



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis, caracterización y evaluación *in Vitro* de 5 compuestos del tipo
Cu[(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)
(α -aminoacidato)]NO₃ (Casiopeína®) en
diferentes líneas tumorales humanas.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

MUCIÑO HERNÁNDEZ MIGUEL ANGEL



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Lena Ruiz Azuara
Vocal: Dr. Rafael Moreno Esparza
Secretario: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha
1er Suplente: M en C María Isabel Gracia Mora
2º Suplente: QFB. María Elena Bravo Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 210, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear y la UNEXA, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora de tesis: Dra. Lena Ruiz Azuara

Asesor técnico: QFB. María Elena Bravo Gómez

Sustentante: Miguel Ángel Muciño Hernández

Este proyecto fue auspiciado por:

Proyecto CONACYT 60085

Beca Sistema Nacional de Investigadores

PAPITT IN-209907.

Dedicatorias

A Dios por darme la vida y la fortaleza para lograr esta meta tan importante.

A mi madre por ser una mujer ejemplar, digna, valiente y humilde, porque me reprimió cuando lo necesité pero sobre todo por apoyarme y aconsejarme todos los días de mi vida; por sus sacrificios, preocupaciones y bendiciones; por creer y confiar en mi; gracias mama esto es para ti.

A mi padre por ser un hombre ejemplar, por sus regaños pero sobre todo sus consejos, por enseñarme a vivir, trabajar y valorar todo lo que tengo; por ser un gran amigo que creyó y confió en que podía lograr cualquier cosa; por sus preocupaciones, sacrificios y bendiciones, gracias papa por todo, yo se que me cuidas desde el cielo y estas orgulloso.

A mis hermanas que me apoyaron y cuidaron desde pequeño, porque siempre han estado cerca cuando lo he necesitado, gracias hermanitas por todo.

A mis sobrinos Royito peluches, Mamis, Emmanuel chinchita y ratón Said por sacarme una sonrisa en los momentos difíciles.

A mi familia por ser un ejemplo a seguir.

A Paco y David por ser dos grandes amigos; por aconsejarme, y sobre todo apoyarme cuando mas lo necesite; por todas esas tardes en las tumbas, conciertos, fiestas y sobre todo las tardes de buena plática.

A Lupita y Ximi por ser mis confidentes y consejeras.

A Lumivi, Cess, Paola, Hilda y Karla que estuvieron a mi lado en el transcurso de la carrera, me aconsejaron y me apoyaron en los momentos difíciles; por las tardes de buen café y buena platica, y claro las quemas.

Marianita, el Inge, Lawrence, Shiba por las sesiones de estudio y aprendizaje.

A todos los de la jardinera por esos agradables momentos.

A Fabiola (Güereja) por el apoyo incondicional, por creer y confiar en mi, por alentarme a seguir adelante, por escucharme y aconsejarme, por ser mi confidente y regañarme cuando lo necesito, por todas las cosas que hemos vivido juntos dificultades, tristezas, preocupaciones, pero sobre todo todos los momentos felices, gracias por darme tanto y espero que este sueño no termine. **TE AMO**

Agradecimientos

A Maria Elena Bravo por todo el conocimiento, apoyo, experiencia, jalones de orejas, correcciones y amistad gracias jefita.

A la Doctora Lena Ruiz por dejarme compartir un pedazo de su sueño, por su apoyo y amistad incondicional, por ser un ejemplo a seguir en todos sentidos. Jefa cuando sea grande quiero ser como usted!!!!

A todos los del 210 Silvia por esas buenas tardes de platica confidente y de apoyo, Juan Carlos por los consejos y zapearme cuando la regaba, Ana Laura por ser una gran amiga, confidente y cómplice y por esas sesiones de estudio para los exámenes de Química Farmacéutica.

A todos los del Bioterio Isa, Paquito, Lucia, Rebe, Mabel y Lidia por haberme ayudado con mis células.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me formo académica y personalmente. POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU México, Pumas, Universidad Goya Goya...!!!

Índice

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes	3
	2.1 Cáncer.....	4
	2.1.1 Causas del cáncer.....	6
	2.1.2 Proceso de carcinogénesis.....	7
	2.2 Estadísticas.....	8
	2.3 Tratamientos.....	9
	2.3.1 Cirugía.....	11
	2.3.2 Radioterapia.....	11
	2.3.3 Quimioterapia.....	12
	2.3.3.1 Clasificación quimioterpéuticos.....	14
	2.4 Quimioterapéuticos inorgánicos.....	16
	2.4.1 Otros metales con potencial actividad Antineoplásica	18
	2.5 Metales en Biología	20
	2.5.1 Cobre.....	22
	2.6 Casiopeínas	23
3	Hipótesis y Objetivos.....	28
	3.1 Hipótesis.....	29
	3.2 Objetivo general.....	29
	3.2.1 Objetivos particulares.....	30
4	Desarrollo experimental.....	31
	4.1 Síntesis	32
	4.2 Caracterización química.....	32
	4.2.1 Análisis elemental.....	32
	4.2.2 Espectroscopia de infrarrojo cercano y lejano.....	33
	4.2.3 Conductimetría.....	33
	4.2.4 Momento magnético.....	33
	4.2.5 Espectroscopia UV-Vis.....	34

4.3	Estudio electroquímico.....	35
4.4	Ensayos Biológicos	37
5	Resultados y análisis de resultados.....	39
5.1	Síntesis de los complejos.....	40
5.2	Caracterización.....	41
5.2.1	Análisis elemental.....	41
5.2.2	Espectroscopia de infrarrojo.....	42
5.2.2.1	IR cercano.....	42
5.2.2.2	IR lejano.....	43
5.2.3	Momento magnético.....	43
5.2.4	Conductividad.....	44
5.2.5	Espectroscopia UV-vis.....	44
5.2.5.1	UV.....	44
5.2.5.2	UV-vis.....	45
5.3	Estudio electroquímico.....	46
5.3.1	Voltamperometría cíclica.....	46
5.4	Ensayos Biológicos	51
6	Conclusiones.....	55
7	Anexos.....	57
7.1	Anexo 1. Espectros de IR en las regiones del cercano y lejano.....	58
7.2	Anexo 2. Espectros de UV-vis.....	63
7.3	Anexo 3. Voltamperogramas	68
8	Bibliografía.....	70

Abreviaturas

ERO's: Especies reactivas de oxígeno

ECC: Fármacos específicos del ciclo celular.

NECC: Fármacos no específicos del ciclo celular.

QSAR: Estudio cuantitativo de correlación estructura actividad

E1/2: Potencial de media onda.

Epa: Pico anódico

Epc: Pico catódico

α -Fen: α -fenilalaninato

α -Pro: α -prolinato

α -Tyr: α -tirosinato

α -His: α -histidinato

α -Trip: α -triptofanato

HeLa: Línea celular de carcinoma epitelial de cérvix estadio IV A

SiHa: Línea celular de carcinoma de células escamosas de cérvix.

HCT-15: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.

SKLU-1: Línea celular de adenocarcinoma de pulmon humano pobremente diferenciado estadio III

ϵ : Coeficiente de extinción molar.

1. Introducción

Una de las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial por su incidencia y mortalidad es el cáncer [1, 2]. En México el cáncer ocupa la tercera causa de muerte, siendo la primera la diabetes mellitus [3]. El cáncer se caracteriza por fallas y/o errores en el control de la replicación celular, provocando la proliferación desmedida e incontrolada de las células, iniciando así un tumor localizado, que comprime o invade las estructuras normales adyacentes o bien diferentes tejidos en el organismo (metástasis) [4].

Entre las principales terapias contra el cáncer se encuentran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; siendo esta última la más utilizada [1, 5] y se define como el uso de agentes químicos para tratar sistémicamente cualquier afección en un organismo. Sin embargo, este término se ha utilizado específicamente para describir el método terapéutico en el tratamiento del cáncer [6, 7].

A pesar de que este método terapéutico es el más usado presenta varios inconvenientes por ejemplo, toxicidad, resistencia, debilitamiento del sistema inmune, entre otros [6, 7]. Estos inconvenientes han hecho que se investiguen y desarrollen nuevos quimioterapéuticos para combatir esta enfermedad. Una de las líneas de investigación para encontrar nuevos agentes es sin duda, entre muchas, sintetizar compuestos que en sus estructuras contengan metales de transición (compuestos de coordinación, inorgánicos) [8].

Actualmente los únicos antineoplásicos inorgánicos utilizados en la clínica son el cisplatino y sus análogos [7, 8].

En la década de los 80's la Dra. Lena Ruiz Azuara diseñó un grupo de compuestos cuyo centro metálico es un ion de cobre (II), el cual es un metal de transición esencial en sistemas biológicos [9-11]. Estos compuestos fueron denominados Casiopeínas®, y se definen como un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) con dos ligantes bidentados; el

primer ligante es de tipo diimina (N-N); fenantrolina o bipyridina sustituida [9]. y un segundo ligante cargado de tipo N-O (α -aminoacidato) o donador O-O (acetilacetato o salicilaldehidato [9]).

El diseño de estos compuestos propone al cobre como participante en una reacción de Fenton para la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), al ligante diimina como un intercalante del ADN, y finalmente en el caso del segundo ligante se propone que genere cierta selectividad antitumoral. Estos compuestos han mostrado actividad citotóxica [10, 12, 13] citostática [13, 14] y antineoplásica [11, 14, 15] con resultados prometedores para su empleo como antitumorales en la clínica lo que hace indispensable que se estudien detalladamente.

En este trabajo se seleccionaron compuestos de la familia Casiopeína II del tipo $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-aminoacidato})]\text{NO}_3$ donde el aminoacidato tiene en su estructura ciclos alifáticos o aromáticos (histidina, tirosina, prolina, fenilalanina y triptofano) con el objetivo de estudiar la influencia que tiene el ligante aminoacidato en la modulación de la actividad biológica *in vitro*. Se empleó el ensayo de inhibición de la proliferación celular [16, 17] para evaluar la actividad en 4 diferentes líneas tumorales humanas:

- HeLa: Línea celular de carcinoma epitelial de cérvix estadio IV A
- SiHa: Línea celular de carcinoma de células escamosas de cérvix.
- HCT-15: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.
- SKLU-1: Línea celular de adenocarcinoma de pulmon humano.[18]

Así mismo, se comparó la actividad de los compuestos en las diferentes líneas tumorales para identificar si existe algún tipo de selectividad tumoral debido al cambio de ligante.

2. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia el hombre se ha enfrentado a diversas enfermedades que han provocando estragos en las comunidades, este motivo ha hecho que se desarrollen medicamentos, así como medios terapéuticos para combatir estas enfermedades; desde precarias cirugías en las primeras civilizaciones hasta descubrimientos como la medicina genómica en el siglo pasado [1].

Una de las enfermedades que ha acompañado al hombre a lo largo de la historia es el cáncer. La importancia de esta enfermedad radica principalmente en su elevada frecuencia y diagnóstico tardío lo que produce mortalidad a nivel mundial, así como, en la falta de tratamientos eficaces para combatirla, sobretodo en el caso de cánceres como el de pulmón y colon [1, 19].

2.1 Cáncer

Se define al cáncer como un conjunto de enfermedades ya que pueden desarrollarse en diferentes órganos además de presentar una variabilidad significativa entre los tumores de un mismo órgano en diferentes pacientes y una importante heterogeneidad fenotípica entre las células de un mismo cáncer. Esta heterogeneidad es lo que hace que la enfermedad sea difícil de tratar exitosamente [1, 5, 20].

La característica principal de esta enfermedad es que las células proliferan descontroladamente debido a errores en los sistemas de control genético que regulan el crecimiento y la muerte celular [4, 5, 19, 21]. Estos errores genéticos se dan principalmente en tres tipos de genes, los genes supresores de tumor, los protooncogenes y los genes que regulan la apoptosis, como el *BCL2* y el *P53* [4, 19]. Los genes supresores de tumor regulan el crecimiento, al presentar errores pierden esta capacidad provocando un crecimiento inapropiado. Los protooncogenes que por medio

de mutaciones se vuelven oncogenes activos, codifican proteínas estimuladoras de crecimiento anómalas permitiendo que la célula crezca independiente de los factores de crecimiento normales; finalmente, los genes que codifican la regulación de la apoptosis pueden dañarse y de esta forma no codifican las proteínas que inician la cascada apoptótica inactivando así esta vía [4, 19].

En este sentido, si la célula pierde la capacidad de morir cuando debe y prolifera descontroladamente, producirá un tumor o neoplasma que puede ser maligno o benigno. Las características principales de ambos se muestran en la tabla 1 [4].

Tabla 1 Principales diferencias entre los tumores malignos y benignos.

DIFERENCIAS ENTRE TUMORES MALIGNOS Y BENIGNOS		
	Benignos	Malignos
Grado de diferenciación	Alto	Deficiente
Núcleo celular	Normal	Grande e hipercromático
Relación núcleo/citoplasma	Bajo	Alto
Mitosis	Baja	Abundante
Crecimiento	Lento	Rápido
Tipo de crecimiento	Expansivo	Penetrante
Reincidencia después de un tratamiento quirúrgico	Poco frecuente	Frecuente
Metástasis	Ausente	Frecuente
Capacidad de producir factores angiogénicos	Baja	Alta

Adaptada de Lodish H., Berk. A., Matsudaira P., Kaiser C.A, *Cancer and molecular Cell Biology*

(Referencia 4)

Las principales características que diferencian a los tumores malignos de los benignos son: la capacidad de crecimiento y de invasividad hacia otros tejidos. Esta última se da cuando las células invaden los tejidos circundantes; y en algunas ocasiones las células tumorales logran ingresar al sistema circulatorio y diseminarse hacia nuevas áreas de proliferación, a este proceso se le conoce como metástasis, siendo en este punto cuando los tratamientos no son tan efectivos [4, 19].

En general las células cancerosas o malignas presentan seis propiedades que les permite formar un tumor maligno:

1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento.
2. Inestabilidad en las señales de anticrecimiento.
3. Evasión de la muerte por apoptosis.
4. Elución de la senescencia.
5. Capacidad invasiva y de producir metástasis
6. Capacidad de producir vasos sanguíneos sostenidamente (angiogénesis) [4, 21].

Los tumores malignos se clasifican siguiendo la regla de denominación celular según sus tejidos embrionarios de origen. Existen cuatro tipos de cáncer según el tejido de procedencia: *carcinoma* si deriva del endodermo (epitelio intestinal) o del ectodermo (epitelio neural o de la piel), *sarcomas* si derivan del mesodermo (precursores de los músculos, la sangre o del tejido conectivo), *leucemias* una clase de sarcoma (derivadas de la células hematopoyéticas) y *neuromas* (derivados del sistema nervioso) [4, 21, 22].

2.1.1 Causas del cáncer

El desarrollo del cáncer comprende muchas etapas; cada una gobernada por múltiples factores, algunos dependen de la constitución genética de los individuos pero otros dependen de su entorno y del modo de vida. En general podemos decir que el cáncer es producido por dos tipos de agentes: los exógenos y los endógenos, o bien, la combinación de estos [21].

Los agentes carcinogénicos exógenos se clasifican en: químicos, físicos y biológicos; los más conocidos son los que dañan al ADN produciendo mutaciones [23].

En cuanto a los agentes químicos estos ejercen sus efectos de forma directa en el ADN a través de la formación de uniones covalentes, ya que son especies reactivas altamente electrofílicas; otros son metabolizados en el organismo a través del complejo enzimático citocromo P-450 produciendo o liberando el carcinógeno. Cabe mencionar que no todos los agentes carcinógenos actúan sobre el ADN. Los principales daños en el ADN son: cambios en la secuencia de nucleótidos por intercalación, ruptura o alquilaciones [19, 21].

Los agentes físicos como la radiación UV (UVB 280-320 nm) y la radiación ionizante causan translocaciones y rupturas en el ADN, de igual forma las quemaduras pueden producir cáncer en las zonas de tejido dañado debido a la estimulación de la proliferación celular en la zona [19].

Finalmente, los agentes biológicos son virus o bacterias (p.ej. el virus de la hepatitis B, virus de Epstein-Barr, virus del papiloma humano y la bacteria *Helicobacter pylori*) que introducen ADN exógeno a las células o bien producen lesiones que pueden desarrollar cáncer [4, 21, 22, 24, 25].

Los factores endógenos son: herencia, inmunidad, nutrición y hormonales [24].

2.1.2 Proceso de Carcinogénesis

El proceso mediante el cual se produce un tumor canceroso se denomina carcinogénesis (Fig. 1) y consta de cuatro etapas: iniciación, promoción, transformación y progresión. En la iniciación la célula sufre una mutación en el ADN que es permanente y transmisible a las células hijas. En la promoción aumenta la proliferación de las células mutadas en la etapa inicial. Durante la tercera etapa las células se transforman a malignas debido a los daños en el ADN, provocando el crecimiento y desarrollo tumoral. Y en

la última etapa, la progresión, el tumor continúa el crecimiento, la proliferación aumenta y se adquiere la capacidad de invadir tejidos cercanos o diseminarse a sitios lejanos al sitio inicial de aparición mediante la metástasis [1, 4, 21, 25]..

