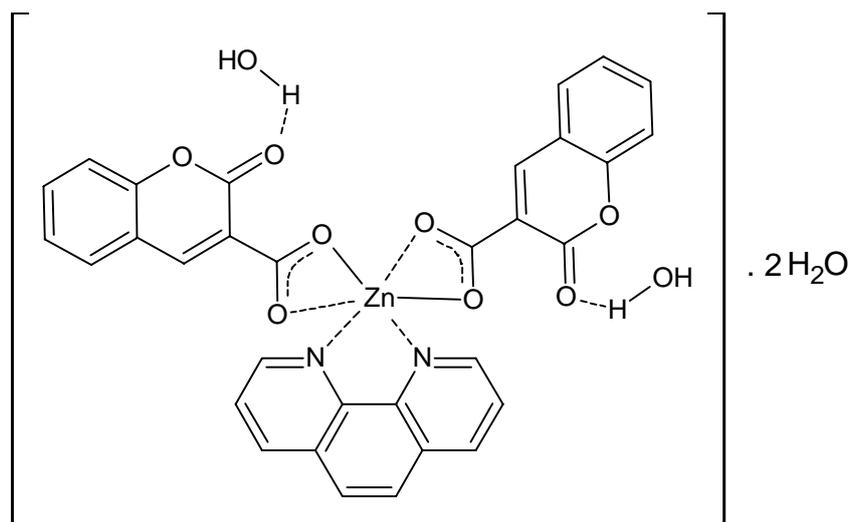
Para el ZnCCA pH 6, la banda observada en  $1667\text{ cm}^{-1}$ , se asigna al estiramiento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de la lactona. Este valor muestra una similitud con el que se observaba para el HCCA ( $1682\text{ cm}^{-1}$ ) en el que el carbonilo intervenía en un puente de hidrógeno intramolecular. Creaven y colaboradores<sup>9</sup> obtuvieron experimentalmente este complejo en fase sólida y realizaron un análisis computacional de su estructura para poder asignar las bandas observadas. De acuerdo con este estudio, el corrimiento hacia menores frecuencias de la banda observada en  $1667\text{ cm}^{-1}$  no estaría indicando coordinación al metal, sino que se debería a una interacción por puente de hidrógeno con una molécula de agua que coordina al metal. Por el lado del grupo carboxilato, la diferencia entre los valores de las frecuencias simétrica y antisimétrica es de  $163\text{ cm}^{-1}$  el que se correspondería con una coordinación a través del grupo carboxilato que actúa como ligando bidentado<sup>25</sup>. Este puente de hidrógeno se observa también como un corrimiento de la banda ancha en la región alta del espectro. Así, esta banda se encuentra en  $3227\text{ cm}^{-1}$ , desplazándose  $220\text{ cm}^{-1}$  hacia menores frecuencias comparada con la del complejo ZnCCA obtenido a pH 10, en el que no hay interacciones por puente de hidrógeno. De acuerdo con esto, se propone una estructura (**Fig. 10**) similar a la reportada previamente<sup>9</sup>.



**Figura 10.** Estructura propuesta para el complejo ZnCCA obtenido a pH 6.

Por último, el complejo de  $\text{Zn}(\text{CCA})_2\text{fen}$  obtenido a pH 6 muestra un patrón FTIR similar al del ZnCCA a pH 6, pero con las bandas de la fenantrolina en posiciones similares a las observadas tanto para el complejo ZnCCAfén pH 10, como para el cristal (**Fig. 9**). De acuerdo a la fórmula molecular propuesta  $[\text{Zn}(\text{CCA})_2\text{fen}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , el Zn(II) se encuentra en un entorno octaédrico con las seis posiciones de coordinación ocupadas por el CCA y la fen, mientras que las moléculas de agua se encuentran actuando como aguas de hidratación. Al igual que en el caso anterior, la banda de la lactona también se encuentra a frecuencias bajas, en  $1669\text{ cm}^{-1}$ , indicando algún tipo de interacción del grupo carbonilo por puente H con el agua. Con respecto al grupo carboxilato, la diferencia entre los valores de las frecuencias simétrica y antisimétrica es de  $191\text{ cm}^{-1}$ , lo que sugiere un tipo de coordinación bidentada de este grupo<sup>25</sup>. Además, en la región alta del espectro, de manera similar a la anterior, se observa una banda ancha en  $3150\text{ cm}^{-1}$ , desplazada a menores frecuencias, cuando se la compara con la del  $\text{Zn}(\text{CCA})_2\text{fen}$  a pH 10 ( $3351\text{ cm}^{-1}$ ). En este caso, se propone una interacción de los restos carbonilo de la lactona por puente de hidrógeno con dos de las cuatro moléculas de agua fuera del entorno de coordinación (**Fig. 11**), de manera similar al trabajo realizado por Georgieva y colaboradores<sup>26,27</sup> para complejos metálicos con otro derivado cumarínico. Las dos moléculas de agua de hidratación restantes se encuentran interaccionando de una manera más débil, sin poder localizarlas de manera inequívoca, debido a que no se pudo obtener un monocristal de este compuesto.

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)



**Figura 11.** Estructura propuesta para el complejo  $Zn(CCA)_2phen$  obtenido a pH 6.

Mediante el análisis de los espectros Raman se obtiene el mismo comportamiento que el asignado por FTIR. En esta técnica se comparan HCCA, KCCA y los complejos binarios  $ZnCCA$  obtenidos a pH 6 y 10 (**Fig. 12**). Las bandas de estiramiento de los espectros Raman de HCCA que aparecen en  $1738\text{ cm}^{-1}$  y  $1671\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a los modos  $\nu(C=O)$  carboxílicos y carbonílicos, respectivamente. Cuando el ácido se desprotona, se observa la desaparición de la banda de  $1738\text{ cm}^{-1}$  junto con la aparición de dos bandas nuevas en  $1599\text{ cm}^{-1}$  y  $1374\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los estiramientos antisimétrico y simétrico del carboxilato ( $\Delta = 225\text{ cm}^{-1}$ ). El estiramiento  $C=O$  carbonílico aparece como una banda débil desplazada al azul en  $1738\text{ cm}^{-1}$  como fue previamente justificado mediante diferentes publicaciones y cálculos teóricos<sup>24</sup>.

Los estiramientos antisimétrico y simétrico del anión carboxilato coordinado al  $Zn(II)$  observados por espectroscopia Raman dan cuenta de diferencias entre ambos (**Tabla 3**).

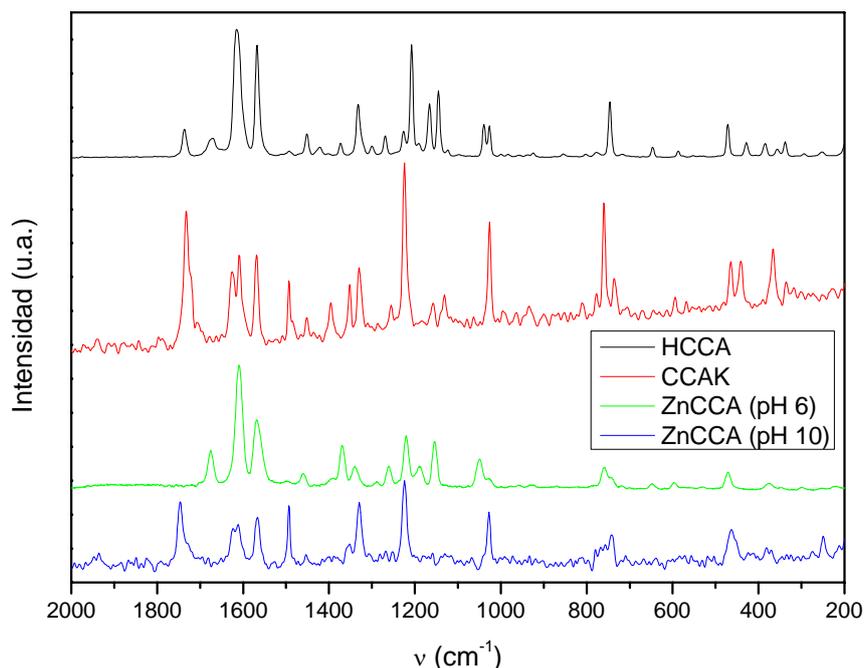
**Tabla 3.** Modos vibracionales de los espectros Raman del grupo carboxilato iónico (KCCA) y coordinado ( $ZnCCA$ )

Compuesto	$\nu_{as}$	$\nu_s\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\Delta(\nu_{as} - \nu_s)\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
<b>ZnCCA pH6</b>	1568	1369	199
<b>ZnCCA pH 10</b>	1566	1395	171
<b>KCCA</b>	1599	1374	225

$\nu$ : frecuencia de estiramiento; as: asimétrica; s: simétrica. Todas las frecuencias se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

De acuerdo con datos previos, las bandas observadas en la zona  $1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de estiramiento  $C=C$  de HCCA. Estas bandas no cambian significativamente en los espectros de los complejos o del cristal, lo que indica que la coordinación no produce polarización sustancial en el anillo de la cumarina. Las bandas Raman en  $1615\text{ cm}^{-1}$  y  $1568\text{ cm}^{-1}$  de HCCA se asignan a las vibraciones de estiramiento  $C=C$  y estas posiciones se mantienen por desprotonación y/o complejación.

