



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS**

**Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre (II)  
[Cu(N-N) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ



TUTOR: DRA. LENA RUIZ AZUARA

AÑO: 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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 210 del Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los resultados aquí presentados se divulgaron parcialmente o en su totalidad en los siguientes congresos:

**Tercer encuentro de Química Inorgánica.** Guanajuato, Gto. México. 15-17 de agosto 2007.

**13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry.** Vienna, Austria. 15-20 de Junio 2007.

**9th FIGIPAS Meeting in Inorganic Chemistry.** Vienna, Austria. 4-7 de Junio 2007.

**9th International on Applied Bioinorganic Chemistry.** Napoles, Italia. 2-5 de diciembre 2006.

**II Congreso Nacional de Química Médica dedicado a investigación en Cáncer y Diabetes.** Querétaro, Qro. México. 4-8 de Septiembre 2006.

**1er Congreso Nacional de Química Médica.** Oaxaca, Oax. 2004

**7th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC 7).** Guanajuato, México. April 1-5, 2003

**3rd International Meeting on Copper Homeostatis and Its Disorders.** Ischia, Italy, 4-8 October 2002.

**10th International Conference on Bioinorganic Chemistry. (ICBIC 10).** Florence, Italy, August 26-31, 2001.

Así mismo, fueron publicados en el artículo:

*Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinate)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas<sup>®</sup>)." María Elena Bravo-Gómez, Juan Carlos García-Ramos, Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Azuara. **Journal of Inorganic Biochemistry.** Vol 103 (2), **2009**, 299-309.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fué financiado por el fideicomiso 634-UNAM, y los proyectos de investigación CONACyT 60085, CONACyT Sectorial Salud C01-2002-7677 y PAPIIT IN2109907. Así mismo, extiendo mi agradecimiento por las becas para la realización de mis estudios doctorales que recibí por parte del Sistema Nacional de Investigadores (SNI), la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), UNAM y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Se agradecen las facilidades proporcionadas por la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) y su personal para la realización de los estudios biológicos, particularmente a M. en C. Isabel Gracia Mora, MVZ Mabel Tinoco Méndez y MVZ Lucía Macías. Así mismo, se agradece a La Friederich-Alexander Nürnberg Universität y al Dr. Ulrich Nickel por la estancia académica y el adiestramiento en los estudios electroquímicos. Finalmente, se agradece al Dr. Luis Ortiz Frade por las aportaciones al análisis y discusión de los resultados de los estudios electroquímicos.

*A Juan Carlos Ávila Klein  
Porque mi reflejo en tus ojos me impulsa hacia adelante.*

# INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>INDICE</b>	<b>4</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>10</b>
<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>14</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
1. QUÍMICA BIOINORGÁNICA MÉDICA	19
2. COMPUESTOS MÉTALICOS CON PROPIEDADES ANTITUMORALES	23
3. EL COBRE Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA.	29
3.1 HOMEOSTASIS DEL CU EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.	31
4. CÁNCER Y CASIOPEÍNAS®	34
5. ESTUDIOS QSAR.	42
5.1 FREE WILSON ANÁLISIS	45
5.2 ANALISIS DE HANSCH	46
5.3 MÉTODOS QSAR 3D	47
5.4 TÉCNICAS DE CORRELACIÓN PARA EL DESARROLLO DE ESTUDIOS QSAR.	48
5.5 CONTRIBUCIONES DEL QSAR AL DISEÑO DE FÁRMACOS.	50
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>52</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
OBJETIVO GENERAL	52
OBJETIVOS PARTICULARES	52
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>53</b>
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	53
2. REACTIVOS Y DISOLVENTES	55
3. SÍNTESIS	55
4. CARACTERIZACIÓN	56
5. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS.	57

6. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN (LOG D)	58
7. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50	59
8. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	60
9. ANÁLISIS QSAR:	61

## **RESULTADOS** **62**

1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.	62
v (C-H)	64
2. DETERMINACIONES ELECTROQUÍMICAS.	65
3. HIDROFOBICIDAD	68
4. ENSAYOS BIOLÓGICOS.	69
4.1 TOXICIDAD AGUDA (DL <sub>50</sub> )	69
4.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	71
5. ANÁLISIS QSAR.	71
5.1 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL DONADOR N-N	72
5.2 RELACIÓN ENTRE LA TOXICIDAD AGUDA (DL <sub>50</sub> ) Y LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA (CI <sub>50</sub> ).	73
5.3 QSAR EMPLEANDO DESCRIPTORES SOLAMENTE PARA LOS LIGANTES.	74
5.4 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL LIGANTE SECUNDARIO	75

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES** **79**

### **APÉNDICE I: DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN LOG D** **84**

1. ESTABLECIENDO EL MÉTODO.	84
1.1 SELECCIÓN DEL AMORTIGUADOR DE PH	84
1.2 SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA Y SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.	86
1.3 DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE TIEMPO	86
1.4 LINEARIDAD.	87

### **APÉNDICE II: ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO** **89**

COMPUESTO 1: [Cu(2,2'-BIPYRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	89
COMPUESTO 2: [Cu(4,4'-DIMETIL-2,2'-BIPYRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	89
COMPUESTO 3: [Cu(1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	90
COMPUESTO 4: [Cu(4-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	90
COMPUESTO 5: [Cu(5-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	91
COMPUESTO 6: [Cu(4,7-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	91
COMPUESTO 7: [Cu(5,6-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	92
COMPUESTO 8: [Cu(3,4,7,8-TETRAMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	92
COMPUESTO 9: [Cu(5-FENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	93
COMPUESTO 10: [Cu(4,7-DIFENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	93
COMPUESTO 11: [Cu(5-CL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	94

COMPUESTO 12: [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	94
--	----

---

<b>APÉNDICE III: ESPECTROS IR</b>	<b>95</b>
-----------------------------------	-----------

COMPUESTO 1: [Cu(2,2'-BIPIRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	95
COMPUESTO 2: [Cu(4,4'-DIMETIL-2,2'-BIPIRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	96
COMPUESTO 3: [Cu(1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	97
COMPUESTO 4: [Cu(4-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	98
COMPUESTO 5: [Cu(5-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	99
COMPUESTO 6: [Cu(4,7-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	100
COMPUESTO 7: [Cu(5,6-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	101
COMPUESTO 8: [Cu(3,4,7,8-TETRAMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	102
COMPUESTO 9: [Cu(5-FENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	103
COMPUESTO 10: [Cu(4,7-DIFENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	104
COMPUESTO 11: [Cu(5-Cl-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	105
COMPUESTO 12: [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	106

---

<b>APÉNDICE IV: VOLTAMPEROGRAMAS</b>	<b>107</b>
--------------------------------------	------------

COMPUESTO 1: [Cu(2,2'-BIPIRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	107
COMPUESTO 2: [Cu(4,4'-DIMETIL-2,2'-BIPIRIDINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	108
COMPUESTO 3: [Cu(1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	109
COMPUESTO 4: [Cu(4-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	110
COMPUESTO 5: [Cu(5-METIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	111
COMPUESTO 6: [Cu(4,7-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	112
COMPUESTO 7: [Cu(5,6-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	113
COMPUESTO 8: [Cu(3,4,7,8-TETRAMETIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	114
COMPUESTO 9: [Cu(5-FENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	115
COMPUESTO 10: [Cu(4,7-DIFENIL-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	116
COMPUESTO 11: [Cu(5-Cl-1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	117
COMPUESTO 12: [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-FENANTROLINA)(ACETILACETONATO)]NO <sub>3</sub>	118

---

<b>APÉNDICE V: ARTÍCULO J. INORG. BIOCHEM. 103(2009)299-309</b>	<b>119</b>
---	------------

---

<b>REFERENCIAS</b>	<b>130</b>
--------------------	------------



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de Bertrand.....	17
<b>Figura 2.</b> Algunas áreas actuales de investigación de la química inorgánica medicinal. ....	20
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción propuesto para agentes citotóxicos que tienen preferencia para unirse a grupos sulfhidrilos. ....	25
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de acción propuestos para los agentes quelatantes y sus complejos metálicos. ....	26
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción de los diferentes complejos de platino. ....	27
<b>Figura 6.</b> El ciclo de Haber-Weiss.....	29
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del metabolismo del cobre. ....	30
<b>Figura 8.</b> Principales mecanismos homeostáticos de cobre en mamíferos. ....	32
<b>Figura 9.</b> Principales causas de muerte en México.....	34
<b>Figura 10.</b> Estructura general de los complejos de cobre patentados como Casiopeínas® .....	35
<b>Figura 11.</b> Estructura cristalina de Casiopeína II-gly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO <sub>3</sub> .....	36
<b>Figura 12.</b> Actividad antitumoral in vivo en modelos murinos de acuerdo al panel de cernimiento del Cancer Chemotherapy National Service Center perteneciente al National Cancer Institute en las líneas tumorales murinas Sarcoma 180(S180), Melanoma B16 (B16) y Leucemia L1210 (L1210). ....	38
<b>Figura 13.</b> Microscopía electrónica del daño mitocondrial. ....	42
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de una molécula para el análisis de Free Wilson.....	45
<b>Figura 15.</b> Análisis comparativo de campo molecular (CoMFA).....	48
<b>Figura 16.</b> Estructuras de los complejos estudiados. A. [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] <sup>+</sup> B. [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] <sup>+</sup> y C. [Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)] <sup>+</sup> .....	53
<b>Figura 17.</b> Diagrama de flujo de la metodología realizada para llevar a cabo el estudio QSAR. ....	54
<b>Figura 18.</b> Esquema general de síntesis.....	55
<b>Figura 19.</b> Celda electroquímica. ....	57
<b>Figura 20.</b> Diagrama de flujo del ensayo de inhibición de la proliferación celular y tinción con sulforrodamina B.....	60
<b>Figura 21.</b> Estructuras de los complejos estudiados. A. [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] <sup>+</sup> B. [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] <sup>+</sup> y C. [Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)] <sup>+</sup> .....	62
<b>Figura 22.</b> Voltamperograma de [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)] <sup>+</sup> . ....	66
<b>Figura 23.</b> pKa phen vs. E <sub>1/2</sub> (V). ....	67
<b>Figura 24.</b> Relación lineal (Ecuación 11) entre el coeficiente de reparto calculado para el ligante fenantrolina (CLog P <sub>N-N</sub> ) y el coeficiente de distribución experimental (Log D) para el complejo ternario. ....	69
<b>Figura 25.</b> Gráfica de actividad antiproliferativa del grupo de complejos de [Cu(N-N)(acac)]NO <sub>3</sub> en la línea celular SiHa contra el potencial de media onda Cu <sup>I</sup> /Cu <sup>II</sup> .....	72
<b>Figura 26.</b> Gráficas de actividades antiproliferativas estimadas versus observadas para el grupo de complejos phen en: A. SiHa (1/Cl <sub>50</sub> SiHa); B. HeLa (1/Cl <sub>50</sub> HeLa); C. MCF-7 (1/Cl <sub>50</sub> MCF-7); D. HCT-15 (1/Cl <sub>50</sub> HCT-15).. ....	77
<b>Figura 27.</b> Potencial de media onda para la pareja Cu <sup>I</sup> /Cu <sup>II</sup> de complejos [Cu(phen)(acac)] <sup>+</sup> versus complejos [Cu(phen)(gly)] <sup>+</sup> . ....	78
<b>Figura 28.</b> Comparación de los potenciales redox de algunos reductores celulares contra el intervalo de potencial redox de los complejos estudiados [Cu(N-N)acac]NO <sub>3</sub> y [Cu(phen)(gly)]NO <sub>3</sub> .....	81
<b>Figura 29</b> Espectros de absorción en la región visible para [Cu(1,10-fenantrolina)(acac)]NO <sub>3</sub> 10 <sup>-2</sup> M en diferentes amortiguadores de pH.....	85
<b>Figura 30</b> Espectros de absorción para MOPS 1*10 <sup>-4</sup> M antes y después de una extracción por 24 horas con octanol a 25°C y ausencia de luz. ....	86

<b>Figura 31</b> Espectro de absorción Uv de $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})acac]NO_3$ en MOPS $10^{-3}M$ pH= 7.4 después de extracciones octanol/MOPS $10^{-3}M$ con diferentes periodos de incubación .....	87
<b>Figura 32.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	89
<b>Figura 33.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	89
<b>Figura 34.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	90
<b>Figura 35.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	90
<b>Figura 36.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(5\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	91
<b>Figura 37.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	91
<b>Figura 38.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	92
<b>Figura 39.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(3,4,7,8\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	92
<b>Figura 40.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(5\text{-fenil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	93
<b>Figura 41</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	93
<b>Figura 42.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(5\text{-Cl-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	94
<b>Figura 43.</b> Analisis termogravimétrico para $[Cu(5\text{-NO}_2\text{-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	94
<b>Figura 44</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	95
<b>Figura 45</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	96
<b>Figura 46</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	97
<b>Figura 47</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	98
<b>Figura 48</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(5\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	99
<b>Figura 49</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	100
<b>Figura 50</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	101
<b>Figura 51</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	102
<b>Figura 52</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(5\text{-fenil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	103
<b>Figura 53</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	104
<b>Figura 54</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(5\text{-Cl-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	105
<b>Figura 55</b> Espectro de IR 4000 – 400 $cm^{-1}$ de $[Cu(5\text{-NO}_3\text{-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	106
<b>Figura 56</b> Voltamperograma de $[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]^+$ .....	107
<b>Figura 57</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	107
<b>Figura 58</b> Voltamperograma de $[Cu(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]^+$ .....	108
<b>Figura 59</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	108
<b>Figura 60</b> Voltamperograma de $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(acetilacetato)]^+$ .....	109
<b>Figura 61</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	109
<b>Figura 62</b> Voltamperograma de $[Cu(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]^+$ .....	110
<b>Figura 63</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	110
<b>Figura 64</b> Voltamperograma de $[Cu(5\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]^+$ .....	111
<b>Figura 65</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(5\text{-metil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	111
<b>Figura 66</b> Voltamperograma de $[Cu(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]^+$ .....	112
<b>Figura 67</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para $[Cu(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]NO_3$ .....	112
<b>Figura 68</b> Voltamperograma de $[Cu(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(acetilacetato)]^+$ .....	113

<b>Figura 69</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	113
<b>Figura 70</b> Voltamperograma de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)] <sup>+</sup> .	114
<b>Figura 71</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	114
<b>Figura 72</b> Voltamperograma de [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)] <sup>+</sup> .	115
<b>Figura 73</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	115
<b>Figura 74</b> Voltamperograma de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)] <sup>+</sup> .	116
<b>Figura 75</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	116
<b>Figura 76</b> Voltamperograma de [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)] <sup>+</sup> .	117
<b>Figura 77</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	117
<b>Figura 78</b> Voltamperograma de [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)] <sup>+</sup> .	118
<b>Figura 79</b> Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO <sub>3</sub> .	118

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales funciones bioquímicas de los elementos. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Algunos metales empleados en la clínica. ....	21
<b>Tabla 3.</b> Proteínas que unen cobre y su localización. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Clasificación en familias según la nomenclatura del grupo de trabajo en Casiopeínas®. ....	37
<b>Tabla 5.</b> Descriptores más empleados en los estudios QSAR. ....	43
<b>Tabla 6.</b> Propiedades fisicoquímicas y biológicas más empleadas en los estudios QSAR. ....	44
<b>Tabla 7.</b> Técnicas estadísticas y no-estadísticas empleadas en los estudios QSAR. ....	49
<b>Tabla 8.</b> Bandas de absorción en Uv y coeficientes de extinción molar. ....	58
<b>Tabla 9.</b> Caracterización química. ....	63
<b>Tabla 10.</b> Principales bandas de absorción en el espectro IR (4000-400 $\text{cm}^{-1}$ ) y sus probables asignaciones. ....	64
<b>Tabla 11.</b> Pérdida de moléculas de agua en el análisis termogravimétrico. <i>sp</i> = sin pérdidas. ....	65
<b>Tabla 12.</b> Valores de $E_{1/2}$ y $\Delta E$ de los complejos. ....	68
<b>Tabla 13 .</b> Datos biológicos y fisicoquímicos. ....	70
<b>Tabla 14.</b> Toxicidad aguda ( $DL_{50}$ ( $\mu\text{mol/kg}$ ) en ratones machos ICR.) vs. concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )) en líneas celulares HeLa, SiHa, MCF-7 y HCT-15. ....	74
<b>Tabla 15.</b> Cinética para reacciones catalizadas por complejos de cobre y potenciales de óxido-reducción para la pareja Cu(II)/Cu(I). ....	82
<b>Tabla 16.</b> Datos de las curvas de calibración realizadas para cada analito. ....	88
<b>Tabla 17</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	95
<b>Tabla 18</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	96
<b>Tabla 19</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	97
<b>Tabla 20</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	98
<b>Tabla 21</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	99
<b>Tabla 22</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	100
<b>Tabla 23</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	101
<b>Tabla 24</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	102
<b>Tabla 25</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	103
<b>Tabla 26</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	104
<b>Tabla 27</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	105
<b>Tabla 28</b> Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 $\text{cm}^{-1}$ de [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	106
<b>Tabla 29.</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	107
<b>Tabla 30.</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	108

<b>Tabla 31</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	109
<b>Tabla 32</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	110
<b>Tabla 33</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	111
<b>Tabla 34</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	112
<b>Tabla 35</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	113
<b>Tabla 36</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	114
<b>Tabla 37</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	115
<b>Tabla 38</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	116
<b>Tabla 39</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> .....	117
<b>Tabla 40</b> Datos voltamperometría cíclica para [Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub> . ....	118

## INDICE DE ABREVIATURAS

2-OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
<i>acac</i>	acetilacetato
AIF	factor inductor de apoptosis
ANN	Redes neuronales artificiales
Apaf 1	activador de proteasa 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATOX	metalochaperona antioxidante
ATP7A	ATPasa tipo P 7A
ATP7B	ATPasa tipo P 7B
<i>bpy</i>	2,2'-bipiridina
BTP	bis tris propano
Casiopeína I-gly	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína II-gly	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína III-ia	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub>
CCS	chaperona de cobre para superóxido dismutasa
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
cis-DDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino (II)
cisplatino	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino (II)
CLog P <sub>N-N</sub>	Coefficiente de reparto Log P para los ligantes diimina aromática sustituidos
CLog P <sub>N-N</sub>	Valores calculados de coeficiente de reparto (LogP) para el ligante diimina.
Cols.	colaboradores
CoMFA	análisis comparativo de campo molecular
COX17	chaperona de cobre para citocromo c oxidasa
CS I-gly	Casiopeína I-gly, [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO <sub>3</sub>
CS II-gly	Casiopeína II-gly, [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO <sub>3</sub>
CS III-ia	Casiopeína III-ia, [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub>
CTR1	transportador de cobre 1
Cu( <i>phen</i> )(L) <sup>+</sup>	Complejos Cu(R-1-10-fenantrolina)(aminoacidato) <sup>+</sup>
<i>Cuphen</i> <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	Complejos bisquelato de fenantrolina
CuZn-SOD	Superóxido dismutasa de cobre y zinc ó Cu-Zn superóxido dismutasa
D	Coefficiente de distribución
DCT1	transportador de cationes divalentes 1
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco invitrogen corporation</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DMT1	transportador de metales divalentes 1
DYLOMMS	sistema de modelaje molecular de retícula dinámica orientada
E <sub>1/2</sub>	Potencial de media onda
Ec.	Ecuación
EPA	Environmental Protection Agency
<i>gly</i>	glicinato
grupo <i>acac</i>	Compuestos [Cu(N-N)( <i>acac</i> )]NO <sub>3</sub> , es decir compuestos 1-12
grupo <i>phen</i>	Compuestos [Cu( <i>phen</i> )( <i>acac</i> )]NO <sub>3</sub> , es decir compuestos 3-12
HCT-15	adenocarcinoma colorrectal
hCTR1	transportador humano de cobre 1
HeLa	adenocarcinoma de cérvix
<i>I</i> <sub>ligante 2°</sub>	Variable indicadora para el ligante secundario
<i>I</i> <sub>N-N phen</sub>	Variable indicadora para el ligante diimina
LFER	Relaciones lineales de energía libre
LFER	relaciones lineales de energía libre.

Log D	Coeficiente de distribución para los complejos [Cu(N-N)( <i>acac</i> )]NO <sub>3</sub>
Log P	Coeficiente de reparto
MBS	secuencias de unión a metales
MCF-7	adenocarcinoma mamario
MOPS	ácido 4-morfolino propanesulfónico
NCI	National Cancer Institute
N-N	diimina aromática sustituida
N-N	diimina aromática
N-O	$\alpha$ -aminoacidato
O-O	ligante bidentado donador por oxígeno
PARP-1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1
PCA	Análisis de componentes principales
PDH	piruvato deshidrogenasa
pE <sub>1/2</sub>	E <sub>1/2</sub> /0.059V
<i>phen</i>	1,10-fenantrolina
pKa <i>phen</i>	pKa para el ligante fenantrolina
pKa <sub><i>phen</i></sub>	pKa del ligante fenantrolina sustituido
PLS	análisis de mínimos cuadrados
q.d.	quaque die (Cada día)
QSAR	Correlación estructura química-actividad biológica
RLM	Análisis de regresión lineal múltiple.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>salal</i>	salicilaldehidato
SDH	succinato deshidrogenasa
<i>SFB</i>	suero fetal bovino
SiHa	carcinoma de células escamosas de cérvix
SOD	Superóxido dismutasa

## RESUMEN

Los compuestos de coordinación de cobre (II) patentados y registrados como Casiopeínas<sup>®</sup> son un grupo de agentes antineoplásicos con fórmulas  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\alpha\text{-L-aminoacidato})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ , donde el donador N-N es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina (*phen*) o 2,2'-bipiridina (*bpy*)) y el donador O-O es acetilacetato (*acac*) o salicilaldehidato (*salal*). Algunos complejos de esta familia han demostrado actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral en diferentes modelos experimentales con resultados prometedores para su empleo en la clínica. El mecanismo de acción aún no se ha elucidado satisfactoriamente; sin embargo, existe evidencia que apoya la capacidad de estos compuestos para inhibir la proliferación celular y producir muerte celular por apoptosis a través de varios mecanismos en función de la dosis administrada.

Dado que cada uno de los ligantes puede presentar sustituciones en diferentes posiciones, las combinaciones posibles hacen que esta familia abarque un grupo muy amplio de compuestos de coordinación con variantes estructurales que les proporcionan diferentes características fisicoquímicas y, por tanto, diferentes grados de actividad biológica. A pesar de los métodos de cernimiento, como el ensayo de inhibición de la proliferación celular *in vitro*, la evaluación de un número tan grande de compuestos en la búsqueda de aquel con las características más prometedoras es una tarea difícil y costosa. Los estudios de correlaciones estructura actividad o QSAR por sus siglas en inglés (Quantitative Structure-Activity Relationships) permiten predecir qué moléculas serán las más prometedoras a través de la evaluación biológica de un número estadísticamente representativo de compuestos seleccionados adecuadamente y la determinación de algunos parámetros que permitan definir sus propiedades fisicoquímicas. Debido a lo anterior, los estudios QSAR reducen significativamente los costos de investigación y permiten la identificación de las moléculas más activas en menor tiempo. Por otra parte, con base en la descripción de la actividad biológica en términos fisicoquímicos, es posible no sólo rediseñar racionalmente análogos optimizando así las propiedades biológicas, sino también apoyar las hipótesis sobre los mecanismos de acción involucrados en la actividad biológica.

Es por esto que, en el presente trabajo, se seleccionaron para realizar un estudio de correlación estructura-actividad biológica (QSAR), dos series de compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$ , en las cuales el ligante diimina presenta diferentes sustituyentes. A pesar de que los estudios QSAR son una herramienta ampliamente usada para entender y predecir diversas actividades en sistemas biológicos, poco se ha hecho en esta área con complejos de coordinación debido a la escasez de parámetros empleados en "relaciones lineales de energía libre" (LFER) que sean precisos y transferibles para complejos metálicos, tales como el coeficiente de partición (Log P). Para superar este obstáculo, se determinaron experimentalmente el coeficiente de distribución (D) y el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ), con el objetivo de emplearlos junto con algunos descriptores de sustituyentes tomados de la literatura para desarrollar ecuaciones QSAR. Se realizaron tres análisis: 1. El estudio de la influencia que tienen los sustituyentes en el ligante diimina sobre las propiedades fisicoquímicas como potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) y coeficiente de distribución (Log D); 2. La relación que estas propiedades guardan con la dosis letal ( $\text{DL}_{50}$ ) o la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) en varias líneas tumorales humanas; y 3. El estudio de la



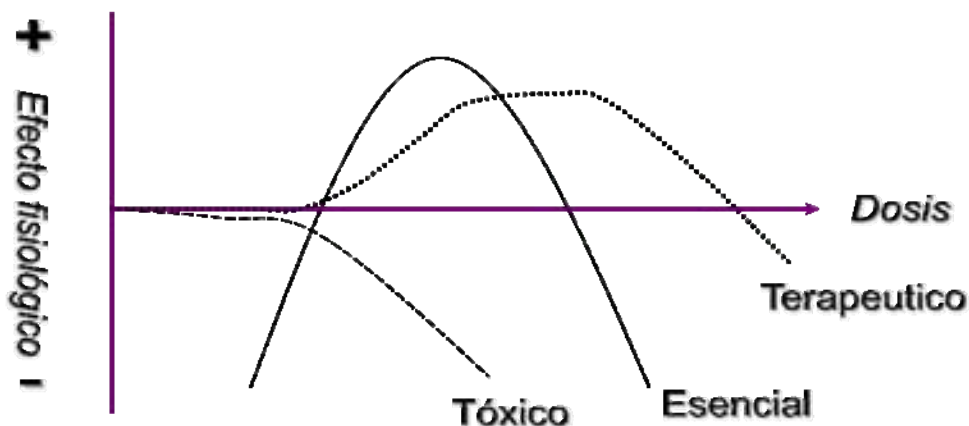
influencia del cambio de ligante secundario cuando *acac* es sustituido por glicinato (*gly*). Los resultados mostraron que la presencia del anillo aromático central en los compuestos que contienen en su estructura fenantrolina es necesaria para incrementar la actividad antiproliferativa. Por otra parte, las ecuaciones QSAR revelaron una fuerte relación entre  $CI_{50}$  y  $E_{1/2}$ , lo que lleva a pensar que el centro metálico de cobre está fuertemente involucrado en el mecanismo de acción que provoca la actividad antiproliferativa; los complejos más activos son los oxidantes más débiles. Finalmente, el cambio de ligante secundario de *acac* por *gly* tiene menos influencia sobre la actividad biológica que los cambios en el ligante diimina.



## ANTECEDENTES

Ante la mención de los términos “metales o metales pesados”, el público en general e incluso aquellos con estudios en ciencias químicas, inmediatamente asocian los términos con toxicidad y materiales tóxicos. Sin embargo, actualmente existe un creciente número de compuestos que contienen iones metálicos, los cuales son extremadamente útiles en diferentes campos de la ciencia y están en contacto con nosotros en la vida diaria.

En el campo de la medicina existen ejemplos bien conocidos que son aplicados exitosamente como fármacos para tratar o diagnosticar distintas enfermedades. Este es el caso de los compuestos de plata que se emplean para proteger la piel después de sufrir quemaduras; los compuestos radioactivos de tecnecio empleados en el diagnóstico de varias enfermedades; las sales de bismuto empleadas para el tratamiento de las úlceras estomacales o bien de la diarrea; los complejos de oro y las sales de cobre utilizados con éxito para el tratamiento de la artritis; y desde luego, los conocidos complejos de platino los cuales son eficientes como fármacos antitumorales (**Tabla 1**). De hecho, todos estos compuestos metálicos son en efecto tóxicos; sin embargo, dependiendo de la dosis, algunos de estos metales muy tóxicos son cruciales para la vida, ya sea como elementos traza o bien presentes en un fármaco. Rara vez resulta útil describir a los elementos como “tóxicos” y “no tóxicos” ya que, incluso aquellos descritos como “compuestos o elementos tóxicos” pueden ser tolerados a bajas dosis, e incluso, pueden presentar efectos terapéuticos dentro de un rango de concentraciones estrecho; mientras que, los elementos esenciales pueden convertirse en tóxicos a altas dosis (**Figura 1**). Por otra parte, el mismo elemento puede ser benéfico o nocivo dependiendo de la especiación o la forma química en que se presente, la naturaleza química de la molécula o ión es crucial y determina si un compuesto puede ser empleado satisfactoriamente o no. Un buen ejemplo de la importancia de la especiación es el selenio, el cual es un elemento esencial y, sin embargo, algunos de sus compuestos son extremadamente tóxicos (ejemplo,  $H_2Se$ ).



**Figura 1.** Diagrama de Bertrand adaptado de G. Bertrand, 8th Int. Congr. Appl. Chem 28 (1912) 30 [1]



La química de la vida es la química de los elementos ligeros, es decir, metales y no metales con número atómico menor a 35, sólo yodo, molibdeno y estaño son elementos pesados esenciales para la vida. Existen 11 elementos constantes en todos los sistemas biológicos, el 99% de ellos son C, H, O y N; el 0.9% corresponde a Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl; y finalmente, el 0.1% restante corresponde a 10 elementos necesarios en la mayoría de las especies: Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, B, Si, Se; y 7 necesarios en solo unas cuantas especies: V, Cr, F, I, As, Br, Sn [2]. La vida seleccionó elementos de prácticamente todos los grupos y sub-grupos de la tabla periódica exceptuando las familias IIIA, IV A y gases inertes, razón por la cual, todo tipo de propiedades químicas están asociadas con los procesos biológicos según los límites impuestos por el medio. Cabe recordar, que los procesos químicos involucrados en la vida toman lugar en medio acuoso, por lo cual, los elementos que la conforman y sus compuestos deben ser estables en agua a temperatura y pH biológicos. Fundamentalmente, todos estos elementos fueron seleccionados en función de su abundancia y disponibilidad en el medio ambiente.

Actualmente, cerca de 24 elementos son considerados esenciales para la vida de los mamíferos: H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn, y I. Sin embargo, la lista podría estar incompleta. Por ejemplo, el boro [3] y el cromo [4] podrían resultar ser esenciales, y se sugiere que el silicón es esencial sólo para prevenir la toxicidad del aluminio [5]. El papel biológico del cromo está rodeado de controversia [4]. En la actualidad, se sabe que los compuestos de Cr (VI) se encuentran reconocidos como carcinógenos clase I para el humano; en contraste, la mayoría de los nutriólogos señalan al Cr (III) como un micronutriente esencial el cual actúa como activador de insulina, sin embargo, esta opinión es discutible ya que hasta la fecha ninguna biomolécula dependiente de Cr (III), como enzimas o cofactores, se ha descrito aún.

La disciplina que estudia y elucida los mecanismos a través de los cuales los iones metálicos (usualmente metales de transición) intervienen en los procesos biológicos se denomina química **bioinorgánica** [6]. Los elementos inorgánicos juegan un papel crucial en los procesos biológicos (**Tabla 1**) y biomédicos [7]. Es evidente que muchos compuestos orgánicos empleados en la medicina no tienen un mecanismo de acción “exclusivamente orgánico”; algunos son activados o biotransformados por iones metálicos incluyendo a las metaloenzimas [8], mientras que otros tienen efectos directos o indirectos en el metabolismo de los iones metálicos. En efecto, muchas proteínas necesitan ensamblar uno o más metales para realizar sus funciones (metaloproteínas y metaloenzimas), un tercio de todas las enzimas son metaloenzimas, en algunas de ellas el ión metálico está involucrado directamente en el mecanismo catalítico y, en otras, estabiliza y determina la estructura terciaria y cuaternaria. Los iones metálicos también son importantes para la estructura y función (en el caso del ARN) de los ácidos nucleicos. Debido a su toxicidad, la concentración de los metales; así como, su distribución en los diversos compartimentos celulares y su incorporación en las metaloproteínas son procesos rigurosamente controlados. El balance apropiado de los equilibrios involucrados en estos procesos de control es fundamental para un fenotipo saludable.