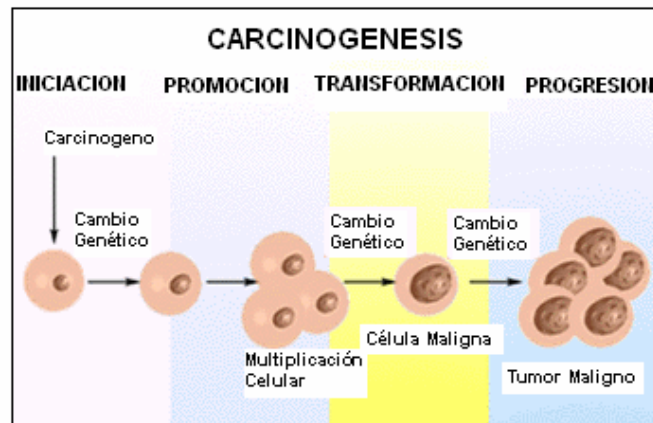


Fig.1 Proceso de Carcinogénesis

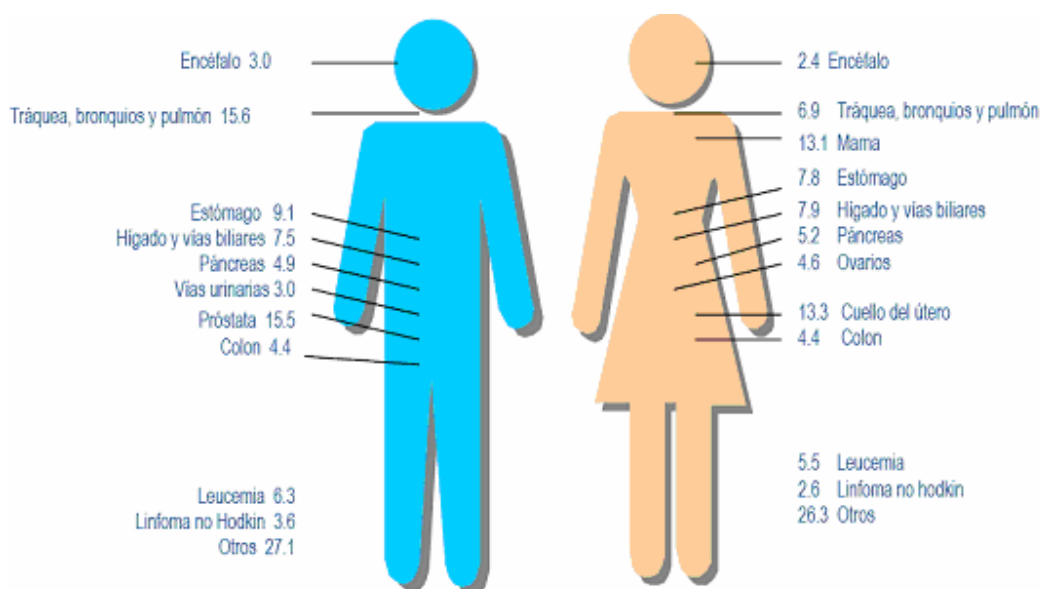
2.2 Estadísticas [3]

Durante el año 2005 en México el cáncer ocupó el tercer lugar dentro de las principales causas de muerte, 63 128 personas fallecieron a causa de esta enfermedad, el volumen representa 12.7% del total de defunciones registradas en el año.

En los hombres, el cáncer ocupó la segunda causa de muerte con 30899 defunciones, que significó 11.3% de los fallecimientos de hombres; y en las mujeres, se ubica en el tercer lugar con 32 224 decesos; es decir, 14.5% de las defunciones en la población femenina.

En los hombres, los tres tipos de cáncer que se presentan con mayor frecuencia son: el de tráquea, bronquios y pulmón (15.6%), próstata (15.5%) y estómago (9.1 %). En las mujeres se presentan dos tipos cáncer principalmente: cáncer cérvico-uterino (13.3%) y mama (13.1%); de igual

forma el cáncer de hígado, colon y vías biliares lo presentan ambos géneros en proporciones diferentes pero igual de significativas. En la figura 2 se muestra la proporción de los distintos tipos de cáncer según el género.



La distribución es para cada sexo
Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, Base de datos 2005

Figura 2: proporción de cánceres según el género en la población mexicana (ref 3)

2.3 Tratamientos

Los principales tratamientos para intentar combatir esta enfermedad son tres: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia [23, 26], que si bien no son métodos terapéuticos infalibles para combatir el cáncer, si han demostrado que con el diagnóstico adecuado y un tratamiento temprano la enfermedad puede ser curable.

Debido a la resistencia y efectos secundarios de las terapias [23, 26, 27] existentes se han tenido que desarrollar nuevas terapias para combatir esta enfermedad, por mencionar algunas tenemos:

- **Hormonoterapia:** se basa en la hormonodependencia que presentan algunos tumores para su crecimiento. Se

administran fármacos que disminuyen la actividad de las glándulas que secretan las hormonas de las cuales son dependientes los tumores. Un ejemplo de esto es la administración de análogos de LH-RH (*luteinising hormone releasing hormone – hormona liberadora de hormona luteinizante*) en el tratamiento de cáncer de próstata [23, 27].

- Fototerapia o fotodinamia: consiste en la administración de fármacos inactivos los cuales son fotosensibles tales como las porfirinas que al ser irradiados en una longitud de onda específica (λ 630nm), se activan y desencadenan una serie de reacciones que liberan especies reactivas de oxígeno (ERO's), las cuales dañan a las células provocando su muerte. La exposición a la luz se hace a través de una fibra óptica especial o puede ser directa en el caso de que el cáncer sea en la piel [26, 27].
- Hipertermia: en esta terapia se somete a los tumores a temperaturas elevadas mediante ondas de alta frecuencia. Se ha observado que cuando las células tumorales se someten a hipertermia consumen más oxígeno y mueren por falta relativa de éste, además, se vuelven sensibles a otras terapias como la quimioterapia y radioterapia [23, 26].
- Transferencia de genes: involucra transferir genes a las células para restaurar, activar o conferirles nuevas funciones. Se utiliza principalmente con el objeto de inactivar un oncogen o reemplazar un gen supresor de tumor mutado, en caso de estar ausente [23, 27].

Si bien estas nuevas terapias no están validadas han demostrado resultados positivos en el intento de curar la enfermedad [1, 6, 23, 26].

Los tratamientos existentes y los que se encuentran en desarrollo tienen como blanco terapéutico las diferencias de propiedades biológicas y señales de autorregulación entre células malignas y células normales. Entre ellas se encuentran: *defectos en los sistemas de reparación del ADN, en los controles del ciclo celular y en las vías de apoptosis*. El crecimiento tumoral también puede inhibirse con la administración de agentes anti-angiogénicos que van a limitar el aporte sanguíneo y en consecuencia de nutrientes necesarios para el desarrollo del tumor. Comprendiendo los mecanismos de control y como se alteran cuando se presenta la enfermedad; podemos diseñar tratamientos más precisos y específicos, tanto para cada tipo de cáncer, como para cada paciente [22, 23, 27].

2.3.1 Cirugía

El tratamiento más antiguo contra el cáncer es la cirugía; sin embargo, solo puede ser utilizado si el tumor está bien localizado y diferenciado, o si presenta una metástasis localizada. Si el tumor se localiza en un tejido de difícil acceso o vital para el organismo, no se puede realizar este procedimiento debido a la peligrosidad que representa. Es el único tratamiento que permite eliminar el cáncer o metástasis poco diseminadas. Generalmente, se utilizan tratamientos adicionales como la quimioterapia o la radioterapia, antes o después de la cirugía, lo que ayuda a una completa erradicación de las células malignas [22, 23, 27].

2.3.2 Radioterapia

En la radioterapia se utiliza radiación para el tratamiento del cáncer, esta radiación proviene de rayos γ , rayos X, o bien de radiofármacos de

algunos elementos radiactivos como ^{60}Co , ^{198}Au , ^{131}I . La importancia de esta terapia radica en que se pueden radiar zonas específicas sin dañar el tejido sano. La radiación al pasar por agua produce electrones que a su vez producen radicales libres que pueden dañar al ADN y de esta forma provocar la muerte celular mediante mecanismos apoptóticos. Sin embargo, una porción significativa de células tumorales son hipóxicas (crecen en concentraciones de oxígeno limitadas) lo que hace que estas células sean poco sensibles a la radiación, para que esto no ocurra, se sensibiliza a la células administrando oxígeno, ya sea durante o después de la radiación. De igual forma, se puede administrar metronidazol para sensibilizar a las células. Es por esto que la radioterapia que aunque es una técnica bien establecida se sigue investigando para determinar tiempos óptimos de exposición y frecuencia de la radiación empleada [23, 25, 27].

2.3.3 Quimioterapia

La quimioterapia se define como la administración de agentes químicos para curar cualquier afección en un organismo de manera sistémica, afectando cualquier órgano. Así, la quimioterapia contra el cáncer se define como un tratamiento general y sistémico capaz de alcanzar las células tumorales, salvo tumoraciones localizadas en lugares poco accesibles como el sistema nervioso [6, 7, 23, 26].

Debido a que la quimioterapia es un tratamiento sistémico que ataca a las células de proliferación continua, se debe mencionar que en un organismo no sólo las células cancerosas son de alta proliferación, por ejemplo las células del sistema inmune, del tracto digestivo y del folículo piloso son de alta proliferación también. Por tanto, la quimioterapia es capaz de generar reacciones adversas indeseables como: alta toxicidad en diferentes órganos, inmunosupresión, pérdida de cabello, supresión de médula ósea, náuseas y vómito [6, 26, 27].

Uno de los principales problemas en el uso de la quimioterapia, es sin duda, la resistencia que se define como la capacidad de las células a abatir los efectos de los fármacos anticancerígenos [7, 23, 27].

La resistencia a los tratamientos puede ser: adquirida o primaria. La resistencia adquirida es la responsable de que algunos tumores vuelvan a aparecer después de haber sido tratados y aparentemente erradicados, éstos nuevos tumores se generan a partir de células resistentes al tratamiento inicial [4, 23, 28].

La resistencia primaria es cuando el tumor muestra una pequeña o nula respuesta al tratamiento. Se ha demostrado que la resistencia primaria se debe a mecanismos bioquímicos que inactivan ya sea al fármaco o su efecto [6, 7, 23, 29], como:

- Disminución de la captación o aumento en la eliminación del fármaco administrado.
- Disminución de las enzimas activadoras del fármaco.
- Aumento de las enzimas que inactivan el fármaco.
- Disminución de la afinidad del fármaco por sus receptores o aumento en el número de éstos.
- Incremento de la reparación del ADN.
- Incremento de la actividad de alguna vía metabólica alternativa, no inhibida por el fármaco.

El aumento o disminución en la actividad de estos mecanismos está asociado a la inestabilidad genética que presentan las células [4, 7, 30].

Puesto que los quimioterapéuticos en su mayoría, son incapaces de curar el cáncer por si solos, se suelen administrar diferentes

quimioterapéuticos de forma combinada o secuencial, para aumentar la probabilidad de erradicar las células tumorales al dañar sitios bioquímicos diferentes, disminuir la proliferación de las células tumorales resistentes y minimizar la toxicidad en los tejidos normales. Estas combinaciones se diseñan a partir de las siguientes consideraciones: [22, 27, 29, 31].

- Seleccionar fármacos con mecanismos de acción diferentes.
- Seleccionar fármacos que difieran en el sitio de toxicidad principal.
- Usar dosis y cronologías óptimas para cada fármaco, con intervalos entre dosis, para permitir la recuperación en los tejidos normales más sensibles.

2.3.3.1 Clasificación de los Quimioterapéuticos

Los quimioterapéuticos pueden ser clasificados con tres criterios diferentes: por su naturaleza, por su efecto en el ciclo celular o por su mecanismo de acción [7, 23].

- Por su naturaleza: contempla únicamente la procedencia química de los compuestos usados:
 - ◆ Extraídos de productos naturales
 - ◆ Sintéticos:
 - Inorgánicos.
 - Orgánicos.
- Por su efecto en el ciclo celular: clasifica a los quimioterapéuticos en términos del efecto que tienen sobre el ciclo celular, esto es, si son ciclo específicos y no ciclo específicos):[7]
 - ◆ Un agente específico del ciclo celular (ECC) es citotóxico sólo en una fase del ciclo celular (G_0 , G_1 , G_2 , S o M).

-
- ◆ Un agente no específico del ciclo celular (NECC) es citotóxico en cualquier fase del ciclo celular.

Los fármacos ECC han demostrado ser más eficaces en tumores que proliferen más rápido como las neoplasias hematológicas. Los fármacos NECC son utilizados normalmente en tumores sólidos que se encuentren en la fracción de alto o bajo crecimiento [23, 31].

- Por su mecanismo de acción: clasifica a los quimioterapéuticos en términos del efecto biológico que tienen en el organismo:
 - ◆ Fármacos alquilantes.
 - ◆ Fármacos intercalantes
 - ◆ Antimetabolitos (análogos estructurales).
 - ◆ Antibióticos.
 - ◆ Enzimas.
 - ◆ Anticuerpos.
 - ◆ Agentes diversos (inhibidores de la topoisomerasa, fijadores de la tubulina).
 - ◆ Hormonas e inhibidores de hormonas.

El conocimiento de la farmacodinamia de los quimioterapéuticos es fundamental para su uso apropiado. Esto incluye la comprensión de los mecanismos de acción y sus efectos fisiológicos. La mayoría de los quimioterapéuticos actuales actúan de modo primario sobre la síntesis, la reparación o la función de macromoléculas; es decir, sobre la producción o la función del ADN, el ARN o las proteínas [23, 30, 31].

Un quimioterapéutico ideal es aquel que erradique las células malignas sin dañar a las normales; sin embargo, a la fecha esto no se ha conseguido. Por lo que en la actualidad se desarrollan nuevas terapias y se mejoran las ya existentes [7, 22].

Entre los medicamentos que actualmente están en desarrollo clínico se encuentran: los inhibidores de transducción de señal, inhibidores de microtúbulos, antimetastásicos, agentes antiangiogénicos, agentes hipóxicos específicos de células madre, fármacos radiosensibilizantes de células malignas y radioprotectores de células sanas, agentes citoprotectores, vacunas, factores de crecimiento, inhibidores de reparación del ADN, y compuestos a base de metales de transición, entre otros; con la finalidad de encontrar quimioterapéuticos económicos, menos tóxicos y más efectivos para combatir la enfermedad [7, 23, 29, 31, 32].

2.4 Quimioterapéuticos Inorgánicos

Los únicos antineoplásicos de naturaleza inorgánica que se usan en la clínica actualmente son el cisplatino y sus análogos. Son compuestos d^8 de geometría cuadrada plana y su centro metálico es un átomo de platino (II). La molécula fue descubierta en 1844 por Michele Peyrone en Turín y sus propiedades antineoplásicas fueron descubiertas en 1965 por Rosenberg en Michigan cuando estudiaba el efecto del campo eléctrico en el crecimiento de *Escherichia coli*, observo crecimiento filamentoso en las células, lo que es indicativo de división celular sin proliferación celular paralela. Encontró que el electrodo de platino que había utilizado reacciono con el medio (NH_4Cl) formando una serie de compuestos de coordinación de platino entre ellos el cisplatino. En 1971 inicio la fase clínica I y en 1979 fue aprobado por la FDA como agente quimioterapeutico.

A pesar de que existen alrededor de 28 compuestos análogos del cisplatino que presentan actividad antineoplásica sólo 5 son utilizados en la clínica: el cisplatino (1) y el carboplatino (2) en todo el mundo; el oxaliplatino (3) en algunos países, nedaplatino (4) en Japón y el lobaplatino (5) en China. Fig (3) [33, 34].

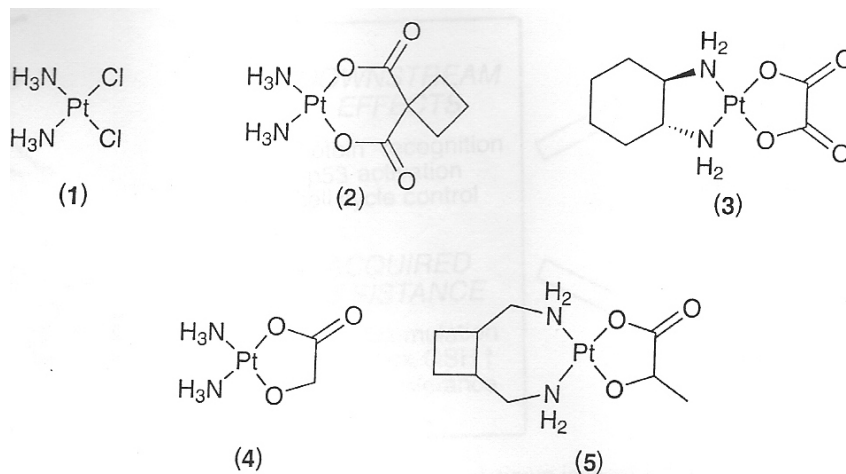
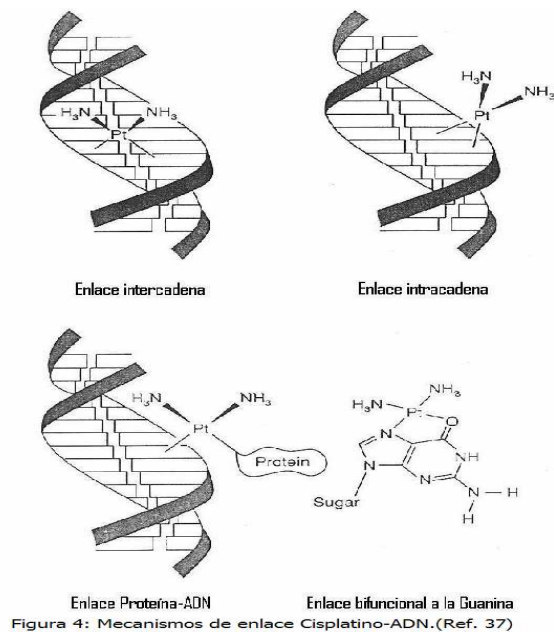


Figura 3. Quimioterapéuticos a base de platino aprobados clínicamente en el mundo

El cisplatino se administra generalmente por vía intravenosa cada 3 o 4 semanas y es preservado en el torrente sanguíneo debido a la concentración de iones cloruro, permitiéndole difundir de manera pasiva al interior de la célula en donde por medio de una reacción de hidrólisis pierde una molécula de agua para formar el complejo $[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ el cual se podría coordinar con los ácidos nucleicos. La hidrólisis del segundo cloro forma un enlace con el ADN en el átomo más nucleofílico, el Nitrógeno 7 de la Guanina [33, 34].

En general el mecanismo de acción del cisplatino se lleva a cabo mediante la formación de aductos inter e intra cadena en el ADN, Fig 4 lo que provoca la inhibición de la replicación celular y estimula la apoptosis vía dependiente.[33, 34].



