



Departamento Estrella Campos

Cátedra de Química Inorgánica

Facultad de Química –Universidad de la República (UdelaR)

Montevideo, República Oriental del Uruguay

Tesis de Maestría en Química

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Gabriel Arrambide Brianthe

Químico Farmacéutico

Profesores orientadores

Dra. Dinorah Gambino (DEC, Facultad de Química, Uruguay)

Dr. Enrique Baran (CEQUINOR, Universidad Nacional de la Plata, Argentina)

-Tesis aprobada el 13 de Noviembre de 2014-

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*



A mi familia, y muy especialmente, a mis abuelos

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Agradecimientos

Muchas personas han influido sobre mí en la culminación de este trabajo, aprecio muchísimo que me dieron apoyo constante, y quiero destacar su voluntad de ayudarme incondicionalmente en lo que pudieran hacer.

Por esto es que merecidamente debieran ser mencionadas en esta sección.

No obstante, temo olvidarme momentáneamente de algunos(as) y así pecar de desagradecido ante ellos(as), por lo que a continuación, mencionaré solamente a aquellas personas que fueron las que estuvieron más directamente vinculadas a mi Trabajo de Tesis en forma continua durante todo el período que llevó culminarlo.

Mis agradecimientos más especiales son para:

- Mis directores de Tesis, Dinorah y Enrique, por la paciencia infinita, sus conocimientos, y su generosidad que han mostrado en este período, compartiendo sus valiosos conocimientos, así como también darme el impulso continuo para que este Trabajo de Tesis llegara a su culminación.
- Los compañeros de la Cátedra de Inorgánica (UDELAR) por haber estado siempre dispuestos a dar un mano.
- La Dra. Susana Etcheverry (*Nené*), de la Cátedra de Bioquímica Patológica (UNLP, La Plata); por que siempre estuvo allí para ayudarme con calidez, con lo que le pidiera, o preguntara.
- La Dra. Beatriz Parajón-Costa y Dra. Ana González Baró del CEQUINOR (UNLP, La Plata) que han sido tan fantásticas conmigo cuando estuve por el CEQUINOR, en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, y que siempre estuvieron para ayudarme en todo lo que necesité de ellas aun cuando ya estaba nuevamente en Montevideo.
- El Dr. Daniel Barrio y la Dra. Josefina Rivanadeira, de la Cátedra de Bioquímica Patológica (UNLP), por el tiempo que me brindaron y la invaluable ayuda que fue para mí sus conocimientos.

Pido disculpas a aquellos(as) que no mencioné anteriormente, mi gratitud está también con ustedes.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Resumen del Trabajo de Tesis

Se sintetizó y caracterizó siete nuevos complejos de vanadio(V) junto a una serie de otros compuestos ya conocidos. Estos compuestos noveles se obtuvieron por modificación de las técnicas originales.

En general, la caracterización fisicoquímica y estructural de los compuestos se realizó mediante un conjunto de técnicas: análisis elemental, espectroscopía electrónica UV/Vis y vibracional, difracción de rayos X en polvo microcristalino y monocristal, medida de propiedades magnéticas y voltametría cíclica.

En particular, se puso a punto una técnica espectrofotométrica de dosificación de vanadio de uso general, y se realizó un estudio vibracional profundo de los compuestos mediante espectroscopía IR y Raman, lo que constituye el principal aporte de este Trabajo de Tesis a la Química Inorgánica Básica.

Además, se realizó la evaluación biológica de los compuestos sintetizados en diferentes líneas celulares y se estudió en detalle los efectos, a nivel celular, de dos compuestos seleccionados.

En este Trabajo de Tesis se trabajó con tres grupos de compuestos: derivados de vanadio(IV) y vanadio(V) de la tropolona, peroxocompuestos de vanadio(V) y compuestos heterolépticos de vanadio(V) hidroxilamido-aminoácido.

Para el caso de los derivados de la tropolona $[V^{IV}O(trop)_2]$ y $[V^VO(trop)_2Cl]$ (trop= ligando tropolonato), se desarrolló un método alternativo de síntesis del complejo $[V^VO(trop)_2Cl]$; fue analizado su comportamiento electroquímico mediante voltametría cíclica y las propiedades magnéticas del complejo $[V^{IV}O(trop)_2]$.

Además, al igual que para las otras series, se estudió en profundidad su espectro vibracional mediante espectroscopía IR y Raman. A efectos de facilitar la asignación de las bandas del espectro vibracional se sintetizaron los complejos $[M(trop)_2]$ (donde M = Co, Cu, Zn).

Para los complejos de vanadio(V) de ligando peroxo, $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ y $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$, se abordó el estudio de sus propiedades biológicas en las líneas celulares osteoblasto-símiles MC3T3-E1 (preosteoblasto normal) y UMR196 (células derivadas de osteosarcoma de rata). Se evaluó la capacidad antiproliferativa de los compuestos en ambas líneas celulares. También, se estudió la acción antiproliferativa del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ en células derivadas de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) y macrófagos de tumor murino RAW264.7.

Por ser el ligando hidroxilamido (NH_2O) isoelectrónico del peroxo, para algunos complejos de fórmula general $[VO(NH_2O)_2(aa)] \cdot nH_2O$ (donde aa representa el ligando aminoácido), ha sido interesante evaluar sus propiedades biológicas en cultivos celulares, utilizando las líneas celulares anteriormente mencionadas.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

En este sentido se ha ensayado inhibición de la fosfatasa alcalina intestinal y proliferación, alteraciones de morfología, acción citotóxica, acción genotóxica y generación de estrés oxidativo en las líneas celulares osteoblasto-símiles.

Dos de los compuestos fueron evaluados en un modelo *in vivo* de huevos de pez cebra fertilizados.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Ora et labora

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Introducción y Objetivos del Trabajo de Tesis

1. Introducción

1.1 Origen y fuentes de vanadio

El vanadio, $Z=23$, es un metal de transición del grupo 3d de la Tabla Periódica, con interesantes propiedades fisicoquímicas.

Fue descubierto por el español Andrés Manuel Del Río, profesor de Mineralogía en el Colegio de Minería de Nueva España (México), en un mineral de plomo que es actualmente conocido como *vanadinita*, $Pb_5(VO_4)_3Cl$ [1]. Inicialmente, Del Río lo llamó *pancromio* por la variedad de coloraciones que toman las soluciones de sus sales al variar el pH. Sin embargo, más tarde lo rebautizó *eritronio* por la coloración roja de las soluciones en medio ácido, pero luego interpretó, erróneamente, que se trataba de una nueva especie del cromo.

En 1830 el sueco Nils Sefström redescubrió el vanadio en minerales de hierro, y lo bautizó con su nombre actual, en homenaje a la diosa nórdica de la belleza y la fertilidad Vanadis [1,2]. Finalmente, Friedrich Wöhler (utilizando una muestra que Del Río había enviado a Europa a través de su amigo Alexander von Humboldt), demostró que el eritronio de Del Río y el vanadio de Sefström era el mismo elemento [1].

El vanadio es un elemento traza. En la corteza terrestre constituye un 0,02%, que corresponde a una concentración promedio de 150g/ton, similar a la del Zn, y es más abundante que el Cu o el Ni. En aguas marinas es el segundo metal de transición en abundancia (30nM), después del Mo (100 nM) [3].

Curiosamente, se lo encuentra en algunos organismos marinos, como diversas especies de tunicados que lo acumulan en células especializadas denominadas *vanadocitos*, [4,5], pero también en algas marinas, hongos (caso de *Amanita muscaria*, ver Fig. 1.1) [6], e inclusive en gusanos segmentados [7]. Si bien para estos organismos se lo

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

considera un metal esencial, su esencialidad en humanos aún es discutida. Sin embargo en animales superiores hay evidencias de que sería importante para el correcto funcionamiento de algunos sistemas enzimáticos y en la generación y estabilización del tejido óseo [8].

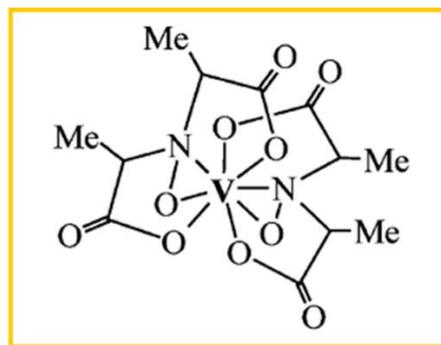


Fig. 1.1: *Amanita muscaria* (izquierda) y amavadina (derecha). La amavadina es un complejo no oxo de vanadio(IV), el vanadio se encuentra coordinado a ligandos hidroxilamido y carboxilato del ácido propiónico. (Imágenes de dominio público)

1.2 Antecedentes de farmacología de compuestos de vanadio

El uso medicinal de compuestos de vanadio comenzó hace más de un siglo, cuando se recomendaba terapéuticamente en casos de desnutrición, anemia, tuberculosis y diabetes [9]. Actualmente, el sulfato de vanadilo suele emplearse como suplemento en la generación de masa muscular [10] y el mejoramiento del rendimiento de atletas que deben elevar su masa corporal magra [11].

Resulta interesante que las propiedades farmacológicas de los compuestos del vanadio incluyen acciones insulino-miméticas [12-16] y antitumorales [17,18]. Por ejemplo, producen, entre otros, efectos sobre la contracción de los vasos sanguíneos, aumento de la afinidad de la hemoglobina y mioglobina por el oxígeno [13, 19, 20], y efectos osteogénicos [21, 22].

En la década de 1980, los compuestos de vanadio ocuparon una posición única entre los metalofármacos, tanto por sus potentes efectos farmacológicos como por su

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

compleja química de coordinación [23-25]. El vanadio fue catalogado como un metal traza con "funciones biológicas difíciles de entender" [26], con posibles funciones relacionadas a las vías metabólicas de la glucosa y de los lípidos [27].

Posteriormente al descubrimiento de las propiedades insulino-miméticas de los compuestos del vanadio, surgieron otras propiedades que posicionarían definitivamente al vanadio como uno de los metales más interesantes a ser estudiados como fuente de potenciales agentes terapéuticos. En 1984, Thompson y colaboradores publicaron el primer trabajo sobre las propiedades quimiopreventivas del vanadio *in vivo*. En ese reporte, el cáncer de mama inducido con *metil-1-nitrosurea* en ratas era prevenido alimentando a los animales con un suplemento de 25 mg/L de VOSO_4 .

La presencia de vanadio reducía tanto el número de incidencias como el promedio de tumores [28]. Desde entonces, los efectos antitumorales y quimiopreventivos del vanadio han sido ampliamente investigados tanto en modelos animales como en diferentes tipos de líneas celulares tumorales [17, 29-31].

Otro hallazgo, simultáneo al descubrimiento de Thompson *et al.*, pero esta vez en el área de la química y bioquímica, revolucionó el estudio del vanadio. En 1984, se aisló la primera *haloperoxidasa de vanadio* a partir del alga *Ascophyllum nodosum* [32]. Fue la primera vez que los químicos bioinorgánicos podían citar un ejemplo de una enzima que requería al vanadio como cofactor [32,33].

En 1986, se descubrió otra enzima dependiente de vanadio, la *vanadio-nitrogenasa*, que se encuentra presente en ciertas bacterias fijadoras de nitrógeno [34].

Actualmente los estudios estructurales con cristalografía de rayos X muestran una relación estructural y funcional entre haloperoxidasas y ciertas fosfatasas [35, 36]. Las nitrogenasas dependientes de vanadio no están todavía tan bien comprendidas como las haloperoxidasas dependientes de vanadio, pero son frecuentemente utilizadas para estudios mecanísticos [37-39] y también para estudios de modelado de sitio activo [40].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.3 Generalidades de la química del vanadio en solución acuosa

El vanadio presenta diferentes estados de oxidación (desde -1 a + 5) siendo los estados +3,+4 y +5 los más relevantes en sistemas biológicos.

En solución acuosa, el vanadato y el vanadilo (VO^{2+}) presentan diferentes reacciones de hidrólisis y condensación. Los productos obtenidos varían con el pH, la concentración de vanadio y ligandos que pueden formar complejos con diferentes geometrías de coordinación. Una característica importante de las soluciones acuosas ácidas de vanadio es que el vanadio(IV) se encuentra en forma de catión vanadilo, y el vanadio(V) como anión vanadato, excepto a pH inferior a 3 donde éste último está presente como catión VO_2^+ , denominado comúnmente como *pervanadilo*.

Además, el par $\text{H}_2\text{VO}_4^-/\text{VO}^{2+}$ posee un potencial redox en torno a +0,34 V, mientras que el par $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ es de +1,24 V y el par NADH/NAD^+ es de - 0,32 V a pH fisiológico. Esta cualidad permite que el vanadato pueda ser reducido por moléculas biológicas que proporcionen el potencial requerido, como el NADPH [41].

1.3.1 Química del V(IV) en solución

La especie mejor conocida del V(IV) en solución acuosa es el catión vanadilo (catión VO^{2+} , $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$) (Fig.1.2) [42,43]. Es estable a pH ácido y es la principal especie a pH 3. Se distingue por poseer ocho líneas en el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a temperatura ambiente. Cuando se incrementa el pH a ~ 4 , un protón empieza a perderse ($\text{p}K_a$ entre 5 a 6) y se forman especies hidrolizadas $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$ (Fig. 1.3 A y B, página 11). La Fig. 1.3 A muestra la especiación simple que existe a concentraciones nano-micromolar del V(IV) y la Fig. 1.3B la especiación simple que existe a concentraciones micro-milimolar del V(IV):

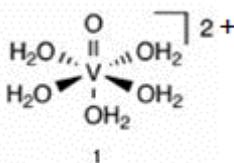


Fig. 1.2: Esquema de la especie $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ en solución acuosa.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

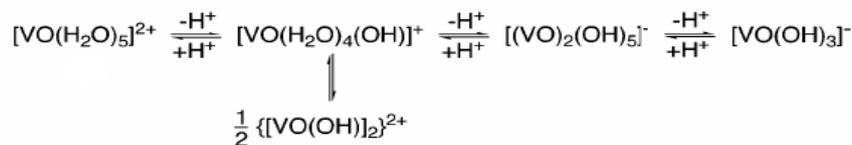


Fig. 1.3 A: Productos de hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentraciones nano y micromolar. (Tomado de Crans et al. [46]).

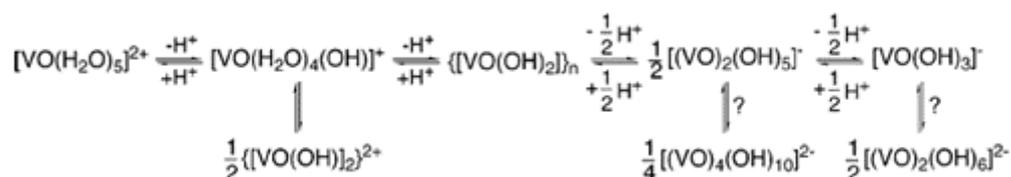


Fig. 1.3 B: Productos de hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentraciones micro-milimolar (Tomado de Crans *et al.* [46]).

A medida que el $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$ se forma, aparece un dímero silencioso al EPR. Incrementando el pH de la solución por encima de 5 hay una abrupta disminución en la intensidad de la señal en el EPR debido a la formación de hidróxido de vanadilo $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]_n\}$, insoluble. Si se continúa incrementando el pH (6-8), el $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]_n\}$ se disuelve para formar un dímero, $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ y subsecuentemente un monómero cargados negativamente, $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$. Solamente esta última especie ha sido bien caracterizada por EPR y espectroscopía UV-Vis [44] mientras que la formación de $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ fue deducida por análisis potenciométrico [45].

La fórmula $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$ implica especies tetra-coordinadas. Las características espectroscópicas de estas especies fueron investigadas utilizando UV-Vis y EPR para confirmar la geometría [44]. Los resultados no fueron consistentes para especies tetra o penta-coordinadas sino para una geometría hexa-coordinada [44]. Ni los métodos de potencimetría ni otros métodos espectroscópicos empleados hasta el momento pueden brindar información exacta del número de moléculas de agua asociadas con el ion metálico en solución. Presumiblemente, dos moléculas de aguas están asociadas con el ion $[\text{VO}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2]^-$. Tal estequiometría podría convertir este anión en el catión

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

vanadilo a través de tres pasos de protonación sin cambios en la esfera de coordinación [46].

La existencia de especies oligoméricas fue sugerida en solución básica y neutra a concentraciones micromolares, pero a pH fisiológico en un medio no complejante, no puede observarse ningún espectro de EPR [43,47]. Diversos estudios sobre la complejación de V(IV) con ligandos de bajo peso molecular presentes en sistemas biológicos como fosfato [48, 49], lactato [50], glutatión [51,52], NAD⁺, NADP⁺ [53] y azúcares [54,55] apoyaron la especiación descrita más arriba en la cual el [(VO)₂(OH)₅]⁻ es la especie predominante a pH 7-7,5 y el total de V(IV) en todas las especies estaba en el rango de 1-10 μM.

1.3.2 Química del V(V) en solución

El vanadio(V) forma el anión vanadato y sus derivados en solución acuosa. El vanadato ha sido reconocido como un análogo estructural (estructuras 2-4 en Fig. 1.4) y también electrónico del fosfato con reacciones de protonación similares [43-44,57]. Esta analogía es más evidente en la forma trianiónica tetraédrica VO₄³⁻ (estructura 2 en Fig. 1.4 vs. PO₄³⁻). La similitud en los valores de pK_a para el vanadato (3,5; 7,8 y 12,5) con los del fosfato (2,1; 7,2 y 12,7) [58] evidencia la analogía electrónica de estas dos especies. Sin embargo, existen diferencias.

A pH neutro el vanadato en concentraciones menores a 0,1 mM está presente principalmente como monoanión (H₂VO₄⁻) mientras que el fosfato se halla como dianión (HPO₄²⁻). Además, en contraste con la alta estabilidad del H₃PO₄, el H₃VO₄ rara vez ha sido documentado [59], presumiblemente reflejando su conversión a VO₂⁺. En este aspecto, la alta estabilidad del VO₂⁺ se debe al mayor número de coordinación comparado con H₃VO₄. En concentraciones mayores a 0,1 mM a pH fisiológico el H₂VO₄⁻ y HVO₄²⁻ oligomerizan a la forma dimérica, tetramérica y pentamérica (estructuras 5, 6 y 7 en Fig. 1.4, página 13) [60]. Estas especies son análogas al pirofosfato, especies oligoméricas y poliméricas del fosfato.

Sin embargo, mientras que los derivados del pirofosfato son estables y cinéticamente inertes, las especies de vanadato experimentan interconversiones en solución [46,61].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Otra diferencia muy importante es que bajo condiciones fisiológicas, el vanadato puede sufrir química redox mientras que el fosfato, no.

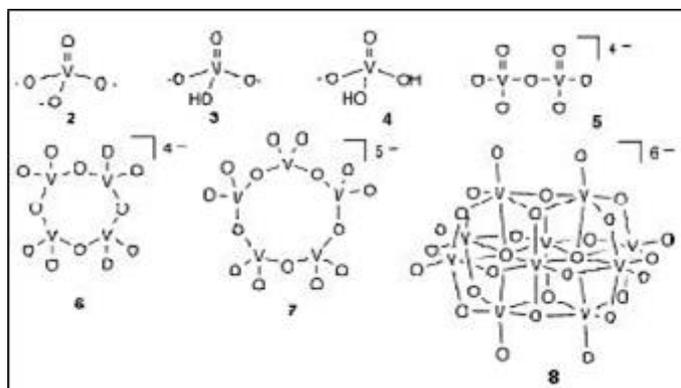


Fig. 1.4: Especies monoméricas, oligoméricas y poliméricas de V(V) en solución acuosa.

Resulta difícil conseguir información estructural de las especies oligoméricas en solución ya que los sistemas oligoméricos son preparados principalmente a partir de solventes orgánicos [62,63] y en complejos enzimáticos [64] lo cual podría no reflejar las especies formadas en solución. Los efectos biológicos de mezclas de oxovanadatos en solución manifiestan que algunas analogías estructurales con los correspondientes derivados del fosfato realmente existen. A valores altos de pH, el estado de oxidación más estable del vanadio es el V(V) mientras que a bajos valores, predominan las especies de V(IV). Desde pH 2 a 6, la principal especie de V(V) es el decámero $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (estructura 8 en Fig. 1.4) y sus diferentes formas protonadas.

Este comportamiento químico del vanadio tiene una implicancia muy importante. Las especies difícilmente retengan la forma del estado sólido una vez disueltas o ingeridas. La situación se complica más por el hecho de que la química de las distintas especies difiere considerablemente.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.4 Bioquímica del vanadio

En este Trabajo de Tesis se ha intentado incursionar en los aspectos químicos (síntesis, caracterización espectroscópica) de compuestos de vanadio con potencial actividad biológica, fundamentalmente inhibición de la fosfatasa alcalina (FAL) intestinal, y posible actividad antitumoral de algunos de los compuestos sintetizados. Por lo tanto, resulta interesante comentar algunos aspectos relacionados a la bioquímica del vanadio que son relevantes a este trabajo.

1.4.1 Inhibición enzimática

Se han llevado a cabo diferentes estudios en torno a las acciones biológicas del vanadio, hasta el momento se conocen muchos de sus efectos *in vitro* e *in vivo*. El vanadio inhibe diferentes enzimas y entre ellas ATPasas, aunque no todas son inhibidas con igual potencia. Subsecuentemente, se ha encontrado que el vanadio inhibe diferentes fosfatasas, incluyendo fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y proteína-tirosina fosfatasas (PTPasas).

Otras enzimas que son inhibidas por el vanadio son ribonucleasas, fosfodiesterasas, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa [65].

La analogía entre los compuestos de vanadio pentacoordinados y el estado de transición de la hidrólisis del éster fosfato explica por qué diversos compuestos de vanadio son potentes inhibidores de ribonucleasas, fosfatasas, ATPasas y otras fosforilasas.

Las PTPasas activan o inhiben señales intracelulares que desencadenan diferentes efectos biológicos. *In vivo*, el contenido de proteínas fosforiladas es un equilibrio dinámico entre la actividad de las quinasas y las fosfatasas, mostrando que ambas tienen un papel preponderante en la regulación de procesos celulares. Las fosfatasas que tienen fosfoproteínas como sustrato se pueden clasificar dentro de dos grandes grupos: las que tienen especificidad para serina- / treonina-fosfato (PS/TPasas) y las fosfatasas para tirosina-fosfato. Todas catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato. Las

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

PS/TPasas son metaloenzimas que catalizan el ataque directo de una molécula de agua activa al átomo de fósforo del sustrato. Las PTPasas no son metaloenzimas y en su mecanismo de catálisis se forma un intermediario fosfocisteína. La cisteína del sitio activo es esencial para el funcionamiento de la enzima. Además, estas enzimas son diferentes estructural y mecanísticamente a las fosfatasas alcalina y ácida y a las fosfatasas que hidrolizan ésteres fosfato de moléculas pequeñas como la glucosa-6-fosfato [66].

Las fosfatasas alcalinas son metaloenzimas de membrana, todas son glicoproteínas, codificadas por distintos genes y clasificadas en tejido no específico, intestinal, placentario y derivada de células germinales. Las fosfatasas alcalinas tejido no específico, por modificación posterior a su síntesis en riñón, hígado y hueso, dan origen a la fosfatasa alcalina renal, hepática y ósea, respectivamente. Las fosfatasas alcalinas hidrolizan monoésteres de fosfato de pequeñas moléculas y proteínas, además transfieren grupos fosfato a moléculas orgánicas con grupos hidroxilo.

El mecanismo de acción comprende la fosforilación de una serina presente en el sitio activo de la enzima y posteriormente se transfiere el grupo fosfato a una molécula de agua (fosfohidrolasa) o a un aceptor orgánico (fosfotransferasa) [67].

La habilidad del vanadato para inhibir este tipo de enzimas está estrechamente relacionada con sus propiedades físicas y químicas.

Estructuralmente, el vanadato es similar al fosfato y además posee mayor flexibilidad en su geometría de coordinación. Por lo tanto, es razonable esperar que ambos aniones participen de reacciones similares. La formación de un estado de transición estable entre la enzima y el vanadio parece ser la razón de la inhibición. Estudios de difracción de rayos X muestran que el vanadato se localiza en el sitio activo de la enzima formando una unión covalente con geometría de bipirámide trigonal.

En ensayos con compuestos de vanadio de diferente geometría de coordinación se encontró que los complejos con coordinación 5 eran inhibidores más potentes que los compuestos con coordinación 6 o 7 [56]. No obstante, todos los complejos estudiados inhibieron significativamente la actividad enzimática.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Por otro lado, el arseniato es un inhibidor potente, al igual que el vanadato, de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, no es un inhibidor eficiente de la Na^+ / K^+ ATPasa. Por ejemplo, la bomba de protones dependiente de ATP no forma un estado de transición estable entre la enzima y el fosfato, sino que el vanadato formaría un complejo catalíticamente inactivo con el sustrato, actuando así como un inhibidor.

Estos resultados sugieren que habría otros factores, además de la similitud con el fosfato, que estarían afectando la actividad enzimática [56,68].

Las PTPasas como *PTP 1B* y *LAR* poseen una cisteína en su centro activo, si este resto es oxidado se inhibe su actividad enzimática irreversiblemente. Los complejos de vanadio a través de la generación de radicales libres y principalmente los peroxoderivados podrían oxidar esta cisteína [69-71].

Estos aspectos muestran la importancia de las propiedades redox del vanadio y su relación con las PTPasas y las vías de transducción de señales.

Además del vanadato, el catión vanadilo también inhibe diferentes enzimas y, en algunos casos, es más potente que el vanadato. El mecanismo propuesto para esta inhibición se basa en la posibilidad del vanadilo para adoptar una estructura de bipirámide trigonal debido a la flexibilidad de la conformación de las proteínas, similar a la del fosfato y ubicarse en el sitio activo de estas enzimas inhibiendo su actividad [72].

1.4.2 Efectos celulares del vanadio

Luego de encontrar que el vanadio inhibe la Na^+ / K^+ ATPasa [73] se comenzaron a diseñar diferentes experimentos *in vitro* con células en cultivo para estudiar y conocer sus efectos biológicos. Se encontró que el vanadio estimula la fosforilación de proteínas con restos de tirosina, aumenta los niveles de fosfoinosítidos, estimula la proliferación de diferentes líneas celulares, incrementa la captación de pequeñas moléculas e iones, entre otros efectos.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Por otro lado, se han descrito efectos antitumorales - tóxicos - y transformantes en diferentes líneas celulares [17,18, 74-77].

1.4.2.1 Efectos del vanadio sobre la proliferación de células en cultivo

Diferentes estudios de células en cultivo muestran que el vanadio tiene un comportamiento bifásico con respecto a la proliferación celular. Concentraciones entre 2,5 y 25 μM son inductoras de la proliferación celular, mientras que concentraciones mayores a 50 μM producen inhibición de la proliferación.

Por otro lado, hay algunos derivados de vanadio que no tienen este comportamiento; comportándose solo como inhibidores de la proliferación celular, independientemente de la concentración utilizada para el ensayo.

Pero, en general, los compuestos de vanadio tienen efectos contrapuestos y éstos dependerán de la dosis, de la especie de vanadio presente y del tipo celular [17].

1.4.2.2 Efectos del vanadio sobre la diferenciación de células en cultivo

Uno de las propiedades más importantes de los factores de crecimiento es su habilidad para estimular la diferenciación celular. Las acciones del vanadio sobre la diferenciación celular parecen ser mediados por la inhibición de PTPasas.

Estudios realizados con vanadio muestran cierta controversia con relación a la diferenciación celular ya que se han descrito efectos contrapuestos, como se ha dicho antes.

Los osteoblastos en su etapa de diferenciación expresan, entre otras proteínas, colágeno y fosfatasa alcalina. Estudios de osteoblastos en cultivo muestran que el vanadio es capaz de estimular la síntesis de colágeno [78,79]. De esta forma, el vanadio participaría como un inductor de la diferenciación osteoblástica.

Sin embargo, por ensayos previos, y aún en este Trabajo de Tesis, se ha probado que el vanadio es un inhibidor de la fosfatasa alcalina. La actividad de la fosfatasa alcalina

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

es inhibida en forma dependiente de la dosis, siendo el vanadato un inhibidor más potente que el vanadilo [80].

En la etapa de formación ósea se requiere de una matriz extracelular, mayoritariamente de colágeno, donde se depositará la hidroxiapatita produciéndose la mineralización. En esta etapa es necesaria la actividad de la fosfatasa alcalina para que se produzca un aumento de la concentración local de fosfato, requerida para la mineralización. La inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina por el vanadio podría poner en riesgo la mineralización ósea y, de esta forma, afectar la formación del hueso.

1.4.2. Transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en sistemas celulares.

En células Swiss 3T3, tanto el vanadato como el vanadilo producen transformaciones morfológicas del citoplasma y disminución de las conexiones intercelulares [81].

Además, en células osteoblásticas (MC3T3-E1), los complejos de vanadio (IV) y (V) con maltol indujeron cambios en la morfología celular [82].

Por otro lado, el vanadato disminuye la adhesión y *spreading* celular en matrices de fibronectina, posiblemente por la alteración de los microtúbulos del citoesqueleto [83-85].

El vanadato produce la activación de una quinasa, sugiriendo que éste sería un mecanismo involucrado en las transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en células en cultivo [86].

1.5 Efectos antitumorales

El tratamiento antitumoral por cualquier compuesto debería cumplir ciertos criterios y ejercer los siguientes efectos selectivos en células malignas: (a) inhibición de la proliferación, (b) acciones citotóxicas y/o citostáticas (c) reducción y/o inhibición del potencial invasivo o metastásico de las células y (d) reducción o ausencia del potencial

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

para inducir resistencia celular. Los compuestos de vanadio poseen todas estas propiedades y las ejercen concertadamente o independientemente a través de una variedad de mecanismos celulares (Fig. 1.5).

Los efectos antitumorales de los compuestos de vanadio han sido investigados en una variedad de células tumorales [18, 87-92]. La generación de estrés oxidativo es un mecanismo que subyace a la mayoría de los efectos antitumorales que se observan para el vanadio y sus derivados.

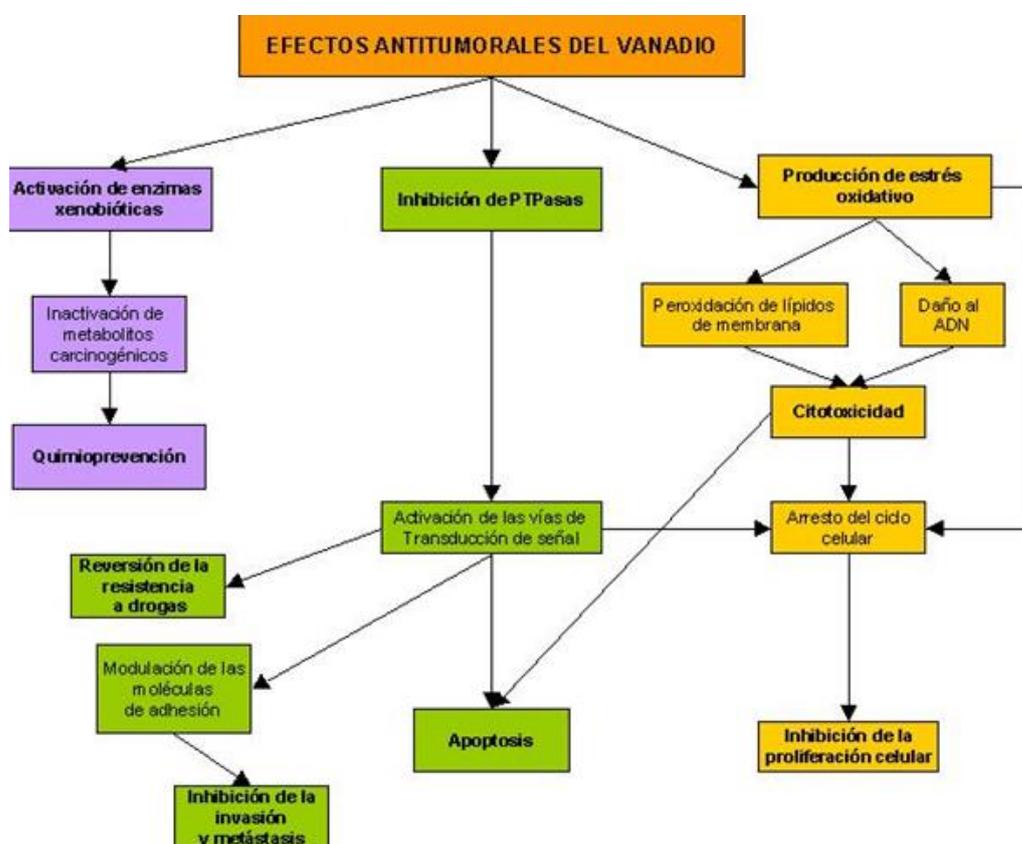


Fig. 1.5: Esquema de los mecanismos de acción a través de los cuales los compuestos de vanadio ejercen sus efectos antitumorales. (Modificado de Evangelou [17])

1.5.1 Especies de oxígeno y de nitrógeno reactivas (ROS y RNS)

El término especies de oxígeno reactivas o *ROS* comprende a los radicales libres y aquellas moléculas que no siendo radicales, son capaces de su formación en ambientes

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

extra e intra celulares. Las especies de nitrógeno reactivas (RNS) también han ganado mucha atención por su potencial oxidativo.

Los ROS/RNS pueden dañar tejidos a través de una variedad de mecanismos incluyendo daño en el ADN, peroxidación lipídica y daño de proteínas, oxidación de importantes enzimas y estimulación de citoquinas pro-inflamatorias liberadas por monocitos y macrófagos. Además, también están relacionados con la regulación del proceso de apoptosis o muerte celular programada [93].

Por otro lado, las ROS pueden tener un papel como mensajeros secundarios implicados en regulación génica y cascadas de transducción de señales con finalidades fisiológicas [94].

1.5.2 Daño oxidativo a biomoléculas

El $\text{OH}\cdot$ es conocido por reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN dañando tanto las bases de purinas como de piridimas y también el esqueleto de desoxirribosa [95]. La modificación permanente del material genético a partir de estos incidentes representa el primer paso en la mutagénesis y carcinogénesis. Los daños mediados por ROS pueden ser cortes en el ADN de simple y doble cadena, modificaciones de purina, pirimidina o desoxirribosa y entrecruzamientos.

Como consecuencia del daño, puede ocurrir una detención, o inducción, de la transcripción, inducción de las vías de transducción de señales, errores en la replicación e inestabilidad genómica, todas asociadas con la carcinogénesis [96,97].

Las RNS como peroxinitritos y óxidos de nitrógeno también pueden generar daño en el ADN [98].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.5.3 Generación de estrés oxidativo por el vanadio

El vanadio puede participar en reacciones que generan radicales libres (Fig. 1.6). El vanadio(V) es reducido rápidamente a vanadio(IV) en el plasma mediante enzimas y antioxidantes. Las siguientes reacciones tienen lugar dentro de las células [93]:

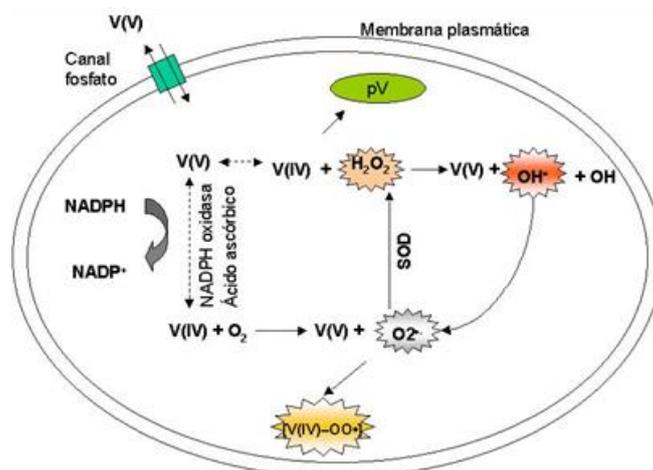
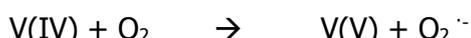


Fig. 1.6: Esquema de la generación de ROS mediada por el vanadio. (Modificado de Evangelou [17]).

Los radicales peroxovanadilo e hidroperóxido de vanadilo son los responsables de la peroxidación de lípidos de membrana reportada para el vanadio [17]. El superóxido generado es posteriormente convertido en H₂O₂ mediante dismutación por la superóxido-dismutasa, SOD.

Por otro lado, el vanadio(IV) en presencia de H₂O₂ puede generar especies reactivas a través de reacciones tipo Fenton mediante la siguiente reacción:



Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

La generación de $\text{OH}\cdot$ puede a su vez generar otros radicales como el anión superóxido el cual, como se mencionó, puede ser dismutado por la enzima (SOD), regenerando el H_2O_2 y perpetuando la generación de $\text{OH}\cdot$ [93].

Alternativamente el par V(V)/V(IV) en presencia de H_2O_2 puede generar directamente peroxovanadatos (pV), independientemente de la reacción tipo Fenton [99].

1.6 Importancia de la complejación del vanadio

Dado que los compuestos inorgánicos de vanadio son pobremente absorbidos por el intestino y que causan trastornos gastrointestinales, diferentes laboratorios han sintetizado complejos de vanadio con ligandos orgánicos para tratar de subsanar estos aspectos. La coordinación de especies inorgánicas de vanadio podría aumentar la solubilidad, estabilidad y absorción del vanadio y, por lo tanto, disminuir los problemas gastrointestinales asociados con las dosis elevadas o los tratamientos prolongados. Además, esta modificación estructural podría incrementar la potencia farmacológica de los mismos, disminuir su toxicidad y los requerimientos de vanadio para el tratamiento de diversas afecciones [14,100].

1.7 Estudios *in vivo*

La toxicidad del vanadio es un punto muy importante si estamos interesados en su uso como potencial agente terapéutico y principalmente si va a ser utilizado en tratamientos prolongados.

El índice terapéutico del vanadio depende, en gran medida, de la especie animal y el estado de oxidación del metal y la especie química en la que se encuentra. Por esto, en este Trabajo de Tesis se ha ensayado la toxicidad de nuevos compuestos de V(V) en modelo de embriones de peces cebra (*Danio rerio*) a los efectos de aportar al conocimiento de la toxicidad de complejos de V(V).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Como antecedente de estudios *in vivo* en modelos animales, con el objetivo de evaluar la toxicidad aguda y crónica del vanadio en animales, se administraron diferentes dosis de vanadio a ratas.

La administración en el agua de bebida de 0,2 a 1 mg/ml de sulfato de vanadilo o vanadato de sodio causó neurotoxicidad, nefrotoxicidad y desórdenes gástricos, entre los efectos tóxicos más importantes [76]. La acumulación de vanadio en los riñones afectó su función, modificando la retención de agua y solutos. Este efecto estaría asociado con la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa del riñón [101]. La administración intraperitoneal de vanadato a ratas, en dosis de 1,5 mg/kg, durante 12 días, produjo un incremento de la peroxidación lipídica y disminución de los grupos sulfhidrilos no proteicos en células neuronales [102]. Esta actividad pro-oxidante del vanadio podría posiblemente producir la irritación local de las membranas de la mucosa, causando problemas gastrointestinales en los pacientes tratados con vanadio [103].

Existe evidencia que el vanadio causaría mutagénesis, genotoxicidad, carcinogénesis y daño en el ADN en células en cultivo de forma dosis-dependiente [104, 105]. Estudios de toxicidad aguda de vanadio en roedores mostró que tanto el vanadilo, como el vanadato, son tóxicos en dosis superiores a las utilizadas como agente terapéutico, sin embargo el vanadato es más tóxico que el vanadilo [106].

Un aspecto adicional es la acumulación de vanadio en los tejidos y la toxicidad a largo plazo.

El vanadio se acumula mayoritariamente en hueso, riñón e hígado. Presumiblemente, algún equilibrio es alcanzado en la mayoría de los tejidos blandos que no acumulan vanadio, sin embargo su similitud con el fosfato podría favorecer la acumulación en el hueso. De hecho, estudios metabólicos detallados, ya han demostrado claramente que el hueso es el principal sistema de retención del vanadio no excretado [107].

La relevancia clínica de este punto debería ser considerada.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2. Objetivos del Trabajo de Tesis

2.1 Objetivos generales

2.1.1 Sintetizar diversos compuestos de vanadio con ligandos de interés biológico y farmacológico, tanto sistemas ya reportados, como nuevos complejos.

2.1.2 Caracterizar desde el punto de vista físico-químico y especialmente espectroscópico los complejos sintetizados.

2.1.3 Evaluar el efecto de los compuestos de V(V) sobre la actividad específica de fosfatasas.

2.1.4 Estudiar los efectos biológicos de complejos de V(V) seleccionados sobre células osteoblásticas en cultivo.

2.1.5 Seleccionar complejos de vanadio(V) con potencial aplicación farmacológica y evaluar su toxicidad *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Sintetizar peroxocomplejos de vanadio(V) ya reportados y caracterizarlos más detalladamente; realizar un estudio espectroscópico profundo de estos sistemas ya conocidos.

2.2.1.1 Evaluar los efectos de estos complejos sobre la proliferación de células formadoras de hueso, normales y tumorales, en cultivo.

2.2.2 Sintetizar y caracterizar complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido ya reportados e incorporar nuevos complejos a esta serie.

2.2.2.1 Caracterizar estos complejos analíticamente y estructuralmente y realizar un análisis espectroscópico detallado, tanto de los complejos ya reportados como de los nuevos, obtenidos por vez primera en este trabajo.

2.2.2.2 Obtener la estructura cristalina de complejos nuevos, cuando ello sea posible, y comparar con la estructura cristalina reportada de aquellos anteriormente sintetizados por otros investigadores.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.2.2.3 Estudiar el complejo que forma el oxovanadio(IV) con la tropolona y, eventualmente, caracterizar el análogo de vanadio(V). Estos sistemas aparecen como interesantes por la relación estructural que guardan con algunos complejos derivados de hidroxipironas e hidroxipiridinonas, de reconocida actividad farmacológica.

2.2.2.4 Estudiar el efecto inhibitorio de complejos seleccionados de vanadio(V) sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina de origen intestinal.

2.2.2.5 Analizar el efecto de complejos seleccionados con potencial aplicación farmacológica sobre líneas celulares osteoblasto-símiles, normales y tumorales: estudiar proliferación, morfología, citotoxicidad y genotoxicidad.

2.2.2.6 Evaluar la toxicidad de algunos complejos seleccionados en un modelo *in vivo*: huevos de peces cebra fertilizados (*Danio rerio*) mediante la prueba FET (*Fish Embryo Toxicity*).