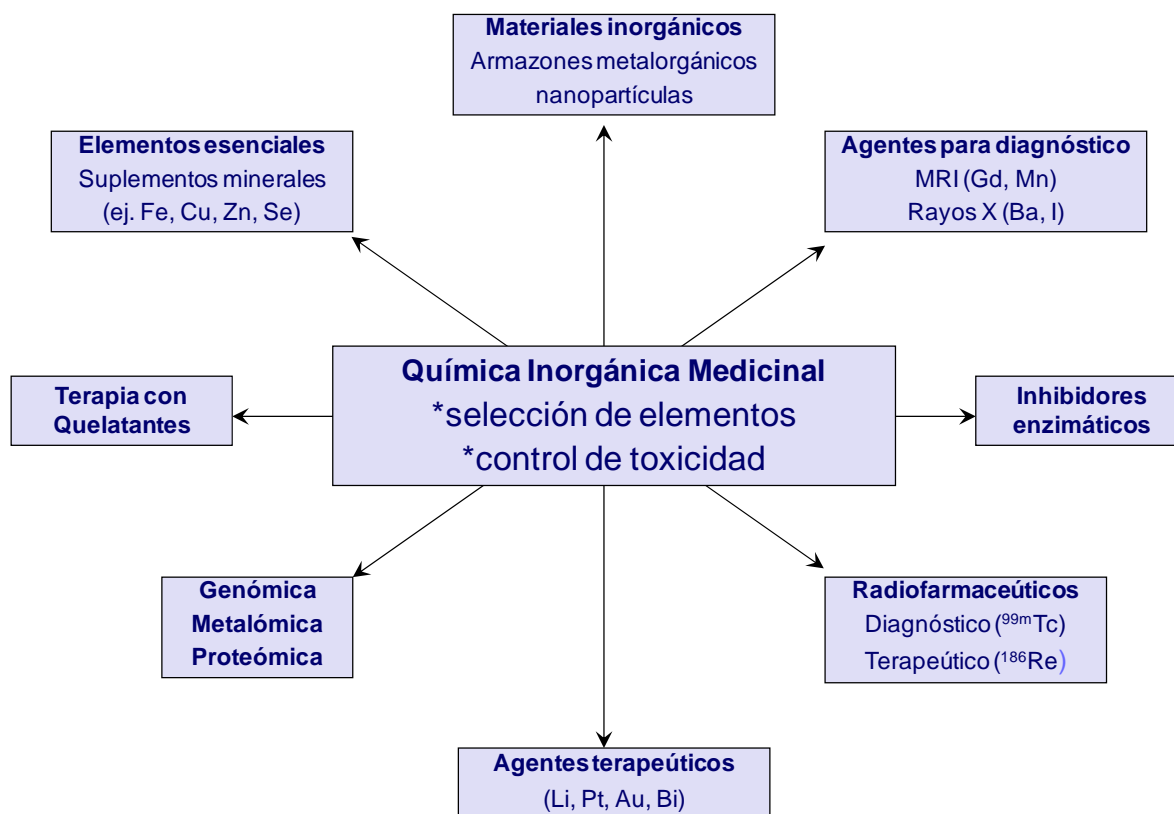
**Tabla 1.** Principales funciones bioquímicas de los elementos. Tomada de Fraústo da Silva y Williams, 1991 [2].

<b>Función general</b>	<b>Elementos</b>	<b>Forma Química</b>	<b>Ejemplos</b>
Funciones estructurales	H, O, C, N, P, S, Si, B, F, Ca (Mg, Zn)	Combinados en compuestos orgánicos o compuestos inorgánicos solubles.	Moléculas biológicas, tejidos, membranas, esqueletos, caparzones, dientes, etc.
Funciones electroquímicas	H, Na, K, Cl, (Mg), (Ca), $\text{HPO}_4^{2-}$	Como iones libres	Transmisión de mensajes (sinapsis neuronal); producción de energía metabólica.
Efectos mecánicos	Ca, (Mg), $\text{HPO}_4^{2-}$	Intercambio de iones libres con iones unidos	Desencadenamiento de la contracción muscular, lisis de vesículas.
Catálisis ácido-base	Zn,(Ni),(Fe),(Mn)	Combinados en enzimas	Digestión de comida (Zn), hidrólisis de urea (Ni).
Catálisis Redox	Fe, Cu, Mn, Mo, Se, (Co), (Ni), (V)	Combinados en enzimas	Reacciones con $\text{O}_2$ (Fe,Cu); Formación $\text{O}_2$ (Mn), Fijación de N (Mo), Inhibición de lipoperoxidación (Se), reducción de nucleótidos (Co), reacciones con $\text{H}_2$ (Ni); actividad bromoperoxidas (V)
Varias funciones específicas	Mg Fe, Cu I Fe, Ca, Si $\text{O}_2$ , $\text{N}_2$ , $\text{CO}_2$	Clorofila Proteínas Compuestos covalentes Compuestos minerales Gases	Captura de luz en la fotosíntesis. Transporte de $\text{O}_2$ Acción Hormonal Sensores (magnéticos, gravitacionales) Flotación (Pez)

## 1. Química bioinorgánica médica

La química bioinorgánica es un amplio y apasionante campo de estudio, en la actualidad, las principales ramas de investigación en esta área son los estudios sobre el tipo de ambientes de coordinación que adoptan los metales en las proteínas; los mecanismos mediante los cuales las metaloenzimas activan pequeñas moléculas como  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  [9]; el papel de los iones metálicos en la catálisis hidrolítica por proteínas y riboenzimas [10]; los procesos y la forma en la cual los iones metálicos ingresan a las células y subsecuentemente son integrados en estas metaloenzimas; la metaloregulación, la cual busca describir como los genes se encienden o apagan en respuesta a los cambios en la concentración de metales [11, 12]; y desde luego la aplicación de los metales en medicina o **química bioinorgánica médica** [13-17].

En los últimos 50 años, la química inorgánica y bioinorgánica han hecho importantes contribuciones a las ciencias médicas y al campo de la salud humana. Estos descubrimientos se han dado predominantemente en dos áreas: **agentes de contraste para diagnóstico que contienen metales o bien fármacos que contienen metales** [18]. Sin embargo, investigaciones importantes se han realizado en otras áreas como: el desarrollo de agentes **quelatantes** [19], **inhibidores enzimáticos** [20], **materiales inorgánicos (armazones metalorgánicos y nanopartículas) aplicados al diagnóstico** [21] y **la liberación de fármacos** [22], y **metalómica** [23] (Figura 2).



**Figura 2.** Algunas áreas actuales de investigación de la química inorgánica medicinal. Modificada de Ronconi, L. y Sadler, P.J.; 2007[16]

En el área del **radiodiagnóstico**, las contribuciones más importantes de la química bioinorgánica son el uso de complejos de gadolinio (III) como **agentes de contraste para resonancia magnética** (Dotarem) [24] y complejos de  $^{99}\text{Tc}$  como agentes de contraste cardiovascular (Cardiolite) [25].

En el terreno de los fármacos que contienen metales, el descubrimiento más importante es el del cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino (II), *cis*-DDP), el cual es uno de los fármacos antineoplásicos más empleados en la clínica [26]. Desde el punto de vista de la química inorgánica medicinal y el uso de metales en medicina, el éxito del cisplatino se considerado notable debido principalmente a dos razones: (i) es un fármaco completamente inorgánico que no contiene átomos de carbono (su análogo carboplatino si contiene átomos de carbono), y (ii) el compuesto cura efectivamente al menos un tipo de cáncer (cáncer testicular) y se emplea clínicamente en el tratamiento de cánceres de cabeza, cuello, pulmones y tracto genitourinario. Además del cisplatino, otros fármacos que dependen de metales han tenido éxito clínico en diferentes grados, incluyendo compuestos que contienen oro (Auranofin, antiartrítico) [27], litio (Carbonato de litio, antidepresivo) [28], y hierro (Bleomicina, antitumoral) [29].



Tanto metales esenciales, como no esenciales, pueden emplearse con fines terapéuticos y de diagnóstico, algunos de los ejemplos mencionados en conjunto con otros compuestos empleados en la clínica se encuentran citados en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Algunos metales empleados en la clínica. Tomada de Ronconi, L. y Sadler, P.J.; 2007 [16].

Compuesto Ejemplo (nombre comercial)	Función	Comentario
<i>Complejos Activos</i>		
Cis- [Pt <sup>II</sup> Cl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ](Cisplatino)	Antitumoral	Isómero <i>trans</i> es inactivo
[Gd <sup>III</sup> (DTPA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2-</sup> (Magnevist)	Agente de contraste extracelular para resonancia magnética nuclear	Toxicidad baja
[ <sup>99m</sup> Tc <sup>I</sup> (CNCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>+</sup> (Cardiolite)	Agente de diagnóstico cardiaco	El complejo cargado positivamente es absorbido por el corazón
Vitamina B <sub>12</sub>	Coenzima	La deficiencia de esta molécula causa anemia perniciosa.
<i>Metales activos</i>		
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Profilaxis de desordenes bipolares	El Litio forma complejos lábiles.
[Au <sup>I</sup> (tiomalato)] (Miocrisina)	Se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide	El tiol se intercambia fácilmente en el Au <sup>I</sup>
Citrato Bi <sup>III</sup> de amonio y potasio (De-Nol)	Antibacteriano y antiulceroso	Unión fuerte del Bismuto a los tioles, fácil intercambio
Na <sub>2</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>5</sub> (NO)]·2H <sub>2</sub> O (Nitroprusiato de sodio/Nipride)	Hipotensor, vasodilatador	Libera NO, relaja la vasculatura.
(Bleomicina)	Antitumoral	Requiere Fe para atacar al ADN
p-xilil-biciclam-8HCl (AMD3100)	Anti-HIV, movilización de células troncales	Puede unir metales <i>in vivo</i>
CaCO <sub>3</sub> , Mg(OH) <sub>2</sub>	Antiácido	Liberación lenta de la base
La <sub>2</sub> <sup>III</sup> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (fosnol)	Tratamiento de falla renal crónica	Reduce la absorción del fosfato

Los iones metálicos no solo tienen reactividad muy variada y propiedades espectroscópicas interesantes, sino que también presentan los más diversos modos de enlace y geometría entre los elementos. El carbono, el elemento más importante en el diseño de fármacos, puede generar enlaces covalentes e inertes con conectividad de dos a cuatro, y con geometrías que varían entre lineal, trigonal plana y tetraédrica. A pesar de que el número de geometrías de enlace es limitado, esto no ha detenido la síntesis de un gran número de moléculas diferentes basadas en átomos de carbono. En contraste, los iones metálicos pueden tener enlaces tanto lábiles como inertes, con números de coordinación que varían desde uno hasta doce, y con diversas geometrías incluyendo la lineal, trigonal plana, tetraédrica, octaédrica y muchas otras. Esta simple comparación sugiere que los iones metálicos pueden ser empleados con éxito como plataforma sobre la cual se puede construir moléculas con propiedades terapéuticas que logren formas y estructuras las cuales serían imposibles, o al menos muy difíciles de lograr con compuestos exclusivamente de carbono.



Además de los compuestos antes mencionados que contienen metales y que están aprobados para el uso clínico, existen numerosas investigaciones que se han realizado y se realizan con el objetivo de identificar nuevos agentes terapéuticos a lo largo y ancho de la tabla periódica. Al día de hoy, se han evaluado isótopos de cobre, galio, indio e iterbio como agentes para radiodiagnóstico [30]; investigado compuestos de manganeso y hierro para su empleo como agentes de contraste para resonancia magnética; estudiado profundamente compuestos de vanadio que mimetizan la actividad de la insulina para emplearlos en el tratamiento de la diabetes [31]; y evaluado metalocenos, principalmente de titanio, y complejos de rodio dinucleares como quimioterapéuticos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer [32].

Otra área de investigación que ha sido también de relevancia médica es la del empleo de **agentes quelatantes** para eliminar iones metálicos en sistemas biológicos [19, 33] o para inhibir la actividad de las metaloproteínas a través de la unión con el sitio activo [20]. Los agentes quelatantes se emplean en el tratamiento del exceso de concentración de iones metálicos no importando si se trata de intoxicación por metales exógenos como es el caso del saturnismo (Pb), o metales esenciales como en el caso de la enfermedad de Wilson (Cu) y la Talasemia (Fe). La eficacia del tratamiento con quelatantes obedece a un gran número de factores incluyendo la especificidad del quelatante por el ion metálico, sus propiedades farmacocinéticas y su metabolismo. Los tratamientos para el exceso de hierro, cobre y plomo se encuentran bien documentados en la mayoría de los libros de texto [34, 35]. Por otra parte, en términos generales, la estrategia para desarrollar fármacos inhibidores de metaloenzimas consiste en la generación de análogos del sustrato, los cuales se unirán competitivamente al sitio activo.

Un área creciente de la química del estado sólido aplicada a la medicina es la síntesis de compuestos híbridos (inorgánicos-orgánicos) a menudo conocidos como armazones metalo-orgánicos (AMOs). Estos armazones metalo-orgánicos son sólidos cristalinos de baja densidad que presentan microporosidades; generalmente están compuestos de ligantes orgánicos que funcionan como conexiones entre iones metálicos o agrupaciones de iones metálicos (nódulos) [36, 37]. A pesar de que el interés principal en estos armazones se enfoca al área de desarrollo de nuevos materiales para el almacenamiento de gases de alta densidad y su empleo potencial en separaciones, celdas de combustible y otras tecnologías relacionadas con la energía, algunos reportes sugieren que estos materiales podrían jugar un papel novedoso en el desarrollo de tecnología aplicada a la imagenología médica [21] o bien materiales para liberación controlada de fármacos [22].

En años recientes se ha propuesto la “**metalómica**” como un nuevo campo científico para integrar las áreas de investigación relacionadas con biometales. La metalómica puede definirse como el campo científico en donde se fusiona la genómica y la proteómica, ya que la síntesis y las funciones metabólicas de los genes (DNA y RNA) y proteínas no pueden realizarse sin la ayuda de varios iones metálicos y las metaloenzimas. En la metalómica, las metaloproteínas, metaloenzimas y otras biomoléculas que contienen metales se definen como “metalomas”, en una forma similar a



la que se definen los genomas en la genómica y los proteomas en la proteómica [23]. La investigación de los vínculos entre los elementos inorgánicos (esenciales y tóxicos) y la información obtenible de las secuencias genómicas, así como los mecanismos que garantizan la homeostasis en los compartimentos celulares, representan un reto para el futuro de la química bioinorgánica en la llamada “era post-genómica” [38]. Esta nueva área permite la interacción de las biociencias dedicadas a los elementos metálicos y sus ciencias aplicadas, que tradicionalmente, han sido estudiadas de forma independiente en muchos campos científicos como la bioquímica, la química bioinorgánica, la nutrición, farmacia, medicina, toxicología, agricultura, química ambiental, etc. Todos estos campos científicos están fuertemente interrelacionados, siendo el factor común, los metales, desde el punto de vista de las ciencias biológicas [23].

## **2. Compuestos metálicos con propiedades antitumorales**

Históricamente, se ha evaluado el potencial antitumoral de numerosos agentes que contienen en su estructura algún metal, desde metales de transición temprana hasta el grupo principal de elementos [39]. En el caso específico del cisplatino, se han dedicado grandes esfuerzos al diseño de análogos que superen las propiedades de los compuestos de platino actualmente en uso como el carboplatino y el oxaliplatino [26, 40]. A la fecha, existe evidencia considerable sobre la disminución de la eficacia terapéutica de los complejos de platino dependiendo, por ejemplo, de su configuración molecular [39]. El cisplatino ó *cis*-diaminodicloroplatino (II) pierde su actividad antitumoral cuando se transforma en el isómero *trans* en medio acuoso [39, 41-44]; por el contrario, en el caso de otros compuestos de platino algunos ligantes en configuración *trans* tienen mayor citotoxicidad cuando se compara con sus contrapartes *cis*, siendo de particular interés los complejos de platino que muestran citotoxicidad en líneas tumorales resistentes a cisplatino [40].

Además del control de su toxicidad selectiva, los compuestos que contienen metales deben tener también propiedades farmacológicas apropiadas que permitan su empleo en la clínica. Muchos compuestos antitumorales, siendo muy activos y con propiedades muy interesantes, no han alcanzado las fases clínicas debido a que sus propiedades fisicoquímicas son deficientes para el empleo farmacológico, como por ejemplo: la baja hidrosolubilidad, la inestabilidad en medios acuosos, y la tendencia a descomponerse con la exposición a disolventes, humedad, luz o aire. Por otra parte, la dificultad para controlar la toxicidad selectiva o sus propiedades farmacológicas han contribuido a la renuencia de algunos investigadores al desarrollo de fármacos a base de metales. En consecuencia, a pesar del hecho de que los complejos metálicos son a menudo citotóxicos *in vitro* a dosis mucho más pequeñas que los fármacos orgánicos, frecuentemente no son estudiados en más modelos tumorales *in vivo*. Otro factor crítico cuando se determina el potencial terapéutico de un metal es el estado de oxidación; el potencial de oxidación de la mayoría de los metales de transición aumenta cuando el radio iónico decrece como consecuencia de una valencia más alta. La toxicidad, sin embargo, no parece estar directamente relacionada con un estado de

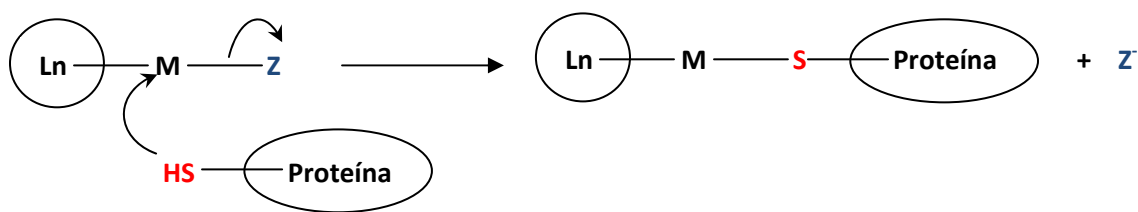




oxidación más alto o más bajo, ya que los compuestos de cromo (VI) son más tóxicos que los de cromo (III), mientras que la arsenita (As(III)) es más tóxica que el arsenato (As(V)) por sólo mencionar un par de ejemplos.

La actividad citotóxica de un complejo metálico, la cual está relacionada con su actividad antitumoral, es controlada tanto por la identidad del metal y su estado de oxidación como por los ligantes unidos a este metal; sin embargo, en muchos casos sólo uno de ellos es el factor dominante. A pesar de todas estas variables, existen claras asociaciones entre las similitudes estructurales y la citotoxicidad [39, 45]. Es por esto que, en un estudio publicado en 2005 por Ruili Huang y cols. se analizaron los perfiles de citotoxicidad del depósito del National Cancer Institute (NCI) para catalogar más de 1100 compuestos que contienen metales o metaloides con potencial actividad antitumoral [45]. En este reporte se analizaron las características moleculares y la reactividad de estos compuestos en términos de las propiedades de sus metales, los componentes orgánicos asociados (ligantes), así como, su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, concluyendo que el mecanismo de acción de los compuestos que contienen metales puede clasificarse en 4 grandes grupos de acuerdo a: **la preferencia para unirse a grupos sulfhidrilos, características quelatantes, comportamiento como iones lipofílicos, y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Aproximadamente el 90% de los compuestos que tienen **preferencia para unirse a grupos sulfhidrilos** contienen metales de transición del quinto y sexto periodo (Rh, Pd, Ag, Ir, Pt, Au, Hg, etc.), o metales pesados post-transicionales (Sn, Pb, Sb, Bi, etc.). Los metales pesados generalmente son conocidos como “ácidos blandos”; estos metales tienden a formar complejos estables con bases suaves [46]. Por tanto, los metales se unen preferentemente a átomos pertenecientes a periodos superiores al tercero (S, Se) por encima de átomos del segundo periodo en la misma familia (O). Esta preferencia puede atribuirse a la presencia del considerable carácter covalente en sus enlaces metal-ligante resultado de la formación de enlaces  $\pi$  por superposición de orbitales d. Los compuestos que comparten este mecanismo de acción generalmente se encuentran débilmente coordinados a ligantes hidrolizables o grupos salientes ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{RCOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Estas características hacen que estos complejos metálicos sean susceptibles de ataques nucleofílicos por ligantes biológicos como por ejemplo el grupo sulfhidrilo (-SH) de los residuos de cisteína dando como resultado reacciones de adición y/o sustitución nucleofílica (**Figura 3**). Este tipo de reacciones trae como consecuencia, dependiendo desde luego del metal y los ligantes que le acompañan, la disminución de glutatión (GSH) [47-49] y la inhibición de enzimas clave para la protección celular que contienen cisteínas o selenio en el centro activo o cerca de él como la  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetasa[50], glutatión S-transferasa [50-52], tioredoxina reductasa[53, 54], glutatión reductasa [55], además de proteínas de membrana [56, 57], glicoproteínas y otras proteínas celulares entre ellas proteasas y fosfolipasas [58], e incluso algunos factores de transcripción [59, 60] o proteosomas [61].



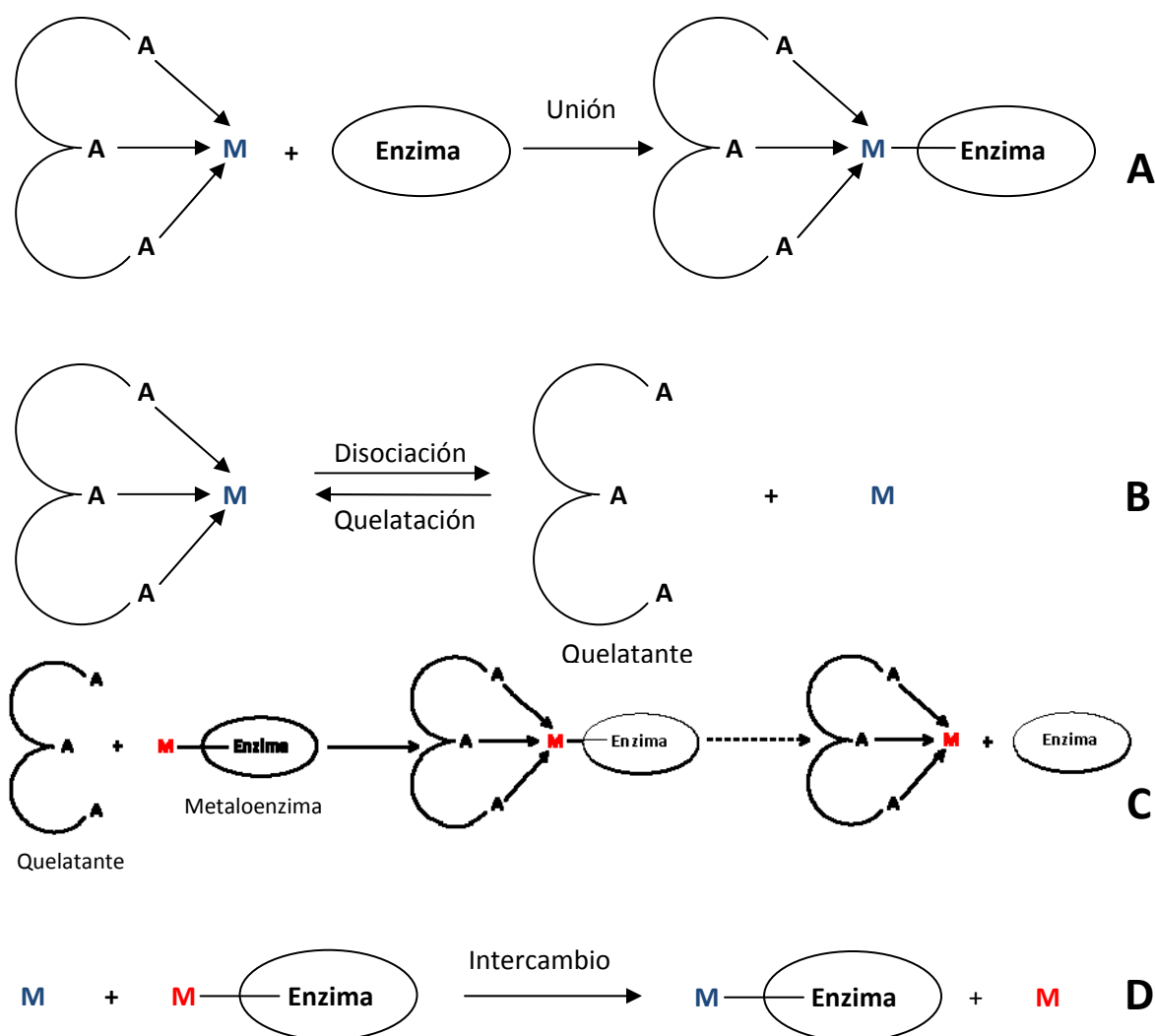
M= metal; Z = grupo saliente: Cl, Br, I, OAc, etc.; Ln = Ligantes

**Figura 3.** Mecanismo de acción propuesto para agentes citotóxicos que tienen preferencia para unirse a grupos sulfhidrilos. Adaptada de Ruli Huang y cols. 2005 [45]

Los quelatantes y los complejos metálicos con quelatantes tienen como principal característica ser complejos de coordinación principalmente de metales de transición del cuarto periodo (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) con agentes de características quelatantes muy fuertes (especialmente quelatantes tridentados). En este grupo no sólo los complejos de coordinación tienen actividad sino los quelatantes por sí mismos también. Estos últimos han recibido especial atención como agentes terapéuticos debido a su capacidad para alterar el metabolismo y la homeostasis de metales esenciales como el hierro, cobre, y zinc [62-64]. El metabolismo del hierro se encuentra alterado en el cáncer; las células tumorales en rápida proliferación muestran requerimientos de hierro incrementados [62, 64]. Por otra parte, el cobre regula la producción de factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis y se ha observado un incremento en los niveles de cobre en suero en pacientes con varios tipos de cáncer [63].

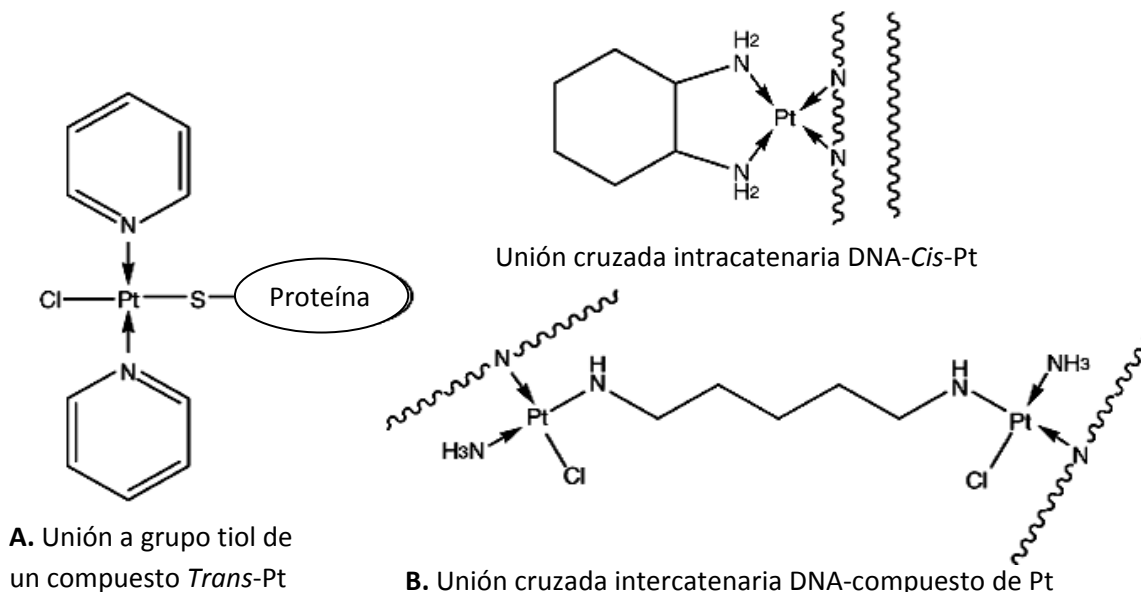
Los agentes quelatantes pueden interferir con las actividades catalíticas de las metaloenzimas o metaloproteínas afectando sus cofactores catalíticos o estructurales [45]. Estas moléculas pueden quelatar, ya sea solo uniéndose a las biomoléculas (**Figura 4A**), o bien, sustrayendo los metales funcionales en las enzimas o proteínas (**Figura 4C**), incluso secuestrando los iones metálicos no enlazados a proteínas, y por tanto, privar a las metaloenzimas del suplemento de iones metálicos que requieren. El mecanismo de acción puede incluso ser más complejo, en la **Figura 4A-D** se exponen algunas otras posibilidades. Los metalofármacos pueden por sí mismos unirse a los sitios de unión a metales en las enzimas (**Figura 4A**). El complejo metálico puede actuar también como acarreador del quelatante para disociarse después de ingresar al sistema biológico en el ión metálico libre y el quelatante a través de la reacción ilustrada en la **Figura 4B**, de esta forma el quelatante queda disponible para quelatar otros metales biológicamente importantes o unirse a otros blancos biológicos (**Figura 4C**), finalmente el metal libre puede sustituir otros metales esenciales (**Figura 4D**). El hecho de que los agentes quelatantes posean perfiles de citotoxicidad similares a sus complejos metálicos, y que la identidad del metal no afecte significativamente la actividad de estos complejos, indica que probablemente sean profármacos, y que sus especies activas sean los complejos metálicos formados *in situ*, o que los complejos metálicos sirven únicamente como acarreadores de los quelatantes los cuales son las moléculas activas. Ejemplos

de este tipo de agentes son los complejos metálicos de carboxaldehído tiosemicarbazonas  $\alpha$ -N-heterocíclicas [62, 64], salicilaldehído tiosemicarbazonas [65, 66], 2-benzoilpiridin 2-piridilhidrazonas [67], salicilaldehído semicarbazonas [68, 69], 8-quinolinolatos [70-73], 2,6-diacetilpiridín-bis(nicotinoilhidrazonas) [74] y diiminas aromáticas como 2,2'-bipiridina y 1,10-fenantrolina. Estos últimos dos ligandos son quelatantes bidentados con átomos de nitrógeno como donadores, los cuales tienen relativamente alta afinidad por hierro y cobre [75-78]; por otra parte, además de sus propiedades quelatantes, su sistema de anillos aromáticos fusionados hace de estos ligandos potenciales intercaladores del ADN [79]. La mayor parte de los complejos de estos ligandos se presenta con iones lantánidos trivalentes y algunos otros metales como Mo, Ru, Co y Pt, los cuales muestran perfiles de citotoxicidad similares a aquellos complejos de Pt(II) y 2,2',2''-terpiridina [45], cuyo mecanismo de acción es la intercalación al DNA y la inhibición de la DNA topoisomerasa [80].



**Figura 4.** Mecanismos de acción propuestos para los agentes quelatantes y sus complejos metálicos. Adaptada de Ruili Huang y cols. 2005 [45]

Cabe resaltar que los compuestos de platino, dependiendo de su configuración y la estructura de sus ligantes, presentan mecanismos de acción tanto de unión a grupos sulfhidrilos (**Figura 3**) como de unión a bases púricas y pirimídicas del ADN donde los átomos donadores no son bases blandas [45]. Este último mecanismo de acción es una reacción similar a la propuesta en la **Figura 4A** donde la biomolécula es el ADN en vez de una enzima. El 90% de los compuestos de platino son análogos de cisplatino, es decir, complejos forzados a tener configuración *cis* mediante el empleo de un ligante bidentado que forma un anillo con el Pt, por ejemplo: oxaliplatino y carboplatino; o análogos dinucleares (dos centros de platino unidos por una cadena alifática)(**Figura 5B**). Estas características permiten que estos compuestos formen uniones cruzadas intra e intercatenarias con dos bases del ADN, donde la configuración *cis* o la cadena flexible en el complejo dinuclear es esencial para que este tipo de unión se presente. En contraste, los complejos de platino que tienden a unirse con grupos sulfhidrilos presentan en su estructura ligantes voluminosos como anillos aromáticos o triarilquil y triarilfosfinas. El impedimento estérico favorece la configuración *trans* y por tanto las uniones cruzadas en el ADN son poco probables (**Figura 5A**). Debido a las características del Pt(II) como metal blando, la unión con moléculas que contienen tioles se hace favorable. Las estructuras de estos complejos de Pt(II) son mucho más variadas que aquellas cuyo mecanismo de acción es a través de la unión con el DNA.