Este antineoplásico se utiliza principalmente en el tratamiento de carcinomas de ovario, testículo, vejiga y teratomas; y entre sus efectos secundarios destacan: náuseas, vómito, depresión, ototoxicidad, nefrotoxicidad y neuropatías [8, 22, 35].

Sin embargo, debido a que los tumores presentan resistencia al tratamiento con cisplatino o sus análogos y la alta toxicidad de este fármaco, se ha investigado el uso de otros metales de transición [34, 36].

2.4.1 Otros metales con potencial actividad antineoplásica

Hacia el 2005 existían 1100 compuestos aprobados por el NCI (National Cancer Institute) con potencial actividad antineoplásica [36].

Entre los metales cuyos compuestos han presentado actividad antitumoral se encuentran: Au[37], Ru, Rh Nb, Mo, Ti y V[38].

El desarrollo de nuevos compuestos a base de metales de transición con potencial actividad antineoplásica es motivado por los inconvenientes que los quimioterapéuticos utilizados actualmente en la clínica presentan como: toxicidad, resistencia, altos costos, entre otros. Una de las razones por las cuales los compuestos a base de metales no pueden ser evaluados en fases clínicas es debido a que alguna de sus propiedades físico-químicas son deficientes como la solubilidad y la estabilidad [39].

En general, entre los mecanismos de acción de los compuestos a base de iones metálicos se encuentran: [34, 36-39].

- Formación de enlaces inter e intra cadena en el ADN.
- Inhibidores de angiogenesis.
- Inhibición de la topoisomerasa
- La unión o interacción con muchas biomoléculas, debido a que los iones metálicos son deficientes de electrones (ácidos de Lewis) y en un organismo vivo existen muchas biomoléculas ricas en electrones como las proteínas y el ADN, por tanto los iones tienden a interactuar con estas biomoléculas ricas en electrones (bases de Lewis) [36].
- Generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), ya que éstas pueden oxidar diferentes organelos celulares o bien modificar el potencial redox de la célula.

El uso de metales de transición en el desarrollo de quimioterapéuticos ha sido impulsado por sus propiedades ya que algunos son utilizados de manera esencial en los seres vivos. Las principales funciones de los metales se mencionan a continuación: [8, 26, 35, 40]

-
- Son parte de las denominadas metaloenzimas, las cuales son indispensables en muchas vías metabólicas.
 - Por medio de reacciones Redox facilitan el flujo de electrones, base importante en la respiración y en el transporte de señales en los nervios.
 - Facilitan el transporte de oxígeno para la producción de energía mediante reacciones Redox.

2.5 Metales en biología

La importancia de los metales en la biología se debe a que algunos metales son esenciales para los seres vivos, denominados así porque son necesarios para el correcto funcionamiento del metabolismo de los seres vivos. Los metales esenciales se dividen en elementos abundantes y elementos traza. Existen 26 elementos esenciales, de los cuales 14 son metales. Si se separan los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y cloro que son los elementos de mayor abundancia e importancia bioquímica, la selección queda limitada a 14 elementos metálicos y 5 no metálicos. De estos 19 elementos, 4 son abundantes – sodio, potasio, magnesio y calcio- y 15 son traza –vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, molibdeno, wolframio, boro, selenio, silicio, flúor y yodo [26, 41, 42]. En la Tabla 2 se enlistan algunas de las principales funciones de los elementos en los seres vivos.

Tabla 2: Algunas funciones específicas de los elementos en los seres vivos. Tomada de Frausto Da Silva, W., *The Biological Chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*. 1991, U.S.A.: Clarendon Press Oxford (ref. [41])

Función general	Elemento o grupo funcional	Forma química	Ejemplos de funciones específicas
Funciones estructurales	<i>H, O, C, N, P, S, Si, B, F, Ca,</i>	Unidos a compuestos orgánicos o en compuestos inorgánicos solubles	Formación de tejidos, membranas esqueléticas, dientes, estructuras internas, etc
Funciones electroquímicas	<i>H, Na, K, Cl, Mg, Ca,</i>	iones libres	Segundos mensajeros, producción de energía, etc
Efectos mecánicos	<i>Ca, Mg,</i>	iones libres intercambiándose con otros iones	Activación de la contracción muscular, lisis de vesículas, etc
Catálisis ácido-base	<i>Zn, Fe, Ni, Mn</i>	Unido a enzimas	Digestión de los alimentos, hidrólisis de urea, aumento de pH, etc
Catálisis redox	<i>Fe, Cu, Mn, Mo, Se, Co, Ni, V</i>	Unido a enzimas	Reacciones con oxígeno, inhibición de la peroxidación de lípidos, etc
Otras funciones	<i>Fe, Cu, I</i>	En proteínas Compuestos covalentes	Transporte de oxígeno Acción hormonal

Cabe mencionar que a pesar de que algunos metales sean esenciales pueden originar procesos de intoxicación si la dosis ingerida es lo suficientemente elevada. Existe un margen de concentración bajo que genera una actividad metabólica insuficiente; una concentración mayor asociada con un funcionamiento bioquímico óptimo y, por encima de esta, concentraciones altas que terminan siendo tóxicas, o incluso, letales [26, 41, 42].

Así mismo algunos metales también son utilizados en la clínica. Por ejemplo:

- En la medicina nuclear en donde se utilizan radio-nucleótidos, ya sea, para obtener imágenes que se generan a partir de la radiación y así llevar a cabo el diagnóstico o bien para aprovechar esa radiación en terapias como el cáncer. Entre los metales que se utilizan para estos fines se encuentran el ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{111}In y ^{201}Tl utilizados en radio-imagen y ^{89}Sr , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{131}I y ^{10}B utilizados en radio-terapia [35, 36, 42, 43].
- En tratamientos de ciertas enfermedades, por ejemplo: el oro que ha sido utilizado contra la artritis; plata utilizada como antimicrobiano, sales de bismuto y aluminio utilizados para padecimientos gastrointestinales; antimonio, oro y rutenio como antiparasitarios; litio en el tratamiento de psicosis maniaco-depresiva; vanadio como hipoglucemiante y platino como agente anticancerígeno, entre otros [42-44].

Existen también otro tipo de metales, denominados tóxicos como el cadmio, mercurio, talio, plomo, bismuto, berilio y arsénico, entre otros que al exponerse a estos provocan daños considerables en los seres vivos.

2.5.1 Cobre

El cobre, de símbolo Cu (del latín *cuprum*), es el elemento químico de número atómico 29, localizado en la primera fila de los metales de transición en el grupo 11d (familia 1B), de configuración electrónica $[\text{Ar}]4s^23d^9$, con un peso atómico de 63.546, sus estados de oxidación pueden ser 0, I, II, III y IV, siendo el más común el estado de oxidación II, aunque también se puede encontrar con estado de oxidación I. El ion Cu(II) es considerado un ácido fuerte [45].

Se trata de un metal de transición de color rojizo y brillo metálico que, junto con la plata y el oro, forma parte de la llamada familia del cobre, caracterizada por ser los mejores conductores de electricidad.

En sistemas biológicos el cobre contribuye a la formación de glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunológico y huesos y por tanto es esencial para la vida humana. El cobre se encuentra en algunas enzimas como la *citocromo c* oxidasa, la *lisil oxidasa* y la *superóxido dismutasa* [41].

El desequilibrio de cobre en el organismo ocasiona una enfermedad hepática conocida como enfermedad de Wilson, el origen de esta enfermedad es hereditario, y aparte del trastorno hepático que ocasiona también daña al sistema nervioso.

2.6 Casiopeínas

En los 80's un grupo de investigadores encabezados por la doctora Lena Ruiz diseñó y desarrolló un grupo de compuestos con el fin de encontrar un agente antineoplásico menos tóxico y más efectivo a base de cobre (II); en su esfera de coordinación estos compuestos contienen dos ligantes bidentados, el primer ligante de tipo di-imina (N-N), que puede ser una fenantrolina o una bipyridina sustituida, y el segundo ligante cargado de tipo α -aminoacidato (N-O) o donador (O-O) [9].

Estos compuestos fueron denominados Casiopeínas[®] y se clasificaron en nueve familias según la Tabla 3.

Tabla 3: clasificación de las Casiopeína donde (N-O) = α -aminoacidato y (N-N) es una diimina aromática.

Clave	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína IIIa	[Cu(N-N)(acetilacetato)]NO ₃
Casiopeína IIIs	[Cu(N-N)(salicilaldehidato)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-2,2-bipiridina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO ₃

Las características principales en el diseño de estos compuestos son las siguientes:

- Tiene como centro metálico un ion de Cu II y debido a que es un metal esencial se tiene la hipótesis de que estos compuestos son menos tóxicos comparados con el cisplatino, porque el organismo tiene procesos homeostáticos para eliminar los excesos del metal.
- El cobre éste podría participar en ciclos redox mediante reacciones tipo Fenton, liberando especies reactivas de oxígeno.[9, 10, 46]
- En las Casiopeínas se utiliza como ligante di-imina a la bipiridina o a la fenantrolina que al ser sistemas aromáticos planos funcionan como intercalantes del ADN [47]

-
-
- La geometría de los compuestos es pirámide de base cuadrada con agua apical en el centro metálico en estado sólido; y en solución su estructura es octaédrica, debido a la solvatación, cabe mencionar que las moléculas de agua coordinadas en solución son muy lábiles y se pueden perder fácilmente.[48]
 - Son estables debido al efecto de retrodonación del centro metálico con sus ligantes.[49-51]
 - Por último se tiene una segunda hipótesis que propone que el segundo ligante (donador O-O o O-N) genera selectividad tumoral.

De entre la amplia familia de Casiopeínas sintetizadas destacan dos compuestos, la casiopeína [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -glicinato)]NO₃ (Casiopeína II-gly) y la Casiopeína [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO₃ (Casiopeína III-ia) debido a que poseen buenas propiedades fisicoquímicas, buena actividad biológica y baja toxicidad. Entre los estudios que se han realizado a estas Casiopeínas se encuentran estudios de estabilidad, relaciones estructura-actividad, estudios biológicos *in Vitro* e *in vivo* [11, 12, 14, 15, 46, 47, 50, 52-54].

Utilizando Casiopeína II-gly en células L1210 de leucemia murina y CH1 de cáncer de ovario (células resistentes a cisplatino), a diferentes dosis se muestra que la eliminación de la población de células tumorales se presenta principalmente por mecanismos apoptóticos debidos a la activación de caspasas [55]. Utilizando la misma casiopeína en células de glioma C6 *in Vitro* se observa incremento en la formación de ERO's e inhibición de la proliferación celular por apoptosis y necrosis vía caspasa dependiente e independiente en función de la dosis, fragmentación de ADN nuclear además de disminución del volumen tumoral *In Vivo* [14]. Cuando se evaluó la

casiopeína III-ia en la línea tumoral HCT-15 se observó un aumento en la expresión del gen Bax y fragmentación del ADN nuclear, indicando que el mecanismo mediante el cual disminuye la población celular es por la activación de caspasas, en especial de la caspasa 3, cabe señalar que también se observó que las fases del ciclo celular no se ven afectadas [15].

También se ha evaluado la toxicidad de las Casiopeínas encontrándose que producen daño a la mitocondria interviniendo con el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa[56], provocan cardiotoxicidad inhibiendo la síntesis de ATP [57, 58] sin producir lipoperoxidación[12]. En estudios de hematotoxicidad se observó que la Casiopeína II-gly causa daño en los eritrocitos provocando anemia hemolítica acompañada de leucocitosis y neutrofilia, éstos últimos atribuidos a la formación de ERO's. [59]. Se observó que al administrar DMSO disminuye la toxicidad de las casiopeínas porque se propone que una de las especies formadas sea el radical hidroxilo, que se sabe que el DMSO puede secuestrar a dicho radical produciendo así un efecto protector [60].

Con la finalidad de determinar tiempos de vida media y de farmacocinética preclínica se validaron métodos cromatográficos con plasma de rata, dando como resultado que las Casiopeínas se unen a proteínas plasmáticas [61].

Se han realizado dos estudios QSAR. El primer estudio se realizó empleando complejos de la familia III con fórmula general $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$ y en un segundo estudio se emplearon complejos de la familia II con fórmula general $[Cu(R-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO_3$. De estos estudios se obtuvieron ecuaciones que permiten describir y predecir el comportamiento biológico de los complejos bisoños y novedosos, encontrando una relación lineal entre las actividades calculadas y las evaluadas.

Los parámetros que se utilizaron para construir las ecuaciones fueron: un descriptor estérico (RM), un hidrológico π_{fen} y un electrónico ($E_{1/2}$); siendo el descriptor estérico y el electrónico los que tienen una mayor contribución en las ecuaciones. Con respecto al descriptor estérico se concluyó que la presencia del tercer anillo en la estructura del ligante di-imina presente en la fenantrolina y no así en la bipyridina, resultó ser fundamental en la actividad biológica. Y con respecto al parámetro electrónico se concluyó que los compuestos que presentaron un potencial más negativo resultaron ser los más activos, estos compuestos fueron los que en las fenantrolinas tenían sustituyentes electrodonadores (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina) [46, 53]

En los estudios QSAR mencionados se mantuvo constante el ligante aminoacidato y sólo se intercambió el ligante di-imina, una vez conocido el ligante di-imina era necesario conocer el efecto del segundo ligante, comenzando por evaluar el efecto en el descriptor electrónico $E_{1/2}$ y en la actividad biológica; esto es, si se calcula $E_{1/2}$ se sabrá que tan activos pueden ser los complejos y si esta actividad depende del complejo o sólo de una parte de él.

3. HIPÓTESIS Y **OBJETIVOS**

3.1 Hipótesis

Al intercambiar el ligante α -glicinato por aminoácidos cíclicos o alifáticos, manteniendo constante el ligante di-imina 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en las Casiopeínas no se producirá un cambio significativo en el potencial de media onda $E_{1/2}$ y por consiguiente en la actividad biológica debidos al tipo y tamaño del aminoácido.

3.2 Objetivos generales

- Calcular el potencial de media onda $E_{1/2}$ de compuestos del tipo $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-aminoacidato})]\text{NO}_3$ (Casiopeínas®)
- Evaluar la actividad *in vitro* de compuestos del tipo $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-aminoacidato})]\text{NO}_3$ (Casiopeínas®), donde el donador α -aminoacidato tiene en su estructura ciclos alifáticos o aromáticos; mediante el ensayo de inhibición de la proliferación celular y tinción con sulforrodamina B, en diferentes líneas tumorales humanas.

3.2.1 Objetivos particulares

- Sintetizar los complejos:
 1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO₃
 2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirosinato)]NO₃
 3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -histidinato)]NO₃
 4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -prolinato)]NO₃
 5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO₃
- Caracterizar los complejos mediante técnicas de: IR, UV-vis, análisis elemental, conductimetría, momento magnético, y voltamperometría cíclica.
- Determinar el potencial de media onda mediante un estudio de voltamperometría cíclica.
- Determinar los valores de $E_{1/2}$
- Analizar la influencia que tiene el ligante aminoacidato en el valor de potencial de media onda ($E_{1/2}$).
- Evaluar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en líneas tumorales humanas:
 - HeLa: Línea celular de carcinoma epitelial de cérvix estadio IV A
 - SiHa: Línea celular de carcinoma de células escamosas de cérvix.
 - HCT-15: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano.
 - SKLU-1: Línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano pobremente diferenciado estadio III
- Analizar la influencia que tiene el ligante aminoacidato en la modulación de la actividad biológica *in vitro*.
- Analizar la influencia que tiene el ligante aminoacidato en la selectividad tumoral.

4. DESARROLLO **EXPERIMENTAL**

4.1 Síntesis

La síntesis se realizó según lo reportado en las patentes.[9]

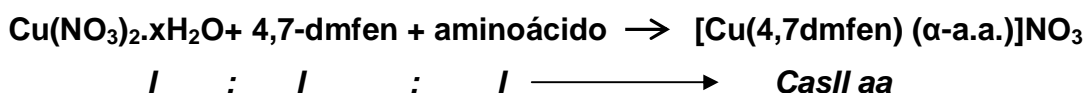
El $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99.99%) y los ligantes(N-O) utilizados en la síntesis fueron adquiridos a SIGMA-ALDRICH Co, el ligante 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (99.99%) fue adquirido a GFS Chemicals y los disolventes fueron adquiridos a J.T. Baker, R.A.

-Ligantes (N-O): Fenilalanina, Prolina, Tirosina, Histidina y Triptofano.

-Disolventes: metanol (MeOH), etanol (EtOH), éter etílico, agua destilada, agua desionizada.

-Solución acuosa de NH_4OH .1:4

Reacción general de los compuestos:



4.2 Caracterización química.

4.2.1 Análisis elemental

Se determinaron los porcentajes de C, H, N con un analizador *Fissions Instruments Analyzer* modelo EA 1108. La técnica de análisis se basa en la combustión de las muestras a una temperatura de entre 950-1100°C, en atmósfera de oxígeno puro para convertir los elementos antes mencionados en gases simples los cuales son detectados en un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química y con los resultados obtenidos se determinó la pureza, la fórmula mínima y el peso molecular de cada complejo.

4.2.2 Espectroscopia de infrarrojo cercano y lejano

Los espectros de IR cercano se realizaron en la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación) con un espectrofotómetro Nicolet AVATAR 320 FT-IR en el intervalo de 4000-400 cm^{-1} , las muestras se prepararon en pastillas de KBr (Sigma-Aldrich) grado espectroscópico

Para la espectroscopia de IR lejana se empleó un espectrofotómetro IR Bruker Vector 22 en el intervalo de 800-200 cm^{-1} , las muestras se prepararon en polvo fino diluidas con KBr (Sigma-Aldrich) grado espectroscópico.

4.2.3 Conductimetría

La conductividad de los complejos se determinó en solución metanólica del complejo a una concentración de 1 mM a 25°C con un Conductímetro Jeanway 4330 Conductivity and pH meter.