3. Presentación del trabajo

A efectos de ordenar adecuadamente la presentación de los resultados la presentación del trabajo se hará en cuatro capítulos, a saber:

Cap. 1: *Materiales, métodos y equipos. Parte experimental*

Cap. 2: *Hidroxilamido complejos de vanadio(V)*

Cap. 3: *Peroxocomplejos de vanadio (V)*

Cap. 4: *Complejos de vanadio(IV y V) con tropolona*

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Bibliografía

- [1] Baran, E.J., Los Dos Elementos Químicos Descubiertos en América. En: Química y Civilización, Galagovsky, L. (Ed.), p.41, Asociación Química Argentina, Buenos Aires (2011)
- [2] Nriagu, J.O., History, Occurrence, and Uses of Vanadium. En: Vanadium in the Environment, Chemistry and biochemistry, Nriagu, J.O. (Ed.), Vol. 30, p. 1, John Wiley & Sons, New York (1998)
- [3] Habashi, F., *Ann. NY. Acad. Sci.* 928, 22 (2002)
- [4] Michibata, H., Sakurai, H., Vanadium in ascidians. En: Vanadium in Biological Systems, Chasteen, N. D. (Ed.), p. 153, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1990)
- [5] Michibata, H., Uyama, T., Ueki, T., Kanamori, K.M., *Microsc. Res. Technol.* 56, 421 (2002)
- [6] Winter, J.M., Moore, B.S., *J. Biol. Chem.* 284, 18577 (2009)
- [7] Fattorini, D., Regoli, F., Hyper-accumulation of Vanadium in Polychaetes. En: Vanadium: Biochemical and Molecular Biological Approaches, Michibata, H. (Ed.), p. 74, Springer, Dordrecht (2012)
- [8] Nielsen, F.H., Vanadium in Mammalian Physiology and Nutrition. En: Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life. Sigel, H., Siegel, A. (Eds.), Vol. 31, p. 543, Marcel Drekker, Inc., New York (1995)
- [9] Shechter, Y., Shisheva, A. *Endavour* 17, 27 (1993)
- [10] Clarkson, P.M., Rawson, E.S., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39, 317 (1999)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [11] Fawcett, J.P., Farquhar, S.J., Thou, T., Shand, B.I., *Pharmacol. Toxicol.* 80, 202 (1997)
- [12] Morinville, A., Maysinger, D., Shaver, A., *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 452 (1998)
- [13] Thompson, K.H., Leichter, J., McNeil, J.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1549 (1993)
- [14] Thompson, K.H., *Biofactors* 10, 43 (1999)
- [15] Thompson, K.H., McNeill, J.H., Orvig, C., *Chem. Rev.* 99, 2561 (1999)
- [16] Thompson K.H., Orvig C., *J. Inorg. Biochem.* 100, 1925 (2006)
- [17] Evangelou, A.M., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 249 (2002)
- [18] Djordjevic, C., Antitumor Activity of Vanadium Compounds. En: Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life. Sigel, H. and Sigel, A. (Eds.). Vol. 31, p. 595, Marcel Drekker, Inc., New York (1995)
- [19] Rehder, D., *Biometals* 5, 3 (1992)
- [20] Poucheret, P., Verma, S., Grynepas, M.D., McNeil, J.H., *Mol. Cell. Biochem.* 188, 73 (1998)
- [21] Cortizo, A.M., Molinuevo, M.S., Barrio, D.A., Bruzzone, L., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1171 (2006)
- [22] Etcheverry, S.B., Barrio, D.A., Vanadium and bone. En: Relevance of vanadium compounds in bone cells. Vol. 974, p. 204, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington, (2007)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [23] Rubinson, K.A., *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 212, 65 (1981)
- [24] Sakurai, H., Shimomura, S., Ishizu, K., *Inorg. Chim. Acta* 55, L67 (1981)
- [25] Willsky, G.R, White, D.A, McCabe, B.C., *J. Biol. Chem.* 259, 13273 (1984)
- [26] Boyd, D.W., Kustin, K., *Adv. Inorg. Biochem.* 6, 311 (1984)
- [27] Ramasarma, T., Crane, F.L., *Curr. Top. Cell. Reg.* 20, 247 (1981)
- [28] Thompson, H.J., Chasteen, D.N, Neeker, L., *Carcinogenesis* 5, 849 (1984)
- [29] Bishayee, A., Chatterjee, M., *Br. J. Cancer* 71, 1214 (1995)
- [30] Bishayee, A., Karmakar, R., Mandal, A., Kundu, S.N., Chattrjee, M., *Eur. J. Cancer Prev.* 6, 58 (1997)
- [31] Bishayee, A., Oinam, S., Basu, M., Chatterjee, M., *Breast Cancer Res. Treat.* 63, 133 (2000)
- [32] Vilter, H., *Phytochemistry* 23, 1387 (1984)
- [33] Vilter, H., Vanadium-Dependent Haloperoxidases. En: *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life.* Sigel, H. and Sigel, A. (Eds.). Vol. 31, p. 325, Marcel Drekker, Inc., New York (1995)
- [34] Robson, R. L., Woodley, P. R., Pau, R. N., Eady, R. R., *EMBO J.* 8, 1217 (1989)
- [35] Messerschmidt, L., Prade, R., Wever, A., Vanadium Compounds. En: *Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications.* Crans, D.C, Tracey, A.S. (Eds.), Vol. 711, p. 186, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington, (1998)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [36] Littlechild J., Garcia-Rodriguez, E., Dalby A., Isupov, M., *J. Mol. Recognit.* 15, 291 (2002)
- [37] Slebodnick, C., Hamstra, B.J., Pecoraro, V.L., *Struct. Bond.* 89, 51 (1997)
- [38] Rehder, D., Schulzke, C., Dau, H., Meinke, C., Hanss, J., Epple, M. *J. Inorg. Biochem.* 80, 115 (2000)
- [39] Eady, R.R., *Coord. Chem. Rev.* 237, 23 (2003)
- [40] Hinnemann, B., Norskov, J. K., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1466 (2003)
- [41] Liochev, S.I., Fridovich, I., *Arch. Biochem. Biophys.* 1,1 (1990)
- [42] Baes, J., Charles, F., Mesmer, R.E., *The hydrolysis of cations.* John Wiley & Sons: New York (1976)
- [43] Chasteen, N.D., *Struct. Bond.* 53, 103 (1983)
- [44] Iannuzzi, M.M., Rieger, P.H., *Inorg. Chem.* 14, 2895 (1975)
- [45] Komura, A., Hayashi, M., Imanaga, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50, 2927 (1977)
- [46] Crans D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., Yang, L., *Chem. Rev.* 104, 849 (2004)
- [47] Lachowicz, A., Höbold, W., Thiele, K.H., *Z. Anorg. Allg. Chem.* 418, 65 (1975)
- [48] Alberico, E., Micera, G., *Inorg. Chim. Acta* 215, 225 (1994)
- [49] Kiss, T., Kiss, E., Micera, G., Sanna, D., *Inorg. Chim. Acta* 283, 202 (1998)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [50] Micera, G., Sanna, D., Dess, A., Kiss, T., Buglyo, P., *Gazz. Chim. Ital.* 123, 573 (1993)
- [51] Costa-Pessoa, J., Tomaz, I., Kiss, T., Buglyó, P., *J. Inorg. Biochem.* 84, 259 (2001)
- [52] Costa-Pessoa, J., Tomaz, I., Kiss, T., Kiss, E., Buglyó, P., *J. Biol. Inorg. Chem.* 7, 225 (2002)
- [53] Micera, G., Sanna, D., Kiss, E., Garribba, E., Kiss, T., *J. Inorg. Biochem.* 75, 303 (1999)
- [54] Branca, M., Micera, G., Dessi, A., Sanna, D., *J. Inorg. Biochem.* 45, 169 (1992)
- [55] Garribba, E., Lodyga-Chruscinska, E., Sanna, D., Micera, G., *Inorg. Chim. Acta* 322, 87 (2001)
- [56] Crans, D.C, Tracey, A.S., The chemistry of vanadium in aqueous and non-aqueous solution. En: Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications. Crans, D.C., Tracey, A.S. (Eds.), Vol. 711, p. 2, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington (1998)
- [57] Rehder, D., *Coord. Chem. Rev.* 182, 297 (1999)
- [58] Chasteen, N.D., Vanadium in Biological Systems: physiology and biochemistry. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1990)
- [59] Crans, D.C., *Pure Appl. Chem.* 77, 1497 (2005)
- [60] Cruywagen, J.J., Heyns, J.B., Westra, A.N., *Inorg Chem.* 35, 1556 (1996)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [61] Crans, D.C., Harnung, S.E., Larsen, E., Shin, P.K., Theisen, L.A., Trabjerg, I., *Acta Chem. Scand.* 45, 456 (1991)
- [62] Daym V.W., Klemperer W., Yagasaki, G., A. *Chem. Lett.* 1267 (1990)
- [63] Hamilton, E.E., Fanwick, P.E., Wilker, J.J., *J. Am. Chem. Soc.* 124, 78 (2002)
- [64] Rigden, D.J., Littlejohn, J., Jedrzejewski, M.J., *J. Mol. Biol.* 325, 411 (2003)
- [65] Stankiewicz, P.J., Tracey, A. Stimulation of Enzyme Activity by Oxovanadium Complexes. En: *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life.* Sigel, H., Sigel, A. (Eds.) Vol. 31, p. 287, Marcel Dekker, Inc., New York (1995)
- [66] Zhang, Z.Y., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 1 (1998)
- [67] Van Hoof, V.O., De Broe, M.E., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 31, 3, 197 (1994)
- [68] Kustin, K., Perspectives on Vanadium Biochemistry. En: *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications.* Crans, D.C., Tracey, A.S., Vol. 711, p. 170, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington (1998)
- [69] Crans, D.C., Peroxo, Hydroxylamino, and Acac Derived Vanadium Complexes: Chemistry, Biochemistry, and Insulin-Mimetic Actions of Selected Vanadium Compounds. En: *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications.* Crans, D.C., Tracey, A.S., Vol. 711, p. 82, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington (1998)
- [70] Posner, B.I., Yang, C.R., Shaver, A., Mechanism of Insulin Mimetic Action of Peroxovanadium Compounds. En: *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications.* Crans, D.C., Tracey, A.S., Vol. 711, p. 316, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society, Washington (1998)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [71] Cheng, A., Dube, N., Gu, F., Tremblay, M.L., *Eur. J. Biochem.* 269, 1050 (2002)
- [72] Williams, P. A. M., Barrio, D. A., Etcheverry, S. B., *J. Inorg. Biochem.* 75, 99 (1999)
- [73] Cantley, L.C. (Jr), Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., Guidotti, G., *J. Biol. Chem.* 252, 7421 (1977)
- [74] Shechter, Y., *Diabetes* 39, 1 (1990)
- [75] Stern A., Yin, X., Tsang, S.S., Davison, A., Moon, J., *Biochem. Cell. Biol.* 71, 103 (1993)
- [76] Domingo, J.L., *Mol. Cell. Biochem.* 203, 185 (2000)
- [77] Srivastava, A.K., *Mol. Cell. Biochem.* 206, 177 (2000)
- [78] Canalis, E., *Endocrinology* 116, 855 (1985)
- [79] Lau, K.H., Tanimoto, H., Baylink, D.J., *Endocrinology* 123, 2858 (1988)
- [80] Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 145, 97 (1995)
- [81] Cortizo, A.M., Salice, V.C., Vescina, C.M., Etcheverry, S.B. *Biometals* 10, 127 (1997)
- [82] Salice, V.C., Cortizo, A.M., Gomez Dumm, C.L., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 198, 119 (1999)
- [83] Marchisio, P.C., D'Urso, N., Comoglio, P.M., Giancotti, F.G., Tarone, G., *J. Cell. Biochem.* 37, 151 (1988)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [84] Edwards, J.G., Campbell, G., Grierson, A.W., Kinn, S.R., *J. Cell. Sci.* 98, 363 (1991)
- [85] Brautigam, D.L., Bornstein, P., Gallis, B., *J. Biol. Chem.* 256, 6519 (1981)
- [86] Brown, D.J., Gordon, J.A., *J. Biol. Chem.* 259, 9580 (1984)
- [87] English, L., Macara, J.G., Cantley, L.C., *J. Cell. Biol.* 97, 1299 (1983)
- [88] Djordjevic, C., Wampler, G.L., *J. Inorg. Biochem.* 25, 51 (1985)
- [89] Zick, Y., Sager-Eisenberg, R., *Biochemistry* 29, 10240 (1990)
- [90] Bergamashi, G., Rosti, V., Danava, M., Ponchio, L., Lucotti, C.,Cazzola, M., *Leukemia* 7, 2012 (1993)
- [91] Kresja, C.M., Nadler, S.G., Esselstyn, J.M, Kavanagh, J.T, Ledbetter, J.A, Scieven, G.L., *J. Biol. Chem.* 272, 11541 (1997)
- [92] Fu, Y., Wang, Q., Yang, X-G., Yang, X-D., Wang, K., *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 1009 (2008)
- [93] Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur M., *Chem. Biol. Interact.* 160, 1 (2006)
- [94] Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J., *Life* 49, 427 (2000)
- [95] Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., *Free Rad. Biol. Med.* 32, 1102 (2002)
- [96] Marnett, L.J., *Carcinogenesis* 21361 (2000)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[97] Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., *FASEB J.* 17, 1195 (2003)

[98] Brown, G.C., Borutaite, V., *IUBMB Life* 52, 189 (2001)

[99] Capella, M.A.M., Capella, L.S., Valente, R.C., Gefé, M., Lopes, A.G., *Cell Biol. Toxicol.* 23, 413 (2007)

[100] Yuen, V.G., Orvig, C., McNeill, J.H., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 263 (1993)

[101] Phillips, T.D., Nechay, B.R., Heidelbaugh, N.D., *Fed. Proc.* 42, 2969 (1983)

[102] Haider, S.S., Abdel-Gayoum, A.A., el-Fakhri, M., Ghwarsha, K.M., *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 23 (1998)

[103] Cohen, N., Halbestam, M., Shlimovich, P., Chang, C.J., Shamoan, H., Rossetti, L., *J. Clin. Invest.* 95, 2501 (1995)

[104] Sabbioni, E., Pozzi, G., Devos, S., Pintar, A., Casella, L., Fischbach, M., *Carcinogenesis* 14, 2565 (1994)

[105] Ciranni, R., Antonetti, M., Migliore, L., *Mutat. Res.* 343, 53 (1995)

[106] Llobet, J.M., Domingo, J.L., *Toxicol. Lett.* 23, 227 (1984)

[107] Baran, E. J., *Chem. Biodivers.* 5, 1475 (2008)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Capítulo 1

Materiales, Métodos y Equipos: Parte Experimental

1.1 Generalidades

En este capítulo se describen los materiales, métodos y equipos utilizados en las diferentes etapas de este Trabajo de Tesis: síntesis, caracterización analítica, estructural y ensayos biológicos *in vitro*.

1.1.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en la síntesis de los complejos eran de grado analítico a menos que se especifique otra cosa, disponibles comercialmente y de marcas conocidas (Aldrich, Merck, etc.), y fueron utilizados sin previa purificación.

1.2 Generalidades de la síntesis de los complejos

1.2.1 Complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido

En la síntesis de estos compuestos se siguió un procedimiento común para todos, derivado de métodos descritos en la bibliografía para obtener complejos de vanadio (V) de fórmula general $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, en donde aa representa un α -aminoácido [1,2].

Se disuelve en un volumen mínimo de agua destilada (ca. 10 mL), 4 ó 5 mmol de NH_4VO_3 con cantidad variable de NaOH, suficiente para asegurar la neutralidad luego de la adición de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$).

Se realiza la disolución en caliente, con agitación magnética, y luego de llevar a temperatura ambiente, se agrega el aminoácido en pequeñas porciones, en una relación aminoácido/ NH_4VO_3 cercana a 3.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

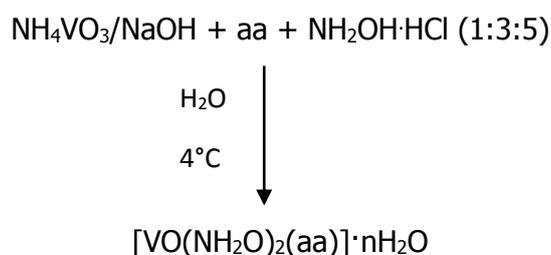
La solución se enfría en baño de hielo-agua y se le adiciona $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ sólido, en pequeñas porciones, en una relación $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{NH}_4\text{VO}_3 \sim 5$, bajo agitación constante. Se asegura la disolución completa dejando un tiempo agitándose en el baño a 0°C .

Se mide el pH con tira indicadora y si es necesario se ajusta a pH aproximadamente 7 con solución de NaOH 0,1N o HCl 0,1 N.

La solución amarilla resultante se deja en heladera. En un tiempo variable, que puede ser inmediato, de horas o aún de varios días (dependiendo del aminoácido utilizado) aparece el sólido microcristalino. Éste se separa por filtración, se lava con 3-4 porciones de 2 mL de agua destilada fría y 3-4 porciones de 3 mL de etanol absoluto frío.

Se seca el sólido entre papel de filtro, separando los agregados de sólido y repitiendo el procedimiento varias veces. Finalmente se deja secar a vacío sobre sílica-gel o H_2SO_4 concentrado.

Se propone, para resumir lo anteriormente expuesto, el siguiente esquema de síntesis:



1.2.2 Complejos de vanadio(V) con ligando peroxo

La síntesis de peroxocomplejos de vanadio(V) se realiza, en términos generales, disolviendo pentóxido de divanadio (V_2O_5) en H_2O_2 diluido, en baño de hielo-agua, o disolviendo V_2O_5 en una solución alcalina (KOH , NaOH o carbonato alcalino) con calentamiento suave.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los ligandos se agregan a la mezcla de reacción como sólidos, o en forma de soluciones acuosas o en el disolvente adecuado al caso, o como sólidos suspendidos en una solución hidroalcohólica.

El sistema reaccionante utilizado en la obtención de estos complejos es, en general:

Compuesto de vanadio(V) – H₂O₂ – ligando(s) – disolvente

De ser necesario, se ajusta el pH a 7 con HCl 0,1 N ó NaOH 0,1 N.

La cristalización generalmente se inicia con el agregado de un co-disolvente (etanol) en pequeña cantidad hasta aparición de turbidez que perdura al agitar [3].

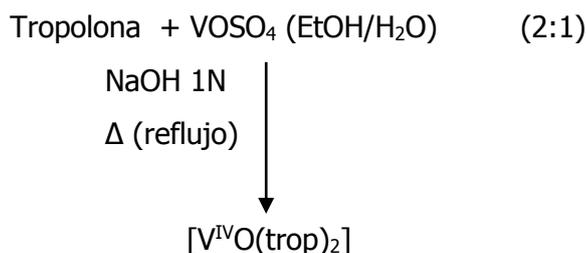
Se obtienen sólidos luego de haber dejado las soluciones en heladera por horas o días. Éstos se lavan con agua fría y etanol frío, y se dejan secar en un desecador a vacío sobre sílica-gel o H₂SO₄ concentrado.

1.2.3 Complejos bistropolonatooxovanadio (IV) y (V)

1.2.3.1 Complejo bistropolonatooxovanadio (IV)

La tropolona (Htrop) disuelta en una mezcla etanol/agua (50:50) se agrega de a gotas a una solución de VOSO₄ en etanol/agua (50:50). Se modifica el pH hasta medio básico y se calienta a reflujo la solución resultante, dejando luego enfriar a temperatura ambiente.

El esquema de la síntesis sería, entonces:



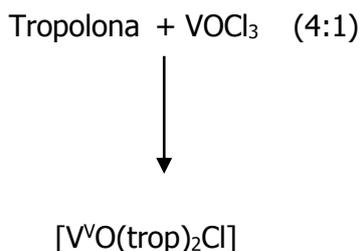
Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.2.3.2 Complejo bistropolonatooxovanadio (V)

En general, este complejo se prepara adicionando oxicloruro de vanadio(V), VOCl_3 , a una solución de tropolona en CCl_4 .

El esquema de la síntesis es:



1.2.3.3 Complejos $[\text{Co}(\text{trop})_2]$, $[\text{Cu}(\text{trop})_2]$ y $[\text{Zn}(\text{trop})_2]$

Estos complejos fueron sintetizados con fines comparativos.

Se mezclan soluciones de tropolona en agua/metanol (50:50) con los correspondientes acetatos de los metales (Co, Cu o Zn), en relación molar 2:1, y se calienta a reflujo.



1.3 Caracterización Analítica

1.3.1 Análisis Elemental

El análisis de C, N, H y S fue realizado con un analizador Carlo Erba modelo EA1108 utilizando un procesador de datos Eager 200 (Cátedra de Química Inorgánica, UdelaR).

Para la dosificación de vanadio se puso a punto un método colorimétrico basado en la formación de un compuesto soluble amarillo, ácido tungstovanadofosfórico, por la adición de ácido fosfórico y tungstato de sodio a una solución ácida de vanadato.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

La etapa inicial implica la destrucción de materia orgánica, para lo que se realiza una toma pesada a la décima de miligramo del complejo, conteniendo 2 mg de vanadio. Se agregan 2 mL de H₂SO₄ 1:4 (v/v) y 2 ml de HNO₃ concentrado. Se lleva a ebullición con agitación magnética hasta que se desprenden vapores blancos de SO₃. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se añaden 2 mL más de HNO₃, y se deja evaporar nuevamente. Se repiten las adiciones y evaporaciones de HNO₃ hasta obtener una solución clara [4].

La dosificación de vanadio se realiza por medio de una curva de calibración realizada midiendo la absorbancia a 410 nm de soluciones de fosfotungstovanadato obtenidas a partir de soluciones estándar de NH₄VO₃. Se determina el rango lineal de trabajo que resulta 0,5-5,0 µg/L en vanadio.

Para realizar la medida, a la solución resultante del proceso de destrucción de materia orgánica se le añade 1,0 mL de H₃PO₄ 1:2 (v/v) y 0,5 mL de Na₂WO₄ 0,5 M por cada 10 mL de solución de muestra. Se calienta a ebullición, se deja enfriar a temperatura ambiente, se lleva a volumen, y se determina la absorbancia a 410 nm contra un blanco de reactivos. De la curva de calibración se calcula la concentración de vanadio de la muestra [5].

1.3.2 Caracterización estructural en estado sólido

1.3.2.1 Caracterización estructural por difracción de rayos X en polvo

La estructura de varios de los compuestos estudiados fue confirmada por difracción de rayos X en polvo, utilizando un difractómetro Philips PW 1710 (Laboratorio de Cristalografía, UNLP) y empleando radiación monocromática de Cu ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$). Como patrón de calibración externo se utilizó NaCl.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.3.2.2 Determinación de la estructura cristalina en monocristal

En el caso del $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{DL-met})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ se logró obtener monocristales de calidad adecuada como para determinar su estructura cristalina por difracción de rayos X.

Las medidas fueron realizadas en un difractómetro Oxford Xcalibur, Eos, Gemini CCD con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) (Laboratorio de Cristalografía, UNLP).

Las intensidades de difracción de rayos X fueron recogidas (ω barridos con desplazamientos ϑ y κ), integradas y escaladas con el paquete de programas CrysAlisPro [6].

Los parámetros de la celda unidad se obtuvieron por refinamiento de mínimos cuadrados basados en los ajustes angulares de las reflexiones recogidas con intensidades mayores a siete veces la desviación estándar de los errores de medida utilizando CysAlisPro. Los datos fueron corregidos empíricamente por absorción empleando el método de múltiple barrido implementado en CrysAlisPro.

La estructura fue resuelta por métodos directos con SHELXS-97 [7] y el modelo molecular refinado por procedimiento de mínimos cuadrados de matriz completa sobre F^2 con SHELXL-97 [8].

Los átomos de hidrógeno del aminoácido y del agua se localizaron en un mapa de diferencias de Fourier y se refinaron isotrópicamente en las posiciones encontradas. Las distancias $\text{O}_{(\text{agua})}\text{-H}$ ($\text{O}_{\text{wy}}\text{-H}$) y $\text{H}\cdots\text{H}$ se restringen a los valores objetivo de 0.86(1) y 1.36(1) Å , respectivamente. Los restantes átomos de hidrógeno del residuo metioninato fueron refinados utilizando el modelo de cabalgata ("riding model") [9] con el grupo metilo supuesto como grupo rígido que puede rotar libremente en torno al correspondiente enlace C-S. La densidad electrónica residual de 1.8 $\text{e}\cdot\text{Å}^{-3}$ en el mapa de diferencias de Fourier es probablemente debido a desorden de posición del grupo aminoácido en torno al carbono α .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.3.2.3 Espectroscopía FT-IR y FT-Raman

La espectroscopía vibracional FT-IR y FT-Raman, fue utilizada para la verificación de la presencia de los ligandos en los compuestos de coordinación sintetizados, la caracterización de grupos funcionales de los mismos y la determinación de modificaciones en sus bandas características por efecto de su coordinación con el centro metálico. Estos estudios permiten obtener datos estructurales de los complejos preparados [10]. Además, estas técnicas espectroscópicas permiten obtener información sobre el centro de vanadio presente en los compuestos, particularmente caracterizar la presencia de los centros $V^{IV}O$ y V^{VO} .

Los espectros FT-IR se midieron en el rango $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ utilizando pastillas de KBr en un instrumento Bomem M 102 (Cátedra de Química Inorgánica, Udelar), con una velocidad de 20 barridos/min y resolución de 4 cm^{-1} .

Los espectros FT-IR de complejos bistropolonatooxovanadio (IV) y (V) se registraron utilizando pastillas de KBr en rango espectroscópico $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, en un instrumento Bruker EQUINOX 55 (CEQUINOR, UNLP) con una velocidad de 20-25 barridos/min y resolución de 4 cm^{-1} .

Los espectros FT-Raman (CEQUINOR, UNLP) se registraron con el accesorio FRA 106 de un espectrofotómetro FT-IR Bruker IF 66.

Se utilizó la línea de 1064 nm de un láser de estado sólido Nd:YAG para excitar la muestra. La geometría de barrido fue de 180° y fueron acumulados unos 50 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras en todos los casos fueron estudiadas en el estado sólido.

La intensidad de las bandas fue clasificada según: "mi" (muy intensa, intensidad relativa muy alta), "i" (intensa, intensidad relativa hasta un 25% menor que la más intensa), "m" (media, intensidad relativa hasta un 50% menor que la "i") y "d" (débil, intensidad relativa menor que "m"); cuando la banda aparece ensanchada se indica "h" (hombro).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

A partir de los espectros infrarrojos de los complejos metálicos obtenidos se determinó la presencia de los distintos ligandos coordinados al metal, por comparación con los espectros obtenidos para los ligandos libres. A partir de las modificaciones de las frecuencias de vibración de algunas bandas características de los ligandos se pudo determinar a través de qué átomos se produce la coordinación del ligando al centro metálico.

Los espectros FT-Raman de los complejos de vanadio se obtuvieron a efectos de recoger información complementaria a la obtenida de la espectroscopía IR y obtener así un *estudio espectroscópico completo* de los sistemas.

1.3.2.4 Medidas de susceptibilidad magnética

Esta herramienta es muy utilizada en el estudio de complejos de coordinación aunque encuentra su aplicación en el campo de la Química Bioinorgánica, fundamentalmente en el estudio de modelos.

Estas mediciones permiten obtener información sobre el estado de oxidación del metal, su configuración electrónica, y la geometría de la esfera de coordinación [10].

Las medidas de susceptibilidad magnética se realizaron sobre muestras policristalinas de $[\text{VO}(\text{trp})_2]$ utilizando un magnetómetro SQUID (Quantum Design, modelo MPMS-XL, Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid).

La dependencia de la susceptibilidad magnética con la temperatura se midió en el rango 2-300 K con un campo magnético aplicado de 0,5 T luego de calentar la muestra bajo condiciones de enfriamiento de campo cero desde 2 K (previamente enfriado a $H=0$ T).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

La contribución paramagnética χ_p a la susceptibilidad determinada experimentalmente fue obtenida substrayendo la contribución diamagnética ($-102(1) \times 10^{-6} \text{ emu mol}^{-1}$) la cual fue calculada de las constantes de Pascal [11].

1.3.3 Caracterización en solución acuosa

Dado que la estructura de un complejo en estado sólido puede ser diferente de su estructura en solución, es de interés para algunos sistemas representativos de los grupos de compuestos estudiados en este Trabajo de Tesis, complementar la caracterización en estado sólido con la caracterización en solución.

1.3.3.1 Espectroscopía UV/Vis

La espectroscopía electrónica de absorción UV-vis es utilizada para obtener información acerca de la existencia de la coordinación y el estudio de la geometría del centro metálico, ya sea utilizando las transiciones d-d, las bandas de transferencia de carga, así como los cambios en las transiciones internas de los ligandos al producirse la coordinación [12].

Debido a que existen referencias bibliográficas sobre las transiciones electrónicas (bandas de transferencia de carga) para los sistemas estudiados en este Trabajo de Tesis, la comparación entre estos datos reportados y los hallados añaden información a la que ya se disponía por el empleo de otras técnicas.

Los espectros se realizaron en solución acuosa. La concentración de los compuestos en las soluciones acuosas fue establecida según los casos.

Fue utilizado un instrumento Shimadzu UV-1603, y cubetas de cuarzo de 10 mm de paso (Cátedra de Química Inorgánica, UdelaR).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Para los espectros electrónicos de los complejos de bistroponatooxovanadio(IV) y(V) se utilizó un instrumento Hewlett-Packard 8452 de arreglo de diodos y celdas de cuarzo de 10 mm de paso en el rango espectral 200-800 nm (CEQUINOR, UNLP).

Los solventes utilizados con estos complejos fueron diversos (agua, metanol, DMF, cloroformo, THF, DMSO).

1.3.4 Medidas electroquímicas en sistemas de bistroponatooxovanadio (IV) y (V)

Las propiedades redox de un analito en solución resultan en información interesante del sistema que pueden complementar otros datos recogidos a partir de otros métodos.

Además, el estudio del comportamiento redox de compuestos con potencial aplicación farmacológica puede aportar resultados interesantes para correlacionar con la actividad encontrada.

La voltametría cíclica es capaz de proveer de información no solamente de los aspectos termodinámicos de los procesos redox sino también de la cinética de reacciones de transferencia electrónica heterogénea y reacciones químicas acopladas. Las formas características de las ondas voltamétricas y su posición inequívoca en la escala de potenciales es virtualmente una "huella dactilar" de las propiedades electroquímicas de sistemas redox, por lo que ha recibido la denominación de "espectroscopía electroquímica" [13].

Se realizaron medidas de voltametría cíclica con un potencióstato/galvanóstato Princeton Applied Research (PAR) modelo 263A (CEQUINOR, UNLP).

Se utilizó una celda estándar de tres electrodos provista de un disco de carbono vitrificado como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo de conteo, y Ag/AgNO₃ 10⁻² M en CH₃CN como electrodo de referencia. Este electrodo fue calibrado contra el par redox [Fe(C₅H₅)₂]/[Fe(C₅H₅)₂]⁺, para el cual fue asignado un potencial de +0.4 V contra ENH [14, 15].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Las medidas fueron realizadas en soluciones de DMSO 10^{-3} M con hexaclorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF6) 0,1 M como electrolito soporte, purgadas de oxígeno a través del pasaje de N_2 . Durante las medidas se hizo pasar una corriente de N_2 a través de las soluciones. Todos los potenciales indicados están referidos al ENH, en voltios.

1.3.6 Estudios biológicos *in vitro*

Para estudiar diferentes efectos biológicos y farmacológicos de los complejos de vanadio(V), se realizaron estudios biológicos tanto acelulares (inhibición de la actividad específica de la fosfatasa alcalina, FAL) como celulares (proliferación celular de osteoblastos-símiles) *in vitro*. Estos estudios son relevantes en cuanto a ahondar en las propiedades osteogénicas, antitumorales y citotóxicas de los complejos de vanadio estudiados.

En general, se ha visto que los compuestos de vanadio muestran acciones opuestas sobre dos marcadores del fenotipo osteoblástico: inhiben la actividad de la FAL y algunos de ellos pueden aumentar la síntesis de colágeno por los osteoblastos. Por lo tanto, la probabilidad de que un compuesto de vanadio actúe como un agente promotor de la formación del hueso podría depender de la relación entre la inducción de la diferenciación osteoblástica y síntesis concomitante de colágeno y una ligera disminución de la actividad de la FAL [16].

1.3.6.1 Actividad inhibitoria de la fosfatasa alcalina intestinal (FAL)

La FAL está involucrada en la mineralización del hueso. Es una enzima anclada a la membrana celular de los osteoblastos desde donde aumenta la concentración de fosfato inorgánico de las vesículas extracelulares de mineralización, favoreciendo la precipitación de fosfato de calcio, el principal componente de la fase mineral del hueso. La enzima es un marcador de fenotipo osteoblástico maduro, y por ese motivo, la determinación de su actividad específica es utilizada para evaluar el grado de diferenciación en este tipo de cultivos [17].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

El efecto inhibitorio de diferentes especies de vanadio(V) sobre la FAL de origen comercial, se determinó espectrofotométricamente a 405 nm en un instrumento Shimadzu UV-1603 a 37 °C (Cátedra de Química Inorgánica, UdelaR).

Para ello, se mezcló 1 µg de proteína en 880 µl de solución reguladora conteniendo glicina 55 mM, KCl 20 mM y MgSO₄ 0,55 mM.

Luego, se agregaron 10 µl de una dilución en agua del compuesto a estudiar. Se realizaron curvas dosis – respuesta, a concentraciones de la solución de complejo inhibitorio de 2,5 a 100 µM.

La reacción se inició con el agregado de 100 µl de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) en solución reguladora y a los 10 minutos se determinó la formación del producto de reacción: *p*-nitrofenol (*p*-NP) midiendo la absorbancia a 405 nm. La reacción se detuvo con el agregado de NaOH 20 mM.

La reacción entre la enzima y el sustrato en estas condiciones de reacción fue lineal al menos hasta los 15 min, hecho verificado previamente mediante representación gráfica de la absorbancia (A) en función del tiempo.

La velocidad inicial de reacción se expresó en nmol de *p*-NP/min. Previamente, con un patrón de *p*-NP se realizó una curva de calibración y se determinó la relación entre la absorbancia y los nmol de *p*-NP (nmol *p*-NP = A x 60, rango [1,0 – 60,0 nmol *p*-NP]).

1.3.6.2 Estudios celulares

Diferentes trabajos sugieren que los compuestos de vanadio estimulan la síntesis de ADN y de colágeno, sugiriendo que los mismos son inductores y promotores de la diferenciación osteoblástica [18,19].

El sistema modelo *in vitro* utilizado consiste en dos líneas clonadas de células osteoblasto-símiles: UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata inducido por ³²P

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

que se conserva por trasplante dentro de la misma colonia de ratas, y una línea de células no transformadas MC3T3E1, derivada de calvaria de ratón.

Para el estudio de la actividad biológica *in vitro* del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ se utilizó además de las líneas celulares anteriores, otras dos líneas: células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma de colon humano y células macrófagos de tumor murino RAW 264.7.

La línea clonada de células UMR106 expresa marcadores de un fenotipo osteoblástico diferenciado. Esta línea, a diferencia de las MC3T3-E1, tiene la característica fenotípica de un osteoblasto diferenciado, pero inmaduro: expresa altos niveles de fosfatasa alcalina y colágeno de tipo I; pero no expresa osteocalcina, ni osteonectina, ni forma mineral óseo en cultivo. Esta línea se propone como un buen modelo para el estudio de efectos mediados por hormonas y diversos compuestos químicos en osteoblastos maduros [20].

La línea MC3T3-E1, no transformada, es un modelo de pre-osteoblasto que puede diferenciarse en cultivo. La línea MC3T3-E1 es un tipo de células que expresan diferentes genes y marcadores osteoblásticos en función del tiempo de cultivo, pasando secuencialmente por los estadios de proliferación, diferenciación y mineralización. Además, provee un sistema adecuado para examinar los procesos de formación de la matriz extra-celular y las respuestas a diferentes hormonas, fármacos y metabolitos durante el desarrollo y la formación ósea. Esta línea de células, en su fase proliferativa, tiene una morfología fibroblástica y crece en monocapas, tiene la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, diferentes marcadores específicos y mineralizar la matriz extra-celular formando una hidroxiapatita madura *in vitro* [21].

Estudios previos han demostrado que el cultivo de estas células en un medio suplementado con β -glicerolfosfato 5 mM y ácido ascórbico 140 μ M, induce su progresión a través de etapas de desarrollo muy similares a las observadas en cultivos primarios de osteoblastos. Este modelo *in vitro* refleja en gran medida los procesos de desarrollo del hueso *in vivo* [22,23].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Otra línea tumoral que se ha utilizado para los estudios de proliferación es Caco-2, la cual desarrolla características morfológicas y funcionales de enterocitos normales cuando se cultivan en condiciones adecuadas [24]. Esta línea celular de tumor humano es interesante para observar los efectos de compuestos tóxicos o deletéreos. Previamente se han realizado sobre esta línea trabajos de inhibición de proliferación celular mediada por compuestos de vanadio [25].

Para obtener más datos sobre la toxicidad de los compuestos sobre células tumorales, también se realizan ensayos con células macrófagos murinos RAW 264.7 sobre los cuales también existen antecedentes de estudios con complejos de vanadio(IV) [25]. Es una línea interesante para ser estudiada dado la gran participación de estas células en procesos inflamatorios y numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer. Reconocen también, además de las alteraciones en el ciclo celular que explican la proliferación descontrolada de esas células, una base inflamatoria, por lo que es interesante ver el efecto de los nuevos compuestos sobre estos macrófagos.

Por lo tanto estas líneas celulares resultan modelos útiles sobre los cuales se podría observar los efectos biológicos *in vitro* de los compuestos de vanadio relevantes a este Trabajo de Tesis.

1.3.6.2.1 Cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron realizados en la Cátedra de Bioquímica Patológica de la Universidad Nacional de La Plata, por el equipo de trabajo de los Dres. Susana Etcheverry y Daniel Barrio, de la referida cátedra.

Las líneas celulares fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Después de 3 a 5 días -tiempo necesario para que lleguen a subconfluencia, las células se cosecharon usando tripsina-EDTA en buffer fosfato salino (PBS) para re-suspenderlas. Una fracción de células se diluyó 1:10 en DMEM con

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

10 % FBS para continuar el cultivo y la otra fracción se utilizó para realizar los experimentos.

Las células se colocaron en placas de 24 ó 48 pocillos, a una densidad de plaqueo de $2,5 \times 10^4$ células / pocillo.

Luego se cultivaron en DMEM con 10 % FBS hasta llegar nuevamente a la subconfluencia deseada, se lavaron dos veces con DMEM, y se incubaron en DMEM sin suero (para evitar la influencia de los factores de crecimiento propios del suero), en presencia de los complejos de vanadio (cuya acción sobre la proliferación celular se está investigando), de acuerdo con lo requerido para cada ensayo en particular. Para los casos en los que se estudió el efecto de los compuestos de vanadio en los *diferentes estadios de diferenciación*, las células MC3T3-E1 confluentes se incubaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal (10 %), penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$), anfotericina B (0,3 $\mu\text{g/ml}$), ácido ascórbico (25 $\mu\text{g/ml}$) y β -glicerolfosfato (5 mM). Este medio de cultivo se cambió cada dos días.

Cabe aquí una aclaración importante: para estudiar solamente el efecto de un compuesto dado en la proliferación celular de la línea MC3T3-E, no se requiere del agregado de ácido ascórbico y β -glicerolfosfato.

Para favorecer la expresión de la FAL y la síntesis de colágeno tipo I se requiere más tiempo de incubación (aproximadamente una semana o más) y el agregado de ácido ascórbico (25 $\mu\text{g/ml}$) y β -glicerolfosfato (5 mM) que son sustancias requeridas para la diferenciación osteoblástica. Para la mineralización se requieren cultivos a largo plazo (aproximadamente un mes), también con el agregado de ácido ascórbico y β -glicerolfosfato. Por otra parte, la línea UMR106, que es una línea ya diferenciada, no se requiere de estos compuestos.

1.3.6.2.2 Ensayo de proliferación celular

Se estimó la proliferación celular por medio del ensayo mitogénico del cristal violeta con algunas modificaciones [26].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los cultivos se fijaron con glutaraldehído al 5 % en PBS y se colorearon con cristal violeta al 0,5 %. El colorante incorporado por las células se extrajo con buffer glicina / HCl pH=3,0 que contiene 30 % de metanol. El extracto se diluyó adecuadamente con agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm.

Previamente, se demostró que los valores de absorbancia obtenidos con este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas en cámara de Neubauer ($r= 0,897$; $p< 0,001$) [27].

1.3.6.2.3 Estudios morfológicos

1.3.6.2.4 Tinción con Giemsa

Las características morfológicas del citoplasma y el núcleo de las células pueden observarse por medio de una tinción con Giemsa.

Se cultivaron ambas líneas celulares en microplacas de 6 pocillos. Una vez que llegaron a 60-70 % de confluencia, se las incubó con distintas concentraciones de los compuestos de vanadio 24 horas a 37°C.

Posteriormente, se lavaron con PBS y se fijaron 5 minutos con metanol. Luego, se tiñeron 10 minutos con una dilución 1:10 de Giemsa.

Finalmente, las microplacas se lavaron repetidamente con agua y las células fueron observadas bajo microscopio óptico. Las imágenes se registraron con una cámara de fotos adaptada al microscopio.

1.3.6.2.4 Ensayos de citotoxicidad

1.3.6.2.4.1 Captación de rojo neutro

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas de las células y sobre el control del flujo de colorante a través de la misma.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

El ensayo de acumulación lisosomal de rojo neutro (RN) fue realizado de acuerdo a Borenfreund y Puerner [28].

Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células UMR106/pocillo o $1,8 \times 10^4$ células MC3T3-E1 /pocillo).

Los osteoblastos fueron incubados con diferentes concentraciones de complejo por 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire. Luego del tratamiento, el medio fue reemplazado por otro conteniendo 100 µg/mL de colorante RN y las células se incubaron durante 3 horas adicionales. Luego se descartó el medio con colorante y las células fueron lavadas dos veces con PBS (pH=7,4) para remover el RN no incorporado. Posteriormente, los osteoblastos fueron fijados adicionando a cada pocillo 100 µL de etanol 50% (v/v) y ácido acético 1% (v/v) liberando el RN a la solución.

Las microplacas se agitaron durante 10 minutos y se leyó la absorbancia de la solución en un lector de microplacas a 540 nm.

1.3.6.2.4.2 Actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial

El ensayo fue desarrollado por Mosmann [29] siendo modificado en 1986 por François Denizot y Rita Lang [30]. Este ensayo se usa para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales o cultivos primarios de células normales.

Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para formar un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

1.3.6.2.5 Estrés oxidativo

1.3.6.2.5.1 Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)

La generación de ROS se midió espectrofotométricamente mediante la leuco sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123), la cual es oxidada por ROS a la molécula fluorescente rodamina 123.

Las líneas osteoblásticas fueron incubadas con los complejos de vanadio por 24 h. Luego, se lavaron dos veces con solución salina tamponada de Hank (HBSS) y se incubaron 30 min con DHR (1 µg/mL) en HBSS con el fin de permitir el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación. Luego las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 0,1 % Triton-X100.

Los extractos celulares fueron analizados con un espectrofluorómetro Aminco Bowman SPF ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 520 \text{ nm}$), usando como estándar rodamina 0,5 µM [31].

A una alícuota de cada extracto celular se le determinó el contenido total de proteínas por pocillo por el método de Bradford [32] para normalizar los resultados por mg de proteínas.

1.3.6.2.6 Estudios de genotoxicidad

1.3.6.2.6.1 Inducción de micronúcleos

Los micronúcleos, o "tercer núcleo", son fragmentos cromosómicos que normalmente desarrollan envolturas nucleares. Son cuerpos citoplasmáticos que tienen una porción de cromosoma acéntrico (carece de centrómero), o cromosoma entero, que no es llevado al polo opuesto durante la anafase.

Su formación resulta en una célula hija que carece de una parte o de la totalidad de un cromosoma.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Luego de la citoquinesis, una célula hija termina con un núcleo y la otra con un núcleo grande y otro pequeño, esto es, un micronúcleo. Es posible que se forme más de un micronúcleo, también.

El ensayo de micronúcleos (MN) es utilizado como herramienta para evaluar la genotoxicidad de compuestos químicos [33].

Hay varios ensayos de micronúcleos posibles, involucrando diferentes organismos de prueba y tejidos. El ensayo detecta tanto clastógenos como agentes que afecten al huso cromático [33].

El ensayo citogenético para la detección de micronúcleos (CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*) es un método seguro y preciso para la evaluación del daño cromosómico.