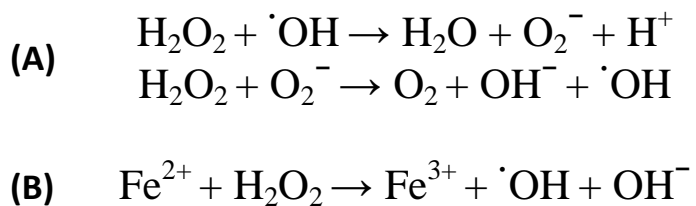


**Figura 5.** Mecanismos de acción de los diferentes complejos de platino. A. Complejos de platino con ligantes voluminosos *trans*-configurados cuyo mecanismo de acción es a través de la unión con grupos sulfhidrilos. B. Complejos de platino cuyo mecanismo de acción es la unión intercatenaria o intracatenaria con el DNA. Adaptada de Ruili Huang y cols. 2005 [45]



Otro grupo importante de agentes citotóxicos que contienen metales son los **iones lipofílicos**, la característica distintiva de este tipo de complejos es su capacidad para producir especies con carga positiva deslocalizada. Estos iones lipofílicos se concentran en la membrana mitocondrial como resultado de su potencial transmembranal negativo, acumulándose de forma selectiva en las mitocondrias de células de carcinoma debido a que sus potenciales de membrana son mayores en comparación a los de las células epiteliales normales, presentando así cierta toxicidad selectiva [81]. Los compuestos más representativos de esta clase son la serie de complejos iónicos de ciclopentadienilrenio compuestos del catión  $[(C_5H_5)(NO)(Ph_3P)ReL]^+$  y contraiones como  $BF_4^-$  o  $PF_6^-$ ; o bien carboxilatos del tipo  $[(C_5H_5)(NO)(Ph_3P)Re(COOR)]$ , donde R= Me,  $Ph_3Ge$ , o  $Ph_3Sn$ . Algunos compuestos de este tipo han mostrado actividad contra la línea tumoral murina de Ehrlich [82]. Algunos otros compuestos con este mecanismo de acción son series de trifenilfosfinas ( $[Ph_3PR]^+$ ) [83], tetrafenilfosfinas [84-86], tetrafenilarsinas ( $[Ph_4As]^+$ ) y bromuros organoantimoniales [81].

Finalmente, el cuarto mecanismo citotóxico importante es **la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**. El tipo de compuestos que actúan a través de este mecanismo contienen en su estructura metales capaces de participar en ciclos redox, tales como: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni y Cu [45]. La característica común de estos complejos es la habilidad de catalizar la generación de ROS y de esta forma oxidar a los componentes celulares (lípidos, proteínas y DNA), alterar el balance celular redox, y/o interferir con las señales celulares reguladas por mecanismos de óxido-reducción. El probable mecanismo involucrado en la formación de ROS es la conocida reacción tipo Fenton (**Figura 6**), mediante la cual los complejos de estos metales son capaces de catalizar la formación de radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) a partir de  $H_2O_2$  [87]. El radical  $\cdot OH$  es uno de los más reactivos y destructivos, es la especie reactiva más temida debido al daño celular que causa [88]. La generación de este, y otros radicales, puede incrementar el desbalance redox pre-existente en las células tumorales debido a su metabolismo incrementado y, de esta forma, generar daños irreversibles que las conducirán a apoptosis [89-91]. La selectividad de la toxicidad generada radica en la hipersensibilidad de las células tumorales al estrés oxidante [90, 92] debido al incremento de ROS y la disminución de enzimas antioxidantes que les caracteriza [93]. A este mecanismo de acción se le atribuye la citotoxicidad y actividad antitumoral que presentan los complejos bis( $\beta$ -dicetona)titanio(IV) [94]; algunos complejos de Cr(VI) y Cr(III) [95]; complejos de vanadio [96]; y compuestos que mimetizan también la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como metaloporfirinas de hierro, manganeso y cobre [97], y bis-quelatos de cobre y manganeso tipo  $[M-O_4]$  [98, 99] por solo mencionar algunos ejemplos.

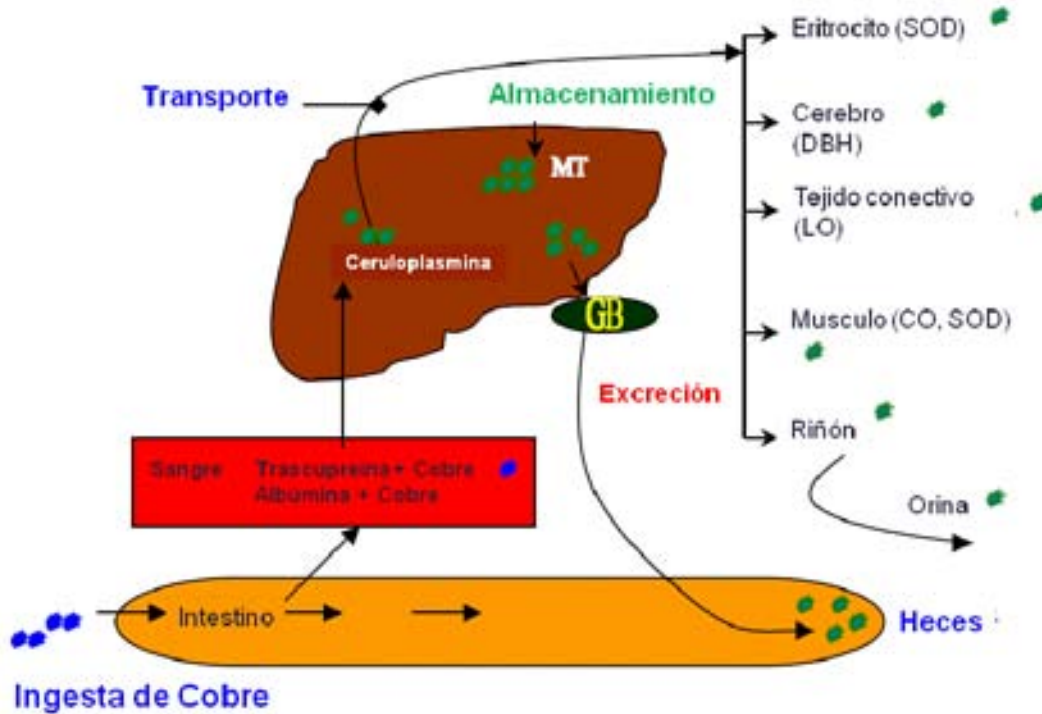


**Figura 6.** El ciclo de Haber-Weiss (A) consiste de dos reacciones, la segunda es una posible fuente de radicales libres pero tiene una constante de reacción muy pequeña; sin embargo, esta reacción puede ser catalizada a través de la reacción de Fenton (B) debido a la presencia de metales capaces de participar en reacciones de óxido-reducción como el hierro o sus complejos.

### 3. El cobre y su importancia biológica.

El cobre (Cu) es un elemento traza esencial en los sistemas biológicos, el cual existe en pequeñas cantidades en una gran variedad de células y tejidos, encontrándose su mayor concentración en el hígado [100]. El cobre puede existir en los sistemas biológicos en dos estados de oxidación, cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ó cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) [101], funcionando como cofactor necesario para las propiedades estructurales y catalíticas de un gran número de enzimas importantes como: citocromo c oxidasa, tirosinasa, *p*-hidroxifenil piruvato hidrolasa, dopamina beta hidroxilasa, lisil oxidasa, y Cu-Zn superóxido dismutasa (CuZn-SOD) [2, 102]. Estas enzimas están involucradas en procesos biológicos necesarios para el crecimiento, mecanismos de defensa, fuerza en los huesos, maduración de los glóbulos rojos y blancos, transporte de hierro, metabolismo de la glucosa y el colesterol, contractibilidad muscular, desarrollo cerebral y varias funciones de mantenimiento [103].

El consumo de cobre varía dependiendo de los hábitos alimenticios. La comida, más que el agua, proporciona la mayor parte del Cu consumido por los mamíferos. Las comidas ricas en cobre son las ostras, el hígado, nueces, legumbres, granos enteros y fruta seca [104]. El agua natural tiene una concentración promedio de 4-10  $\mu\text{g}$  Cu/L encontrándose la mayor parte de este cobre, unido a materia orgánica [105]. El agua para beber contribuye con el 6-13% de la ingesta diaria de Cu, siendo el límite permitido por la EPA como contaminante de 1.3 mg Cu/L [106]. La absorción de cobre en el cuerpo humano depende de varios factores incluyendo la forma química y la presencia de otros componentes de la dieta. El cobre se absorbe desde el estómago en pequeñas cantidades, sin embargo, alrededor del 30-50% del cobre ingerido, normalmente como  $\text{Cu}^{2+}$ , se absorbe en el duodeno [107]. Una porción de cobre endógeno se reabsorbe desde los jugos digestivos. El cobre se une a algunos aminoácidos, particularmente histidina, metionina, y cisteína para su absorción y transporte a través del sistema de transporte de aminoácidos. Una vez absorbido puede unirse al glutatión reducido (GSH), o algunos ácidos orgánicos como lo son el cítrico, glucónico, láctico y acético [107]. Por otra parte, el zinc, hierro, molibdeno, calcio, fósforo y la vitamina C desacoplan la absorción de Cu [108].



**Figura 7.** Representación esquemática del metabolismo del cobre. Adaptada de Hyun, C. y Filippich, L.J., 2003 [109]

Parte del cobre que ingresa por el tracto digestivo permanece en los enterocitos unido a proteínas específicas como metalotieninas y es excretado posteriormente por descamación en heces (**Figura 7**) [110]. El resto del cobre, absorbido desde el intestino delgado, se transporta en la sangre hasta el hígado, vía circulación enterohepática, unido principalmente a la albúmina y en cierta medida a la transcupreina; y otra parte, llega a los riñones vía circulación sistémica. Una vez en el hígado o en los riñones, el cobre recién absorbido se incorpora en varias cuproenzimas (**Tabla 3**) y, proteínas que requieren cobre como la ceruloplasmina y metalotieninas. El cobre que ingresa al hígado puede ser almacenado en los hepatocitos, secretado al plasma o excretado en la bilis. El cobre liberado desde el hígado se une principalmente a la ceruloplasmina para su transporte a los tejidos, pero puede también unirse a la albúmina, transcupreina e histidina. Aproximadamente entre el 60 y 90% del cobre circulante en la sangre se encuentra en forma de ceruloplasmina [111] y de esta forma se transporta también en otros fluidos corporales encontrados en el cerebro, sistema nervioso central y saco amniótico [101] y puede reaparecer en plasma. En mamíferos el exceso de cobre se elimina principalmente por excreción biliar (80%) y parcialmente por excreción urinaria (menos del 3%), ambos mecanismos de eliminación son responsables de la homeostasis del cobre [112-114].

Existen tres mecanismos de detoxificación para limitar la toxicidad de los metales pesados en animales, estos son: la reducción de la absorción del metal en cuestión, incremento de la excreción y el secuestro del metal [115]; en este último participan principalmente las





metalotieninas, las cuales pueden unir el cobre iónico intracelular y, de esta forma, funcionan como antioxidantes y previenen la citotoxicidad inherente a este metal [116].

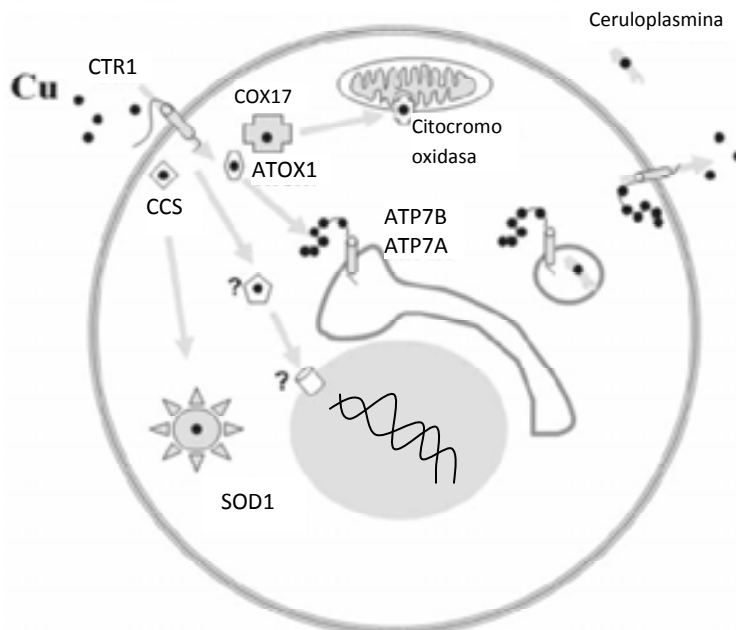
**Tabla 3. Proteínas que unen cobre y su localización (basada en Linder, 1991 [117])**

	Localización/tejidos
Albúmina	Extracelular/plasma
Transcupreína	Extracelular/plasma
Ceruloplasmina	Extracelular/hígado
Metalotienina	Intracelular/intestino, hígado
Superóxido dismutasa	Extracelular e intracelular/hígado, riñón, células sanguíneas.
Citocromo c oxidasa	Intracelular/músculo, hígado
Lisil oxidasa	Extracelular/tejido conectivo
Tirosinasa	Intracelular/tejidos que contienen melanina
Dopamina $\beta$ -monooxigenasa	Hipotálamo
Peptidilglicina monooxigenasa	Extracelular/gránulos hipotalámicos.

### 3.1 Homeostasis del Cu en células de mamífero.

Las proteínas que regulan la homeostasis del cobre cumplen dos funciones principales: 1. Distribución de Cu a las cuproenzimas involucradas en procesos celulares críticos como el transporte de electrones, la neurotransmisión y el metabolismo del hierro en varios compartimentos subcelulares, y 2. Brindar protección a la célula contra la potencial toxicidad del Cu. El Cu (I) es altamente tóxico debido a su habilidad para oxidar y generar ROS, y a su capacidad para interactuar directamente con proteínas, RNA, y DNA. La homeostasis de este metal esencial se mantiene gracias a un grupo bien conservado de proteínas que contienen dominios únicos conocidos como secuencias de unión a metales (MBS), estos dominios son ricos en cisteína, metionina o histidina. Las MBS unen Cu (I) en una bolsa protectora y lo intercambian a través de interacciones íntimas proteína-proteína con otras proteínas que contienen secuencias similares, de esta forma, mantienen la concentración de cobre libre intracelular por debajo de  $10^{-18}$  M [118] y al mismo tiempo transfieren Cu (I) a las enzimas que lo requieren en los diferentes compartimentos subcelulares. Los componentes del sistema de homeostasis de cobre incluyen transportadores para su entrada y salida; moléculas quelatantes y amortiguadoras; y metalochaperonas. Muchos de estos elementos se han conservado durante la evolución al grado que pueden complementar las funciones entre las diferentes especies [119]. Se ha demostrado que las MBS de algunas proteínas que participan en la homeostasis del cobre interactúan también con otros metales como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Au}^{2+}$  [120, 121], estos estudios apoyan la idea de que algunos elementos del sistema de homeostasis de cobre podrían participar en la detoxificación de otros metales además de proteger a la célula de la toxicidad del cobre. La **Figura 8** presenta un diagrama con los componentes principales que controlan la homeostasis del cobre en mamíferos.





**Figura 8.** Principales mecanismos homeostáticos de cobre en mamíferos. El Cu ingresa a las células por el transportador hCTR1, el cual lo transfiere a la metalochaperona antioxidante (ATOX1), a la chaperona de cobre para superóxido dismutasa (CCS), y a la chaperona de cobre para citocromo c oxidasa (COX17). Estas metalochaperonas a su vez lo transfieren a ATP7A y ATP7B, Superóxido dismutasa Cu-Zn, y citocromo c oxidasa, respectivamente. ATP7A y ATP7B transfieren el cobre al aparato de Golgi, donde es introducido en las cuproenzimas como tirosinasa y ceruloplasmina. La unión de cobre a ATP7A y ATP7B también induce el tráfico subcelular en las vesículas que contienen estas dos proteínas desde el aparato de Golgi hacia lugares más periféricos. Adaptada de Safei, R y Howell, S.B. 2006 [122].

En nuestra especie, el principal transportador de cobre hacia el interior de las células es el transportador de cobre 1 (hCTR1), el cual está compuesto de una secuencia de 190 aminoácidos [123-125]. CTR1 reside principalmente en la membrana plasmática [126, 127] y algunos estudios realizados en ratones transgénicos indican que es esencial para la supervivencia de los embriones en mamíferos [127, 128]. El mecanismo mediante el cual CTR1 transporta Cu a través de la membrana plasmática aún no se ha dilucidado completamente; sin embargo, se ha sugerido que CTR1 une cobre vía un dominio terminal rico en metionina e histidina, y lo transporta a través de la membrana mediante poros que se forman por asociaciones oligoméricas [126, 127, 129]. El dominio citosólico de CTR1 es capaz de entregar el Cu (I) directamente a la chaperona antioxidante ATOX1 *in vitro* [130]. Por otra parte, existen además de CTR1, otros transportadores que se encargan del ingreso de cobre en células eucariontes [131]; estos son, el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), también conocido como proteína natural de resistencia asociada a macrófagos (Nramp2), y el transportador de cationes divalentes 1 (DCT1), los cuales también están involucrados en este proceso en células de mamífero [132]. Sin embargo, la cantidad de cobre que



transportan estos últimos en relación al hCTR1 en células tumorales humanas aún queda por ser determinada.

Una vez dentro de la célula (**Figura 8**), el cobre puede unirse a diferentes biomoléculas, principalmente a glutatión [133], algunas metalotieninas [134], y metalochaperonas específicas [135-138]. El glutatión es una de las defensas más importantes en el organismo, pero a pesar de que el glutatión puede potencialmente unir Cu, este péptido puede no funcionar para proteger a las células del daño provocado por este metal ya que la mezcla *in vitro* de cobre y glutatión genera radical superóxido [133]; y se sabe que el cobre libre cataliza la oxidación de glutatión, generando  $H_2O_2$  y radicales hidroxilo [139]. Las metalotieninas, por su parte, actúan como reserva intracelular de cobre [134]; estas secuestran Cu en una región similar a una “bolsa protectora” y lo mantienen aislado del disolvente, siendo esto considerado como un mecanismo mediante el cual las células pueden limitar la exposición a Cu y sus efectos tóxicos [116]. Sin embargo, las metalotieninas no pueden realizar las funciones críticas de distribuir el Cu a los organelos y/o a las proteínas que lo requieren, esta tarea debe ser realizada por las metalochaperonas, que liberan cobre de forma muy específica a los transportadores intracelulares de cobre y a las proteínas que lo requieren. Como muestra la **Figura 8**, las metalochaperonas involucradas en el tráfico subcelular de cobre en células de mamífero son ATOX1 (HAH1) que libera cobre en las ATPasas tipo P ATP7A y ATP7B en la red trans-Golgi [137, 138], cytochromo *c* oxidasa COX17 que distribuye Cu a COX en la mitocondria [135], y la chaperona para superóxido dismutasa (CCS) la cual carga el cobre en la SOD1 citoplasmática [136]. Estas metalochaperonas actúan como secuestradores y transportadores al mismo tiempo.

Las células de mamífero tienen dos transportadores de salida similares a las ATPasas tipo P, estos son ATP7A y ATP7B, los cuales median la salida de cobre de la célula. ATP7A se expresa en el epitelio intestinal [140] y en muchos otros tejidos pero no en el hígado [141-143]; mientras que ATP7B se expresa en hígado [137], riñón, y en menor proporción en cerebro [144]. Estas dos moléculas tienen estructuras muy similares [144-146] y pueden ser inhibidos por vanadatos [147].

La unión de cobre a ATP7A y ATP7B activa una relocalización subcelular regulada de este metal, que involucra el movimiento desde su posición basal en la red trans-Golgi a otros compartimentos vesiculares, y en el caso de ATP7A, a la membrana plasmática [137, 148, 149]. Las mutaciones que alteran la función de ATP7A y ATP7B causan las enfermedades de Menkes y Wilson respectivamente. La enfermedad de Menkes es una alteración relacionada con la deficiencia de cobre y está ligada al cromosoma X, esta enfermedad es fatal en los primeros años de la niñez. Los pacientes con esta enfermedad presentan retraso mental y neurodegeneración, principalmente como resultado de la deficiencia de enzimas dependientes de cobre necesarias para el desarrollo del cerebro [150]. La enfermedad de Wilson es una alteración autosómica recesiva; está caracterizada por un incremento marcado en la concentración de cobre en hígado y cerebro causado por una reducción en la capacidad de excretar cobre a través de otras vías. El cobre se

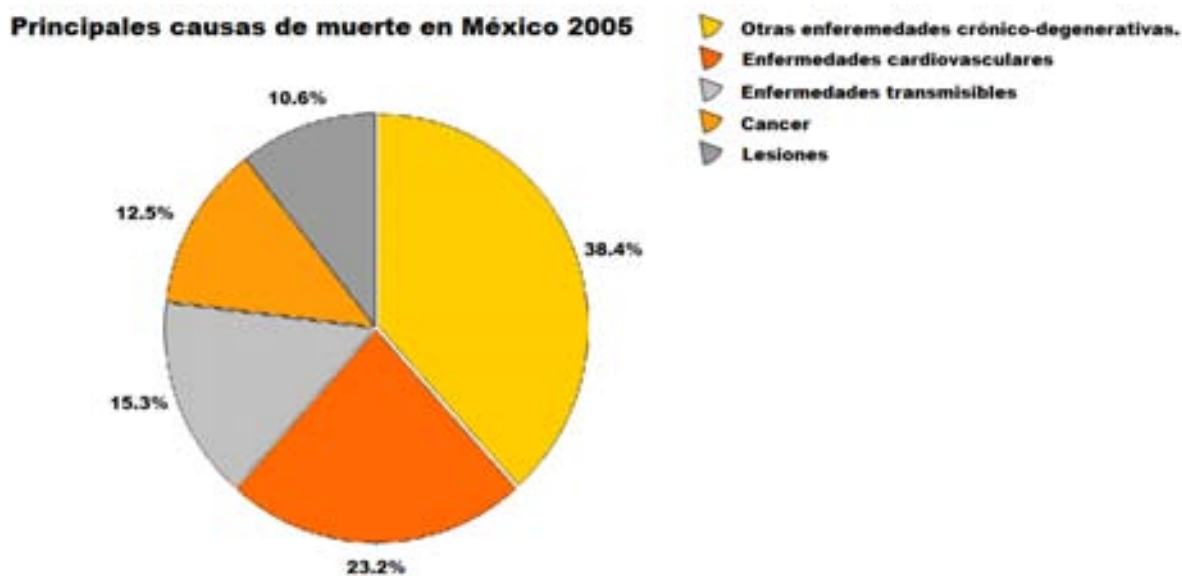


acumula en los hepatocitos y células cerebrales provocando cirrosis y neurodegeneración; también se deposita en la cornea produciendo los anillos característicos de Kaiser-Fleischer [151].

#### 4. Cáncer y Casiopeínas ®

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y produce un gran número de muertes anualmente. La Organización Mundial para la Salud (OMS) reporta que en el año 2005, 7.6 millones de personas murieron a causa del cáncer [152], y estima que en el año 2020 se diagnosticarán más de 15 millones de personas con cáncer, de las cuales 10 millones fallecerán a causa del mismo [153].

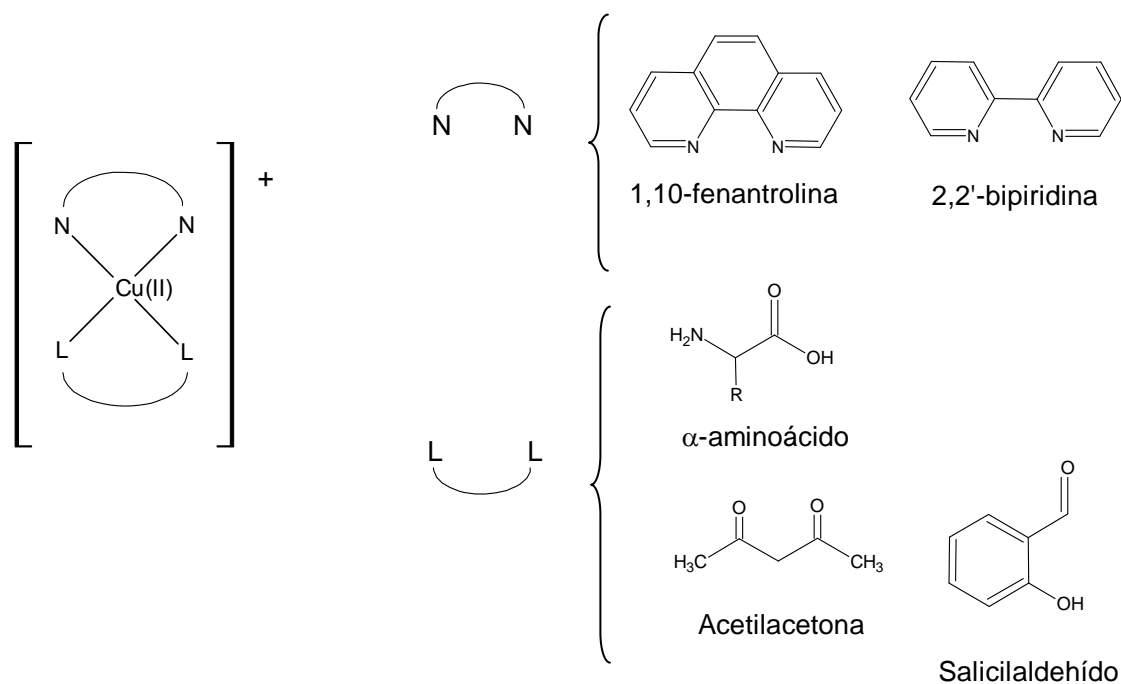
En México, según el Registro Histopatológico de Neoplasias en México, durante el año 2003, se registraron más de 110 mil nuevos casos de cáncer y más de 50 mil muertes por neoplasias diversas [154]. La OMS reporta a este grupo de enfermedades como responsables del 12.5% de las muertes en nuestro país durante el 2005, siendo la tercera causa de muerte a nivel nacional (Figura 9). Así mismo, asegura que el cáncer de cérvix es el de mayor incidencia en mujeres y el de próstata en hombres [152].



**Figura 9.** Principales causas de muerte en México, adaptada y traducida de *Cancer in your country*. WHOIB, 2008 [152].

Estas cifras de mortalidad obligan a identificar más y mejores opciones terapéuticas a través de la investigación básica y clínica. En nuestro país, el problema de la terapia contra el cáncer cobra aún

mayor importancia ya que la quimioterapia existente, como tratamiento primario o adyuvante, se desarrolla en el extranjero, lo cual inevitablemente incrementa su costo haciéndolo inaccesible para algunos sectores de la población con las consecuencias éticas que esto significa. Debido a esto, en la facultad de Química, UNAM, un grupo de investigadores encabezados por la Dra. Lena Ruíz Azuara ha sintetizado, caracterizado y patentado una serie de agentes antineoplásicos basados en quelatos mixtos de cobre (II) llamados Casiopeínas® [155-157] con fórmulas generales  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\alpha\text{-L-aminoácido})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ , donde el donador *N-N* es una diimina aromática sustituida (1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina) y el donador por oxígeno (*O-O*) es acetilacetato (*acac*) o salicilaldehidato (*salal*). (Figura 10).

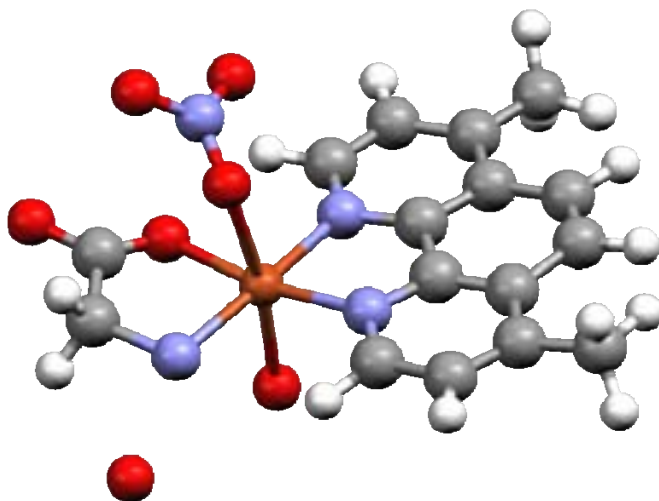


**Figura 10.** Estructura general de los complejos de cobre patentados como Casiopeínas®

Durante el diseño de estos complejos se consideró que el cobre es un metal de transición esencial que está involucrado en una amplia gama de procesos biológicos y, particularmente, interviene en reacciones de óxido-reducción en sistemas biológicos [2]. Debido a sus propiedades, el cobre y sus complejos tienen la habilidad de catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales pueden causar daño a través de la oxidación de los componentes celulares; la alteración del balance redox en la célula; y/o la interferencia con los mecanismos de señalización celulares relacionados con el estado redox [45, 110]. En cuanto a los ligandos que le acompañan, estos pueden mejorar las propiedades de transporte del cobre catiónico, promover el reconocimiento molecular o modificar las propiedades electrónicas del metal central. Las 1,10-fenantrolinas (*phen*) y 2,2'-bipiridinas (*bpy*) sustituidas son ligandos bidentados donadores por nitrógeno con gran

afinidad por el cobre [76-78]; el sistema de anillos aromáticos en su estructura les permite, en su forma libre o bien como complejos metálicos, unirse al ADN mediante interacciones intercalantes y no intercalantes [45, 79]. Por otra parte, los  $\alpha$ -L-aminoácidos fueron seleccionados como ligantes secundarios debido a su baja toxicidad y a su elevada afinidad por complejos Cu(II)- *bpy* o Cu(II)-*phen* [158, 159]. Finalmente los ligantes *salal* y *acac* tienen también buena afinidad por complejos (N-N)cobre (II) [158] y podrían modular las propiedades redox del centro metálico. Estas características de diseño, en conjunto, permiten que este tipo de complejos tenga la posibilidad de generar una reacción citotóxica [160, 161], la cual a menudo está relacionada con la actividad antitumoral [162, 163], a través de varios mecanismos posibles entre los cuales se proponen la generación de ROS [160, 163, 164], la interacción directa con el ADN a través de la intercalación [79, 165-169] o bien por sustitución del ligante secundario [79], e incluso toxicidad mitocondrial [162, 170, 171] debido a su comportamiento en cierta medida como iones lipofílicos.

Los datos químicos y estructurales reportados hasta el momento demuestran que en este tipo de complejos ternarios, el centro de cobre (II) puede presentar geometría octahédrica (**Figura 11**), cuadrada plana ó pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada con una molécula de disolvente, normalmente agua, en la posición apical [172-180]; siendo las dos últimas geometrías las más comunes.



**Figura 11.** Estructura cristalina de Casiopeína II-gly [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> [178]

Las consideraciones tomadas en su diseño condujeron al estudio de la actividad biológica de este tipo de complejos de cobre (II) en varios sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando como hipótesis de trabajo que la naturaleza, el número y la posición de los sustituyentes en los ligantes diimina, y también la modificación del ligante secundario ( $\alpha$ -L-aminoácido o O-O) tendrán efecto en la selectividad y/o en el grado de actividad biológica que estos compuestos presenten. Este



efecto puede deberse a la modificación de ciertas propiedades fisicoquímicas de los complejos como por ejemplo el comportamiento *redox* del centro metálico, la estabilidad de la unión de los ligantes secundarios o la liposolubilidad del complejo.