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)

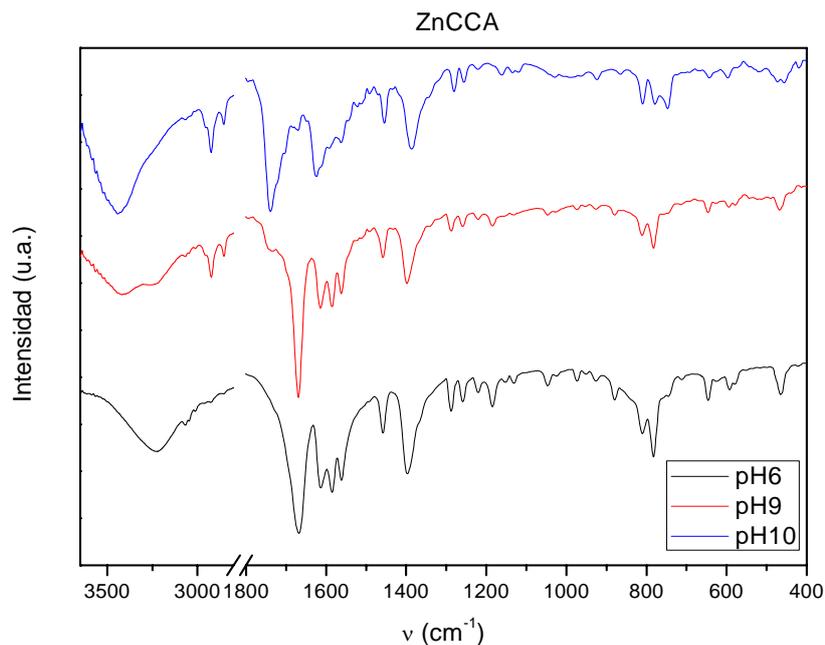


**Figura 12.** Espectros Raman para el HCCA (negro), el KCCA (rojo) y los complejos binarios de ZnCCA a pH 6 (verde) y a pH 10 (azul).

#### **3.3.1. Variación con el pH por FTIR**

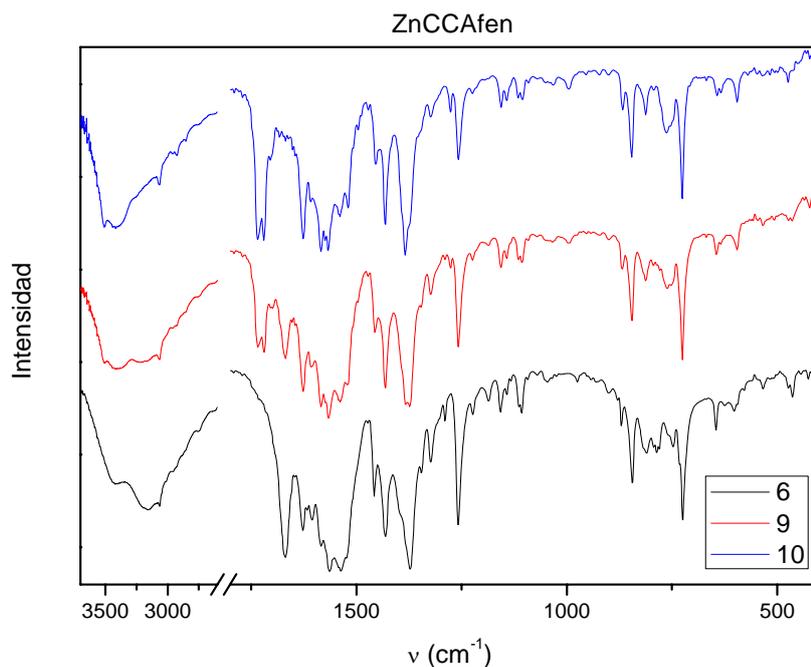
Para estudiar la relación que existe entre los complejos binarios y los ternarios se realizó una variación con el pH, seguida por FTIR. Por el lado de los complejos binarios de ZnCCA, se realizó una mezcla de soluciones acuosas de CCA y Zn(II), al precipitado blanco formado se le fue variando el pH con  $\text{HNO}_3$  o  $\text{NaOH}$  1M bajo agitación continua dejando que la suspensión llegue a un equilibrio para cada unidad de pH. Luego se tomaron alícuotas que se filtraron a cada valor de pH, se secaron en estufa se les midió el espectro FTIR. En el ensayo se obtuvo una especie a pH bajos (entre 4 y 6), y otra especie a pH altos (entre 10 y 12). A valores intermedios de pH (entre 6 y 10) se observa un espectro FTIR mezcla de las dos especies anteriores. Las dos especies están en equilibrio, ya que solamente con variar el pH se interconvierten una en otra, en una reacción del tipo reversible, en la que se propone un reemplazo de un CCA del entorno de coordinación a valores de pH bajos por un oxhidrilo a valores de pH altos. Los espectros con variaciones más significativas se muestran en la **figura 13**.

### 3.3. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO (FTIR Y Raman)



**Figura 13.** Espectros FTIR del complejo binario sólido de ZnCCA a distintos valores de pH.

De manera similar a lo anterior, se realizó la variación con el pH del complejo ternario de ZnCCAfén. En el espectro FTIR también se observa una especie a valores bajos de pH (4-6) y otra especie a valores altos de pH (10-12). En la **figura 14** se muestran los espectros con mayores diferencias. En este caso, puede observarse a valores de pH intermedios (6-10) un espectro mezcla de los dos anteriores, debido al equilibrio reversible en el que se forma un complejo binuclear, intercambiando CCA de la especie ácida (**Fig. 11**) por grupos oxhidrilos en la especie alcalina (**Fig. 8**).



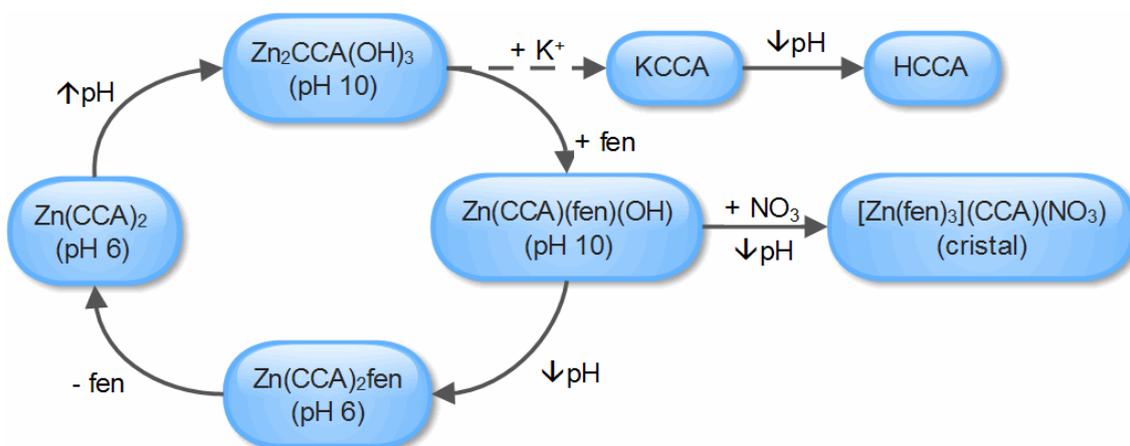
**Figura 14.** Espectros FTIR del complejo ternario sólido de ZnCCAfén a distintos valores de pH.

### 3.3.2. Resumen análisis espectroscópico

Mediante espectroscopía FTIR y Raman, en conjunto con el análisis elemental se pudo proponer mediante distintas comparaciones, diferentes estructuras moleculares para los complejos binarios y para el ternario obtenido a pH 6. Por el contrario, para el complejo ternario de pH 10, si bien se obtuvo su fórmula mínima, no se pudo establecer la geometría molecular mediante este tipo de análisis por lo que se requerirán en un futuro otro tipo de ensayos a fin de obtener la estructura del complejo asignado en principio como binuclear.

Con respecto a las frecuencias analizadas, se puede concluir que la frecuencia de vibración del grupo carbonilo de la lactona, no necesariamente es indicador de la coordinación con un metal<sup>27</sup>, sino que puede deberse también a la formación de puentes de hidrógeno. En caso de que esto ocurra, se observarán también variaciones en la zona alta del espectro, donde se observa el estiramiento O-H del agua. Para el complejo ternario a pH 10, esta banda aparece en  $3350\text{ cm}^{-1}$ , mientras que a pH 6, se observa en  $3150\text{ cm}^{-1}$ . Esta diferencia de frecuencias de  $200\text{ cm}^{-1}$ , se debe a la formación de puente H, como consecuencia, los modos  $\nu(\text{O}_{(\text{CCA})}-\text{H}_w)$  de los complejos a pH 6 se desplazan a menor frecuencia, comparado con los modos normales de los compuestos a pH 10<sup>26</sup>. Es de destacar que dicha frecuencia es mucho menor en HCCA donde el puente H es intramolecular ( $3056\text{ cm}^{-1}$ ). Teniendo en cuenta la polarización producida por dicha interacción la frecuencia de estiramiento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  de la lactona también sufre corrimientos por alargamiento de dicho enlace durante la polarización inducida por formación de puente H (**tabla 2**). Para el CCA iónico (cristal) decrece la polarización, el enlace C=O se acorta y la frecuencia de dicho grupo en el anión cumarín carboxilato se corre a mayores valores con respecto al ácido con una diferencia de  $39\text{ cm}^{-1}$  (de  $1683\text{ cm}^{-1}$  a  $1722\text{ cm}^{-1}$ ).