Se basa en la utilización de un agente químico, denominado citocalasina-B capaz de impedir la citoquinesis permitiendo la división nuclear proporcionando a las células un aspecto de células binucleadas monodividas. El recuento de micronúcleos se realiza sobre 1.000 células binucleadas [34].

El CBMN se preparó con cultivos en fase *log* de crecimiento. Las células fueron sembradas en cubreobjetos previamente limpios en placas de Petri de 35 mm a una densidad de 3×10^4 células por placa, por 24 horas. Entonces, las células se trataron con diferentes concentraciones de los complejos con citocalasina-B ($4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Luego de 24 horas las células se lavaron y sometieron a condiciones hipotónicas con KCl 0,075% a 37°C por 5 minutos, se fijaron con metanol absoluto a -20°C por 10 minutos y se tiñeron con solución Giemsa 5%. Luego de teñidas las células, los cubreobjetos se secaron al aire y se montaron sobre portaobjetos usando medio Depex para montajes.

Para el ensayo de MN, 1000 células binucleadas (BN) fueron calificadas para cada punto experimental para cada experimento, con los criterios reportados por Fenech [34]: micronúcleos (MNi) de diámetro menor a 1/3 respecto del núcleo principal, no

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

refractables, con tinción de igual o de menor intensidad que para el núcleo principal, sin conexión o enlace con el éste, que no se superponga al núcleo principal, y que presenten límites diferenciables respecto del límite del núcleo principal.

1.3.6.2.6.2 Electroforesis en gel de células individuales (ensayo "cometa")

Existe una gran variedad de bioensayos útiles para evaluar genotoxicidad, entre ellos se encuentra el de electroforesis de células individuales en gel, llamado comúnmente ensayo "cometa", el cual es un método de microscopía de fluorescencia rápido y muy sensible, que permite examinar el daño al ADN en células de forma individual. El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producidos por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados al ser sometidos a electroforesis en gel a un pH ca. 13.

Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la "cola del cometa", entre más larga sea esta porción, mayor será el daño ocasionado al ADN [35,36].

El método utilizado es el reportado por Singh *et al.* [37] con modificaciones menores.

Bajo condiciones alcalinas, las hebras de ADN que contienen rupturas se relajan, pierden el superenrollamiento, se liberan del núcleo y forman la "cola del cometa" en electroforesis en gel.

Para estos experimentos, se siembran 2×10^4 células en placas de 12 pocillos; 24 horas más tarde, se incuban las células con diferentes concentraciones de los complejos. Luego de este tratamiento, las células se suspenden en 80 μ L de agarosa 0,5% de bajo punto de fusión a pH 7,4 e inmediatamente se vierte sobre un portaobjeto al cual se le ha depositado previamente una capa de agarosa 0,5% de punto de fusión normal previamente enfriado en el congelador unos minutos, a efectos de promover una adherencia firme de la segunda capa. Luego de que se han solidificado las capas a 4°C por 5-10 minutos, se sumergen los portaobjetos en solución de lisis helada y

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

recientemente preparada (NaCl 2,5 M, Tris 10 μ M, Na₂EDTA 100 mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) en la oscuridad por 1 hora (4°C), de forma de lisar las células, remover las proteínas celulares y permitir el desenrollamiento del ADN.

Inmediatamente, los portaobjetos se colocan en cubeta electroforética horizontal conteniendo Na₂EDTA 1mM, NaOH 0,3 M (pH 12,7) y se realiza la electroforesis por 25 minutos a 25 V (4°C).

Luego, se neutraliza con una solución Tris-HCl (pH 7,5) y se tiñe con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; medio de montaje Vectashield). Se realizan los análisis de las láminas con microscopio de fluorescencia Olympus BX50 equipado con una combinación adecuada de filtros con objetivo de fluorescencia de 63 X. Las imágenes de las células se analizan con administrador de imágenes Leica IM50 (Imagic Bildverarbeitung AG). Se toma un total de 50 células al azar para cada punto experimental por experimento para determinar el "tail moment" o "momento de la cola" (producto de la longitud de la cola por porcentaje de ADN de la cola) utilizando un programa para evaluar cometa libre (Comet score version 1.5).

Se realizan dos láminas de forma paralela, por duplicado, para cada punto experimental. Los experimentos independientes se repiten dos veces.

1.3.7. Estudios de toxicidad in vivo

1.3.7.1. Prueba FET

Los peces cebra adultos se obtuvieron de una tienda de animales local (La Plata, Argentina) y se mantuvieron a 28 °C en agua de grifo filtrada por carbón, con un fotoperíodo de 14 horas.

Se recogieron los huevos y se conservaron utilizando procedimientos estándar como se indica en la bibliografía [38]. Luego de recolectados y desinfectados, se tienden en microplacas de 24 pocillos, con 1 mL de agua.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

El ensayo se basa en el borrador de la guía OECD para la prueba de Toxicidad de Embriones de Pez (prueba FET: Fish Embryo Toxicity test) [39], que se describe con detalle en la bibliografía [40].

Se seleccionan dieciséis huevos por tratamiento (4 replicados) y se distribuyen en microplacas de 24 pocillos. La prueba comienza con huevos recientemente fertilizados expuestos a concentraciones nominales de 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 y 100 μM de compuestos de vanadio, y se corre por 2 días.

Los embriones se observan bajo un estereomicroscopio (Nikon Corporation, Japón) (aumento utilizado para observaciones 40X).

Los siguientes parámetros fueron considerados como puntos finales apicales: coagulación del huevo, falta de desarrollo del somite, falta de desprendimiento de la cola, falta de latidos cardíacos. La detección de solo uno de ellos basta para considerar muerte del embrión.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Bibliografía

- [1] Keramidas, A.D., Miller, S.M., Anderson, O.P., Crans, D.C., *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8901 (1997)
- [2] Li, L.Z., Xu, T., Wang, D.Q., *J. Chem. Crystallogr.* 34, 585 (2004)
- [3] Tatiersky, J., Pacigová, S., Sivák, Schwendt M., *J. Argent. Chem. Soc.* 97, 181 (2009)
- [4] Curtman, L.J., *Análisis Químico Cualitativo*. Marín M. y Cia., Barcelona (1965)
- [5] Onishi, H. Photometric Determination of Traces of Metals, Part IIB: Individual Metals, Magnesium to Zirconium. En: *Chemical Analysis - A series of monographs on Analytical Chemistry and its applications*, Winefordner, J.D., Kolthoff, I.M. (Eds.), Volume 3, 4th Edition, John Wiley & Sons, New York (1998)
- [6] CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., version 1.171.33.48 (release 15-09-2009 CrysAlis171.NET)
- [7] Sheldrick, G.M., SHELXS-97, Program for Crystal Structure Resolution, University of Göttingen, Göttingen, Germany (1997)
- [8] Sheldrick, G.M., SHELXL-97, Program for Crystal Structures Analysis, University of Göttingen, Göttingen, Germany (1997)
- [9] Srinivasan, R., Jagannathan, N. R., *Acta Crystallogr.* B38, 2093 (1982)
- [10] Baran, E. J., *Química Bioinorgánica, Parte Primera, Capítulo 5: Metodologías y Herramientas de Trabajo empleadas por la Química Bioinorgánica*, p.35, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid (1995)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [11] Brain, G.A., Berry, J.F. *J. Chem. Ed.* 85, 532 (2008)
- [12] Lever, A.B.P., *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam (1968)
- [13] Heinzer, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 11, 831 (1984)
- [14] Chang, T.S. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440 (2009)
- [15] Helms, J. B., Huang L., Price, R., Sullivan, B.P., Sullivan B.A. *Inorg. Chem.* 34, 5335 (1995)
- [16] Barrio, D.A., Etcheverry, S.B., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 677 (2006)
- [17] Stein, G.S., Lian, J.B, *Endocr. Rev.* 14, 424 (1993)
- [18] Canalis, E. *Endocrinology* 116, 885 (1985)
- [19] Lau, K. H., Tanimoto, H., Baylink, D.J., *Endocrinology* 123, 2858 (1988)
- [20] Molinuevo, M.S., Etcheverry, S.B., Cortizo, A.M. *Toxicology* 210, 2-3, 205 (2005)
- [21] Sudo, H., Kodama, H.A, Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S. *J. Cell. Biol.* 96, 191 (1983)
- [22] Barrio, D.A., Etcheverry, S.B *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 677 (2006)
- [23] Quarles L.D., Hartle J.E. (II), Middleton J.P., Zhang J., Arthur J.M., Raymond J.R. *J. Cell. Biochem.* 56,1, 106 (1994)
- [24] Rousset, M. *Biochem.* 68, 9, 1035 (1986)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [25] Yang, X.G., Yang, X.D., Yuan, L., Wang, K., Crans, D.C. *Pharm. Res.* 21, 6, 1026 (2004)
- [26] Okajima, T., Nakamura, K., Zhang H., Ling, N., Tanabe, T., Yasuda, T., Rosenfeld, R. G., *Endocrinology* 130, 2201 (1992)
- [27] Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 145, 97 (1995)
- [28] Borenfreund, E., Puerner, J.A *J. Tiss. Cult. Meth.* 9, 7 (1984)
- [29] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983)
- [30] Denizot, F., Lang, R. *J. Immunol. Methods* 89, 271 (1986)
- [31] Cortizo, A.M., Bruzzone, L., Molinuevo, S., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 145, 89 (2000)
- [32] Bradford, M., *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976)
- [33] Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G.W., Salamone, M.F., *Mutat.Res.-Rev.Genet.* 123, 1, 61 (1983)
- [34] Fenech. M., *Mut. Res.* 1, 35 (1993)
- [35] Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., Patiño, A., *An. Sist. Sanit. Navar.* 28(2), 227 (2005)
- [36] McKelvey-Martin, V.J., Green, M., Schmezer, P., deMeo y Collins, A., *Mutat. Res.* 288, 47 (1993)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[37] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. *Exp. Cell. Res.* 175, 184 (1988)

[38] Westerfield, M., *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, University of Oregon Press, Eugene, 1995.

[39] OECD, *Fish Embryo Toxicity Test*. Organization for Economic Co-Operation and Development, 2006.

[40] Domingues, I., Oliveira, R., Lourenc, O. J., Grisolia, C. K., Mendo, S., Soares, A. M. V. M., *Comp. Biochem. Physiol.* 152, 338 (2010)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Capítulo 2

Complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido

2.1 Introducción

Las reacciones del peróxido de hidrógeno con vanadato han sido, y son, un campo de creciente interés debido a la función de éstos: i) como agentes de transferencia de oxígeno (por ejemplo, hidroxilación y epoxidación de hidrocarburos) [1], ii) para obtener modelos sencillos de las haloperoxidasas dependientes de vanadio que se encuentra en líquenes terrestres y algas marinas [2], iii) por sus propiedades insulino-miméticas [3-5] y iv) antitumorales [6].

La acción insulino-mimética y, aparentemente, la actividad antineoplásica de peroxocompuestos de vanadio se explica, como primer modo de acción, por la inhibición de sitios activos tiol en tirosina-fosfatasa intracelulares [7], aunque son posibles otros efectos adicionales de la acción de los compuestos de vanadio que incluyen intervención de especies reactivas de oxígeno y detoxificación de agentes alquilantes [8].

Sin embargo, a diferencia de los peroxocomplejos, la actividad sobre enzimas de los complejos de vanadio-hidroxilamina parecería ser ejercida a través de un mecanismo no oxidativo [9].

Los aniones peróxido (O_2^{2-}) e hidroxilamido (NH_2O^-), incluyendo sus derivados orgánicos, son isoelectrónicos y muestran un comportamiento similar en la formación de complejos con un ion metálico (complejos con vanadio(V) coordinado "side-on" a grupos hidroxilamido o peroxo, como se muestra en la Fig. 2.1 (página 62) para los complejos mixtos estudiados en este capítulo.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

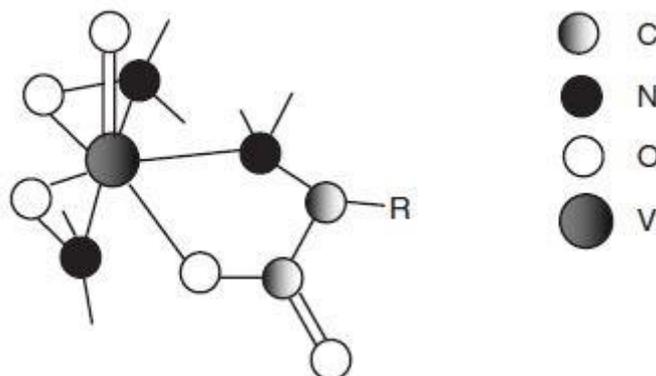


Fig. 2.1: Representación esquemática de la estructura de los complejos $[VO(H_2NO)_2(aa)]$ investigados.

Es un hecho interesante que el ligando presente en la amavadina, un complejo no oxo de vanadio(IV) aislado del hongo *Amanita muscaria*, es un compuesto 1:2 de vanadio y del ácido (S,S)-2,2'-(hidroxiimino)propiónico (el derivado bis(propionato) de la hidroxilamida) [10-15] (ver Fig. 1.1). Este complejo puede fácilmente oxidarse a amavadina de vanadio(V) [16].

También es interesante mencionar, sobre el ligando hidroxilamina, que éste (así como la hidrazina y el anión azida) inhibe la cloroperoxidasa de vanadio recombinante (rVCPO), en forma competitiva y no competitiva.

Los estudios cinéticos sugieren que la rVCPO podría formar un complejo de hidroxilamina, y que la hidroxilamina podría también reaccionar con el complejo de peroxovanadato durante el recambio [17].

Los complejos de vanadio con ligando hidroxilamido, han sido de interés, también, debido a la asimetría del referido ligando, y sumado a este hecho, el modo análogo de coordinarse con respecto a los complejos de vanadio con sus isoelectrónicos ligandos peroxo, porque se han explorado otros aspectos de su química que de otra manera no hubieran sido fácilmente accesibles.

Por ejemplo, la isomerización rotacional que intercambia las posiciones de átomo ligantes de N y O, de unos pocos milisegundos, es mucho más rápida que la hidrólisis, que lleva algunas horas, sugiriendo que no existen en este proceso derivados

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

intermediarios donde el ion metálico está coordinado a un átomo de N (solamente) ó a un átomo de O (solamente), porque de estos complejos debiera esperarse que se disociaran rápidamente, por lo que se sugiere que el vanadato en la especie intermediaria retiene el enlace al N y al O en el proceso rotacional [18].

Además, para agregarse al interés en estos compuestos, también se ha descrito actividad insulino-mimética en los mismos, tanto *in vitro* como *in vivo*; por ejemplo, estudios en animales han demostrado que el complejo bis(N,N-dimetil)-hidroxamidohidroxo-oxovanadio(V) es tan eficaz respecto de sus propiedades insulino-miméticas como el bis(maltolato)-oxovanadio(IV) [19] (este último es el complejo de oxovanadio(IV) más extensamente estudiado por su potencial como fármaco insulino-mimético [20]).

Aunque tanto el peróxido de hidrógeno como la hidroxilamina (y sus derivados) reaccionan con el vanadato para formar complejos de forma VL y VL₂ (L = ligando) de manera espontánea, se encuentra que el peróxido de hidrógeno reacciona con formación de compuestos de los cuales no se han reportado complejos hidroxilamido equivalentes: como veremos, el complejo K₃[VO(O₂)₂CO₃]·H₂O ha sido reportado pero el análogo de ligando hidroxilamido no se ha podido sintetizar con éxito (en este Trabajo de Tesis), ni hay referencias de su síntesis en la bibliografía hasta la fecha.

Una notable diferencia entre estos ligandos es que mientras que el peróxido coordina al vanadato con y sin ligandos adicionales, el grupo V(H₂NO) requiere ser estabilizado por ligandos soportes , a pesar de ser "electrónicamente similares", entendiéndose por ésto de que son ligandos de electronegatividad efectiva y polarizabilidad similares, lo cual se ha inferido de estudios de RMN de ⁵¹V realizados a complejos de ligandos peroxo e hidroxilamidos análogos [21].

Se han realizado algunos trabajos de síntesis y estudio de complejos de ligando hidroxilamido con otros metales (por ejemplo, de molibdeno, estudiando la inhibición del crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en función del pH [22]) pero los datos existentes sobre complejos de este ligando con otros metales e inclusive el vanadio, son aún son muy escasos.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

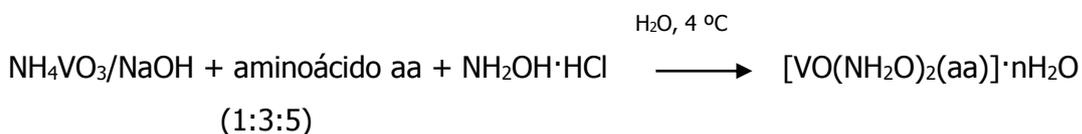
Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

En conclusión, las propiedades de los peroxocomplejos de vanadio han sido bastante extensamente estudiadas, pero no ocurre lo mismo con los complejos de vanadio del ligando análogo hidroxilamido, por lo que en este Trabajo de Tesis se ha intentado aportar más información de interés a ese respecto, especialmente en cuanto a su espectroscopía vibracional y actividad biológica *in vitro* e incluso *in vivo*. Para ello se estudiaron algunos compuestos particulares ya sintetizados en algunos casos, y otros nuevos obtenidos en este trabajo.

2.2 Síntesis de los complejos

Se sintetizaron los complejos por modificación de técnicas descritos en trabajos previamente publicados [23,24]. En algunos casos, la síntesis fue exitosa variando ligeramente las relaciones molares entre los reactivos respecto de la indicada en las técnicas originales (ver Tabla 2.2).

El esquema general de la síntesis, como ya se ha visto en el capítulo 1, es:



Se obtienen rendimientos de los complejos en torno a 20-60%.

En la Tabla 2.1 (página 65) se explicitan los complejos con los que se trabajó.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Complejo N°	Fórmula molecular
1	[VO(NH ₂ O) ₂ (val)]
2	[VO(NH ₂ O) ₂ (leu)]·H ₂ O
3	[VO(NH ₂ O) ₂ (ile)]
4	[VO(NH ₂ O) ₂ (ser)]
5	[VO(NH ₂ O) ₂ (phe)]
6	[VO(NH ₂ O) ₂ (trp)]
7	[VO(NH ₂ O) ₂ (cys)]
8(*)	[VO(NH ₂ O) ₂ (met)]
9(**)	[VO(NH ₂ O) ₂ (gly)]·H ₂ O
10(**)	[VO(NH ₂ O) ₂ (thr)]
11(*)	[VO(NH ₂ O) ₂ (ala)]·2H ₂ O
12(*)	[VO(NH ₂ O) ₂ (imid) ₂]Cl

Tabla 2.1: Complejos sintetizados en este Trabajo de Tesis.

Referencias a las abreviaturas: val: valina, leu: leucina, ile: isoleucina, ser: serina, phe: fenilalanina, trp: triptófano, cys: cisteína, met: metionina, gly: glicina, thr: treonina, ala: alanina, imid: imidazol. El compuesto con ligando imidazol se sintetizó para facilitar el estudio espectroscópico; no pertenece a la serie [VO(NH₂O)₂(aa)]·nH₂O.

De los doce complejos con los que se trabajó, siete son originales de este Trabajo de Tesis (complejos 1-7), y cinco (complejos 8-12) que ya habían sido sintetizados por otros investigadores [23,24].

Los complejos 8, 11 y 12 fueron sintetizados según los procedimientos publicados en el trabajo de Keramidas *et al.* [23] (complejos marcados con asterisco en la Tabla 2.1) y los complejos (9) y (10) siguiendo la técnica publicada en el trabajo de Li y colaboradores [24] (los complejos marcados con doble asterisco en la Tabla 2.1). Estos trabajos y los complejos allí reportados han sido el punto de partida para la obtención de los nuevos compuestos sintetizadas en el presente Trabajo de Tesis.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

En la Tabla 2.2 se indican las cantidades de los reactivos utilizados: NH_4VO_3 , NaOH, L-aminoácido, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, y el volumen de agua utilizado en la síntesis de cada uno de los complejos, así como la relación molar de aminoácido (aa)/ NH_4VO_3 .

Complejo	NH_4VO_3 (mmol)	$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (mmol)	L-aminoácido (mmol)	NaOH (mmol)	Volumen de <i>agua</i> (mL)	Relación aa/ NH_4VO_3
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$	0,89	4,39	1,96	3,01	3,5	2,2
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{leu})]\cdot\text{H}_2\text{O}$	1,02	5,43	2,76	5,82	7,5	2,7
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ile})]$	0,68	3,59	1,38	3,77	5,0	2,0
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ser})]$	1,04	5,43	3,08	5,82	7,5	2,9
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{phe})]$	1,08	5,31	3,11	5,82	7,5	2,9
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{trp})]$	0,68	3,59	1,38	3,77	5,0	2,0
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{cys})]$	1,04	5,39	3,10	5,78	7,5	2,9
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$	1,02	5,39	3,10	5,78	7,5	3,0
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]\cdot\text{H}_2\text{O}$	8,79	17,1	24,07	29,75	35,0	2,7
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{thr})]$	1,02	4,95	2,90	5,78	7,5	2,8
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ala})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,36	5,46	3,60	4,98	7,5	2,6
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{imid})_2]\text{Cl}$	8,19**	21,65	26,43*	-	15,0	3,2*

Tabla 2.2: Cantidades de reactivo, volumen de agua, y relación molar aminoácido- NH_4VO_3 utilizadas en la síntesis de los complejos. * se debe a que el imidazol sustituye al aminoácido en este complejo. ** se utilizó NaVO_3 en lugar de NH_4VO_3 (ver texto).

Con respecto al complejo (12) es de aclarar que se intentó sintetizarlo repitiendo básicamente la técnica descrita por Crans y otros [23] pero sin resultados exitosos. Sin embargo, el complejo pudo obtenerse en forma satisfactoria utilizando una cantidad equivalente de NaVO_3 a la indicada de NH_4VO_3 , manteniendo las mismas relaciones molares de los otros reactivos y las concentraciones de los mismos.

Detallando más la técnica muy general expuesta anteriormente (ver Capítulo 1 de esta Tesis), se prepara primero la solución de NH_4VO_3 y NaOH en el volumen indicado en la Tabla 2.2, calentando a aproximadamente 50 °C y agitando con agitador magnético hasta la disolución completa. Luego se quita de la plancha de calentamiento y se continúa agitando a temperatura ambiente por unos minutos para remover el exceso de NH_3 (en la práctica, hasta no percibir el olor característico amoniacal en la solución).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

A continuación, se agrega, poco a poco, el aminoácido agitando con varilla para favorecer la humectación y la disolución concomitante, y se lleva a baño de agua y hielo (0 °C) con agitación magnética, dejándose alcanzar el equilibrio térmico, agregando más hielo picado y agua a la cubeta, si fuere necesario. Se añade entonces el clorhidrato de hidroxilamina, de a poco (se agrega una porción, se disuelve con agitación, se vuelve a agregar otra porción, y así sucesivamente), hasta disolver completamente la cantidad necesaria, se deja unos minutos agitándose en el baño y a continuación se mide el pH con tirilla indicadora y se lleva al refrigerador. Siempre se mantiene una mezcla de agua y hielo enfriando al vaso que contiene al sistema.

Los sólidos se separan de las soluciones por filtración por gravedad o vacío y se lavan con agua destilada fría y etanol frío (previamente se mantienen en congelador un tiempo suficiente).

Los sólidos obtenidos pueden secarse en desecador a vacío con sílica-gel pero se han obtenido mejores resultados respecto de la estabilidad de los complejos en el tiempo empleando un agente deshidratante potente como H₂SO₄ concentrado, ya que trazas de humedad pueden conducir a la rápida descomposición de los complejos, a veces de un día al otro.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.3 Caracterización analítica

2.3.1 Análisis elemental

En la Tabla 2.3 se indican los rendimientos y los resultados del análisis elemental.

Complejo	Peso fórmula	% C	% H	% N	Rendimiento (%)	Color del sólido
[VO(NH ₂ O) ₂ (val)]	247,13	23,80 (24,30)	5,02 (4,89)	16,88 (17,00)	68	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (leu)]·H ₂ O	279,15	26,55 (25,82)	6,92 (6,50)	15,15 (15,05)	23	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (ile)]	261,12	28,25 (27,57)	5,47 (6,13)	16,78 (16,09)	36	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (met)]	279,19	21,22 (21,51)	5,10 (5,05)	14,87 (15,05)	48	incolore
[VO(NH ₂ O) ₂ (phe)]	295,17	36,25 (36,62)	5,05 (4,78)	14,10 (14,24)	34	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (trp)]	334,17	36,59 (35,91)	3,75 (4,19)	12,99 (12,57)	39	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (cys)]	251,13	14,58 (14,35)	4,18 (4,01)	16,15 (16,73)	38	grisáceo

Tabla 2.3: Resumen de los resultados de análisis elemental de C, N e H para los complejos sintetizados, noveles, de este Trabajo de Tesis. En negrita, los contenidos porcentuales medidos de los elementos; entre paréntesis, los contenidos porcentuales teóricos de los elementos; los rendimientos de síntesis y el color de los compuestos.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[VO(NH ₂ O) ₂ (ser)]	235,07	15,37 (15,33)	4,54 (4,29)	17,74 (17,87)	46	blanco
[VO(NH ₂ O) ₂ (gly)]·H ₂ O	223,07	11,06 (10,77)	4,20 (4,52)	19,10 (18,84)	53	incoloro
[VO(NH ₂ O) ₂ (thr)]	249,10	19,15 (19,29)	4,95 (4,86)	16,58 (16,87)	45	incoloro
[VO(NH ₂ O) ₂ (ala)]·2H ₂ O	255,11	15,00 (14,12)	5,40 (5,53)	16,75 (16,47)	59	incoloro
[VO(NH ₂ O) ₂ (imid) ₂]Cl	302,55	23,75 (23,82)	4,18 (3,99)	27,34 (27,77)	51	blanco

Tabla 2.3 (continuación): Resumen de los resultados de análisis elemental de C, N e H para los complejos sintetizados en este Trabajo de Tesis, ya descritos en otros trabajos. En negrita, los contenidos porcentuales de los elementos medidos, entre paréntesis, los contenidos porcentuales teóricos de los elementos, los rendimientos de síntesis y el color de los compuestos.

2.3.1.1 Discusión de resultados

Si bien los procedimientos de síntesis son relativamente sencillos, el éxito de la síntesis se consigue después de un arduo trabajo en algunos casos, a veces de "ensayo y error", ya que al parecer, existen variables de las cuales depende el éxito de la síntesis que no están definidas aún, y la reproducibilidad de la síntesis es dependiente fundamentalmente de la sistemática de trabajo del operador más que de seguir las instrucciones del procedimiento: por ejemplo, el tiempo que transcurre entre que se añaden las sucesivas porciones de los reactivos, entre otros factores indeterminados (como podría ser el tiempo que transcurre entre disolución del aminoácido en la solución inicial y el agregado de NH₂OH·HCl, o el tiempo de agitación de las soluciones, o cuánto tiempo permanezcan en la heladera las soluciones antes de separarse el sólido, etc.).

Estos factores se han intentado mantener controlados dentro de la medida de lo posible. Lamentablemente, se encuentra que los procedimientos de síntesis requieren de cierta componente "artesanal" para lograr obtener un producto con buen rendimiento y con pureza aceptable.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Las soluciones de "metavanadato" en agua son una mezcla compleja de mono y oligovanadatos cuya composición depende del pH, la concentración global de vanadio y la fuerza iónica del medio [25]. El vanadio en estado de oxidación (V) forma vanadato y derivados de vanadato en solución acuosa. A pH en torno a la neutralidad, el vanadato monomérico existe principalmente como una mezcla en equilibrio del monoanión H_2VO_4^- y el dianión HVO_4^{2-} , predominando el primero [26]. Estas especies de vanadio serían las principales que aportan el vanadio (V) necesario para la formación de complejos. A pH neutro estos aniones se oligomerizan, por lo que el control del pH es esencial a los efectos de obtener especies de vanadio en solución suficientemente lábiles como para permitir la entrada de los ligandos y obtener éxito en las síntesis.

Con respecto a los reactivos fuente de vanadio, se ha utilizado NH_4VO_3 porque es más soluble que el NaVO_3 . La disolución de este último es más dificultosa y sin presencia de NaOH se requieren volúmenes muy grandes de disolvente, lo cual podría afectar negativamente la concentración de las especies que se requiere introducir en la esfera de coordinación si no se cambian concomitantemente las relaciones molares de los aminoácidos.

Sin embargo, la obtención del complejo de imidazol (a diferencia de lo que se manifiesta en el trabajo original de Keramidas *et al.* [23]) ha sido imposible luego de muchos intentos utilizando NH_4VO_3 , pero sí fue posible con NaVO_3 . Esto sugiere que el reactivo y la química en solución acuosa del "metavanadato" es un factor muy importante en el éxito de la síntesis como se ha sugerido anteriormente y si bien con NH_4VO_3 y NaOH se tendría, al final, una solución de metavanadato de sodio, alguna diferencia evidentemente hay entre uno u otro camino de síntesis.

Al respecto, se maneja la siguiente hipótesis: posiblemente el NH_3 disuelto esté interfiriendo en el complejamiento, compitiendo como ligando con el aminoácido por ser pequeño y buen nucleófilo, al utilizar mayores volúmenes de agua para disolver el NaVO_3 , se reduciría la concentración relativa de este ligando indeseado, favoreciéndose la entrada del imidazol a la esfera de coordinación (para lo cual deberá adicionarse en

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

una relación molar mucho mayor que con respecto a sus homólogos aminoácidos, obsérvese que la relación molar imidazol/ NaVO_3 es más alta que las demás en la Tabla 2.2).

Por ello se enfatiza sobre la conveniencia de eliminar en lo posible el exceso de NH_3 en la solución por medio de la agitación, antes de agregar el aminoácido. Este podría ser un factor determinante para ligandos débiles como en el caso del ligando imidazol. Si no funciona utilizando como reactivo el $\text{NH}_4\text{VO}_3/\text{NaOH}$, se debe recurrir al NaVO_3 con las importantes desventajas mencionadas: la insolubilidad de la sal, los volúmenes de disolvente a utilizar, y la incidencia que podrían tener en particular, estas dos características, para una síntesis adecuada dentro del complejo sistema con el que se trabaja.

Deberá considerarse, además, que en el tiempo que se mantienen a las soluciones en reposo en la heladera, para cristalizar, podrían suceder fenómenos en solución que podrían afectar el rendimiento de los complejos obtenidos.

Esto se manifiesta bastante claramente en el complejo de cisteína; rápidamente se produce la precipitación del complejo, y si se separa el sólido inmediatamente entonces los resultados de análisis elemental tienen buena concordancia con los valores esperados, pero al separar una segunda cosecha, los resultados son completamente diferentes a los de la primera, evidenciándose de esta manera cambios en el sistema de reacción dependientes del tiempo.

Con respecto a la pureza de los productos, se destaca que en algunos casos los resultados del análisis elemental demuestran que se obtienen con elevada pureza pero en otros casos no se ha podido obtener compuestos tan puros como sería deseable, ya que son necesarias concentraciones relativamente grandes de aminoácido para obtener el complejo precursor deseado pero esto lleva a que la cantidad de aminoácido (especialmente para los de alto peso molecular) sea bastante grande como para disolver en un pequeño volumen de solución. Esto conlleva el riesgo de no disolver completamente al aminoácido o de la co-precipitación de éste junto al complejo.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Sumado esto al hecho que no se puede utilizar un volumen excesivo de agua para lavar el sólido, a riesgo de quedarse sin complejo, conduce a que el compuesto, al final, mantenga un cierto grado de impurificación muy difícil de ser eliminado completamente.

La recristalización por evaporación a temperatura de heladera se ha intentado, pero en todos los casos ensayados, el compuesto se descompone perceptiblemente (cambios de coloración de solución clara a oscura) a partir de un cierto tiempo y de una importante evaporación, que si se deja mantener, se terminan obteniendo un cristalitos negro-oscuros con unos brillos iridiscentes muy extraños.

Como es fácil suponer, a temperaturas no mucho mayores a la ambiente, la descomposición se hace evidente mucho más prontamente.

Específicamente, en el caso de los aminoácidos isoleucina (ile), leucina (leu), fenilalanina (phe) y triptófano (trp), la precipitación del complejo es inmediata al agregado de hidroxilamina. Esta precipitación conduce a la obtención de un sólido amorfo y con un alto grado de impurificación (ésta se evidencia en los espectros FT-IR).

En el caso de los complejos de ile y leu este hecho se ha manifestado en la imposibilidad de obtener complejos más puros que los de los resultados que se muestran. En el caso de los aminoácidos más hidrófobos (por ejemplo los dos mencionados anteriormente, ile y leu), la co-precipitación se hizo evidente cuando se inspeccionó el sólido, luego que se lava y se seca, y se observa bajo lupa que hay "más de un tipo" presente. Un paliativo de este suceso podría ser la necesidad de lavar ulteriormente el complejo impurificado con mayor número de porciones de agua con la concomitante disminución de los rendimientos, y lamentablemente, la pureza aún con pequeñas cantidades obtenidas sigue sin ser la mejor.

La estabilidad aparente de los complejos en sus soluciones acuosas parecería ser de regular a buena, por lo menos en lo que respecta a realizarse algunos trabajos ulteriores con los compuestos. La descomposición se manifiesta en una solución muy

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

oscura, y la aparición de los cristalitas oscuros mencionados cuando se llega a un volumen de solución muy pequeño o a sequedad.

A temperatura ambiente, la descomposición de las soluciones de los complejo se hace evidente por un cambio de color de la solución de amarillo pálido a amarillo más intenso y en la medida que pasan los días, se incrementa la coloración amarilla intenso, hasta llegar a ser muy oscura.

Con respecto a la estabilidad de los sólidos, hay algunos muy estables y otros altamente inestables aún en un medio fuertemente desecante (por ejemplo el complejo de alanina, que se ha observado se mantiene pocos días en el secador con ácido sulfúrico).

La luz común parece no afectarlos, pero aparecen muy sensibles a la humedad atmosférica y/o al oxígeno del aire, lo cual exige mantenerlos en desecador a vacío con agente desecante.

En la Tabla 2.4 (página 74) se expone el tiempo expresado en semanas (muy aproximado) que se pueden mantener algunos de los complejos en el desecador a vacío. Se puede tomar como criterio cualitativo que el complejo no haya experimentado cambios de color o aspecto, y que no aparezcan cambios en las bandas más representativas de los espectros FT-IR.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Complejo	Estabilidad observada de los complejos sólidos en desecador sobre H ₂ SO ₄ (semanas)
[VO(NH ₂ O) ₂ (val)]	>10
[VO(NH ₂ O) ₂ (cys)]	>3
[VO(NH ₂ O) ₂ (ala)] .xH ₂ O*	≤1
[VO(NH ₂ O) ₂ (gly)].H ₂ O	<5
[VO(NH ₂ O) ₂ (met)]	>6
[VO(NH ₂ O) ₂ (thr)]	<1

Tabla 2.4: Estabilidad observada, en estado sólido, de algunos complejos sintetizados.

*No se puede afirmar que la especie que se conserva al cabo del tiempo indicado sin descomponer sea la mono o dihidratada.

Obviamente, los tiempos de la Tabla 2.4 son a modo ilustrativo, ya que el grado de humedad que puedan llevar los complejos cuando se los deja en el desecador puede ocasionar incluso que estén descompuestos al día o dos siguientes, posiblemente la actividad de agua favorezca la hidrólisis del compuesto. Por este motivo, los mejores resultados se han obtenido cuando los complejos fueron secados muy cuidadosamente, apretándolos y disgregándolos entre papeles de filtro antes de guardarlos en el desecador.

Además, para los complejos que tienen moléculas de agua de cristalización, es razonable pensar que la pérdida de alguna molécula de agua puede llegar a propiciar la descomposición del complejo. Esto se ha observado en el complejo de alanina, que es extremadamente inestable en desecador a vacío con sílica-gel como desecante (la mayor parte de las veces soporta un día o dos) pero con ácido sulfúrico como desecante sobrevive hasta una semana o incluso más. Por análisis elemental se sugiere que la estructura con una molécula de agua de cristalización es la que se encuentra al cabo de varios días en desecador con H₂SO₄. En la Tabla 2.4, se escribió "xH₂O" (*) porque no se puede asegurar que la especie que se mantiene al cabo del tiempo

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

indicado sin descomponer sea la mono o dihidratada, pero hay evidencias que sería la primera de estas especies.

Sin perjuicio de lo anterior, los resultados de análisis elemental no son tan buenos como se esperaría para este complejo, y se atribuye no a que se obtiene impuro, sino a la fórmula asignada. El análisis termogravimétrico podría ser de utilidad para estudiar más este fenómeno.

2.4 Caracterización estructural en estado sólido

2.4.1 Estructura cristalina de los complejos

2.4.1.2 Determinación de la estructura cristalina de $[\text{VO}(\text{NH}_2)_2(\text{DL-metioninato})]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Visto que la información estructural para este tipo de complejos es relativamente escasa, se realizaron esfuerzos para obtener monocristales adecuados para estudios de difracción de rayos X.

Generalmente, los cristales obtenidos son extremadamente pequeños o de poca calidad, pero luego de numerosos intentos se ha logrado obtener un número de monocristales pequeños y bien formados del complejo de oxovanadiohidroxilamidometioninato, $[\text{VO}(\text{NH}_2)_2(\text{DL-met})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, con metionina racémica como especie quelante, obtenido siguiendo la síntesis general que se ha descrito para los complejos de la serie.

Se ha confirmado la pureza del compuesto por análisis elemental (Carlo Erba model EA 1108, experimental C= 20,05%; H= 5,45%; N= 14,00%; S= 10,70%; calculado para $[\text{VO}(\text{NH}_2)_2(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NS})]\cdot\text{H}_2\text{O}$: C= 20,19%; H= 5,38%; N= 14,13%; S= 10,78%) y por espectroscopía IR y Raman (sección 2.4.2 de este Trabajo de Tesis).

La Fig. 2.2 (página 76) muestra un diagrama ORTEP [27] del complejo, y en la Tabla 2.5 (página 78) se presentan los datos cristalográficos y los detalles del refinamiento

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

de la estructura para el complejo. En la Tabla 2.6 (página 79) se muestran las distancias de enlace intra-moleculares y los ángulos en torno al centro metálico.

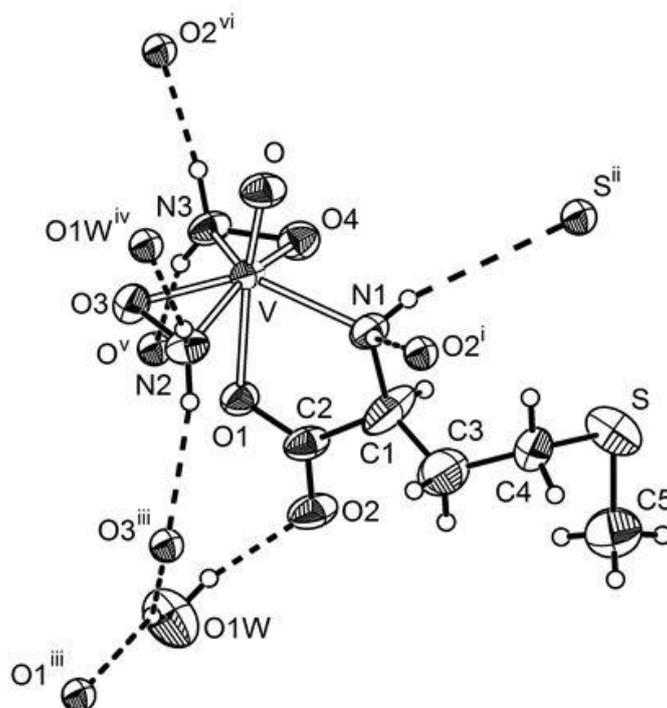


Fig. 2.2: Vista ORTEP del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{DL-metioninato})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ donde se han identificado los átomos que no son de H y sus elipsoides de desplazamiento a nivel de probabilidad del 50%. Los enlaces metal-ligando se indican como líneas gruesas vacías, los enlaces de H como líneas discontinuas y los demás enlaces como líneas llenas. Las operaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes son: i) $(x-1, y, z)$, ii) $(-x, -y+1, -z)$, iii) $(x, -y+3/2, z-1/2)$, iv) $(x-1, -y+3/2, z+1/2)$, v) $(x+1, y, z)$, and vi) $(x, y, z+1)$.

Los datos cristalográficos y resultados del refinamiento de la estructura se resumen en la Tabla 2.5 (página 78).

El enlace $\text{V}=\text{O}$ del vanadato ($d(\text{V}=\text{O})=1,601(3) \text{ \AA}$) define el eje de un entorno bipiramidal pentagonal en torno al catión vanadio(V). El ion metálico se encuentra ecuatorialmente coordinado en un modo denominado "side-on" a dos aniones

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

hidroxilamido a través de sus dos átomos de O [distancias V-O 1,908(3) y 1,918(3) Å] y los átomos de nitrógeno (distancias V-N 2,028(4) y 1,989(4) Å). Los demás sitios de coordinación ecuatoriales y axiales están puenteados por la molécula de aminoácido el cual funciona como ligando bidentado a través de su átomo de nitrógeno ($d(\text{V-N})=2,120(4)$ Å) y un átomo de oxígeno carboxílico ($d(\text{V-O})=2,175(3)$ Å).

Los átomos coordinados al vanadio ecuatoriales yacen sobre un plano (desviación *rms* de 0,015 Å de los átomos respecto de un plano definido por cuadrados mínimos) y en el borde de una forma similar a una sombrilla china con una suave pendiente opuesta a la dirección del enlace VO (ángulos O(carboxyl)-V-L(ecuat) en el rango de 76,0(1) a 84,1(1)°).

La conformación y las distancias intramoleculares y ángulos concuerdan bien con aquellas de unos pocos otros complejos similares de este tipo que se han caracterizado estructuralmente: $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ [23], $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ser})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ [23], $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ala})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [24] y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{thr})]$ [24].

Resulta interesante mencionar que mientras en estos últimos compuestos los dos ligandos hidroxilamidos están coordinados con los átomos de nitrógenos *cis* a los ligando ecuatorial remanente [23,24], en el presente caso, estos ligandos NH_2O^- están en posición *trans* respecto al otro ligando ecuatorial (ver Fig. 2.2). Se ha sugerido que los requerimientos estéricos del otro ligando ecuatorial dirigen la orientación de los grupos hidroxilamido [23,24].