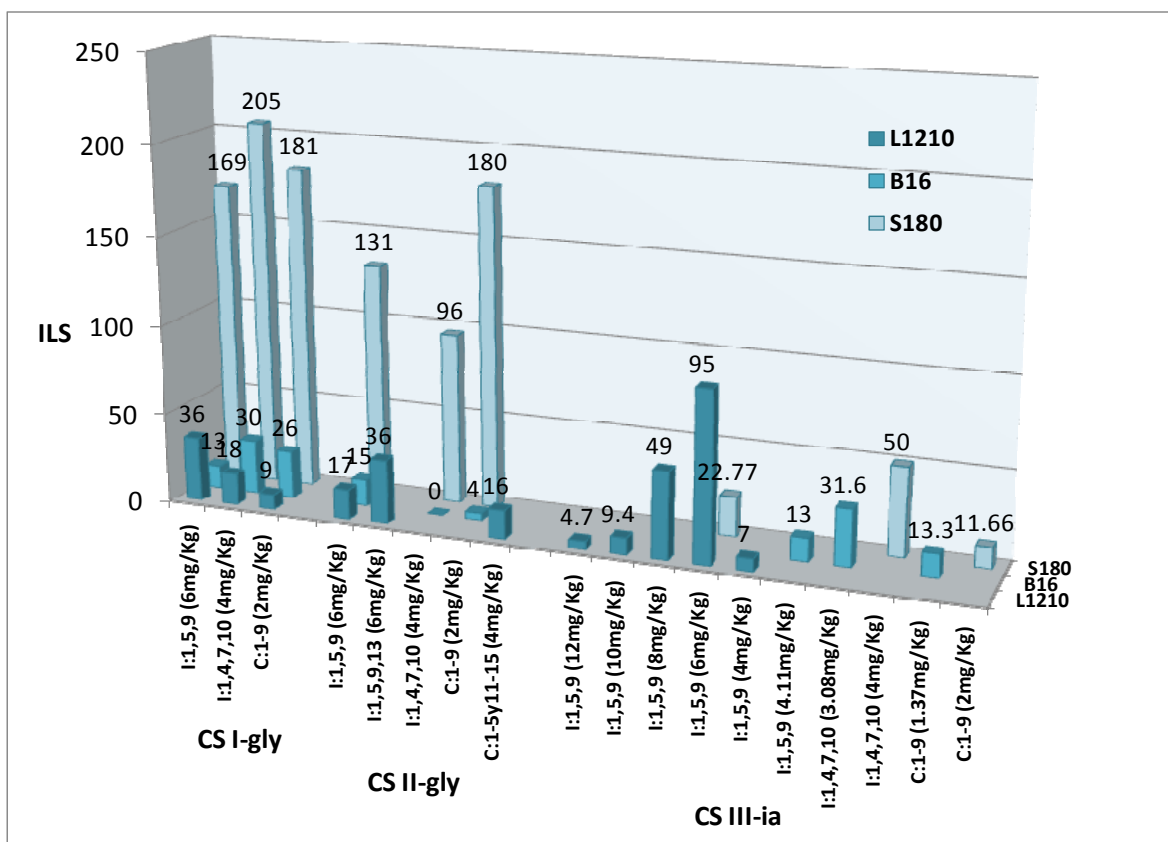
De acuerdo a su definición, este grupo de compuestos puede presentar una gran cantidad de variantes estructurales, ya que los ligantes diimina pueden tener diferentes sustituyentes en diferentes posiciones; así mismo, el cambio en el ligante secundario (O-O o  $\alpha$ -aa) o bien sustituciones en los donadores por oxígeno generan una amplia gama de posibilidades estructurales en esta matriz de compuestos, quienes desde luego, presentarán diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Es por esto que fue necesario generar en el grupo de trabajo una nomenclatura que permita agrupar los compuestos en familias de acuerdo a su estructura. Estas fueron denominadas con números romanos, los cuales indican el ligante diimina que permanece constante en la estructura de esa familia, seguido de la abreviatura correspondiente al ligante secundario según las convenciones de la IUPAC, esta última indica exactamente la identidad del complejo. La excepción a esta nomenclatura es la Familia III, la cual está compuesta por todos aquellos complejos que presenten en su estructura un donador por oxígeno-oxígeno, no importando cual sea la diimina; para esta familia, la letra posterior al número romano indica que tipo de donador por oxígeno es (**a** para *acac* y **s** para *salal*), y finalmente se agrega una letra más que indica la identidad del ligante diimina. (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Clasificación en familias según la nomenclatura del grupo de trabajo en Casiopeínas®. *Acac*: acetilacetato, *salal*: salicilaldehidato, *N-O*:  $\alpha$ -L-aminoacidato, *N-N*: diimina sustituida

Familia	Fórmula General
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína III-a	[Cu(N-N)(acac)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína III-s	[Cu(N-N)(salal)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína V	[Cu(5-R-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)]NO <sub>3</sub>

A partir de 1980 el grupo de trabajo comenzó los estudios encaminados a la evaluación de la actividad biológica *in vitro*, iniciando con la evaluación de la citotoxicidad en cultivo de bacterias, para posteriormente comprobar la actividad citostática sobre cultivo de linfocitos en 1988. A partir de esa fecha, varias Casiopeínas® han sido evaluadas en diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*, demostrado actividad citotóxica [161, 164], citostática [181], genotóxica [164, 181] y antitumoral [162, 163].

Esta última actividad biológica ha sido evaluada *in vivo* empleando el panel de cernimiento del *Cancer Chemotherapy National Service Center* perteneciente al *National Cancer Institute* de los Estados Unidos de América. Estos protocolos contemplan el uso de líneas tumorales murinas transplantables en cepas singénicas como: Leucemia L210, sarcoma S180, melanoma B16 (**Figura 12**). Por otra parte, algunos compuestos han sido evaluados también en glioma C6 de rata [163] y tumores xenotransplantados, entre ellos la línea de adenocarcinoma de colon HCT-15 [162]. En cada uno de estos estudios preclínicos, los resultados han sido alentadores y han revelado que la sustitución en las diiminas y el cambio de ligante secundario modifica la magnitud de la actividad biológica. Este mismo comportamiento se observa en la actividad antiproliferativa en líneas tumorales humanas reportada por varios autores [161, 182] y en la actividad genotóxica [164, 181].



**Figura 12.** Actividad antitumoral *in vivo* en modelos murinos de acuerdo al panel de cernimiento del *Cancer Chemotherapy National Service Center* perteneciente al *National Cancer Institute* en las líneas tumorales murinas Sarcoma 180(S180), Melanoma B16 (B16) y Leucemia L1210 (L1210). La actividad se encuentra reportada como índice de sobrevivencia (ILS) para los complejos evaluados [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> (CS I-gly), [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> (CS II-gly), y [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>. (CS III-ia). Recopilación de datos de las tesis: Bravo-Gómez, M.E.,1998 [183]; Gracia-Mora, I. 1999 [184]; Mayet-Cruz, M.L.,1991 [185]; Huerta, L; Tinoco-Méndez,M [186].





El mecanismo de acción aún no se ha elucidado satisfactoriamente, sin embargo, existe evidencia que apoya la capacidad de estos compuestos para inhibir la proliferación celular y producir muerte por apoptosis de una forma dependiente de la dosis mediante mecanismos que pueden o no involucrar la activación de caspasas [162, 163, 182, 187]. La apoptosis que se observa puede ser el resultado de una o varias señales que conducen a este efecto final; estas señales involucradas podrían estar mediadas por varios mecanismos, siendo tres los principales: la interacción directa con el ADN [79, 165], la toxicidad mitocondrial que estos compuestos provocan [162, 163, 170, 171, 182], y la generación de ROS [164]. Estos blancos celulares podrían jugar, de forma aislada o cooperativamente, un papel importante en la regulación de la muerte celular inducida por estos compuestos.

La toxicidad mitocondrial se considera hoy en día un posible blanco terapéutico y una estrategia más para tratar el cáncer [188]. La inhibición de la respiración mitocondrial y de la síntesis de ATP que se observa después de la administración de estos complejos de cobre, presenta un efecto dependiente de la dosis y es el resultado del daño en varios sitios mitocondriales que comprometen los procesos celulares que dependen de energía. La Casiopeína II-gly produce inhibición de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH) [171], la succinato deshidrogenasa (SDH) [171] y la piruvato deshidrogenasa (PDH) [170] mediante la interacción directa con los grupos sulfhidrilos de estas enzimas o con la coenzima A, interfiriendo de esta forma con las funciones mitocondriales [171]. Este compuesto, a dosis mayores de  $15 \text{ nmol (mg protein)}^{-1}$ , provoca el incremento en la respiración mitocondrial, el cual correlaciona con el hinchamiento de la mitocondria dependiente de la apertura de los canales de potasio (**Figura 13**), seguida de una fuerte inhibición y la consecuente liberación de citocromo *c* [171]. Esta última es una señal apoptótica que activa la caspasa 9 y el factor apoptótico activador de proteasa 1 (Apaf 1) [189]. Así mismo, las Casiopeínas inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células de meduloblastoma [182] y glioma C6 de rata [163]. Estos efectos en el metabolismo mitocondrial han llevado a pensar que los tumores de crecimiento rápido, cuyo metabolismo es predominantemente oxidante, podrían ser particularmente sensibles a la actividad de estos fármacos [190].

Algunos autores han reportado que la inhibición de la proliferación celular [160, 163, 164] y la degradación del ADN [163-165] ocurren de forma simultánea a la generación de ROS y que estos efectos se potencian en presencia de agentes reductores. Así mismo, se ha observado peroxidación de lípidos [163] y la disminución del glutatión reducido [160]. Lo cual sugiere que la oxidación del ADN u otros componentes celulares puede ser también la señal de estrés que desencadene por sí misma la muerte celular por apoptosis. A pesar de que el cobre normalmente participa en la generación de especies reactivas a través de la reacción de Fenton, no existe evidencia aún de que las Casiopeínas puedan participar en esta reacción *in vitro* o *in vivo* incrementando así el estrés oxidante. Sin embargo, el incremento de la citotoxicidad al agregar al medio de cultivo agentes reductores, así como el decremento de este efecto mediante la adición DMSO [160], el cual es un agente que secuestra al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) [191], llevan a pensar que esta reacción es probable.





Por otra parte, también existe la posibilidad de una interacción directa de los complejos con el ADN de forma intercalante y no intercalante debido al sistema aromático planar del ligante diimina [45, 79, 192]. En la literatura se reporta que la activación de la Poli(ADP-ribosa) polimerasa -1 (PARP-1), como resultado del daño al ADN, induce la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) y su translocación en el núcleo, dando como resultado la muerte celular independiente de caspasas [193]. Este último efecto podría explicar las observaciones en los estudios con glioma C6 de rata [163] y en la línea tumoral humana carcinoma de ovario CH1 [187] en donde la apoptosis ocurre por un mecanismo independiente de caspasas. Así mismo, estos compuestos han demostrado buena actividad biológica sobre la línea tumoral HCT-15 [162, 194], en la cual el p53 no está activo. Se sabe que las líneas celulares con p53 inactivo son resistentes a los fármacos que actúan a través de la mitocondria [195], razón por la cual se ha propuesto que la señal apoptótica provenga de p73 [162], ya que el daño al DNA inducido por algunos quimioterapéuticos potencia la función apoptótica de p73 [196].

Sin embargo, los blancos celulares podrían ser distintos a la mitocondria o el ADN ya que la administración *in vivo* de complejos de esta familia produce daño severo en eritrocitos, el cual se manifiesta como anemia hemolítica [197]; este efecto es similar al que produce el cobre por sí mismo [101, 105, 109]. Los eritrocitos carecen de los dos blancos celulares antes mencionados, mitocondria y ADN, por lo tanto, es razonable concluir que podrían existir también otros blancos celulares involucrados.

En resumen, a nivel molecular, la evidencia apunta hacia una compleja red de blancos biológicos, en cada uno de ellos, el daño podría estar mediado por diversos mecanismos, los cuales son activados de forma dependiente de la dosis, entretendiéndose de manera simultánea o bien cobrando importancia según el sistema en el que son evaluados y las condiciones empleadas.

Desde luego la citotoxicidad de este grupo de compuestos despierta la preocupación acerca de su selectividad hacia las células tumorales, razón por la cual se han realizado varios estudios comparativos empleando diferentes líneas celulares tanto normales como transformadas. La Casiopeína II-gly ha demostrado inhibir *in vitro* la proliferación celular de líneas tumorales como HeLa y hepatoma AS-30D, sin afectar la viabilidad o proliferación de líneas no tumorales como los linfocitos [190, 198]. En contraste, otros efectos como la inhibición de la respiración celular y la pérdida del potencial mitocondrial son similares en células de hígado, riñón y AS-30D empleando concentraciones *in vitro* de 1-10 nmol (mg proteína)<sup>-1</sup> [171], lo que lleva a pensar que podrían existir reacciones adversas resultado de la administración de este compuesto *in vivo*. Es importante mencionar en este punto que la efectividad de estos compuestos como antitumorales es el resultado de sus efectos tóxicos en varios niveles celulares y no sólo como consecuencia de la toxicidad mitocondrial.

Con respecto a la toxicidad *in vivo*, se ha observado durante las evaluaciones de actividad antitumoral que a la dosis de 3.0 mg/kg (6.74 µmol/kg) y 6.0 mg/kg (13.5 µmol/kg) q.d. 4 x 6 (cada día 4 por 6 dosis) vía intraperitoneal, la Casiopeína III-la produce adhesiones e inflamación en la superficie peritoneal de ratones nu/nu, siendo este último efecto producto de la irritación crónica

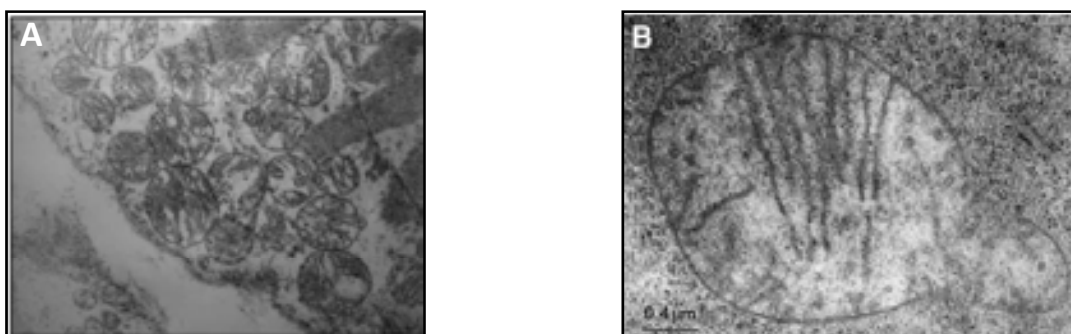


[162]. Por otra parte, en ratas Wistar, la administración de Casiopeína II-gly por vía intravenosa provoca anemia hemolítica, caracterizada por la disminución de la concentración de hemoglobina y glóbulos rojos que se acompaña de una marcada leucocitosis neutrofílica y cambios morfológicos en el bazo. Estos efectos son dependientes de la dosis administrada, y reversibles a los 15 días cuando se emplea una dosis única de 5 mg/Kg. El tipo de daño generado es compatible con la generación de radicales libres y daño oxidante en la membrana y en el interior de las células [197]. Los efectos hematotóxicos producidos por Casiopeína II-gly son similares a los que se producen por toxicidad asociada a cobre [199-201].

Estos compuestos producen como principales efectos adversos, toxicidad respiratoria y cardiovascular en diferentes especies. Los ensayos en roedores para evaluar la toxicidad aguda de estos compuestos muestran que la toxicidad está directamente vinculada con la velocidad de infusión a la cual el compuesto es administrado por vía intravenosa [202]. Por otra parte, en estudios *in vitro* en corazón de rata aislado se encontró que estos compuestos disminuyen el gasto cardíaco y el consumo de oxígeno a las concentraciones de 4 y 4.6  $\mu\text{M}$  para Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia, respectivamente. Este efecto se atribuye a la fuerte inhibición que estos compuestos tienen sobre el metabolismo energético [170, 171] como resultado de la inhibición de la piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa y creatina cinasa, enzimas involucradas en la generación de la energía necesaria para el funcionamiento cardíaco. En este mismo estudio, la administración femoral *in vivo* de Casiopeína II-gly en una dosis de 1  $\mu\text{M}$  demostró que este compuesto es inocuo en este modelo probablemente debido a su fuerte unión con la albúmina sérica. Este efecto cardiotoxico *in vivo* es mucho menor al del fármaco control adriamicina, el cual es un antineoplásico empleado en la clínica que presenta un efecto cardiotoxico potente [170]. En estudios de toxicidad aguda en perros, después de la administración intravenosa de dosis muy superiores ( $\text{DL}_{99}$ ), 200  $\text{mg}/\text{m}^2$  (10  $\text{mg}/\text{Kg}$ ) para Casiopeína III-ia y 160  $\text{mg}/\text{m}^2$  (8  $\text{mg}/\text{Kg}$ ) para Casiopeína II-gly, se observa que ambos compuestos producen taquipnea y disminución de la presión arterial, taquicardia seguida de bradicardia y finalmente paro cardíaco alrededor de 25 minutos posteriores a la administración, acompañado de edema pulmonar cuyo origen probablemente sea mixto, causado por una parte por toxicidad directa sobre los capilares pulmonares, y por otra, debido a la cardiotoxicidad que este compuesto tiene [203]. El análisis por microscopía electrónica reveló la desorganización de las microfibras musculares en el corazón y la pérdida de las crestas mitocondriales en células cardíacas (**Figura 13A**) [203]; este último efecto *in vivo* sobre las mitocondrias se ha observado también en células HCT-15 *in vitro* (**Figura 13B**) [162].

En cuanto a la toxicidad reproductiva, la evidencia indica que la Casiopeína III-ia produce infertilidad sin afectar el proceso de implantación. Este compuesto provoca la disminución tanto en la cantidad como en la motilidad de los espermatozoides desde dosis de 1.75  $\text{mg}/\text{Kg}$ , y anomalías espermáticas en ratones machos CD-1 a partir de una dosis de 3.5  $\text{mg}/\text{Kg}$  administrada crónicamente durante 60 días. La Casiopeína III-ia induce alteraciones esqueléticas y osificación tardía en la descendencia de los machos tratados, posiblemente como resultado de

alteraciones tiroideas o paratiroides. El aumento en la frecuencia de reabsorciones tempranas y tardías con dosis de 1.75 mg/Kg indica la presencia de mutaciones letales dominantes. Los efectos reprotóxicos de la Casiopeína III-ia presentan una relación dosis-respuesta [204]. Por otra parte, la Casiopeína II-gly produce disminución significativa en el promedio de los sitios de implantación, incremento en el número de reabsorciones y una disminución del 50% en el número de fetos por camada en ratones CD-1 a una dosis de 4.4 mg/Kg. Así mismo, Casiopeína II-gly produce efectos teratogénicos principalmente en las extremidades, siendo micromelia, extremidades mal rotadas y extremidades hiperextendidas los efectos que más frecuentemente se presentan desde dosis de 2.2 mg/Kg. Los machos son más susceptibles a los daños por Casiopeína II-gly que las hembras [205].



**Figura 13.** Microscopía electrónica: A. pérdida de las crestas mitocondriales en células cardiacas después de la administración in vivo a perros de la DL<sub>99</sub> de Casiopeína III-ia (10 mg/Kg), tomada de Leal-García, M. 2007 [203]; B. pérdida de las crestas mitocondriales en células HCT-15 administradas in vitro con una dosis de 2.5 µg/mL de Casiopeína III-ia, tomada de Carvalho-Chaigneau, F. 2008 [162].

## 5. Estudios QSAR.

Por generaciones el objetivo de los científicos ha sido crear moléculas con propiedades específicas. Sin embargo, debido a la combinación de serendipia y empirismo como base del descubrimiento de nuevos fármacos, encontrar nuevas moléculas con actividad biológica ha sido un proceso extremadamente desafiante. La decisión de cuales compuestos sintetizar mediante prueba y error, y su evaluación biológica de forma aleatoria, han probado a lo largo de la historia ser un método inefectivo que consume grandes cantidades de tiempo y recursos.

Los estudios de correlación estructura química-actividad biológica (QSAR) se han aplicado por décadas en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que presentan numerosas ventajas frente a los métodos tradicionales y pueden apoyarse en los avances que actualmente existen para la dilucidación de la estructura molecular o en recursos computacionales. Todos los análisis QSAR están basados en la hipótesis de que las contribuciones de diferentes propiedades estructurales o



características de un compuesto a su actividad biológica son aditivas, siempre que no existan dependencias no lineares de transporte o unión con ciertas propiedades fisicoquímicas.

**Tabla 5.** Descriptores más empleados en los estudios QSAR. Tomada de Grover et al., 2000 [206].

<p><b>Solubilidad</b> Solubilidad Molar (S) Solubilidad en fracción molar (X) Coeficientes de actividad (<math>\text{Log } \gamma_w</math>) Parámetros de solubilidad Hildebrand (<math>\delta_H</math>)</p> <p><b>Lipofílicos</b> Log Po/w Log D Rm (TLC) Log k', Log K<sub>w</sub> (RPLC) Constante de Hansch (<math>\pi</math>) Constante de Rekker (f)</p> <p><b>Electrónicos</b> Constante de ionización (pKa) Constante de Hammett (<math>\delta</math>) Constante polar de Taft (<math>\delta^*</math>) Componentes inductivos y de resonancia de Taft (<math>\delta_1, \delta_R</math>) Momento dipolar Parámetros de puente de hidrógeno.</p> <p><b>Estéricos</b> Parámetro estérico de Taft (Es) Refractividad molar (MR) Parachor Parámetro estérico de Charton (<math>\nu</math>) Parámetro de van der Waal's</p> <p><b>Constitucionales</b> Número total de átomos Número de tipos de átomos individuales Número total de enlaces Número de tipos individuales de enlaces Número de anillos Peso molecular Peso atómico promedio</p>	<p><b>Topológicos</b> Índice de Wiener (W) Índices de Randic Índices de conectividad de Kier y Hall Índice de forma de Kier Índice de flexibilidad de Kier Índice de Balaban (J) Índice de información de contenido (IC) Índices de forma Kappa Complejidad Topológica Índice de conectividad excéntrico Índice Detour</p> <p><b>Geométricos</b> Principio de momento de inercia Volumen molecular Área superficial molecular Área superficial accesible al disolvente Índice de gravitación</p> <p><b>Electrostáticos</b> Cargas parciales máximas y mínimas en la molécula Parámetros de polaridad Descriptores de área superficial de cargas parciales (CPSA)</p> <p><b>Química cuántica</b> Distribución de carga y descriptores relacionados Energías HOMO-LUMO Densidades de orbitales Superdeslocalización Polarizabilidad átomo-átomo Polarizabilidad molecular Energías cuánticas moleculares</p> <p><b>Misceláneos</b> Desplazamientos químicos: <math>^1\text{H}</math>, <math>^{13}\text{C}</math> (<math>\delta\text{ppm}</math>) Frecuencias de IR (V) Tensión superficial</p>
---	--



En principio, la estructura de un compuesto, encierra toda la información que predetermina las propiedades fisicoquímicas, químicas, y por tanto, biológicas de ese compuesto. En 1868 Crum-Brown y Fraser [207] propusieron por primera vez que la actividad fisiológica de un compuesto depende de su “constitución”, planteando esta hipótesis en términos matemáticos según la **Ecuación 1**. Algunas décadas después, Richet [208], Meyer [209], y Overton [210], de forma independiente encontraron relaciones lineales entre la lipofilicidad, expresada como solubilidad o coeficiente de reparto aceite-agua, y efectos biológicos, como toxicidad y actividad narcótica. Posteriormente Hammet [211] proporcionó los fundamentos para la comprensión de los efectos que tienen los cambios electrónicos en la estructura sobre un mecanismo de reacción. En 1956 Taft [212] completó el modelo de Hammett permitiendo la descripción por separado de las propiedades electrónicas y estéricas de los sustituyentes en los compuestos alifáticos. Sin embargo, el verdadero progreso en el cálculo de relaciones estructura-actividad (SAR) se dio durante la década de los sesentas con la publicación de forma independiente de los métodos propuestos por Free-Wilson [213] y Hansch [214] en 1964; ambos trabajos marcan el inicio del desarrollo del QSAR. Desde entonces, las ecuaciones QSAR se han empleado exitosamente para describir miles de actividades biológicas en diferentes series de fármacos y candidatos con actividad biológica. El norfloxacin, un antibiótico de amplio espectro, representa un ejemplo de un producto descubierto a través del análisis QSAR que actualmente está en el mercado [215].

$$\Phi = f(\text{constitución})$$

(Ec. 1)

**Tabla 6.** Propiedades fisicoquímicas y biológicas más empleadas en los estudios QSAR. Tomada de Grover et al., 2000 [206].

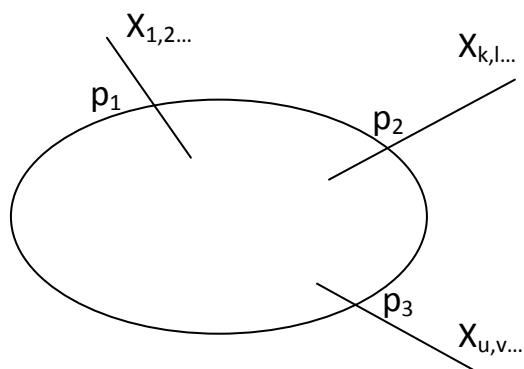
<b>Fisicoquímicas</b>	<b>Biológicas</b>
Propiedades organolépticas	Actividad
Punto de ebullición	Dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> )
Constantes de disociación	Perfil alquilante (con ADN)
Viscosidad	Bioconcentración
Punto de fusión	Biodegradación
Volumen molar	Carcinogenicidad
Coefficiente de difusión	Toxicidad crónica
Coefficiente de reparto octanol-agua ó aire-agua	Constante de inhibición
Reactividad	Perfil metabólico
Características de liberación	Constante de Michaelis
Solubilidad	Mutagenicidad
Estabilidad	Penetración a través de la piel
Transportabilidad	Farmacocinética
Presión de Vapor	Unión al receptor
Tiempo de retención cromatográfica y factores de respuesta.	

Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) correlacionan, dentro de una serie de análogos, afinidades de los ligantes a sus sitios de unión, constantes de inhibición, constantes de velocidad y otras actividades biológicas, ya sea con ciertas características estructurales (Free-Wilson análisis) o con propiedades atómicas o moleculares como lipofilicidad, polarizabilidad, propiedades electrónicas y estéricas (Hansch análisis). Las **Tabla 5** y **Tabla 6** muestran algunos de los descriptores y propiedades más empleados en el análisis QSAR [206].

### 5.1 Free Wilson análisis

En 1964, Free y Wilson propusieron un modelo matemático que describe la presencia o ausencia de ciertas características estructurales, por ejemplo, los grupos que son modificados químicamente. A estas características estructurales se les otorga valores de 1 ó cero y se correlaciona la matriz estructural resultante con los valores de actividad biológica según la **Ecuación 2** [213, 216]. Donde, los valores  $a_i$  representan la actividad biológica del grupo de contribuciones de los sustituyentes  $X_1, X_2, \dots, X_i$  en las diferentes posiciones  $p$  del compuesto 1 (**Figura 14**) y  $\mu$  es el valor de la actividad biológica del compuesto de referencia, normalmente el compuesto líder sin sustituyentes. La ventaja más importante de este método es que sólo se requiere conocer la estructura de los compuestos y la actividad biológica para generar un modelo QSAR. Por el contrario, este método presenta como desventajas que al menos dos posiciones diferentes de sustitución deben ser químicamente modificadas, las predicciones sólo pueden hacerse para las combinaciones nuevas de los sustituyentes previamente incluidos en el análisis, se requieren muchos grados de libertad para describir a cada sustituyente y los casos en donde una característica estructural ocurre una sola vez en todo el set de datos obscurecen los resultados estadísticos del modelo [216, 217].

$$\text{Log } 1/C = \sum a_i + \mu \quad (\text{Ec. 2})$$



**Figura 14.** Representación esquemática de una molécula para el análisis de Free Wilson. Los sustituyentes  $X_i$  se presentan en diferentes posiciones  $p$  sobre un esqueleto estructural común. La presencia de los sustituyentes en las posiciones  $p$  es codificada con los valores 1 o cero, respectivamente. Tomada de Kubinyi, H. 1997 [218]



## 5.2 Analisis de Hansch

Este análisis, también publicado en 1964, es conocido como “enfoque extratermodinámico” debido a que correlaciona un efecto biológico con propiedades fisicoquímicas que están relacionadas con la energía libre como constantes de equilibrio por ejemplo. Este modelo está basado en la **Ecuación 3**, donde  $P$  = coeficiente de reparto n-octanol/agua,  $s$  = parámetro electrónico de Hammett,  $a, b, c$  = coeficientes de regresión,  $k$  = constante [214, 216, 217].

$$\text{Log } 1/C = a (\text{Log } P)^2 + b \text{ Log } P + c \sigma + \dots + k \quad (\text{Ec. 3})$$

Esta ecuación fue desarrollada a partir del concepto de que el transporte de un fármaco desde el sitio de aplicación hasta su sitio de acción depende de una forma no lineal de la lipofilidad del fármaco; y que la constante de afinidad a su contraparte biológica, como una enzima o receptor, depende de la lipofilidad, las propiedades electrónicas y de otras propiedades relacionadas con la energía libre (LFER). La **Ecuación 3** combina la descripción de los dos procesos en un modelo matemático. Además de la introducción de un término parabólico para la dependencia no lineal de la lipofilidad y la combinación de diferentes propiedades fisicoquímicas en una ecuación, Hansch y Fujita definen el parámetro  $\pi$  como la lipofilidad del sustituyente X (**Ecuación 4**) [214, 217], de la misma forma que Hammet definió antes el parámetro electrónico  $\sigma$  (**Ecuación 5**) [211]. En la **Ecuación 4** el coeficiente de reparto  $P$  es una constante de equilibrio, similar a la constante de disociación o las constantes de reacción  $K$  en la **Ecuación 5**. Con la ayuda de estas definiciones se hace posible usar valores tabulados obtenidos de la literatura en lugar de valores experimentales.

$$\pi_X = \log P_{RX} - \log P_{RH} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\rho\sigma = \log K_{RX} - \log K_{RH} \quad (\text{Ec. 5})$$

El análisis de Hansch supera al análisis de Free-Wilson, ya que sólo se requieren pocas propiedades para correlacionar la actividad biológica y el modelo puede ser interpretado directamente en términos fisicoquímicos. Así mismo, a diferencia del análisis de Free-Wilson, se pueden hacer predicciones de compuestos con sustituyentes diferentes a los analizados en el modelo. Sin embargo, si la naturaleza de los sustituyentes no evaluados difiere mucho de aquellos analizados por el modelo, es probable que las predicciones fallen; para evitarlo, es necesario evaluar un grupo más heterogéneo de sustituyentes.

La aplicación adecuada de este método requiere partir de una hipótesis de trabajo. Así mismo, es recomendable evaluar en la correlación varios parámetros fisicoquímicos que sean





independientes, solos o en conjunto, hasta hallar el modelo que mejor describa los datos. Se recomienda incluir de 4 a 5 datos por cada variable que se incluya en el análisis. Finalmente, el modelo aceptado debe ser el más sencillo y todas las variables incluidas deben estar estadísticamente validadas [217, 219].

En algunas ocasiones, ninguno de los dos modelos permite una descripción adecuada de la actividad biológica, en esos casos es posible emplear la combinación de ambos modelos en uno solo. Este método se conoce como “enfoque mixto” [216, 217]. La **Ecuación 6** combina las ventajas de los análisis de Hansch y Free-Wilson ampliando de esta forma la aplicabilidad de ambos métodos [220]. Los parámetros fisicoquímicos describen partes de la molécula con una amplia gama de variaciones, mientras las variables indicadoras  $a_i$  (variables tipo Free-Wilson) codifican los efectos de las variaciones estructurales que no pueden describirse de otra forma.

$$\text{Log } 1/C = a (\log P)^2 + b \log P + c\sigma + \dots + \sum a_i + k \quad (\text{Ec. 6})$$

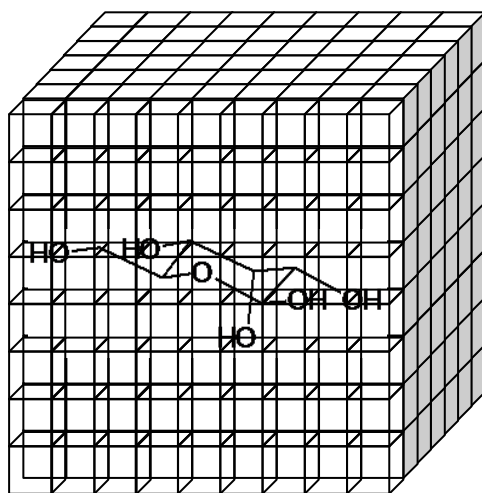
Cualquiera que sea el modelo QSAR empleado para describir la actividad biológica, el ajuste de una ecuación QSAR dependerá de la calidad de los datos biológicos, la habilidad del modelo para describir la realidad y la relevancia de los parámetros (variables independientes) para que el proceso pueda ser modelado [217].