4.2.4 Momento magnético

La susceptibilidad magnética para cada complejo se determinó empleando una balanza Mkl de Sherwood Scientific.

La determinación se realizó empacando las muestras en un tubo para susceptibilidad magnética se determinó altura de empacamiento, la temperatura a la que se realizó la determinación, el valor de la constante de la balanza magnética (cte 0.99128), el peso del tubo con y sin muestra, así como la lectura de la balanza con el tubo con y sin muestra.

El momento magnético efectivo se calculó, corrigiendo las aportaciones diamagnéticas de ambos ligantes.

El valor de momento magnético efectivo se calculó con las siguientes relaciones:

$$\chi_g = \frac{[(C * h)(R - R_0)]}{(10^9 * m)}$$

$$\chi_m = \chi_g * PM$$

$$\chi_m^c = \chi_m - \chi_d$$

$$\mu_{ef} = 2.83 \sqrt{\chi_m^c * T}$$

Donde:

C= cte de la balanza

h= altura de la columna

R₀= lectura de la celda vacía

R= lectura de la celda con muestra

m= peso de la muestra en gramos

T= temperatura en Kelvin

PM= peso molecular en g/mol

μ_{ef}= momento magnético efectivo

4.2.5 Espectroscopia UV-vis

La espectroscopia UV-vis se realizó con un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452 de arreglo de diodos en el intervalo de 200-400 nm.

Preparando soluciones metanólicas de diferentes concentraciones con el fin de obtener absorbancias en el intervalo de 0.2 a 0.8. Con estas absorbancias se calcularon los coeficientes de extinción molar (ε), graficando absorbancia vs. concentración para cada máximo en donde ε es la pendiente de la gráfica resultante.

La obtención de los máximos en la región del Visible (400-800 nm), se hizo a partir de soluciones metanólicas a una concentración de 5 mM para cada compuesto.

En todos los experimentos se empleó metanol como blanco.

4.3 Estudio electroquímico.

La voltamperometría cíclica se realizó con un potenciostato-galvanostato EG & G PARC modelo 263-A; se utilizó un arreglo de tres electrodos, en donde, el electrodo de trabajo fue un disco de carbón-vítreo, un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M.

El sistema de trabajo fue una disolución EtOH:H₂O 40:60 en un volumen final de 10 mL de los cuales: 5 mL fueron de una disolución acuosa de electrolito soporte KNO₃ (SIGMA-ALDRICH Co) 0.1 M, 1 mL de una disolución acuosa de buffer BTP (1,3-bis [tris (hidroximetil) metilamino]propano SIGMA-ALDRICH Co) 0.1M a pH 7.4, 4mL de EtOH, y el peso necesario del compuesto para obtener una concentración final de 1 mM en celda.

A estas disoluciones se les hizo pasar una corriente de N₂ burbujeadas por un lapso de 20 minutos antes de comenzar cada experimento y la limpieza del electrodo se realizó puliéndolo con alúmina y papel suave entre cada experimento.

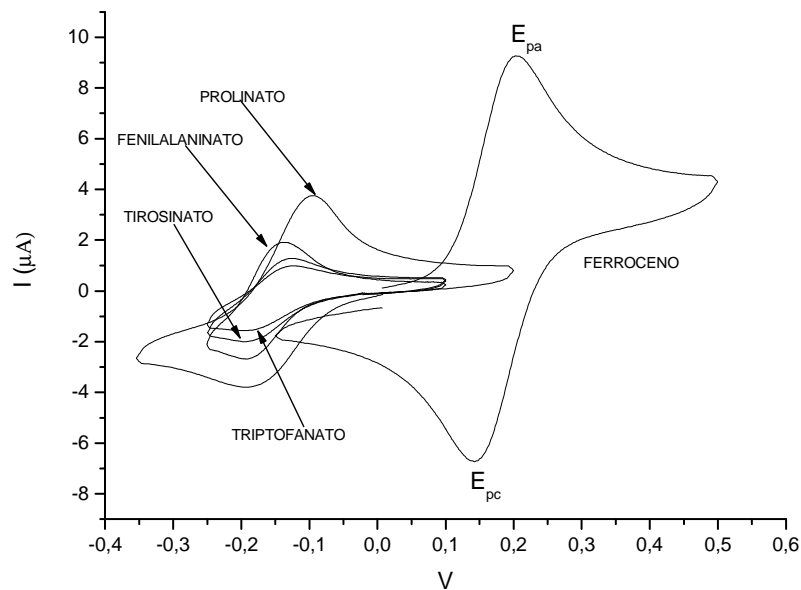


Fig. 5: Voltamperograma de los compuestos sintetizados y ferroceno con un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M. a una concentración de compuesto de 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO₃ como electrolito soporte. En donde E_{pa} es el potencial de pico anódico y E_{pc} es el potencial de pico catódico.

De los voltamperogramas obtenidos se obtuvieron los potenciales de pico anódico E_{pa} y pico catódico E_{pc} como se muestra en la figura 5; con estos datos se calculó el potencial de media onda (E_{1/2}) con la relación:

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} - E_{pc}}{2}$$

El potencial de media onda (E_{1/2}) se reporta con respecto al par ferricino-ferroceno según la recomendación de la IUPAQ [62]. Se realizó un estudio a diferentes velocidades de barrido de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mV/s en dirección anódica para determinar el comportamiento electroquímico de los complejos.

4.4 Ensayos biológicos

La determinación de la concentración inhibitoria 50, se realizó mediante el ensayo de inhibición de la proliferación celular [16], para lo cual se emplearon cuatro líneas tumorales humanas: HeLa, SiHa, HCT-15 y SKLU-1. Se emplearon placas de 96 pozos en los cuales se sembraron 2×10^4 células por pozo; estas placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h con 100 µL de medio de cultivo D-MEM adicionado al 10% con suero fetal bovino (SFB), transcurrido el tiempo de incubación se aspiró el medio y se agregaron 90 µL de medio de cultivo adicionado con SFB y 10 µL de la disolución de los complejos a evaluar para obtener una concentración final en celda de 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 µg/mL por triplicado, se volvieron a incubar a las condiciones antes descritas y al término del tiempo de incubación se aspiró el medio y las células se fijaron con 100 µL de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4°C, posteriormente se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La tinción se realizó, una vez secas las placas, con 100 µL de sulforrodamina-B al 0.4% en ácido acético al 10% y se incubaron por 30 min. a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se lavaron con ácido acético al 1% hasta que no se desprendiera colorante, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Una vez secas se disolvió el colorante con 100 µL de Tris-base pH 10.5 (tris(hidroximetil) aminometano) 10 mM por 5 min con agitación suave, y se leyó la absorbancia en un lector para microplacas BIO-RAD 550 a una longitud de onda de 564 nm.

El cálculo de % de sobrevivencia se obtiene mediante la relación:

$$\% \text{ sobrevivencia} = 100 * \left[\frac{A_T}{A_C} \right]$$

Donde:

A_T = absorbancia de los pozos tratados

A_C = absorbancia de los pozos control

El testigo negativo fue agua y los controles positivos fueron cisplatino, CasII-gly ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -glicinato)]NO₃) y CasIII-Ea ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO₃) cuyos valores de CI₅₀ son conocidos en estas líneas celulares [46].

El cálculo de la CI₅₀ se obtuvo mediante el análisis estadístico Probit, utilizando el programa StatPlus 2005 [63].

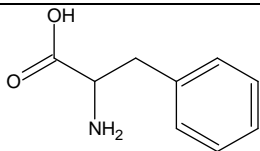
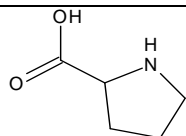
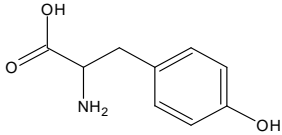
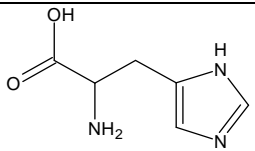
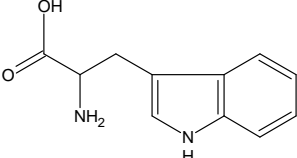
5. RESULTADOS Y **ANÁLISIS DE** **RESULTADOS**

5.1 Síntesis de los complejos

Se sintetizaron satisfactoriamente 5 complejos de la familia de las Casiopeínas; la síntesis fue realizada según los procedimientos reportados en las patentes sin ninguna modificación importante; los porcentajes de los rendimientos obtenidos para cada complejo variaron dependiendo del aminoácido utilizado, siendo el más alto el de fenilalanina y el más bajo el de histidina Tabla 4.

Los nombres de los complejos, las estructuras de los α -aminoácidos y los porcentajes de los rendimientos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Nombre de cada complejo sintetizado, estructura del aminoácido, rendimientos de síntesis y clave del complejo.

Clave	Nombre	Aminoácido	%Rend
CasII-Fen	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO ₃		69.16
CasII-Pro	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -prolinato)]NO ₃		63.09
CasII-Tyr	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirosinato)]NO ₃		60.1
CasII-His	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -histidinato)]NO ₃		41.2
CasII-Trip	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO ₃		55.4

Para un mejor seguimiento de los complejos se mantendrá el orden mostrado en esta tabla.

5.2 Caracterización

5.2.1 Análisis elemental

Los resultados del análisis elemental de los porcentajes para C, H y N, muestran que existe concordancia entre los datos teóricos y experimentales, ya que las diferencias (Δ) entre los ambos valores son menores a 0.5% a excepción del porcentaje de H en el complejo 5 (0.73%) y sugiere que la fórmula mínima predicha para cada complejo es correcta. Los complejos 1, 2 y 4 tienen moléculas de agua en su esfera de coordinación.

Estos resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Datos de análisis elemental, fórmula mínima, P.M.(peso molecular en g/mol) y Δ que se refiere a la diferencia del análisis experimental con respecto al teórico.

Compuesto	P.M.	%Obs	%Calc	Δ	
CasII-Fen	[Cu(4,7-dm-fen)(α -Fen)]NO ₃ •2H ₂ O CuC ₂₃ H ₂₇ N ₄ O ₇	535.04	%C 51.37 %H 5.04 %N 10.47	%C 51.67 %H 5.09 %N 10.49	0.3 0.05 0.02
CasII-Pro	[Cu(4,7-dm-fen)(α -Pro)]NO ₃ •H ₂ O CuC ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₆	465.95	%C 48.83 %H 4.86 %N 12.06	%C 49.02 %H 4.77 %N 12.04	0.19 0.09 0.02
CasII-Tyr	[Cu(4,7-dml-fen)(α -Tir)]NO ₃ CuC ₂₃ H ₂₂ N ₄ O ₆	513.08	%C 53.74 %H 4.47 %N 10.76	%C 53.76 %H 4.31 %N 10.9	0.02 0.16 0.14
CasII-His	[Cu(4,7-dm-fen)(α -His)]NO ₃ •2H ₂ O CuC ₂₀ H ₂₄ N ₆ O ₉	523.1	%C 45.34 %H 4.54 %N 16.24	%C 45.84 %H 4.64 %N 16.04	0.5 0.09 0.2
CasII-Trip	[Cu(4,7-dm-fen)(α -Trip)]NO ₃ CuC ₂₅ H ₂₃ N ₅ O ₅	537.03	%C 55.91 %H 5.05 %N 13.16	%C 55.96 %H 4.32 %N 13.06	0.05 0.73 0.1

5.2.2 Espectroscopia de infrarrojo

5.2.2.1 IR cercano

Se identificaron las ν_{asim} de la fenantrolina y del aminoacidato en la región del IR cercano, (Tabla 6). En el caso del ligante fenantrolina las frecuencias características son la $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$, correspondientes a los anillos, que aparecen alrededor de 1579 y 850 cm^{-1} respectivamente, estos datos son comparables a los encontrados en la literatura para $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-Fen})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{fen})(\alpha\text{-Pro})]\text{NO}_3$ [64-66]; y en el caso del ligante aminoacidato las frecuencias características son $\nu(\text{-COO}^-)$ y $\nu(\text{-NH}_2)$ que aparecen para todos los complejos alrededor de 1600 y 3420 cm^{-1} respectivamente; estos resultados permiten establecer la presencia de los ligantes en el complejo.

Debido a que la síntesis se lleva a cabo a partir de una sal de nitrato, y que estos complejos presentan una carga positiva, se corrobora que el contra-ión sea un NO_3^- , ya que en todos los casos existe una banda muy cercana a 1384 cm^{-1} correspondiente al NO_3^- libre.

Tabla 6: bandas de asignación para la espectroscopia de infrarrojo en la región del cercano en cm^{-1}

Comp	Aminoacidatos			Fenantrolina				Contra ión
	$\nu(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{COO})$	$\nu(\text{CCN})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{N}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{C H})$	$\nu(\text{C}=\text{CH})$	$\nu(\text{NO}_3)$
CasII-Fen	3423.71	1622.18	1137.76	1579.95	858.57	1525.6	1427.27	1383.43
CasII-Pro	3427.94	1641.27	1176.04	1577.96	852.35	1525.72	1426.12	1383.32
CasII-Tyr	3303.59	1660.47	1173.03	1579.77	864.03	1525.85	1426.83	1384.05
CasII-His	3385.7	1629.82	1172.6	1578.46	856.6	1524.49	1425.86	1383.88
CasII-Trip	3423.77	1626.48	1173.32	1580.43	852.79	1526.85	1427.21	1383.90

Todos los espectros de infrarrojo se encuentran en el anexo 1

5.2.2.2 IR lejano

En el caso de las frecuencias observadas en la región del lejano las vibraciones más importantes son las de un anillo de cinco miembros formado por coordinación del ligante al metal, con ambos ligantes (N-Cu-O) que se presentan alrededor de 550cm^{-1} , así como bandas de las vibraciones de los ligantes unidos a su centro metálico como Cu-N de la fenantrolina que aparecen alrededor de 538cm^{-1} , Cu-N del aminoácido que aparece alrededor de 484cm^{-1} , Cu-OCO del aminoácido que se presentan alrededor de 364cm^{-1} y Cu-O del aminoácido que aparece alrededor de 280cm^{-1} , los valores encontrados en este trabajo para los complejos sintetizados son comparables con lo encontrado en la literatura con los complejos $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-Fen})]\text{NO}_3$ [65] y $[\text{Cu}(\text{fen})(\alpha\text{-Pro})]\text{NO}_3$ [66] los resultados para estas bandas se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: bandas de asignación para la espectroscopia de infrarrojo en la región del lejano en cm^{-1}

Comp.	ν (N-Cu-O)	ν (Cu-N) fenantrolina	ν (Cu-N) fenan.	ν (Cu-OCO) aminoácido	ν (Cu-O)
<i>CasII-Fen</i>	557.32	538.04	484.04	362.55	283.48
<i>CasII-Pro</i>	557.32	539.97	482.11	347.12	277.69
<i>CasII-Tyr</i>	557.32	536.11	482.11	364.48	269.98
<i>CasII-His</i>	557.32	538.04	482.11	364.48	285.41
<i>CasII-Trip</i>	561.18	538.04	464.76	364.48	285.41

Los espectros para la región del lejano de los cinco compuestos se presentan en el anexo 1.

5.2.3 Momento magnético

Los valores calculados de μ_{eff} (Tabla 8) para los cinco complejos sintetizados se encuentran dentro del intervalo de 1.7-2.2 MB que corresponde a 1 electrón desapareado, lo que indica la presencia de Cu en estado de oxidación 2^+ [67].

Tabla 8: Momento magnético efectivo (μ_{eff}) en magnetotes de Bohr

Compuesto	μ_{eff} MB
CasII-Fen	1.72
CasII-Pro	1.70
CasII-Tyr	1.71
CasII-His	1.72
CasII-Trip	1.72

5.2.4 Conductividad

Se realizó la determinación de la conductividad en solución metanólica y los resultados obtenidos (Tabla 9) se encuentran dentro del intervalo de 80-115 μS , lo que indica que los complejos son electrolitos 1:1 en este disolvente [68].

Tabla 9: Valores de conductividad molar en MeOH en micro siemens (μS)

Compuesto	Λ (μS)
CasII-Fen	89.3
CasII-Pro	90.2
CasII-Tyr	80.2
CasII-His	92.6
CasII-Trip	91.8

5.2.5 Espectroscopia UV-vis

5.2.5.1 UV

Para la espectroscopia UV se observan dos máximos de absorción en 210 y 274 nm, los cuales corresponden a las dos absorciones características conocidas como banda E (etilénica) y banda B (bencenoide). Estos máximos de absorción corresponden a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del ligante di-imina con su centro metálico; y el valor de absortividad molar ϵ confirma estas

transiciones ya que para compuestos bencénicos debe ser mayor a $10,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [69]; siendo específico para cada compuesto estos resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Coeficientes de extinción molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para cada compuesto a 210 y 274 nm.

Compuesto	λ 210	λ 274
CasII-Fen	45886.45	40503.50
CasII-Pro	38174.99	39453.24
CasII-Tyr	38258.45	37090.65
CasII-His	47923,17	40154,09
CasII-Trip	38258.43	37090.65

5.2.5.2 UV-vis

En el caso de la espectroscopia para el visible, se observa una sola banda de absorción alrededor de 600 nm que corresponde al traslape de las bandas de transición $d_{xz,yz} \rightarrow d_{xy}$ y $d_{x^2-y^2} \rightarrow d_{xy}$ ya que la primera transición ocurre entre 550 y 600 nm y la segunda ocurre entre 600 y 640 nm [70], los valores para los máximos se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores de los máximos de absorción en la región del visible del espectro.

Compuesto	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$
CasII-Fen	604
CasII-Pro	598
CasII-Tyr	602
CasII-His	662
CasII-Trip	606

Los espectros de la región del UV así como del visible se encuentran en el anexo 2.