El sólido se encuentra estabilizado adicionalmente por una red compleja de enlaces de hidrógeno intermoleculares N-H...O (distancias N...O de 2,85 y 3,11 Å), N-H...S (distancia N...S = 3,68 Å), N-H...Ow (distancia N...Ow = 2,77 Å) y Ow-H...O (distancias Ow...O de 2,85 y 3,14 Å).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Fórmula empírica	C ₅ H ₁₆ N ₃ O ₆ SV
Peso-fórmula	297.21
Temperatura (K)	295(2)
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
<i>a</i> , Å	5,8138(2)
<i>b</i> , Å	27,3496(8)
<i>c</i> , Å	7,5663(2)
β , grados	103,059(3)
Volumen (Å ³)	1171,97(6)
Dc (g.cm ⁻³)	1,684
Z	4
Tamaño del cristal (mm)	0,158 x 0,078 x 0,067
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	8,967
<i>F</i> (000)	616
Rango θ de recolección de datos	3,23 a 74,07°-7
Rangos de índices	-7 $\leq h \leq$ 4, -34 $\leq k \leq$ 33, -7 $\leq l \leq$ 9
Reflexiones recogidas	7321
Reflexiones independientes	2379 [R(int) = 0,0263]
Reflexiones observadas [$I \geq 2\sigma(I)$]	2037
Datos/restricciones/parámetros	2379/4/178
Bondad de ajuste en F ²	1,071
Índices R finales [$I \geq 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0609, wR2 = 0,1668
Índices R finales (todos los datos)	R1 = 0,0683, wR2 = 0,1715
Mayor diferencia pico y hueco	1,837 y -0,873 e Å ⁻³

Tabla 2.5: Datos cristalográficos y detalles del refinamiento de la estructura para el complejo [VO(NH₂O)₂(DL-met)]·H₂O.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

N(1)-V	2.120(4)	N(2)-V	2.027(4)
N(3)-V	1.990(4)	O-V	1.600(3)
O(1)-V	2.175(3)	O(3)-V	1.907(3)
O(4)-V	1.919(3)		
O-V-O(3)	100.78(16)	O-V-O(4)	101.71(16)
O(3)-V-O(4)	133.53(14)	O-V-N(3)	104.71(17)
O(3)-V-N(3)	93.30(16)	O(4)-V-N(3)	41.64(15)
O-V-N(2)	97.22(17)	O(3)-V-N(2)	41.80(14)
O(4)-V-N(2)	161.02(16)	N(3)-V-N(2)	133.42(17)
O-V-N(1)	95.56(16)	O(3)-V-N(1)	133.17(17)
O(4)-V-N(1)	84.00(18)	N(3)-V-N(1)	124.36(18)
N(2)-V-N(1)	92.97(18)	O-V-O(1)	170.40(15)
O(3)-V-O(1)	82.19(13)	O(4)-V-O(1)	82.27(13)
N(3)-V-O(1)	84.11(14)	N(2)-V-O(1)	78.83(14)
N(1)-V-O(1)	76.05(13)		

Tabla 2.6: Distancias de enlace [\AA] y ángulos ($^\circ$) en torno al vanadio(V) en el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{DL-met})] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

2.4.2 Espectroscopía vibracional IR y Raman

2.4.2.1 Consideraciones previas

A pesar de la escasa información espectroscópica existente sobre hidroxilamido-complejos [28,29], en base a la información espectroscópica disponible de la molécula de hidroxilamina en fase gaseosa ([30,31] y las referencias allí dadas) es posible realizar un análisis vibracional del ligando hidroxilamido en los complejos.

Si se asume simetría de grupo puntual C_s para la molécula libre de hidroxilamina $\text{H}_2\text{N-OH}$ [30,31], la representación irreducible para los modos vibracionales de la misma pueden representarse con $\Gamma_{C_s} = 6A' + 3A''$, y todas esas especies presentan actividad infrarroja y Raman [29]. Las frecuencias de vibración experimentales observadas, en cm^{-1} son las siguientes: $\nu(\text{OH})$, $\nu_1(A')=3650$; $\nu_s(\text{NH}_2)$, $\nu_2(A')=3294$; $\delta(\text{NH}_2)$, $\nu_3(A')=1604$; $\delta(\text{NOH})$, $\nu_4(A')=1353$; $\rho_w(\text{NH}_2)$, $\nu_5(A')=1115$; $\nu(\text{NO})$, $\nu_6(A')=895$; $\nu_{as}(\text{NH}_2)$, $\nu_7(A'')=3358$; $\rho_r(\text{NH}_2)$, $\nu_8(A'')=1294$ y $\tau(\text{OH})$, $\nu_9(A'')=386$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Luego de la formación del ligando hidroxilamido y la coordinación al centro metálico tres de estas vibraciones (ν_1 , ν_4 y ν_9) desaparecen y solo queda identificar los modos vibracionales relacionados a los grupos $-\text{NH}_2$ y el estiramiento N-O.

Los espectros FTIR de los compuestos son relativamente complejos, especialmente debido a las bandas de los aminoácidos ligados. Por el contrario, los espectros Raman son relativamente simples, presentando un número reducido de bandas de fuerte y mediana intensidad entre 1200 y 100 cm^{-1} .

Como referencia, se muestra el espectro FTIR de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ en la Fig. 2.3, mientras que el espectro Raman del mismo complejo se muestra en la Fig. 2.4 (página 81), en el rango espectral $1200 - 100\text{ cm}^{-1}$.

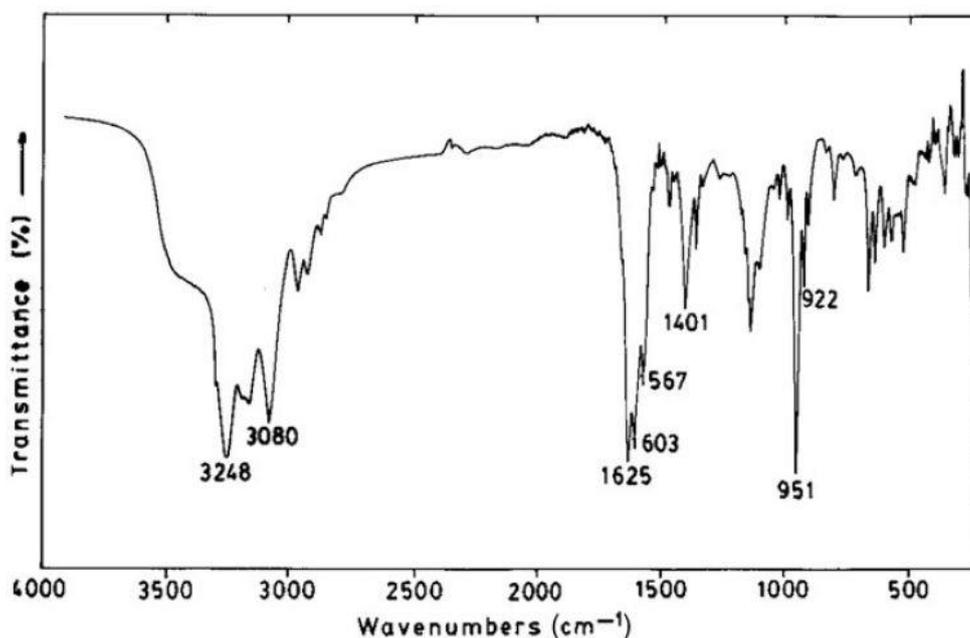


Fig. 2.3: Espectro FT-IR del complejo $[\text{VO}(\text{H}_2\text{NO})_2(\text{val})]$. Se muestran las posiciones de las bandas más características en el rango $4000-400\text{ cm}^{-1}$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

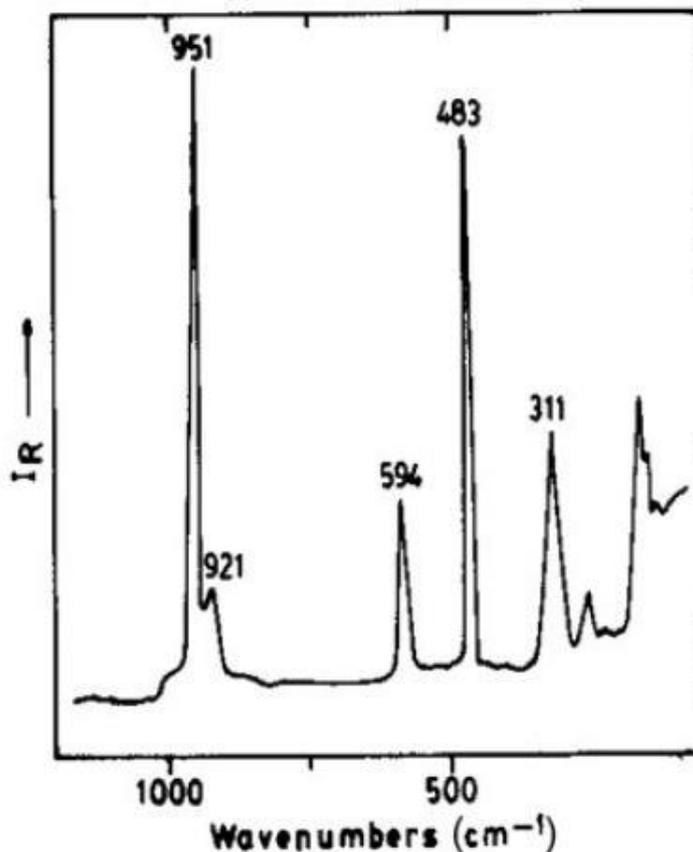


Fig. 2.4: Espectro FT-Raman del complejo [VO(H₂NO)₂(val)] en el rango espectral 1200 – 100 cm⁻¹; se han identificado las posiciones de las bandas más características.

Como resulta muy difícil intentar asignar en forma completa todas las bandas IR y Raman registradas, se ha intentado identificar aquellas relacionadas al ligando NH₂O⁻, del grupo VO³⁺ y algunas de las más importantes y características de cada uno de los ligandos aminoácidos coordinados (y del ligando imidazol en el caso del complejo [VO(NH₂O)₂(imid)₂]Cl).

Para este propósito, se han medido los espectros FT-IR de los aminoácidos libres, utilizando referencias estándar [29, 32, 33] y también datos de otros estudios realizados por nuestros grupos de trabajo sobre complejos de aminoácidos simples [34-38].

Además, para comparación, se utilizaron datos espectrales de sales de hidroxilamonio, como ser [NH₃OH]Cl y [NH₃OH]₂SO₄ [39].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.4.2.2 Resultados

En las Tablas 2.7-2-9 se presentan las asignaciones propuestas de los espectros FT-IR de los once complejos sintetizados que contienen ligandos aminoácidos.

gly	ala	val	leu	ile	Asignación
3296 mi	3246 mi	3248 mi	3263 i	3276 mi	$\nu(\text{NH}_2)$ aa
3114 i	3087 i	3158 m	3187i	3185 m	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ aa
2980 i	3051 i	3080 i	3057 i	3082 s	$\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$ hd
-	2968 i	2964 m	2855m	2967 i	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
1639 mi	1626mi	1625mi	1604 mi	1630mi	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1585 mi	1604 mi	1603 i	1583 i	1610 m	$\delta(\text{NH}_2)$ aa
1557 i	1552 h	1567 d	1560 h	1561 m	$\delta(\text{NH}_2)$ hd
-	1463 m	1465 d	1470 m	1459 m	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ hd
1396 mi	1402 i	1401 m	1407 i	1401 i	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1360 m	1354 m	1356 d	1347 m	1353 m	$(\text{CH}_2)+ \nu(\text{C}-\text{CO}_2)$
1137 i	1132 h	1134 m	1135 m	1121 m	$\nu(\text{C}-\text{C})$
1103 mi	1113 mi	1100 m	1091 m	1094 m	$\nu(\text{CN})$
972 mi	959 mi	951 mi	940 mi	952 mi	$\nu(\text{VO}^{3+})$
922 i	937 i	922 m	925 mi	940 mi	$\nu(\text{N}-\text{O})$
640 i	647 i	658 m	662 m	647 m	$\rho(\text{CO}_2)+ \rho(\text{NH}_2)$
595 i	581 m	595 m	584 m	588 m	$\nu(\text{V}-\text{O})$

Tabla 2.7: Asignaciones de las bandas más características de complejos de fórmula general $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$, con aa: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina (posición de las bandas en cm^{-1}).

Referencias: mi: muy fuerte; i: fuerte; m: medio; d: débil; h: hombro; aa: aminoácido
hd: hidroxilamido.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

phe	ser	thr	trp	Asignación
			3407 mi	v(NH)trp
	3390 i	3423 i		v(OH)
3243 m	3245 mi	3244 mi	3204 m	v(NH ₂) aa
3187 i	3166 d	3156 m	3122 d	v _{as} (NH ₂) hd
3066 m	3068 i	3059 m		v _s (NH ₂) hd
2928 m			2940 d	v _{as} (CH ₂)
1610 mi	1650 mi	1633 mi	1626 mi	v(C=O)
1582 i	1607 m	1595 m	1592 m	δ(NH ₂) aa
1560 h	1551 d	1550 h	1540 h	δ(NH ₂) hd
1454 d	1448 d		1457 m	δ _{tijeras} (CH ₂)
1408 i	1402 m	1405 i	1401 i	v(C-O)
1345 d	1366/1342 d	1355 d	1344 m	(CH ₂)+v(C-CO ₂)
1146 m	1141 m	1130 i	1137 i	v(C-C)
1097 m	1093 m	1090 m	1094 m	v(CN)
956 m	963 mi	963 m	952 mi	v(VO ³⁺)
926 i	928 m	933 m	926 m	v(N-O)
660 d	652 i	641 m	641 m	ρ(CO ₂)+ ρ(NH ₂)
585 d	593 m	595 d	578 d	v(V-O)

Tabla 2.8: Asignaciones de las bandas IR más características de complejos de fórmula general [VO(NH₂O)₂(aa)], con aa: fenilalanina (phe), serina (ser), treonina (thr), triptófano (trp). La posición de las bandas se indica en cm⁻¹.

Referencias: mi: muy fuerte; i: fuerte; m: medio; d: débil; h: hombro; aa: aminoácido hd: hidroxilamido.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

cys	met	Asignación
3243 i	3235 mi	$\nu(\text{NH}_2)$ aa
3175 d	3195 d	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$ hd
3050 i	3045 i	$\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$ hd
	2960 d	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
1626 mi	1625 mi	$\nu(\text{C-O})$
1561 i	1603 i	$\delta(\text{NH}_2)$ aa
	1578 h	$\delta(\text{NH}_2)$ hd
1390 mi	1418 i	$\nu(\text{C-O})$
1353 d	1356 m	$(\text{CH}_2)+\nu(\text{C-CO}_2)$
	1176 d	$\nu(\text{C-C})$
1096 i	1116 m	$\nu(\text{CN})$
961 mi	957 mi	$\nu(\text{VO}^{3+})$
930 i	942 mi	$\nu(\text{N-O})$
	770 d	$\nu(\text{C-S-C})$
701 d		$\nu(\text{C-S})$
643 i	661 d	$\rho(\text{CO}_2)+\rho(\text{NH}_2)$
585 m	585 d	$\nu(\text{V-O})$

Tabla 2.9: Asignaciones de las bandas IR más características de complejos de fórmula general $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$, con aa: cisteína (cis) y metionina (met). La posición de las bandas se indica en cm^{-1} .

Referencias: mi: muy fuerte; i: fuerte; m: medio; d: débil; h: hombro; aa: aminoácido
hd: hidroxilamido.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.4.2.3 Discusión de resultados

En vista de los resultados obtenidos es posible ensayar una descripción general del comportamiento espectroscópico, por lo que caben las siguientes consideraciones:

- El rango de mayores frecuencias está dominado, en todos los casos, por las frecuencias de estiramiento de los grupos NH_2 . Por comparación con la posición encontrada para estas vibraciones en complejos de aminoácidos de Cu(II) [34-38], se sugiere que las vibraciones NH_2 de los grupos amino de los aminoácidos están localizados a mayores energías que aquellos de los grupos hidroxilamido. Para estos grupos se puede generalmente asignar la vibración simétrica y antisimétrica. Sin embargo, no se puede excluir una mezcla parcial de las vibraciones de ambos grupos NH_2 especialmente en el rango espectral por encima de 3200 cm^{-1} . En el caso del triptófano esta región de altas frecuencias es más complicada por la presencia adicional de la banda intensa $\nu(\text{NH})$ del anillo pirrólico.
- En el caso de los complejos de glicina, alanina y leucina, los cuales contienen agua de cristalización, la región de alta frecuencia muestra algunas características adicionales y ensanchamiento de bandas, obviamente relacionadas a los estiramientos $\nu(\text{O-H})$. Es interesante que el modo $\delta(\text{H}_2\text{O})$ que se espera en la región de $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, no introduce modificaciones importantes en este rango espectral, probablemente debido a su poca intensidad en comparación con otras bandas encontradas en esta región.
- El otro rango espectral de interés es en torno a 1600 cm^{-1} . En esta región se podría esperar las vibraciones de estiramiento de carbonilo del aminoácido y los modos de deformación de tijera de los grupos NH_2 . En esta región se observan generalmente tres características, como se ve en la Fig. 2.3 (página 80) para el caso de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$; esto es, una banda de intensidad muy fuerte, una banda de intensidad fuerte y una banda débil o un hombro. Por otro lado, se

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

puede identificar en todos los casos una banda asignable a la vibración de estiramiento $\nu_s(\text{C-O})$ la cual involucra al átomo de oxígeno enlazado al metal.

- Para identificar la posición correcta del modo $\nu(\text{C=O})$ en la banda triplete, se ha comparado las vibraciones del carboxilato que se encuentra en los aminoácidos libres con las de los respectivos complejos. La comparación se muestra en la Tabla 2.10. Los aminoácidos "libres" existen como *zwitteriones* en el estado cristalino; de este modo, se esperarían dos vibraciones para la parte carboxilato presente en estos sistemas, $\nu_s(\text{COO}^-)$ y $\nu_{as}(\text{COO}^-)$. Luego de la coordinación, se esperaría un decrecimiento de la frecuencia de una de estas bandas debido a la formación de un enlace V-O y se esperaría también un aumento de la otra porque un doble enlace C-O se reconstruye parcialmente. Como se ve de los datos de la Tabla 2.10 (página 87), la banda asignada a la vibración $\nu_s(\text{COO}^-)$ comparada con la misma en el aminoácido "libre", sufre un pequeño desplazamiento a menores frecuencias en todos los casos excepto para el complejo de la metionina, de acuerdo con la participación de un enlace C-O en la unión al metal. Contrariamente y como es de esperar, la otra banda se desplaza a mayor frecuencia luego de la formación del complejo.

En conclusión, este análisis claramente apoya las asignaciones, el cual está relacionado a la componente de mayor energía del triplete mencionado arriba de la vibración $\nu(\text{C=O})$.

- Para los dos modos de deformación del grupo NH_2 , se ha aplicado el mismo criterio que en la región de estiramiento, esto es decir, que se ha asumido que los modos de deformación de la parte NH_2 de hidroxilamido se encuentra a menor energía que su homóloga del aminoácido, y la intensidad de la banda del NH_2 del hidroxilamido es apreciablemente menor a la del aminoácido.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Aminoácido/Complejo	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	$\nu_s(\text{COO}^-)$
glicina	1608	1412
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})] \cdot \text{H}_2\text{O}$	1639	1396
alanina	1605	1413
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ala})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1626	1402
valina	1586	1426
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$	1625	1401
leucina	1583	1410
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{leu})] \cdot \text{H}_2\text{O}$	1604	1407
isoleucina	1602	1417
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ile})]$	1630	1401
fenilalanina	1562	1411
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{phe})]$	1610	1408
serina	1597	1412
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{ser})]$	1650	1402
treonina	1626	1417
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{thr})]$	1633	1405
triptofano	1590	1412
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{trp})]$	1626	1401
cisteína	1623	1399
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{cys})]$	1626	1390
metionina	1583	1409
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$	1625	1418

Tabla 2.10: Comparación de las vibraciones de estiramiento simétrico (ν_s) y antisimétrico (ν_{as}) del carboxilato (en cm^{-1}) de los aminoácidos "libres" y en los complejos investigados.

- Algunas otras bandas características de aminoácidos como las vibraciones de los modos del metilo CH_3^- y metileno CH_2^- , $\nu(\text{C}-\text{C})$ y $\nu(\text{CN})$ han podido ser identificadas. En el caso de aminoácidos que contienen azufre, las bandas de estiramientos características de los modos $\nu(\text{C}-\text{S})$ (cys) y $\nu(\text{C}-\text{S}-\text{C})$ (met)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

también han podido ser asignadas. En el caso de cisteína, la vibración $\nu(\text{S-H})$ no fue encontrada, lo cual concuerda con su usual baja intensidad en el espectro IR [32,40]. En los dos complejos con residuos de hidroxilo (serina, treonina), las vibraciones de estiramiento $\nu(\text{O-H})$ pudieron ser identificadas con claridad, en concordancia con el hecho que este grupo no está involucrado en la coordinación.

- La banda de estiramiento N-O del hidroxilamido se espera que caiga entre 920 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} en complejos metálicos, con independencia del modo de coordinación del ligando $\text{NH}_2\text{-NO}$ [31]. En el caso de sales de hidroxilamonio cristalinas se encuentra en 998 cm^{-1} en $[\text{NH}_2\text{OH}]\cdot\text{HCl}$ y a 1000 cm^{-1} en $[\text{NH}_3\text{OH}]_2(\text{SO}_4)$ [39]. En los complejos investigados, la banda relacionada a esta vibración siempre se encuentra muy cercana al estiramiento de intensidad fuerte $\nu(\text{VO}^{3+})$ en forma de una banda de intensidad media o fuerte entre 922 cm^{-1} y 942 cm^{-1} .
- La vibración de estiramiento V-O del VO^{3+} constituye una de las bandas IR más fuertes y es de este modo, sencilla de identificar. En los complejos investigados se encuentra entre 940 cm^{-1} y 972 cm^{-1} , indicando la presencia de un enlace relativamente fuerte metal-oxígeno. La posición de esta banda es comparable a aquellas encontradas en complejos oxodiperoxovanadato [41,42] y en complejos de oxovanadio(V) de derivados de la "oxina" [43]. En los casos para los que se dispone de información estructural [23,24] las distancias de enlace V-O en los complejos son comparables, y por consiguiente, las diferencias encontradas se resuelven en detalles del empaquetamiento de los complejos en el estado sólido (ver también [24]).
- Finalmente, todos los complejos investigados presentan una banda característica en el rango espectral entre 578 y 595 cm^{-1} que se asigna al estiramiento V-O que corresponde al ligando hidroxilamido. En el caso de los peroxocomplejos de vanadio(V), las bandas V-O que involucran al ligando peroxo están en rangos comparables [42-45] y rangos similares también se encuentran en el caso de peroxocomplejos del cromo(IV) [46].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

De forma de dar sostén adicional a algunas de las asignaciones es interesante investigar el comportamiento vibracional del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{imid})_2]\text{Cl}$.

En este caso la ausencia de ligando aminoácido podría simplificar algunos de los rangos espectrales más interesantes. Los datos correspondientes se muestran en Tabla 2.11 (página 90) y el espectro en la Fig. 2.5 a continuación.

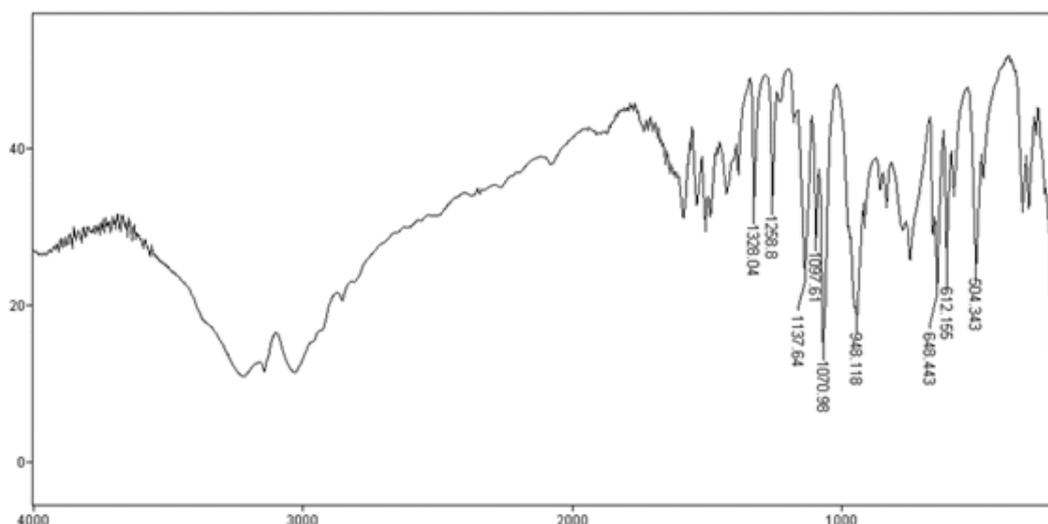


Fig. 2.5: espectro del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{imid})_2]\text{Cl}$ (KBr) en el rango $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

La mayoría de las vibraciones características fueron asignadas sobre la base de datos espectrales conocidos [47]. Los estiramientos NH_2 del ligando hidroxilamido se ven como una única banda a 3220 cm^{-1} , algo más alta que la posición en los complejos de aminoácidos.

Es interesante notar que la correspondiente vibración $\delta(\text{NH}_2)$ se encuentra como una banda relativamente débil, sobrepuesta al modo fuerte del anillo imidazol, pero también confirmando el comportamiento de este modo en los complejos de las series de aminoácidos.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Posición de la Banda	Asignación
3220 mi	$\nu(\text{NH}_2)$ hd
3143 i	$\nu(\text{CH})$ imid
3031 mi	$\nu(\text{NH})$ imid
1590 d	$\delta(\text{NH})$ imid
1534 d	$\delta(\text{NH}_2)$ hd
1502 d	ν_{anillo} imid
1431 m	$\delta(\text{NH})$ imid
1327 m	$\delta(\text{CH})$ imid
1259 m, 1231 d	ν_{anillo} imid
1138 i	$\delta(\text{NH})$ imid
1097 i, 1069 mi	$\delta(\text{CH})$ imid
973 h	ν_{anillo} imid
953 mi	$\nu(\text{VO}^{3+})$
919 d	$\nu(\text{N-O})$ hd
750 m	$\gamma(\text{CH})$ imid
661 h, 650 m	$\tau(\text{NH})$ imid
614 m	$\gamma(\text{NH})$ imid
585 d	$\nu(\text{V-O})$

Tabla 2.11: Asignaciones de las bandas IR más características del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{imid})_2]\text{Cl}$ (las posiciones de las bandas están cm^{-1}).

Referencias: mi: muy fuerte; i: fuerte; m: medio; d: débil; h: hombro; imid: imidazol
hd: hidroxilamido.

El estiramiento $\nu(\text{VO}^{3+})$ se encuentra en el mismo rango que en los demás complejos y también aparece en este caso como una de las bandas IR más intensas. Además, la banda $\nu(\text{V-O})$ se encuentra en el rango esperado mientras que la banda $\nu(\text{N-O})$ es algo más débil que en los complejos de aminoácidos.

El comportamiento del modo anillo localizado a 936 cm^{-1} en el imidazol "libre", el cual es muy sensible a la complejación [48], es muy interesante también. Como es usual [48-50], luego de la formación del complejo, la banda se desplaza hacia mayor energía

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

y muestra una disminución importante de intensidad. En el caso en cuestión se observa como un hombro a 973 cm^{-1} , del lado de mayor energía de la banda fuerte del estiramiento $\nu(\text{VO}^{3+})$.

Finalmente, se ha realizado el análisis de los mejores siete espectros Raman que se pudieron obtener de los complejos investigados. Los datos y las asignaciones propuestas de las bandas se presentan en la Tabla 2.12 (página 92).

Prácticamente, todos estos espectros son dominados por dos bandas Raman fuertes. Una de ellas, generalmente la más fuerte, se relaciona al estiramiento $\nu(\text{VO}^{3+})$. La segunda de éstas se encuentra en torno a 480 cm^{-1} y se discutirá luego. El estiramiento $\nu(\text{N-O})$ se encuentra en todos ellos, pero es una señal débil del lado de menor energía de la banda $\nu(\text{VO}^{3+})$.

La posición del estiramiento $\nu(\text{V-O})$ está claramente confirmada por su presencia en los espectros Raman como una banda de intensidad mediana con una energía comparable a la encontrada en los espectros IR. En las regiones relacionadas con las vibraciones del $-\text{NH}_2$, no se encuentran señales, de acuerdo con su esperada muy débil intensidad en el efecto Raman [32].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

val	leu	ile	Phe	thr	cys	met	Asignación
951 mi	945 mi	947 mi	957 mi	963 mi	956 mi	963 mi	v(V-O ³⁺)
921 d	928 d	920 d	922 d	935 d	935 d	945 h	v(N-O)
594 m	585 md	594 m	591 m	595 m	582 m	578 m	v(V-O)
483 mi	486 mi	486 mi	482 mi	487 mi	480 mi	475 mi	v(V-N)
311 i		311 i	307 i	300 i	314 i	316 i	(?)
Otras Bandas							
358 d	429 m	820 d	1603 m	803 d	2666 m	770 d	ver texto
254 d	346 m	675 d	1582 d	342 w	700 d	730 m	
162 i	334 m	285 d	1031 m	166 m	509 d	650 d	
	166 i	130 m	1001 mi		160 m	253 i	
			773 d				
			620 m				
			307 i				
			243 d				
			183 i				

Tabla 2.12: Asignaciones de las bandas Raman más características de complejos [VO(NH₂O)₂(aa)] con aa: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, cisteína y metionina, y localización de otras bandas Raman destacadas.

Referencias: mi: muy fuerte; i: fuerte; m: medio; d: débil; h: hombro.

La banda Raman muy fuerte a 480 cm⁻¹, la cual no tiene contraparte IR en ninguno de los espectros, podría asignarse tentativamente a la vibración de estiramiento v(V-N) del ligando hidroxilamido.

Respecto de la otra banda Raman relativamente fuerte que se encuentra en torno a 310 cm⁻¹, su origen es incierto, pero puede ser relacionado a uno de los movimientos V-O de los aminoácidos enlazados [29].

Para algunos de los complejos obtenidos, los espectros Raman contienen alguna otra información interesante. En el espectro de [VO(NH₂O)₂(phe)], las bandas relativamente intensas que se encuentran a 1031 y 1011 cm⁻¹ seguramente se relacionan a los modos δ(CH₂) del anillo fenilo, mientras que otros modos del anillo producen las bandas a 1603 y 1582 cm⁻¹ [32,33]. En el caso del complejo de la cisteína la vibración

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

$\nu(\text{S-H})$ se observa como una banda de mediana intensidad a 2666 cm^{-1} , mientras que el correspondiente modo $\nu(\text{C-S})$ se observa como una señal débil a 700 cm^{-1} . Para el complejo de metionina el estiramiento $\nu(\text{CSC})$ puede también identificarse en el espectro Raman, a 770 cm^{-1} .

Otras señales que se encuentran a menores frecuencias no son fáciles de asignar, dado que generalmente se trata de movimientos intensos acoplados que incluyen modos de esqueleto o de deformación y vibraciones externas (de la "red" cristalina).

2.5 Estudios en solución acuosa de los complejos

2.5.1 Espectros UV-Vis de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$

Por su importancia para trabajos planificados de estudio de la actividad biológica de los compuestos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido, resultó interesante estudiar el comportamiento en solución acuosa de estos complejos, para caracterizarlos aún más y en forma adicional, para evaluar su estabilidad en solución. Para ello se eligieron dos compuestos que en estado sólido mostraron estabilidad mucho más prolongada que otros complejos de la serie; el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ demora más de seis meses en descomponerse (cambios de color, cambios significativos de bandas de espectros FT-IR) y el compuesto $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ se descompone luego de unos 45 días de almacenamiento (en desecador, sobre H_2SO_4 concentrado).

Respecto de la estabilidad de estos compuestos en solución acuosa, trabajos de espectroscopía UV-Vis y de ^1H y ^{51}V RMN previamente reportados de complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$ estructuralmente similares (con aa= gly o ser) muestran que a pesar de que se pueden identificar en solución acuosa tres isómeros de idéntica estequiometría, ambos complejos retienen en solución la misma esfera de coordinación y fórmula que en el estado sólido [23]. Ambos complejos con ligandos aminoácidos no resultaron muy lábiles en solución. Además, estudios en solución sugieren que los isómeros que se forman luego de la disolución son de idéntica estequiometría y son consistentes con la coordinación "side-on". Por lo tanto, se espera que los complejos

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

análogos con metionina y valina como co-ligandos en lugar de glicina y serina pudieran comportarse en forma similar a sus homólogos anteriormente reportados [23].

De hecho, los espectros UV-Vis de soluciones acuosas de estos complejos, cubriendo un rango de concentraciones representativo (25 μM - 100 μM) fueron similares a los reportados para los complejos de glicina y serina [23]:

Bandas UV-Vis (H_2O) para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$: **320 h; 270 h, 210 nm**

Bandas UV-Vis (H_2O) para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$: **330 h; 275 h; 209 nm**

(Referencia: h, hombro)

Durante un período de 48 horas de reposo a 37°C no se detectaron cambios en los espectros para el complejo de valina y a partir de 24 horas ya se empieza a detectar cambios en el espectro para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$.

2.6 Estudios de actividad biológica in vitro

2.6.1 Inhibición de la FAL (fosfatasa alcalina) intestinal

Como ya se ha mencionado anteriormente, el vanadio posee diferentes propiedades biológicas y farmacológicas, entre ellas la actividad inhibitoria de fosfatasas, la cual fue de las primeras descritas [43-45].

De los modelos utilizados para estudiar y comparar los efectos biológicos del vanadio, los enzimáticos son sistemas simples que permiten estudiar las propiedades inhibitorias de complejos de vanadio (especialmente en este caso complejos de vanadio(V)) sobre la fosfatasa alcalina intestinal.

Para realizar estos estudios, se seleccionaron tres complejos, la síntesis de uno de ellos ya ha sido anteriormente reportada [16] - complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$ - en tanto que los otros dos complejos son nuevos y emergentes de este Trabajo de Tesis : $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Para comparación de la actividad inhibitoria de la FAL intestinal mediada por los complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido, se tomó al NaVO_3 .

Se han seleccionado estos complejos en función de los siguientes criterios:

- Buena estabilidad de los complejos en solución acuosa.
- Adecuada solubilidad de los complejos en solución acuosa.
- El tamaño de los ligandos (para ellos se elige un aminoácido con cadena lateral pequeña, gly, y otros dos complejos con cadena lateral más grande, una de ellas polar (met) y la otra, apolar (val)).
- Conveniencia para otros estudios de actividad biológica *in vitro* que se planificaron.

La metodología de estos ensayos se ha detallado anteriormente en el Capítulo 1 (1.3.6.1 Actividad inhibitoria de la fosfatasa alcalina intestinal).

Es importante destacar que además de ensayar la actividad inhibitoria de la FAL intestinal producida por los compuestos en estudio, se ha realizado el ensayo para los aminoácidos involucrados –glicina, valina, metionina- y la hidroxilamina NH_2OH , a efectos de comprobar que estos ligandos aislados no tienen actividad inhibitoria de la FAL intestinal *per se*. Se verificó que los aminoácidos dados y la hidroxilamina, tal como se esperaba, no inhiben la enzima en las condiciones de trabajo especificadas. Por lo tanto se infiere sin lugar a error que la inhibición de la FAL se debe a la acción específica de los complejos sobre el sitio activo de la enzima.

Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes gráficos (Figs. 2.6-2.9, páginas 96-98). La respuesta se evalúa a través del porcentaje de actividad enzimática respecto del basal (sin agregado de complejo).

Cada punto marcado en las curvas se obtiene de promedio de triplicados de la medida de absorbancia para cada nivel de concentración del complejo.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Para evaluar los efectos inhibitorios de vanadio(V) se analizó su potencia (definida como la concentración de vanadio necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de FAL) para: vanadato de sodio, y los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$.

2.6.1.1 Resultados

- Complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$

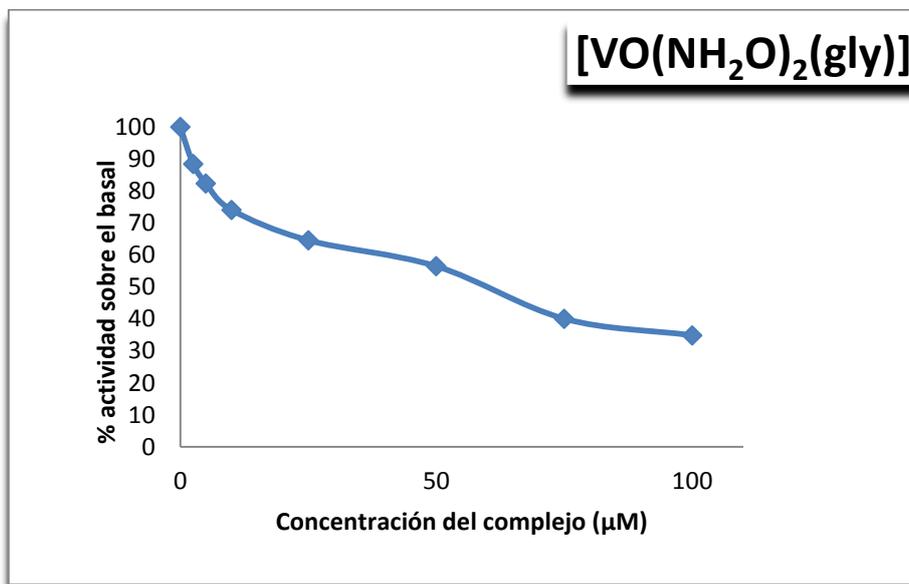


Fig. 2.6: Curva dosis-respuesta para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$. La respuesta se evalúa a través del porcentaje de actividad enzimática respecto del basal (sin agregado de complejo).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- Complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$

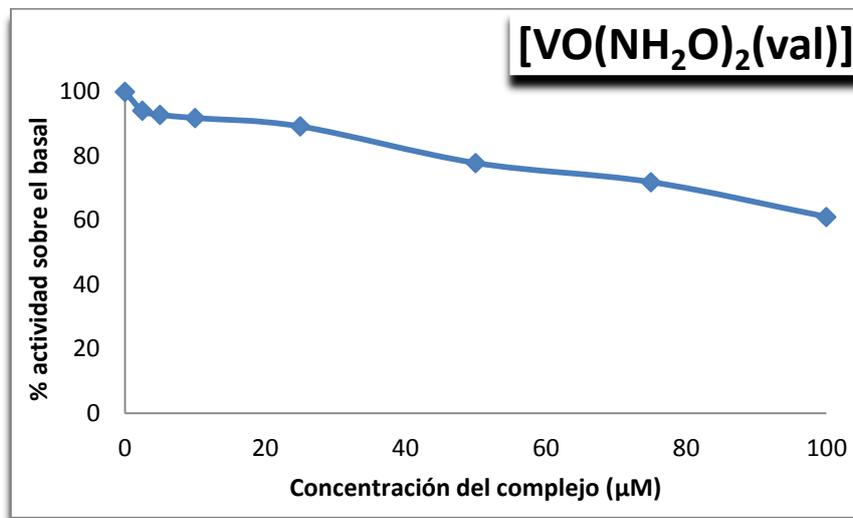


Fig. 2.7: Curva dosis-respuesta para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$. La respuesta se evalúa a través del porcentaje de actividad enzimática respecto del basal (sin agregado de complejo).

- Complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$

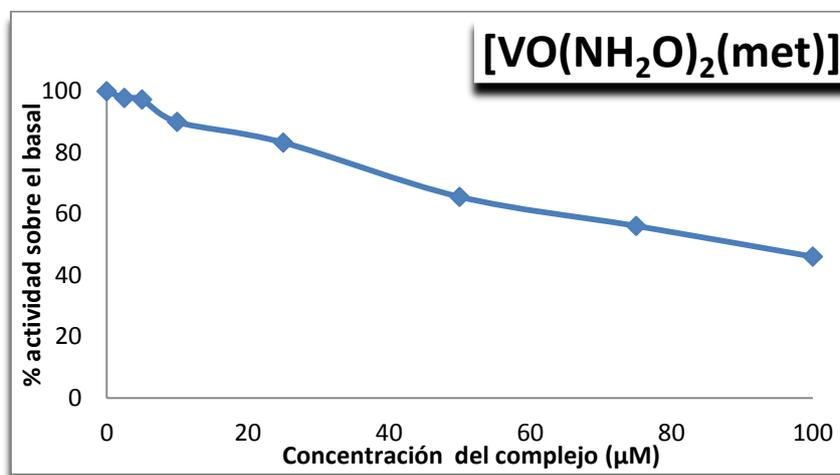


Fig. 2.8: Curva dosis-respuesta para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$. La respuesta se evalúa a través del porcentaje de actividad enzimática respecto del basal (sin agregado de complejo).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- Inhibidor: NaVO_3

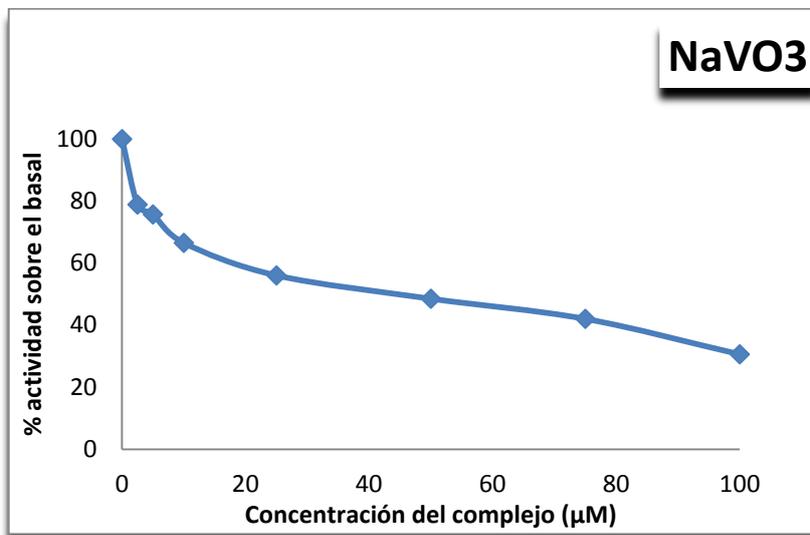


Fig. 2.9: Curva dosis-respuesta para vanadato de sodio. La respuesta se evalúa a través del porcentaje de actividad enzimática respecto del basal (sin agregado de complejo).

De las curvas obtenidas se calculan los IC_{50} a partir de un ajuste exponencial de los datos de cada experimento. Dichos valores de IC_{50} se muestran en la Tabla 2.13, el IC_{50} en cada caso es un valor semicuantitativo a efectos de comparación y discusión.

Inhibidor	IC_{50} (μM)
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$	60
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$	>100
$[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$	86
NaVO_3	50

Tabla 2.13: Potencia inhibidora de la FAL a través del valor de IC_{50} para los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$ (con aa= gly, val, met).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

De la Tabla 2.13 (página 98) se desprende que el orden de inhibición sería:



2.6.1.2 Discusión de resultados

La FAL es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de mono-ésteres de fosfato. Hay de diferentes orígenes, y se ha encontrado que en ocasiones, la potencia inhibidora del vanadio y sus complejos podría mostrar algunos cambios según el origen de la enzima [4].

El vanadato es isoestructural e isoelectrónico con el fosfato, y es inhibidor competitivo de la FAL [51-53]. A diferencia del anión fosfato, el ion vanadato puede formar especies pentacoordinadas estables [54] permitiendo de este modo funcionar como un análogo del estado de transición tanto para la adquisición de fosfato como su liberación en la reacción catalítica de la FAL. El complejo pentacoordinado trigonal bipyramidal de vanadato en el sitio activo de la FAL se ha descrito a través de una estructura cristalina obtenida por rayos X de alta resolución refinada a 1.9 Å [55].

Por otra parte, sería necesario considerar a estos compuestos como verdaderamente inhibidores solo si su efecto se verifica mientras que éstos se mantienen intactos en el momento de la interacción con el sitio activo de la enzima, permitiéndose que haya algún cambio en la esfera de coordinación o en la geometría del complejo después de la interacción con éste [4]. Esta suposición, como ya se ha mencionado anteriormente, es válida en este caso ya que se ha demostrado a través de estudios de espectroscopía UV-Vis que a 37°C estos compuestos mantienen su esfera de coordinación intacta en solución [23].

Se ha demostrado [56] que la potencia de la inhibición enzimática de los compuestos de vanadio varía considerablemente dependiendo de los ligandos soporte. Aumentar el tamaño de los ligandos introduciendo sustituyentes decrece significativamente el efecto inhibidor sobre la actividad de la FAL [57]. Estas suposiciones resultan válidas para los experimentos que se han realizado en este Trabajo de Tesis. El ion vanadato,

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

pequeño, es el inhibidor más potente. Le sigue el complejo de glicina, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$, con ligando aminoácido más pequeño y por lo tanto, menos voluminoso, con una potencia inhibidora similar, aunque ligeramente menor. Por último, el complejo de valina, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$, es el más voluminoso debido a la cadena lateral del aminoácido valina, con una potencia inhibidora más débil.