### 5.3 Métodos QSAR 3D

En 1979, se propuso un nuevo enfoque en 3D para describir las propiedades moleculares por campos, calculándolas a partir de la interacción de las moléculas con una red regular tridimensional [221]. De estos campos se extraen vectores empleando el análisis de componentes principales y se correlacionan con la actividad biológica. A este método se le llamó más tarde enfoque DYLOMMS (dynamic lattice-oriented molecular modeling system - sistema de modelaje molecular de retícula dinámica orientada) y se comenzó a emplear ampliamente a partir de 1988 [221, 222], cuando el análisis por mínimos cuadrados (PLS) se empleó para correlacionar los valores del campo con las actividades biológicas. El método, ahora conocido como análisis comparativo de campo molecular (CoMFA), se emplea especialmente para obtener modelos cuantitativos de constantes de inhibición enzimática y otras propiedades de unión particularmente cuando se conoce la estructura tridimensional de la enzima [219, 223]. En este método, el grupo de compuestos seleccionado debe estar químicamente relacionado y debe actuar a través del mismo mecanismo de acción; sin embargo, en contraste con los métodos QSAR clásicos, es requisito indispensable que el grupo de análogos tenga un farmacóforo común y no necesariamente el mismo esqueleto molecular [218]. Debido a que el farmacóforo se refiere a una estructura tridimensional, este método requiere como primer paso de la optimización energética de cada una de las estructuras para posteriormente superponerlas e introducir las en una retícula regular para calcular diferentes campos moleculares en cada punto de la rejilla; la distancia de elección entre los puntos de la rejilla es de  $2 \text{ \AA}$  (**Figura 15**). Las interacciones energéticas en cada punto de la rejilla se determinan empleando átomos o grupos de átomos, por ejemplo, átomos de carbono neutro para calcular interacciones de van der Waals, átomos cargados para interacciones



Coulómbicas, o donadores y aceptores de puentes de hidrógeno para interacciones de puentes de hidrógeno. Finalmente estas interacciones se correlacionan con la actividad biológica a través de PLS.



**Figura 15.** En un estudio de análisis comparativo de campo molecular (CoMFA) todas las moléculas de una serie de compuestos relacionados se sobreponen de acuerdo a su farmacóforo en común. Posteriormente se embeben dentro de una caja con una red regular que descansa sobre las moléculas. Para mejorar la visualización en este ejemplo, la caja es más pequeña de lo usual, sólo las líneas externas de la rejilla están indicadas, y sólo se muestra una molécula en vez de todos los análogos. Adaptada de Kubinyi, H. 1997 [218]

Uno de los pasos más críticos en un estudio CoMFA es la alineación de los análogos según su farmacóforo en común, ya que los resultados pueden variar radicalmente con pequeños cambios en la orientación de la molécula, de la caja o de los puntos de la rejilla en los cuales los campos se calculan. En muchos casos, para moléculas que no son parte de una serie de análogos con un gran número de enlaces que pueden rotar, llegar a la alineación correcta es muy difícil e incluso en ocasiones imposible. Teóricamente, este problema limita las aplicaciones de los estudios CoMFA, sin embargo, algunas investigaciones han proporcionado evidencia acerca de la apropiada descripción de las afinidades de las moléculas a pesar de que las geometrías estudiadas sean diferentes a su correcta conformación bioactiva. Por otra parte, para evitar estos problemas se han desarrollado métodos que no dependen de la alineación común de las moléculas [224, 225].

#### 5.4 Técnicas de correlación para el desarrollo de estudios QSAR.

En cualquier estudio QSAR, la propiedad de interés se correlaciona con varios descriptores, esto se logra con la ayuda de las técnicas estadísticas de multivariadas; sin embargo, también se pueden emplear algunas técnicas no estadísticas como las mencionadas en la **Tabla 7**. Debido a su importancia en la metodología del presente trabajo destacaremos tres de ellas: El análisis de regresión lineal múltiple, el análisis de Free-Wilson, y el análisis de mínimos cuadrados.



**Tabla 7.** Técnicas estadísticas y no-estadísticas empleadas en los estudios QSAR. Adaptada de Grover et al., 2000 [206].

<b>Análisis de regresión lineal múltiple (RLM)</b>
<b>Análisis de Free-Wilson</b>
<b>Análisis por “agrupaciones” (cluster)</b>
<b>Reconocimiento de patrones</b>
<b>Análisis de Factores</b>
<b>Análisis discriminante</b>
<b>Análisis de componentes principales (PCA)</b>
<b>Análisis de mínimos cuadrados (PLS)</b>
<b>Redes neuronales artificiales (ANN)</b>
<b>Algoritmos evolutivos</b>

Entre las técnicas estadísticas de multivariadas, el análisis de regresión lineal múltiple (RLM) es el más empleado en los estudios QSAR. A este análisis se le conoce también como el modelo LFER (linear free energy relationships) debido a que es el análisis estadístico que se emplea para el análisis de Hansch. Esta técnica cuantitativa identifica la dependencia de una propiedad del fármaco con alguno o todos los descriptores bajo investigación. La validez de la ecuación y la importancia relativa de los diferentes criterios empleados se juzgan a través de los valores del coeficiente de correlación múltiple (R), el cociente de Fisher (F), el valor de la t de Student (t) y la desviación estándar (s). La posibilidad de correlaciones al azar se mantiene en un nivel bajo restringiendo el número de variables independientes con respecto al número total de datos, ya que el riesgo de obtener este tipo de correlaciones aumenta con el incremento del número de variables consideradas en el modelo. Estos aspectos fueron discutidos ampliamente por Topliss y colaboradores [226]. Debido a esto, es necesario un método de validación para evaluar los modelos. El método más común es el llamado “dejar uno afuera” (leave one out (LOO)), la significancia de la correlación se evalúa a través de el coeficiente de validación cruzada ( $R^2$  o  $Q^2$ ). Otro método es dividir el grupo de compuestos en dos subgrupos, un subgrupo del cual será derivado el modelo y un segundo subgrupo de evaluación para el cual se predicen las actividades biológicas a partir del modelo. Sin embargo, esto sólo se puede realizar cuando se cuenta con grupos de compuestos relativamente grandes, y sólo si las variaciones estructurales en ambos subgrupos son comparables. Hansch recomienda la validación lateral de los resultados del QSAR, en donde se comparan modelos obtenidos para series de compuestos cercanamente relacionados en un sistema biológico de prueba, o bien, se comparan modelos QSAR derivados para una sola serie de compuestos en varios modelos biológicos de prueba relacionados, por ejemplo serina-proteasas y cisteína-proteasas [227].

Desde luego, otro modelo estadístico muy empleado es el ya mencionado análisis de Free-Wilson o modelo *de novo*, el cual está basado en la suposición de que los sustituyentes contribuyen de forma aditiva a una propiedad medible [213]. Este concepto de adición implica que la contribución



a la actividad que tiene la molécula líder y cada sustituyente es constante. El modelo por tanto puede expresarse como un conjunto de funciones lineales de contribuciones desconocidas de los sustituyentes y una contribución grupal constante. Este método se aplica fácilmente y se emplea para encontrar la significancia de la contribución de un sustituyente a una propiedad medible. El método tiene algunas desventajas, la primera es que se encuentra limitada a las relaciones aditivas, y la segunda es que deben existir variaciones estructurales en al menos dos posiciones diferentes para evitar errores. Algunas modificaciones a este método son el modelo Cammarata, el modelo Fujita-Ban y el método Free-Wilson modificado [228, 229]. También existe la combinación del análisis de Free-Wilson y el análisis de regresión lineal múltiple en el ya mencionado “enfoque mixto”, lo cual amplía la aplicabilidad del modelo LFER y el método *de novo* [220].

Finalmente, otro método muy empleado es el análisis de mínimos cuadrados (PLS), el cual ofrece mejores oportunidades que RLM para la correlación de un gran número de variables con la actividad biológica de un número limitado de compuestos. PLS es un enfoque popular para el desarrollo de modelos predictivos y es un método alternativo para la selección de variables a usar en los modelos, especialmente cuando existen muchas variables altamente intercorrelacionadas (colinealidad) [217, 230]. Por otra parte, PLS es el análisis estadístico que normalmente se emplea para los estudios CoMFA [221, 222].

### 5.5 Contribuciones del QSAR al diseño de fármacos.

Las contribuciones de los estudios QSAR al diseño de fármacos son muchas; existen numerosos casos de compuestos bioactivos que se han identificado ó diseñado a través de estas técnicas y que han llegado a comercializarse exitosamente principalmente en las áreas de agricultura y medicina [231]. El Norfloxacinó, un antibacterial de amplio espectro, representa un ejemplo muy exitoso de un producto comercializado actualmente, descubierto a través del análisis QSAR [215, 232].

Los estudios QSAR deben ser considerados como una herramienta para derivar una hipótesis, la cual debe ser comprobada mediante la síntesis de los compuestos señalados por el estudio y su evaluación biológica [217]. El objetivo principal es siempre la comprensión de la relación existente entre la estructura del compuesto bioactivo y su actividad biológica; sin embargo, la obtención de predicciones es un medio para diseñar nuevos análogos que permitan la optimización y el refinamiento de la actividad biológica o de las propiedades útiles de un grupo determinado de compuestos. Por otra parte, existen otras ventajas que resultan del empleo de estos estudios, entre ellas se encuentran la reducción de los animales de experimentación y el diagnóstico del mecanismo de acción [217].



En la investigación médica existe el dilema constante de garantizar la seguridad del fármaco y evitar el empleo de animales de experimentación, ya que para evitar efectos desastrosos debido a su uso en humanos es necesaria la evaluación exhaustiva de la toxicidad en animales. Sin embargo, resulta muy deseable la reducción al mínimo, e incluso el remplazo, de los animales empleados en la investigación. En este sentido, los ensayos *in vitro* en conjunto con los modelos matemáticos como el QSAR se presentan como alternativas viables, ya que reducen el número de fármacos a evaluar mediante un diseño inteligente de análogos para mejorar la actividad [217], y por otra parte pueden ser empleados para predecir la toxicidad [233-237].

Otra gran ventaja de los estudios QSAR es que los modelos matemáticos se pueden interpretar directa o indirectamente en términos fisicoquímicos o de características estructurales, y de esta forma pueden apoyar o rechazar hipótesis acerca del mecanismo de acción, esclareciendo el comportamiento de una molécula al nivel del receptor [217, 238] o bien delineando las propiedades necesarias para el transporte del fármaco hasta el sitio de acción [217].

A pesar de las dificultades en la adecuada aplicación del QSAR [215], existen en la literatura muchos ejemplos bien documentados en donde esta técnica ha probado ser una valiosa herramienta para dirigir la optimización de la actividad biológica [217, 224, 225, 231] y, desde luego, toda esta reducción de los esfuerzos de investigación se traduce también en la reducción del tiempo y costos invertidos en la misma.

Con base en lo anterior, se consideró necesario realizar un estudio QSAR para la familia de compuestos de cobre (II) patentados como CASIOPEÍNAS<sup>®</sup>, con el objetivo de identificar las características fisicoquímicas y estructurales que regulan la actividad biológica. La comprensión de esta relación permitirá comprender y apoyar los mecanismos de acción propuestos, guiar las evaluaciones biológicas hacia los compuestos más activos y más seguros, y realizar un rediseño racional de estos compuestos optimizando en todo momento recursos de investigación. El presente trabajo muestra los resultados de un estudio QSAR para las series de compuestos [Cu(N-N)(*acac*)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(*gly*)]NO<sub>3</sub> con diferentes sustituyentes en el ligante diimina.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Se sabe que los compuestos de coordinación de la familia Casiopeínas® presentan actividad tóxica *in vivo* y antiproliferativa *in vitro* en diferentes grados, entonces, las series de análogos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$  presentarán una correlación entre el valor de dichas actividades y sus propiedades fisicoquímicas en función de los sustituyentes periféricos en el ligante diimina y la naturaleza del ligante secundario.

### OBJETIVOS

#### Objetivo General

Analizar la relación existente entre la estructura química de las series de análogos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$  y su actividad tóxica *in vivo* y antiproliferativa *in vitro*.

#### Objetivos Particulares

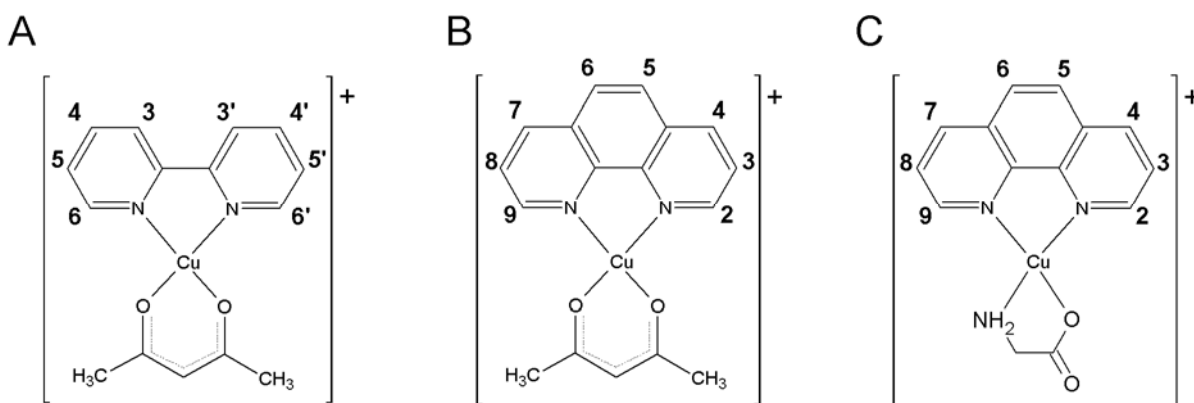
1. Sintetizar 12 compuestos de coordinación del tipo  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$
2. Caracterizar por espectroscopía UV, IR ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ), análisis elemental, termogravimetría, conductimetría y momento magnético a 12 compuestos de coordinación del tipo  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$
3. Implementar un método adecuado para la determinación del coeficiente de distribución Octanol- $\text{H}_2\text{O}$  (Log D).
4. Determinar los coeficientes de distribución (Log D) de 12 compuestos de coordinación del tipo  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$
5. Implementar un método adecuado para la obtención experimental del potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ).
6. Determinar  $E_{1/2}$  para 12 compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  por el método implementado (Voltamperometría cíclica)
7. Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de 12 compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  en las líneas tumorales humanas SiHa y HeLa.
8. Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de 12 compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  y 9 compuestos  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$  en las líneas tumorales humanas MCF-7 y HCT-15.
9. Evaluar la toxicidad aguda *in vivo* ( $\text{DL}_{50}$ ) en ratones ICR de 12 compuestos de coordinación del tipo  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$
10. Analizar la relación estructura química-actividad biológica (tóxica y citostática)

## METODOLOGÍA

### 1. Diseño experimental

La familia de compuestos Casiopeínas® ha sido estudiada en varios modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo sus dos representantes más estudiados el complejo [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> ó Casiopeína III-ia, y el complejo [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> ó Casiopeína II-gly. Ambos complejos han demostrado diferentes grados de actividad citotóxica [160, 161, 164, 165, 197], proapoptótica [162, 163, 187] y antitumoral [162, 163]. Esta diferencia es atribuible desde luego a las variaciones estructurales entre ambos compuestos, las cuales se pueden resumir de la siguiente forma: 1. no comparten la misma diimina; 2. el ligante secundario en la Casiopeína III-ia es un donador por oxígeno y forma un anillo de 6 miembros con el centro metálico, mientras que en la Casiopeína II-gly es un donador por oxígeno y nitrógeno y forma un anillo de 5 miembros; y 3. El ligante secundario en la Casiopeína III-ia es simétrico mientras que en la Casiopeína II-gly es asimétrico. Todas estas variaciones traen como consecuencia diferencias en propiedades fisicoquímicas que se ven reflejadas en esa diferencia de actividad.

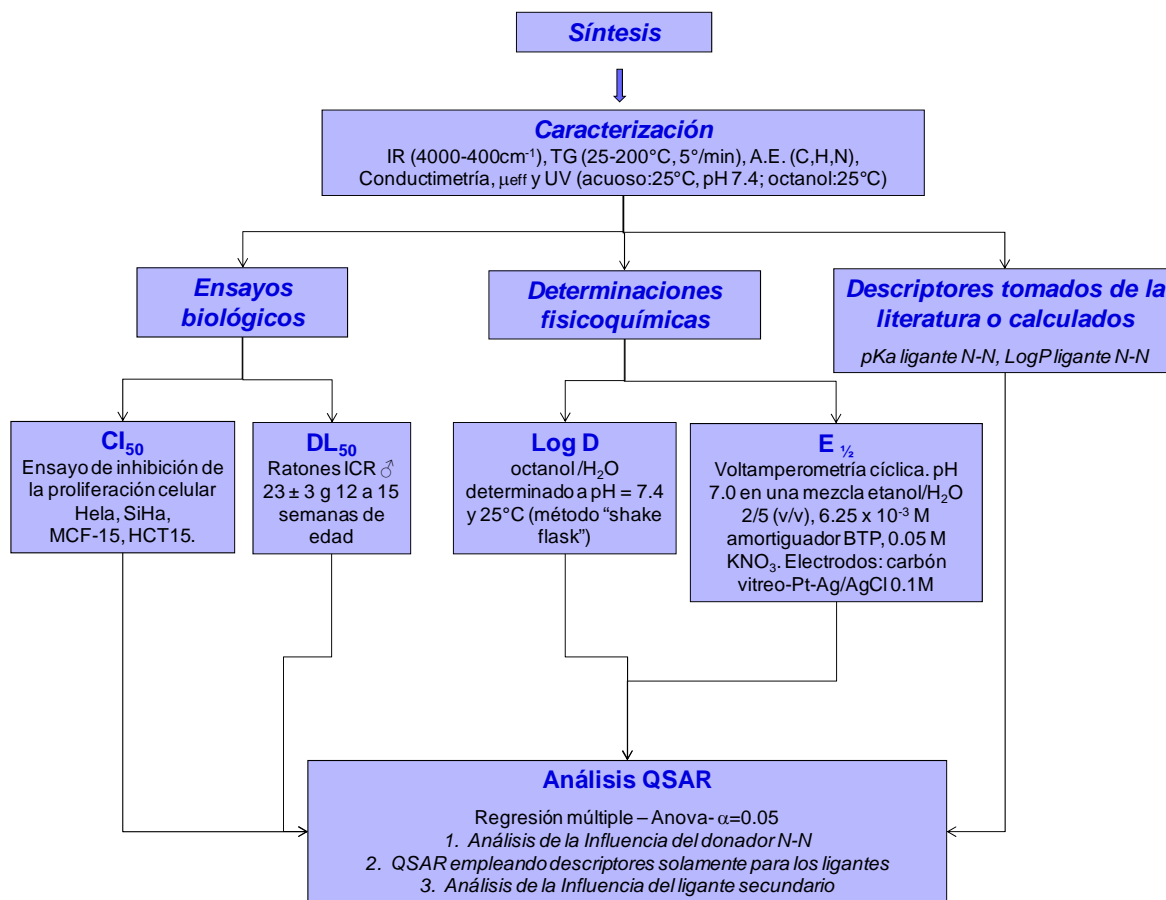
Con base en estos resultados, en el presente trabajo se realizó un estudio QSAR seleccionando las series complejos [Cu(N-N)(*acac*)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(*gly*)]NO<sub>3</sub>, donde N-N es un ligante diimina con sustituciones en diferentes posiciones (**Figura 16**). Los dos compuestos antes citados quedan incluidos en estas dos series de compuestos. Debido a la escasez de parámetros de “relaciones lineales de energía libre” (LFER) que sean precisos y transferibles para complejos metálicos, fue necesario determinar experimentalmente el coeficiente de distribución (D) y el potencial de media onda (E<sub>1/2</sub>), con el objetivo de emplearlos junto con algunos descriptores de sustituyentes tomados de la literatura en el desarrollo de las ecuaciones QSAR.



**Figura 16.** Estructuras de los complejos estudiados. A. [Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]<sup>+</sup> B. [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]<sup>+</sup> y C. [Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)]<sup>+</sup>

El primer grupo de compuestos,  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  (**Figura 16A y B**), fue seleccionado inicialmente con la intención de realizar el estudio manteniendo constante la mayor parte de la estructura. Esta primera serie tiene como característica principal que el ligante secundario es simétrico, por lo cual no existe la posibilidad de isómeros estructurales. La serie incluye como ligantes primarios tanto 2,2'-bipiridinas como 1,10-fenantrolinas lo que permite evaluar la influencia no sólo de las sustituciones en la diimina sino del tipo de diimina también. Esta primera serie permitió analizar: 1. la influencia que el tipo de diimina y sus sustituyentes en ella tienen sobre las propiedades fisicoquímicas como potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) y coeficiente de distribución ( $\text{Log } P$ ); 2. La relación que estas propiedades guardan con la dosis letal ( $\text{DL}_{50}$ ) o la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) en varias líneas tumorales humanas; y 3. Analizar la validez del empleo de propiedades de los ligantes para describir las propiedades del complejo en modelos QSAR.

El segundo grupo de compuestos,  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$  (**Figura 16C**), comparte la *phen* como ligante primario y *gly* como ligante secundario. Esta serie permitió: 1. realizar una validación lateral recomendada por Hansch en este tipo de estudios QSAR [227]; y 2. analizar la influencia que tiene el cambio del ligante secundario cuando *acac* es sustituido por *gly*.



**Figura 17.** Diagrama de flujo de la metodología realizada para llevar a cabo el estudio QSAR.

## 2. Reactivos y disolventes

Los reactivos, 1,10-fenantrolinas sustituidas, 2,2'-bipiridinas sustituidas y la glicina, empleados para la síntesis de los complejos de cobre, se adquirieron a GFS Chemicals Inc. y se emplearon sin purificación adicional. Los reactivos, acetilacetona, nitrato de cobre (II) hemipentahidratado ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ , 99.999%), ácido 4-morfolino propanesulfónico (MOPS, 99+%), bromuro de potasio (KBr, 99+%), bis tris propano (BTP, 99+%), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ , 99+%), cisplatino, sulforrodamina B y disolventes empleados para sintetizar (grado R.A.), purificar (grado R.A.) y realizar las determinaciones fisicoquímicas (grado espectrofotométrico) se adquirieron en Sigma-Aldrich, Inc. Se empleo agua desionizada para los estudios conductimétricos y electroquímicos.

## 3. Síntesis

Se sintetizaron 12 compuestos con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  según los procedimientos patentados [155-157]. (Figura 18)

Siguiendo el método general de síntesis, se mezclaron cantidades estequiométricas de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y la fenantrolina o bipiridina correspondiente previamente disuelta en la mínima cantidad posible de MeOH. A esta mezcla de reacción se le agregó acetilacetonato en proporción estequiométrica más un exceso del 20%. Posteriormente se incrementó el pH con  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso 1:4 hasta  $\text{pH}=8$ , exceptuando para el complejo de  $5\text{NO}_2$ -1,10-fenantrolina que requiere un incremento de pH no mayor de 5. El producto se precipitó por evaporación parcial del disolvente a presión reducida y se separó por filtración. Finalmente, se recrystalizó varias veces de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y se procedió a realizar los análisis de caracterización.

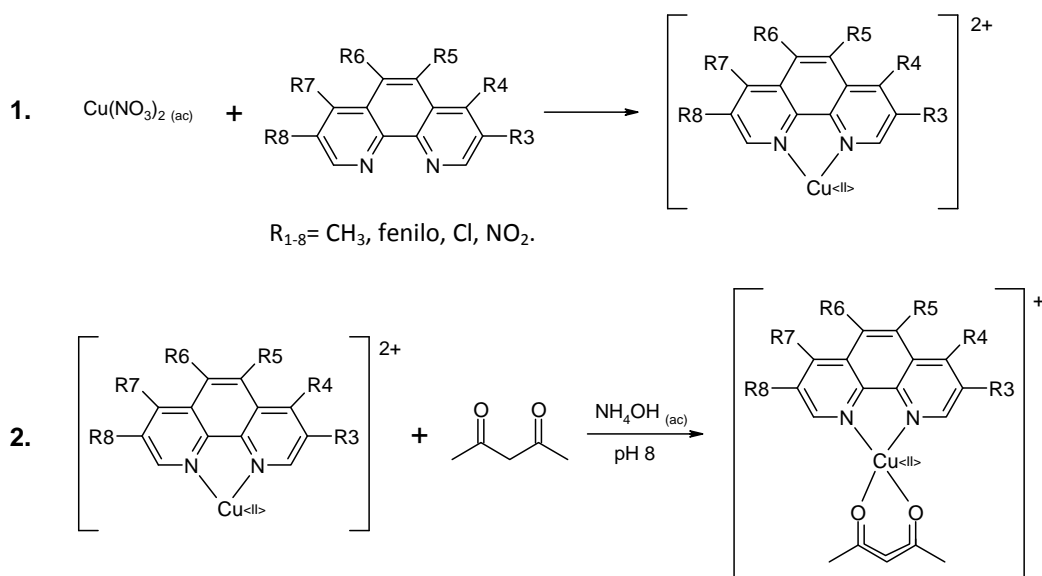


Figura 18. Esquema general de síntesis





## 4. Caracterización

Se caracterizaron por métodos convencionales 12 compuestos de fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{acac})]\text{NO}_3$ , los detalles sobre las condiciones en las que se realizó cada estudio se describen a continuación:

- A. *Análisis elemental*: Este análisis fue realizado por la Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Se determinó el contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno empleando un analizador elemental *EAGER 200 (EAGER 200 chns/method)*, empleando como estándar y puntos control cada 3 determinaciones sulfacetamida (*estándar para microanálisis elemental, Fisons Instruments, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S C 41.84%, H 4.68%, N16.27%, O 18.58%, S 18.62%*).
- B. *Espectroscopía Uv-vis*: los espectros en la región Uv-vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Uv-vis *Agilent 8453 (Agilent Technologies)* empleando soluciones octanólicas (*1-octanol 99+%, ACS grado espectrofotométrico, Aldrich*) y acuosas amortiguadas a pH  $7.40 \pm 0.03$  (ácido 4-Morpholino propanosulfónico  $10^{-3}\text{M}$ ).
- C. *Espectroscopía infrarroja*: El espectro IR se obtuvo en la región de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  empleando pastillas de KBr y un espectrofotómetro *Nicolet, Avantar 320 FT-IR*.
- D. *Termogravimetría*: El análisis térmico fue realizado por la USAI. Se llevó a cabo en un intervalo de temperatura de  $25\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$ , con una velocidad de incremento de temperatura de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  empleando el método TG/SDTA en un analizador *Mettler Toledo Star<sup>a</sup> System*.
- E. *Conductimetría*: Los estudios conductimétricos se realizaron en solución etanólica  $1\text{mM}$  empleando un conductímetro *YSI 3100*.
- F. *Susceptibilidad magnética*: Las determinaciones de susceptibilidad magnética se realizaron en una balanza para susceptibilidad magnética *Mkl, Sherwood Scientific*. Para cada muestra se tomó el peso de la celda con y sin muestra, la susceptibilidad magnética de la celda con y sin muestra, la altura de la columna y la temperatura. Con estos datos se calculó el momento magnético efectivo ( $\mu_{\text{eff}}$ ) empleando las siguientes ecuaciones [239, 240]:

$$\chi_g = [(C \cdot h) \cdot (R - R_0)] / (10^9 \cdot m) \quad \text{(Ec. 7)}$$

$$\chi_m = \chi_g \cdot \text{P.M.} \quad \text{(Ec. 8)}$$

$$\chi_m^c = \chi_m - \chi_d \quad \text{(Ec. 9)}$$

$$\mu_{\text{eff}} = 2.83 \sqrt{\chi_m^c} \cdot (T) \quad \text{(Ec. 10)}$$

C = constante de la balanza = 0.99128

h = altura de columna (cm)

R<sub>0</sub> = lectura de celda vacía

R = lectura de celda con muestra

m = peso de la muestra (g)

T = temperatura en K

P.M. = peso molecular

$\chi_g$  = susceptibilidad por masa

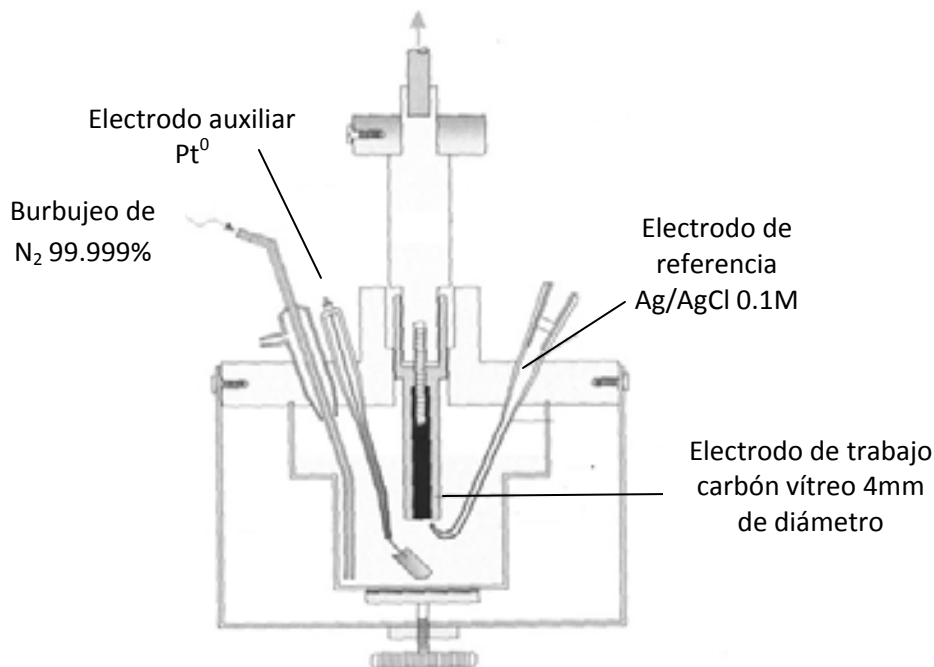
$\chi_m$  = susceptibilidad molar

$\chi_d$  = susceptibilidad diamagnética

## 5. Estudios electroquímicos.

Los potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) para la pareja Cu(II)/Cu(I) para 12 compuestos [Cu(N-N)(*acac*)]NO<sub>3</sub> se determinaron por voltamperometría cíclica. Las determinaciones se realizaron empleando un sistema de tres electrodos en una celda de un volumen final de 10 mL. Se empleó un electrodo de carbón vítreo de 4 mm de diámetro como electrodo de trabajo, un electrodo de platino como electrodo auxiliar y un electrodo Ag/AgCl 0.1M como electrodo de referencia (**Figura 19**). Se preparó una solución etanólica al 40% v/v la cual contenía KNO<sub>3</sub> 50 mM como electrolito soporte, buffer bis-tris popano-HNO<sub>3</sub> 6.25 mM pH = 7.37 ± 0.02, y el complejo ternario correspondiente en una concentración igual a 2 mM. El pH aparente de la solución final fue de 7.00 ± 0.02. Antes de cada determinación, el electrodo de trabajo se limpió y pulió empleando alúmina y un paño suave. Las soluciones se desoxigenaron mediante el burbujeo de nitrógeno con 99.999% de pureza durante 10 minutos. Se aplicó una preoxidación al potencial de equilibrio durante 30 s y se tomaron los voltamperogramas a 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mVs<sup>-1</sup> en dirección reductiva.