Un resumen de todos los compuestos sintetizados, se muestra en el **diagrama 1**.

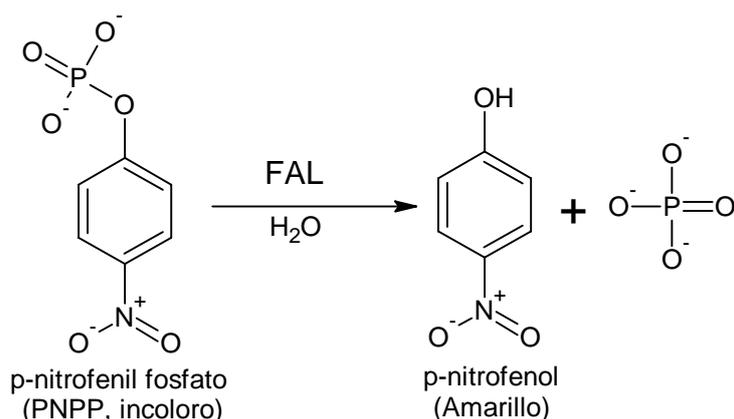


**Diagrama 1.** Distintas especies obtenidas experimentalmente. Sobre las flechas se indican las diferencias de los agregados o los cambios en el pH entre una especie y otra.

### 3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

#### 3.4.1. Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina

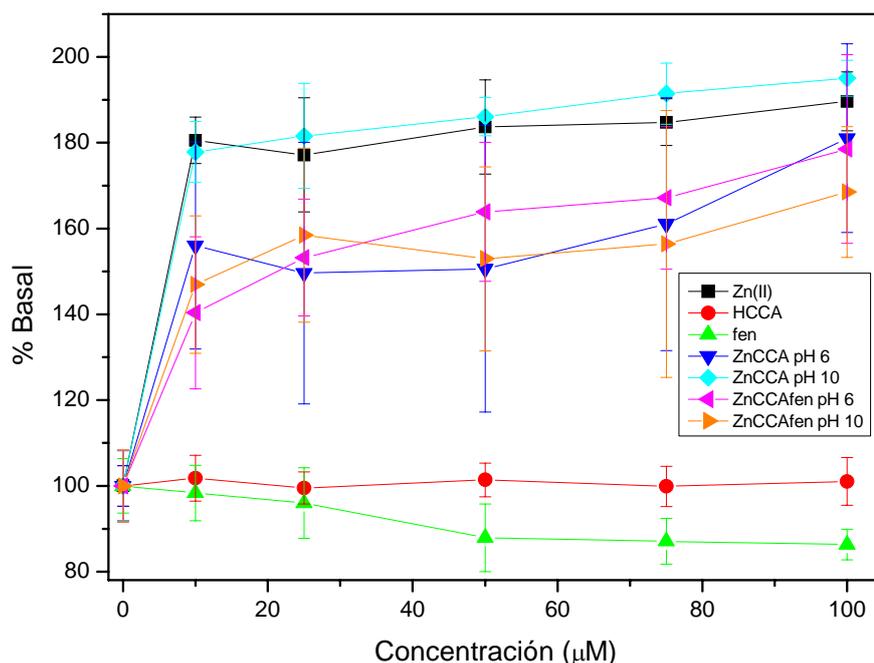
Para estudiar la actividad enzimática, se utilizó la fosfatasa alcalina (FAL) intestinal bovina a la que se le adicionó como sustrato el p-nitrofenil fosfato (PNPP). Por acción de la enzima, el sustrato pierde el grupo fosfato formando el p-nitrofenol, de color amarillo (**Fig. 15**). Cuanto mayor sea la actividad de la enzima, mayor será la absorbancia medida a 405 nm (amarillo). Dada la relación que existe entre el Zn(II) y el sitio activo de la fosfatasa alcalina (FAL) se decidió estudiar el efecto de los complejos de Zn(II) con CCA sobre la actividad, realizando distintos agregados y monitoreando las variaciones en la absorbancia con respecto al control sin agregados.



**Figura 15.** Reacción de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) sobre el sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP).

Se evaluó el efecto en la actividad tanto de los complejos binarios de ZnCCA obtenidos a pH 6 y 10, como de los complejos ternarios de ZnCCAfen obtenidos también a pH 6 y 10. También se midió la actividad de la o-fenatrolina (fen), el ácido 3-cumarín carboxílico (HCCA) y el Zn(II). Todos los compuestos se testearon en concentraciones de hasta 100 μM (**Fig. 16**).

### 3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*



**Figura 16.** Ensayo de la variación de la actividad de la FAL debido al agregado de diferentes compuestos en concentraciones hasta 100  $\mu\text{M}$ .

En este rango de concentraciones, se observa que el Zn(II) aumenta la actividad de la enzima. A una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , la absorbancia aumenta un 90% con respecto al control sin ningún agregado. Estos valores están de acuerdo con lo mencionado anteriormente, ya que a concentraciones menores a 1 mM el Zn(II) aumenta la velocidad de reacción de la enzima<sup>20</sup> lo que conlleva a un aumento en la actividad.

Los complejos de Zn(II) tanto binarios, como ternarios muestran un comportamiento similar al del Zn(II) sin diferencias significativas con respecto al metal en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ . Así, los complejos de ZnCCA aumentan la actividad a la máxima concentración testada en un 81 % a pH 6 y un 95 % a pH 10. Los complejos ternarios por su parte, muestran un aumento del 78 % a pH 6 y de un 68 % a pH 10, a la misma concentración que los anteriores.

El HCCA no muestra diferencias en la actividad de la FAL a las concentraciones testadas (hasta 100  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, la fen solo muestra una ligera inhibición (14 %) a la máxima concentración testada. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, dado al carácter quelante de la fenantrolina, la actividad de la FAL disminuye debido a la complejación de la fenantrolina con el Zn(II) del sitio activo<sup>17</sup>. El valor de inhibición de la actividad es relativamente bajo a 100  $\mu\text{M}$ , sin embargo se incrementa notoriamente a concentraciones 10 veces mayores, ya que se observa una inhibición de la actividad de la FAL de un 59 % a una concentración 1mM<sup>28</sup>.

En resumen, en las concentraciones bajas testadas se observa un aumento en la actividad de todos los complejos, de una manera similar a lo que

### 3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

ocurre con el Zn(II), el HCCA no tiene actividad, mientras que la fen disminuye ligeramente la actividad enzimática. Debido a la baja solubilidad de los complejos, no pudo realizarse el ensayo a mayores concentraciones (hasta 1 mM), lo que permitiría comparar con los valores obtenidos para la fen.

#### **3.4.2. Efecto antimicrobiano**

Debido a que ha sido reportado previamente que algunos derivados cumarínicos<sup>28</sup> y complejos de HCCA con metales de transición tienen efecto antimicrobiano<sup>12</sup>, se estudió la actividad de los ligandos y de los complejos de Zn en distintas cepas de bacterias y hongos, del género *Cándida*, de interés clínico. Dentro de las cepas bacterianas, se utilizaron *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) un patógeno oportunista aeróbico, *Escherichia coli* (*E. coli*) es una enterobacteria, presente en la flora intestinal animal, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) causante de infecciones en el tracto gastrointestinal, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) responsable de infecciones en el tracto urinario, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) presentes generalmente en la piel, estos cuatro últimos son microorganismos anaeróbicos facultativos. Por el lado de las cepas de hongos, se utilizaron *Candida albicans* (*C. albicans*) un patógeno de mucosas o piel, *Candida glabrata* (*C. glabrata*) un microorganismo no patogénico, *Candida krusei* (*C. krusei*), *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) responsable de infecciones en heridas, *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) un patógeno existente en la flora normal humana. En todas estas cepas se realizaron medidas de la concentración inhibitoria mínima (CIM), correspondiente a la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (**Tabla 4**). Debemos tener en cuenta que está establecido que la actividad antibacteriana se considera significativa cuando los valores de CIM son de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  o menores. Cuando la CIM está en el rango de 100 a 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  la actividad antibacteriana se considera moderada, cuando la CIM están entre 500 a 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  se considera débil, y cuando la CIM es de 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  se considera inactivo<sup>30,31</sup>.