De los resultados obtenidos, se concluye que la actividad inhibidora es dosis-dependiente y posiblemente relacionada a efectos estéricos.

2.6.2 Efectos de complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido sobre la proliferación de osteoblastos UMR106 y MC3T3-E1

Luego de encontrar que el vanadio inhibe la actividad específica de diferentes fosfatasas, se comenzaron a diseñar experimentos *in vitro* con células en cultivo para estudiar y conocer sus efectos biológicos.

Se encontraron diversas propiedades biológicas y farmacológicas del vanadio, entre ellas las más interesantes son su actividad insulinomimética y antitumoral. Un aspecto importante a tener en cuenta, si consideramos administrar vanadio a pacientes con alguna de estas afecciones, es su biodistribución. El vanadio al ser ingerido por los seres vivos se acumula principalmente en el tejido óseo. Por ello, es de gran interés conocer qué tipo de efectos producen el vanadio y sus complejos sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo.

En el presente trabajo se utilizaron dos líneas celulares, UMR106 y MC3T3-E1, para estudiar diferentes efectos biológicos y farmacológicos de los complejos de vanadio(V).

Los trabajos sobre la acción de los complejos de vanadio(V) del tipo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$ sobre la proliferación de células relacionadas al hueso se llevaron a cabo en los laboratorios de la Cátedra de Bioquímica Patológica (UNLP), a cargo de los Dres. Susana Etcheverry y Daniel Barrio.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.6.2.1 Acción antiproliferativa en células osteoblasto-símiles mediada por los compuestos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$

Como parte de un proyecto dedicado a la investigación del comportamiento biológico de los compuestos de vanadio con potenciales aplicaciones terapéuticas en células relacionadas al hueso, se describe entonces los efectos de dos complejos de vanadio(V) con ligandos hidroxilamido y aminoácidos, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ (val = valina y met = metionina).

En las Figs. 2.10 y 2.11 (páginas 102 y 103, respectivamente) se muestra el efecto de los referidos complejos en la proliferación de células osteoblasto-símiles evaluada por el método del cristal violeta.

Como se observa en la Fig. 2.10, en las células MC3T3-E1, línea celular preosteoblástica normal, ambos compuestos causan la inhibición de la proliferación celular de una manera dosis-dependiente a partir de concentración de los compuestos $2,5 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$). Sin embargo, el efecto de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ resultó menos nocivo que para el otro complejo en esta línea celular ($p < 0,01$).

En la Fig. 2.11 se muestra que para las células UMR106, una línea celular tumoral, el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ empieza a inhibir cierta proliferación a partir de $25 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$) mientras que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ se comporta como agente inhibidor en todo el rango de concentraciones ensayado ($p < 0,01$).

Resumiendo, los resultados obtenidos indican una mayor toxicidad y acción deletérea sobre la proliferación de las células para el complejo de metionina. Esta observación está en concordancia con los valores de IC_{50} de ambos complejos en células MC3T3-E1: $10 \pm 3 \mu\text{M}$ para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ vs. $5 \pm 2 \mu\text{M}$ para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$.

En células UMR106, se observó un comportamiento similar con los siguientes valores de IC_{50} : $25 \pm 4 \mu\text{M}$ para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$, y $45 \pm 4 \mu\text{M}$ para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los valores de IC_{50} que muestran los complejos en las dos líneas celulares indican que fueron aproximadamente 4 - 5 veces más tóxicos en los osteoblastos normales que en las células de osteosarcoma.

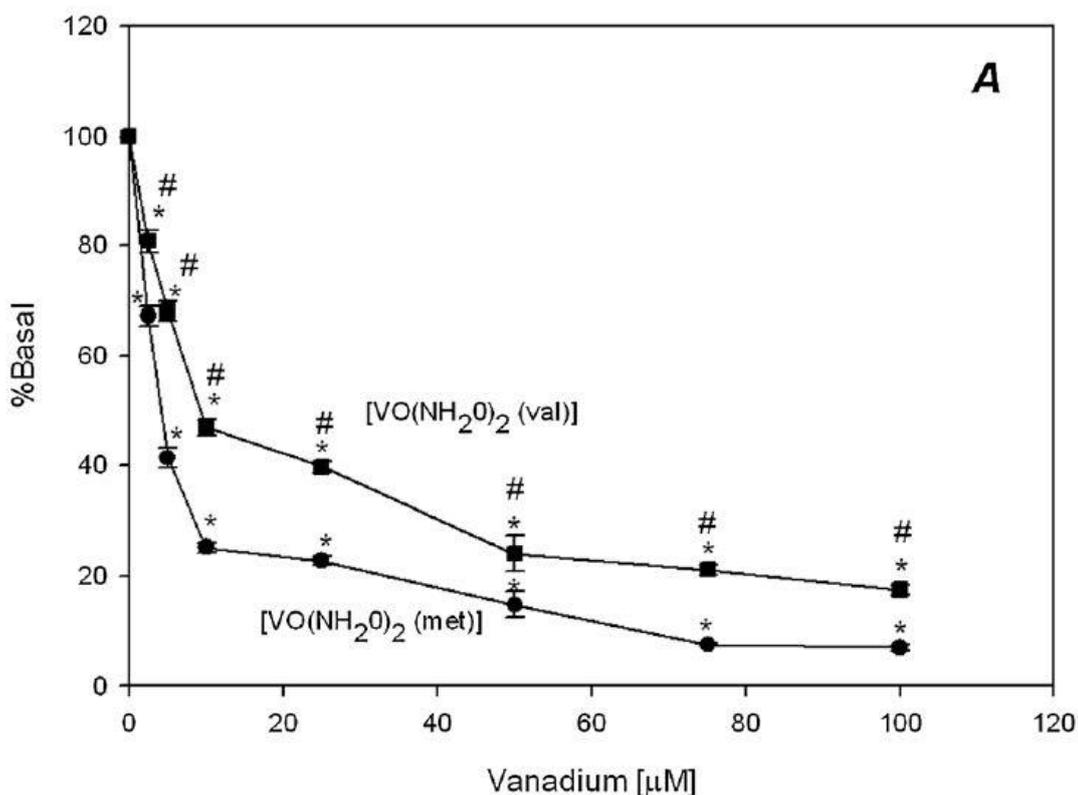


Fig. 2.10: Efectos de $[VO(NH_2O)_2(val)]$ (cuadrados) y de $[VO(NH_2O)_2(met)]$ (círculos) sobre células preosteoblastos MC3T3-E1. Las células se incubaron en DMEM libre de suero, sólo (basal) o con diferentes concentraciones de los compuestos a 37°C por 24 horas. Los resultados expresan la inhibición de la proliferación celular, % de células activas respecto del nivel basal y representan la media \pm SEM (n=9).

*Diferencia significativa en comparación con el nivel basal ($p < 0,01$) y # diferencia significativa comparando las misma concentración para ambos complejos ($p < 0,01$).

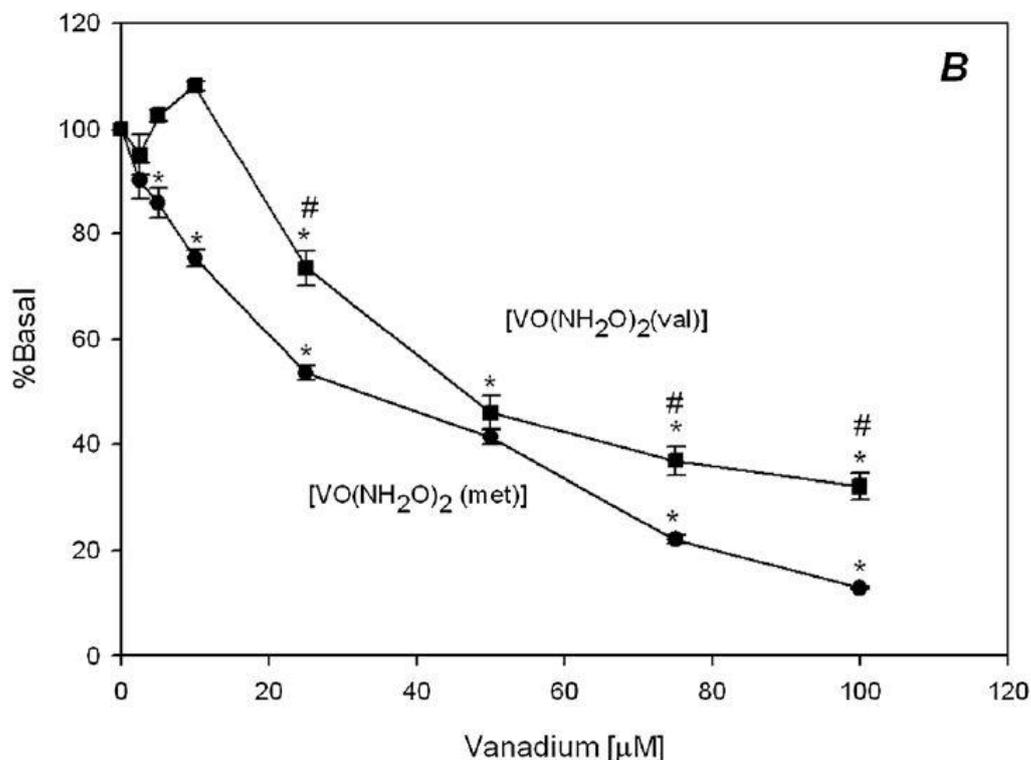


Fig. 2.11: Efectos de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ (cuadrados) y de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ (círculos) sobre células tumorales UMR106. Las células se incubaron en DMEM libre de suero, sólo (basal) o con diferentes concentraciones de los compuestos a 37°C por 24 horas. Los resultados expresan la inhibición de la proliferación celular, % de células activas respecto del nivel basal y representan la media \pm SEM (n=9).

* Diferencia significativa en comparación con el nivel basal ($p < 0,01$) y # diferencia significativa comparando las misma concentración para ambos complejos ($p < 0,01$).

2.6.2.2 Efectos de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en la morfología celular

La Fig. 2.12 (página 104) muestra las características morfológicas de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y de osteosarcoma UMR106, y el efecto de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en concentración 50 μM sobre ambas líneas celulares.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

El primer complejo causó una reducción del número de células por campo. Esta acción se acompañó de marcados cambios morfológicos los cuales son más evidentes para los osteoblastos no transformados (panel superior medio). A concentración 50 μM , las células MC3T3-E1 muestran solamente núcleos bien teñidos pero picnóticos -retracción del núcleo con condensación de la cromatina- y prácticamente, no se observa citoplasma.

Por otra parte, las células UMR106 fueron menos alteradas y muestran las características morfológicas del núcleo y citoplasma regularmente bien conservadas (panel inferior medio). Las modificaciones en el número de células y cambios morfológicos fueron más pronunciadas para $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en ambas líneas celulares (paneles superior e inferior derechos).

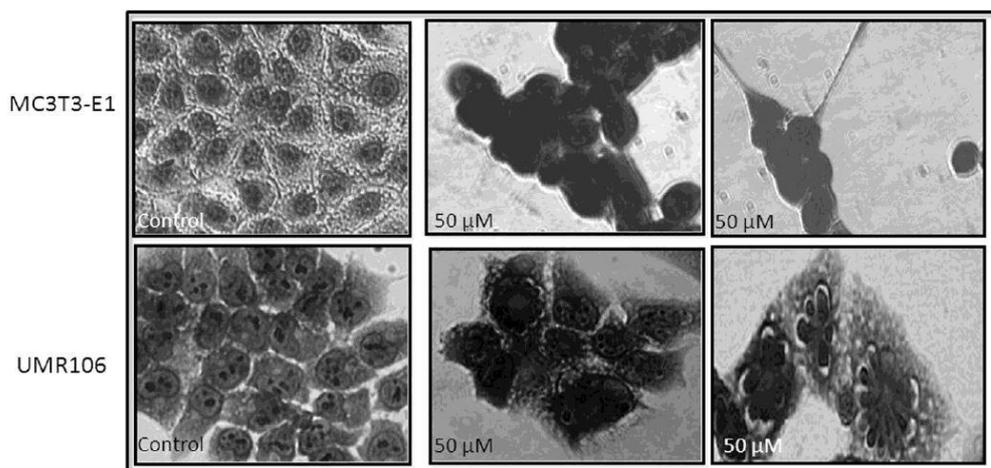


Fig. 2.12: Efectos de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en la morfología celular de líneas celulares osteoblásticas. Los osteoblastos fueron incubados por 24 horas sin adición de compuestos (control) y con $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ 50 μM (panel superior medio células MC3T3-E1, panel inferior medio células UMR106) y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ 50 μM (panel superior derecho células MC3T3-E1, células UMR106 en panel inferior derecho). Aumento 400X.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.6.2.3 Estudios de citotoxicidad-Ensayo MTT

El ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) [58,59] evalúa la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial y es un buen marcador de citotoxicidad. Las Figs. 2.12 A y B muestran que ambos complejos causaron una disminución en la reducción del MTT en las células MC3T3-E1 desde 2.5 a 100 μM como una función de la concentración del complejo ($p < 0,001$).

En las células tumorales, el compuesto $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ produjo un efecto citotóxico a partir de 50 μM ($p < 0,001$) mientras que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ causó un efecto más fuerte, afectando la actividad mitocondrial a partir de 25 μM ($p < 0,001$) (Fig. 2.13 B).

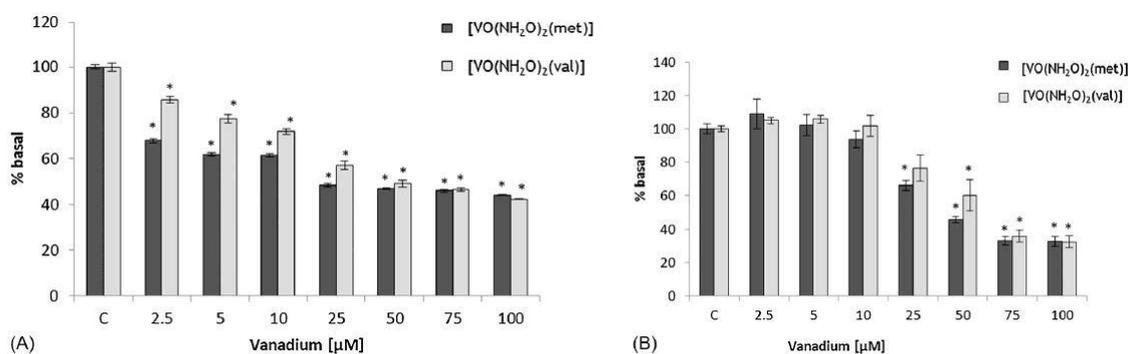


Fig. 2.13: Evaluación de la succinato deshidrogenasa mitocondrial por el ensayo de MTT en osteoblastos en cultivo. En (A) células osteoblasto-símiles y en (B), células de osteosarcoma, fueron incubadas con diferentes dosis de los complejos por 24 horas a 37°C. Luego de la incubación, la viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT. Los resultados se expresan como % del basal y representan la media \pm SEM (n=18). * $p < 0,001$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.6.2.4 Estudios de genotoxicidad

2.6.2.4.1 Inducción de micronúcleos por $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$

El efecto de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ en la inducción de micronúcleos en células binucleadas puede verse en la Fig. 2.14. En células MC3T3-E1, el complejo indujo la formación de micronúcleos desde 2,5 μM ($p < 0,001$) de manera dosis dependiente. Es de destacar el hecho que a concentración 25 μM la acción genotóxica no pudo ser determinada en esta línea celular debido al fuerte efecto citotóxico del complejo.

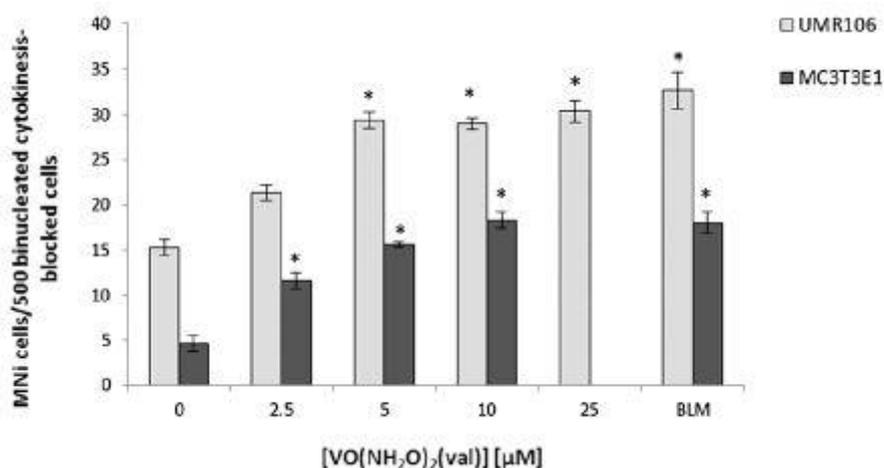


Fig. 2.14: Ensayo de micronúcleos (MNI). Inducción de micronúcleos en células osteoblasto-símiles luego de 24 horas de exposición a $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$. * Diferencia significativa a $p < 0,001$. BLM por bleomicina, como control positivo.

Por otra parte, en células UMR106, el efecto citotóxico significativo comenzó a observarse a concentración 5 μM y este efecto es bastante uniforme en el resto de las dosis ensayadas. Se utilizó bleomicina ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) como control positivo. La bleomicina puede afectar varias vías celulares, pero su acción tóxica generalmente se cree que está asociada con su interacción con ADN, esto es, la bleomicina tiene la capacidad de unirse al ADN y clivarlo [60,61]. Los efectos de las dosis máximas ensayadas para el complejo fueron similares a la bleomicina para cada línea celular (Fig. 2.14).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

2.6.2.4.2 Electroforesis en gel de células individuales (EGCI) - Ensayo "cometa"

Éste fue el otro ensayo llevado a cabo para elucidar el efecto genotóxico del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$.

Se evaluó el parámetro "momento de la cola del cometa", que se define como la longitud de la cola x cantidad de ADN en la cola. La cantidad de ADN se determina a través de la intensidad de fluorescencia. La distancia de la migración de ADN se usa para medir la extensión del daño al ADN. Sin embargo, si el daño al ADN es relativamente alto, la cola aumenta la intensidad de tinción de fluorescencia pero no su longitud [62]. Por esta razón es útil el momento de la cola como punto final genotóxico.

La Fig. 2.15 (página 108) muestra que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ generó la formación de cometa en células MC3T3-E1 desde 2,5 μM a 25 μM , con una respuesta en forma de campana. La disminución del daño al ADN mientras que la concentración de complejo aumenta podría deberse a la citotoxicidad del complejo ejercida sobre esta línea celular.

Además, el aumento del momento de la cola desde 2.5 a 10 μM del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ es incluso mayor que el daño al ADN generado por un pulso de 2 horas de peróxido de hidrógeno 2 mM utilizado como control positivo en este ensayo. Por otra parte, en las células tumorales no se observan cometas en el rango de concentraciones ensayado (2.5 - 25 μM).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

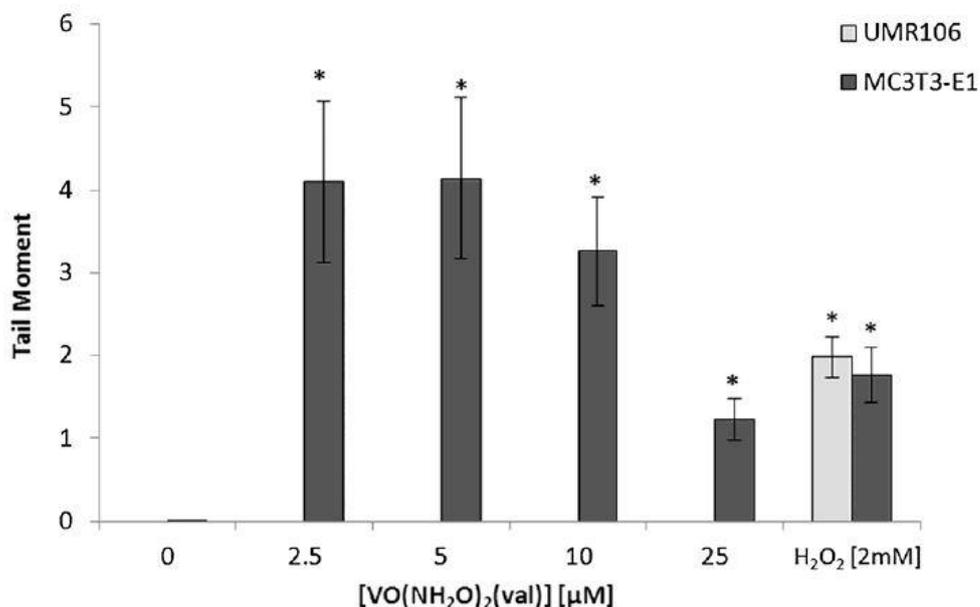


Fig. 2.15: EGCI (Ensayo cometa). La inducción de daño al ADN en células MC3T3-E1 y UMR106 se evaluó por el momento de la cola. Luego de la incubación con $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ por 24 horas, las células se lisaron y los fragmentos de ADN se procesaron por electroforesis. Luego de la electroforesis, los núcleos se tiñeron y analizaron. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=150$), $*p < 0,001$.

Para resumir, los estudios de genotoxicidad muestran que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ indujo micronúcleos y cometas desde $2,5 \mu\text{M}$ en células osteoblasto-símiles MC3T3-E1, en tanto que para las células de osteosarcoma UMR106, el complejo solo indujo formación de micronúcleos a partir de concentración $5 \mu\text{M}$.

2.6.2.5 Estrés oxidativo

La Fig. 2.16 A muestra que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ causa un decrecimiento de ROS (radicales libres de oxígeno) en las células UMR106 desde $2,5$ a $10 \mu\text{M}$ en comparación con las condiciones del control. En el rango de concentraciones bajas este complejo parecería comportarse como un recolector de ROS. El complejo indujo la producción de ROS sobre el basal (aproximadamente 170%, $p < 0,01$) a mayores concentraciones ($50 - 100 \mu\text{M}$).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Este hecho está de acuerdo con el efecto inhibitorio observado en el estudio de proliferación.

En células MC3T3-E1, desde 25 μM el complejo indujo un aumento significativo de producción de ROS de una manera dosis dependiente ($p < 0,01$), alcanzando un máximo de aproximadamente 225% sobre el basal a 100 μM .

Este incremento en el estrés oxidativo puede ser, al menos parcialmente, uno de los mecanismos posibles relacionados con el efecto deletéreo previamente descrito.

La Fig. 2.16 A también muestra que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ causó mayor producción de ROS en las células de fenotipo normal que en las células de osteosarcoma en todo el rango de concentraciones ($p < 0,01$).

Por otra parte, el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ también indujo un aumento en el nivel de ROS en ambas líneas celulares, con un efecto más pronunciado en los osteoblastos no transformados (Fig. 2.16 B). Sin embargo, para este complejo, el efecto recolector de ROS determinado para el compuesto $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ en el rango de concentraciones bajo, no pudo ser observado.

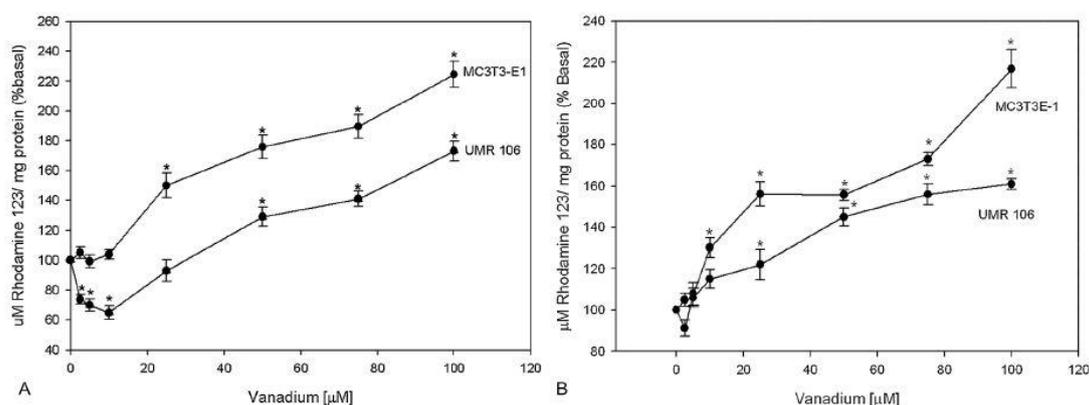


Fig. 2.16: Efecto de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ sobre los niveles de ROS en células MC3T3-E1 y UMR106 (A y B respectivamente). Las células osteoblasto-símiles se incubaron con diferentes concentraciones de los complejos por 24 horas en presencia de DHR 123 10 mM a 37°C. La DHR 123 se oxida a rodamina 123. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=18$). *Diferencias estadísticamente significativas vs. control, $p < 0,01$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los mayores niveles de ROS detectados en células MC3T3-E1 respecto de las UMR106 podrían explicar el mayor efecto inhibitorio en la proliferación celular de la primera línea según fue establecido por el bioensayo del cristal violeta para ambos complejos.

2.6.3 Discusión de resultados obtenidos de estudios *in vitro* respecto de la acción de complejos [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)] sobre líneas celulares MC3T3-E1 y UMR106

Los ligandos quelantes fuertes son compuestos muy importantes como modelos de captación, transporte y almacenamiento de especies metálicas en organismos vivos [63]. Compuestos de bajo peso molecular con grupos funcionales con átomos de oxígeno y nitrógeno donores como el grupo amino y carboxilato de aminoácidos y aquéllos del anión hidroxilamido son sistemas muy atractivos desde el punto de vista químico y bioquímico [64].

En el presente trabajo se ha estudiado los efectos de dos complejos de vanadio(V) hidroxilamido/aminoácido, [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)], en un modelo de osteosarcoma y osteoblastos normales en cultivo, y, como se verá más adelante, en un modelo *in vivo* de huevos de peces cebra. En particular, los ensayos *in vitro* de viabilidad fueron evaluados a través del bioensayo del cristal violeta, MTT y morfología. Por otro lado, la inducción de estrés oxidativo fue investigada para ambos complejos. Además, dado que el complejo [VO(NH₂O)₂(val)] mostró mayor estabilidad así como menores efectos citotóxicos, fue también probado para genotoxicidad.

Se encontró que los complejos [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)] inducen la inhibición de la proliferación celular de un modo dosis-dependiente, de acuerdo con alteraciones morfológicas. Mientras que la concentración de los complejos aumenta, numerosas células muertas se desprenden de la matriz extracelular correlacionándose esto con la disminución de la supervivencia celular.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Además, se pudo observar que los compuestos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ causan condensación del citoplasma, cromatina, y pérdida de conexiones celulares.

La línea MC3T3-E1 muestra mayor sensibilidad a los complejos de vanadio estudiados que los osteoblastos tumorales. Efectos similares fueron previamente reportados por el grupo de trabajo de la Cátedra de Bioquímica Patológica (UNLP) y otros autores [65-71].

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la acción citotóxica de derivados del vanadio.

Muchos reportes clínicos mostraron que los cationes lipofílicos son promitentes candidatos anti-cáncer al apuntar a la mitocondria [72]. Uno de los distintivos más útiles para la citotoxicidad es la disrupción de las actividades enzimáticas mitocondriales que puede medirse a través de la reducción de MTT. Luego de 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de los complejos, una reducción similar en esta importante función metabólica pudo ser determinada en osteoblastos MC3T3-E1 para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en el rango de concentraciones 2,5 - 100 μM .

Por el contrario, en la línea celular tumoral, una diferencia estadísticamente significativa se observó entre los dos complejos. El complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ produjo el efecto más fuerte (desde 25 μM), mientras que $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ causó un efecto citotóxico desde 50 μM ($p < 0,001$).

Estos resultados están en concordancia con los reportados para este complejo en el ensayo de proliferación.

Además, estos resultados son similares a reportes previos sobre las acciones citotóxicas de diferentes especies de vanadio en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, previamente fueron reportados experimentos con oxocomplejos de vanadio(V) contra células epiteliales del tracto genital femenino humano utilizando el ensayo de reducción del colorante MTT [73]. Adicionalmente, la viabilidad celular disminuida fue determinada en cardiomiocitos tratados con una solución de vanadato [74], así como

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

en células tumorigénicas y no carcinogénicas expuestas a una sal de vanadio(IV) como es el sulfato de vanadilo [75].

Adicionalmente, se ha investigado los efectos genotóxicos de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ en ambas líneas celulares por dos métodos bien conocidos: micronúcleos y el ensayo de cometa.

En esta técnica de electroforesis, un pequeño número de células suspendidas en una capa delgada de gel de agarosa en un portaobjetos se lisa, se electroforetiza, y se tiñe con un colorante fluorescente que se une al ADN. Las células con daño del ADN aumentado muestran una aumentada migración del ADN cromosómico desde el núcleo hacia el ánodo, lo cual se parece a la "cola del cometa". El ensayo tiene múltiples aplicaciones en investigación fundamental del daño al ADN y su reparación, en la evaluación de genotoxicidad de nuevos compuestos químicos y farmacéuticos, biomonitoreo ambiental, y monitoreo de población humana.

El ensayo cometa generalmente detecta rupturas de hebra simple y doble fue utilizado para analizar el efecto genotóxico. Bajo condiciones alcalinas, estructuras adicionales del ADN se detectan como daño de ADN: sitios AP (sitios a-básicos en los cuales falta un nucleótido purina o pirimidina) y sitios donde la reparación de la escisión está sucediendo. Este método es un procedimiento simple y sensible para estudiar el daño al ADN y su reparación.

En este trabajo se reporta un efecto genotóxico significativo del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ que sólo puede observarse en células M3CTC3-E1 desde 2,5 μM , desde 20 μM y en adelante, la disminución en el número de células vivas causa un decrecimiento en el momento de la cola.

Por el contrario, no se pudo determinar daño al ADN en células UMR196 por este método.

Por otra parte, el ensayo de micronúcleos detecta aquellos productos químicos que inducen la formación de fragmentos de ADN unidos a la membrana, esto es, micronúcleos en el citoplasma de células interfaciales. Estos micronúcleos podrán haberse originado de fragmentos cromosómicos carentes de centrómero o bien

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

cromosomas enteros que fueron incapaces de migrar junto al resto de cromosomas durante la anafase de la división celular.

En este trabajo, se ha visto que el compuesto $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ aumenta la frecuencia de micronúcleos en un modo dependiente de la concentración, desde 2,5 μM en células MC3T3-E1 y desde 5 μM en células tumorales UMR-106. Es interesante que los micronúcleos no pudieron ser detectados al nivel de concentración más elevado (25 μM) en MC3T3-E1, probablemente debido a efectos citotóxicos manifiestos.

Estos resultados sugieren que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ induce rupturas en hebras simples y dobles de ADN en células MC3T3-E1, lo cual lleva a un resultado positivo en el ensayo cometa y a la inducción de aumento de la frecuencia de micronúcleos. Sin embargo, un resultado positivo del ensayo de micronúcleos junto a un resultado negativo en el ensayo cometa, como se ha obtenido para células UMR-106, sugiere que la formación de micronúcleos podría ser una consecuencia de una perturbación del aparato mitótico. Esta acción podría haber afectado el proceso de división celular, llevando a pérdida de cromosomas más que a ruptura de éstos. Este efecto ha sido previamente reportado para benzo(a)pireno, el cual aumenta la formación de micronúcleos pero no la ruptura de hebras de ADN [76].

De acuerdo con nuestros hallazgos, se ha reportado anteriormente la inducción del daño al ADN en células humanas expuestas a óxidos de vanadio *in vitro*.

Se observó que el trióxido de vanadio(III) y el pentóxido de vanadio(V) produce ruptura de ADN de hebra simple a concentraciones de hasta 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en períodos de tratamiento de 2 a 6 horas, mientras que el tetróxido de vanadio (IV) significativamente aumenta el daño al ADN en toda concentración solo por 4 o 6 horas de tratamiento [77].

Además, se ha reportado previamente el efecto genotóxico de un complejo de catión vanadilo(IV) con oxodiacetato, empleando el ensayo cometa en células tumorales Caco-2.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Esta acción concuerda con el efecto de este complejo en ADN plasmídico, al cual causa clivaje en hebras simples y dobles [78].

Por otro lado, la genotoxicidad del vanadio tetravalente fue también evaluada *in vivo*. La exposición oral subaguda a sulfato de vanadilo (VOSO_4) en ratones CD1 machos causaron la incidencia de reticulocitos micronucleados en sangre y eritrocitos policromáticos en médula ósea, además de lesiones al ADN detectables por el ensayo cometa [79].

Es bien conocido que los compuestos de vanadio ejercen sus efectos tóxicos a través de la generación de estrés oxidativo [80, 81, 82].

En un intento de entender mejor el mecanismo posible de la citotoxicidad de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en células osteoblasto-símil, se evaluó el efecto agudo de estos complejos respecto del estrés oxidativo valorado por la oxidación de la sonda DHR-123. Esta sustancia actúa como una sonda asociada a la mitocondria que reacciona selectivamente con peróxido de hidrógeno [83, 84].

Los complejos estudiados aumentaron la producción de ROS en osteoblastos con un mayor efecto en la línea celular no transformada, MC3T3-E1.

Esta observación está de acuerdo con resultados previos del laboratorio de Bioquímica Patológica (UNLP) sobre la acción del vanadato y catión vanadilo(IV) en el modelo de osteoblastos en cultivo [65] y en un modelo de macrófagos en cultivo [85]. Estos resultados indican que el incremento en el estrés oxidativo podría mediar, al menos en parte, las acciones citotóxicas de los complejos con un mayor efecto en la línea celular no transformada.

Los resultados obtenidos de MTT y niveles de ROS medidos concuerdan con el hecho que las células requieren de una regulación ajustada del balance redox intracelular y consecuentemente de la formación de ROS para mantener un estado redox adecuado [86].

En varias enfermedades, incluyendo cáncer, este balance está perturbado. Entonces, los fármacos contra el cáncer orientados a los sistemas redox merecen la atención de los científicos por sus potenciales efectos farmacológicos. Los complejos metálicos

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

anticancerígenos, y entre ellos los compuestos de vanadio, han demostrado interactuar fuertemente con la homeostasis redox celular o perturbarla [87].

2.6.4. Estudios de toxicidad *in vivo*

2.6.4.1 Resultados de la exposición de huevos de peces cebra fertilizados a los complejos [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)]

Además de los estudios *in vitro* descritos anteriormente, se ha evaluado la toxicidad de los complejos [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)] en un modelo de huevos de peces cebra fertilizados (*Danio rerio*). Estos animales han llegado a ser un organismo modelo ampliamente utilizado para estudios de biología del desarrollo y descubrimiento de fármacos. Este modelo contribuye al desarrollo de fármacos combinando las herramientas de la Química Medicinal y la biología de los peces cebra. Mediante este enfoque, se han identificado varios compuestos que podrían ofrecer ventajas terapéuticas para enfermedades relacionadas con el hueso y cáncer.

Se ha utilizado la prueba FET (Fish Embryo Toxicity) para estudio *in vivo* de la toxicidad de [VO(NH₂O)₂(val)] y [VO(NH₂O)₂(met)].

La Guía de la prueba FET se basa en la exposición química de huevos de peces cebra recién fertilizados hasta por 48 horas y se espera que refleje la toxicidad aguda de fármacos en peces en general.

Luego de 24 y 48 horas de exposición a los complejos, se registraron cuatro puntos finales apicales como indicadores de letalidad aguda en peces: coagulación de huevos fertilizados, falta de formación del somite, ausencia de desprendimiento de la cola-yema del saco vitelino, falta de latidos cardíacos. Los huevos se consideraron muertos cuando exhibieron al menos una de las características anteriores.

En los pocillos control, luego de 48 horas, debiera haber menos de 10% de los huevos con alguna de las características mencionadas.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

La Fig. 2.17 muestra los resultados de la prueba FET para ambos complejos de oxovanadio(V). Los valores de IC_{50} indican que el complejo de metionina, $[VO(NH_2O)_2(met)]$, es cuatro veces más tóxico que su homólogo de valina, $[VO(NH_2O)_2(val)]$ ($5 \pm 3 \mu M$ vs. $20 \pm 4 \mu M$ respectivamente, $p < 0,01$).

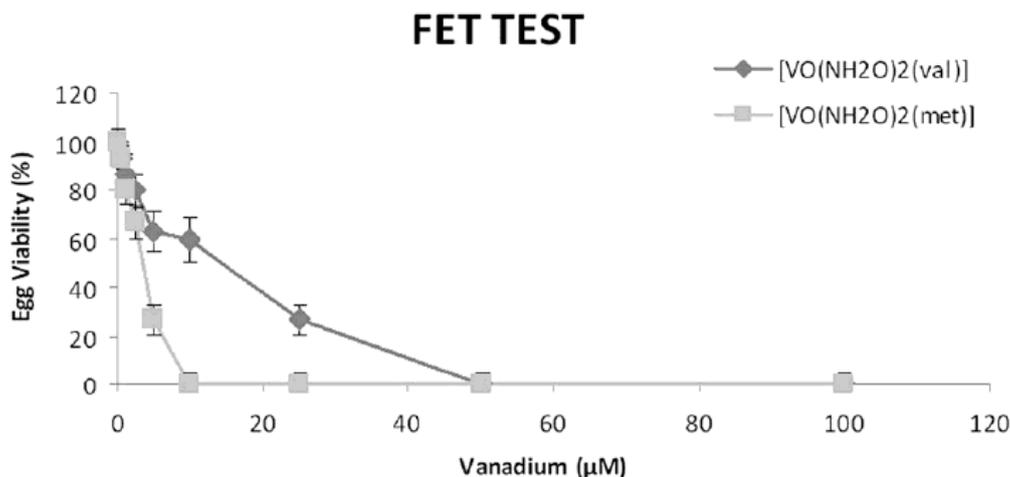


Fig. 2.17: Efectos de $[VO(NH_2O)_2(val)]$ y $[VO(NH_2O)_2(met)]$ en la viabilidad de huevos de peces cebra (*Danio rerio*).

Los huevos de peces cebra fueron incubados con diferentes concentraciones de los complejos $[VO(NH_2O)_2(val)]$ y $[VO(NH_2O)_2(met)]$ por 48 horas a $28^\circ C$. Los embriones fueron observados bajo estereomicroscopio a las 24 y 48 h (aumento 40X). Los resultados se registraron de acuerdo a las *Guidelines* OECD de la prueba FET [88]. Se encontraron diferencias significativas *versus* control a $p < 0,02$ a partir de concentración $5 \mu M$.

2.6.4.2 Discusión de resultados

En el desarrollo de nuevos compuestos con potenciales aplicaciones terapéuticas es muy útil estudiar su toxicidad *in vivo*.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los embriones de peces cebra representan un modelo con un rango impresionante de posibles aplicaciones en ciencias ambientales. Dado el enorme cuerpo de información existente sobre el desarrollo del pez cebra [88, 89, 90], éstos parecerían ser la primera elección para probar la toxicidad embrionaria de rutina. Debido al pequeño tamaño de los tamaños de los embriones, desarrollo rápido, transparencia, fecundidad, y numerosas similitudes moleculares, morfológicas y fisiológicas con mamíferos, estos animales se han constituido en una potente plataforma para el control de fármacos basados en fenotipo.

En este contexto, se encuentra que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ es aproximadamente, cuatro veces más deletéreo que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ (ver la Fig. 2.16 y la relación entre valores de IC_{50} en este modelo *in vivo*).

A pesar que los estudios de descorionación en embriones de pez cebra de 48 horas indican que la función de barrera del corion aumenta con la lipofilia del compuesto de prueba [89], el diferente comportamiento observado en el presente trabajo no podría ser atribuido a diferencias en la permeabilidad del corion porque se esperaría que ambos compuestos tuviesen una lipofilia similar.

Por otra parte, los embriones de pez cebra íntegros permiten la evaluación de efectos tóxicos durante el desarrollo embrionario, desde simples células a un organismo completo. Algunos compuestos son tóxicos en etapas tempranas del desarrollo, y los efectos no pueden ser detectados en huevos descorionizados porque los ensayos pueden empezar 24-48 horas post-fertilización para asegurar la supervivencia sobre el 90% del control.

Las investigaciones sistemáticas iniciales que compararon embriones de pez cebra corionados con aquellos manualmente descorionados sugieren una función de barrera del corion más débil para unos pocos compuestos [89-92].