El potencial de media onda se calculó como la semisuma del potencial de pico catódico y anódico. Los resultados fueron estandarizados según la recomendación de la IUPAC contra el par Ferroceno/Ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) [241].



**Figura 19.** Celda electroquímica.



## 6. Determinación del coeficiente de distribución (Log D)

La hidrofobicidad se evaluó mediante la determinación del coeficiente de distribución (D) en el sistema octanol-agua empleando el método de agitación en matraz (*shake flask method* [217]). Los detalles del desarrollo y adaptación de este método a los complejos de coordinación estudiados en este trabajo, así como la validación y las curvas de calibración están descritos con detalle en el **Apéndice I**

**Tabla 8.** Bandas de absorción en Uv y coeficientes de extinción molar.

subgrupo biperidina (Fig. 15A)			
No	Sustituyente en el ligante N-N	Absorción Uv en H <sub>2</sub> O <sup>a</sup> $\lambda_{\max}$ (nm); $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Absorción Uv en octanol <sup>b</sup> $\lambda_{\max}$ (nm); $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
1	H	197; 48267	205; 34063
		297; 29823	300; 24661
2	4,4'-diMe	206; 54778	210; 57396
		295; 28098	298; 31608
subgrupo fenantrolina (Fig. 15B)			
3	H	206; 43809	212; 40813
		272; 32160	274; 31289
4	4-Me	205; 56843	207; 50981
		272; 40498	274; 39929.
5	5-Me	206; 56384	209; 58384
		277; 45652	279; 45458
6	4,7-diMe	208; 50526	209; 60257
		273; 44271	274; 47796
7	5,6-diMe	207; 41402	210; 35629
		282; 36119	283; 30968
8	3,4,7,8-tetraMe	211; 59953	213; 55153
		278 ; 41915	280; 47719
9	5-phenyl	204; 63658	208; 58558
		281; 42576	285; 41604
10	4,7-diphenyl	205; 55653	205; 61186
		286; 57409	289; 55730
11	5-Cl	207; 54385	210; 53849
		276; 42513	278; 44643
12	5-NO <sub>2</sub>	201; 57918	206; 49124
		280; 33187	279; 32221

- a. Bandas de absorción Uv en solución acuosa amortiguada (MOPS 10<sup>-2</sup> M) a pH 7.40 ± 0.02, 25.0°C ± 0.5°C  
 b. Bandas de absorción Uv en 1-octanol, 25.0°C ± 0.5°C



En esta determinación se emplearon dos fases inmiscibles entre sí, un buffer MOPS  $10^{-2}$  M pH =  $7.4 \pm 0.02$  como fase acuosa y 1-octanol como fase orgánica. Ambas fases, orgánica y acuosa, se presaturaron con  $10^{-4}$  M del complejo a evaluar y se registró el espectro Uv (espectrofotómetro Agilent 8453) para cada fase antes de poner en contacto 2.5 mL de cada una en un vial de 8 mL con tapón de teflón cuidadosamente desgrasado con potasa alcohólica. Los viales se incuban dentro de un baño de agua con una temperatura constante de  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y agitación constante, en ausencia de luz durante 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm para romper la emulsión y las fases se separaron con una pipeta Pasteur. Posteriormente, se cuantificaron las concentraciones en ambas fases por espectroscopia de absorción en la región UV del espectro en la segunda banda de absorción alrededor de 290 nm. La longitud de onda empleada para cada complejo y su coeficiente de extinción molar se encuentran reportados en la **Tabla 8**. La determinación se realizó por triplicado y D se calculó como el promedio del cociente de concentraciones  $C_o/C_w$ , donde  $C_o$  es la concentración en la fase orgánica y  $C_w$  es la concentración final en la fase acuosa.

## 7. Determinación de la dosis letal 50

Para la evaluación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) se emplearon ratones ICR machos (*Harlan México Inc.*) con un peso promedio de  $23 \pm 3$  g y de 12 a 15 semanas de edad. Los ratones se alojaron en la UNEXA (*Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, UNAM*) bajo condiciones ambientales controladas: temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), 50 – 60% de humedad relativa, ciclos luz-obscuridad 12/12h. A los animales se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* el cual consistió en *Sterilizable Harlan Teklad Global Diet20185* y agua purificada por osmosis inversa y acidulada con HCl hasta pH = 2.5 para el control de parásitos intestinales[242, 243].

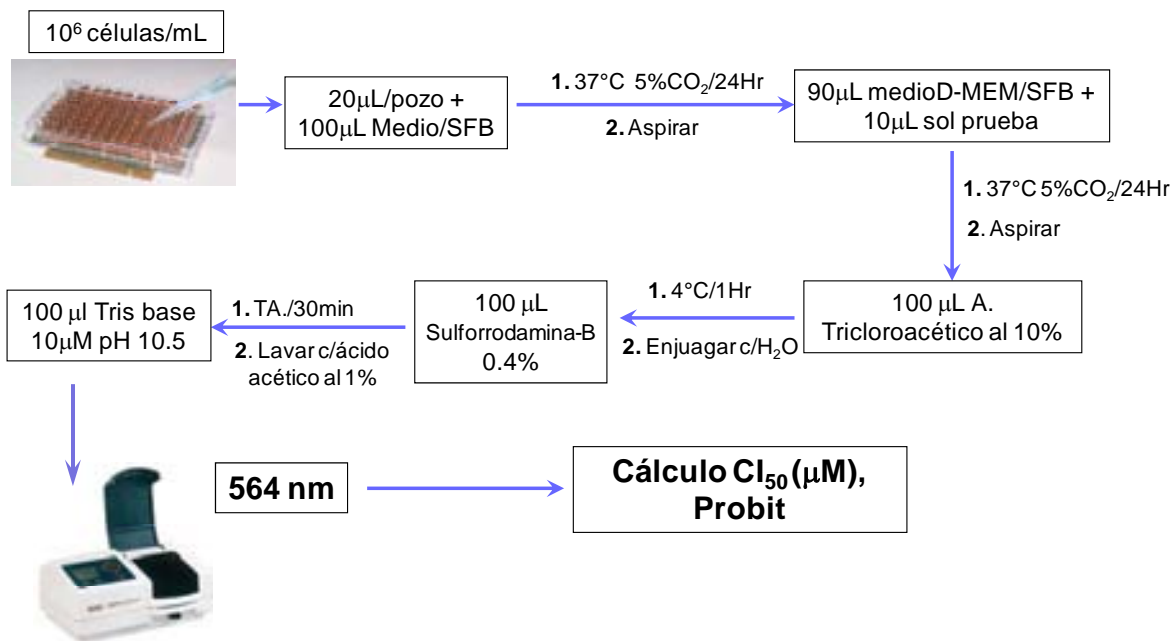
Previo a la determinación de la  $DL_{50}$ , se realizó una estimación aproximada de la dosis máxima tolerada para lo cual se emplearon grupos de 2-4 ratones machos y se les administró dosis logarítmicas del complejo de prueba (3, 10, 30, 100, 300 mg/Kg) por vía intraperitoneal (ip) usando como vehículo  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y filtrada (*Filtro para jeringa estéril, hidrofílico, 0.20 $\mu\text{m}$  Sartorius minisart 16534, Germany*).

Con base en estos resultados se seleccionaron 6 dosis en un intervalo cercano a la  $DL_{50}$ , que en todos los compuestos se encuentra entre 7 y 35 mg/Kg de peso corporal, y se evaluaron 6 dosis en grupos de 10 ratones cada uno. Los complejos fueron administrados intraperitonealmente (*i.p.*) con una dosis única de cada complejo y se mantuvieron en observación durante 14 días. Transcurridas las primeras 24 h se realizó la cuenta de los ratones sobrevivientes por grupo, la  $DL_{50}$  se calculó a partir de una regresión sigmoideal en una curva dosis respuesta cuantil (*Microcal Origin 6.0, Microcal software Inc. [244]*).

## 8. Ensayo de inhibición de la proliferación celular

Se emplearon las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma de cérvix), SiHa (carcinoma de células escamosas de cérvix), MCF-7 (adenocarcinoma mamario) y HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal) las cuales se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se propagaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco invitrogen corporation*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (*SFB, Gibco invitrogen corporation*).

Detalles de esta técnica se pueden encontrar en el artículo de Sekhan y cols. publicado en 1990 [245]. La **Figura 20** presenta un esquema de la metodología, en resumen, se sembraron  $2 \times 10^4$  células/pozo en microplacas de 96 pozos con medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% SFB, y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, para obtener un cultivo a confluencia. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se aspiró el medio y las células se expusieron a los fármacos en 6 concentraciones diferentes (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 µg/ml) durante 24 h en las condiciones antes mencionadas. Se empleó cisplatino como fármaco control. La proliferación celular se determinó a través de una tinción con sulforrodamina B al 0.4%. La absorbancia se cuantificó a 564 nm en un lector de microplacas *BIO-RAD 550* y el porcentaje de crecimiento celular para cada concentración de complejo se calculó como: % crecimiento =  $100 * [T/C]$ ; donde T es la absorbancia de los pozos tratados y C es la absorbancia de los pozos no tratados. La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) se calculó empleando el análisis de sobrevida Probit y el programa StatPlus® 2005 [246]. Las CI<sub>50</sub> reportadas en este trabajo son el resultado del promedio de al menos 3 experimentos independientes.



**Figura 20.** Diagrama de flujo del ensayo de inhibición de la proliferación celular y tinción con sulforrodamina B.



## 9. Análisis QSAR:

Debido a las características estructurales de los compuestos empleados para realizar este estudio y el diseño del mismo, se seleccionó el “enfoque mixto” para llevarlo a cabo. Se emplearon los valores experimentales del coeficiente de distribución (D) y el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) como variables hidrofóbica y electrónica, respectivamente, con el objetivo de emplearlos junto con algunos descriptores LFER de sustituyentes tomados de la literatura para desarrollar ecuaciones QSAR (referencias en la tabla 13, resultados). Así mismo, se calculó el Log P para el ligante diimina en el módulo CLOGP de *ACD Labs/ChemSketch 3.00* [247].

Se empleó el método de análisis estadístico por mínimos cuadrados (PLS) para seleccionar los descriptores apropiados de entre todas las variables disponibles tanto experimentales como teóricas, para ello se empleó el módulo general PLS del programa *STATISTICA 7.0* [248]. Las ecuaciones QSAR reportadas se generaron por regresión múltiple en *Origin pro 7* [244] y se evaluaron estadísticamente con ANOVA en el mismo programa. Los coeficientes para las variables predictivas se reportaron al nivel de significancia 0.05. Las variables independientes que se emplearon como descriptores en el modelo final para  $CI_{50}$  y  $DL_{50}$  se muestran en la Tabla 13 de la sección de resultados.

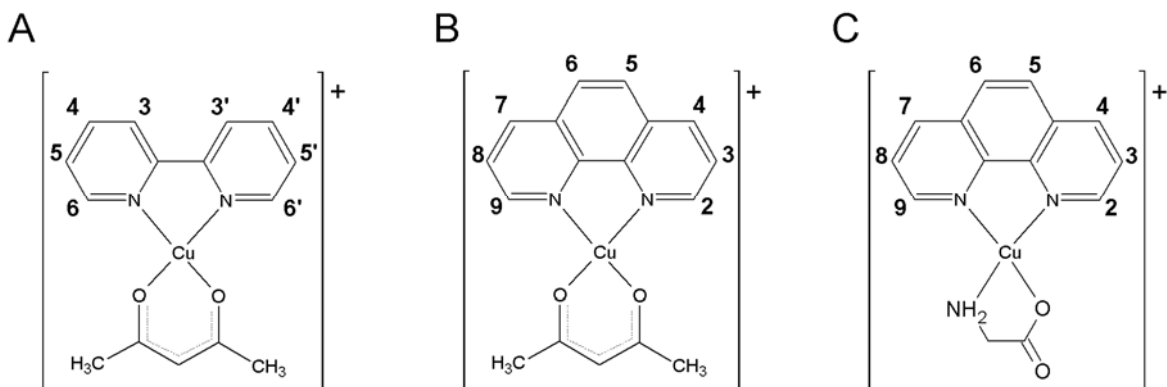
## RESULTADOS

### 1. Caracterización química.

Se sintetizaron 12 compuestos con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$  (**Figura 21A y Figura 21B**) con rendimientos superiores al 80% en todos los casos (datos no mostrados). Los compuestos 2 [179] y 3 [249] fueron reportados previamente por otros investigadores y se replicó su síntesis con el propósito de incluirlos en el análisis. Los compuestos de fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$  (**Figura 21C**) fueron sintetizados y caracterizados por el grupo de trabajo [250] y se retomaron para completar las evaluaciones biológicas y realizar el análisis QSAR. Los resultados de la caracterización por técnicas convencionales se encuentran reportados en la **Tabla 9**, donde solo se muestran aquellos datos que corresponden a los compuestos que fueron sintetizados en este trabajo.

La pureza de los compuestos se confirmó por análisis elemental para C, H y N, el cual en todos los casos concuerda con una variación menor al 0.5% para la fórmula mínima reportada en la **Tabla 9**. De acuerdo al análisis elemental el 75% de los compuestos presenta moléculas de agua de hidratación, cuya presencia se confirmó posteriormente en el análisis termogravimétrico (**Apéndice II**) y en las bandas de absorción en el espectro IR (**Apéndice III**). Todos los complejos presentan valores de momento magnético efectivo ( $\mu_{\text{eff}}$ ) dentro del intervalo de 1.7 a 2.2 MB correspondiente a compuestos paramagnéticos con un electrón desapareado, indicando que el centro metálico de cobre se encuentra en estado de oxidación II [239]. Por otra parte, los datos de conductividad se encuentran en el intervalo 35-45  $\mu\text{S}$  y corresponden a electrolitos 1:1, de lo anterior se deduce que son complejos catiónicos con una molécula de nitrato como contra-ión, la cual fue confirmada posteriormente en el espectro IR (**Tabla 10**).

**Figura 21.** Estructuras de los complejos estudiados. A.  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetato})]^+$  B.  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]^+$  y C.  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]^+$



**Tabla 9. Caracterización química.**

subgrupo bipyridina (Figura 21A)							
No	Sustituyente en el ligante N-N	Ligante secundario	A.E. <sup>a</sup> (%N; %C; %H)	Fórmula <sup>b</sup>	PM (g/mol)	$\mu_{\text{eff}}$ (BM) <sup>c</sup>	Cond. ( $\mu\text{S}$ ) <sup>d</sup>
1	H	Acac	10.32; 43.13; 4.42 (10.08; 43.22; 4.59)	$\text{CuC}_{15}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{15}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	416.54	1.74	46.90
2	4,4'-diMe	Acac	9.97; 47.48; 5.07 (9.84; 47.83; 4.96)	$\text{CuC}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}\cdot \text{H}_2\text{O}$	426.92	1.80	40.23
subgrupo fenantrolina (Figura 21B)							
3	H	Acac	9.23; 45.93; 4.17 (9.53; 46.31; 4.34)	$\text{CuC}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{15}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.90	1.88	38.57
4	4-Me	Acac	10.24; 51.16; 4.16 (10.03; 51.61; 4.09)	$\text{CuC}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{17}$	418.90	1.94	39.51
5	5-Me	Acac	9.15; 47.66; 4.92 (9.24; 47.52; 4.65)	$\text{CuC}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{17}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	454.91	1.89	40.10
6	4,7-diMe	Acac	9.30; 50.23; 4.55 (9.32; 50.61; 4.69)	$\text{CuC}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}\cdot \text{H}_2\text{O}$	450.94	1.80	38.48
7	5,6-diMe	Acac	9.03; 48.82; 4.93 (8.96; 48.66; 4.94)	$\text{CuC}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	468.95	1.82	38.90
8	3,4,7,8-tetraMe	Acac	8.95; 52.79; 5.41 (8.77; 52.66; 5.26)	$\text{CuC}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{23}\cdot \text{H}_2\text{O}$	478.99	1.78	37.32
9	5-phenyl	Acac	8.46; 57.47; 4.00 (8.74; 57.44; 3.98)	$\text{CuC}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}$	480.97	1.81	36.77
10	4,7-diphenyl	Acac	7.22; 60.43; 4.22 (7.31; 60.57; 4.38)	$\text{CuC}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{23}\cdot \text{H}_2\text{O}$	575.06	1.87	36.00
11	5-Cl	Acac	9.41; 44.46; 3.49 (9.19; 44.65; 3.53)	$\text{CuC}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{14}\text{Cl}\cdot \text{H}_2\text{O}$	457.31	1.83	39.74
12	5-NO <sub>2</sub>	Acac	12.62; 44.95; 3.25 (12.45; 45.39; 3.14)	$\text{CuC}_{17}\text{N}_4\text{O}_7\text{H}_{14}$	449.87	1.82	34.80

a. A.E. análisis elemental valores experimentales. (Valores teóricos).

b. Fórmula por ión metálico.

c. Momento magnético efectivo

d. Conductividad 1 mM en solución etanólica a 298 K

Los complejos ternarios muestran las bandas de absorción típicas de sus ligantes coordinados (**Tabla 10**): *phen*: 1625-1590  $\text{cm}^{-1}$ , 1524-1516  $\text{cm}^{-1}$ , 1430-1421  $\text{cm}^{-1}$  (anillos aromáticos fusionados), 736-711  $\text{cm}^{-1}$  y 896-811  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H fuera del plano); *bpy*: 1616-1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1525-1523  $\text{cm}^{-1}$ , 1490-1446  $\text{cm}^{-1}$  (anillos aromáticos), 783-769  $\text{cm}^{-1}$  y 730  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  C-H fuera del plano); *acac*: 1587-1577  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O). Todos los espectros de IR muestran una banda de absorción en 1384.7  $\text{cm}^{-1}$  asociada con  $\text{NO}_3^-$  como contra-ión; los espectros de los complejos 1-3, 5-8, 10 y 11 muestran una banda de absorción ancha entre 3398  $\text{cm}^{-1}$  y 3489  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a moléculas de agua. Los hidratos fueron confirmados por análisis termogravimétrico, la pérdida de las moléculas de agua ocurrió entre 40 y 100°C en todos los casos (**Tabla 11**), indicando que corresponden a moléculas de agua de cristalización o débilmente unidas al complejo debido a la elongación de los enlaces en las posiciones axiales como resultado de la distorsión de Jahn-Teller que suelen presentar los complejos de cobre (II).



**Tabla 10.** Principales bandas de absorción en el espectro IR (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) y sus probables asignaciones.

subgrupo biperidina (Figura 21A)									
Sustituyente en el ligante N-N	diimina coordinada				<i>acac</i>	$\text{NO}_3^-$	$\text{H}_2\text{O}$		
	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{H})$	$\nu(\text{C}-\text{H})$	$\nu_{\text{asim}}(\text{COO}^-)$	$\nu(\text{N}-\text{O})$	$\nu(\text{O}-\text{H})$	
1	H	1600.7(m)	1523.5(s)	1446.4(m)	730.9(m)	1577.6(s)	1384.7(vs)	3513.8(m,b)	
2	4,4'-diMe	1616.14(s)	1525.5(s)	1490.8(w)	730.9(m)	1587.2(s)	1384.7(vs)	3463.7(m,b)	
subgrupo fenantrolina (Figura 21B)									
3	H	1623.8(w)	1519.7(s)	1429.6(m)	725.1(m)	858.2(m)	1587.2(s)	1384.7(vs)	3432.8(m,b)
4	4-Me	1623.8(w)	1518.6(s)	1428.3(m)	727.1(m)	852.4(m)	1577.6(s)	1384.7(vs)	-
5	5-Me	1625.8(w)	1519.7(s)	1427.1(m)	729.0(m)	811.9(w)	1577.6(s)	1384.7(vs)	3473.3(m,b)
6	4,7-diMe	1622.2(w)	1521.6(s)	1425.2(m)	725.1(m)	869.8(m)	1577.6(s)	1384.7(vs)	3413.5(m,b)
7	5,6-diMe	1606.5(m)	1517.8(s)	1430.9(m)	729.9(m)	819.6(m)	1581.4(s)	1384.7(vs)	3488.7(m,b)
8	3,4,7,8-tetraMe	1618.1(m)	1517.8(s)	1430.9(m)	727.1(m)	833.1(m)	1583.3(s)	1375.1(vs)	3338.1(m,b)
9	5-phenyl	1618.06(w)	1524.7(s)	1425.2(m)	732.9(m)	833.1(m)	1583.0(s)	1384.2(vs)	-
10	4,7-diphenyl	1620.0(w)	1517.8(s)	1427.1(m)	736.7(m)	854.4(m)	1585.3(s)	1384.7(vs)	3417.4(m,b)
11	5-Cl	1614.2(w)	1517.8(s)	1423.3(m)	729.0(m)	896.8(m)	1577.6(s)	1384.7(vs)	3401.9(m,b)
12	5-NO <sub>2</sub>	1623.8(w)	1515.8(s)	1421.3(m)	721.3(m)	839.4(m)	1579.5(s)	1384.7(vs)	-

(w)= débil, (m) = media, (s) = fuerte, (vs) = muy fuerte, (b) = ancha,  $\nu_{\text{asim}}(\text{COO}^-)$  = vibración asimétrica.

Los datos de caracterización para todos los complejos estudiados coinciden con los datos de difracción de rayos X reportados previamente por el grupo de trabajo para los complejos 2 [179] y 3 [249]. Debido a lo anterior y en base a otras estructuras cristalinas reportadas en la literatura para este tipo de compuestos, se deduce que el ambiente de coordinación alrededor del átomo central de cobre tiene siempre la misma geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada, donde el ligante diimina y el acetilacetato ocupan 4 posiciones de coordinación en el plano de la base y una molécula de agua ocupa la quinta posición de coordinación en la posición apical para los compuestos 1-3, 5-8, 10 y 11. **Figura 11.**

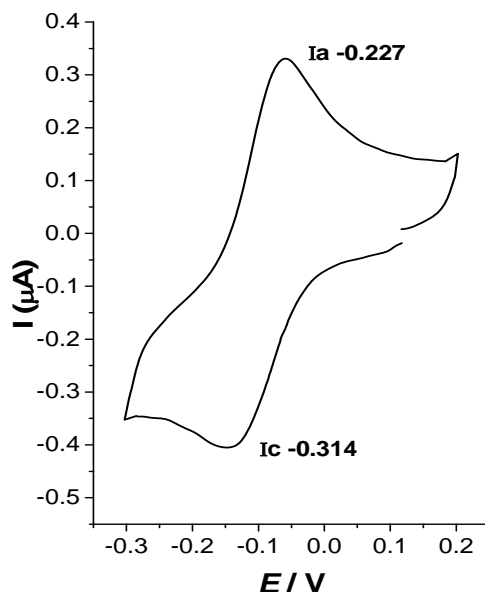
**Tabla 11.** Pérdida de moléculas de agua en el análisis termogravimétrico. sp = sin pérdidas.

subgrupo bipyridina (Figura 21A)					
	Sustituyente en el ligante N-N	PM (g/mol)	% Pérdida	H <sub>2</sub> O	T (°C)
1	H	416.54	8.78	2	55-62
2	4,4'-diMe	426.92	4.28	1	76-85
subgrupo fenantrolina (Figura 21B)					
3	H	440.90	7.22	2	30-50
4	4-Me	418.90	sp	0	-
5	5-Me	454.91	6.55	2	30-44 50-80
6	4,7-diMe	450.94	3.84	1	30-60
7	5,6-diMe	468.95	7.14	2	40-60
8	3,4,7,8-tetraMe	478.99	4.27	1	62-82
9	5-phenyl	480.97	sp	0	-
10	4,7-diphenyl	575.06	3.22	1	70-95
11	5-Cl	457.31	3.60	1	73-93
12	5-NO <sub>2</sub>	449.87	sp	0	-

## 2. Determinaciones electroquímicas.

La **Figura 22** muestra un voltamperograma representativo del comportamiento del centro metálico en los compuestos estudiados para la pareja Cu (II)/Cu (I). En todos los casos, los sistemas muestran un comportamiento lineal entre la intensidad de corriente de los picos catódico y anódico ( $i_{p_{a,c}}$ ) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ) (**Apéndice IV**), lo que indica que son procesos controlados por difusión. El cociente de la intensidad de pico anódico y catódico es ligeramente superior a uno (**Tabla 12**), por lo cual se deduce que es un proceso de transferencia de  $1 e^-$ . Debido a que el cociente es mayor a uno es razonable proponer que existe una posible adsorción en la superficie del electrodo, sin embargo, llama la atención que la relación entre  $i_{p_{a,c}}$  y  $v^{1/2}$  sea lineal, ya que esto no ocurre cuando existen adsorciones en el electrodo. Este comportamiento único puede explicarse con el modelo propuesto por Anson y colaboradores [251] para sistemas  $Cu(phen)_2^{2+}$ . En este modelo se propone que debido a la planaridad del ligante diimina, el complejo se deposita en la superficie del electrodo formando monocapas; se asume que este depósito no interfiere con el flujo de electrones ya que se transportan a través de los

núcleos de Cu(I) y Cu (II) presentes en la capa en un proceso de transferencia considerado rápido. Este fenómeno fue discutido y analizado previamente para complejos  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gly})]\text{NO}_3$  en el trabajo de García-Ramos y cols. [250].



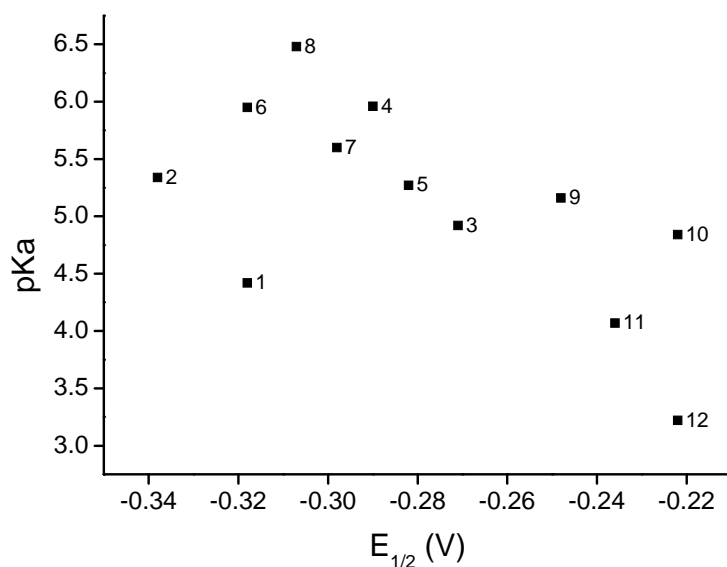
**Figura 22.** Voltamperograma de  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]^+$  obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  2/5 (v/v), amortiguador BTP  $6.25 \times 10^{-3}$  M,  $\text{KNO}_3$  0.05 M, velocidad de barrido  $0.1 \text{ Vs}^{-1}$ . Se empleó un electrodo de trabajo de carbón vítreo de 4 mm de diámetro, electrodo de platino como electrodo auxiliar y electrodo Ag/AgCl 0.1M como electrodo de referencia. Los potenciales se estandarizaron contra la pareja ferroceno/ferricinio ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ).

La reversibilidad de la reacción y los valores de  $E_{1/2}$  (**Tabla 12**) están influenciados por el tipo de ligante diimina en la estructura y sus sustituyentes. La separación entre los potenciales de pico catódico y pico anódico (**Tabla 12**), que puede ser considerada como una medida de la reversibilidad del proceso en el electrodo para la pareja redox involucrada, presenta un rango que varía de 0.079 V para el complejo 8, a 0.193 V para el complejo 12 a la velocidad de barrido de  $0.2 \text{ Vs}^{-1}$ . La tendencia general muestra que los sustituyentes electrodonadores en el ligante diimina favorecen la reversibilidad de la reacción en este sistema experimental.

Los valores  $E_{1/2}$  (**Tabla 12**) se calcularon como la semisuma de los potenciales de pico catódico y anódico. Para el complejo 12 la irreversibilidad afecta la transferencia de carga en el electrodo; como resultado, el pico catódico presenta una banda muy ancha lo que hace imposible determinar



adecuadamente el  $E_{1/2}$  (**Apéndice IV**), por tanto, este valor no se encuentran reportado en la **Tabla 12**. Los efectos electrónicos de los sustituyentes en los anillos de *phen* o *bpy* influyen significativamente el potencial redox de la pareja Cu(II)/Cu(I). El potencial de media onda es un parámetro experimental ampliamente aceptado para medir indirectamente la capacidad de los ligantes como aceptores  $\pi$ , lo cual está estrechamente relacionado con el efecto de retro-donación  $\pi$  del ión metálico a la diimina aromática y, en consecuencia, el incremento de las constantes de estabilidad termodinámicas[252]. Las propiedades como aceptor  $\pi$  de un ligante generalmente decrecen mientras sus propiedades como donador  $\sigma$  aumentan ( $pK_a$ ). De acuerdo a lo esperado, se encontró una relación inversamente proporcional entre el potencial redox y el  $pK_a$  de la fenantrolina ( $pK_{a_{phen}}$ ) para el subgrupo de complejos con ligante primario fenantrolina (complejos 3-12;  $R = -0.87$ ) (**Figura 23**). Este mismo comportamiento se observa con los complejos [Cu(N-N)(*gly*)]NO<sub>3</sub> (complejos 13-21;  $R = -0.94$ ) (**Figura 21C**) y coincide con la relación reportada por Sanna y colaboradores sobre Cu (II) y fenantrolinas sustituidas con estequiometría 1:2 Metal-ligante [253].



**Figura 23.**  $pK_a$  phen vs.  $E_{1/2}$ (V). Se observa una relación inversa proporcional entre estas dos variables tanto para el subgrupo de complejos con ligante primario fenantrolina ( $R = -0.87$ ) como para el subgrupo con bipyridinas, el comportamiento es equivalente en ambos. Los valores de  $E_{1/2}$  y  $pK_{a_{phen}}$  se encuentran reportados en la **Tabla 12**

**Tabla 12.** Valores de  $E_{1/2}$  y  $\Delta E$  de los complejos

subgrupo bipyridina (Figura 21 A)					
	Sustituyente en el ligante N-N	$E_{1/2}$	$\Delta E$ (0.2 Vs <sup>-1</sup> )	$ip_a/ip_c$ (0.2 Vs <sup>-1</sup> )	pKa phen*
1	H	-318 ± 4	180.31	1.5	4.42 (1)
2	4,4'-diMe	-338 ± 3	112.48	1.3	5.34 (2)
subgrupo fenantrolina (Figura 21 B)					
3	H	-271 ± 1	100.11	1.3	4.93 (1)
4	4-Me	-290 ± 4	88.47	1.2	-
5	5-Me	-282 ± 2	97.21	1.3	5.27 (3)
6	4,7-diMe	-318 ± 2	81.79	1.4	5.95 (4)
7	5,6-diMe	-298 ± 3	85.92	1.3	5.60 (4)
8	3,4,7,8-tetraMe	-307 ± 1	79.65	1.2	6.48 (5)
9	5-phenyl	-248 ± 4	91.32	1.3	4.90 (6)
10	4,7-diphenyl	-222 ± 1	80.08	1.5	4.84 (7)
11	5-Cl	-236 ± 3	107.28	1.5	4.07 (8)
12	5-NO <sub>2</sub>	-	192.6	-	3.22 (9)

\*pKa para el ligante N-N (HL / H + L). 1[254], 2[255], 3[76], 4[256], 5[257], 6[258], 7[259], 8[260], 9[261].

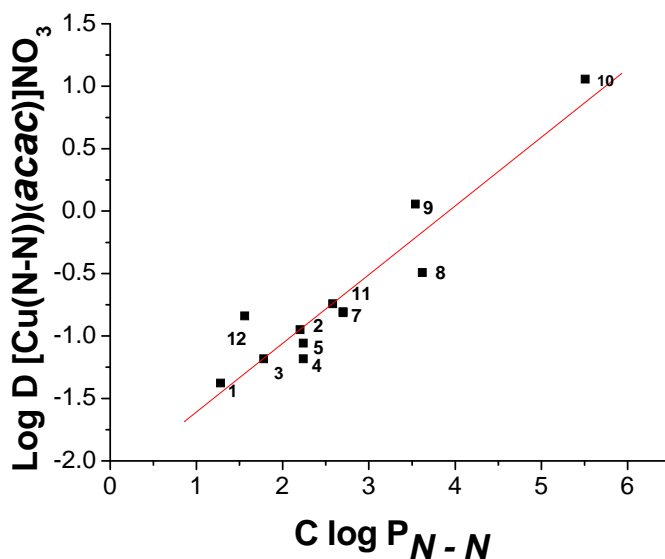
Debido a que el  $E_{1/2}$  describe el comportamiento redox del centro metálico, el cual podría estar involucrado en el mecanismo de acción, se seleccionó este valor como parámetro electrónico en el análisis QSAR, con el objetivo de analizar la influencia del ambiente electrónico alrededor del metal central en la actividad biológica ( $DL_{50}$  o  $Cl_{50}$ ).