Las actividades medidas para Zn(II) y fen coinciden con nuestros datos reportados previamente<sup>32</sup>. Dentro de las cepas bacterianas, *P. aeruginosa*, la única cepa bacteriana aeróbica testada, es la que muestra el menor efecto ante el tratamiento con los distintos compuestos. Es así que solamente la fenantrolina muestra una ligera actividad antimicrobiana, con una CIM de 375  $\mu\text{g/ml}$ . Similar a este caso es el de la cepa de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), en el que la fen muestra una CIM de 94  $\mu\text{g/ml}$  sin que los restantes compuestos muestren actividad microbiana. La cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) demostró ser sensible al tratamiento no solo con la fenantrolina sino con el Zn(II), estos compuestos mostraron una CIM de 12 y 188  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, este último valor para el Zn(II) fue el mayor efecto obtenido para el metal, y se observó tanto en esta cepa, como en la de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). En estas dos últimas cepas, además de ser sensibles a la fen, mostraron ser ligeramente sensibles a algunos de los complejos testados. Sin embargo, los valores de CIM observados son mayores a los del Zn(II) y fen, aunque menores al HCCA

### 3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

que no muestra ningún efecto antimicrobiano en ninguna de las cepas testeadas (confirmando datos medidos previamente para el HCCA).

Reportes previos con HCCA mostraron que el ácido no presenta actividad antifúngica con las cepas tratadas y sólo produce algo de inhibición en *Candida albicans* ( $CIM_{80}$ , es decir la menor concentración del compuesto que inhibe el crecimiento fúngico en un 80% toma un valor de  $60 \mu\text{g/mL}$ )<sup>32</sup>. En líneas generales, la fenantrolina mostró tener un efecto antifúngico mayor que para las cepas bacterianas, mientras que contrariamente, la actividad antifúngica del Zn(II) disminuyó. Para estas cepas, ninguno de los complejos de ZnCCA se comportan como compuestos antimicrobianos, por lo que no mejora la actividad del HCCA y empeora en algunos casos el leve efecto antimicrobiano que muestra el Zn(II). Por su parte, los complejos ternarios de ZnCCAFen muestran buenas actividades para las cepas de *Candidas*. Los bajos valores de CIM medidos están en concordancia con los valores obtenidos para la fenantrolina. Es decir, que el complejo ternario mejora notoriamente la actividad antifúngica del HCCA y del Zn(II) debido a la complejación con fenantrolina. El mayor efecto se observó en *Candida albicans* (*C. albicans*), cepa en la cual la fen tiene una CIM de  $3 \mu\text{g/ml}$  y los complejos ternarios obtenidos tanto a pH 6, como a pH 10 tienen una CIM de  $12 \mu\text{g/ml}$ .

A modo de resumen, el HCCA no muestra actividad antimicrobiana en ninguna de las cepas testeadas, al igual que el ZnCCA obtenido a pH 6 y a pH 10 (con excepción del ZnCCA pH 10 en *S. aureus*). El Zn por su parte es un elemento esencial para todos los organismos vivos, es necesario para el crecimiento bacteriano *in vitro*, sin embargo, a concentraciones del orden de milimolar presenta efectos tóxicos<sup>33</sup>. Es por esta razón que en las bajas concentraciones testeadas, o bien no presenta efecto antimicrobiano, o tiene un efecto leve (como en el caso de *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermis*)<sup>34</sup>. Por otro lado, fue ampliamente demostrado que la fenantrolina es un compuesto que muestra actividad antimicrobiana<sup>35</sup>, los menores valores se obtienen en las cepas de hongos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*, similar a los que ocurre con los complejos ternarios de ZnCCAFen. Dentro de estos complejos ternarios, el obtenido a pH 10 es ligeramente mejor antimicrobiano que el obtenido a pH 6. Estos complejos muestran un mayor efecto en cepas de hongos (eucariotas) que en cepas bacterianas (procariotas). Estudios previos de  $\text{Zn}(\text{fen})_2$  en cepas bacterianas de *S. aureus* and *E. coli*, demostraron no tener actividad antibacteriana al menos en concentraciones  $10 \mu\text{M}$ <sup>36</sup> y esto se correlaciona con la poca actividad de los complejos ternarios ejercida sobre estas cepas. La acción inhibitoria de fen sobre un amplio rango de hongos se relacionó con la remoción de zinc(II), la que a su vez parece asociarse con la inhibición de la glicanasa de la pared celular de las manoproteínas<sup>37</sup>. El proceso se revierte con el agregado de iones Zn. Además, la presencia de iones zinc está relacionada con el efecto estimulante en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y la presencia de fen en las células fúngicas inhibe su biosíntesis. Las células crecidas en presencia de fen tienen una pared celular distendida, ruptura de organelas internas y remoción de la membrana citoplasmática desde adentro de la pared celular.

### 3.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria (CIM) del metal Zn(II), los ligandos libres (fen y HCCA) y de los complejos binarios de ZnCCA y de los complejos ternarios ZnCCAfen obtenidos a pH 6 y a pH 10, testeados en diferentes cepas bacterianas y de hongos de referencia, expresado como  $\mu\text{g/ml}$ .

		Zn(II)	fen	HCCA	ZnCCA		ZnCCAfen	
					pH 6	pH 10	pH 6	pH 10
Bacterias	<i>P. aeruginosa</i>	1500	375	1500	>1500	>1500	>1500	>1500
	<i>E. faecalis</i>	1500	94	1500	>1500	>1500	1500	1500
	<i>E. coli</i>	188	12	>1500	>1500	1500	1500	1500
	<i>S. aureus</i>	188	24	1500	>1500	750	750	750
	<i>S. epidermidis</i>	188	12	1500	1500	1500	750	375
Hongos	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1500	3	>1500	>1500	>1500	12	12
	<i>C. glabrata</i>	1500	6	>1500	>1500	>1500	24	12
	<i>C. krusei</i>	1500	6	>1500	>1500	1500	24	24
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	750	12	>1500	>1500	>1500	188	24
	<i>C. tropicalis</i>	750	12	>1500	>1500	>1500	188	94

Se ha sugerido que en las enfermedades hepáticas son comunes las infecciones microbianas y que existe una relación entre el nivel de fosfatasa alcalina y la infección por hongos y bacterias. En particular, cuando se presentan dichas infecciones el nivel de FAL decrece<sup>38</sup>. Probablemente, esta sea la razón por la cual los complejos con fenantrolina estudiados que aumentaron la actividad de fosfatasa alcalina resultaron tener cierta toxicidad sobre bacterias y marcada toxicidad en las cepas de hongos estudiadas. El ácido cumarín carboxílico no mostró efecto en ninguna de las pruebas. Para las concentraciones estudiadas, la fenantrolina no ejerció demasiada acción inhibitoria sobre la FAL y en estas condiciones, también ejerció un efecto deletéreo sobre las cepas estudiadas, aunque en este caso el efecto quelante del compuesto podría ser la causa de la toxicidad, como ya se demostró.