5.3 Estudio electroquímico

5.3.1 Voltamperometría cíclica.

En todos los casos se observan dos señales de oxidación y dos de reducción y para determinar la correspondencia de estos picos se realizó un estudio de correspondencia a una velocidad de 50 mV/s; con cortes de potencial cada 0.05mV/s, el resultado de este experimento se muestra en la figura 7 en donde se observa la dependencia de estos picos ya que al acercarse el potencial a cero las intensidades de todos los picos disminuyen sin observar un cambio en los valores de potencial. Así mismo este resultado indica que el comportamiento de los complejos es muy similar a los estudiados con anterioridad con las fórmulas generales $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{R-1,10-fenatrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ [46, 53] y tomando en cuenta estos resultados se asigna al proceso principal los picos I y II que corresponden a la reducción/oxidación $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, y las señales III y IV se propone que se deban a una absorción del complejo en la superficie del electrodo [53].

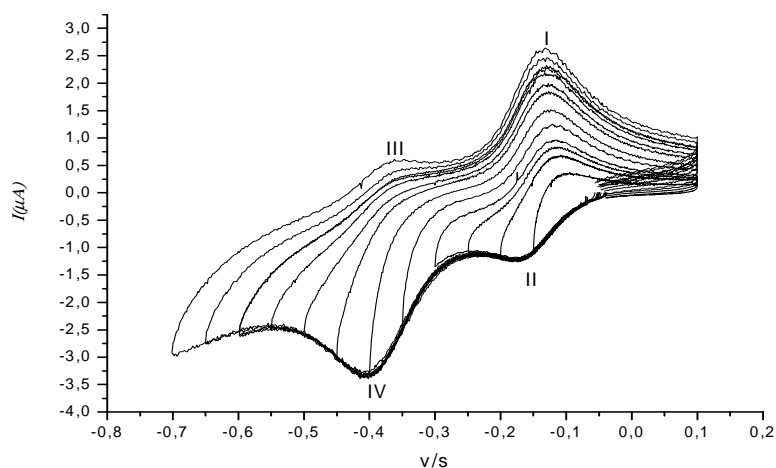


Figura 7: Estudio de correspondencia del complejo $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-Tir})]\text{NO}_3$ con un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M. A una concentración de compuesto de 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte.

Una vez asignado el proceso principal $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ se realizó el estudio a diferentes velocidades de barrido (50, 100, 200, 300, 400 y 500 V/s) para cada complejo en dirección anódica figura 8.

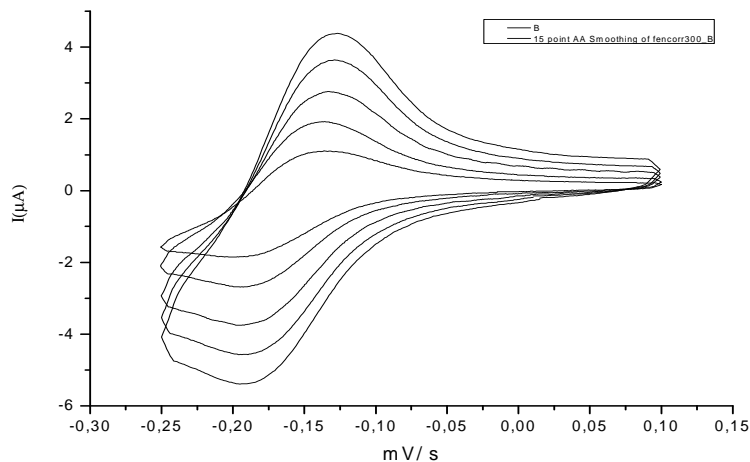


Figura 8: Estudio de voltamperometría cíclica del complejo $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-Fen})]\text{NO}_3$ a una velocidad 50, 100, 200, 300 y 400V/s con un electrodo de carbón vítreo a una concentración 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M.

De este estudio a diferentes velocidades de barrido se obtuvieron las siguientes relaciones:

- La relación entre las intensidades de pico anódico y catódico (I_{pa} e I_{pc}) vs. $V^{1/2}$ (raíz cuadrada de la velocidad de barrido) las cuales presentan una relación lineal, (figura 9) que indica que este proceso es quasirreversible.

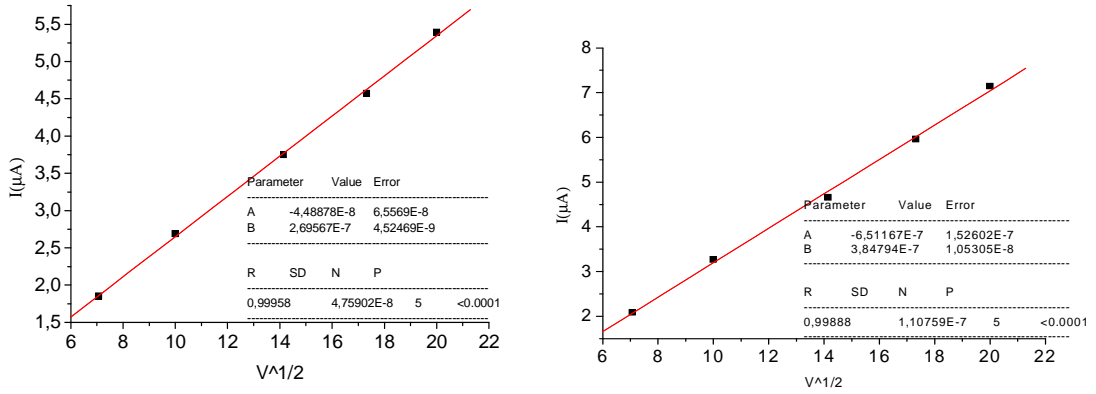


Figura 9: Gráficos de I_{pa} e I_{pc} vs. $V^{1/2}$. El estudio se realizó con un electrodo de carbón vítreo a una concentración 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M.

- El cociente de los picos anódico y catódico (I_{pa}/I_{pc}) vs. V es aproximadamente 1 lo que indica que durante el proceso hay una transferencia de 1 electrón. Figura 10.

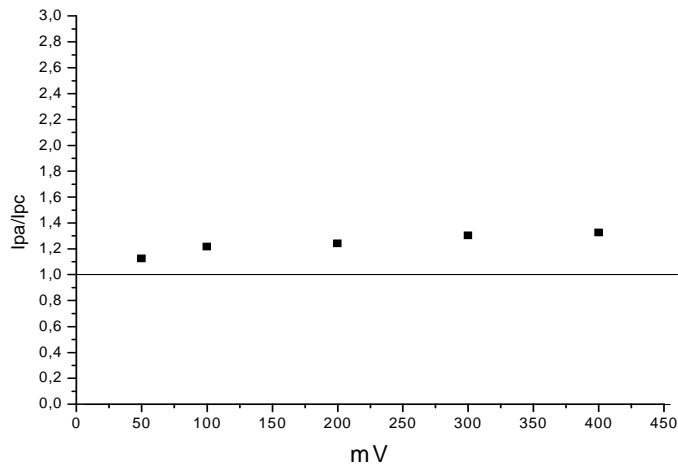


Figura 10: Gráfico de la relación de corrientes de pico anódico y catódico en función de la velocidad. El estudio se realizó con un electrodo de carbón vítreo a una concentración 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M.

-
-
- Y la relación I_{pa} e I_{pc} con respecto a la velocidad también tienen un comportamiento lineal; con lo cual se puede decir que los complejos aparentemente se comportan como procesos quasireversibles, que no presentan reacciones acopladas y que son procesos que se controlan por difusión. Figura 11.

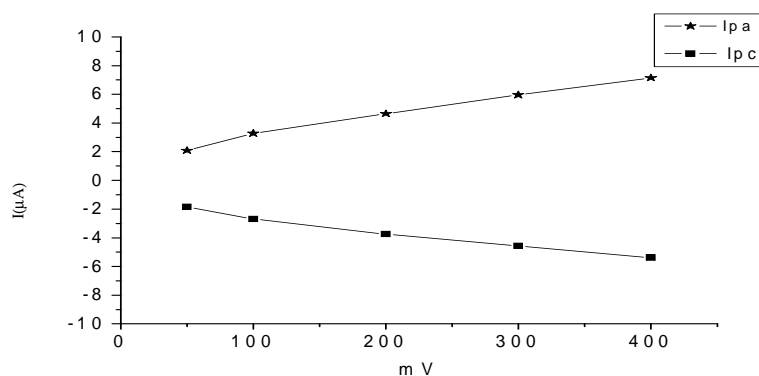


Figura 11: Gráfico de I_{pa} e I_{pc} vs. Velocidad de barrido. El estudio se realizó con un electrodo de carbón vítreo a una concentración 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte un electrodo de carbón vítreo un contra-electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl 0.1M.

El estudio electroquímico se logró realizar en todos los complejos a excepción del complejo 4 el cual presenta bajo estas condiciones, un proceso demasiado lento que no permite observar el pico del proceso Cu^{2+}/Cu^+ figura 12.

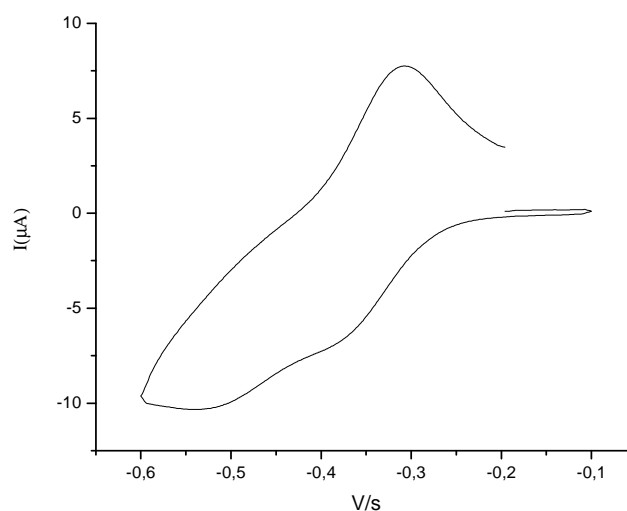


Figura 12: Voltamperograma del complejo $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-His})]\text{NO}_3$ a una velocidad de 100 V/s con un electrodo de carbón vítreo a una concentración 1mM en un solución 40:60 EtOH-agua y KNO_3 como electrolito soporte.

Con los resultados obtenidos en el estudio electroquímico se determinaron los potenciales de media onda $E_{1/2}$ Tabla 12.

Tabla 12: $E_{1/2}$ de los complejos en volts.

Compuesto	$E_{1/2}$
CasII-Fen	-0.3261
CasII-Pro	-0,3210
CasII-Tyr	-0,3218
CasII-His	-----
CasII-Trip	-0,3226

Al analizar los potenciales de los complejos sintetizados se observa que la diferencia más grande entre los valores es de apenas 0.0052 volts y se podría decir que prácticamente no existe diferencia entre estos valores; al no observar diferencia se propone que el ligante aminoacidato no influye sobre el potencial y el ligante diimina es el que más influye sobre el potencial.

En trabajos anteriores en donde se analizaron los complejos $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\alpha\text{-Gly})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-fen})(\text{acac})]\text{NO}_3$ [46, 53] se obtuvieron los

potenciales de media onda para realizar un estudio QSAR con el objeto de predecir la actividad biológica, en donde este parámetro fisicoquímico resulto ser de suma importancia para tal fin. Los resultados obtenidos indicaron que los valores de potencial de ambos complejos eran muy similares (-0.3104 y -0.318 volts respectivamente).

Si el potencial de media onda nos ayuda a predecir la actividad biológica se esperaría que las actividades fueran similares; o bien que la diferencia en tamaño y propiedades fisicoquímicas que los aminoácidos puedan conferirle al complejo influyan en la actividad biológica.

El resto de los voltamperogramas se encuentran en el anexo 3.

5.4 Ensayos biológicos

Mediante el ensayo de inhibición de la proliferación celular se calculó la CI_{50} de cada compuesto. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 13, 14 15 y 16 para cada línea celular.

Se utilizaron como controles positivos el cisplatino, la casiopeína II-Gly ([Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -glicinato)]NO₃) y la casiopeína III-Ea ([Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -acetilacetato)]NO₃), porque ambos contienen la misma fenantrolina del presente estudio y porque han sido de los más estudiados por el grupo de trabajo, por lo tanto los valores de CI_{50} son conocidos en estas líneas celulares[46, 53, 54] y en el caso del cisplatino porque es el único antineoplásico inorgánico que actualmente se utiliza en la quimioterapia.

Tabla 13: Ensayo de inhibición celular en HeLa

Compuesto	Intervalo	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)
Cisplatino	0.7251-3.9193	1.4721	4.907
CasII-Fen	0.9523-1.2762	1.0959	2.0482
CasII-Pro	0.7741-1.0542	0.9032	1.9384
CasII-Tyr	1.3746-1.7676	1.5554	3.0314
CasII-His	0.8337-1.0475	0.9333	1.7841
CasII-Trip	1.1213-1.3645	1.2372	2.3037
Cas II-gly	0.609-0.8562	0.7229	1.6285
Cas III-Ea	1.0979-1.4204	1.2507	2.7735

Tabla 14: Ensayo de la inhibición celular en SiHa

Compuesto	Intervalo	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)
Cisplatino	SN	SN	SN
CasII-Fen	2.4607-3.5432	2.8774	5.3779
CasII-Pro	0.8679-1.7876	1.2107	2.5983
CasII-Tyr	2.0289-3.7331	2.6123	5.0914
CasII-His	1.8715-2.9575	1.9232	3.6765
CasII-Trip	1.7491-2.5655	2.0845	3.8815
Cas II-Gly		2.5876	5.8292
Cas III-Ea	-----	-----	-----

Tabla 15: Ensayo de la inhibición celular en HCT-15

Compuesto	Intervalo	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)
Cisplatino	1.7521-6.1766	2.9738	9.9126
CasII-Fen	1.3388-1.6876	1.4676	2.7429
CasII-Pro	0.66-0.9955	0.8043	1.7261
CasII-Tyr	1.4485-2.1126	1.7417	3.3945
CasII-His	1.2338-1.5075	1.3625	2.6046
CasII-Trip	2.2514-3.0703	2.5904	4.8235
Cas II-Gly	1.2839-1.8207	1.5138	3.4102
Cas III-Ea	1.9208-2.5858	2.2023	4.8837

Tabla 16: ensayo de la inhibición celular en SKLU-1

Compuesto	Intervalo	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)
Cisplatino	1.4622-5.7406	2.8703	9.5660
CasII-Fen	1.8522-3.1804	2.4063	4.4974
CasII-Pro	0.6378-5.0687	1.7393	3.7328
CasII-Tyr	1.0571-1.9111	1.3875	2.7042
CasII-His	1.5251-1.8588	1.6768	3.2055
CasII-Trip	1.5896-2.1593	1.8342	5.4154
Cas II-Gly	1.055-1.3221	1.1813	2.6611
Cas III-Ea	1.537-2.0013	1.7426	3.8643

Los complejos presentaron actividad biológica en todas las líneas celulares.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si existe diferencia en el valor de la actividad biológica debido a la influencia del segundo ligante en cada complejo. El resultado de esta evaluación es que la actividad biológica mostrada se mantiene dentro de un rango de 2.0 y 5.5 μM y prácticamente no se observa una influencia del segundo ligante en la actividad, ya que los valores de CI_{50} son muy similares para cada línea. Al graficar $E_{1/2}$ vs CI_{50} (figura 13) se observa esta tendencia y sobre todo que aparentemente no existe una tendencia entre ambos valores ya que los datos obtenidos se agrupan en el rango antes mencionado.

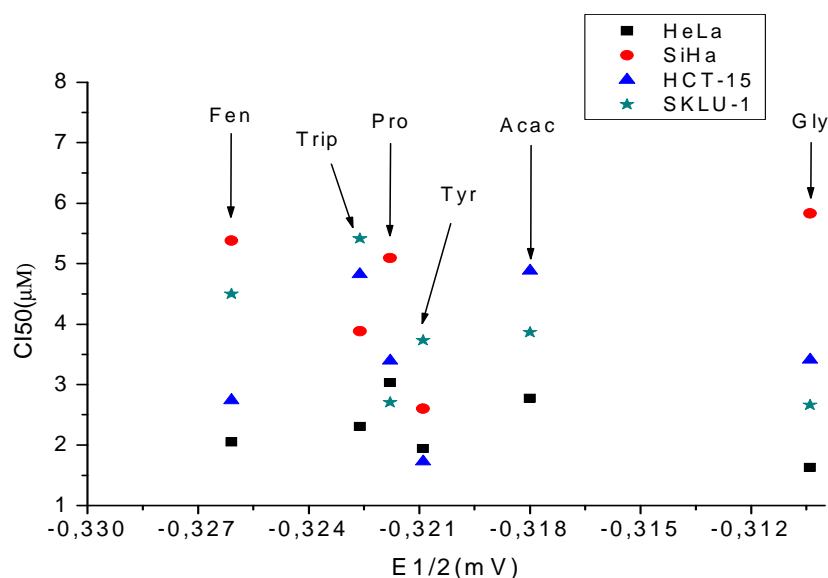


Figura 13: Gráfico de $E_{1/2}$ vs. CI_{50} en las líneas celulares tumorales utilizadas. $E_{1/2}$ en mV y CI_{50} en micromolar

Al comparar los datos obtenidos de CI_{50} de los complejos con datos de experimentos anteriores en donde se trabajó con diferentes fenantrolinas y como segundo ligante glicina, se observa que estos datos son cercanos a los valores de CI_{50} y $E_{1/2}$ para la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (figura 14) lo que

podría indicar que la actividad y el potencial están regidos principalmente por la fenantrolina y no por el segundo ligante.