### 3. Hidrofobicidad

Los valores experimentales de Log D para el grupo *acac* de complejos (compuestos 1-12) varía entre -1.38 y 1.06 (**Tabla 13**). Debido a que estos complejos son electrolitos 1:1, todos tienen una carga total 1+ lo cual los hace principalmente hidrofílicos con la excepción de los complejos 9 y 10 con fenilos como sustituyentes en el ligante diimina cuyos valores de Log D son positivos. Con el objetivo de analizar si los efectos de la sustitución en el ligante diimina tienen la misma contribución a la hidrofobicidad cuando están coordinados, se calculó Log P para los ligantes N-N sustituidos (CLog  $P_{N-N}$ ); estos valores fueron comparados con los valores experimentales de Log D obtenidos para los complejos ternarios correspondientes  $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$ . Los valores teóricos y experimentales están relacionados linealmente de acuerdo a la **Ecuación 11**.

$$\text{Log D} = -2.15787 + 0.54971 * \text{CLog } P_{N-N} \quad (R = 0.9418, n=12)$$

(Ec. 11)



**Figura 24.** Relación lineal (Ecuación 11) entre el coeficiente de reparto calculado para el ligante fenantrolina ( $C\log P_{N-N}$ ) y el coeficiente de distribución experimental ( $\log D$ ) para el complejo ternario.

A pesar de la presencia del metal central, la contribución de los sustituyentes a la lipofilicidad es proporcional tanto en el ligante diimina como en los complejos ternarios. Este hallazgo abre la posibilidad de emplear descriptores de sustituyentes que se encuentren reportados en la literatura para describir la hidrofobicidad del complejo; o bien, hacer uso de los métodos establecidos para calcular el  $\log P$  para los ligantes involucrados y emplear estos valores en vez de los valores experimentales en la construcción de ecuaciones QSAR. Ambas opciones permitirán identificar tendencias para complejos de coordinación relacionados, optimizando de esta forma el tiempo y los recursos experimentales, ya que no requiere de la determinación experimental de estos valores.

## 4. Ensayos biológicos.

### 4.1 Toxicidad Aguda ( $DL_{50}$ )

Los valores de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) para los complejos ternarios se incluyen en la **Tabla 13** empleando como unidades de dosis  $\mu\text{mol/Kg}$ . Los complejos con fenantrolinas como ligante primario son aproximadamente 2.5 veces más tóxicos que sus análogos de bipyridinas. La



comparación de los valores de  $DL_{50}$  para los compuestos  $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$  donde  $N-N=phen$ , compuestos 3 y 6, con sus correspondientes análogos donde  $N-N=bpy$ , compuestos 1 y 2, revela que existe un decremento abrupto de la toxicidad atribuible a la ausencia del anillo aromático central. Este anillo es la única diferencia estructural entre las parejas comparadas; sin embargo, esa diferencia estructural trae consigo cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos como estabilidad, solubilidad, y propiedades electrónicas, las cuales, solas o en conjunto, son responsables de ese cambio en la toxicidad aguda. Este comportamiento concuerda con el observado para los valores de  $CI_{50}$  para los estudios *in vitro* discutidos más adelante.

**Tabla 13 . Datos biológicos y fisicoquímicos.**

No	Sustituyente en N-N	Log D <sup>a</sup>	E1/2 <sup>b</sup>	pKa <sup>c</sup> (ref.)	DL <sub>50</sub> <sup>d</sup>	CI <sub>50</sub> <sup>e</sup>			
						HeLa	SiHa	MCF-7	HCT-15
1	H	-1.38 ± 0.03	-318 ± 4	4.42 (1)	71.73 ± 6.53	42 ± 3.1	40.5 ± 2.0	103.7 ± 9.6	67.3 ± 1.6
2	4,4'-diMe	-0.95 ± -0.95	-338 ± 3	5.34 (2)	51.43 ± 2.39	18.2 ± 2.7	14.5 ± 1.5	15.9 ± 1.8	40.5 ± 4.6
3	H	-1.18 ± 0.00	-271 ± 1	4.93 (1)	29.18 ± 1.63	10.7 ± 0.9	6.8 ± 0.9	8.1 ± 0.5	7.3 ± 0.7
4	4-Me	-1.18 ± 0.06	-290 ± 4	-	28.21 ± 1.38	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.5	5.6 ± 0.7	6.0 ± 0.9
5	5-Me	-1.06 ± 0.07	-282 ± 2	5.27 (3)	25.76 ± 1.74	6.2 ± 0.7	3.2 ± 0.2	4.4 ± 0.5	2.6 ± 0.4
6	4,7-diMe	-0.81 ± 0.06	-318 ± 2	5.95 (4)	22.92 ± 1.82	1.4 ± 0.1	0.96 ± 0.09	4.9 ± 0.6	2.1 ± 0.1
7	5,6-diMe	-0.81 ± 0.02	-298 ± 3	5.60 (4)	26.38 ± 1.39	3.4 ± 0.5	1.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3
8	3,4,7,8-tetraMe	-0.49 ± 0.01	-307 ± 1	6.48 (5)	16.23 ± 2.63	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.3	1.4 ± 0.2
9	5-phenyl	0.06 ± 0.01	-248 ± 4	4.90 (6)	28.38 ± 3.33	3.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.5 ± 0.3
10	4,7-diphenyl	1.06 ± 0.08	-222 ± 1	4.84 (7)	24.93 ± 1.79	4.2 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.2 ± 0.3	3.2 ± 0.4
11	5-Cl	-0.74 ± 0.06	-236 ± 3	4.07 (8)	33.60 ± 1.84	4.5 ± 0.5	8.8 ± 0.6	9.8 ± 0.5	12.9 ± 0.5
12	5-NO <sub>2</sub>	-0.84 ± 0.04	-	3.22 (9)	51.65 ± 0.78	21.3 ± 2.6	10.2 ± 1.1	14.7 ± 1.4	35.0 ± 2.4
13	H	-	-259 ± 3 <sup>f</sup>	4.93 (1)	-	13.9 ± 1.3	27.3 ± 2.2	9.6 ± 1.1	21.2 ± 2.5
14	4-Me	-	-281 ± 7 <sup>f</sup>	-	-	8.7 ± 0.7	10.2 ± 1.0	7.7 ± 0.6	5.1 ± 0.5
15	5-Me	-	-273 ± 7 <sup>f</sup>	5.27 (3)	-	6.2 ± 0.6	5.7 ± 0.6	4.7 ± 0.2	3.7 ± 0.4
16	4,7-diMe	-	-310 ± 4 <sup>f</sup>	5.95 (4)	-	5.5 ± 0.7	5.5 ± 0.8	4.6 ± 0.4	2.0 ± 0.2
17	5,6-diMe	-	-292 ± 3 <sup>f</sup>	5.60 (4)	-	5.3 ± 0.1	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.3	2.1 ± 0.1
18	3,4,7,8-tetraMe	-	-302 ± 5 <sup>f</sup>	6.48 (5)	-	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4
19	4,7-diphenyl	-	-214 ± 4 <sup>f</sup>	4.84 (7)	-	5.1 ± 0.2	6.6 ± 0.9	4.1 ± 0.4	7.6 ± 0.7
20	5-Cl	-	-221 ± 4 <sup>f</sup>	4.07 (8)	-	14.3 ± 0.5	13.9 ± 1.3	23.2 ± 2.3	22.3 ± 1.6
21	5-NO <sub>2</sub>	-	-	3.22 (9)	-	44.8 ± 1.5	17.9 ± 2.2	28.64 ± 3.4	47.3 ± 6.5
Cispt						5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.8	21.8 ± 2.4

a. Logaritmo del coeficiente de distribución octanol /H<sub>2</sub>O determinado a pH = 7.4 y 25°C. Log D está dado como el promedio de 3 determinaciones independientes ± SD.

b. Potencial de media onda obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. E<sub>1/2</sub> está dado en mV como el promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido ± SD. Los potenciales se estandarizaron contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>)

c. pKa para el ligante N-N (HL / H + L). 1 [254], 2 [255], 3 [76], 4 [256], 5 [257], 6 [258], 7 [259], 8 [260], 9 [261].

d. LD<sub>50</sub> (μmol/kg) en ratones machos ICR ± SE

e. CI<sub>50</sub> (μM) en HeLa, SiHa, MCF-7 y HCT-15, los valores están dados como el promedio de 3 experimentos independientes ± SE.

f. Valores de potencial de media onda tomados de García-Ramos, 2007 [250]. Los experimentos fueron tomados en las mismas condiciones que en b



## 4. 2 Ensayo de inhibición de la proliferación celular

Los valores de  $Cl_{50}$  para cada compuesto se encuentran incluidos en la **Tabla 13** como dosis micromolares. Los valores experimentales de  $Cl_{50}$  para el cisplatino son cercanos a los reportados previamente por el National Cancer Institute en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7. Al analizar los resultados para el grupo *acac* (compuestos 3-12), se encontró la misma tendencia antes descrita para  $DL_{50}$ ; los compuestos con fenantrolina como ligante N-N son más activos que sus correspondientes con bipyridina (1-2). Este comportamiento se presenta en las cuatro líneas celulares evaluadas y se atribuye a la ausencia del tercer anillo aromático en los complejos 1 y 2. Con respecto al grupo *gly* (13-21), se observa de forma cualitativa la misma tendencia encontrada para el grupo *acac* (3-12), siendo estos últimos ligeramente más activos.

## 5. Análisis QSAR.

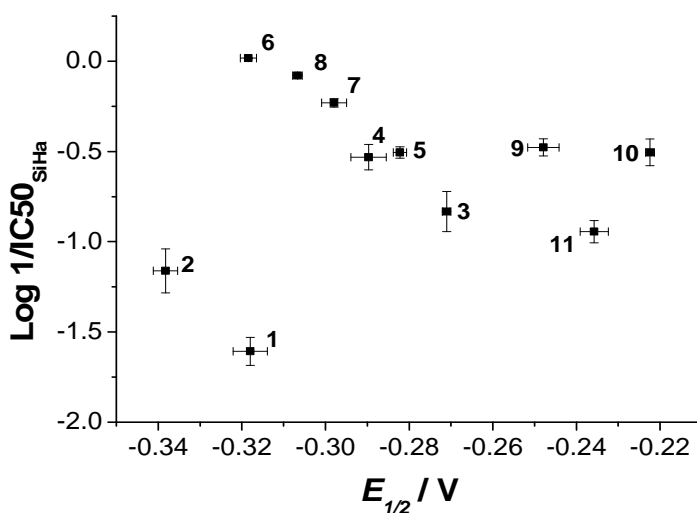
Como se mencionó anteriormente, existen pocos análisis QSAR para compuestos de coordinación y debido a la falta de parámetros disponibles para el complejo, los autores usualmente introducen en las ecuaciones descriptores reportados en la literatura o calculados teóricamente sólo para los ligantes, presentando, en la mayoría de los casos, ecuaciones QSAR para la actividad de los ligantes y asumiendo que el comportamiento de los complejos debe ser el mismo sin comprobarlo experimentalmente.

Uno de los objetivos de este trabajo es la construcción de ecuaciones QSAR empleando como variables predictivas algunos valores experimentales que describen las propiedades del complejo, y compararlas con las ecuaciones QSAR construidas con descriptores moleculares o de sustituyente obtenidos de la literatura sólo para los ligantes, tomando siempre como variable dependiente la actividad biológica del complejo completo. Esta comparación tiene como finalidad analizar si esta práctica es predictiva para los compuestos de coordinación que están estructuralmente relacionados con los complejos de este estudio, de esta forma, se puede realizar el análisis QSAR para la actividad de los complejos sin realizar todas las determinaciones fisicoquímicas experimentalmente. Los valores experimentales que se emplearon para este análisis fueron Log D como descriptor hidrofóbico y  $E_{1/2}$ , representado como  $pE_{1/2}$  ( $pE_{1/2} = E_{1/2} / 0.059V$ ), como descriptor de las propiedades electrónicas del centro metálico. Se emplearon dos conjuntos de datos para realizar el análisis: 1. Grupo *acac* (compuestos 1-12) para evaluar la influencia del donador N-N en la actividad biológica, analizar la relación entre la toxicidad aguda *in vivo* y la  $Cl_{50}$  *in vitro*, y para evaluar la capacidad de predicción del modelo cuando se emplean solamente propiedades fisicoquímicas o descriptores de sustituyentes para los ligantes; y 2. Grupo *phen* (compuestos 3-21) para evaluar la influencia del ligante secundario sobre la  $Cl_{50}$ .



### 5.1 Análisis de la Influencia del donador N-N

Para analizar la influencia del ligante diimina en la actividad biológica,  $DL_{50}$  o  $Cl_{50}$ , se construyeron ecuaciones QSAR para el grupo de compuestos *acac* (compuestos 1-12). La **Figura 25** muestra la distribución del  $\text{Log } 1/Cl_{50}$  evaluada en la línea tumoral SiHa ( $\text{Log } 1/Cl_{50\text{SiHa}}$ ) para los complejos 1-11 en función de sus  $E_{1/2}$ . Los complejos se agrupan en dos conjuntos bien definidos dependiendo de la diimina presente en su estructura, la tendencia general muestra un fuerte decremento en la actividad cuando el donador N-N cambia de fenantrolina a bipyridina, así como un fuerte desplazamiento de  $E_{1/2}$  hacia potenciales más negativos. El mismo comportamiento se presenta en las otras 3 líneas celulares.



**Figura 25.** Gráfica de actividad antiproliferativa del grupo de complejos de  $[Cu(N-N)(acac)]NO_3$  en la línea celular SiHa ( $\text{Log } 1/Cl_{50\text{SiHa}} \mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) contra el potencial de media onda  $Cu^I/Cu^{II}$  estandarizado contra la pareja ferroceno/ferrocenio en volts ( $E_{1/2} \pm \text{SD}$ )

La única diferencia estructural entre las diiminas es el tercer anillo aromático, y esta diferencia trae como consecuencia posibles cambios en varias propiedades fisicoquímicas de forma simultánea (hidrofóbicas, estéricas o electrónicas). Debido a esto, el efecto individual que cada una de estas propiedades tiene sobre la actividad biológica es difícil de distinguir. Para considerar estos cambios simultáneos, se introdujo en las ecuaciones una variable indicadora a la cual se denominó como  $I_{N-N}$ . Esta variable permite analizar la importancia del anillo aromático central considerando todas estas variaciones como un conjunto. La variable toma el valor de 1 si la



diimina es fenantrolina donde el anillo aromático está presente, o cero si la diimina es bipyridina y por tanto el anillo está ausente ( $I_{N-N} phen = 1$ ;  $I_{N-N} bpy = 0$ ).

Las ecuaciones finales que se generaron con los valores experimentales  $E_{1/2}$  y  $\text{Log D}$  en conjunto con la variable indicadora  $I_{N-N}$  (**Ecuaciones 12-15**) modelan exitosamente el comportamiento de la respuesta biológica *in vitro*, y describen tendencias similares para las 4 líneas celulares. Las ecuaciones predicen un incremento promedio en la actividad antiproliferativa de aproximadamente un orden de magnitud, el cual puede atribuirse al cambio de diimina en la estructura (*phen* o *bipy*). El signo para la variable  $I_{N-N}$  es positivo indicando un incremento notable en la actividad antiproliferativa para los complejos con fenantrolina como donador N-N.

$$\text{Log } 1/CI_{50} \text{ HeLa} = -3.78(\pm 1.71) + 1.19(\pm 0.41)I_{N-N} - 0.47(\pm 0.33)pE_{1/2} + 0.23(\pm 0.26) \text{Log D} \quad (\text{Ec. 12})$$
$$R^2 = 0.8262, R^2_{\text{adj}} = 0.7517, \text{sd} = 0.2263, F = 11.09, n = 11$$

$$\text{Log } 1/CI_{50} \text{ SiHa} = -4.94(\pm 0.56) + 1.35(\pm 0.11)I_{N-N} - 0.72(\pm 0.09)pE_{1/2} + 0.39(\pm 0.07) \text{Log D} \quad (\text{Ec. 13})$$
$$R^2 = 0.9893, R^2_{\text{adj}} = 0.9847, \text{sd} = 0.0597, F = 214.87, n = 11$$

$$\text{Log } 1/CI_{50} \text{ MCF-7} = -3.37(\pm 1.31) + 1.08(\pm 0.32)I_{N-N} - 0.40(\pm 0.25)pE_{1/2} + 0.42(\pm 0.20) \text{Log D} \quad (\text{Ec. 14})$$
$$R^2 = 0.9046, R^2_{\text{adj}} = 0.8636, \text{sd} = 0.1742, F = 22.11, n = 11$$

$$\text{Log } 1/CI_{50} \text{ HCT-15} = -4.57(\pm 1.18) + 1.49(\pm 0.29)I_{N-N} - 0.59(\pm 0.23)pE_{1/2} + 0.39(\pm 0.18) \text{Log D} \quad (\text{Ec. 15})$$
$$R^2 = 0.9449, R^2_{\text{adj}} = 0.9212, \text{sd} = 0.1565, F = 39.98, n = 11$$

## 5.2 Relación entre la toxicidad aguda ( $DL_{50}$ ) y la actividad antiproliferativa ( $CI_{50}$ ).

El análisis QSAR para  $DL_{50}$  se llevó a cabo siguiendo los mismos criterios antes planteados para el análisis de  $CI_{50}$ . Del análisis anterior se obtuvo la **Ecuación 16**, la cual muestra la misma tendencia general que se encontró previamente en el análisis de  $CI_{50}$  para las 4 líneas tumorales. Las variables independientes, los signos y los valores de los coeficientes de regresión en la **Ecuación 16** son equivalentes a los encontrados en las **Ecuaciones 12-15**, indicando que ambas actividades están cercanamente relacionadas. Los modelos de regresión lineal para la correlación entre  $DL_{50}$  y  $CI_{50}$  en las diferentes líneas celulares se muestran en la **Tabla 14**. El signo positivo de la pendiente en esta correlación nos lleva a pensar que el mecanismo de toxicidad *in vivo* es una extensión del mecanismo de citotoxicidad, es decir, es una consecuencia directa. Por otra parte el valor de la pendiente nos habla de la sensibilidad de la línea tumoral a los cambios en la estructura, siendo HCT-15 la única línea tumoral que es más sensible a los cambios en la estructura que el organismo completo. Esto no quiere decir que HCT-15 es la línea tumoral más sensible a estos compuestos, sino que los cambios en la estructura producen mayor variación en la actividad *in vitro* que en la actividad *in vivo*.



$$\text{Log } 1/\text{DL}_{50} = -2.63(\pm 0.49) + 0.47(\pm 0.12)I_{N-N} - 0.17(\pm 0.09)pE_{1/2} + 0.11(\pm 0.07)\text{Log } D \quad (\text{Ec. 16})$$

$$R^2 = 0.9373, R^2_{\text{adj}} = 0.9104, \text{sd} = 0.0519, F = 34.87, n = 11$$

**Tabla 14.** Toxicidad aguda ( $\text{DL}_{50}$  ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) en ratones machos ICR.) vs. concentración inhibitoria ( $\text{Cl}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ )) en líneas celulares HeLa, SiHa, MCF-7 y HCT-15:  $\text{Cl}_{50\text{línea celular}} = m\text{DL}_{50} + b$ . ( $R$ ), Coeficiente de correlación lineal; ( $SD$ ), desviación estándar; ( $n$ ), número de puntos en la curva; y ( $P$ ), valor de  $P$  para la prueba de  $t$  de la pendiente = 0.

Línea celular	$m$	$b$	$R$	$SD$	$n$	$P$
HeLa	0.72	-14.78	0.96	3.73	12	<0.0001
SiHa	0.64	-13.68	0.92	4.54	12	<0.0001
MCF-7	0.41	- 5.64	0.95	1.54	11	<0.0001
HCT-15	1.31	-29.46	0.98	4.08	12	<0.0001

### 5.3 QSAR empleando descriptores solamente para los ligantes.

Las tendencias y predicciones que se obtienen de las **Ecuaciones 12-16** pueden observarse también cuando se emplean las propiedades de los ligantes como variables predictoras en el modelo en vez de los valores experimentales. Tal y como se discutió previamente, la basicidad del ligante N-N influencia el comportamiento redox y, por tanto, las propiedades electrónicas del cobre. La relación entre estas propiedades presenta una tendencia inversa proporcional entre  $E_{1/2}$  y  $pK_a$  *phen* (**Figura 23**). Esta relación permite el cambio del descriptor electrónico sin cambios significativos en la interpretación del modelo.

Por otra parte, para el grupo de complejos *acac* los cambios en la hidrofobicidad dependen solamente de los sustituyentes en el donador N-N debido a que todo este grupo de complejos comparte el mismo ligante secundario. La **Ecuación 11 (Figura 24)** demuestra que existe una buena correlación entre los valores experimentales  $\text{Log } D$  para los complejos completos y los valores de calculados para el ligante N-N ( $\text{CLog } P_{N-N}$ ). Por tanto, la influencia de la hidrofobicidad sobre la actividad biológica puede modelarse tanto con  $\text{Log } D$  experimental como con  $\text{CLog } P_{N-N}$  obteniendo resultados equivalentes.

Las dos hipótesis anteriores fueron tomadas en consideración para construir un nuevo conjunto de **Ecuaciones 17-21** donde se sustituye en el análisis estadístico las variables descriptoras



experimentales  $pE_{1/2}$  y Log D por el pKa del ligante diimina y el  $CLogP_{N-N}$ . El nuevo modelo describe las mismas tendencias encontradas antes en las **Ecuaciones 12-16**. En las **Ecuaciones 17, 18 y 20** el parámetro  $CLog P_{N-N}$  desaparece, y en la **Ecuación 21** su contribución es muy pequeña a pesar de que el término tiene significancia estadística. Este hecho lleva a pensar que la contribución de la hidrofobicidad en este modelo es muy pequeña.

$$\text{Log } 1/Cl_{50 \text{ HeLa}} = -2.94(\pm 0.72) + 0.73(\pm 0.30) I_{N-N} + 0.31 (\pm 0.14) pKa \textit{phen} \quad (\text{Ec. 17})$$

$R^2 = 0.8348, R^2_{\text{adj}} = 0.7935, sd = 0.2077, F = 20.21, n = 11$

$$\text{Log } 1/Cl_{50 \text{ SiHa}} = -3.11(\pm 0.54) + 0.82(\pm 0.23) I_{N-N} + 0.35(\pm 0.10) pKa \textit{phen} \quad (\text{Ec. 18})$$

$R^2 = 0.9218, R^2_{\text{adj}} = 0.9022, sd = 0.1546, F = 47.14, n = 11$

$$\text{Log } 1/Cl_{50 \text{ MCF-7}} = -2.87(\pm 0.55) + 0.70(\pm 0.25) I_{N-N} + 0.19(\pm 0.11) pKa \textit{phen} + 0.16(\pm 0.09) CLog P_{N-N} \quad (\text{Ec. 19})$$

$R^2 = 0.9269, R^2_{\text{adj}} = 0.8956, sd = 0.1557, F = 29.59, n = 11$

$$\text{Log } 1/Cl_{50 \text{ HCT-15}} = -3.81(\pm 0.61) + 1.04(\pm 0.26) I_{N-N} + 0.43(\pm 0.12) pKa \textit{phen} \quad (\text{Ec. 20})$$

$R^2 = 0.9325, R^2_{\text{adj}} = 0.9156, sd = 0.1763, F = 55.23, n = 11$

$$\text{Log } 1/DL_{50} = -2.44(\pm 0.14) + 0.30(\pm 0.06) I_{N-N} + 0.12(\pm 0.03) pKa \textit{phen} + 0.03(\pm 0.02) Clog P_{N-N} \quad (\text{Ec. 21})$$

$R^2 = 0.9811, R^2_{\text{adj}} = 0.9730, sd = 0.0307, F = 121.05, n = 11$

Los hallazgos que surgen del análisis QSAR, y las comparaciones realizadas para todas las ecuaciones, revelan que las constantes fisicoquímicas para los ligantes, o incluso las constantes de sustituyente, pueden emplearse como variables predictivas en los modelos QSAR para los complejos de coordinación con buenos resultados. Es importante resaltar que el valor exacto para una propiedad cualquiera de un complejo de coordinación es diferente al del ligante; sin embargo, la tendencia relativa se conserva debido a que ambos valores son resultado del mismo cambio, y por tanto, su empleo es predictivo en un modelo QSAR.

#### 5.4 Análisis de la influencia del ligante secundario

Una vez que se estableció la forma en la que se modifica la actividad como resultado de las variaciones en la estructura del donador N-N, el siguiente paso para el entendimiento de las propiedades relacionadas con la actividad biológica de este tipo de complejos de cobre es el análisis de la influencia del ligante secundario. Con el objetivo de obtener ecuaciones QSAR que ayuden a entender estos efectos, se seleccionó al grupo *phen* como segundo subconjunto de complejos, en el cual el ligante secundario cambia de *acac* a *gly*. Este cambio se tomó en cuenta



mediante la introducción de una nueva variable indicadora ( $I_{\text{ligante } 2^{\circ}}$ ) en el modelo. Como se explicó con anterioridad, este tipo de variable permite evaluar la magnitud de la influencia de los cambios estructurales en la actividad biológica, sin conocer los cambios específicos en cada una de las propiedades fisicoquímicas que son resultado directo de esas modificaciones. En este tercer análisis, la variable toma el valor de 1 para los complejos de *acac* y el valor de cero para los complejos *gly*. Debido a que se demostró con anterioridad que los efectos hidrofóbicos en el complejo se pueden estimar adecuadamente empleando  $\text{CLog } P_{N-N}$ , el valor experimental  $\text{Log } D$  para los complejos con glicina no se obtuvo, y en su lugar se empleó la sumatoria del  $\text{CLog } P$  para ambos ligantes ( $\Sigma \text{CLog } P = \text{CLog } P_{\text{phen}} + \text{CLog } P_{\text{ligante } 2^{\circ}}$ ). Con estas consideraciones se realizó el análisis estadístico y se obtuvieron las **Ecuaciones 22- 25** para las  $\text{Cl}_{50}$  en las 4 líneas tumorales. La predicción de la actividad antiproliferativa empleando estas ecuaciones se graficó contra los valores experimentales en la **Figura 26**.

$$\text{Log } 1/\text{Cl}_{50 \text{ HeLa}} = -3.13(\pm 0.51) - 0.42(\pm 0.11) \text{pE}_{1/2} + 0.17(\pm 0.05) \Sigma \text{CLog } P \quad (\text{Ec. 22})$$

$R^2 = 0.8301, R^2_{\text{adj}} = 0.8089, \text{sd} = 0.1728, F = 39.10, n = 19$

$$\text{Log } 1/\text{Cl}_{50 \text{ SiHa}} = -3.04(\pm 0.59) - 0.42(\pm 0.12) \text{pE}_{1/2} + 0.17(\pm 0.06) \Sigma \text{CLog } P \quad (\text{Ec. 23})$$

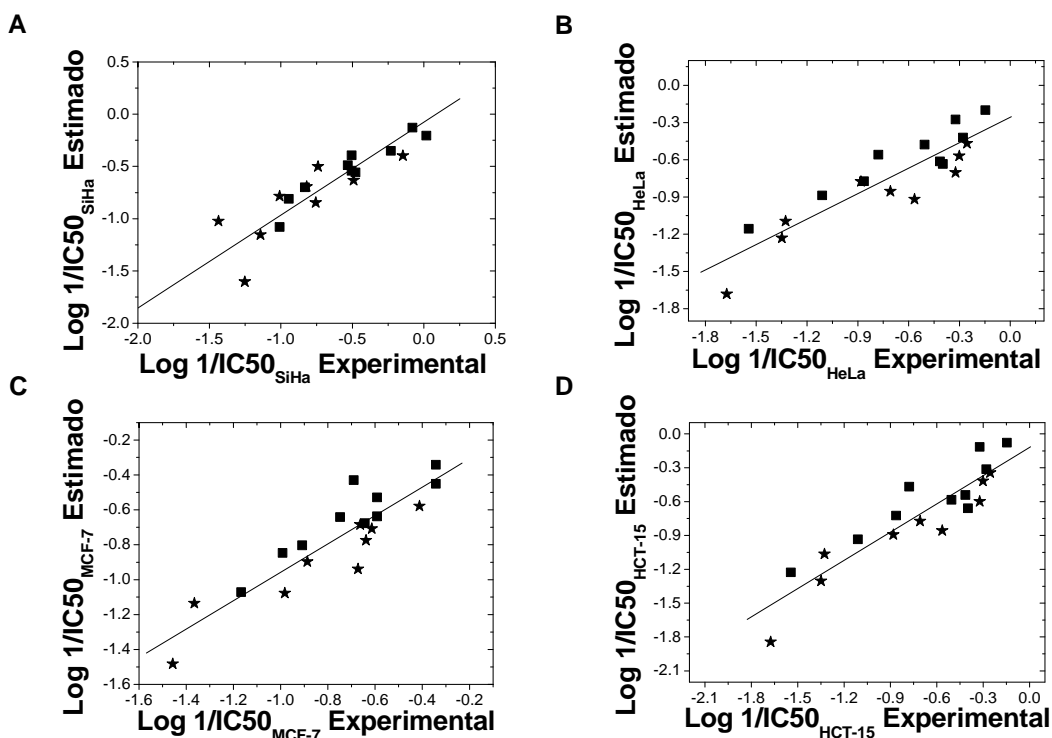
$R^2 = 0.7840, R^2_{\text{adj}} = 0.7570, \text{sd} = 0.1995, F = 29.03, n = 19$

$$\text{Log } 1/\text{Cl}_{50 \text{ MCF-7}} = -2.50(\pm 0.43) - 0.28(\pm 0.09) \text{pE}_{1/2} + 0.16(\pm 0.04) \Sigma \text{CLog } P \quad (\text{Ec. 24})$$

$R^2 = 0.8126, R^2_{\text{adj}} = 0.7892, \text{sd} = 0.1434, F = 34.69, n = 19$

$$\text{Log } 1/\text{Cl}_{50 \text{ HCT-15}} = -3.74(\pm 0.60) - 0.57(\pm 0.13) \text{pE}_{1/2} + 0.16(\pm 0.06) \Sigma \text{CLog } P \quad (\text{Ec. 25})$$

$R^2 = 0.8342, R^2_{\text{adj}} = 0.8134, \text{sd} = 0.2050, F = 40.24, n = 19$



**Figura 26.** Gráficas de actividades antiproliferativas estimadas versus observadas para el grupo de complejos phen en: A. SiHa ( $1/\text{IC}_{50}^{\text{SiHa}}$ ); B. HeLa ( $1/\text{IC}_{50}^{\text{HeLa}}$ ); C. MCF-7 ( $1/\text{IC}_{50}^{\text{MCF-7}}$ ); D. HCT-15 ( $1/\text{IC}_{50}^{\text{HCT-15}}$ ). Complejos  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{acac})]^+$ , (-■-); complejos  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gly})]^+$ , (-\*-).

La contribución más importante al modelo es el valor experimental  $E_{1/2}$ , lo cual sugiere la participación del cobre en el mecanismo de acción. En el primer análisis QSAR (**Ecuaciones 12 - 16**) se encontró que la actividad biológica incrementa para los complejos con propiedades oxidantes más débiles; la misma tendencia se conserva en este nuevo grupo de ecuaciones (**22-25**).