- (1) Freake, H. C. In *Encyclopedia of Human Nutrition*; 2005; pp. 447–454.
- (2) Fernandez, J. C.; Moreno, V.; Sánchez, A.; Sánchez, J. L.; Sordo, J. *Química Bioinorgánica*; Síntesis: Madrid, España, 2002.
- (3) Prasad, A. S. *J. Am. Coll. Nutr.* **1996**, *15*, 113–120.
- (4) Cousins, R. J.; Ziegler, E. E.; Filer, L. J. *Conocimientos actuales sobre nutrición.*; 7th ed.; International Life Sciences Institute: Washington, 1999; pp. 312–327.
- (5) Prasad, A. *Clin Endocrinol Metab.* **1985**, *14*, 567–89.
- (6) Prasad, A. S. *J Am Coll Nutr.* **1985**, *4*, 65–72.
- (7) Pfeiffer, C. C. *Neurobiology of the trace metals zinc and copper*; Academic Press: New York, 1972.
- (8) Bubols, G. B.; Vianna, D. da R.; Medina-Reimon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R. M.; Eifler-Lima, V. L.; Garcia, S. C. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2013**, *13*, 318–334.
- (9) Creaven, B. S.; Devereux, M.; Georgieva, I.; Karcz, D.; McCann, M.; Trendafilova, N.; Walsh, M. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *84*, 275–285.
- (10) Georgieva, I.; Mihaylov, T.; Trendafilova, N. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *135*, 100–112.
- (11) Chimenti, F.; Secci, D.; Bolasco, A.; Chimenti, P.; Granese, A.; Befani, O.; Turini, P.; Alcaro, S.; Ortuso, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3697–3703.
- (12) Thati, B.; Noble, A.; Rowan, R.; Creaven, B. S.; Walsh, M.; McCann, M.; Egan, D.; Kavanagh, K. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 801–808.
- (13) Manevich, Y.; Held, K. D.; Biaglow, J. E. *Radiat. Res.* **1997**, *148*, 580–591.
- (14) Bencini, A.; Lippolis, V. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2096–2180.
- (15) Li, M.; Ding, W.; Baruah, B.; Crans, D. C.; Wang, R. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1846–1853.
- (16) Zalatan, J. G.; Fenn, T. D.; Herschlag, D. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1174–1189.
- (17) Plocke, D. J.; Vallee, B. L. *Biochemistry* **1**, 1039–1043.
- (18) Bortolato, M.; Besson, F.; Roux, B. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1999**, *37*, 310–318.
- (19) Muginova, S. V.; Zhavoronkova, A. M.; Shekhovtsova, T. N. *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 218–233.
- (20) Dean, R. L. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2002**, *30*, 401–407.
- (21) Chan, K. C.; Ho, S.; Law, J.; Yuen, V. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* **2002**, *2*, 13–21.
- (22) Yamaguchi, M.; Yamaguchi, R. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 773–777.
- (23) Georgieva, I.; Trendafilova, N.; Kiefer, W.; Rastogi, V. K.; Kostova, I. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *44*, 78–88.
- (24) Mihaylov, T.; Trendafilova, N.; Kostova, I.; Georgieva, I.; Bauer, G. *Chem. Phys.* **2006**, *327*, 209–219.
- (25) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B*, 5th ed., 1997.
- (26) Georgieva, I.; Mihaylov, T.; Bauer, G.; Trendafilova, N. *Chem. Phys.* **2004**, *300*, 119–131.
- (27) Georgieva, I.; Trendafilova, N.; Creaven, B. S.; Walsh, M.; Noble, A.; McCann, M. *Chem. Phys.* **2009**, *365*, 69–79.
- (28) Urquiza, N. M.; Islas, M. S.; Dittler, M. L.; Moyano, M. A.; Manca, S. G.; Lezama, L.; B, T. R.; Medina, J. J. M.; Diez, M.; Tévez, L. L.; Williams, P. A. M.; Ferrer, E. G. *Inorganica Chim. Acta* **2013**, *405*, 243–251.
- (29) Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887–916.
- (30) Tanaka, J. C. A.; Silva, C. C. da; Oliveira, A. J. B. de; Nakamura, C. V.; Filho, B. P. D. *Braz J Med Biol Res* **2006**, *39*, 387–391.
- (31) Aliero, A. A.; Ibrahim, A. D. In *Salmonella: A Diversified Superbug*; Kumar, Y., Ed.; In Tech: Croatia, 2012; pp. 1–26.
- (32) Creaven, B. S.; Egan, D. a.; Kavanagh, K.; McCann, M.; Noble, A.; Thati, B.; Walsh, M. *Inorganica Chim. Acta* **2006**, *359*, 3976–3984.
- (33) Sugarman, B. *Rev Infect Dis.* **1983**, *5*, 137–47.
- (34) Tévez, L. L. L.; Islas, M. S.; Medina, J. J. M.; Diez, M.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 2304–2318.
- (35) Kalia, S. B.; Kaushal, G.; Kumar, M.; Cameotra, S. S.; Sharma, A.; Verma, M. L.; Kanwar, S. S. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40*, 916–922.
- (36) Butler, H. M.; Hurse, A.; Thursky, E.; Shulman, A. *Aust J Exp Biol Med* **1969**, *47*, 541–552.
- (37) McCann, M.; Kellett, A.; Kavanagh, K.; Devereux, M.; Santos, A. *Curr Med Chem.* **2012**, *19*, 2703–2714.
- (38) Wu, X.-Z.; Chen, D.; Zhao, L.-S.; Yu, X.-H.; Wei, M.; Zhao, Y.; Fang, Q.; Xu, Q. *World J Gastroenterol* **2004**, *10*, 2228–2231.

# **CAPÍTULO IV**

---

## **Materiales y métodos**

---

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

---

#### **4.1.1. Análisis elemental**

Para el análisis elemental de C, H y N se usó un analizador Carlo Erba EA 1108 en el que se produce la combustión de la muestra en un tubo reactor donde es transformada a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>. La separación de los gases se realiza por cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable y para la detección se utiliza un detector de conductividad térmica. El método requiere una calibración previa con una sustancia de composición conocida. En este caso se usaron dos patrones, uno de BBOT (2,5-bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno) y el otro de ácido sulfanílico.

La determinación de vanadio se realizó utilizando una técnica espectrofotométrica UV-vis puesta a punto en nuestro laboratorio. La misma está basada en la formación del ácido tungtoso vanádico (400 nm), por el agregado de ácido fosfórico y tungstato de sodio a una solución ácida conteniendo vanadio(V)<sup>1</sup>.

Para determinar la concentración de Na se trató el complejo disuelto HCl, para obtener el sodio libre en solución. Se utilizó un fotómetro de llama (J.R. Technology) que previamente se calibró con un patrón de NaCl.

#### **4.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)**

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizó mediante el empleo de un sistema termoanalítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50. Se trabajó en atmósfera de O<sub>2</sub> con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El rango de muestra utilizado fue entre 5 y 10 mg. Se empleó Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como estándar para el DTA. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa TASYs.

#### **4.1.3. Espectros electrónicos (UV-vis)**

Las medidas espectrales se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis de simple haz Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos) 8453 con arreglo de diodos, para adquirir los espectros se utilizó un software desarrollado por la Universidad de Cornell.

También se utilizó, principalmente para medidas a longitud de onda fija, el espectrofotómetro UV-vis de doble haz Shimadzu UV-300, con monocromador. Para ambos equipos se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico

## 4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

### **4.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR)**

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  bajo la forma de pastillas de KBr y en otros casos se usó la técnica de la suspensión en nujol la cual se coloca entre dos ventanas de NaCl para su determinación. Con un total de 60 scans acumulados y una resolución espectral de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos fueron analizados con el programa OPUS 4.2.

### **4.1.5. Espectros Raman**

Los espectros Raman para los complejos con sartanes fueron medidos en un espectrofotómetro Bruker IFS 113 FTIR con un accesorio Raman NIR. Para la excitación se utilizó la radiación de un láser de estado sólido Nd:YAG (1064 nm), en el rango entre 3600 y 100  $\text{cm}^{-1}$ . La resolución espectral fue de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ .

### **4.1.6. Espectros de reflectancia difusa**

Los espectros de reflectancia difusa UV-vis fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-300 utilizando el accesorio correspondiente y MgO como estándar.

### **4.1.7. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)**

Con el objetivo de registrar los espectros a distintas temperaturas, se utilizó un espectrofotómetro Bruker ESP300 que opera en banda X (frecuencia=9,5GHz, 3400 Gauss) y banda Q (frecuencia=35GHz, 12500 Gauss) y que está equipado con un estándar de dispositivos de baja temperatura de Oxford (ESR900/ITC4). La ventaja del uso de la banda Q es la mejor resolución de sistemas con valores de tensores g similares, la reducción de los efectos de segundo orden en las interacciones hiperfinas, y la observación de transiciones prohibidas, entre otras. Se obtuvo la simulación computarizada de los espectros EPR mediante el programa Simfonia (WINEPR Simfonia v1.25, Bruker Analytische Messtechnik GmbH, 1996).

### **4.1.8. Determinación de estructuras cristalinas**

Las medidas fueron realizadas en un difractómetro automático de 4 círculos Enraf-Nonius CAD-4 equipado con un generador de ánodo giratorio usando un monocromador de grafito con radiación Cu-K $\alpha$ . Cada estructura fue resuelta por método directo con SHELXS-97<sup>2</sup> y cada modelo molecular fue refinado por el procedimiento en matriz completa por el método de cuadrados mínimos con respecto a  $F^2$  con SHELXS-97.

### 4.2. ESTUDIOS EN SOLUCIÓN

---

#### **4.2.1. Estudios de estabilidad en solución**

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos en solución, es decir, para asegurar que los mismos fueran agregados a las células (en los diversos ensayos biológicos) sin descomposición, se disolvieron los compuestos en el solvente adecuado y se mantuvieron a 25 °C. Adicionalmente, se estudió la estabilidad simulando condiciones biológicas, es decir, utilizando PBS como solvente mayoritario con hasta un 5% de solventes no acuosos. El estudio se llevó a cabo registrando la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo durante 2 horas.

#### **4.2.2. Titulaciones espectrofotométricas y variación del espectro electrónico con el pH**

La estequiometría de los sistemas estudiados en solución fue establecida por titulación espectrofotométrica mediante el método de la razón molar por el cual se registran los cambios de absorbancia en función de la relación metal:ligando a un valor constante de longitud de onda que coincide con el máximo espectral. En general, para determinar los espectros se usó la solución del ligando en estudio (en el solvente adecuado y al pH de síntesis) con el agregado de una solución del metal en cuestión, ya sea  $\text{VOCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , cubriendo un rango de concentraciones metal-ligando desde 10:1 hasta 0,5:1.

La variación del espectro electrónico con el pH para los complejos se realizó a partir de una mezcla estequiométrica de ligando y metal, determinada a partir de la titulación espectrofotométrica. Se varió el pH de la solución resultante utilizando ácidos o bases y se registró su espectro. Para observar y definir las bandas en la región del UV se utilizaron soluciones aprox. 1000 veces más diluidas que las empleadas para observar las bandas en la región del visible, de acuerdo con las intensidades de las transiciones. Para el caso del complejo  $\text{VONar}$ , tanto la titulación, como la variación con el pH se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la posible oxidación del ligando y del oxidovanadio(IV).