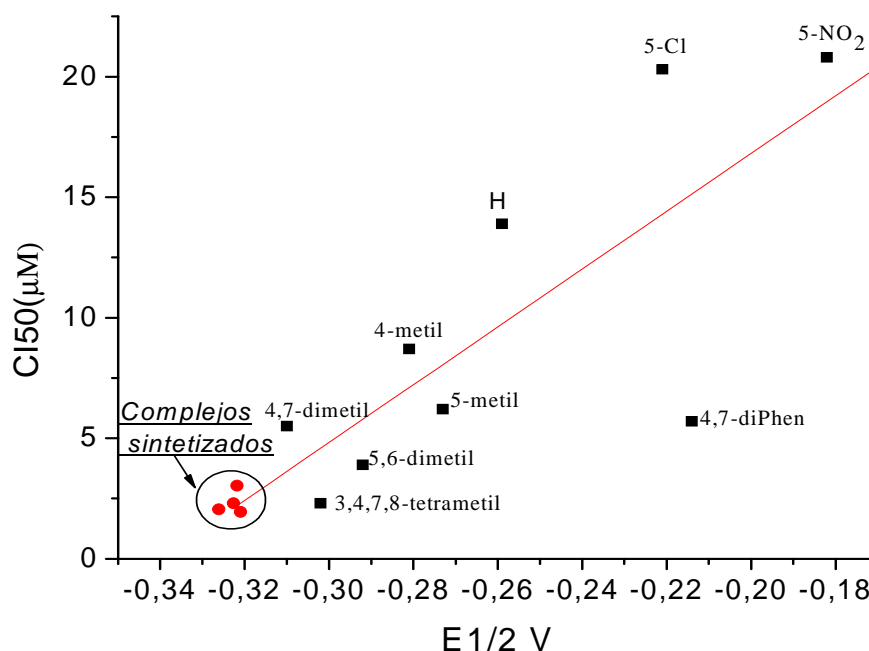


Figura 14: Gráfico de CI₅₀ vs E_{1/2} en la línea celular tumoral HeLa. Los complejos encerrados en un círculo son los complejos sintetizados; el resto de los complejos son los sintetizados y estudiados con anterioridad utilizando diferentes fenantrolinas, todos 1,10-fenantrolina y sustituidos según los números en las diferentes posiciones. En todos los casos el segundo ligante es glicina

Si la propuesta anterior es correcta es lo mismo si se utilizan éstos u otros aminoácidos, ya que al tratar de buscar una relación entre la actividad biológica con E_{1/2}, el tamaño de la molécula, los valores de pka de los aminoácidos y el log P de los aminoácidos utilizados no se encontró ningún tipo de relación entre ellos.

Con respecto a la selectividad tumoral no se puede determinar ya que los valores de CI₅₀ son muy similares y podemos decir que prácticamente no existe selectividad tumoral

6. CONCLUSIONES

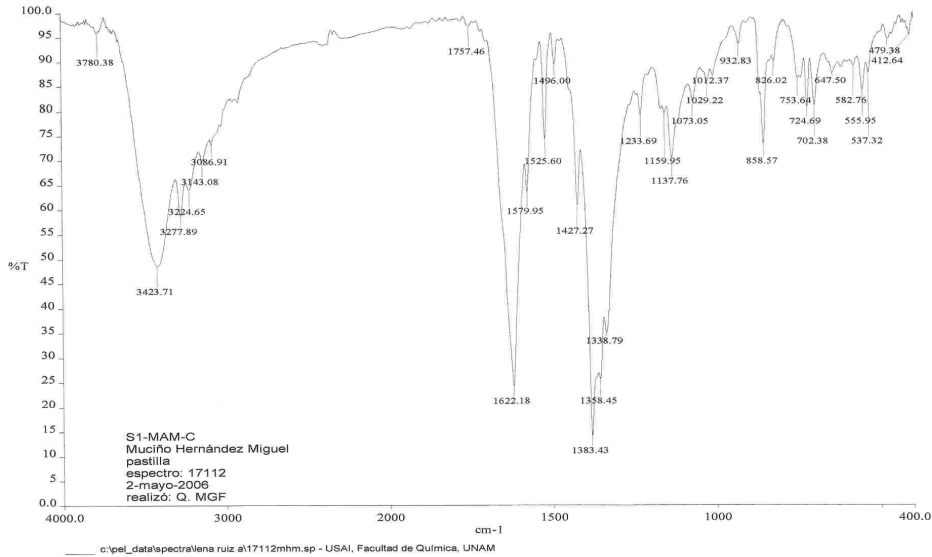
-
- Se sintetizaron y caracterizaron 5 compuestos del tipo [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -aminoacidato)]NO₃ (Casiopeinas®).
 - Los compuestos sintetizados son de Cu(II), electrolitos 1:1. Estos compuestos son ternarios, con evidencia de IR, IR lejano, UV y UV-vis de tener en su esfera de coordinación tanto al ligante 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina como al ligante α -aminoacidato y el ion nitrato como contra ion y su pureza fue confirmada por análisis elemental.
 - El valor de $E_{1/2}$ no tiene un cambio significativo al intercambiar el ligante aminoacidato y aparentemente el ligante diimina es el que tiene una mayor influencia en el valor de potencial.
 - Todos los compuestos son activos en las líneas celulares empleadas.
 - Actividad comparable al Cisplatino dependiendo de la línea celular.
 - No existe una amplia diferencia entre las CI_{50} de cada compuesto en las líneas celulares utilizadas.

7. ANEXOS

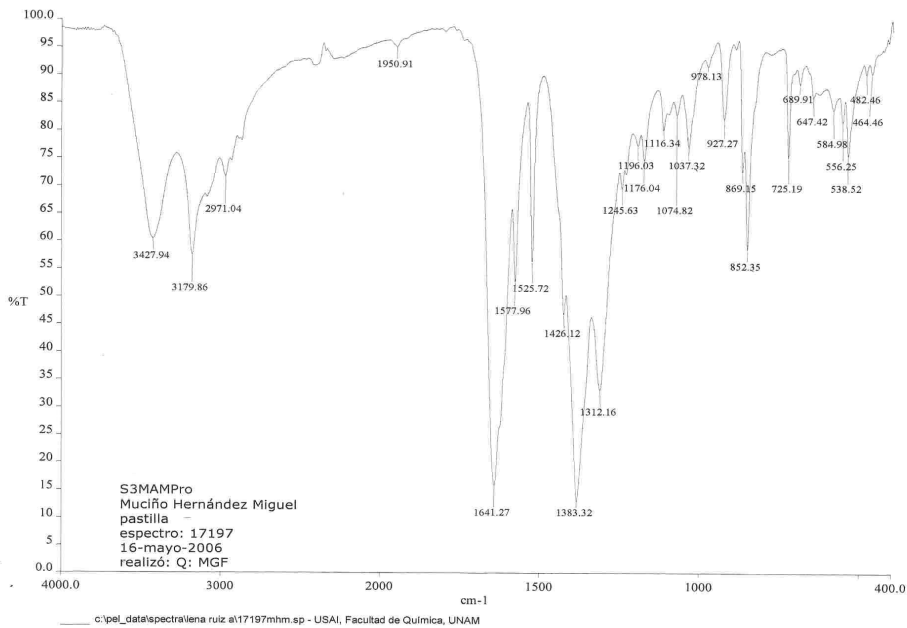
7.1 ANEXO 1

A. Espectros de infrarrojo para los compuestos sintetizados en la región del cercano

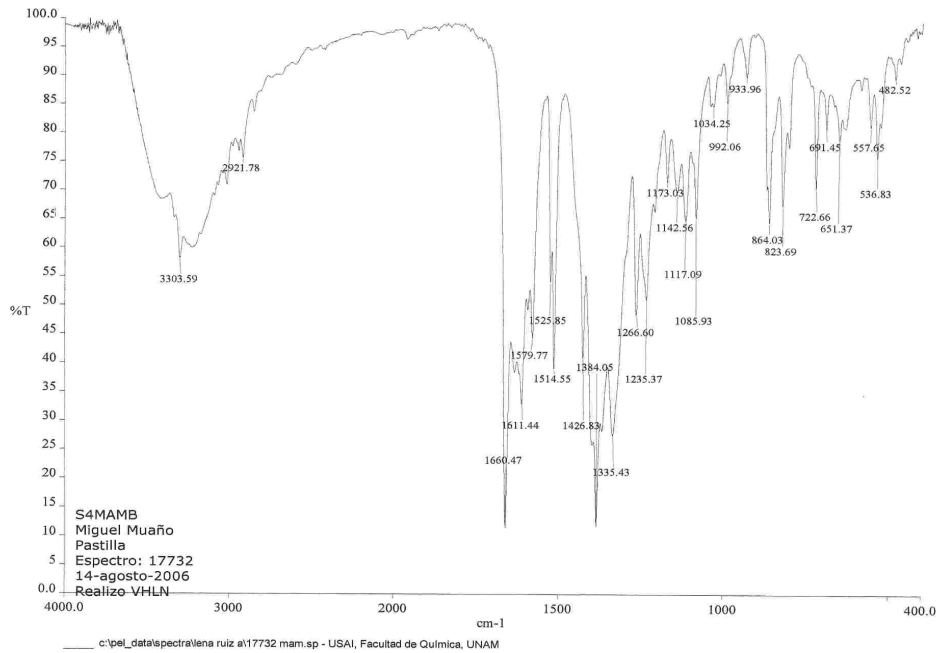
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO₃



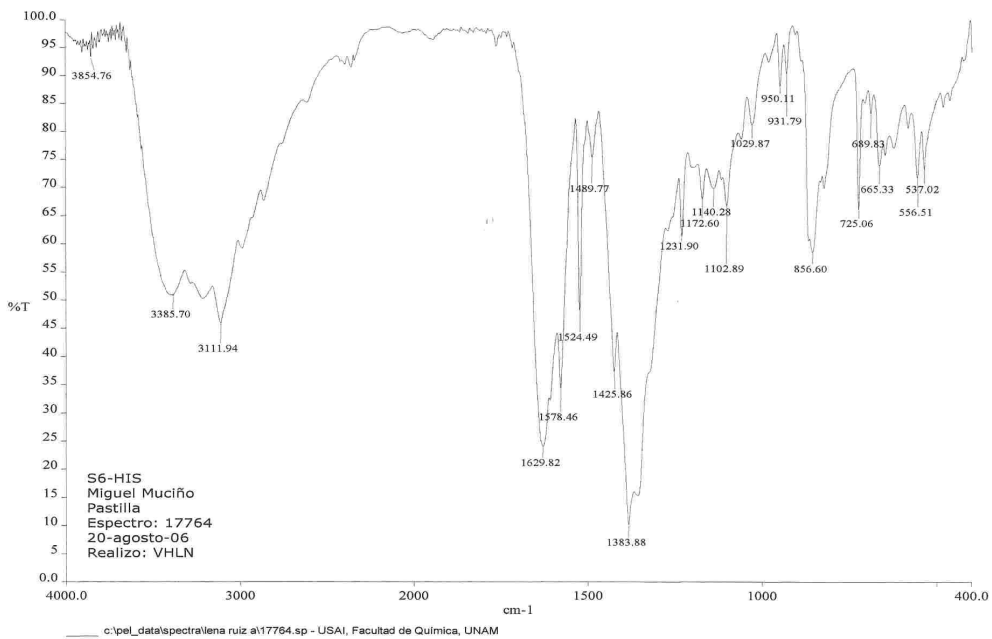
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -prolinato)]NO₃



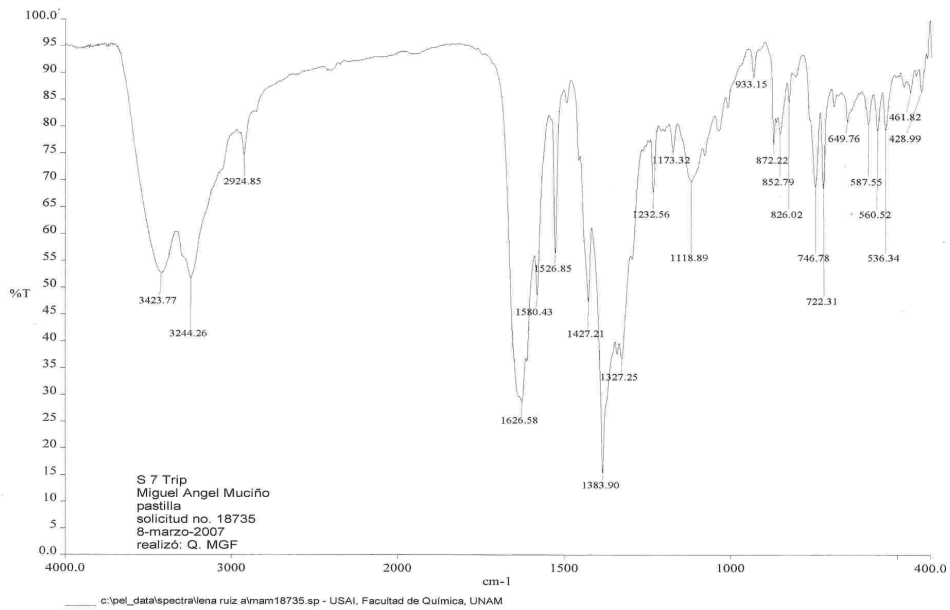
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirocinato)]NO₃



4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -histidinato)]NO₃

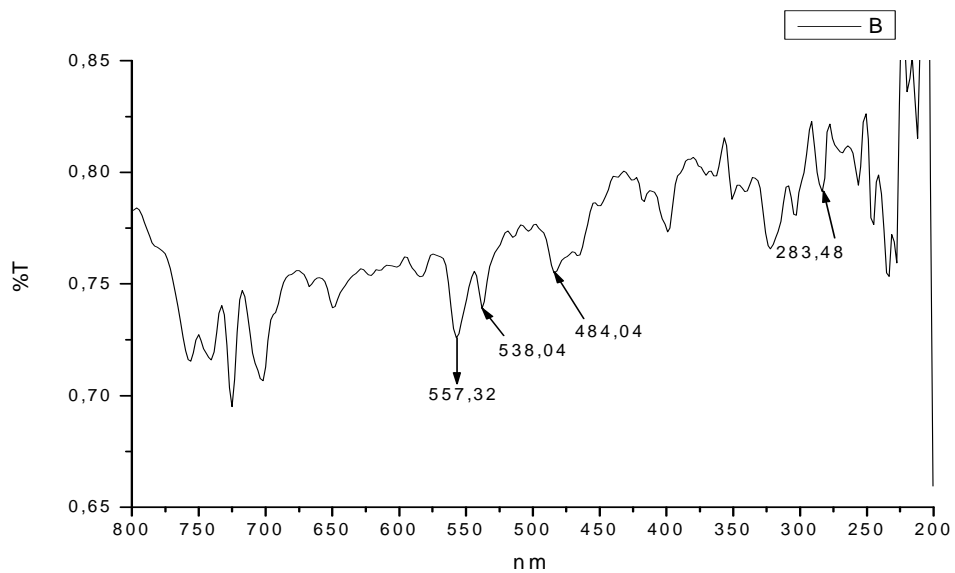


5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO₃

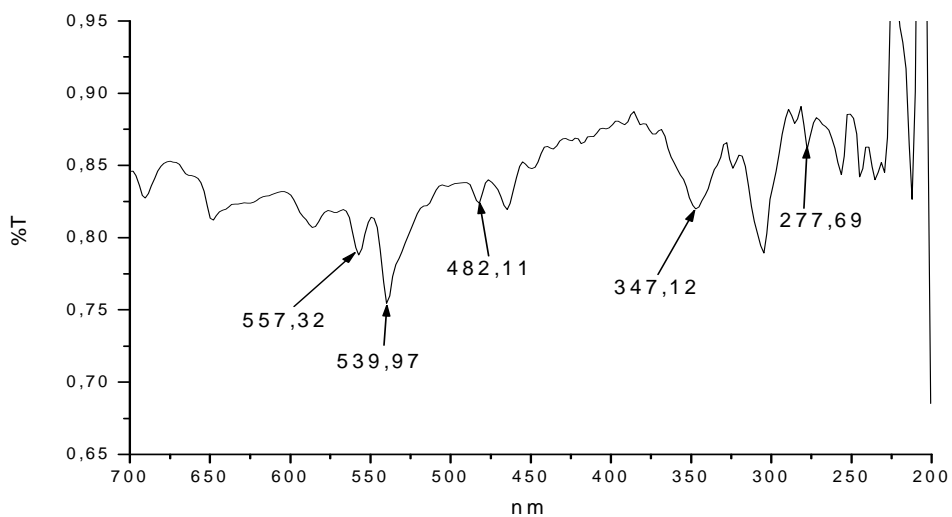


B. Espectros de infrarrojo para los compuestos sintetizados en la región del lejano

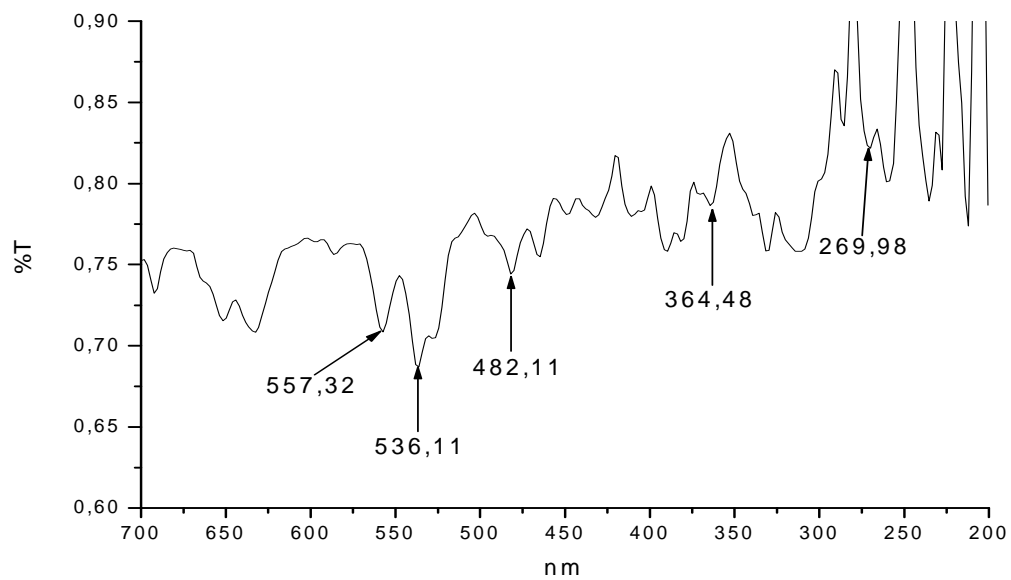
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO₃