Sin embargo, en los peces cebra, el corion contiene poros con un tamaño de $0,17 \mu\text{m}^2$ [93]. Estos poros podrían ser responsables de restricciones dependientes del tamaño para la captación de fármacos. Estos efectos se han reportado para algunos

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

compuestos grandes excediendo 3kDa [88]. El tamaño de los compuestos de vanadio ensayados es menor que 3 kDa.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Bibliografía

- [1] Butler, A., Clague, M. J., Meister, G. E., *Chem. Rev.* 94, 625 (1994)
- [2] Messerschmidt, A., Wever, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 392 (1996)
- [3] Rehder, D. *Bioinorganic Vanadium Chemistry*, J. Wiley, Chichester (2008)
- [4] Crans, D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., Yang, L., *Chem. Rev.* 104, 849 (2004)
- [5] Shaver, A., Hall, D.A., Ng, J.B., Lebus, A. M., Hynes, R.C., Posner, B.I., *Inorg. Chim. Acta* 229, 253 (1995)
- [6] Djordjevic, C. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, A. Sigel (Eds.) Vol. 31, p. 595, Marcel Dekker, New York (1995)
- [7] Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M.J., Ramachandran, C., *J. Biol. Chem.* 272, 843 (1997)
- [8] Evangelou, A.M., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42, 249 (2002)
- [9] Cuncic, C., Desmarais, S., Detich, N., Tracey, A.S., Gresser, M.J., Ramachandran. C. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1859 (1999)
- [10] Baran, E.J. En: *Advances in Plant Physiology*, Hemantaranjan, H. (Ed.), Vol. 10, p. 357, Scientific Publishers, Jodhpur (2007)
- [11] Bortolini, O., Conte, V., *J. Inorg. Biochem.* 99, 1549 (2005)
- [12] Bayer, E. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, A. Sigel (Eds), Vol. 31, p. 407, Marcel Dekker, New York (1995)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [13] Garner, C.D., Armstrong, R.E., Berry, R.E., Beodez, R.L., Collison, D., Cooney, J.J.A., Ertok, S.N., Helliwell, M., *J. Inorg. Biochem.* 80, 17 (2000)
- [14] Crans, D.C. En: *Vanadium Compounds, Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications*, Crans, D.C., Tracey, A.S. (Eds.), p. 82, American Chemical Society, Washington (1998)
- [15] Rehder, D., *Angew. Chem. Int. Edit.* 30, 148 (1991)
- [16] Armstrong, E.M., Beddoes, R.L., Calviou, L.J., Charnock, J.M., Collison, D., Ertok, N., Naismith, J.H., Graner, C.D., *J. Am. Chem. Soc.* 115 (2), 807 (1993)
- [17] Tanaka, N., Wever, R. *J. Inorg. Biochem.* 98, 625 (2004)
- [18] Tracey, A.S., Willsky, G.R., Takeuchi, E.S., "Coordination of Vanadate by Hydrogen Peroxide and Hydroxylamines", Capítulo 5, en: "Vanadium: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Practical Applications", CRC Press, Boca Raton (2007)
- [19] McNeill, J. H., Yuen, V.G., Hoveyda, H. R., Orvig, C. *J. Med. Chem.* 35, 1489 (2002)
- [20] Baran, E.J., *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat.* 63, 77 (2011)
- [21] Rehder, D. *Coord. Chem. Rev.* 252, 2209 (2008)
- [22] Crans, D.C., Smeo, J.J., Gaidamauskien, E.G., Anderson, O.P., Miller, S.M., Jin, W., Gaidamauskas, E., Crubellier, E., Grainda, R., Chi, L.H., Willsky, G.R. *J. Inorg. Biochem.* 98, 11, 1837 (2004)
- [23] Keramidis, A.D., Miller, S.M., Anderson, O.P., Crans, D.C. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8901 (1997)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [24] Li, L.Z., Xu, T., Wang, D.Q., *J. Chem. Crystallogr.* 34, 585 (2004)
- [25] Chasteen, N.D. *Struct. Bonding* 53, 105 (1963)
- [26] Crans, D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., Yang, L., *Chem. Rev.* 104, 849 (2004)
- [27] Johnson, C.K., ORTEP-II, A Fortran Thermal Ellipsoid Plot Program. Report ORNL-5318, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA (1976)
- [28] Wieghardt, K. In *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Sykes, A.G. (Editor), Vol. 3, p. 213, Academic Press, London (1984)
- [29] Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th Ed., Part B, Wiley, New York (1997)
- [30] Luckhaus, D., *J. Chem. Phys.*, 106, 8409 (1997)
- [31] Kowal, A.T., *Spectrochim. Acta*, A58, 1055 (2002)
- [32] Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston (1991)
- [33] Smith, B., *Infrared Spectral Interpretation*, CRC Press, Boca Raton (1999)
- [34] Cuevas, A., Viera, I., Torre, M.H., Kremer, E., Etcheverry, S.B., Baran, E.J., *Acta Farm. Bonaerense* 17, 213 (1998)
- [35] Cuevas, A., Viera, I., Torre, M.H., Kremer, E., Etcheverry, S.B., Baran, E.J., *Afinidad* 56, 263 (1999)
- [36] Wagner, C.C., Baran, E.J. *Acta Farm. Bonaerense* 21, 287 (2002)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [37] Baran, E.J. *Z. Naturforsch.* 60b, 663 (2005)
- [38] Baran, E.J., Viera, I., Torre, M.H. *Spectrochim. Acta* 66A, 114 (2007)
- [39] Rocchiccioli, C. *Compt. Rend.* 253, 838 (1961)
- [40] Pawlukojc, A., Leciejewicz, J., Ramírez-Cuesta, A.J., *J. Nowicka-Scheibe. Spectrochim. Acta* 61A, 2474 (2005)
- [41] Vuletic, N., Djordjevic, C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1137 (1973)
- [42] Baran, E.J., *Monatsh. Chem.* 108, 898 (1977)
- [43] Lopez, V., Stevens, T., Lindquist, R.N., *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 31 (1976)
- [44] Klarlund, J.K., *Cell* 41, 707, (1985)
- [45] Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresse, M.J., Ramachandran, C., *J. Biol. Chem.* 272, 843 (1997)
- [46] Baran, E.J., *Monatsh. Chem.* 108, 1295 (1977)
- [47] Cordes, M., Walter, J.L., *Spectrochim. Acta* 24A, 237 (1968)
- [48] Davis, W.J., Smith, J. *J. Chem. Soc. A*, 317 (1971)
- [49] Baran, E.J., Bozoglian, F., Giles, M., Gonzalez-Baró, A.C., Rivero, M., Sienna, B., *An. Asoc. Quím. Argent.* 82, 223 (1994)
- [50] Williams, P.A.M., Ferrer, E.G, Correa, M.J., Baran, E.J., Castellano, E.E., Piro, O.E., *J. Chem. Crystallogr.* 34, 285 (2004)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [51] Seargent, L.E., Stinson, R.A., *Biochem. J.* 181, 247 (1979)
- [52] Register, T.C., Wuthier, R.E., *J. Biol. Chem.* 259, 3511 (1984)
- [53] Cortizo, A.M., Sálice, V.C., Etcheverry, S.B., *Biol. Trace Elem. Res.* 41, 331 (1994)
- [54] Crans, D. C., Keramidas, A. D., Drouza, C. *Phosphorous Sulfur Silicon* 109–110, 245 (1996)
- [55] Holtz, K.M., Stec, B., Kantrowitz, E.R., *J. Biol. Chem.* 274(13), 8351 (1999)
- [56] Barrio, D.A., Williams, P. A. M., Cortizo, A. M., Etcheverry, S. B., *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 459 (2003)
- [57] Posner, B. I., Faure, R., Burgess, J. W., Bevan, A. P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I. G., Ng, J. B., Hall, D. A., Soo Lum, B., Shaver, A., *J. Biol. Chem.* 6, 4596 (1994)
- [58] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* 65, 55 (1983)
- [59] Denizot, F., Lang, R. J. *Immunol. Methods* 89, 271 (1986)
- [60] Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., Umezawa, H., *J. Antibiot.* 21, 378 (1968)
- [61] Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., Umezawa, H., *J. Antibiot.* 22, 446 (1969)
- [62] Liao, W., Nutt, M.A., Zhu, M.G., *Methods* 48, 46 (2009)
- [63] Harding, C.J., Henderson, R. K., Powell, A. K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 570 (1993)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [64] Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P., Que, L., *Chem. Rev.* 104, 939 (2004)
- [65] Cortizo, A. M., Bruzzone, L., Molinuevo, M.S., Etcheverry, S.B., *Toxicology* 147, 89 (2000)
- [66] Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 145, 97 (1995)
- [67] Sálice, V. C., Cortizo, A. M., Gomez Dumm, C. L., Etcheverry, S. B., *Mol. Cell. Biochem.* 198, 119 (1999)
- [68] Molinuevo, M. S., Barrio, D. A., Cortizo, A. M., Etcheverry, S.B., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 163 (2004)
- [69] Etcheverry, S.B., Ferrer, E. G., Naso, L. G., Rivadeneira, J., Salinas, V., Williams, P. A. M., *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 435 (2008)
- [70] Borenfreund, E., Puerner, J. A., *J. Tissue Cult. Methods* 9, 7 (1984)
- [71] Crans, D.C, Keramidas, A. D., Cortizo, M., *Arch. Biochem. Biophys.* 338, 7 (1997)
- [72] Che, C. M. Sun, R. W., *Chem. Commun.* 47, 9554 (2011)
- [73] D'Cruz, O. J., Dong, Y., Uckun, F. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 253 (2003)
- [74] Soares, S. S., Henao, F., Aureliano, M., Gutierrez-Merino, C., *Chem. Res. Toxicol.* 21, 607 (2008)
- [75] Holko, P., Ligera, J., Kisielewska, J., Kordowiak, A. M., Klein, A., *Pol. J. Pathol.* 59, 3 (2008)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [76] Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 74 (2005)
- [77] Rodríguez-Mercado, J., Mateos-Nava, R. A., Altamirano-Lozano, M. A., *Toxicol. In Vitro* 25, 1996 (2011)
- [78] Di Virgilio, A.L., Rivadeneira, J. Muglia, C. I., Reigosa, M. A., Butenko, N., Cavaco, I., Etcheverry, S.B., *Biometals* 24, 1153 (2011)
- [79] Villani, P., Cordelli, E., Leopardi, P., Siniscalchi, E., Veschetti, E., Fresegna, A.M., Crebelli, R., *Toxicol. Lett.* 170, 11 (2007)
- [80] Evangelou, A. M., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 249 (2002)
- [81] Ye, J., Ding, M., Leonard, S.S., Robinson, V.A., Millecchia, L., Zhang, X., Castranova, V., Vallyathan, V., Shi, X., *Mol. Cell. Biochem.* 202, 9 (1999)
- [82] Zhang, Z., Huang, C., Li, J., Leonard, S. S., Lanciotti, R., Butterworth, L., Shi, X., *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 311 (2001)
- [83] Capella, M. A. M., Capella, L. S., Valente, R. C., Gefé, M., Lopes, A. G., *Cell mol. Toxicol.* 23, 413 (2007)
- [84] Qin, Y., Lu, M., Gong, X., *Cell Biol. Int.* 32, 224 (2008)
- [85] Molinuevo, M. S., Etcheverry, S. B., Cortizo, A.M., *Toxicology* 210, 205 (2005)
- [86] Jungwirth, U., Kowol, C. R., Keppler, B. K., Hartinger, C. G., Berger, W., Heffeter, P., *Antioxid. Redox Signaling* 15, 1085 (2011)
- [87] Rivadeneira, J., Di Virgilio, A. N., Barrio, D. A., Muglia, C.L., Bruzzone, L., Etcheverry, S.B., *Med. Chem.* 6, 9 (2010)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[88] Creton, R., *Dep. Brain Res.* 151, 33 (2004)

[89] Braunbeck, T., Lammer, E., Draft detailed review paper on fish embryo toxicity assays Report prepared for the German Federal Environmental Agency (UBA Contract Number 203 85 422), 2005

[90] Nagel, R., *AL TEX Chromatogram* 19, 38 (2002)

[91] Lammera, E., Carrb, G. J., Wendlera, K., Rawlingsb, J. M., Belangerb. S. E., Braunbeck, Th., *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 149, 196 (2009)

[92] Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394 (2008)

[93] Cheng, J., E. Flahaut, E., Cheng, S.H., *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 708 (2007)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Capítulo 3

Peroxocompuestos de vanadio(V)

3.1 Introducción

Los compuestos de coordinación de V(V) conteniendo ligandos peroxo han recibido mucha atención fundamentalmente por las propiedades insulino-miméticas [1,2] o antitumorales [3], y como modelos funcionales en el estudio de ciertas haloperoxidasas dependientes de vanadio [4].

Sin embargo, ni las propiedades insulino-miméticas ni las propiedades antitumorales son exclusivas de este tipo de compuestos de vanadio(V) [5] ya que se observan en una variedad de compuestos de vanadio [6].

Se ha observado que algunos compuestos de vanadio poseen efectos similares a la insulina. Activan el metabolismo de la glucosa en ratas hiperglicémicas diabéticas permitiendo recuperar la normoglicemia y alcanzar estados parcialmente anabólicos [7]. En especial, se ha demostrado que el vanadato y el peróxido de hidrógeno actúan sinérgicamente para normalizar el nivel de glucosa en ratas [8]. En particular, se han sintetizado varios peroxocompuestos de vanadio(V) de diversos ligandos que presentaron acción insulino-mimética tanto *in vivo* como *in vitro* [9-12].

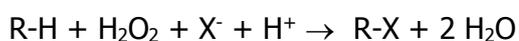
En relación a las propiedades antitumorales, los peroxocomplejos heterolépticos son sistemas interesantes por su estereoquímica. Además de poseer la porción vanadio(V)-peroxo presentan un ligando heterólogo en la esfera de coordinación, cuya presencia puede afectar el potencial redox de la cupla V(V)|V(IV) y la transferencia intramolecular de un electrón puede desencadenar la generación de radicales libres [13]. También se acepta que las propiedades antineoplásicas podrían deberse a la regulación celular de la fosforilación de tirosina, a través de la inhibición de proteína-tirosina fosfatasas (PTPasas) y/o la estimulación de tirosina-quinasa [14-17].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Como ya se indicó en secciones anteriores de este Trabajo de Tesis, el descubrimiento de haloperoxidasas dependientes de vanadio ha abierto un área muy activa en la química y bioquímica del vanadio [4,18].

Las haloperoxidasas constituyen un grupo especial de peroxidasas que catalizan la halogenación de diferentes sustratos mediante la participación de peróxido de hidrógeno, de acuerdo al siguiente esquema general:



Históricamente, las haloperoxidasas han sido nombradas de acuerdo al haluro, X^- , más electronegativo que son capaces de oxidar, como sigue:

- cloroperoxidasas, oxidan Cl^- , Br^- y I^-
- bromoperoxidasas, oxidan Br^- y I^-
- yodoperoxidasas, oxidan I^-

(Obviamente no existen fluoroperoxidasas, ya que el H_2O_2 no tiene el potencial suficiente para oxidar a ese haluro).

La mayoría de las haloperoxidasas conocidas son enzimas dependientes de hierro y su sitio activo está habitualmente constituido por un complejo porfirínico, generalmente la ferriprotoporfirina IX. Por su parte, el sitio activo de las enzimas dependientes de vanadio contiene un átomo de V(V) en coordinación trigonal bipyramidal, unido a un átomo de N de un residuo de histidina en una de las posiciones axiales y un grupo OH o una molécula de agua (según el pH del medio) en la otra. Las posiciones ecuatoriales están ocupadas por tres átomos de oxígeno.

Se ha reportado una gran variedad de peroxocomplejos que son modelos funcionales y/o estructurales de las haloperoxidasas y cuya reactividad, en muchos casos, permite reproducir las reacciones de la enzima [6,19]. En relación con lo antedicho, hay ya abundantes ejemplos de la aplicación de haloperoxidasas o de algunos de sus modelos sintéticos como catalizadores para obtener compuestos con elevada pureza enantiomérica [20]. Más allá de las aplicaciones de las haloperoxidasas, la variedad de

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

usos de los peroxocomplejos de vanadio(V) en química sintética es sumamente amplio [21].

En este Trabajo de Tesis se han realizado estudios con dos peroxocomplejos de V(V): el carbonato oxodiperoxovanadato(V), $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$, y el nitriloacetato oxodiperoxovanadato(V), $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$. Si bien las síntesis de estos complejos ya habían sido reportadas, existía escasa información respecto a sus propiedades espectroscópicas y ninguna acerca de su posible actividad biológica. Por lo tanto, en este trabajo se planteó fundamentalmente complementar la información existente en cuanto al comportamiento espectroscópico-vibracional y analizar la existencia de una eventual actividad biológica.

3.2 Síntesis de los complejos

3.2.1 Síntesis de $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$

La síntesis de este complejo fue inicialmente reportada en un trabajo de Stomberg (1985). En este trabajo la síntesis fue llevada a cabo según se describe en el trabajo del referido autor [22].

Para la síntesis del complejo se pone a reaccionar una suspensión de 0,23 g de V_2O_5 y 10 g de K_2CO_3 en 50 mL de H_2O_2 1,5% en baño de hielo. Se obtienen cristales color amarillo pálido luego de aproximadamente 20 días de mantener la solución resultante en heladera (5-10 °C). Se lavan los cristales con 3 porciones de 5 mL de etanol frío y 5 mL de agua destilada enfriada. Se elimina el residuo de humedad apretando el sólido entre papel absorbente, varias veces. Los cristales se guardan en desecador a vacío sobre H_2SO_4 concentrado.

En estas condiciones permanece estable y sin descomponerse, por lo menos unos treinta días. El rendimiento obtenido en la síntesis de este complejo resultó ser 65%.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

3.2.2 Síntesis de $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

La síntesis de este complejo fue originalmente reportada por Djordjevic y colaboradores [23] y fue la utilizada en este trabajo.

Bajo calentamiento suave se disuelven 1,0 g de V_2O_5 y 1,0 g de KOH en 15 mL de agua. Con agitación constante se añade una mezcla de 1,6 g de ácido nitrilotriacético (H_3NTA) en 15 mL de agua. Se agrega a la mezcla de reacción 3 mL de H_2O_2 30% lentamente y de a gotas, a continuación se ajusta el pH a 5-6 con HCl 0,1 N. Se filtra la solución y se inicia la precipitación mediante agregado de etanol, hasta observar una turbidez que perdura con la agitación. Se deja en reposo durante la noche y luego se separa el sólido precipitado por filtración. Finalmente, dejando la mezcla de reacción durante un día en heladera ($5^{\circ}C$ - $10^{\circ}C$) se obtienen cristales de un sólido color rojo-anaranjado. Se lava el sólido obtenido con cuatro porciones de 5 mL de etanol frío y dos porciones de 3 mL de agua destilada fría. Se termina de secar presionando con papel absorbente, y se deja secar al aire.

Conservado en desecador a vacío sobre H_2SO_4 concentrado la estabilidad de los cristales es muy alta y no se observan cambios aún luego de varios meses. El rendimiento obtenido en la síntesis de este complejo es de 55%.

3.3 Caracterización analítica

3.3.1 Análisis Elemental

3.3.1.1 Complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$

A pesar que el complejo originalmente fue reportado anhidro por Stomberg [22], los resultados obtenidos sugieren la presencia de una molécula de agua por mol de complejo.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los resultados del análisis elemental se resumen en la Tabla 3.1:

Calculado para $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ (PF=326,25)		Experimental	
%C	3,68	%C	3,60
%V	15,61	%V	15,67
%H	0,61	%H	0,58

Tabla 3.1: Análisis elemental del complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$

3.3.1.2 Complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

En el mencionado artículo de Djordjevic y *col.* el complejo se describe con diferentes grados de hidratación, anhidro, dihidratado y pentahidratado [23]. En este Trabajo de Tesis, en las condiciones experimentales utilizadas se favorece la formación del complejo dihidratado, según apuntan los resultados obtenidos del análisis elemental.

Se adjuntan los resultados en la Tabla 3.2.

Calculado para $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ (PF=401,0)		Experimental	
%C	17,9	%C	17,8
%N	3,5	%N	3,5
%V	12,7	%V	12,6
%H	2,5	%H	2,6

Tabla 3.2: Análisis elemental del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

3.3.2 Caracterización estructural en estado sólido

3.3.2.1 Estructura cristalina de los complejos

3.3.2.1.1 Estructura cristalina del complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$

La caracterización de la estructura cristalina del complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ se realizó mediante el correspondiente diagrama de polvos de difracción de rayos X previamente reportado por Stomberg [22]. Compartiendo lo informado en ese trabajo, se verifica que el complejo cristaliza en cristales monoclinicos de grupo espacial Cm con $Z = 2$. El vanadio(V) presenta una coordinación pentagonal bipyramidal y el ligando CO_3^{2-} actúa como bidentado.

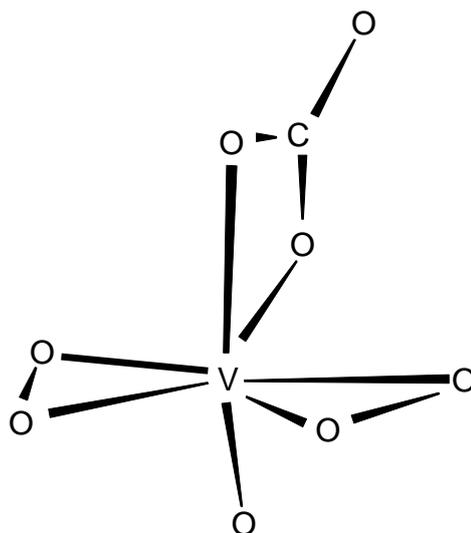


Fig. 3.1: Estructura esquemática del anión $[VO(O_2)_2CO_3]^{3-}$

Como se muestra en la Fig. 3.1 los dos grupos peroxo y el átomo de oxígeno del carbonato son prácticamente coplanares, generando el plano ecuatorial del anión en tanto que el átomo de oxígeno del otro carbonato y el grupo oxo ocupan las posiciones axiales.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

3.3.2.1.2 Estructura cristalina del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

Como mostraron Djordejovic y col. [23] el complejo cristaliza en el grupo espacial ortorrómbico $Pna2_1$ con $Z = 4$. El vanadio(V) presenta coordinación pentagonal bipiramidal distorsionada y el ligando nitriloacetato (NTA) actúa como tetradentado.

Como se muestra en la Fig. 3.2 el grupo peroxo junto al átomo de N y dos átomos de O del carboxilato conforman el plano ecuatorial, mientras que el grupo oxo y un tercer átomo de O del carboxilato ocupan las posiciones axiales.

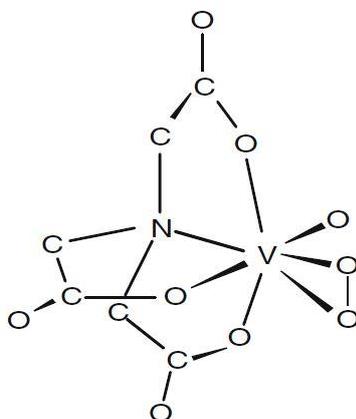


Fig. 3.2: Estructura esquemática del anión $[VO(O_2)NTA]^{2-}$

Durante nuestro trabajo, la estructura de este complejo se confirmó por difracción de rayos X y dado que en este caso se obtuvo un diagrama de polvos de muy alta calidad, se aprovechó el mismo para refinar nuevamente la celda unitaria del complejo.

Para este refinamiento se utilizó una versión localmente modificada del programa PIRUM de Werner [24]. Los resultados se muestran en las Tablas 3.3 y 3.4 (página 134).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

h k l	$d_{\text{observado}}$	I/I _o
0 1 1	9,214	13
1 1 0	6,560	30
1 1 1	5,866	100
1 2 0	4,931	18
0 2 2	4,607	48
0 1 1	4,100	25
1 2 2	3,940	2
1 3 0	3,754	8
1 3 1	3,608	15
2 2 0	3,279	8
2 2 1	3,179	50
0 3 3	3,070	20

Tabla 3.3: Diagrama de polvos del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

a (Å)	b (Å)	c (Å)	Método
7,608(2)	12.952(1)	13,107(2)	polvo
7,621(1)	13,002(3)	13,155(1)	monocristal [23]

Tabla 3.4: Parámetros de la celda unitaria ortorrómbica del $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$, refinados a partir del respectivo diagrama de polvos, comparados con los determinados a partir de monocristales [23].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

3.3.2.2 Espectroscopía vibracional FT-IR y FT-Raman

En esta sección del capítulo se describe el comportamiento espectroscópico-vibracional de los dos peroxocomplejos sintetizados y caracterizados previamente.

3.3.2.2.1 Complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$

En las Figs. 3.3 y 3.4 se muestran los espectros FT-IR y FT-Raman, respectivamente.

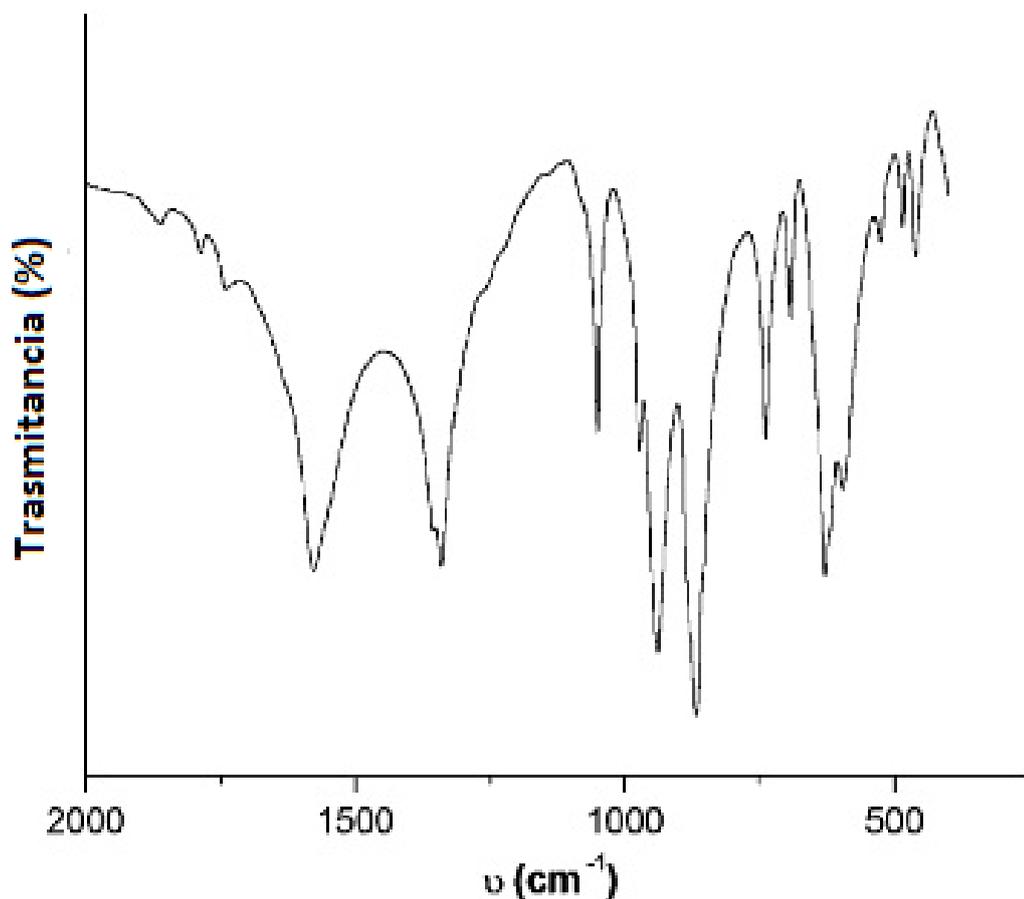


Fig. 3.3: Espectro IR de $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ en el rango 2000 a 400 cm^{-1} .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

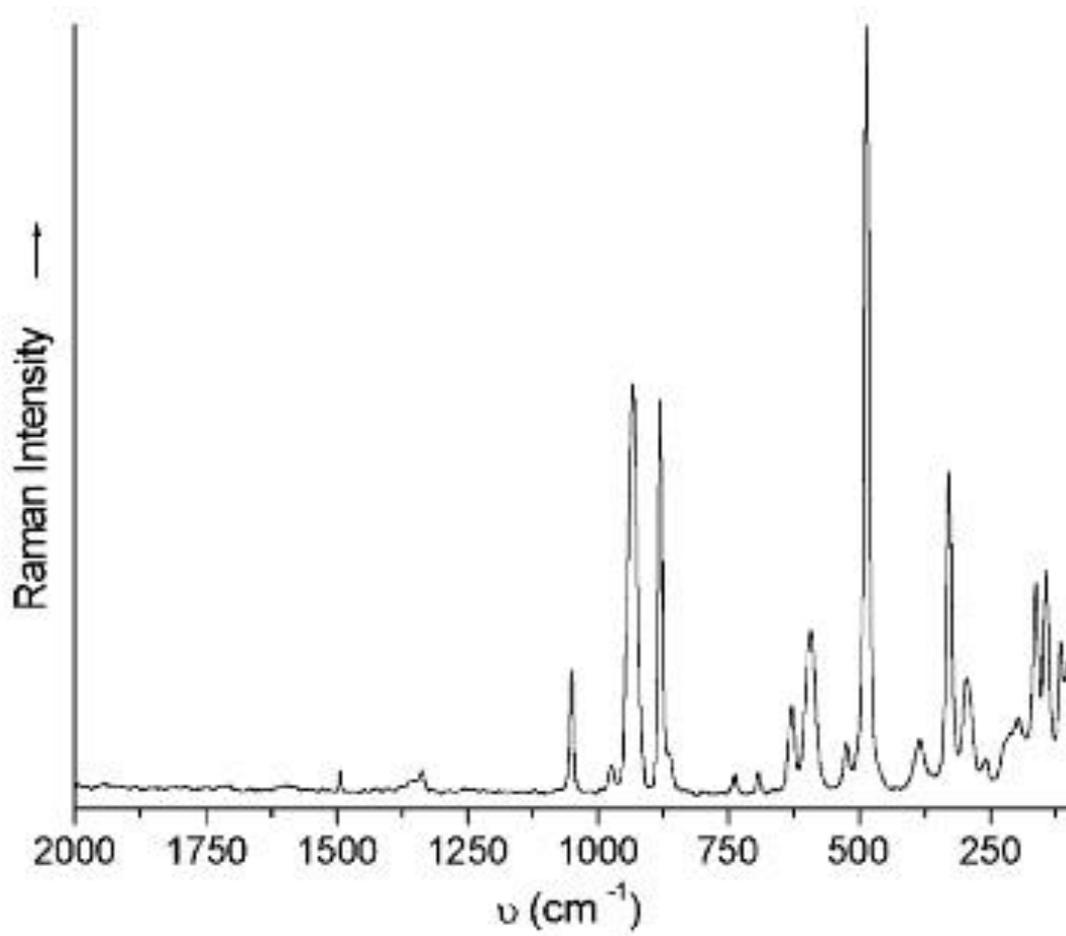


Fig. 3.4: Espectro Raman de $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ en el rango 2000 a 100 cm^{-1} .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Las asignaciones propuestas se presentan a continuación en la Tabla 3.5.

IR	Raman	Asignaciones
3185 mi, ancha		$\nu(\text{OH})$
1577 mi	1492 md	$\nu(\text{C-O}_{\text{II}})$
1350 h, 1340 mi	1337 d	$\nu(\text{C-O}_{\text{I}}) + \delta(\text{O}_{\text{I}}\text{O}_{\text{II}})$
1050 i	1050 m	$\nu(\text{C-O}_{\text{I}})$
972 d	973 md	Sobretono
938 i	932 i	$\nu(\text{V=O})$
868 mi	879 i	$\nu(\text{O-O})$
738 i	736 d	$\nu(\text{V-O}_{\text{I}}) + \delta_{\text{anillo}}$
692 m	692 d	$\delta(\text{O}_{\text{I}}\text{CO}_{\text{II}}) + \nu(\text{C-O}_{\text{I}}) + \nu(\text{V-O}_{\text{I}})$
627 mi	628 d	$\nu(\text{V-O}_2)$
594 d	592 m	$\nu(\text{V-O}_2)(?)$
526 d	523 d	Sobretono
485 d	484 mi	$\nu(\text{V-O}_{\text{I}})$
	384 d	$\nu(\text{V-O}_{\text{I}}) + \delta_{\text{anillo}}$
	329 i	$\delta(\text{O}_{\text{II}}\text{-V-O}_2)$
	295 m	$\delta(\text{O}_{\text{II}}\text{-V-O}_{\text{I}})$
	196 d	Modos de la red

Tabla 3.5: Asignación de los espectros IR y Raman para el complejo $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Referencias: mi: muy intensa; i: intensa; m: intensidad media; d: débil; h: hombro; O_{II} se refiere al átomo de oxígeno del grupo carbonato y O_{I} a los átomos de oxígeno enlazados al metal.

Las asignaciones se basan fundamentalmente en otros trabajos sobre peroxocomplejos de vanadio(V) [25-27] y en el trabajo de Fujita y colaboradores [28].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

A continuación se comentan los principales aspectos:

- El agua se encuentra evidentemente presente como agua de cristalización y los estiramientos O–H generan una banda IR relativamente ancha y asimétrica (no se muestra en la Fig. 3) mientras que no se encuentran señales para dichos modos en el espectro Raman. El modo de deformación $\delta(\text{H}_2\text{O})$ está evidentemente superpuesto con la banda intensa de IR a 1557 cm^{-1} [29].
- Es de destacar que las bandas Raman que son contrapartes de las bandas intensas de IR a 1577 cm^{-1} y 1340 cm^{-1} son señales prácticamente imperceptibles.
- La mayor parte de las bandas del ligando carbonato aparecen en los rangos usuales [28] mientras que la posición del estiramiento apical V=O es comparable al medido en $[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]$ [27], en excelente concordancia con las distancias V=O determinadas en ambos complejos: $1,617\text{ \AA}$ en $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ [22]; $1,606\text{ \AA}$ en $\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{NH}_3)]$ [30].
- Del análisis de las vibraciones de los grupos peroxo y VO_2^+ , se confirma que la agrupación metal-peroxo se comporta como un triángulo equilátero con simetría local C_{2v} [31].

Para este grupo, se esperan tres bandas IR y Raman: De estas vibraciones, el modo $\nu_1(\text{A}_1)$ tiene esencialmente las características de un estiramiento O–O o una deformación O–V–O, mientras que el modo $\nu_2(\text{A}_1)$ es fundamentalmente un estiramiento simétrico V–O parcialmente acoplado a un estiramiento O–O. Finalmente, el modo $\nu_3(\text{B}_1)$ se origina básicamente en el estiramiento antisimétrico V–O.

De acuerdo con este simple modelo, la banda intensa que se presenta en todos los peroxocomplejos entre 800 y 930 cm^{-1} , debe asignarse a estiramiento ν_1 (O–O), para este complejo, la banda intensa a 868 cm^{-1} y su contraparte Raman a 879 cm^{-1} .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Por otro lado, la banda intensa IR a 627 cm^{-1} , la cual aparece como una señal débil en el espectro Raman, se asigna a ν_3 en tanto que la banda de mediana intensidad Raman a 592 cm^{-1} , se asigna a ν_2 .

- Es interesante que la banda intensa Raman a 484 cm^{-1} podría estar relacionada a una interacción metal-ligando, que involucra los átomos de oxígeno del carbonato, aunque no se puede excluir su acoplamiento con otros modos V-L. La señal Raman muy débil a 973 cm^{-1} (972 cm^{-1} en el IR), es probablemente un sobretono de esa vibración.
- Las bandas débiles a 526 cm^{-1} en IR y 523 cm^{-1} en Raman son seguramente sobretonos o modos de combinación de algunos de las vibraciones de baja energía de la red.
- Algunos otros modos vibracionales relacionados al esqueleto vanadio-ligandos se han asignado tentativamente a partir de los datos Raman.

3.3.2.2.2 Complejo $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

La asignación de bandas del espectro IR y Raman del compuesto (Figs. 3.5 y 3.6) se resumen en la tabla 3.6 (página 140).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

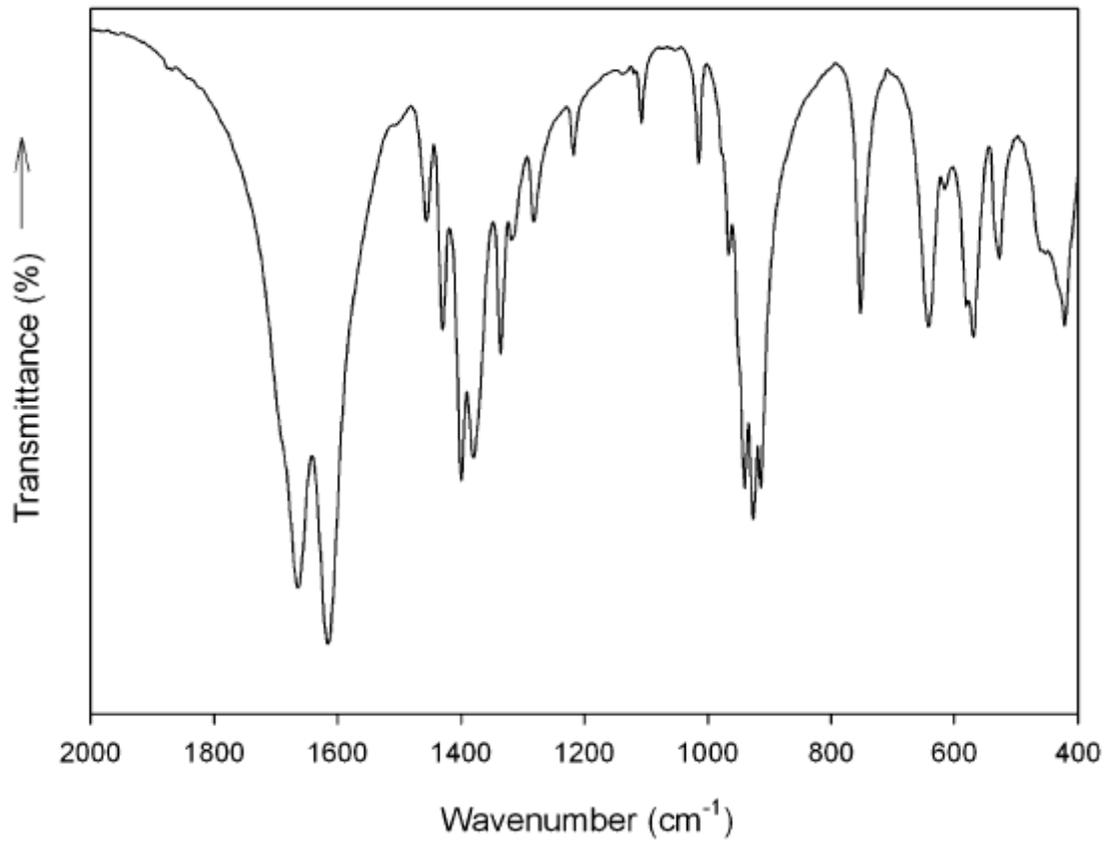


Fig. 3.5: Espectro FTIR del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ entre 2000 y 400 cm^{-1} .

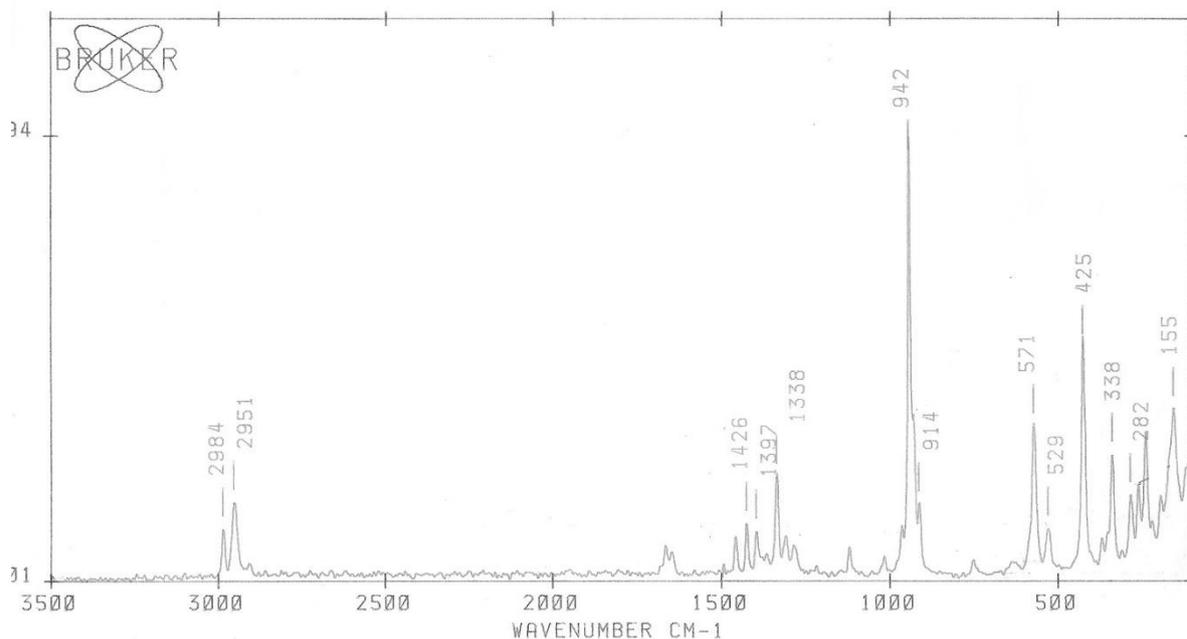


Fig. 3.6: Espectro Raman del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ en el rango 3500-250 cm^{-1} .

El espectro FT-IR del complejo se presenta en la Fig. 3.5 y las asignaciones propuestas, apoyadas también por datos de espectrofotometría vibracional Raman (Fig. 3.6), se muestran en la Tabla 3.6 (página 143). Estas asignaciones se realizaron sobre la base de algunas referencias generales [27,32,33] y de estudios previos en peroxocomplejos de vanadio [27,34,35].

Los principales aspectos se comentan brevemente a continuación:

- Las dos vibraciones de estiramiento O-H de las moléculas de agua se presentan como bandas de IR "muy intensas" y definidas, mientras que no se encontraron en el espectro Raman. Lamentablemente, no es posible realizar un mejor análisis de estas vibraciones por el hecho que las peculiaridades estructurales de las moléculas de agua no se reportaron en el análisis de la estructura del complejo [23]. Además, el modo de deformación de estas moléculas, $\delta(H_2O)$, está evidentemente solapado con el intenso doblete IR a 1664-1615 cm^{-1} .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- Respecto de las bandas de carboxilato, en el ácido libre la vibración de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ se presenta como una banda IR intensa a 1726 cm^{-1} mientras que el correspondiente modo $\nu(\text{C}-\text{O})$ aparece como una banda de intensidad media a 1334 cm^{-1} .

Luego de la formación del complejo ambas bandas se desplazan, una a menor frecuencia y la otra a mayor frecuencia. Es interesante que en el complejo, ambas bandas de estiramiento antisimétrico y simétrico, $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ respectivamente, aparecen claramente divididas, de acuerdo a la existencia de dos ligandos carboxilato estructuralmente diferentes (dos en el plano ecuatorial y una axial) [23].

Por otro lado, la diferencia de energía de las vibraciones de estiramiento de los carboxilatos (250 cm^{-1}) es concordante con el hecho que todos los grupos COO^- del ligando se encuentran coordinados como entidades unidentadas [29,36].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

IR	Raman	Asignaciones
3580 mi, 3373 mi		v(OH) agua
3238 m		Combinación de bandas
2981 d, 2944 md	2984 md, 2951 d	v(CH ₂)
2090 d		
1664 mi, 1615 mi	1665 d, 1640 md	v _{as} (COO ⁻)
1455 m, 1430 i	1461 m, 1430 m	δ _{sciss} (CH ₂)
1399 mi, 1380 mi	1397 m, 1380 md	vs(COO ⁻)
1336 i, 1318 d	1338 i 1302 d	v(C-COO ⁻)
1281 m	1286 d	v(C-C)
1217 d, 1107 d	1115 d	v(C-C)
1015 m	1020 md	v(N-C)
966 d	969 md	v(C-C)
940 mi	942 mi	v(V=O)
926 mi	927 h	v(O-O)
914 mi	914 d	γ(COO ⁻)
752 i	755 d	ρ(CH ₂)
642 i		v(V-O ₂)
615 md	618 md	ρ(COO ⁻)
582 h, 570 i	571 i	v(V-O ₂)
528 m	529 m	δ(COO ⁻)
457 h, 418 i	425 mi	v(V-N)
	338 i	v(V-O)

Tabla 3.6: Asignación de los espectros IR y Raman para el complejo K₂[VO(O₂)NTA]·2H₂O.

Referencias: mi: muy intensa; i: intensa; m: intensidad media; d: débil; md: muy débil
h: hombro, sciss: tijereteo.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- Para el análisis de las vibraciones de los grupos peroxo y de los VO₂ relacionados se suele admitir que el agrupamiento metal-peroxo se comporta como un triángulo equilátero con simetría local C_{2v} esperándose para este agrupamiento tres bandas activas IR y Raman, como ya se discutió en el caso anterior.

De acuerdo con este simple modelo la banda intensa entre 800 y 930 cm⁻¹ que se observa siempre en los peroxocomplejos debiera ser asignada al estiramiento O-O (ν_1), en el caso actual la banda intensa de IR a 926 cm⁻¹ y su débil contraparte Raman que se ve como un hombro a 927 cm⁻¹ en el lado de menor energía de la línea Raman.

Por otra parte, la banda intensa IR a 642 cm⁻¹, la cual no tiene contraparte en el espectro Raman, se asigna a ν_3 , mientras que la banda IR intensa a 570 cm⁻¹, con un débil hombro en el lado de mayor energía se asigna a ν_2 . En el espectro Raman este modo vibracional se presenta también como una banda relativamente intensa a 571 cm⁻¹.

- La intensa banda Raman a 942 cm⁻¹ y su contraparte IR, también intensa, a 940 cm⁻¹, pueden con seguridad asignarse a las vibraciones de estiramiento características $\nu(V=O)$.

La energía de esta vibración es prácticamente coincidente con la medida para el mencionado estiramiento en el previamente analizado complejo K₃[VO(O₂)₂CO₃].H₂O y en el NH₄[VO(O₂)₂(NH₃)] [27], de acuerdo con el hecho que la longitud de enlace V=O es prácticamente igual en los tres complejos.

- Por comparación de los espectros de NTA libre con el del complejo fue también posible asignar dos de las bandas metal-ligando.
- Algunos modos del esqueleto y también los modos de deformación pudieron ser asignados. En este contexto es interesante mencionar que se identificó la vibración $\delta_{sciss.}(CH_2)$ característica en la forma de un doblete IR (a 1455 y 1430

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

cm^{-1}). En el NTA libre esta banda fue identificada a 1436 cm^{-1} con un hombro débil a 1457 cm^{-1} .