### 4.3. MEDIDAS DE LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES

---

#### **4.3.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil**

Este método consiste en generar el radical superóxido a través del sistema fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Los radicales generados son capaces de reducir el nitroazul de tetrazolio (NBT) a azul de formazán. Por lo tanto se determina la habilidad que tienen los complejos, sus ligandos libres o los cationes Cu(II) y V(IV)O<sup>2+</sup> y la enzima de inhibir dicha reducción (**Sección 1.3.4**).

La mezcla de reacción contiene 0,5 ml de muestra (en distintas concentraciones), 0,5 ml de NADH (1,4 mM) y 0,5 ml de NBT (300 µM) en buffer fosfato 0,1M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,4). Se incuban los tubos a 25 °C por 15 min y se inicia la reacción agregando 0,5 ml de PMS (120 µM), luego de 5 min se lee la absorbancia a 560 nm y se compara con el blanco<sup>3</sup>. La concentración de complejo que produce un 50 % de inhibición (IC<sub>50</sub>) fue obtenida a partir de la construcción del gráfico de porcentaje de inhibición de la reducción de NBT versus -log de la concentración de los compuestos testeados<sup>4</sup> utilizando un asistente de regresión sigmoideo provisto por el programa Origin 8.

#### **4.3.2. Ensayo de la actividad anti radical DPPH<sup>•</sup>**

A una solución metanólica de DPPH (4 ml, 40 ppm) se le agrega 1 ml de las soluciones de ligandos, complejos, o metales (Cu(II) o V(IV)O<sup>2+</sup>) diluidos en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 7,1). Luego de incubar 1 hora en oscuridad se mide la absorbancia de las distintas muestras a 517 nm y se las compara con un control al que se le asigna un valor arbitrario de 100%, que fue preparado con el radical y el buffer<sup>5</sup>.

Con fines comparativos, se utilizó ácido ascórbico como antioxidante de referencia, el cual provoca una decoloración inmediata del color violeta inicial, lo que indica su fuerte actividad anti radical DPPH<sup>•</sup>.

#### **4.3.3. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS<sup>•+</sup>**

Para realizar esta técnica se incubó por 16 hs una solución acuosa de ABTS (250 µM) y K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (40 µM) en buffer 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH (pH 7,4). Posteriormente, se le agregan a 990 µl de la mezcla, 10 µl de complejo, ligando, metal o trolox en buffer fosfato en concentraciones que van desde 0 a 100 µM. Luego de incubar la mezcla de reacción durante 6 min y a 25 °C<sup>6</sup>, se registra la reducción del catión radical ABTS<sup>•+</sup>. Se asigna un valor de 100 % a la condición basal, donde no se agregó antioxidante y se registra, luego, la

### 4.3. MEDIDAS DE LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES

disminución porcentual de la absorbancia a 734 nm como función de las distintas concentraciones de muestras utilizadas, obteniendo de este modo, la actividad total antioxidante. Los resultados también se expresan como la concentración  $\mu\text{M}$  de Trolox (TEAC) equivalente a la actividad de una solución 1  $\mu\text{M}$  del compuesto testeado. Dicho valor se calcula con la pendiente del gráfico del porcentaje de inhibición de la absorbancia en función de las concentraciones usadas dividido por la pendiente del gráfico del Trolox (**sección 2.3.1**).

#### **4.3.4. Actividad secuestrante del radical $\text{OH}^\bullet$**

El radical  $\text{OH}^\bullet$  fue generado por el sistema ascorbato/ $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ . La mezcla de reacción contiene 3,75 mM de 2-desoxirribosa, 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  y 100  $\mu\text{M}$  de EDTA más los compuestos de interés en buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  (20 mM, pH 7,4). La reacción comienza por el agregado de 100  $\mu\text{l}$  de ácido ascórbico (100  $\mu\text{M}$ ) a la mezcla incubando los tubos a 37°C durante 30 min. Finalmente la degradación de la desoxirribosa por los radicales  $\text{OH}^\bullet$  se mide por el método del ácido tiobarbitúrico (ATB): la reacción del producto formado con el ATB en caliente y bajo condiciones ácidas (en presencia de ácido tricloroacético (TCA)) da como resultado la formación de un cromógeno color rosa (532 nm)<sup>7,8</sup>.

#### **4.3.5. Inhibición del radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )-**

El radical peroxilo fue generado por descomposición térmica del (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) (AAPH)<sup>9</sup>. La mezcla de reacción contiene AAPH (50 mM), piranina (50  $\mu\text{M}$ ) y distintas concentraciones de los compuestos testeados o buffer (para el caso de la condición basal). El consumo de piranina fue seguido espectrofotométricamente por la disminución en su absorbancia a 454 nm en una celda termostatizada a 37°C.

Experimentalmente se mide la fase *lag* que corresponde al tiempo (en minutos) que transcurre antes de que exista una notable reducción en la absorbancia por consumo de la piranina, por interferencia del complejo, debida a su interacción previa con el radical<sup>10</sup>.

## 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

---

### 4.4.1. Cultivo de líneas celulares

#### 4.4.1.1. Líneas celulares derivadas de cáncer de próstata

- **LNCaP:** Es una línea celular clonada de células que hicieron metástasis en un nódulo linfático subclavicular. Son andrógeno dependientes, adherentes y crecen en clusters, no producen monocapa uniforme.
- **PC3:** Esta línea celular proviene de cáncer de próstata con metástasis en hueso. Son células andrógeno independientes, adherentes y crecen en monocapa uniforme.
- **DU145:** Es una línea celular de cáncer de próstata en un estadio muy avanzado. Son clones de células que hicieron metástasis en cerebro. Son andrógeno independientes, adherentes y crecen en monocapa uniforme.

Las 3 líneas celulares se cultivaron en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>. Para las LNCaP y las PC3, se utilizó medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), mientras que para las DU145 se utilizó medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). En ambos casos, el medio fue suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10 % de suero fetal bovino (SFB).

El medio de cultivo se cambió cada 2 o 3 días. Luego, cuando las células en cultivo llegaron a 70-80 % de confluencia fueron cosechadas utilizando 0,1% de tripsina en PBS-EDTA (11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl, pH:7,4) para resuspenderlas. Una fracción de esas células fue diluida 1:6 en RPMI 1640 o DMEM con 10 % de SFB para continuar el cultivo y con la otra fracción se realizaron los experimentos.

#### 4.4.1.2. Líneas celulares derivadas de cáncer de mama

- **MDAMB231 y SKBR3:** Son líneas celulares derivadas de cáncer de mama humano, obtenidas de la colección de cultivos HPA (Salisbury, Reino Unido). MDAMB231 se cultivó en medio RPMI libre de endotoxinas, suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin). Las células SKBR3 se cultivaron en medio Mc Coy libre de endotoxinas suplementado con 10% de SFB y antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin). Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub>.

## 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### **4.4.1.3. Otras líneas celulares**

- **A549:** Es una línea celular proveniente de cáncer de pulmón. Son células epiteliales, adherentes que crecen en monocapa uniforme. Se obtuvieron del ABAC (Asociación Banco Argentino de Células, INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina). Se cultivaron en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % CO<sub>2</sub>, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 10 % de suero fetal bovino (SFB). Luego, cuando las células en cultivo llegaron a 70-80 % de confluencia fueron cosechadas utilizando TrypLE™ de Gibco (Gaithersburg, MD, USA). Una fracción de esas células fue diluida 1:10 en DMEM con 10 % de SFB para continuar el cultivo y con la otra fracción se siguieron los experimentos.

- **CMH:** Las células mesangiales humanas se cultivaron según lo descrito previamente<sup>11</sup>. Las porciones de tejido cortical macroscópicamente normal se extrajeron de riñones humanos inmediatamente después de una nefrectomía realizada a causa de un carcinoma renal. Los glomérulos aislados se trataron con colagenasa (Sigma) y se sembraron en platos de cultivo plásticos (Nunc Kamstrup, Dinamarca). La identidad de las células se confirmó empleando el criterio morfológico y funcional descrito previamente<sup>11</sup>. Cuando las células llegaron a confluencia, se subcultivaron en una relación 1:4 en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (BioWittaker, Walkersville, MD).

### **4.4.2. Ciclo celular mediante citometría de flujo**

El análisis de ciclo celular se realizó sobre los complejos de cobre con sartanes utilizando la citometría de flujo, realizando la tinción de las células con yoduro de propidio (IP). Luego de 24hs de tratamiento de las distintas líneas celulares con complejos, ligandos o Cu(II) se recogieron las células tanto adheridas como las que se encontraban flotando. Se les agregó el detergente NP40 10% y luego RNasa (1mg/ml, 30 min, en hielo). Posteriormente el DNA celular se tiñó con 5 ng/ml de IP en buffer fosfato y las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan de BD Biosciences. Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular se calcularon a partir de histogramas de ADN. Las células con contenido de ADN en etapa sub-G1 se consideraron apoptóticas<sup>12</sup>.