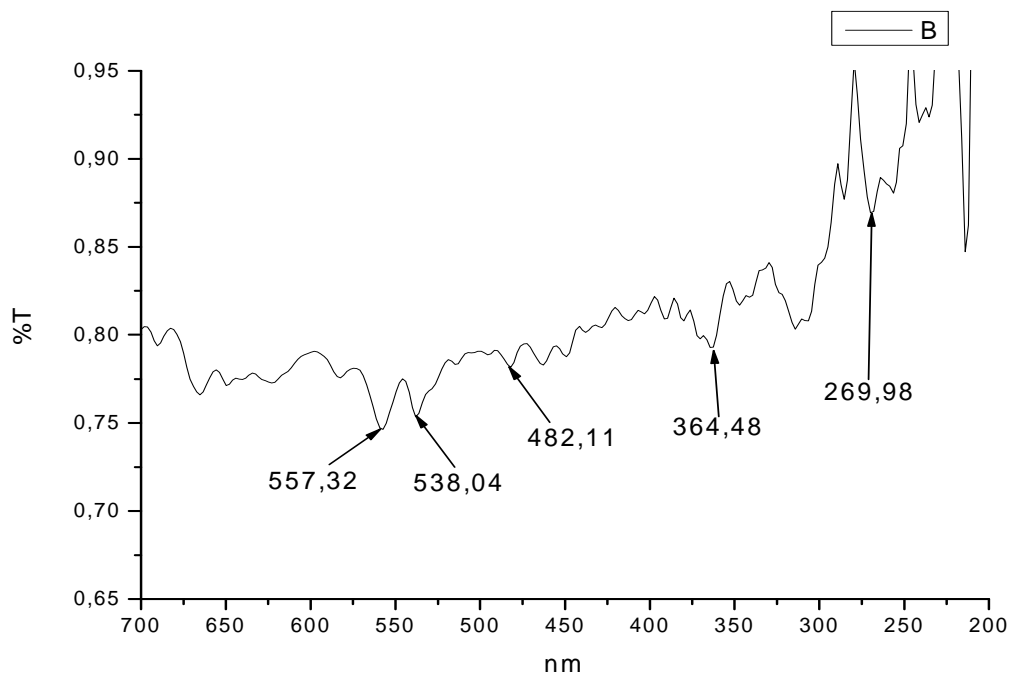
2. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-prolinato})]\text{NO}_3$



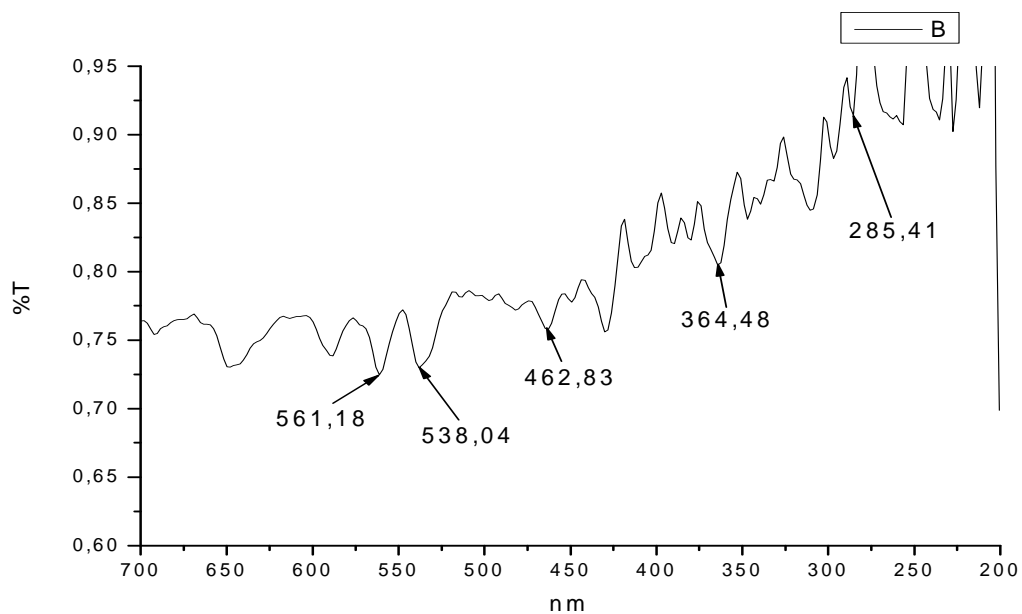
3. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-tirosinato})]\text{NO}_3$



4. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-histidinato})]\text{NO}_3$



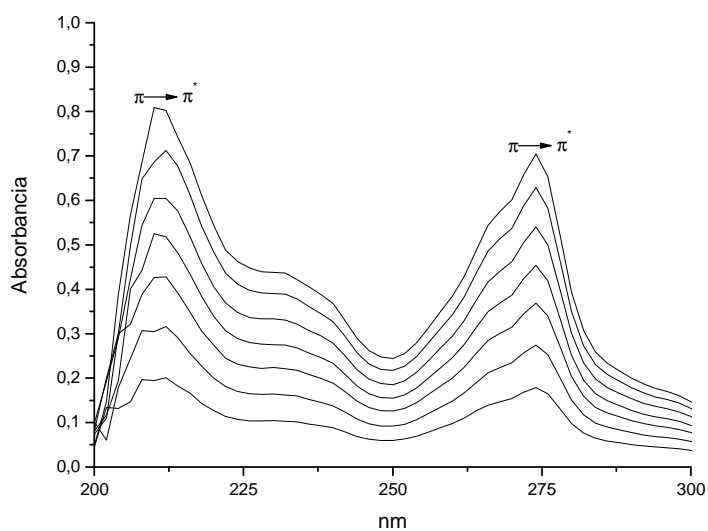
5. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-triptofanato})]\text{NO}_3$



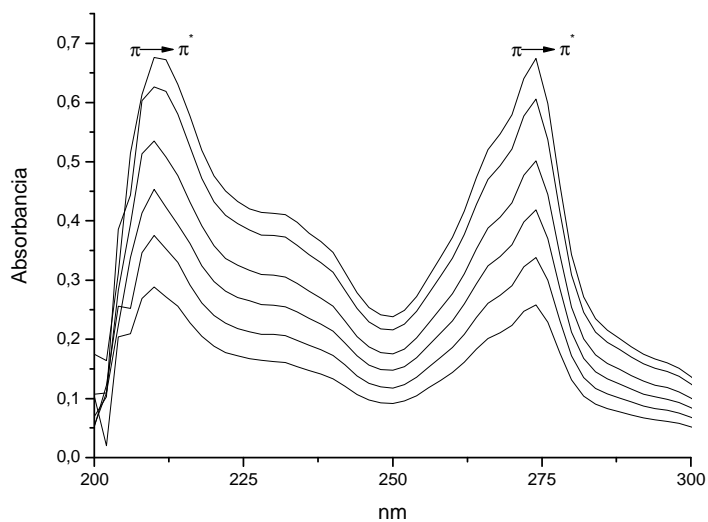
7.2 ANEXO 2

A. Espectros de los complejos sintetizados en la región del UV

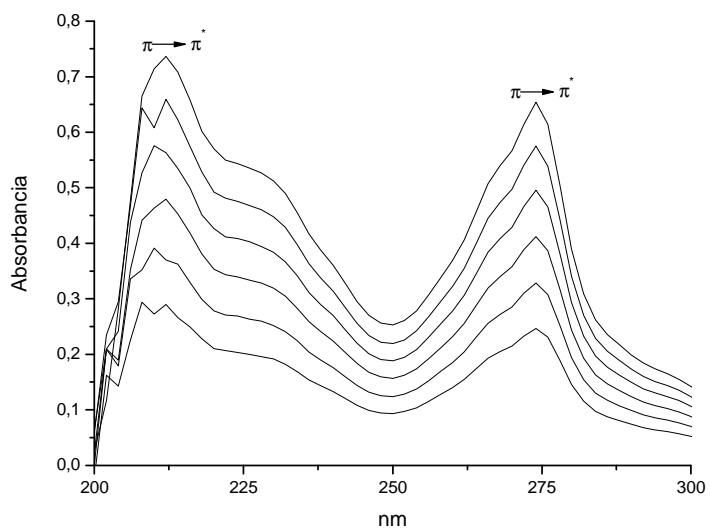
1. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-fenilalaninato})]\text{NO}_3$



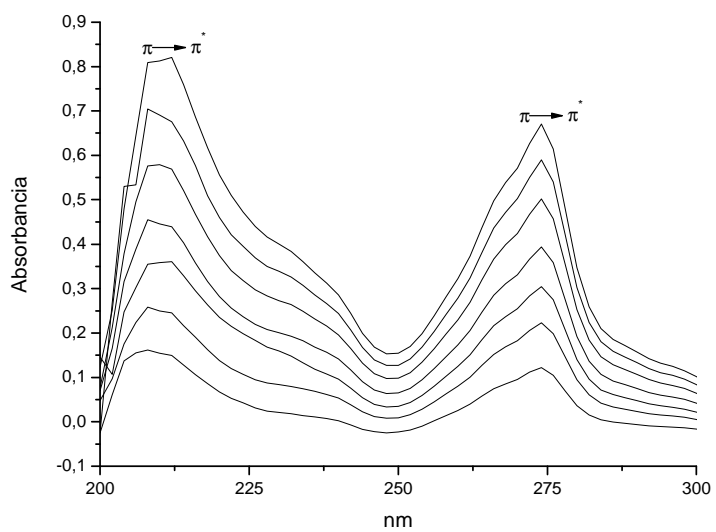
2. $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\alpha\text{-prolinato})]\text{NO}_3$



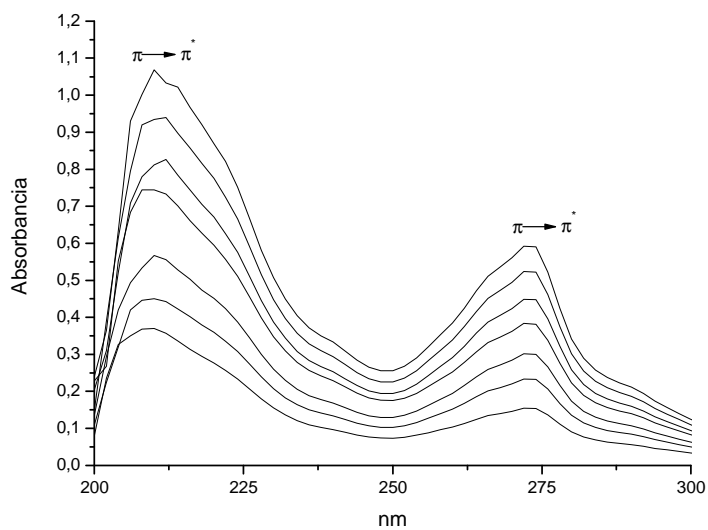
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirosinato)]NO₃



4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -histidinato)]NO₃

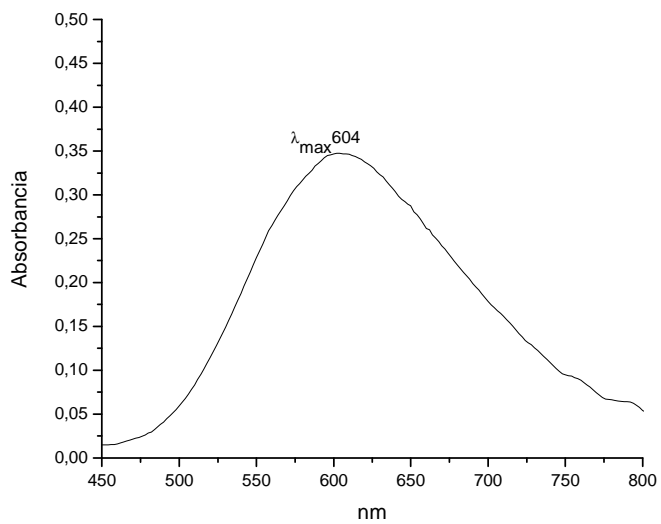


5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO₃

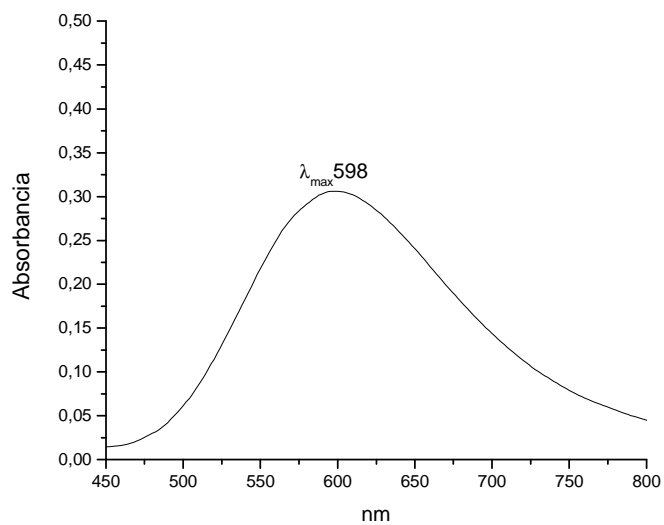


B. Espectros de los complejos sintetizados en la región del visible

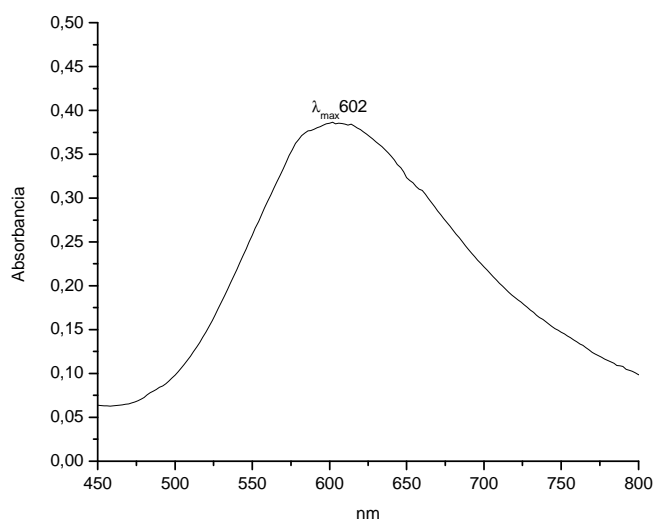
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO₃



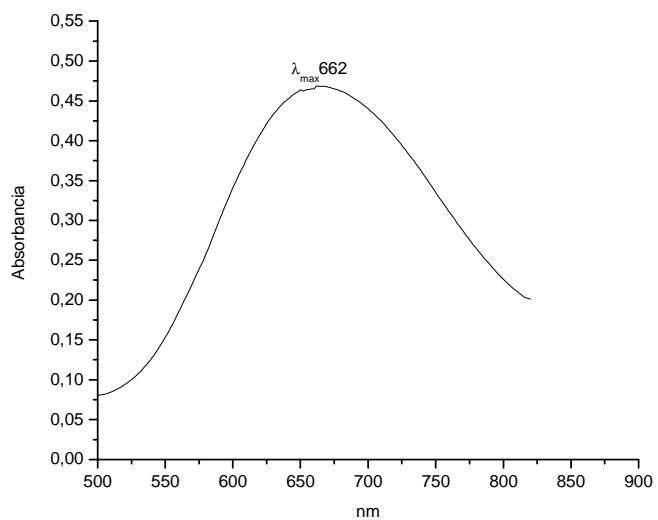
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -prolinato)]NO₃



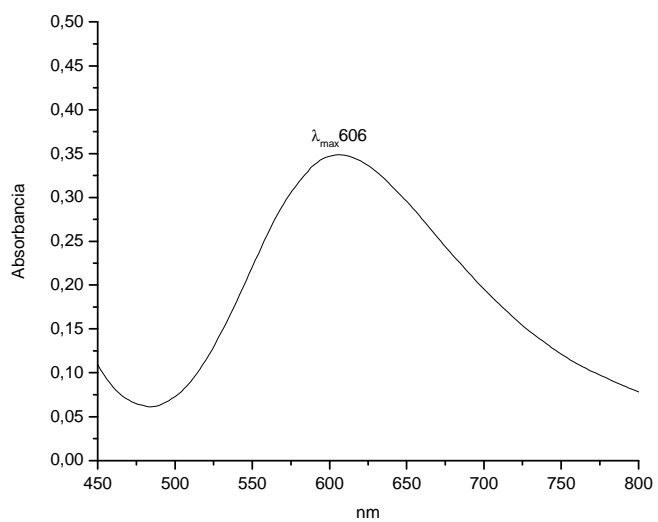
3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirosinato)]NO₃



4. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -histidinato)]NO₃



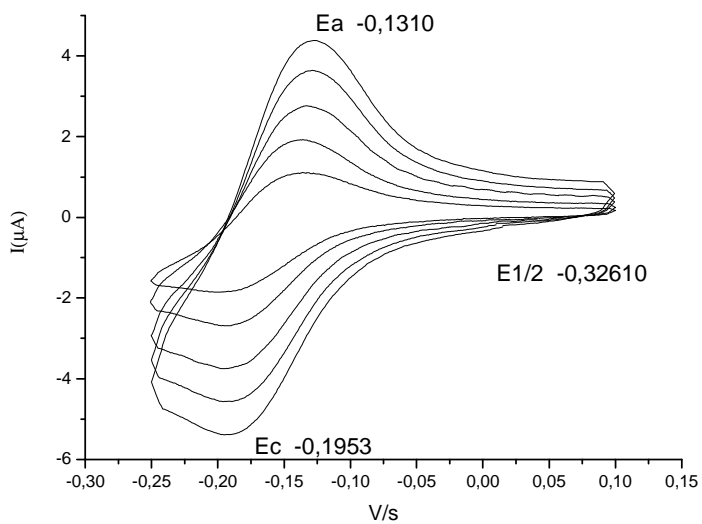
5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO₃