3.3.3. Caracterización de los complejos en solución acuosa

3.3.3.1 Espectroscopía electrónica UV-Vis de los peroxocomplejos $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]$ y $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Los espectros electrónicos de ambos complejos muestran el comportamiento que es típico de este tipo de compuestos [25], mostrando una banda muy intensa localizada en torno a los 200 nm y una más débil en la zona de los 300-400 nm.

3.3.3.1.1 Espectro electrónico UV-Vis del complejo $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]^{3-}$ en solución acuosa

El espectro electrónico de este complejo muestra una banda muy intensa centrada en 196 nm ($\epsilon \sim 10,500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y otra más débil localizada a 316 nm ($\epsilon \sim 670 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) la que muestra un decaimiento lento hacia la región visible y es, de este modo, responsable del color del complejo.

La banda de mayor energía puede asignarse a una transferencia de carga del grupo oxo al vanadio(V) central. Para comparación, se recuerda que en el caso del anión ortovanadato, VO_4^{3-} , este tipo de transferencias de carga $\text{O} \rightarrow \text{V}$ se encuentran a 200 y 270 nm [37]. La segunda banda ha sido generalmente asignada a transferencias de carga que involucran los grupos peroxo. Más concretamente, estas transiciones involucran orbitales π^* de los grupos peroxo y orbitales d_{xy} y $d_{x^2-y^2}$ del metal central [25,27].

Esta "donación π " está evidentemente favorecida por la alta carga del vanadio [35] y permite explicar, en parte, el acortamiento observado de los enlaces O-O que en el caso presente muestra un valor de $1,467 \text{ \AA}$ [22] el cual es algo más corto que el valor generalmente esperado para este enlace ($1,49 \text{ \AA}$) [27].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

3.3.3.1.2 Espectro electrónico UV-Vis del complejo $[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]^{2-}$ en solución acuosa

En este caso la absorción más intensa está localizada en aproximadamente 190 nm (la posición exacta no pudo ser determinada) y muestra un bien definido hombro a 200 nm ($\epsilon \sim 15.280 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La segunda banda esperable, más débil, se localiza en 432 nm ($\epsilon \sim 430 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y es la que, en definitiva, puede considerarse como la responsable del color del complejo. La asignación de estas bandas es, obviamente, análoga a la propuesta para el caso del $[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]^{3-}$.

3.4 Actividad biológica de los peroxocomplejos

3.4.1 Actividad biológica del complejo $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$

En la Fig. 3.7 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de este peroxocomplejo en células formadoras de hueso normales y tumorales en cultivo.

Como puede verse, a concentraciones bajas (2,5- 5 μM) el complejo es más tóxico para osteoblastos no transformados que para las células tumorales ($p < 0,001$).

En el rango de 10 – 100 μM , los efectos deletéreos son similares para ambas líneas celulares. A la máxima concentración ensayada (100 μM), las células metabólicamente activas son aproximadamente 10 – 12% de las del control (sin adición del complejo).

Es bien conocido que el vanadato, el catión VO^{2+} , y el pervanadato (mezcla H_2O_2 /vanadato) [38]) pueden modular la proliferación celular [39]. En general, el vanadio ejerce un efecto bifásico en mitogénesis, promoviéndola a bajas dosis e inhibiendo el crecimiento celular a mayores concentraciones.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

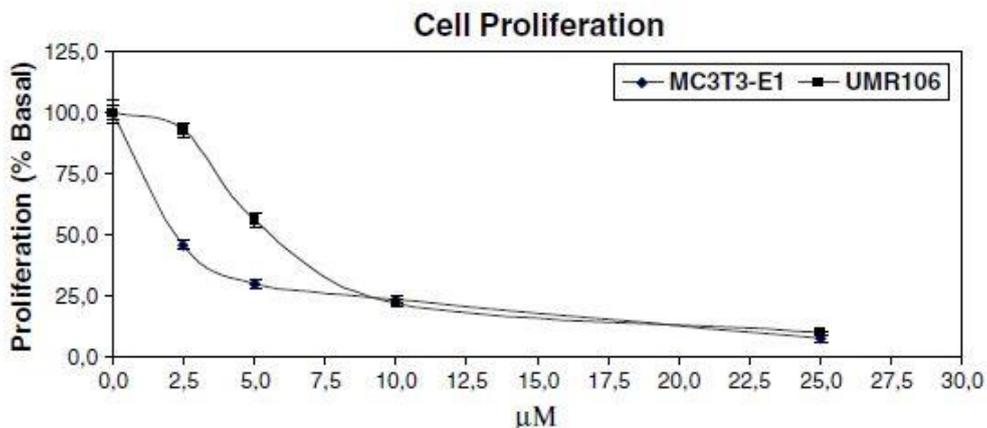


Fig. 3.7: Efecto de $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ en la proliferación de células tipo osteoblasto MC3T3E1 y UMR106. Las células fueron incubadas en DMEM libre de suero solamente (basal) o con diferentes concentraciones del complejo a $37^\circ C$ por 24 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal y representan la media \pm SEM (n=6).

El peroxocomplejo aquí ensayado, $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$, aparece como el compuesto más tóxico que dentro de la experiencia del grupo de trabajo de Bioquímica Patológica (UNLP) haya sido probado en células osteoblasto-símiles en cultivo. Sin embargo, se pueden observar diferencias que dependen del tipo de célula y de la naturaleza de la especie de vanadio [39-42].

El pervanadato ha demostrado ser más potente insulino-mimético que el vanadato [8,43]. El pervanadato también estimula la proliferación de células UMR106 a bajas concentraciones mientras que las dosis mayores no causan ningún efecto [39].

Ha sido previamente demostrado que el pervanadato potencia la acción de la insulina en adipocitos promoviendo la activación de receptores de insulina (autofosforilación) en dichas células [43] y también es conocido que las células UMR106 tienen una fostatasa alcalina citosólica que se comporta, al menos parcialmente, como una proteína-tirosina fostatasa (PTPasa) [44]. El pervanadato podría inhibir esta enzima y de esta manera promover la autofosforilación del receptor de insulina el cual, a su vez, causa el aumento de la mitogénesis mediada por este compuesto. Otros derivados del vanadio causan mitogénesis a través de la activación de la ruta de la quinasa regulada

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

extracelularmente (Erk) la cual clásicamente está asociada a sucesos mitogénicos [45] y la protección de muerte celular [46, 47].

Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que la ruta de Erk también media la detención del ciclo celular y la apoptosis [48] como ha sido reportado por la adición de algunos derivados de peroxovanadio (pV). Estos compuestos son potentes inhibidores de PTPasas [49], neuroblastoma NB 41 y células de glioma C6. El efecto observado fue un marcado decrecimiento en las velocidades de proliferación celular y una acumulación progresiva en la transición G2/M del ciclo celular. El efecto producido se encontró dependiente de la dosis, del tipo celular, y de los pV utilizados [50].

Los resultados preliminares obtenidos sobre el efecto del complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$ en células en cultivo podrían deberse a un mecanismo de este tipo.

3.4.2 Actividad biológica del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$

La Fig. 3.8 muestra el efecto de diferentes concentraciones del complejo de vanadio en las tres líneas celulares en cultivo, que fueron ensayadas en este caso. Como puede verse, a dosis bajas (5 μM) el complejo estimula la proliferación de células UMR106 (115% sobre el basal, $p < 0,05$) mientras que para concentraciones mayores a 25 μM el complejo causa inhibición de la mitogénesis de manera dosis-dependiente ($p < 0,001$).

Para los osteoblastos tumorales, aproximadamente 10 % de la población celular del basal (sin la adición del complejo) sobrevive a 75 y 100 μM . La concentración inhibitoria media máxima (CI_{50}) para $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ en la línea celular de osteosarcoma resultó 35 μM .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

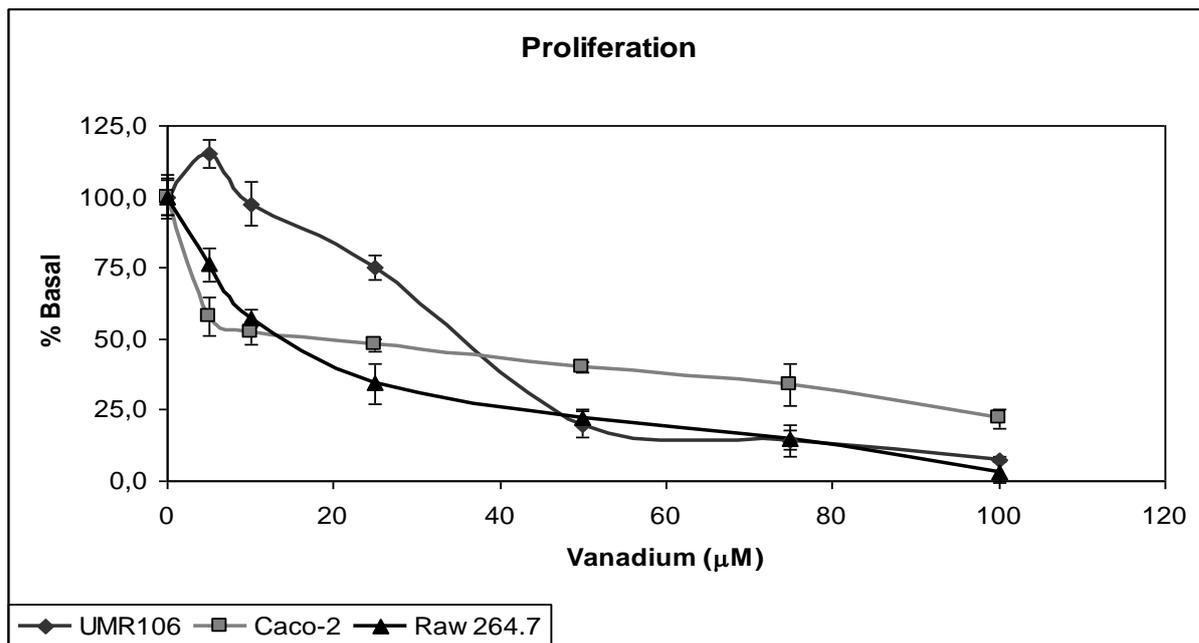


Fig. 3.8: Efecto de $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ en la proliferación celular. Las células se incubaron en DMEM libre de suero sólo (basal) con diferentes concentraciones del complejo a 37°C por 24 horas. Los resultados se expresan como porcentaje del basal y representan la media \pm error estándar de la media ($n=6$)

Estos resultados indican que para los osteoblastos tumorales UMR106 el complejo en cuestión es menos tóxico que el anteriormente ensayado, $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$, un compuesto con dos grupos peroxo en la esfera de coordinación del ion vanadio(V), el cual, como se vio, no causa estimulación de la mitogénesis a dosis bajas en esta línea celular tumoral. Además, en las líneas Caco-2 y Raw 265.7, el complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ ejerció una inhibición dosis-respuesta en el rango completo de concentraciones ensayadas, como puede verse también en la Fig. 3.8. A pesar que $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ es un compuesto inhibidor de la proliferación de estas dos líneas celulares en el rango completo de concentraciones, la disminución observada para la mitogénesis en Caco-2 fue menor que para los macrófagos (aproximadamente 25% y 10% de células metabólicamente activas *vs* control a 100 μ M, respectivamente).

La diferencia observada podría atribuirse al hecho que las células Caco-2 crecen formando grupos de células a diferencia de las monocapas de macrófagos. Esta característica podría ser un factor de protección de la primera línea celular. Sin embargo, la CI_{50} para estas dos líneas es 10 μ M indicando una mayor sensibilidad de

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

estas células hacia la acción perjudicial del complejo cuando se compara con las células transformadas UMR106.

Generalmente, los compuestos de vanadio ejercen una acción bifásica sobre la mitogénesis: la promueven a dosis bajas e inhiben el crecimiento celular a concentraciones más altas.

Como se ha explicado anteriormente, varios mecanismos subyacen los efectos biológicos observados.

Una de las propuestas más fuertes es que los compuestos de vanadio activan diferentes vías de señalización principalmente a través de la inhibición de la proteína-tirosina fosfatasa (PTPasa) [51].

Como se dijo, las células UMR106 tienen una fosfatasa alcalina citosólica que se comporta, al menos parcialmente, como una PTPasa [44]. Dosis bajas del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ podrían inhibir a esta PTPasa y de este modo, promover la activación de vías de proliferación las cuales a su vez permiten el realce de la mitogénesis.

Sin embargo, los estudios preliminares realizados sobre el efecto de $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$ sobre células en cultivo también muestran una acción antiproliferativa del compuesto en las líneas Caco-2 y RAW 264.7. El incremento de estrés oxidativo o la activación de vías de señalización relacionadas con la muerte celular a través de la inhibición de la PTPasa podrían explicar el efecto antiproliferativo de concentraciones más altas del complejo en la línea de osteosarcoma UMR106.

Se necesitaría mayor investigación en modelos animales para diferentes tipos de tumores para comprender, mejor y más claramente, el efecto potencialmente antitumoral de $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$. En conjunto, los resultados de nuestros ensayos sugieren la complejidad de la acción citotóxica de complejos metálicos en células en cultivo, ya que los efectos observados dependen del metal, su esfera de coordinación, la naturaleza de los ligandos, las características del tipo celular, y las vías de transducción celular subyacentes a la acción tóxica.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Bibliografía

- [1] Crans, D.C., Keramidas, A.D., Hoover-Litty H., Anderson O.P., Miller M.M., Lemoine, L.M., Pleasic-Williams S., Vandenberg M., Rossomando, A.J., Sweet L.J. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5447 (1997)
- [2] Srivastava, A.K., Mehdi, M.Z., *Diabetic Med.* 22, 2 (2005)
- [3] Evangelou, A.M. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 249 (2002)
- [4] Crans D., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., Yang, L. *Chem. Rev.* 104, 849 (2004)
- [5] Becker, D.J., Ongemba, L.N., Henquin, J.C. *Eur. J. Pharmacol.* 260,169 (1994)
- [6] Rehder, D. *Bioinorganic Vanadium Chemistry*, Wiley, Chichester (2008)
- [7] Shechter, Y. *Diabetes* 39, 1 (1990)
- [8] Kadota, S., Fantus, I. G., Deragon, G., Guyda, H., Hersch, B., Posner, B.I. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 259 (1987)
- [9] Shaver, A., Ng, J.B., Hall D.A., Loon, B.S., Posner, B.I. *Inorg. Chem.* 32, 3109 (1993)
- [10] Posner, B. I., Faureb, R., Burgessc, J.W.,Bevand, A.P., Lachancee, D., Zhang-Sund, Fantusf. G.I., Ne, J.B., Hallg, D.A., Soo LUm, B., Shaver, A. *J. Biol. Chem.* 269, 4596 (1994)
- [11] Bevan A.P., Burgess J.W, Yale J.F., Drake P.G., Lachance, D., Baquiran G., Shaver, A., Posner, B.I. *Am. J. Physiol.* 268, E60 (1995)
- [12] Eriksson, J.W., Lönnroth, P., Posner, B.I., Shaver, A., Wesslau, C., Smith U.P., *Diabetologia* 39, 235 (1996)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [13] Djordjevic, C. "Antitumor activity of vanadium compounds". En: Siegel, H., Siegel, A. (Eds.) *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 31, p. 595, Marcel Dekker, Inc., New York (1995)
- [14] Kresja, C.M., Nadler, S.G., Esselstyn, J.M., Kavanagh, T.J., Ledbetter, J.A., Schieven G.L. *J. Biol. Biochem.* 272, 11541 (1997)
- [15] Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M.J., Ramachandran, C. *J. Biol. Chem.* 272, 843 (1997)
- [16] Fantus, G.I, Tsiani, E. *Mol. Cell. Biochem.* 182, 109 (1998)
- [17] Jaspers, I., Samet, J.M., Erzurum, S., Reed W. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23, 95 (2000)
- [18] Baran, E.J. "Vanadium in plants, fungi and bacteria. Structural aspects and functions". En: *Advances in Plant Physiology*, Hemantaranjan, H. (Ed.) Vol. 10, p. 357, Scientific Publishers, Jodhpur (2008)
- [19] Colpas, G. J., Hamstra, B.J., Kampf, J.W, Pecoraro, V.L. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3469 (1996)
- [20] ten Brink, H. B., Tuynman, A., Dekker, H.L., Hemrika, W., Izumi Y., Oshiro, T., Schoemaker, H.E., Wever, R. *Inorg. Chem.* 37, 6780 (1998)
- [21] Butler, A., Clague, M.J., Meister, G.E. *Chem. Rev.* 94, 18625 (1994)
- [22] Stomberg, R., *Acta Chem. Scand.* A39, 725 (1985)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [23] Djordjević, C., Wilkins, P.L., Sinn, E., Butcher, R.J. *Inorg. Chim. Acta* 230, 241 (1995)
- [24] Werner, P.E. *Ark. Kemi* 31, 51 (1969)
- [25] Tatierysky, J., Pacigová, S., Sivák, M., Schwendt, P., *J. Argent. Chem. Soc.* 97, 181 (2009)
- [26] Tótaró, R.M. Tesis doctoral , Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina (2002)
- [27] Baran E.J., *Monatsh. Chem.* 108, 989 (1977)
- [28] Fujita, J., Martell, A.E., Nakamoto, K. *J.Chem.Phys.* 36, 339 (1962)
- [29] Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th. Edition, John Wiley, New York (1997)
- [30] Drew, R.E., Einstein, F.W.B. *Inorg. Chem.* 11, 1079 (1972)
- [31] Griffith, W.P. *J. Chem. Soc.* 5248 (1964)
- [32] Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G., Grasselli J.C. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego (1991)
- [33] Smith, B., *Infrared spectral interpretation*. CRC Press, Boca Raton (1999)
- [34] Arrambide, G., Rivadeneira, J., Etcheverry, S.B, Parajón-Costa B.S., Gambino D., Baran, E.J., *Biol.Trace. Elem. Res.* 132, 176 (2009)
- [35] Tuck D.G., Walters R.M. *Inorg. Chem.* 2, 428 (1963)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [36] Deacon, G.B., Phillips, R.G., *Coord. Chem. Rev.* 33, 227 (1980)
- [37] Müller, A., Diemann, E., Jørgensen, C.K., *Struct. Bond.* 14, 23 (1973)
- [38] Fantus, I.G., Kadota, S., Deragon, G., Foster, B., Posner, B.I., *Biochemistry* 28, 8861 (1989)
- [39] Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 145, 97 (1995)
- [40] Sálice, V.C., Cortizo, A.M., Gómez Dumm, C.L., Etcheverry, S.B., *Mol. Cell. Biochem.* 198, 119 (1999)
- [41] Etcheverry, S.B., Williams, P.A.M., Barrio, D.A., Sálice, V.C., Ferrer, E.G., Cortizo, A.M., *J. Inorg. Biochem.* 80, 169 (2000)
- [42] Barrio, D.A., Williams, P.A.M., Cortizo, A.M., Etcheverry, S.B., *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 459 (2003)
- [43] Shisheva, A., Shechter, Y., *Endocrinology* 133, 1562 (1993)
- [44] Cortizo, A.M., Sálice, V.C., Etcheverry, S.B., *Biol. Trace Elem. Res.* 41, 331 (1994)
- [45] Pandey, S.K., Théberge, J.F., Bernier, M., Srivastava, A.K., *Biochemistry* 38, 14667 (1999)
- [46] Cheatham, B., Khan, R., *Endocrine Rev.* 16, 117 (1995)
- [47] Kitagawa, D., Tenemura, S., Ohata, S., Shimizu, N., Nishitai, G., Watanabe, T., Nakagawa, K., Kishimoto, H., Wada, T., Tezuka, T., Yamamoto, T., Nishina, H., Katada, T., *J. Biol. Chem.* 277, 366 (2002)
- [48] Blázquez, G., Galve-Roperh, Guzmán, M., *FASEB J.* 14, 2315(2000)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[49] Posner, B.I., Faure, R., Burgess, J.W., Bevan, A.P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I.G., Ng, J.B., Hall, D.A., Lum, B.S., *J. Biol. Chem.* 269, 4596 (1994)

[50] Faure, R., Vincent, M., Dufour, M., Shaver, A., Posner, B.I., *J. Cell. Biochem.* 59, 389 (1995)

[51] Swarup, G., Cohen, S., Garbens, D.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1104 (1982)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Capítulo 4

Síntesis y caracterización de complejos de oxovanadio (IV y V) con tropolona como ligando

4.1 Introducción

Recientemente, se ha preparado y caracterizado un gran número de complejos metálicos de hidroxipironas e hidroxipiridinonas, explorado sus posibles aplicaciones en el campo de Química Inorgánica Medicinal [1].

La mayoría de estas α -hidroxicetonas, derivadas de anillos de seis miembros, forman complejos relativamente estables con cationes divalentes y trivalentes. En particular, los complejos de oxovanadio(IV) de 3,4-hidroxipironas, como el bis(maltolato)oxovanadio(IV) y otros derivados del maltol, han sido explorados como agentes potenciadores de la insulina [1-3].

La tropolona (2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona, Htrop, Fig. 4.1) es una interesante α -hidroxicetona, pero derivada de un anillo de siete miembros, que también forma complejos estables con numerosos metales [4-6].

Por otra parte, la tropolona por sí misma tiene actividad antibacteriana e insecticida [7,8], también funciona como inhibidor de metaloproteínas [9], y es un fuerte inhibidor de la tirosinasa [10,11].

Algunos derivados de la tropolona tienen actividad antitumoral [12,13], mientras que algunos otros, como β -tujaplicinol y manicol, son potentes y selectivos inhibidores de la actividad de la ribonucleasa H de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 [14].

Se conoce la estructura molecular y cristalina de la tropolona [15] y de algunos de sus derivados [16,17], y también los complejos bis(tropolonato) de Cu (II) [18] y de Zn(II) [19].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

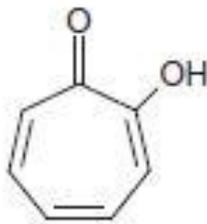


Fig. 4.1: Representación esquemática de tropolona (Htrop), 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona.

A efectos de extender estudios previos de complejos de oxovanadio(IV) y oxovanadio(V) [20-25] se investigaron los complejos de estos dos oxocaciones con la tropolona. Además, con fines comparativos, fueron preparados también los respectivos complejos de Co(II), Cu(II) y Zn(II).

4.2 Síntesis de los complejos

4.2.1 Síntesis de [VO(trop)₂]

Se ha seguido el procedimiento descrito por Lee y Hwang [26] como se indica a continuación: 0,50 g (4 mmol) de tropolona se disolvieron en 100 mL de una mezcla agua: etanol (50:50) y se agregó de a gotas a una solución agitada magnéticamente la cual contenía 0,51 g (2 mmol) de $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 50 mL de una mezcla de solventes idéntica a la anterior en la que se había disuelto la tropolona.

Luego de mezclar bien, se elevó el pH hasta 8,5 (tiras reactivas) mediante la adición de NaOH 1N, la solución resultante se calentó a reflujo, con agitación constante, durante 2 horas y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El polvo verde oscuro generado se filtró y se lavó con pequeñas porciones (2 mL) de etanol frío, y finalmente se dejó secar *in vacuo* sobre H_2SO_4 .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

4.2.2 Síntesis de $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$

Este complejo fue obtenido mediante la adición de 1,74 g (10 mmol) de VOCl_3 a una solución conteniendo 5,0 g (40 mmol) de tropolona en 100 mL de CCl_4 . La reacción ocurre inmediatamente, pero se dejó agitando magnéticamente toda la noche para asegurar que la reacción fuera completa [27]. El producto verde oscuro se filtró, y se lavó repetidamente con CCl_4 . Finalmente se dejó secar *in vacuo* sobre H_2SO_4 .

Se evitó usar, como es sugerido en la literatura, trietilamina, para facilitar la formación del tropolonato en solución [27], ya que luego los complejos generados resultan contaminados con dicha base, lo que fue observado en los espectros IR.

Además, se ha desarrollado un método alternativo para la síntesis del complejo $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$, basado en una metodología analítica conocida [28]: se disolvieron 0,52 g (4,3 mmol) de NaVO_3 en 20 mL de agua destilada y se agregaron 5 mL de HCl concentrado. El eventual precipitado de V_2O_5 se filtró.

Luego, se disolvieron 1,10 g (9 mmol) de tropolona en 20 mL de cloroformo y esta solución se goteó en la solución que contiene vanadio, la cual se mantuvo con agitación continua. La mezcla se agitó por una hora más, y entonces se separó el complejo $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$ por filtración, se lavó con varias porciones de CCl_4 y finalmente se secó en desecador a vacío sobre H_2SO_4 . Los datos analíticos y espectroscópicos confirmaron la identidad del complejo así obtenido.

Los complejos $[\text{Co}(\text{trop})_2]$, $[\text{Cu}(\text{trop})_2]$ y $[\text{Zn}(\text{trop})_2]$ se obtuvieron mezclando lentamente soluciones de tropolona en metanol-agua (50:50) y los acetatos metálicos en relación molar 2:1 y calentando a reflujo las mezclas de reacción con agitación por 2 horas [6,18]. Los cristales obtenidos se separaron por filtración, se lavaron varias veces con metanol frío, y finalmente se secaron *in vacuo* sobre H_2SO_4 .

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

4.3. Caracterización de los complejos

4.3.1. Análisis elemental

Complejo	% C	% H
[VO(trop) ₂]	54,33 (54,38)	3,30 (3,23)
[VO(trop) ₂ Cl]	48,20 (48,78)	3,05 (2,90)

Tabla 4.1: Resultado de análisis elemental para los complejos de vanadio (IV) y (V) con ligando tropolonato. Los valores en negrita son los teóricos para los complejos que responden a las fórmulas mostradas.

4.3.2 Consideraciones estructurales

Las estructuras cristalinas de los dos complejos de oxovanadio investigados no se conocen. Si embargo, de la información espectroscópica y demás propiedades fisicoquímicas determinadas en este trabajo, se mostró la generación de dos anillos quelato de 5 miembros en torno a los centros metálicos, similares a los encontrados en [Cu(trop)₂] [18].

Ambos complejos pudieron aislarse como unidades no poliméricas con el ligando oxo perpendicular al VO₄ aproximadamente plano que se genera de la unión de los ligandos tropolonato.

En el caso del complejo V(V), [VO(trop)₂Cl], el ion cloruro se coordina *trans* al grupo oxo.

Para el [VO(trop)₂], la simetría local del complejo podría ser C_{4v}. Sobre la base de estudios de EPR, para éste y otros complejos de oxovanadio(IV) relacionados, con ligandos quelantes bidentados, se pudo demostrar que la simetría en realidad se reduce a C_{2v} [29].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

4.3.3 Espectros electrónicos y comportamiento en solución de [VO(trop)₂]

Las soluciones de complejos quelato con diferentes anillos de 5 miembros como el [VO(trop)₂], son relativamente inestables en presencia de oxígeno, especialmente cuando el solvente es agua o metanol [29]. Las soluciones originales de color verde cambian rápidamente de coloración a rojo-anaranjado en contacto con el aire, por la oxidación de V(IV) a V(V).



Se ha investigado en forma cualitativa este comportamiento en diferentes solventes orgánicos (metanol, DMF, CHCl₃, THF, DMSO) y en todos ellos se han observado cambios de color de verde a rojo-anaranjado relativamente rápidos. En todos los casos, con diferentes solventes, los espectros del complejo [VO(trop)₂] fueron idénticos a los análogos obtenidos con soluciones de [VO(trop)₂Cl], confirmándose así la oxidación de V(IV) a V(V) en las soluciones.

En la Fig. 4.2 (página 161) se observa el espectro electrónico en el rango 260-500 nm obtenido a partir de soluciones de tropolona libre en DMSO y las de los dos complejos de oxovanadio.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

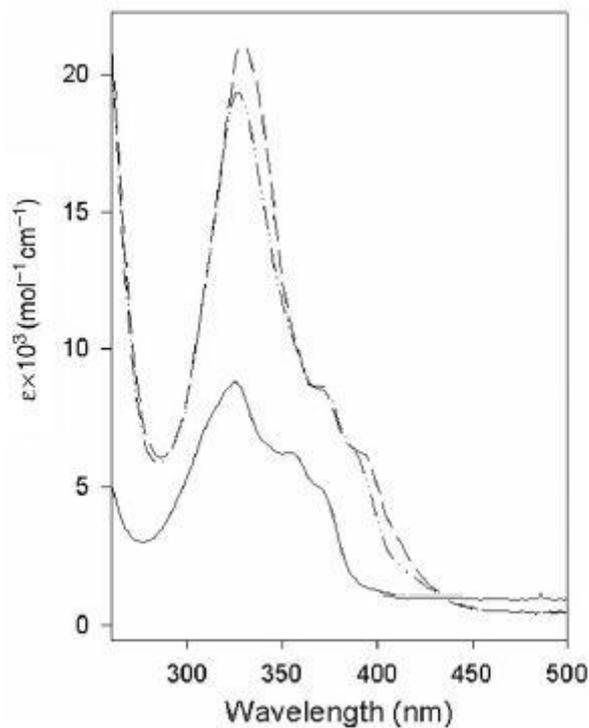


Fig. 4.2: Espectros de absorción electrónica en el rango espectral 260-500 nm de Htrop (—), [VO(trop)₂] (-----) y [VO(trop)₂] (-·-·-·-)

En la Tabla 4.2 se muestran las posiciones de las bandas.

Tropolona		[VO(trop) ₂]		[VO(trop) ₂ Cl]	
Banda (nm)	$\epsilon \times 10^{-3}$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Banda (nm)	$\epsilon \times 10^{-4}$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Banda (nm)	$\epsilon \times 10^{-4}$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
310 (h)					
325	7,85	328	20,62	327	18,93
		338 (h)		332 (h)	
354 (h)		372 (h)		372 (h)	
372 (h)		398 (h)		≈388-390 (h)	

Tabla 4.2: Espectros electrónicos de la tropolona libre y de los dos compuestos de oxovanadio en soluciones de DMSO. "h" – hombro.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

En todos los casos, se observa otra banda de absorción a 260 nm (con los siguientes valores de absorptividad ϵ , en $L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$: tropolona = 4.76×10^3 , $[\text{VO}(\text{trop})_2]$ $20,82 \times 10^4$ y $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}] = 20,47 \times 10^3$). Como estas bandas se encuentran en el límite de corte del solvente, deben de considerarse cuidadosamente.

No pudieron detectarse otras bandas, aun trabajando con soluciones más concentradas.

Estos resultados muestran claramente que con independencia del origen de los complejos disueltos, los espectros obtenidos son prácticamente coincidentes, mostrando solo menores diferencias de intensidad.

Las transiciones electrónicas observadas son transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo aromático [30] y los hombros observados en el lado de menor energía de los espectros se relacionan probablemente con la estructura vibrónica de alguna de estas transiciones [31]. Las diferencias de intensidad entre los espectros de la tropolona libre y los de los complejos pueden ser atribuidas a que en los complejos hay dos anillos de tropolona por lo que se da el aumento aditivo de la banda principal por la contribución de una transición de transferencia de carga [30].

4.3.4 Espectros vibracionales

4.3.4.1 Espectros vibracionales del complejo $[\text{VO}(\text{trop})_2]$

En la Fig. 4.3 (página 163) se muestra los espectros FT-IR y FT-Raman de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$, entre 1700 y 400 cm^{-1} .

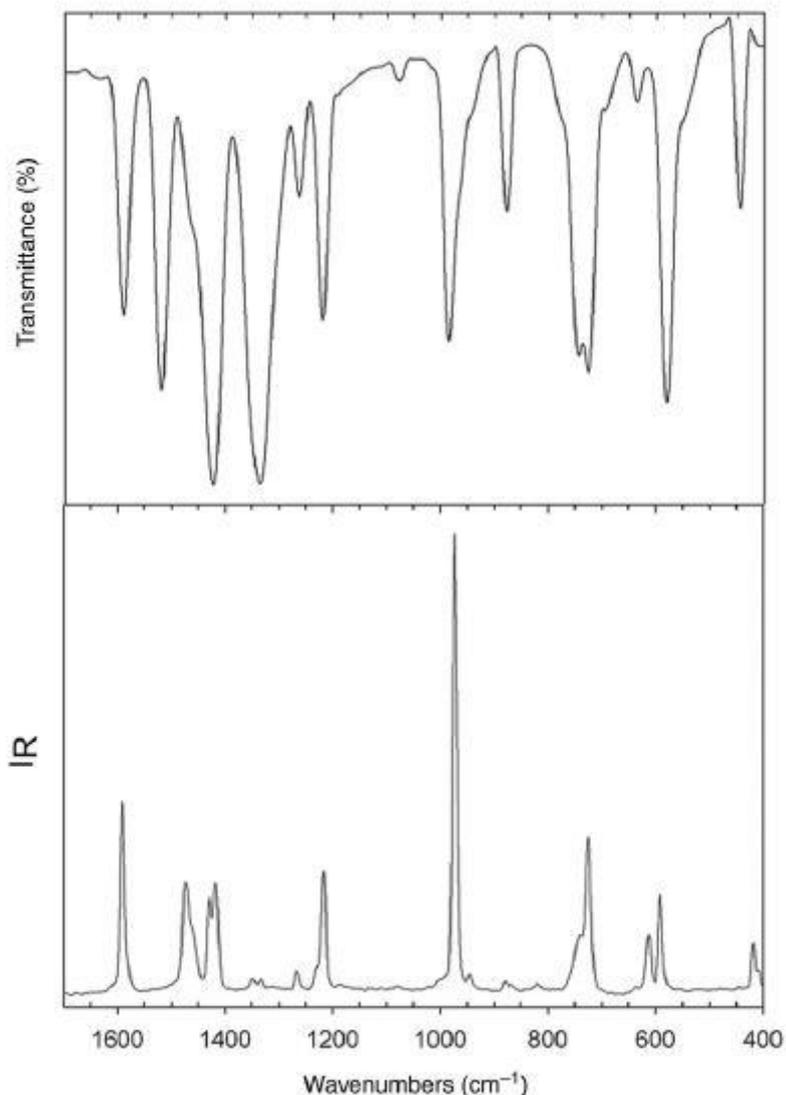


Fig. 4.3: Espectros FT-IR (arriba) y FT-Raman (debajo) de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$ en el rango espectral 1700-400 cm^{-1} .

En la Tabla 4.3 se presentan las asignaciones propuestas, las cuales pueden comentarse de la siguiente manera:

- La asignación de las dos primeras bandas intensas en IR se basa en los argumentos de Junge [32] relativos a una investigación de tropolona y sus complejos de Cu(II) mediante tropolona marcada con ^{18}O . Este estudio

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

demonstró que a pesar del acoplamiento fuerte de las vibraciones $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{O})$, la banda de energía mayor tiene más carácter $\nu(\text{C}=\text{C})$.

- En la tropolona libre, estas bandas están a 1608 y 1548 cm^{-1} en el espectro IR y a 1607 y 1543 cm^{-1} en el espectro Raman. Luego de la formación del complejo ambas bandas se desplazan a menores energías y la segunda está ausente en el espectro Raman, o bien termina más fuertemente desplazada hacia los 1474 cm^{-1} .
- Hay otra banda IR a 1478 cm^{-1} , con contraparte Raman a 1460 cm^{-1} , en el espectro de la tropolona libre con algo de carácter $\nu(\text{C}=\text{O})$ [32,33]. Esta banda está también desplazada a menores energías en el complejo y parece que está acoplada a otras vibraciones (tabla 4.3, página 164).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

IR (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	Asignación
1590 i	1591 i	v(C=C) + v(C=O)
1520 mi		v(C=O) + v(C=C)
1470 h	1474 m	δ(CH)
1422 mi	1430/1420 m	v(C=O) + v(C-C)+ δ(CH)
1336 mi	1357/1318 md	v(C=C)
1263 m	1272 md	v(C-C) + δ(CH)
1220 i	1217 i	v(C-O)
1078 d		v(C-C) + δ(CH)
986 i	973 mi	v(V=O)
	950 md	v(C-C)
878 m	886/829 md	v(C-C) + δ(CH)
746/726 mi	740 h, 725 i	δ(CH) + v(VO) (?)
690 h		v(C-C)
636 d	613 m	v(VO)
581 mi, 550 h	592 i	v(VO)
445 m	418 d	v(VO)

Tabla 4.3: Asignaciones de bandas FT-IR y FT-Raman de [VO(trop)₂] desde 1800 a 400cm⁻¹ (mi: muy intensa; i: intensa; m: mediana; d: débil; md: muy débil; h: hombro)

- La banda v(C-OH) se ve en la tropolona libre, parcialmente acoplada a vibraciones de estiramiento v(C-C) y δ(CH), como un doblete IR muy fuerte a 1268/1236 cm⁻¹, con sus contrapartes Raman a 1272 y 1237 cm⁻¹. La deformación δ(OH) fue identificada como una banda IR medianamente intensa a 1310 cm⁻¹ y está ausente en el espectro Raman.
- En el complejo [VO(trop)₂] el v(C-O) del grupo OH ahora desprotonado está también desplazado a menores frecuencias en ambos espectros IR y Raman y el modo δ(OH) está obviamente ausente.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- La línea Raman más fuerte (973 cm^{-1}) se asigna al estiramiento V=O característico del grupo oxo. Su contraparte IR se encuentra a mayor energía. Esta vibración se encuentra dentro del rango generalmente esperado [34] pero algo más alta que en los complejos de oxovanadio(IV) de carbohidratos [35,36], en los cuales el catión tiene una coordinación similar VO_4 como en el complejo presente. Por otro lado, la posición de esta banda excluye claramente la formación de estructuras de cadenas por puentes del tipo:



para los cuales se esperan mucho menores frecuencias [37].

- Algunas vibraciones típicas del anillo fueron asignadas sobre la base de estudios anteriores de otros tropolonatos metálicos [33,38].
- En la región de bajas frecuencias, el espectro de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$ presenta algunas bandas nuevas que están ausentes en el espectro del ligando libre. Por tanto, y tomando en cuenta resultados previos [32, 33, 38], estas bandas se asignan a vibraciones que involucran enlaces V-O (metal a ligando).

A pesar que en la Tabla 4.3 todas estas bandas fueron identificadas como $\nu(\text{VO})$, es probable que algunas de ellas sean originadas en los modos de deformación del esqueleto $\text{O}=\text{VO}_4$.

4.3.4.2 Espectros vibracionales de $[\text{Co}(\text{trop})_2]$, $[\text{Cu}(\text{trop})_2]$, y $[\text{Zn}(\text{trop})_2]$

Para comparación, se han medido y asignado los espectros vibracionales de $\text{Co}(\text{trop})_2$, $\text{Cu}(\text{trop})_2$, y $\text{Zn}(\text{trop})_2$. A pesar de que los espectros IR ya han sido anteriormente reportados [37], no así los espectros Raman, que en esta oportunidad se han medido y analizado. Los resultados se muestran en la Tabla 4.4 (página 167).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[Co(trop) ₂]		[Cu(trop) ₂]		[Zn(trop) ₂]		Asignación
IR (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	IR (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	IR (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	
1593 mi	1598 m	1590 i	1599 i	1596 i	1598 i	v(C=C) + v(C=O)
1511 mi	1522 i	1515 mi	1510 d	1515 mi	1527 i	v(C=O) + v(C=C)
1471 md	1492 mi	1470 h	1472 mi	1473 md	1474 mi	δ(CH)
1430 h		1430 h	1446 i	1435 m	1435 i	v(C=O) + v(C-C) + δ(CH)
1414 mi	1415 i	1412 mi	1410 mi	1412 mi	1420 m	v(C=O) + v(C-C) + δ(CH)
		1369 m	1369 m		1389 i	
1337 mi	1330 m	1343 mi	1333 m	1337 mi	1333 m	v(C=C)
1248 i	1248 i	1252 m	1228 m	1252 i	1253 i	v(C-C) + δ(CH)
		1242 m	1242 m			δ(CH)
1220 mi	1225 m	1231 i	1231 i	1224 mi	1230 i	v(C-O)
		1220 m				δ(CH)
1073 m		1075 d		1075 d		v(C-C) + δ(CH)
996 m		998 d		1004 d		v(C-C) + δ(CH)
972 m	975 i	970 d	973 i	974 d	976 i	v(C-C)
915 m		918 m		917 m		v(C-C)
874 i	879 m	874 i	875 w	876 i	875 m	v(C-C) + δ(CH)
758 d		753 d		765 m		v(C-C) + δ(CH)
744 d						δ(CH) + v(MO)
726 mi		732 mi		734 mi		δ(CH) + v(MO)
698 m	706 mi	711 m	711 i	697 m	708 mi	v(C-C)
595 m	586 m	635 m	606 m	582 d	586 m	v(MO)
529 s	536 m	586 mi	582 i	532 m	538 m	v(MO)
420 m	428 m	423 i	417 i	425 m	429 i	v(MO)

Tabla 4.4: Asignaciones a bandas FT-IR y FT-Raman de [Co(trop)₂], [Cu(trop)₂], y [Zn(trop)₂] entre 1800 y 400cm⁻¹ (mi: muy intensa; i: intensa; m: mediana; d: débil; md: muy débil; h: hombro)

Como puede verse, los patrones espectrales se parecen bastante a los de [VO(trop)₂].

Un aspecto interesante de los espectros Raman es que la contraparte de la segunda banda IR muy intensa, la cual está ausente en el complejo [VO(trop)₂] puede verse

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

claramente en $[\text{Co}(\text{trop})_2]$, y $[\text{Zn}(\text{trop})_2]$, mientras que para el complejo $[\text{Cu}(\text{trop})_2]$ está presente como una banda muy débil.

El análisis cualitativo de las 3 últimas vibraciones Raman que fueron medidas y asignadas como $\nu(\text{MO})$ en las Tablas 4.3 y 4.4, muestra que las dos primeras aumentan en el orden $\text{Co} \approx \text{Zn} < \text{Cu} < \text{VO}$, mientras que la tercera no muestra una tendencia definida.

Además, la banda Raman a 725 cm^{-1} , que es de origen complejo pero que probablemente involucre un modo vibracional MO, no muestra una tendencia de una relación de dependencia con la masa del metal.

4.3.4.3 Espectros vibracionales de $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$

Los espectros FT-IR y FT-Raman de este complejo presentan patrones espectrales similares a los discutidos anteriormente.

En la Tabla 4.5 (página 170) se muestra la asignación tentativa de las bandas que se puede comentar brevemente:

- La banda de mayor energía que se asigna a $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$ se ve como un doblete en Raman. La segunda de estas bandas del mismo origen, ausente en $\text{VO}(\text{trp})_2$, se ve en este caso como una banda de intensidad mediana a 1515 cm^{-1} en el espectro Raman.
- La banda a 1283 cm^{-1} es la más fuerte en el espectro Raman mientras que su contraparte IR se ve como un doblete de intensidad mediana.
- El estiramiento característico $\nu(\text{V}=\text{O})$ es más fuerte en el espectro IR, en éste tiene un pequeño hombro del lado de menor energía, que en el espectro Raman aparece algo ensanchado. La energía de esta banda es algo más baja que la encontrada en el complejo $\text{VO}(\text{trp})_2$, como consecuencia de la presencia del ligando cloruro en la posición axial, *trans* al grupo oxo, lo cual produce un debilitamiento del enlace $\text{V}=\text{O}$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- No es fácil determinar la posición de la vibración V-Cl, a pesar que las bandas relacionadas con enlaces metal-cloruro se esperan generalmente en el rango 200-400 cm^{-1} [39]. Sobre la base de los espectros de los complejos investigados, tentativamente se ha asignado a esta vibración la banda en 359 cm^{-1} , con una intensidad Raman media.

IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})	Asignación
1588 i	1586 d/1571 i	$\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{O})$
1522 mi	1515 m	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}=\text{C})$
1460 d	1472 i	$\delta(\text{CH})$
1424 mi	1414 i	$\nu(\text{C}=\text{O}) + \nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{CH})$
1349 mi/1325 d	1352 m/1330 md	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1282 m/1263 m	1283 mi	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{CH})$
1214 m	1209 mi	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1067 d	1064 d	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{CH})$
965 mi/941 h	968 i	$\nu(\text{V}=\text{O})$
877 m	876 d	$\nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{CH})$
766 h/731 mi	734 i	$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{VO})(?)$
619 m	619 i	$\nu(\text{VO})$
580 mi	578 i	$\nu(\text{VO})$
543 m	542 i	$\nu(\text{VO})$
497 d/472 d	498 md	(?)
445 i/437 i	449 i/429 i	$\nu(\text{VO})$
416 m	402 md	(?)

Tabla 4.5: Asignaciones de espectros FT-IR y FT-Raman del $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$ (mi: muy intensa; i: intensa; m: mediana; d: débil; md: muy débil; h: hombro).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

4.3.5 Susceptibilidad magnética del complejo [VO(trop)₂]

La dependencia de la susceptibilidad paramagnética (χ_p) con la temperatura para el complejo [VO(trop)₂] se muestra en la Fig. 4.4 (página 171).

χ_p toma el valor $1,493(3) \times 10^{-3}$ uem mol⁻¹ a 298.5 K, correspondiente a un momento magnético efectivo de $1,89 \mu_B$ ($\mu_{\text{eff}} = (8 \chi_p T)^{1/2}$), el cual es algo más elevado que el μ_{eff} esperado para una dilución magnética de cationes VO²⁺ (d¹). Esto es, el valor de *spin-only* $1.73 \mu_B$ o aún menor, si la contribución orbital no está completamente extinguida. Por otro lado, se han encontrados momentos magnéticos efectivos mayores que el

valor de *spin-only* para algunos complejos de oxovanadio (IV) y éstos se explican por interacciones ferromagnéticas entre unidades de vanadilo a través de la formación de cadenas $\cdots V=O \cdots V=O \cdots V=O \cdots$ [40]. Sin embargo, esta última posibilidad puede descartarse para [VO(trop)₂] tomando en cuenta el comportamiento espectroscópico vibracional y el análisis de la dependencia con la temperatura con el recíproco de susceptibilidad paramagnética molar (χ_p^{-1}), como se ve en la Fig. 4.5 (página 172).

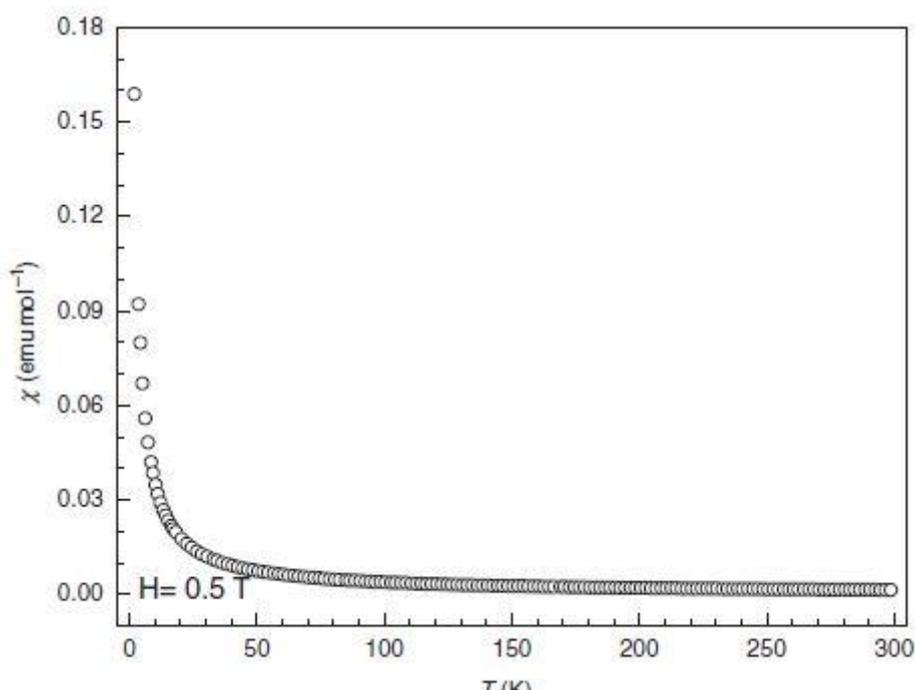


Fig. 4.4: Dependencia con la temperatura de la susceptibilidad paramagnética molar (χ_p) para [VO(trop)₂].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

El gráfico de χ_P^{-1} vs. temperatura sigue la ley de Curie desde 2 K hasta los 50 K, pero por encima de esta temperatura, hay una curvatura pronunciada, la cual se hace más llamativa cuando la temperatura continúa aumentando. Tomando en cuenta la geometría de coordinación que se asume para el complejo, pirámide de base cuadrada distorsionada con simetría C_{2v} , el comportamiento magnético puede explicarse considerando la susceptibilidad dependiente con la temperatura más un paramagnetismo independiente de la misma (PIT), porque esa geometría de coordinación, intermedia entre la pirámide cuadrada C_{4v} y la bipirámide trigonal D_{3h} , involucra un estado fundamental 2A_2 (d_{xy}) no degenerado y aquellos estados excitados por sobre $k_B T$: 2B_1 (d_{xz}), 2B_2 (d_{yz}), 2A_1 ($d_{x^2-y^2}$) y 2A_1 (d_{z^2}) [41,42].

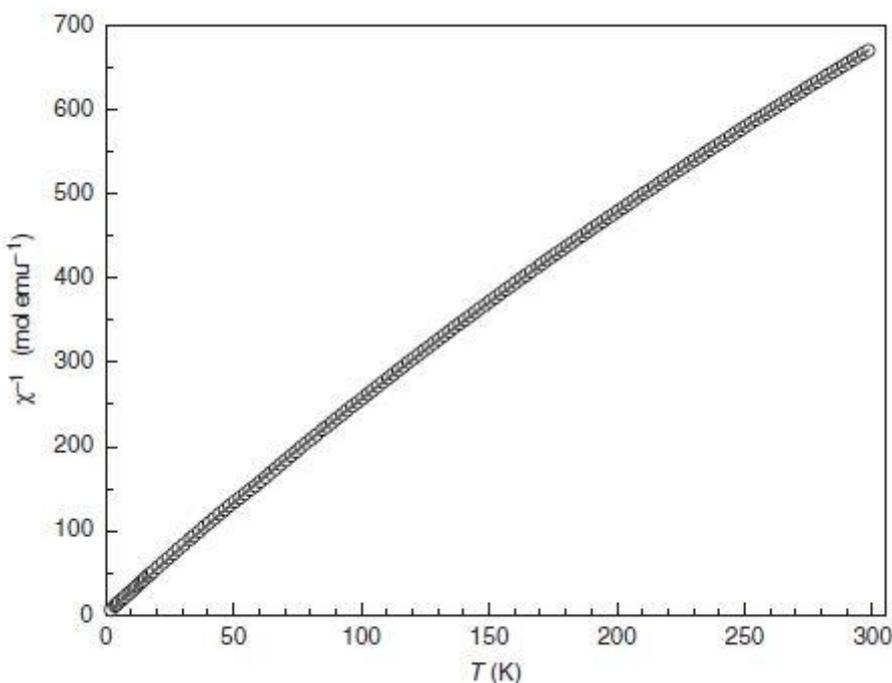


Fig. 4.5: Dependencia con la temperatura del recíproco de la susceptibilidad paramagnética molar, χ_P^{-1} , para $[VO(trop)_2]$.

Entonces, se ajustaron los valores de χ_P^{-1} a la ecuación $\chi_P = \frac{C}{T} + \chi_{PTI}$ (Fig. 6.5), lo cual da valores de $C=0,3624(2)$ uem K mol⁻¹ y $\chi_{TIP}= 2,787(7) \times 10^{-4}$ uem mol⁻¹. El momento magnético efectivo calculado para C ($\mu_{\text{eff}} = (8 \chi_P T)^{1/2} = \sqrt{8C}$) es $1,70 \mu_B$, el cual está en excelente concordancia con el valor $1,71 \mu_B$ calculado *via* $\mu_{\text{eff}} = g\sqrt{S(S+1)} = \frac{1}{2} g\sqrt{3}$, en

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

donde el factor $g = 1,972(5)$ promedio fue anteriormente determinado a través de medidas de EPR [29]. El término χ_{PIT} se origina del efecto Zeeman de segundo orden entre el estado fundamental y los estados excitados, y este valor es inversamente proporcional a las diferencias de energía entre el estado fundamental 2A_2 (d_{xy}) y los estados excitados, principalmente 2B_1 (d_{xz}) y 2B_2 (d_{yz}). El valor obtenido de χ_{PIT} es bastante mayor comparado con aquellos de estados de spin único en óxidos de vanadio, pero similar a los de estados de espín singulete de otros complejos de VO^{2+} [43].

4.3.6 Comportamiento electroquímico

El voltamograma cíclico de tropolona libre, que se muestra en la Fig. 4.6 (página 174), a velocidad de barrido $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, muestra un pico de reducción irreversible, (I), a un potencial de $-1,54 \text{ V}$, el cual no muestra ningún proceso de oxidación en el escaneo reverso, incluso a la velocidad más alta de escaneo. La dependencia lineal del potencial catódico E_{cp} con $\log v$ confirma la irreversibilidad de este pico [44]. En el escaneo reverso se observa a $-0,27 \text{ V}$ aproximadamente una pequeña onda que muestra comportamiento anómalo. La dependencia de esta onda con el pre-tratamiento del electrodo sugiere la adsorción de un producto de reducción en la superficie del electrodo. Más aún, a potencial positivo se observa un pico de oxidación (II) a $+1,04 \text{ V}$ sin tomar en consideración la dirección de escaneo inicial. En el escaneo reverso aparece una pequeña onda de reducción relacionada.

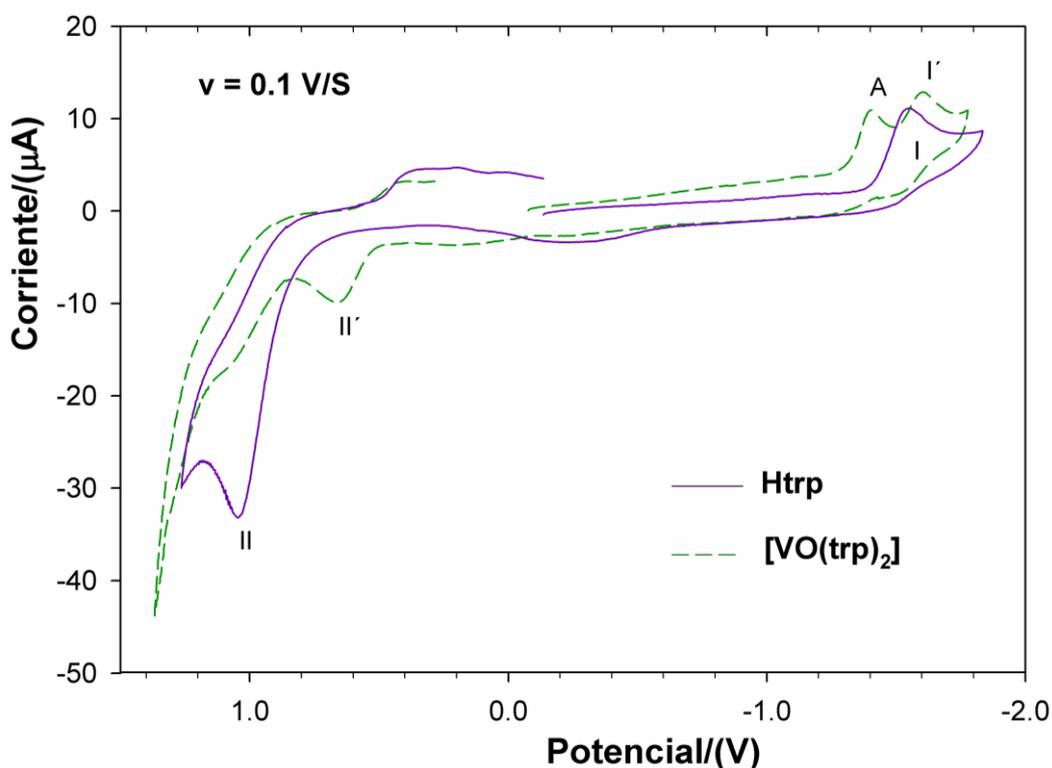


Fig. 4.6: Voltamogramas cíclicos comparativos de Htrp (línea llena) y de $[\text{VO}(\text{trp})_2]$ (línea a trazos) a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Debido al comentado comportamiento de las soluciones de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$, (sección 4.3.3), las soluciones de complejo empleadas en las medidas electroquímicas fueron preparadas directamente en la celda electroquímica utilizando DMSO desoxigenado y trabajando bajo una corriente continua de N_2 .

El comportamiento redox de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$, a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ se muestra en Fig. 4.6. Hay dos reducciones y una oxidación en el rango de potencial investigado. El primer pico (A) a $-1,40 \text{ V}$ no da señal reversa en el escaneo anódico subsiguiente y se desplaza hacia valores más negativos en cuanto v aumenta. El segundo pico irreversible (I') situado a $-1,60 \text{ V}$ se encuentra a un potencial similar al obtenido para la tropolona libre. La corriente asociada a este proceso fue medida desde la línea de base en decaimiento del pico A. La relación de corrientes catódicas $i_{cp}(\text{A})/i_{cp}(\text{I}')$ da valores cercano a uno, a todas las velocidades de escaneo ensayadas, indicando el mismo número de electrones involucrados en ambos procesos.

Más allá de lo anterior, la corriente pico de ambas reducciones $i_{cp}(\text{A})$ e $i_{cp}(\text{I}')$ aumentan con la raíz cuadrada de la rapidez de escaneo, $v^{1/2}$, aproximándose a una línea recta de acuerdo al control por difusión [44]. De acuerdo a los datos experimentales, el primer pico catódico (A) corresponde a la reducción irreversible del centro metálico de $\text{V}(\text{IV})$ a $\text{V}(\text{III})$ y el segundo (I') a la reducción del ligando coordinado. En el escaneo anódico siguiente, el pico de oxidación (I'') a $+0,66 \text{ V}$ con un pequeño hombro en torno a $1,05 \text{ V}$ corresponde a los procesos de oxidación centrados en los ligandos coordinados. Como se ve en la Fig. 4.6, la intensidad de corriente de este pico es menor que la obtenida con el pico II, lo cual sugiere que la coordinación con el ligando modifica el número de electrones involucrados en el proceso.

Los voltamogramas comparativos a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ para soluciones desoxigenadas, recientemente preparadas de $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$ y $[\text{VO}(\text{trop})_2]$ se muestran en la Fig. 4.7 (Página 175).

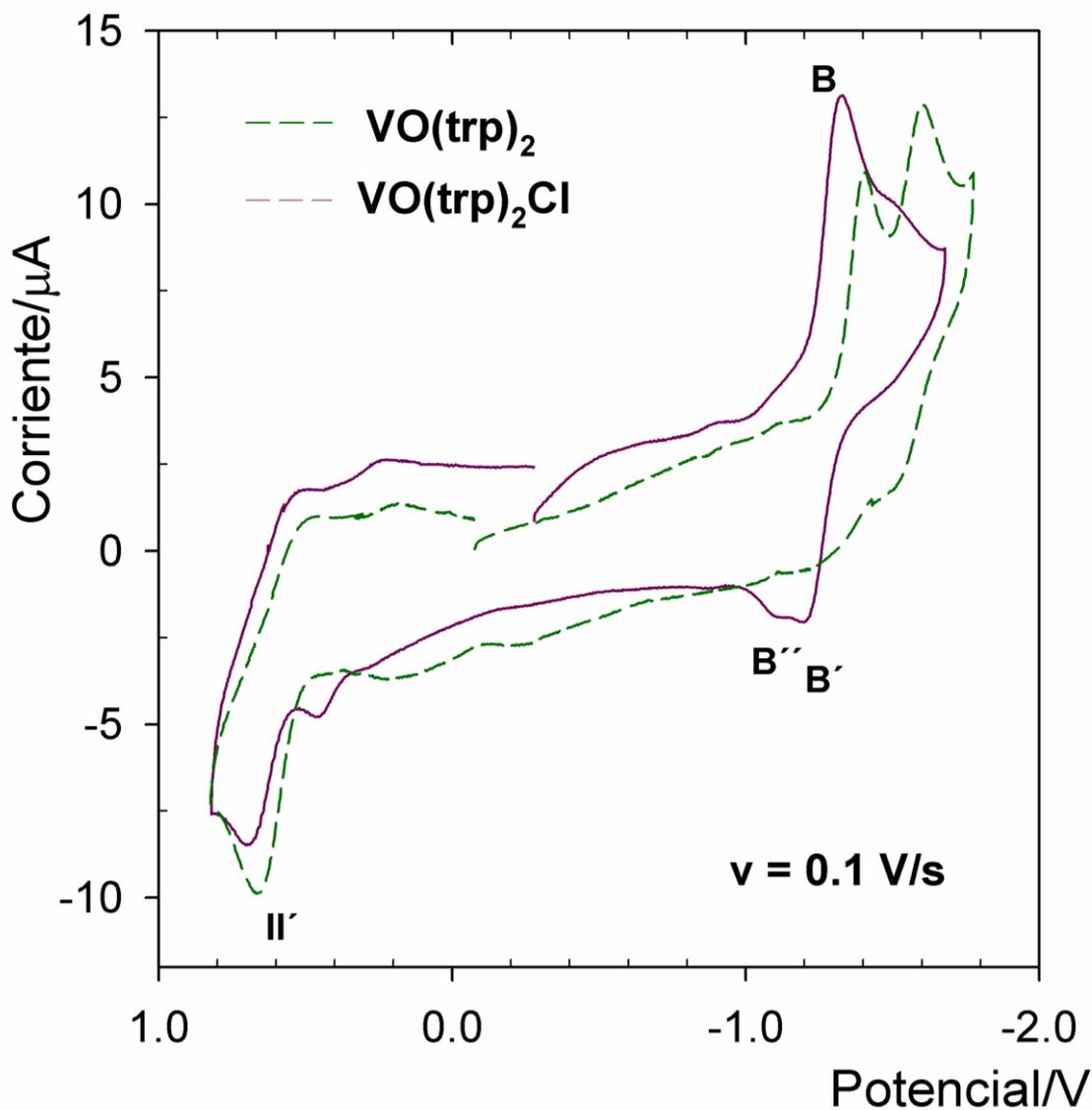


Fig. 4.7: Voltamogramas cíclicos comparativos de $[\text{VO}(\text{trp})_2\text{Cl}]$ (línea llena) y $[\text{VO}(\text{trp})_2]$ (línea a trazos) a $v=0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Durante el primer semiciclo catódico, la curva corriente /potencial muestra un pico de reducción (B) a $-1,30 \text{ V}$. En el siguiente medio ciclo anódico se encuentran dos señales de oxidación (B', B''), relacionadas al referido pico, a $-1,20 \text{ V}$ y $-1,10 \text{ V}$, respectivamente.

El comportamiento redox de estos picos indica que el proceso catódico involucra dos reducciones secuenciales de un electrón del centro metálico, $\text{V(V)}/\text{V(IV)}$ y $\text{V(IV)}/\text{V(III)}$, a valores de potencial muy cercanos [44].

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Los dos picos anódicos, en el escaneo reverso, corresponden a las respectivas oxidaciones de un electrón independientes. El pico catódico asociado con la reducción del ligando no se observa en el rango de potenciales investigado.

Sin perjuicio de este hecho, la pequeña onda entre 1,40 V y 1,65 V podría corresponder a este proceso. El pico anódico (II') observado a +0,70 V para el $[\text{VO}(\text{trop})_2\text{Cl}]$ está a un potencial similar y muestra un comportamiento redox similar al obtenido con soluciones de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$. De este modo, este proceso puede ser razonablemente atribuido a la oxidación del ligando coordinado.

Finalmente, debe notarse que a potenciales más positivos, se observa a +1,15 V (no se muestra en la Fig. 4.7) otro proceso irreversible, que podría atribuirse a la oxidación del ion cloruro a cloro elemental.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Bibliografía

- [1] Thompson, K.H., Barta, C.A., Orvig, C., *Chem. Soc. Rev.* 35, 545 (2006)
- [2] Thompson, K.H., Orvig, C., *J. Inorg. Biochem.* 100, 1925 (2006)
- [3] Thompson, K.H., Lichter, J., LeBel, C., Scaife, M.C., McNeil, J.H., Orvig, C., *J. Inorg. Biochem.* 103, 534 (2009)
- [4] Bryant, B.E., Fernelius, W.C., Douglas, B.E., *Nature* 170, 247 (1952)
- [5] Dutt, Y., Singh, R.P., Katyal, M., *Talanta* 18, 1369 (1969)
- [6] Muetterties, E.L., Roesky, H., Wright, C.M., *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4856 (1966)
- [7] Trust, T.J., *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 500 (1975)
- [8] Morita, Y., Matsumura, E., Okabe, T., Shibata, M., Sugiura, M., Ohe, T., Tsujibo, H., Ishida, N., Inamori, Y., *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1487 (2003)
- [9] Jacobsen, F.E., Lewis, J.A., Heroux, K.J, Cohen, S.M., *Inorg. Chim. Acta* 360, 264 (2007)
- [10] Kahn, V., Andrawis, A., *Phytochemistry* 24, 905 (1985)
- [11] Chang, T.S., *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440 (2009)
- [12] Helms, J.B., Huang, L., Price, R., Sullivan, B.P., Sullivan, B.A., *Inorg. Chem.* 34, 5335 (1995)
- [13] Yamato, M., Ashigaki, K., Kokubu, N., Tashiro, T., Tsuruo, T., *J. Med. Chem.* 29, 1202 (1996)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [14] Budihas, S.R., Gorshkova, I., Gaidamakov, S., Wamiru, A., Bona, M.K., Parniak, M.A., Crouch, R.J., McMahon, J.B., Beutler, J.A., Le Grice, S.F.J., *Nucl. Acids Res.* 33, 1249 (2005)
- [15] Shimanouchi, H., Sasada, Y., *Acta Crystallogr.* B29, 81 (1973)
- [16] Karlsson, B., Pilotti, A.M., Wiehager, A.C., *Acta Crystallogr.* B32, 3118 (1976)
- [17] Berg, J.E., Karlsson, B., Pilotti, A.M., Wiehager, A.C., *Acta Crystallogr.* B32, 3121 (1976)
- [18] Berg, J.E., Pilotti, A.M., Söderholm, A.C., Karlsson, B., *Acta Crystallogr.* B34, 3071 (1978)
- [19] Barret, M.C., Mahon, M.F., Molloy, K.C., Steed, J.W., Wright, P., *Inorg. Chem.* 40, 4384 (2001)
- [20] Baran, E.J., *J. Inorg. Biochem.* 80, 1 (2000)
- [21] Ferrer, E.G., Bosch, A., Yantorno, O., Baran, E.J., *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3878 (2008)
- [22] Baran, E.J., *Chem. Biodivers.* 5, 1475 (2008)
- [23] Arrambide, G., Gambino, D., Baran, E.J., *J. Coord. Chem.* 62, 63 (2009)
- [24] Baran E.J., *J. Inorg. Biochem.* 103, 547 (2009)
- [25] Arrambide, G., Rivadeneira, J., Etcheverry, S.B., Parajón-Costa, B.S., Gambino, D., Baran, E.J., *Biol. Trace Elem. Res.* 132, 176 (2009)
- [26] Lee, C.M., Hwang, C.S., *J. Nano Biotechnol.* 2, 80 (2005)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

- [27] White, J.B., Selbin, J., *J. Inorg. Nucl. Chem.* 32, 2434 (1970)
- [28] Rizvi, G.H., Singh, R.P., *Talanta* 19, 1198 (1972)
- [29] Stewart, C.P., Porte, A.L., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1661 (1972)
- [30] Hasegawa, M., Inomaki, Y., Inayoshi, T., Hoshi, T., Kobayashi, M., *Inorg. Chim. Acta* 257, 259 (1997)
- [31] Shoute, L.C.T., MacKenzie, V.J., Falk, K.J., Sinha, H.K., Warsylewicz, A, Steer, R.P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 1 (2000)
- [32] Junge, H., *Spectrochim. Acta*, 24A, 1957 (1968)
- [33] Jianlin, Y., Yaxian, Y., Renao, G., *Spectrochim. Acta*, 64A, 1072 (2006)
- [34] Selbin, J., *Chem. Rev.*, 65, 153 (1965)
- [35] Baran, E.J., *J. Coord. Chem.*, 54, 215 (2001)
- [36] Baran, E.J., *J. Inorg. Biochem.*, 103, 547 (2009)
- [37] Mathew, M., Carty, A.J., Palenik, G.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 3197 (1970)
- [38] Hulet, L.G., Thornton, D.A., *Spectrochim. Acta*, 27A, 2089 (1971)
- [39] Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th Ed., John Wiley, New York (2009)
- [40] Sáez-Puche, R., Romero, J., González-Baró, A.C., Baran, E.J., *Chem. Phys. Lett.*, 282, 273 (1998)
- [41] Ballhausen, C.J., Gray, H.B., *Inorg. Chem.*, 1, 111 (1962)

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

[42] Rossi, A.R., Hoffmann, R., *Inorg. Chem.*, 14, 365 (1975)

[43] Costa Pessoa, J., Tomaz, I., Henriques, R.T., *Inorg. Chim. Acta*, 356, 121 (2003)

[44] Bard, A.J., Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., John Wiley, New York (2001).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Conclusiones del Trabajo de Tesis

En este Trabajo de Tesis se han estudiado en profundidad, desde el punto de vista físico-químico y biológico utilizando técnicas variadas, sistemas bioinorgánicos de vanadio muy interesantes. Los resultados de estos estudios permiten ampliar los conocimientos existentes sobre ciertos compuestos de este elemento, así como incursionar en aplicaciones potenciales de los complejos estudiados como agentes antitumorales.

Fueron realizadas diferentes contribuciones a la química del vanadio. En primer lugar, se han sintetizado complejos ya reportados (peroxo y hidroxilamido complejos de vanadio(V) y complejos V(IV) y V(V) con tropolona) pero también se han obtenido con rendimiento y pureza adecuada varios nuevos complejos mixtos hidroxilamido-aminoácido. Para lograr esto se debió poner a punto técnicas de síntesis. Se encontró que las síntesis de los complejos de ligandos hidroxilamido-aminoácido, aunque parecen sencillas, no lo son tanto. Para lograr síntesis exitosas se requirió desarrollar habilidades en síntesis inorgánica de compuestos de coordinación de vanadio e identificar y mantener bajo control, muy estricto, diversas variables.

Se puso a punto una técnica sencilla y eficaz de dosificación de vanadio que se ha probado en los complejos sintetizados. Esta técnica resulta un aporte al grupo de Química Medicinal de vanadio que trabaja en Facultad de Química, ya que se ha utilizado para la dosificación de vanadio en otros complejos nuevos que no forman parte de este Trabajo de Tesis .

Se ha estudiado los compuestos tanto en estado sólido como en solución.

Con respecto a los estudios de caracterización en estado sólido de los complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido - aminoácido, se determinó por difracción de rayos X en monocristal la estructura cristalina del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{DL-metioninato})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, complejo sintetizado por vez primera en este Trabajo de Tesis.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

También, se realizaron diagramas de polvos de compuestos de los cuales no se pudo obtener monocristales para confirmar su estructura cristalina.

Además, se ha aumentado el bagaje de conocimientos en estado sólido para complejos de vanadio(V) de ligandos hidroxilamido-aminoácido, y se ha completado la escasa información existente relativa a algunos peroxocomplejos de vanadio(V) y a compuestos de V(IV) y V(V) con tropolona como ligando. Para cumplir este objetivo se utilizó principalmente la espectroscopía vibracional FT-IR y FT-Raman.

Además, en el caso de $[\text{VO}(\text{trop})_2]$ se realizó también el estudio de propiedades magnéticas, en un amplio intervalo de temperaturas.

En cuanto a la caracterización de los compuestos en solución, se estudiaron los espectros electrónicos en soluciones acuosas de los complejos nuevos emergentes de este Trabajo de Tesis y se correlacionaron con la información disponible de sus homólogos ya sintetizados. También, se estudió la estabilidad de los compuestos y se observó que bajo determinadas condiciones ésta es relativamente buena, aunque no se puede establecer una regla general para todos los compuestos estudiados.

Además, en el caso de los complejos de V(IV) y V(V) con tropolona se estudió su comportamiento redox por voltametría cíclica.

En base a lo expuesto, se puede concluir que se ha caracterizado adecuadamente y en forma completa tanto los complejos ya reportados seleccionados como los nuevos.

Este trabajo no se limitó a la síntesis y caracterización de complejos de vanadio, sino que aportó conocimientos a la Química Medicinal del vanadio. Se realizaron ensayos biológicos *in vitro* para los complejos estudiados, así como también estudios *in vivo* para compuestos seleccionados.

En cuanto a los estudios *in vitro*, los complejos de vanadio(V) de ligandos hidroxilamido-aminoácido seleccionados, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{gly})]$, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$, inhibieron la actividad específica de la fosfatasa alcalina intestinal,

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

con una potencia dependiente del aminoácido presente en la esfera de coordinación. Sin embargo, el vanadato NaVO_3 aún es el inhibidor más potente de la FAL.

Por otro lado, se encontró que los peroxocomplejos de vanadio(V) $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ y $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y dos complejos de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido emergentes de este Trabajo de Tesis, $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$, modularon la proliferación de dos líneas celulares osteoblásticas, una normal (MC3T3-E1) y otra tumoral (UMR106), en forma dosis-dependiente. En general, se observó el efecto bifásico del vanadio en la mitogénesis, promoviéndola a bajas dosis e inhibiendo el crecimiento celular a mayores concentraciones. El cumplimiento de esta regla general se determinó para el complejo $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, aunque se observó, además, que el tipo de célula y no solo la esfera de coordinación del compuesto de vanadio, entre otras características, determinan la potencia tóxica del complejo. Esto se observó claramente en el caso del complejo $\text{K}_2[\text{VO}(\text{O}_2)\text{NTA}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con las líneas celulares UMR106, Caco-2 y Raw-264.7, en el que se encontró que el complejo es inhibidor de forma dosis-dependiente en todo el rango de concentraciones de las últimas dos líneas celulares transformadas.

Sin embargo, es bueno destacar que la regla anterior no se cumple para el complejo $\text{K}_3[\text{VO}(\text{O}_2)_2\text{CO}_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ que es tóxico en todo el rango de concentraciones estudiado; a concentraciones bajas (hasta $5\ \mu\text{M}$) es más tóxico para osteoblastos no transformados que para las células tumorales, en tanto que a concentraciones más altas, a partir de $10\ \mu\text{M}$, los efectos tóxicos son similares para ambas líneas celulares, tanto transformadas (UMR106) como no transformadas (MC3T3-E1). Además, es de hacer notar que este complejo resultó ser el más tóxico de todos los hasta ahora ensayados por el grupo de trabajo de la Cátedra de Bioquímica Patológica (UNLP).

En el caso de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ se realizó un trabajo de mayor extensión y profundidad relativo a los efectos biológicos en células. Como ya se indicó, estos complejos modulan la proliferación celular en forma dosis-dependiente pero con efectos diferentes según los niveles de concentración de los complejos. Estos

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

complejos, fueron aproximadamente 4 - 5 veces más tóxicos en los osteoblastos normales que en las células de osteosarcoma.

También se estudiaron los efectos de estos dos complejos en la morfología celular. Ambos complejos redujeron el número de células por campo y causaron alteraciones morfológicas, las cuales fueron más pronunciadas para el complejo de hidroxilamido - metioninato en ambas líneas celulares.

Respecto de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, utilizada como marcador de citotoxicidad, ambos complejos disminuyeron la actividad de la enzima en forma dosis dependiente, encontrándose un efecto más potente para el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$.

Los estudios de genotoxicidad realizados sobre el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ mostraron un efecto genotóxico más importante en células no transformadas MC3T3-E1, observándose la inducción de micronúcleos y cometas a menores concentraciones que en células transformadas UMR106.

En general, se observó mayor sensibilidad de las células no transformadas respecto de las transformadas. Al parecer, el aumento del estrés oxidativo podría explicar las acciones citotóxicas de los complejos con un mayor efecto en la línea celular normal.

También, se ensayaron los efectos de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ en un modelo *in vivo* de huevos de peces cebra. Se encontró que ambos complejos son tóxicos, siendo el complejo de metioninato más tóxico que su homólogo de valinato. El modelo de huevos de peces cebra resultó ser un modelo sencillo y adecuado para evaluar toxicidad de los complejos *in vivo* que podrá ser utilizado en un futuro próximo por el grupo de Química Medicinal de Facultad de Química.

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Listado de trabajos publicados que se originaron en esta Tesis

- 1) Arrambide, G., Gambino, D., Baran, E. J., Synthesis and spectroscopic characterization of hydroxylamido-amino acid complexes of oxovanadium(V). *Journal of Coordination Chemistry*, 62, 63 (2009).
- 2) Arrambide, G., J. Rivadeneira, J., Etcheverry, S.B., Parajón-Costa, B.S., Gambino, D., Baran, E.J, Spectroscopic Behavior and Biological Activity of $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$. *Biological Trace Element Research*, 132, 176 (2009).
- 3) Arrambide, G., Barrio, D.A, Etcheverry, S.B., Gambino, D., Baran, E.J., Spectroscopic behavior and biological activity of $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$. *Biological Trace Elements Research*, 136, 241 (2010).
- 4) Parajón-Costa, B.S., Baran, E.J., Romero, J., Sáez-Puche, R., Arrambide, G., Gambino, D., Synthesis and characterization of the bistropolonato oxovanadium(IV) and (V) complexes. *Journal of Coordination Chemistry*, 64, 57 (2011).
- 5) Piro, O.E., Echeverría, G.A, Arrambide, G., Gambino, D., Baran, E.J., Crystal and molecular structure of a new hydroxylamido-amino acid oxovanadium(V) complex, $[VO(NH_2O)_2(DL\text{-methioninato})] \cdot H_2O$. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 66b, 752 (2011).
- 6) León, I. E., Di Virgilio, A.L., Barrio, D.A., Arrambide, G., Gambino, D., Etcheverry, S.B., Hydroxylamido-amino acid complexes of oxovanadium(V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model. *Metallomics*, 4, 1287 (2012).

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

Índice

	<i>Página</i>
Agradecimientos	3
Resumen del Trabajo de Tesis	4
Introducción y Objetivos del Trabajo de Tesis	
1. Introducción	
1.1 Origen y fuentes del vanadio	7
1.2 Antecedentes de farmacología de compuestos de vanadio	8
1.3 Generalidades de la química del vanadio en solución acuosa	10
1.3.1 Química del V(IV) en solución	10
1.3.2 Química del V(V) en solución	12
1.4 Bioquímica del vanadio	14
1.4.1 Inhibición enzimática	14
1.4.2 Efectos celulares del vanadio	16
1.4.2.1 Efectos del vanadio sobre la proliferación de células en cultivo	17
1.4.2.2 Efectos del vanadio sobre la diferenciación de células en cultivo	17
1.4.2.3 Transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en sistemas celulares	18
1.5 Efectos antitumorales	18
1.5.1 Especies de oxígeno y de nitrógeno reactivas (ROS y RNS)	19
1.5.2 Daño oxidativo a biomoléculas	20
1.5.3 Generación de estrés oxidativo por el vanadio	21
1.6 Importancia de la complejación del vanadio	22

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
1.7 Estudios <i>in vivo</i>	22
2. Objetivos del Trabajo de Tesis	
2.1 Objetivos generales	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Presentación del trabajo	25
Bibliografía	26
Capítulo 1:	
Materiales, Métodos y Equipos: Parte Experimental	
1.1 Generalidades	35
1.1.1 Reactivos	35
1.2 Generalidades de la síntesis de los complejos	35
1.2.1 Complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido	35
1.2.2 Complejos de vanadio(V) con ligando peroxo	36
1.2.3 Complejos bistroponatooxovanadio (IV) y (V)	37
1.2.3.1 Complejo bistroponatooxovanadio (IV)	37
1.2.3.2 Complejo bistroponatooxovanadio (V)	38
1.2.3.3 Complejos [Co(trop) ₂], [Cu(trop) ₂] y [Zn(trop) ₂]	38
1.3 Caracterización Analítica	38
1.3.1 Análisis Elemental	38
1.3.2 Caracterización estructural en estado sólido	39
1.3.2.1 Caracterización estructural por difracción de rayos X en polvo	39
1.3.2.2 Determinación de la estructura cristalina en monocristal	40
1.3.2.3 Espectroscopía FT-IR y FT-Raman	41
1.3.2.4 Medidas de susceptibilidad magnética	42
1.3.3 Caracterización en solución acuosa	43

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
1.3.3.1 Espectroscopía UV/Vis	43
1.3.4 Medidas electroquímicas en sistemas de bistropolonatooxovanadio (IV) y (V)	44
1.3.6 Estudios biológicos <i>in vitro</i>	45
1.3.6.1 Actividad inhibitoria de la fosfatasa alcalina intestinal (FAL)	45
1.3.6.2 Estudios celulares	46
1.3.6.2.1 Cultivos celulares	48
1.3.6.2.2 Ensayo de proliferación celular	49
1.3.6.2.3 Estudios morfológicos	50
1.3.6.2.4 Tinción con Giemsa	50
1.3.6.2.4 Ensayos de citotoxicidad	50
1.3.6.2.4.1 Captación de rojo neutro	50
1.3.6.2.4.2 Actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial	51
1.3.6.2.5 Estrés oxidativo	52
1.3.6.2.5.1 Generación de especies de oxígeno reactivas (ROS)	52
1.3.6.2.6 Estudios de genotoxicidad	52
1.3.6.2.6.1 Inducción de micronúcleos	52
1.3.6.2.6.2 Electroforesis en gel de células individuales (ensayo "cometa")	54
1.3.7. Estudios de toxicidad <i>in vivo</i>	55
1.3.7.1. Prueba FET	55
 Bibliografía	 57
 Capítulo 2:	
Complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido	
 2.1 Introducción	 61
2.2 Síntesis de los complejos	64

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
2.3 Caracterización analítica	68
2.3.1 Análisis elemental	68
2.3.1.1 Discusión de resultados	69
2.4 Caracterización estructural en estado sólido	75
2.4.1 Estructura cristalina de los complejos	75
2.4.1.2 Determinación de la estructura cristalina de [VO(NH ₂ O) ₂ (DL-metioninato)]·H ₂ O	75
2.4.2 Espectroscopía vibracional IR y Raman	79
2.4.2.1 Consideraciones previas	79
2.4.2.2 Resultados	82
2.4.2.3 Discusión de resultados	85
2.5 Estudios en solución acuosa de los complejos	93
2.5.1 Espectros UV-Vis de [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (met)]	93
2.6 Estudios de actividad biológica <i>in vitro</i>	94
2.6.1 Inhibición de la FAL (fosfatasa alcalina) intestinal	94
2.6.1.1 Resultados	96
2.6.1.2 Discusión de resultados	99
2.6.2 Efectos de complejos de vanadio(V) de ligandos mixtos hidroxilamido-aminoácido sobre la proliferación de osteoblastos UMR106 y MC3T3-E1	100
2.6.2.1 Acción antiproliferativa en células osteoblasto-símiles mediada por los compuestos [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (met)]	101
2.6.2.2 Efectos de los complejos [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (met)] en la morfología celular	103
2.6.2.3 Estudios de citotoxicidad- Ensayo MT	105
2.6.2.4 Estudios de genotoxicidad	106
2.6.2.4.1 Inducción de micronúcleos por [VO(NH ₂ O) ₂ (val)]	106
2.6.2.4.2 Electroforesis en gel de células individuales (EGCI) - Ensayo "cometa"	107
2.6.2.5 Estrés oxidativo	108

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
2.6.3. Discusión de resultados obtenidos de estudios <i>in vitro</i> respecto de la acción de complejos [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (met)] sobre líneas celulares MC3T3-E1 y UMR106	110
2.6.4. Estudios de toxicidad <i>in vivo</i>	115
2.6.4.1 Resultados de la exposición de huevos de peces cebra fertilizados a los complejos [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (met)]	115
2.6.4.2. Discusión de resultados	116
Bibliografía	119
Capítulo 3:	
Peroxocompuestos de vanadio(V)	
3.1 Introducción	127
3.2 Síntesis de los complejos	129
3.2.1 Síntesis de K ₃ [VO(O ₂) ₂ CO ₃]·H ₂ O	129
3.2.2 Síntesis de K ₂ [VO(O ₂)NTA]·2H ₂ O	130
3.3 Caracterización analítica	130
3.3.1 Análisis Elemental	130
3.3.1.1 Complejo K ₃ [VO(O ₂) ₂ CO ₃]·H ₂ O	130
3.3.1.2 Complejo K ₂ [VO(O ₂)NTA]·2H ₂ O	131
3.3.2 Caracterización estructural en estado sólido	132
3.3.2.1 Estructura cristalina de los complejos	132
3.3.2.1.1 Estructura cristalina del complejo K ₃ [VO(O ₂) ₂ CO ₃]·H ₂ O	132
3.3.2.1.2 Estructura cristalina del complejo K ₂ [VO(O ₂)NTA]·2H ₂ O	133
3.3.2.2 Espectroscopía vibracional FT-IR y FT-Raman	135
3.3.2.2.1 Complejo K ₃ [VO(O ₂) ₂ CO ₃]·H ₂ O	135
3.3.2.2.2 Complejo K ₂ [VO(O ₂)NTA]·2H ₂ O	139
3.3.3. Caracterización de los complejos en solución acuosa	145

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
3.3.3.1 Espectroscopía electrónica UV-Vis de los peroxocomplejos $K_3[VO(O_2)_2CO_3]$ y $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$	145
3.3.3.1.1 Espectro electrónico UV-Vis del complejo $VO(O_2)_2CO_3^{3-}$ en solución acuosa	145
3.3.3.1.2 Espectro electrónico UV-Vis del complejo $[VO(O_2)NTA]^{2-}$ en solución acuosa	146
3.4 Actividad biológica de los peroxocomplejos	146
3.4.1 Actividad biológica del complejo $K_3[VO(O_2)_2CO_3] \cdot H_2O$	146
3.4.2 Actividad biológica del complejo $K_2[VO(O_2)NTA] \cdot 2H_2O$	148
Bibliografía	151
Capítulo 4:	
Síntesis y caracterización de complejos de oxovanadio (IV y V) con tropolona como ligando	
4.1 Introducción	156
4.2 Síntesis de los complejos	157
4.2.1 Síntesis de $[VO(trop)_2]$	157
4.2.2 Síntesis de $[VO(trop)_2Cl]$	158
4.3. Caracterización de los complejos	159
4.3.1. Análisis elemental	159
4.3.2 Consideraciones estructurales	159
4.3.3 Espectros electrónicos y comportamiento en solución de $[VO(trop)_2]$	160
4.3.4 Espectros vibracionales	162
4.3.4.1 Espectros vibracionales del complejo $[VO(trop)_2]$	162
4.3.4.2 Espectros vibracionales de $[Co(trop)_2]$, $[Cu(trop)_2]$, y $[Zn(trop)_2]$	166
4.3.4.3 Espectros vibracionales de $[VO(trop)_2Cl]$	168
4.3.5 Susceptibilidad magnética del complejo $[VO(trop)_2]$	170
4.3.6 Comportamiento electroquímico	173

Compuestos de Vanadio de Interés Bioinorgánico

Tesis de Maestría: *Gabriel Arrambide*

	<i>Página</i>
Bibliografía	177
Conclusiones del Trabajo de Tesis	181
Listado de trabajos publicados que se originaron en esta Tesis	185
Índice	186