### **4.4.3. Ensayos de viabilidad celular**

#### **4.4.3.1. Cristal violeta**

Para determinar la proliferación celular se utilizó el ensayo de cristal violeta descrito por Okajima y colaboradores<sup>13</sup> con algunas modificaciones. Se sembraron las células en microplacas de 48 pocillos con una concentración de  $1 \times 10^4$  células por pocillo. A las 24 hs se removió el medio, eliminando las células flotantes. Las células adheridas se lavaron con PBS y se les agregó DMEM y en cada pocillo se le agregó el tratamiento correspondiente, ya sea complejo, ligando o metal, en concentraciones variables disueltos en etanol. Cada concentración fue ensayada por triplicado, el porcentaje de etanol

#### 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

(como máximo se usó un 0,5 % de etanol y el resto, medio de cultivo), incubándose durante 24 h. Cada concentración fue ensayada por triplicado. Luego, se lavan las células con PBS, se fijan con glutaraldehído 5 % y se tiñen con cristal violeta por 10 min. Finalmente, se lavan varias veces con agua para eliminar el exceso de colorante, se extrae el mismo de las células con un buffer de glicina pH 3 y se lee la absorbancia a 540 nm. Previamente se realizó una correlación lineal para determinar el número de células en función de la absorbancia medida<sup>14</sup>.

##### **4.4.3.2. MTT**

Para la determinación de la actividad metabólica en las líneas celulares de cáncer de próstata y de mama se sembraron las células en microplacas de 24 pocillos con una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo. A las 24 hs se removió el medio, eliminando las células flotantes. Las células adheridas se lavaron con PBS y se les agregó medio nuevo con 10% de SFB y en cada pocillo se le agregó el tratamiento correspondiente, ya sea complejo, ligando o metal, en concentraciones variables disueltos en DMSO. Cada concentración fue ensayada por triplicado, el porcentaje de DMSO fue igual a 0,5% constante en todos los pocillos, incluso en el control. Luego de 24 hs de tratamiento se removió el medio y se le agregó una solución stock de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) en PBS, concentración final 0,5 mg/ml. Las células se incubaron durante 2,5 hs a 37°C. Los cristales de azul de formazán se disolvieron en DMSO y la absorbancia se midió con un lector de microplacas a 570nm<sup>15</sup>.

##### **4.4.4. Determinación de los cambios en el área superficial planar celular (PCSA)**

Se sembraron células mesangiales humanas (CMH) en placas de 20mm. Los estudios se llevaron a cabo antes que se llegara a confluencia. Las células se dejaron a temperatura ambiente 30 min antes de comenzar con el ensayo, para evitar el error en la medida de contracción originado por el cambio en la temperatura. Las células fueron pretratadas con diferentes compuestos en concentraciones  $10^{-8}$ M y luego con angiotensina II en concentración igual a  $10^{-6}$ M. Posteriormente, las células se observaron con un microscopio de contraste de fase invertido PFX modelo TMS-F, con una lente de aumento de 100X. Se tomaron fotografías de las células a 0 min y luego de 30 min del tratamiento con angiotensina II<sup>16</sup>. También se realizó un control con los compuestos, sin la angiotensina II, para poder observar si el compuesto por si mismo tiene efectos contráctiles. Para realizar las mediciones se consideraron las células que tuvieran una forma apropiada para el análisis planimétrico. Se analizaron entre 6 y 12 células por fotografía. La PCSA se determinó utilizando el software Axiovision 4.8.2.0. Las mediciones se realizaron sobre tres experimentos distintos, y posterior análisis estadístico

##### **4.4.5. Ensayos antimicrobianos**

La actividad antibacterial se evaluó mediante la mínima concentración inhibitoria (MIC) en cinco cepas de bacterias obtenidas de la Colección

#### 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La MIC se define como la menor dilución del complejo que inhibe el crecimiento visible del organismo testeado. Se utilizó *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Estafilococo aureus* (ATCC 25923), *Estafilococo epidermidis* (ATCC 1263) y *Enterococo faecalis* (ATCC 29212). La actividad antifúngica se evaluó mediante la MIC en tres cepas de hongos: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* y *Candida albicans* obtenidas de islotes clínicos. Las MICs se determinaron usando el método de dilución con agar. Para todas las cepas el medio de ensayo/cultivo que se utilizó fue el caldo Mueller Hinton o agar<sup>17,18</sup>. El inóculo de cepas bacterianas se preparó a partir de cultivos en caldo durante 18 hs. Se preparó una suspensión 0,5 de Mc Farland para cada microorganismo, luego se realizó una dilución 1:10 para cada microorganismo previo a la inoculación ( $\sim 10^7$  unidades formadoras de colonias (CFU) por mililitro)<sup>19,20</sup>. El inóculo de las cepas fúngicas se ajustó a 0,5 de Mc Farland, esta suspensión ( $\sim 10^8$  CFU por mililitro) se inoculó directamente sin dilución.

Para el método de dilución de agar se prepararon las soluciones stock del metal en solución acuosa y de los ligandos y complejos en DMSO. A partir de las soluciones stock, esterilizadas previamente por filtración, se realizaron diluciones sucesivas en agar fundido de Mueller Hinton para llegar a las concentraciones finales deseadas.

Las dosis suministradas de cada compuesto estuvieron en el rango comprendido entre  $2,93 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $1500 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Posteriormente, se realizó un estriado en placa de  $2\mu\text{L}$  del inóculo de suspensiones microbianas y se incubó aeróbicamente a  $37^\circ\text{C}$  durante 24hs y 48hs para bacterias y hongos, respectivamente.

La inhibición del crecimiento microbiano se determinó comparando las placas que contenían los compuestos con las placas control.

##### 4.4.6. Ensayo de análisis de imágenes de alto contenido

Para el ensayo en las líneas celulares MDAMB231 y SLBR3, se sembraron las células con una densidad de 5000/ pocillo en placas de 96 pocillos recubiertos de colágeno y se tiñeron con sondas fluorescentes (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, España) durante 30 min. Para las medidas de la despolarización se le agregaron  $50 \mu\text{M}$  de TMRM (tetrametil rodamina metil éster) y para las medidas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se le agregó  $1\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>DFF-DA (2,7, diclorodihidrofluoriceína acetato diacetil éster). Luego de 30 min, las células se lavaron tres veces y se trataron con  $25 \mu\text{M}$  de naringenina, VONar y oxidovanadio(IV) durante 24 hs. Las dos sondas se midieron a las 24hs. La localización de ROS se identificó con un máximo de absorción/emisión de 488nm/530nm (Ex/Em) mientras que la TMRM se midió a 549nm/600nm (Ex/Em) usando el objetivo BD Pathway<sup>TM</sup> 20x. La información se analizó eligiendo una región de interés (célula entera, mitocondrias o núcleo) y midiendo la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, tanto para ROS, como para TMRM. Luego se calculó el promedio de intensidades de fluorescencia de las distintas regiones de interés, restando la fluorescencia de fondo (de las regiones cercanas a las células). A

#### 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

continuación de las medidas con las sondas, se recolectó el medio de cada pocillo para el ensayo de LDH. Las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 15 min. Luego del paso de fijación, se lavaron tres veces las muestras con PBS y se permeabilizaron con 0,1% tritón en PBS durante 15 min. Luego, se bloqueó con PBS y 0,3% de seroalbúmina bovina (ABS) durante 15 min y finalmente, se le agregó el anticuerpo monoclonal anti-H2AX (Abcam Cambridge, Reino Unido) en una relación 1/500 en PBS con 0,3% BSA durante 60 min a temperatura ambiente. Luego de tres pasos de lavado, se le agregó DAPI y el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa 633 (Invitrogen) en relación 1/500 durante 60 min para que reaccionara con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron tres veces y se midieron en un microscopio de fluorescencia Pathway 855. La intensidad de fluorescencia se detectó en el núcleo.

##### **4.4.7. Ensayo de LDH**

El ensayo de LDH se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizó el “kit de detección de citotoxicidad (LDH)” (Roche, Mannheim, FR, Alemania) para medir la liberación de LDH en miniunidades por litro (mU/L) en medio de cultivo obtenido de las líneas celulares de cáncer de mama que fueron sometidas a tratamientos con antioxidantes durante 24 hs como los que se describen más abajo. Se analizó el LDH liberado en el medio de cultivo por las células con daño en la membrana plasmática mediante incubación del medio de cultivo clarificado con piruvato de sodio en presencia de NADH. El ácido pirúvico se convierte en ácido láctico en presencia de LDH libre, con la consecuente oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. La velocidad de oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup> se midió a 340 nm usando un lector de microplacas multimodo Synergy 2 de Biotex (Winooski, USA).