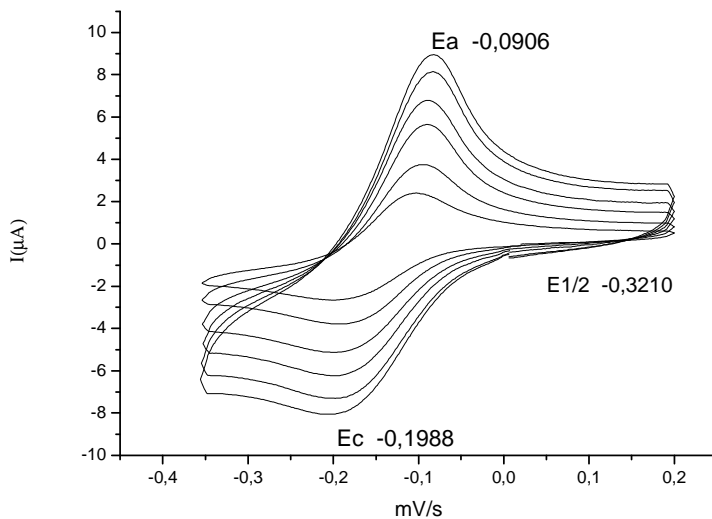
7.3 ANEXO 3

Voltamperogramas de los complejos sintetizados

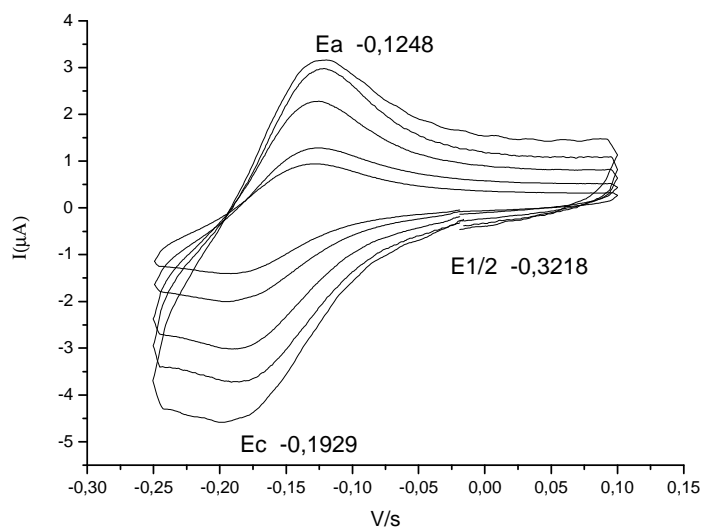
1. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -fenilalaninato)]NO₃



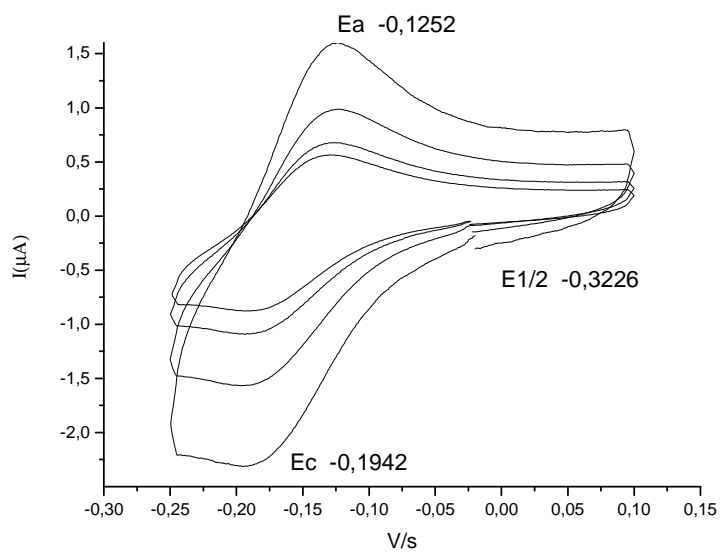
2. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -prolinato)]NO₃



3. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -tirosinato)]NO₃



5. [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(α -triptofanato)]NO₃



Bibliografía

1. Senra, A.Varela., *Capítulo 1: Introducción: Historia del Cáncer, El Cáncer*. 2002, Ediciones Hancourt: Madrid, España. p. 3-20.
2. O.M.S., *Cervical cancer screening in Developing Countries report of a WHO consultation*. 2002.
3. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática., *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e=>, 2007.
4. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A, *chapter 23: Cancer, Molecular Cell Biology*. 2004, W.H. Freeman and Company: U.S.A. p. 935-969.
5. King, J., *Cancer Biology*. 2000, Pearson Prentice-Hall: Singapore.
6. Calabresi Paul, B.A.C., *section X. Chemotherapy of Neoplastic Diseases, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* J.G. Hardman, Editor. 1996, The Mc Graw Hill Companies: U.S.A. p. 1225-1280.
7. Katzung, B.G., *chapter 55: Chemotherapy of cancer, Basic & Clinical Pharmacology* 2001, Mc Graw Hill: U.S.A. p. 1011-1047.
8. Fricker, S.C., *Metal compounds in cancer therapy, Chapters 1 Y 2*. 1996, Chapman & Hall U.S.A.
9. Ruíz, Azuara L., *US Patent Ap. 21 (1992) Number 5, 107, 005. US Patent Re 35, 458, February 18 (1997). US Patent November 19(1996) Number 5, 576, 326. 407543 SECOFI; 1993*.
10. Alemón-Medina, Radamés; Breña-Valle, Matilde; Muñoz-Sánchez, José Luis; Gracia-Mora, Isabel and Ruiz-Azuara, Lena., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®)*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2007. **60**(2): p. 219-28.

-
11. Gracia, I.; Ruiz-Ramírez, L.; Gómez, C.; Tinoco, M.; Márquez, A.; Romero, L., Marín, A.; Macías, L.; Bravo, M.E, *Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel*. Metal- Based Drugs, 2001. **8**(1): p. 19-28.
 12. Ruiz Ramírez.L., García I, de la Rosa M.E., Sumano H.,Gómez C.,Arenas F., Gómez E., Pimentel E., Cruces M.P., *Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeínas I, II and III*. Journal of Inorganic Biochemistry; n Interdisciplinary Journal., 1993. **51**(1-2): p. 250.
 13. Sánchez-Bátrez, F., Tesis de Maestría en Ciencias Químicas *Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeína I, II y III en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo, Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas*. 2006, Universidad Nacional Autónoma de México: Distrito Federal.
 14. Trejo-Solís, C.P., Guadalupe; Zúñiga, Sergio; Rodríguez-Ropon, Andrea; Osorio-Rico, Laura, Torres-Luvia, Sánchez; Gracia-Mora Isabel; Márquez-Rosado Lucrecia; Sánchez, Aurora; Moreno-García, Miguel E.; Cruz, Arturo; Bravo-Gómez María Elena; Ruiz-Ramírez, Lena; Rodríguez-Enriquez, Sara and Sotelo, Julio., *Cas Igly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 563-574.
 15. Carvallo- Chaigneau Francisco; Trejo-Solís Cristina; Gómez-Ruiz Celedonio; Rodríguez-Aguilera Ernesto; Macías-Rosales Lucia; Cortés-Barberena Edith; Cedillo-Peláez Carlos; Gracia-Mora Isabel; Ruiz-Azuara L.; Madrid-Marina; Constantino-Casas Fernando. *Casiopeína III-ia induce apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*.

-
- Biometals: an international journal on the role of metals ions in biology
2008. **21**(1): p. 17-28.
16. Shekan P, S.R., Scudeiro D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren J.T., Bokesch H, Kenney S, Boyd M.R., *New colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening*. Journal of the National Cancer Institute, 1990. **82**(13): p. 1107-1112.
 17. Márquez, A.Q., Marín H.A., *Curso de cultivos celulares*. 15 a 18 de Agosto del 2000, UNEXA: Facultad de Química, UNAM,.
 18. ATCC, *Catalogue of cell lines & hybridomas*. 7 ed. 1992: American Type Culture Collection.
 19. Rubin Philip, J.W., *Capítulo 2: Biología del Cáncer, Oncología Clínica*. 2002, Elsevier Science Imprint: Madrid, España. p. 32-44
 20. Lodish H., B.A., Matsudaira P., Kaiser C.A, *Molecular cell Biology*. 2004, W.H. Freeman and Company: U.S.A. p.11-13.
 21. Bruce, A., *Biología molecular de la célula*. 2004, Omega: España.
 22. Rubin Philip, J.W., *Oncología clínica, Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes, Capítulo 3*, 2002, Elsevier Science: España.
 23. Smith, *Introduction to the principles of drug design and action, Capítulo 14*. 2006, Taylor & Francis: U.S.A.
 24. Senra, A.Varela., *El cáncer, Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención, capítulo 4*, 2002, Elsevier Science: España.
 25. Torroella, K.M., Villa T.S., *Bases genéticas del cáncer*. 1998, Instituto Nacional de Cancerología, Fondo de Cultura Económica: México.
 26. Gram, L., Patrick, , *An Introduction to Medicinal Chemistry, Chapter 18*, Oxford, Editor. 2005: Great Britain.
 27. Moosa, A.R., *Comprehensive textbook in oncology, Chapter 72*. 1991, Williams and Wilkins: E.U.A.
 28. Amiel J.L., R.J., Machover D, *Manual de Oncología*. 1978, Toray-Masson: España.
 29. Mendelsohn J., P.M.H., M.A. Israle, L.A. Liotta, *section 4, Chapter 18: Chemotherapy, suceptibility and resistance, The Molecular Basis of*

-
- Cancer*. 1995, W.B. Saunders Company: Philadelphia, U.S.A. p. 387-397.
30. Macdonald F., F.C., Casson A.G., *Molecular Biology of Cancer*. 2004, Garland Science/BIOS Scientific Publisher: New York, U.S.A. p. 12-30.
 31. Cory, J.G.A.S., *Chapter 1, Section 2: The Biological Bases for the Design of Anticancer Agents, Cancer Biology and Therapeutics*. 1987, Plenum Press: Florida, U.S.A. p. 20-34.
 32. Yung, C.Y., *A synopsis on Metals in Medicine and Psychiatry*. Pharmacology Biochemistry & Behaviour, 1984. **21**(suppl 1).
 33. Canetta, D.L.a.R., *Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: an Historical Perspective and an Update*. European Journal of Cancer, 1998. **34**(10): p. 1522-1534.
 34. Matthew D. Hall, T.W.H., *Platinum(IV) Antitumour Compounds: their Bioinorganic Chemistry*,. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**: p. 49-67.
 35. Bertini, I.G., H.B. & Lippard, J.S., *Bioinorganic Chemistry*. 1994, E.U.A.: University Science Books.
 36. Huang R, W.A., Covell D.G. , *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*. Biochemical Pharmacology, 2005. **69**: p. 1009-1039.
 37. McKeage, M.J.M., L, *Mechanisms of Cytotoxicity and Antitumor activity of Gold(I) Phosphine Complexes: The possible role of mitochondria*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **233**: p. 127-135.
 38. Clarke, J.M., *Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals*. Chemical Reviews 1999. **99**: p. 2511-2533.
 39. Cohen S.M., L.S.J., *Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 2001(67): p. 93-130.
 40. Harrowfield, J.M., *Biological coordination chemistry, a confluence of chemistry and biochemistry*. C. R. Chimie, 2005. **8**: p. 199-210

-
41. Frausto Da Silva, W., *The Biological Chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*. 1991, U.S.A.: Clarendon Press Oxford.
 42. Casas, S., *Química Bioinorgánica*. 2002, Síntesis: España. Capítulo 1.
 43. McClevert, J.A.M., T.J., *Comprehensive Coordination Chemistry II. From Biology to Nanotechnology*. 2004, Elsevier Pergamon Applications of Coordination Chemistry: United Kingdom.
 44. Schwiertert, C.W.M., J.P., *Compounds in Medicinal Chemistry*. *Coordination Chemistry Reviews* 1999(184): p. 67-89.
 45. Wilkinson, G., Gillard, R.D. & McCleverty, *Copper Comprehensive Coordination Chemistry; the Synthesis, Reactions, Properties & Applications of Coordination Compounds*. Late Transition Elements. Vol. 5. 1987, USA: Pergamon Press.
 46. María Elena Bravo-Gómez; Juan Carlos García-Ramos; Isabel Gracia-Mora; Lena Ruiz- Azuara, Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinate)]NO₃ complexes, (Casiopeínas ®). Journal of Inorganic Biochemistry, on line 17 de octubre 2008. 103 (2009) 299 a 309.
 47. Araceli Tovar-Tovar, Juan Carlos García Ramos, Lena Ruiz-Azuara, Antonio Campero, Rafael Moreno-Esparza. A new kind of intermolecular stacking interaction between Copper (II) mixed chelate complexes (Casiopeína III-ia) and adenine. Solution and solid state structural study. J RCS, DALton (2009) enviado
 48. X. Solans, L.R.-R., A. Martínez, L. Gasque and R. Moreno-Esparza, *Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate*. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 1993. **49**(5): p. 890-893.
 49. Gasque, L.M., G; Moreno-Esparza,R & Ruiz-Ramírez, L., *Cu-O stretching frequency correlation with phenanthroline pKa values in*

-
- mixed copper complexes*. Inorganica Chimica Acta, 1999. **288**: p. 106-111.
50. Gasque L, R.-R.L., Moreno-Esparza R. , *Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10phenanthroline*. Journal of Inorganic Biochemistry; an Interdisciplinary Journal., 1992. **2**(48): p. 121.
51. Martínez, A.S., R. & Sansores, L.E., *A Density Functional Study of the Reactivity and Stability of Mixed Copper Complexes. Is Hardness The Reason?*, Inorganic Chemistry, 2001. **40**: p. 301-306.
52. Alemón-Medina, R.B.-V., Matilde; Muñoz-Sánchez, José Luis; Gracia-Mora, Isabel and Ruiz-Azuara, Lena., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas®)*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2007**60**(2)p. 219-228.
53. Ramos-García, J.C., *Tesis de licenciatura Estudio QSR de compuestos de Coordinación de cobre de tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃*, in *Química Inorgánica y Nuclear*. 2007, Universidad Nacional Autónoma de México: Ciudad de México.
54. Flood-Garibay, J.A., *Tesis de licenciatura Síntesis y evaluación biológica in vitro de compuestos de coordinación [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO₃ (Casiopéina) en diferentes líneas tumorales*, in *Escuela de Ingeniería y Ciencias, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas*. Tesis 2006, Universidad de las Américas, Puebla: Puebla.
55. De Vizcaya-Ruiz, A.R.-M., A; Ruiz-Ramírez, L; Kass, G.E.N.; Kelland, L.R.; Orr, R.M.; Dobrota, M., *Induction of Apoptosis by a Novel-Based Anticancer Compound, Casiopéina II, en L1210 murine Leukemia and CH1 human ovarian carcinoma cells*. Toxicology en Vitro, 2000. **14**(1): p. 1-5.
56. Marín-Hernández, A.G.-M., Isabel; Ruiz-Ramírez, Lena; Moreno-Sánchez, Rafael., *Toxic effects of copper-based drugs (Casiopéinas) on mitochondrial functions*. Biochemical Pharmacology, 2003. **65**(12): p. 1979-1989.

-
57. Hernández-Esquivel, L.A., Marín-Hernández ; Pavón, Natalia; Carvajal, Karla; Moreno-Sánchez, Rafael, *Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006. **212**(1): p. 79-88.
58. Leal-García, M.H., Sumano ; Luna-Delvillar, Jorge ;Gracia-Mora, Isabel ; Ruíz-Azuara, Lena ; García-Ortuño, Luis *Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs*. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 2007. **101**(3): p. 151-8.
59. De-Vizcaya-Ruíz, A.R.-M., A; Ruiz-Ramírez, L; Howarth, J.A. ;M. Dobrota *Hematotoxicity in rats by the novel cooper-based anticancer agent: Casiopeína Ilgly*. Toxicology 2003. **194**(1-2): p. 103-113.
60. Alemón-Medina Radamés, M.-S.J.L., Ruiz-Azuara Lena, and G.-M. Isabel, *Casiopeina Ilgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. Toxicology in Vitro, 2008. **22**: p. 710-715.
61. Fuentes-Noriega, I.L., Ruiz-Ramírez; Tovar-Tovar, Aracelí; Rico-Morales, Hector; Gracia-Mora, Isabel., *Development and a validation of liquid chromatographic method for Casiopenia Illia en rat Plasma*. Journal of chromatography, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2002. **772**(1): p. 115-121.
62. Gritzner, G., Küta J., *Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents*. Pure Appl. Chem., 1984. **56**(4): p. 461-466.
63. AnalystSoft-Robust-Business-solutions, *StatPlus 2005*. 2005.
64. Keik, W.L.A., K.P. & Chen, G *Complexes of (2,2bipyridyl)Copper(II) and (1,10-phenanthroline)Copper(II) with some amino acids*. Journal of Inorganic Nuclear Chemistry, 1989. **42**: p. 303-313.
65. Chan-Cheng Sua;, T.-Y.T., Shu-Pao Wua, Sue-Lein Wangb, Fen-Lin Liaob, *Spectroscopic and electronic properties of mixed*

-
- ligandaminoacidatocopper(II) complexes. Molecular structure of [Cu(4,7-dimethyl-1,10 phenanthroline)(Lphenylalaninato)](ClO₄)*. Polyhedron, 1999. **18**: p. 2361–2368.
66. Ramakrishna, R., *DNA binding and oxidative cleavage activity of ternary(L-proline)copper(II) complexes of heterocyclic bases*. Polyhedron, 2007.
67. Cotton-Wilkinson, *Quimica inorganica Avanzada*. 2001, México: Limusa Noriega Editores
68. Girolami, G.S., Rauchfuss, T.B. & Angelici, R.J., *Síntesis and technique in inorganic chemistry: a laboratory manual*. 1998, University Science Book. Sausalito: California. apendice 2.
69. Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*. 3 ed. 1986, USA, Cambridge University Press.
70. Murphy G., T.P., Murphy B. & Hathaway B., *Cristal structures, electronic properties and structural pathways of four complexes*. Chem Soc. Dalton trans., 1997. **15**: p. 2645-2652.