##### **4.4.8. Medidas de actividad de fosfatasa alcalina (FAL)**

Las medidas de la actividad del Zn(II) y de los complejos metálicos con CCA y fen, se determinaron mediante espectroscopía UV-vis. La reacción comenzó con el agregado del sustrato para-nitrofenol fosfato (PNPP) y se monitoreó la aparición del producto de descomposición por acción de la FAL, el para-nitro fenol, mediante los cambios en la absorbancia, medida a 405 nm. Se utilizó una concentración de la enzima FAL intestinal bovina de 1 µg/ml, y 5 mM del sustrato (PNPP). Ambos se disolvieron en el buffer de incubación (55 mM de glicina + 0,55 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10,4) y se los dejó reaccionar por 10 min (control positivo). Los efectos de los compuestos se determinaron mediante la adición a la mezcla de FAL y PNPP de diferentes concentraciones (10-100 µM) de cada uno de los compuestos a testear. Los complejos se disolvieron en DMSO antes de agregarle buffer para obtener las concentraciones finales deseadas (% DMSO en la mezcla de reacción < 0,5 %). El efecto de cada concentración se testeó por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

##### **4.4.9. Medidas de afinidad a la seroalbúmina bovina (ABS)**

La seroalbúmina bovina (ABS) se disolvió en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) a una concentración final de 6 µM. La naringenina, el VONar y el catión

#### 4.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

V(IV)O<sup>2+</sup> se añadieron lentamente y gota a gota sobre la solución de ABS para asegurar la formación de una solución homogénea con concentraciones en el rango de 2 a 100  $\mu$ M. La intensidad de fluorescencia se midió a 298 K (excitación a 280 nm y emisión a 248 nm). Se realizaron triplicados independientes para cada muestra y concentración. Las medidas se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Perkin.Elmer LS-50B (Beaconsfield, England) equipado con una lámpara pulsada de xenon (ancho medio de pico < 10 fs, 60 Hz) un tubo fotomultiplicador R928 y un software FLWinlab. Las rendijas de excitación y de emisión se fijaron en 10 nm a lo largo de todo este estudio.

##### **4.4.10. Análisis estadístico**

Para todos los ensayos biológicos se realizaron al menos 3 experimentos independientes, por triplicado, por cada condición. 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 utilizó el programa Origin 8.

- 
- (1) Onishi, M. *Photometric Determination of Traces of Metals (Part II)*; 4th ed.; J.Wiley: New York, 1989.
- (2) Sheldrick, G. SHELXS-97. Program for crystal structure resolution, 1997.
- (3) Kuo, C.-C.; Shih, M.-C.; Kuo, Y.-H.; Chiang, W. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1564–1570.
- (4) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 128–132.
- (5) Yu, J.; Wang, L.; Walzem, R. L.; Miller, E. G.; Pike, L. M.; Patil, B. S. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2009–2014.
- (6) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- (7) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *FEBS Lett.* **1981**, *128*, 347–352.
- (8) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 215–219.
- (9) Huang, W.-Y.; Majumder, K.; Wu, J. *Food Chem.* **2010**, *123*, 635–641.
- (10) Hapner, C. D.; Deuster, P.; Chen, Y. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186*, 275–279.
- (11) Díez-Marqués, M. L.; García-Escribano, C.; Medina, J.; Boyano-Adanez, M. C.; Arilla, E.; Torrecilla, G.; Rodríguez-Puyol, D.; Rodríguez-Puyol, M. *Endocrinology* **1995**, *136*, 3444–3451.
- (12) Del Nogal, M.; Luengo, A.; Olmos, G.; Lasa, M.; Rodríguez-Puyol, D.; Rodríguez-Puyol, M.; Calleros, L. *Apoptosis* **2012**, *17*, 1261–1274.
- (13) Okajima, T.; Nakamura, K.; Zhang, H.; Ling, N.; Tanabe, T.; Yasuda, T.; Rosenfeld, R. G. *Endocrinology* **1992**, *130*, 2201–2212.
- (14) Cortizo, A.; Etcheverry, S. *Mol. Cell. Biochem.* **1995**, *145*, 97–102.
- (15) Calleros, L.; Lasa, M.; Rodríguez-Álvarez, F.; Toro, M.; Chiloeches, A. *Apoptosis* **2006**, *11*, 1161–1173.
- (16) García, G.; Serrano, I.; Sánchez-Alonso, P.; Rodríguez-Puyol, M.; Alajarín, R.; Griera, M.; Vaquero, J. J.; Rodríguez-Puyol, D.; Álvarez-Builla, J.; Díez-Marqués, M. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 90–101.
- (17) Klančnik, A.; Piskernik, S.; Jeršek, B.; Mozina, S. S. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *81*, 121–126.
- (18) Suksrichavalit, T.; Prachayasittikul, S.; Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3259–3265.
- (19) Berahou, A.; Auhmani, A.; Fdil, N.; Benharref, A.; Jana, M.; Gadh, C. A. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 426–429.
- (20) Rowe, F.; Vargas Superti, S.; Machado Scheibe, R.; Dias, C. G. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *43*, 45–48.

## PUBLICACIONES

---

A partir de este trabajo de Tesis Doctoral se desprenden tres publicaciones en revistas científicas:

- María S. Islas, Carlos A. Franca, Susana B. Etcheverry, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams. "Computational study and spectroscopic investigations of antihypertensive drugs". *J. Vib. Spec.*, 62, 2012, 143-151. ISSN 0924-2031.
- María S. Islas, Teófilo Rojo, Luis Lezama, María A. Cortes, Manuel Rodríguez Puyol, Evelina G. Ferrer, Patricia A. M. Williams. "Improvement of the antihypertensive capacity of Candesartan and Trityl candesartan by their SOD mimetic copper(II) complexes". *J. Inorg. Biochem.*, 123, 2013, 23-33. ISSN 0162-0134.
- María S. Islas, Juan J. Martínez Medina, Libertad L. López Tévez, Teófilo Rojo, Luis Lezama, Mercedes Griera Merino, Laura Calleros, María A. Cortes, Manuel Rodríguez Puyol, Gustavo A. Echeverría, Oscar E. Piro, Evelina G. Ferrer, Patricia A. M. Williams. "Antitumoral, Antihypertensive, Antimicrobial, and Antioxidant Effects of an Octanuclear Copper(II)-Telmisartan Complex with an Hydrophobic Nanometer Hole". *Inorg. Chem.*, 53, 2014, 5724-5737. ISSN 0020-1669.

Además de 4 comunicaciones en congresos nacionales y 4 en congresos internacionales:

- XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Córdoba- 3-6 de mayo 2011. "Obtención, caracterización y actividad antioxidante de un complejo de Cu(II) con tritil candesartán (Tcand)" María Soledad Islas, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.
- EUROBIC11. Granada- España. 12 al 16 de septiembre 2012. "Improvement of the antihypertensive capacity of candesartan and trityl candesartan by their SOD mimetic copper(II) complexes". María S. Islas, Teófilo Rojo, Luis Lezama, María A. Cortes, Manuel Rodríguez Puyol, Evelina G. Ferrer, Patricia A. M. Williams.
- XXIX Congreso Argentino de Química. Mar del Plata. 3-5 octubre 2012. "Obtención, caracterización y actividad antioxidante de un complejo de Cu(II) con telmisartan (TIm)". María S. Islas, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.

- XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario - 9-12 de abril 2013. “Estudio de la interacción de Zn con ácido cumarín carboxílico y 4-aminopiridina en fase sólida y en solución acuosa.” María S. Islas, María B. Colombo Migliorero, Ana C. González Baró, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.
- XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario - 9-12 de abril 2013. “Nuevo complejo de oxovanadio(IV) con naringenina: síntesis, caracterización y determinación de sus propiedades antioxidantes.” María S. Islas, Evelina G. Ferrer, Patricia A.M. Williams.
- EUROBIC12. Zurich- Suiza- 24 al 28 de Agosto, 2014. “Evaluation of the antioxidant, antihypertensive and antitumor activity of a Cu(II) and Irbesartan (Irb) complex  $[Cu(Irb)_2(H_2O)]$  (CuIrb): synthesis, characterization and DFT study”. María S. Islas, Carlos A. Franca, Luis Lezama, Teófilo Rojo, Mercedes Griera Merino, María A. Cortes, Laura Calleros, Manuel Rodríguez Puyol, Evelina G. Ferrer, Patricia A. M. Williams.
- IV Latin American Meeting on Biologal Inorganic Chemistry (LABIC)- V WOQUIBIO (Workshop de Química Bioinorgánica). 5-8 de agosto, 2014, Chascomús, Argentina. “Antitumoral, Antihypertensive, Antimicrobial, and Antioxidant Effects of an Octanuclear Copper(II)-Telmisartan Complex with an Hydrophobic Nanometer Hole”. María S. Islas, Juan J. Martínez Medina, Libertad L. López Tévez, Teófilo Rojo, Luis Lezama, Mercedes Griera Merino, Laura Calleros, María A. Cortes, Manuel Rodríguez Puyol, Gustavo A. Echeverría, Oscar E. Piro, Evelina G. Ferrer, and Patricia A. M. Williams.
- IV Latin American Meeting on Biologal Inorganic Chemistry (LABIC)- V WOQUIBIO (Workshop de Química Bioinorgánica). 5-8 de agosto, 2014, Chascomús-Argentina . “Antitumoral effects of naringenin and its complex with oxidovanadium(IV) on breast cancer cell in culture. Albumin binding studies by Fluorescence Spectroscopy” Luciana G. Naso, María S. Islas, María Valcarcel, Clarisa Salado, Meritxell Roura-Ferrer, Evelina G. Ferrer, Patricia A. M Williams.