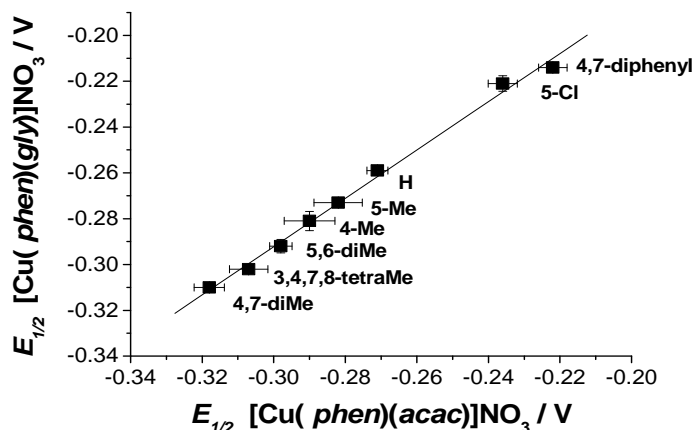
Así mismo, de las mismas ecuaciones se deduce que la variación en la hidrofobicidad debida al cambio de ligante secundario influye positivamente en la actividad, ya que el signo para esta variable es positivo. Esto significa que los complejos de *acac* los cuales son más hidrofóbicos que los de *gly* presentan también un sutil incremento en la actividad con respecto a sus análogos con glicinato. La ausencia de la variable indicadora  $I_{\text{ligante } 2^\circ}$  en las **Ecuaciones 22 - 25** y la presencia de  $\Sigma\text{LogP}$  en su lugar, podría significar que la única contribución de esta parte de la molécula a la actividad biológica es el cambio en la hidrofobicidad, lo cual facilita el transporte no regulado a través de membranas. Sin embargo, es necesario estudiar más variaciones estructurales en el ligante secundario con el objetivo de esclarecer si la hipótesis propuesta explica las diferencias existentes en la actividad para un grupo más amplio y variado de modificaciones en esta zona de la

molécula, ya que existen otras propiedades, como la estabilidad del complejo, que también se ve afectada por el cambio de ligante secundario.

En la **Figura 26**, se aprecia que el intervalo de actividad para los compuestos con *acac* es muy similar al de los compuestos con *gly*, existiendo solamente ligeras diferencias. En todas las ecuaciones, la actividad biológica está influenciada significativamente por las propiedades electrónicas del cobre ( $E_{1/2}$ ), siendo esta variable la segunda en importancia para el modelo después del tipo de diimina ( $I_{N-N}$ ). Este comportamiento llevó al análisis de los  $E_{1/2}$ , el cual es muy cercano entre los compuestos que comparten el mismo donador N-N encontrando así la **Ecuación 26 (Figura 27)**, la cual describe la relación entre grupos en función de  $E_{1/2}$ .

$$E_{1/2} \text{ complejos gly} = 1.05 E_{1/2} \text{ complejos acac} + 0.02 \quad (\text{Ec. 26})$$
$$R^2 = 0.9973, \text{ sd} = 0.00284, N = 8$$

La pendiente en la **Ecuación 26** es cercana a uno, lo cual significa que el  $E_{1/2}$  en ambos grupos es muy similar y por tanto determinado casi exclusivamente por la basicidad del donador N-N. Este hecho explica porque el cambio de ligante secundario tiene un efecto tan pequeño en la actividad biológica, ya que la diferencia principal en las propiedades entre los dos grupos de compuestos es la hidrofobicidad del ligante secundario, y esta propiedad es la contribución más pequeña al modelo. Sin embargo, al igual que en el caso de la influencia de la hidrofobicidad, es recomendable evaluar un grupo de compuestos con modificaciones más variadas en el ligante secundario a fin de comprobar que esta observación es válida.



**Figura 27.** Potencial de media onda para la pareja  $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$  de complejos  $[\text{Cu(phen)(acac)}]^+$  versus complejos  $[\text{Cu(phen)(gly)}]^+$ . Los valores están estandarizados contra la pareja ferroceno/ferricinio ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) y reportados en voltz  $\pm$  SD.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo es un esfuerzo por comprender las propiedades estructurales que influyen y determinan la actividad antiproliferativa y la toxicidad de estos agentes con potencial antitumoral, con la finalidad de guiar su re-diseño y evaluación hacia las moléculas más potentes. La comprensión de estos factores logrará reducir los cernimientos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* y, al mismo tiempo, optimizará los recursos de investigación.

En este estudio se emplearon dos subconjuntos de datos para realizar un análisis QSAR de dos dimensiones, empleando como variables predictivas los valores experimentales para los quelatos o bien los valores reportados en la literatura para los ligantes. En ambos casos, se obtuvieron tendencias similares y de esta forma se validó el uso de constantes de propiedades fisicoquímicas de los ligantes para describir el comportamiento de los complejos. Las ecuaciones QSAR que se obtuvieron como resultado modelan satisfactoriamente la actividad biológica ( $CI_{50}$  o  $DL_{50}$ ) mostrando tendencias similares en todos los casos. Así mismo, los resultados apoyan las hipótesis existentes hasta la fecha acerca del mecanismo de acción.

Los resultados revelaron que el tercer anillo aromático en el ligante diimina es necesario para incrementar la actividad del complejo. La razón de este incremento en la actividad a causa del cambio de ligante diimina podría ser la diferencia de afinidad que estos ligantes tienen hacia el ADN. En la literatura se encuentra ampliamente reportado que la fenantrolina y la bipyridina, como ligantes libres o bien como parte de un complejo de coordinación, son capaces de unirse al ADN mediante interacciones intercalantes y no intercalantes [45]. Esta capacidad está planteada como parte del mecanismo de acción antitumoral de los compuestos de cobre conocidos como Casiopeínas®.

Los intercalantes del ADN representan una de las clases más importantes de agentes anticancerosos. Los requerimientos estructurales para esta actividad se encuentran bien caracterizados y documentados en la literatura, siendo la presencia de sistemas aromáticos policíclicos una característica que todos los intercalantes comparten [262, 263]. El sistema de anillos aromáticos más extendido en la fenantrolina podría ser la causa del incremento en la actividad del grupo de complejos con este ligante en su estructura, ya que permite incrementar la afinidad de unión con el ADN. La disminución de la actividad tóxica y antiproliferativa como resultado de la ausencia del tercer anillo aromático coincide con la disminución de las constantes de unión a ADN reportadas por Patra y cols. [166, 168, 169], y los estudios sobre la orientación de la unión de los complejos  $Cu(phen)(L)^+$  al ADN por resonancia paramagnética del electrón (EPR) realizados por Chikira y cols. [79]. En ambos estudios, se demostró que los tres anillos fusionados de la fenantrolina son críticos para que se lleve a cabo la interacción tipo intercalante de estos compuestos.





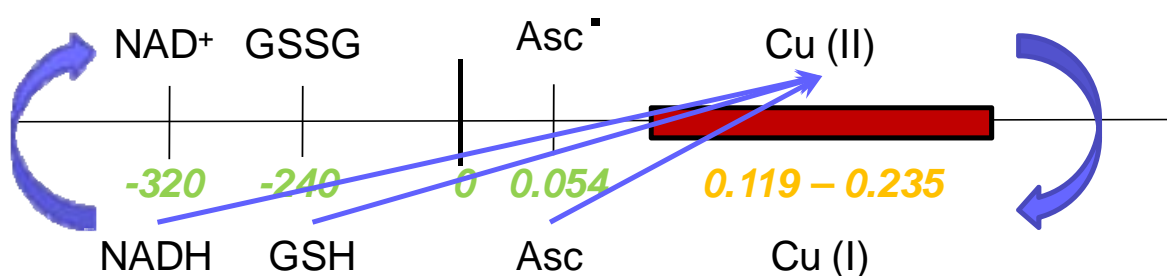
A pesar de que estos resultados indican una relación positiva entre la presencia del sistema de tres anillos aromáticos fusionados y la actividad citotóxica, y esta característica a su vez se encuentra relacionada con la unión al ADN tipo intercalante, normalmente se acepta que la intercalación en el ADN es una condición necesaria pero no suficiente para la actividad antitumoral de los intercalantes [262].

Por otra parte, se encontró también que otra contribución importante al modelo QSAR son los valores  $E_{1/2}$ , los cuales parecen explicar la mayor parte de la actividad antiproliferativa *in vitro*. La importancia de esta variable en las ecuaciones nos lleva a pensar que el cobre y sus propiedades electrónicas están directamente involucrados en el mecanismo de acción tóxico. Esto es posible debido a que el cobre es un metal activo en reacciones de óxido-reducción y es muy eficiente en la catálisis de reacciones de oxidación mediadas por oxígeno. Ciertamente, los complejos de cobre-fenantrolina han sido caracterizados durante las últimas 3 décadas como agentes para oxidar al ADN [167, 264, 265].

Debido a lo anterior se ha propuesto por el grupo de trabajo que la toxicidad de estos compuestos puede ser el resultado del daño oxidante al ADN, y/o otros blancos críticos como proteínas y membranas. Este efecto ha sido observado en varios modelos donde el incremento de ROS es concomitante con la degradación del ADN [164], oxidación del ADN [165], reducción de la concentración de glutatión reducido [160] y/o muerte celular por mecanismos apoptóticos y no apoptóticos dependientes de la dosis [162, 163, 187].

El incremento de ROS podría tener varios orígenes, por ejemplo ser el resultado de la toxicidad mitocondrial que estos complejos tienen [171, 190]; o bien, originarse directamente de la catálisis del ciclo de reacciones Haber-Weiss (reacción de Fenton – **Figura 6**) la cual está comúnmente asociada con el cobre y sus complejos [110, 266]. Este último mecanismo requiere de la presencia y activación de  $H_2O_2$  además de un agente reductor disponible para producir al radical hidroxilo  $\cdot OH$ . Se sabe que la concentración de  $H_2O_2$  está estrictamente regulada por los sistemas enzimáticos antioxidantes en las células [88]; sin embargo, debido a que las células cancerosas son muy activas en su metabolismo energético producen altos niveles de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y otros ROS [89, 267]. Las concentraciones de ROS actúan como moduladores de varias señales celulares que controlan paradójicamente la promoción de la proliferación celular y la muerte celular por apoptosis dependiendo de la naturaleza y del nivel de ROS producido [88, 268]. Este hecho permite explotar la sobreproducción de ROS en las células cancerosas como un blanco terapéutico a través de la producción de muerte celular selectiva mediante la amplificación del estrés oxidante pre-existente [89, 90, 268]. Los complejos de cobre estudiados en este trabajo podrían contribuir a intensificar el desbalance redox mediante la activación de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton, provocando de esta forma, daño celular y en consecuencia muerte celular por apoptosis o algún otro mecanismo. Algunos complejos de coordinación de bajo peso molecular que contienen en su estructura metales activos en reacciones de óxido-reducción, incluyendo algunos complejos de cobre, tienen actividad antitumoral y la reacción de Fenton con  $H_2O_2$  para producir radical  $\cdot OH$  es el mecanismo de acción propuesto [45].

La reacción de Fenton (**Figura 6**) requiere de la reducción de Cu (II) a Cu (I) mediante algún agente reductor intracelular o bien con  $O_2^{\cdot-}$ . El potencial de media onda de la pareja Cu(II)/Cu(I) para los complejos estudiados varía entre 0.119 y 0.235 V/SHE, mientras que los potenciales redox de algunos reductores celulares como NADH, GSH, y ascorbato son -0.320 [269], -0.240 [270, 271], y + 0.054 V/SHE [272, 273], respectivamente. Debido a lo anterior, la reducción del centro metálico mediante reductores celulares está termodinámicamente permitida (**Figura 28**), y en consecuencia, los complejos pueden catalizar la oxidación de biomoléculas y producir  $\cdot OH$ , tal y como se espera de metales de transición como hierro y cobre [274].



**Figura 28.** Comparación de los potenciales redox de algunos reductores celulares contra el intervalo de potencial redox de los complejos estudiados  $[Cu(N-N)acac]NO_3$  y  $[Cu(phen)(gly)]NO_3$ . Los potenciales están reportados en voltz contra el electrodo normal de hidrógeno (SHE).

Las ecuaciones QSAR predicen un incremento de actividad para aquellos complejos que tengan sustituyentes electrodonadores en el ligante diimina, y por tanto sean oxidante más débiles. En efecto, los oxidantes más débiles son más difíciles de reducir, pero una vez reducidos pueden ser mejores agentes reductores, lo cual es necesario para la reacción Fenton subsecuente. La actividad citotóxica, a través de la generación de ROS, puede ser dependiente de la velocidad de alguna de estas reacciones, la cual a su vez es dependiente de las propiedades electrónicas del centro metálico. La pregunta acerca de cómo varían las constantes de velocidad de reacción en función del potencial redox queda aún por resolverse; sin embargo, es factible proponer que los complejos de cobre con  $E_{1/2}$  desplazados hacia potenciales más negativos podrían tener constantes de velocidad más grandes en el paso limitante de la reacción.

Con el objetivo de ilustrar que este tipo de comportamiento es posible, se tomaron algunos datos reportados en la literatura para ser analizados (**Tabla 15**). El potencial redox de la pareja Cu(II)/Cu(I) para tres complejos bis quelatos de fenantrolina Cu(II)  $[Cu(phen)_2^{2+}]$  [253] y las pseudo constantes de velocidad de la catálisis de oxidación de GSH por oxígeno y  $H_2O_2$  para producir  $\cdot OH$  [275] presentan una relación lineal con coeficientes de correlación (R) de -0.9914 y -0.9999, respectivamente. Ambas oxidaciones son eficientemente catalizadas por los complejos  $Cuphen_2^{2+}$ ,



los mecanismos son diferentes y los intermediarios involucrados también; sin embargo, sus constantes de velocidad condicionadas incrementan con el desplazamiento del  $E^{\circ} \text{Cuphen}_2^{2+}$  hacia oxidantes más débiles (**Tabla 15**). Es necesario resaltar que  $E^{\circ} \text{Cuphen}_2^{2+}$  también está relacionado linealmente con  $E_{1/2} \text{ acac}$  ( $r=0.9831$ ) y  $E_{1/2} \text{ gly}$  ( $r=0.9787$ ). Estas relaciones apoyan la hipótesis acerca de que la velocidad de producción de ROS incrementa para compuestos con  $E_{1/2}$  más negativos, y puede explicar la tendencia encontrada en los modelos QSAR, los cuales como se ha mencionado, predicen un incremento en la actividad biológica para los oxidantes más débiles. En resumen, mientras más rápido se incrementa el desbalance redox en la célula, mayor actividad antiproliferativa tendrá el complejo.

**Tabla 15.** Cinética para reacciones catalizadas por complejos de cobre y potenciales de óxido-reducción para la pareja Cu(II)/Cu(I).

phen	GSH + O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	E <sup>o</sup> Cuphen <sub>2</sub> <sup>2+</sup> <sup>b</sup>	E <sub>1/2</sub> acac Complejos <sup>c</sup>	E <sub>1/2</sub> gly Complejos <sup>c</sup>
	$k_0, \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \times 10^6$	$k_2, \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$	mV vs. NHE		
H	5.52	17.1	321	186	198
4,7-diMe	48.3	30.7	255	139	147
5,6-diMe	18	22.5	294	159	165

<sup>a</sup> constante de velocidad condicionada a 25°C para la oxidación de GSH por O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [275]

<sup>b</sup> Potencial de óxido-reducción para los complejos cobre (II) bis-fenantrolina. Los valores originales contra el electrodo estándar de calomel (SCE) [253] se convirtieron en mV vs. electrodo normal de hidrógeno (SHE) empleando el valor de 241.2 mV vs. SHE para SCE [276].

<sup>c</sup> Los potenciales de media onda para los grupos de complejos acetilacetato y glicinato fueron convertidos en mV. Vs SCE empleando el valor experimental de la pareja ferroceno/ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) vs. SCE seguido de la conversión en mV vs SHE tal y como se hizo en b.

De acuerdo al análisis, la variable con menor participación en el modelo es la hidrofobicidad. Esta propiedad puede participar tanto en la interacción con algún receptor como en el transporte a través de membranas. Con respecto a este último, el cobre es un metal cuya concentración está estrictamente regulada en los ambientes celulares, posiblemente debido a la catálisis antes mencionada en la que puede participar y causar daño oxidativo como resultado si no está bien controlada. Se sabe que el cobre se incorpora a las células como Cu(I) y permanece en estado reducido mientras el tráfico intracelular lo lleva a su destino final en las enzimas que lo contienen [277]. La absorción celular de este metal está mediada por un transportador de membrana específico llamado Ctr1, el cual está regulado por las vías de excreción y secreción del mismo ión [123, 278]. Es importante mencionar, que recientemente se ha demostrado que el ligante 1,10-fenantrolina puede facilitar el transporte no-regulado de cobre, y en consecuencia, causar una sobrecarga intracelular de cobre en los cultivos celulares [279], la cual es concomitante con la modificación oxidativa al ADN, disminución de las concentraciones de glutatión y apoptosis. Este efecto es atribuido a la hidrofobicidad de los ligantes, quienes ayudan al transporte pasivo al incrementar la hidrofobicidad del ión cobre, y podría explicar la contribución positiva de Log P en



los modelos QSAR. Resulta interesante, de acuerdo a los resultados, que la hidrofobicidad sea la contribución más pequeña al modelo; de hecho, en algunas ecuaciones no se requiere de este parámetro a pesar de la variación en las características de los sustituyentes. Este hallazgo nos lleva a pensar que los requisitos de hidrofobicidad para la actividad *in vitro* se satisfacen en la mayor parte de las moléculas evaluadas; esto significa que la hidrofobicidad no es el principal factor limitante en el mecanismo de acción. Los ligantes actúan como acarreadores en la absorción celular de cobre (II) [279]; sin embargo, la influencia de los sustituyentes en los parámetros electrónicos y el tipo de diimina gobiernan la actividad a nivel molecular. Es posible que las propiedades hidrofóbicas se vuelvan más importantes y tengan una influencia directa en la actividad biológica *in vivo*, donde esta propiedad es necesaria para el transporte del fármaco hasta el sitio de acción.

En este trabajo se correlacionaron las propiedades fisicoquímicas con la toxicidad en los cultivos celulares y en ratones ICR *in vivo*. Es de esperarse, que si la correlación es similar en ambos modelos (*in vitro e in vivo*), entonces al menos una parte de la toxicidad oxidante que se observa en el cultivo celular puede estar presente en el modelo murino. Lo anterior es consistente con la reducción de la toxicidad *in vivo* cuando se coadministran antioxidantes con este tipo de compuestos[203]. La relación cercana entre la citotoxicidad y la toxicidad aguda *in vivo*, provocan la preocupación acerca de la selectividad en la producción de daño oxidante en las células cancerosas; sin embargo, se requiere realizar experimentos adecuados para evaluar su eficacia terapéutica y la selectividad de estos agentes con potencial antitumoral que actúan a través de la generación de estrés oxidante.

Este trabajo ha demostrado que la citotoxicidad de los complejos de cobre conocidos como Casiopeínas® puede ser descrita adecuadamente con ecuaciones QSAR construidas tanto con valores experimentales para el complejo completo, como con descriptores solo para los ligantes. Estas ecuaciones, a su vez, proporcionan un modelo para diseñar análogos potencialmente más citotóxicos a través de la elección adecuada de los sustituyentes y ligantes. En este punto se sugiere encaminar las evaluaciones *in vivo* hacia los complejos que contengan en su estructura los ligantes 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina, 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina y 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina. Los modelos QSAR también apoyan, al menos en parte, los mecanismos de acción propuestos para la citotoxicidad de estos compuestos. A pesar de que la información con la que se cuenta acerca del comportamiento de estos compuestos en sistemas biológicos apunta a una compleja red de mecanismos de toxicidad, es razonable proponer que la intercalación al ADN y la producción de ROS son los dos factores dominantes. Finalmente, la contribución exacta que tiene el segundo ligante a la actividad queda aún por ser satisfactoriamente estudiada.



## APÉNDICE I: Desarrollo del método analítico para la determinación del coeficiente de distribución Log D

### 1. Estableciendo el método.

La determinación del coeficiente de reparto octanol/agua (Log P) se llevó a cabo por el método de “shake flask”, el cual consiste en presaturar dos fases inmiscibles a la misma concentración con el analito de prueba y ponerlas en contacto con agitación vigorosa y a temperatura constante por un periodo que puede variar de una hora a una semana en función del tiempo que le tome al sistema llegar al equilibrio. El análisis cuantitativo de cada fase una vez alcanzado el equilibrio permite el cálculo del Log D.

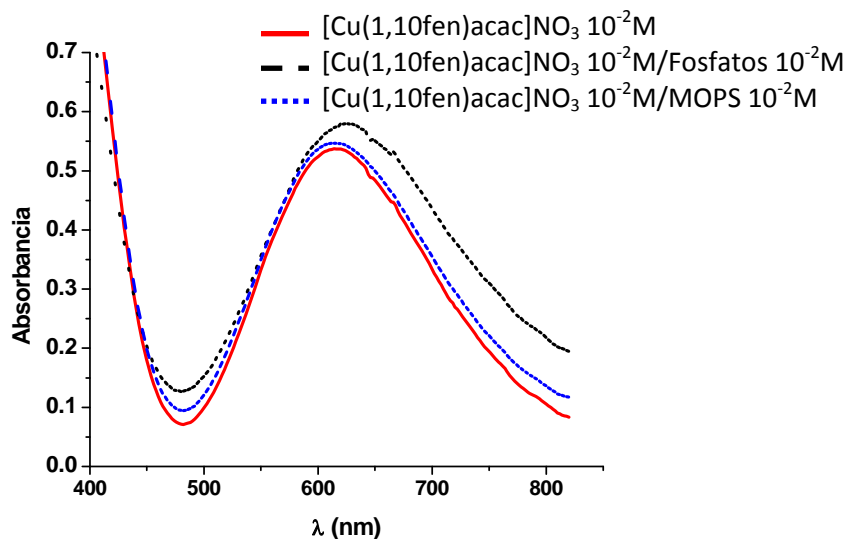
Este método requiere mantener constante el pH en la fase acuosa, la temperatura, y el tiempo que permanecen en agitación las fases, para determinar como se fijarían estas variables y las condiciones adecuadas en las que se debería llevar a cabo la cuantificación espectrofotométrica se montaron los siguientes experimentos:

#### 1.1 Selección del amortiguador de pH:

La fase acuosa requiere de un pH=7.4 para conservar las condiciones del sistema lo más cercano posible a las condiciones biológicas, por lo cual se debe hacer uso de un amortiguador de pH inerte y no extraíble a la fase orgánica. Entre los amortiguadores no extraíbles más usados en estas determinaciones se encuentran los fosfatos y citratos [217]; sin embargo, con frecuencia se comportan como ligantes y existe el riesgo de que reaccionen con los complejos de coordinación empleados incorporándose en la esfera de coordinación.

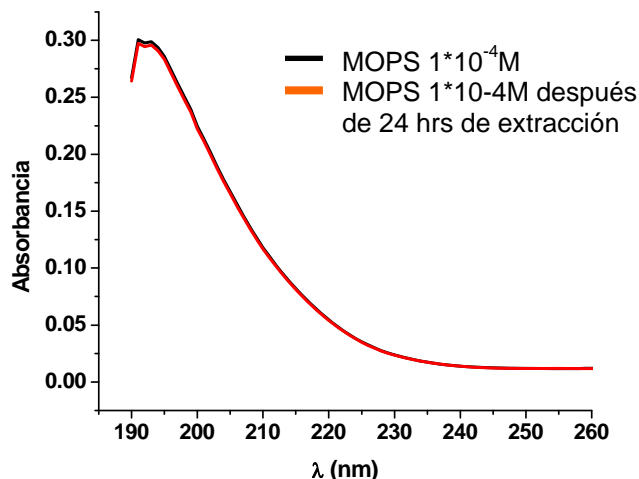
Para seleccionar el amortiguador adecuado se prepararon soluciones de  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acac})]\text{NO}_3$   $10^{-2}\text{M}$  en: (a) amortiguador de fosfatos pH= 7.4,  $10^{-2}\text{M}$ ; (b) amortiguador MOPS (ácido 4-Morpholinopropanosulfónico) pH = 7.4,  $10^{-2}\text{M}$ ; y (c)  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Las soluciones fueron analizadas por espectrofotometría Uv-Vis en la región visible del espectro (*Agilent 8453 spectrophotometer Uv-vis, Agilent Technologies*), con el objetivo de identificar desplazamientos de la banda de absorción característica con respecto al espectro acuoso ( $\lambda_{\text{max}} = 614 \text{ nm}$ ), dicho desplazamiento es indicador de una reacción entre el analito y el amortiguador.

Los resultados de este análisis muestran que el amortiguador de fosfatos es coordinante con este tipo de compuestos ya que provocó un desplazamiento en el máximo de absorción de 614 nm a 630 nm ( $\Delta\lambda = 16$  nm), por lo cual no es adecuado su uso en las determinaciones. Por el contrario la solución preparada en MOPS no provocó ningún desplazamiento en el máximo de 614 nm (**Figura 29**) por lo que se procedió a verificar que no fuese extraíble bajo las condiciones del procedimiento.



**Figura 29** Espectros de absorción en la región visible para  $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(acac)]NO_3 10^{-2}M$  en diferentes amortiguadores de pH.

Este segundo experimento consistió en poner en contacto buffer MOPS pH=7.4,  $1.7 \cdot 10^{-4}M$  y la fase orgánica (1-octanol 99+%, ACS Spectrophotometric grade, Aldrich) durante 24 horas en agitación constante y ausencia de luz. Transcurrido este periodo la solución se centrifugó a 3600 rpm durante 10 minutos para romper la emulsión, y las fases se separaron con una pipeta pasteur. Para cuantificar la concentración de MOPS, la fase acuosa se analizó espectrofotométricamente a 192 nm al inicio y final del experimento. Se encontró que la concentración permaneció constante después de 24 horas de extracción, con lo cual se concluye que este amortiguador no es extraíble en las condiciones de trabajo y por tanto reúne los dos requisitos necesarios para su empleo en las determinaciones del coeficiente de partición. (**Figura 30**)



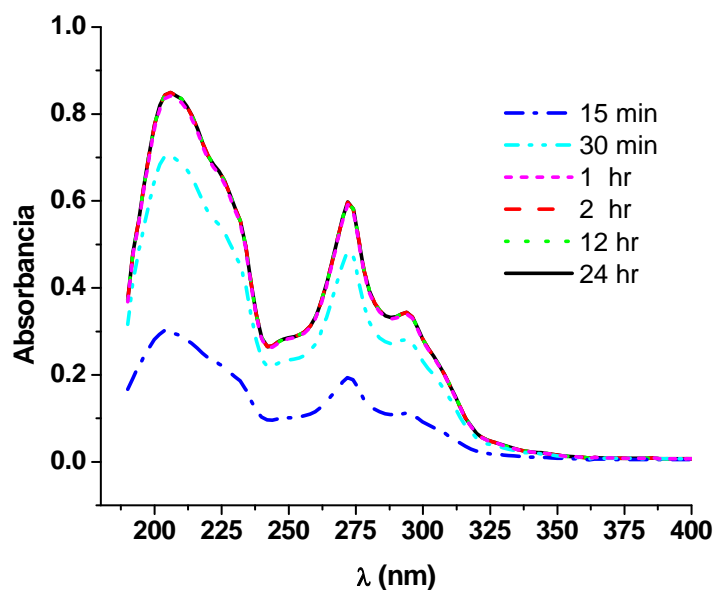
**Figura 30** Espectros de absorción para MOPS  $1 \cdot 10^{-4}$  M antes y después de una extracción por 24 horas con octanol a  $25^{\circ}\text{C}$  y ausencia de luz.

## 1.2 Selección de la longitud de onda y selectividad del método.

Todos los compuestos analizados en este trabajo presentan dependiendo del compuesto de 2 a 3 máximos de absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético debidos a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . El primero alrededor de 200 nm y el segundo entre 270 nm y 300 nm. Para evitar interferencias en las mediciones debidas a la absorción del buffer MOPS ( $\lambda_{\text{max}} = 192$  nm) y del octanol (zona de absorción: 190 nm - 250 nm) se seleccionó el segundo máximo de absorción para realizar las determinaciones.

## 1.3 Determinación del periodo de tiempo

Para determinar el periodo de tiempo adecuado para que el sistema llegue al equilibrio se prepararon soluciones de  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acac})]\text{NO}_3$   $10^{-4}\text{M}$  en octanol y en amortiguador MOPS  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.02$ ,  $10^{-3}\text{M}$ . Las fases se pusieron en contacto con agitación constante a  $T = 25^{\circ}\text{C}$  por periodos de 15 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 12 hr, y 24 hr. Concluido el periodo correspondiente, las muestras se centrifugaron y se separaron las fases para ser analizadas espectrofotométricamente en la región Uv. El ensayo se realizó por triplicado y se encontró que a partir de 1 hr no hay cambios en la concentración de las fases (**Figura 31**), por lo que se concluyó que al sistema le toma alrededor de 1 hora llegar al equilibrio. En base a estos resultados y para garantizar el equilibrio en todas las muestras se fijó un periodo de 3 horas de contacto para realizar las determinaciones.



**Figura 31** Espectro de absorción Uv de  $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})acac]NO_3$  en MOPS  $10^{-3}M$  pH= 7.4 después de extracciones octanol/MOPS  $10^{-3}M$  con diferentes periodos de incubación

#### 1.4 Linealidad.

Se prepararon curvas de calibración para cada uno de los compuestos a analizar en el intervalo de 0.2 a 0.8 unidades de absorbancia empleando la longitud de onda del segundo máximo de absorción, obteniendo los resultados que a continuación se presentan en la **Tabla 16** para ambas fases. Estos datos se emplearon para la cuantificación de la concentración del analito en ambas fases durante la determinación del Log D.



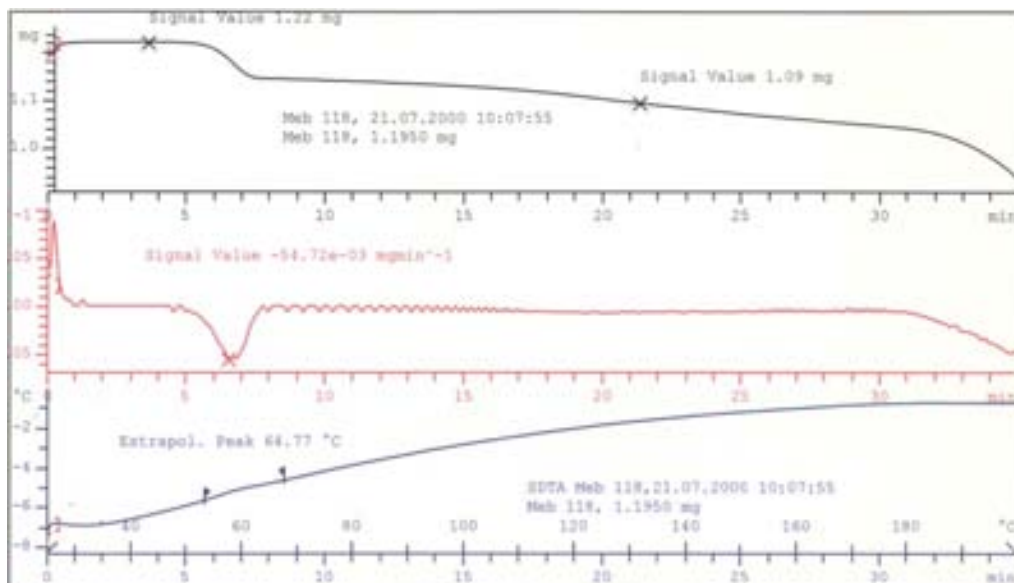


**Tabla 16.** Datos de las curvas de calibración realizadas para cada analito:  $\lambda$  = longitud de onda en nm, R = coeficiente de correlación lineal,  $\varepsilon$  = Coeficiente de absortividad molar.

Compuesto	Fase acuosa				Fase orgánica			
	$\lambda$	R	$\varepsilon$	Ordenada al origen	$\lambda$	R	$\varepsilon$	Ordenada al origen
[Cu(1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	272	0.9993	29859.67	0.033	274	0.9999	32057.61	-0.013
[Cu(4-me-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	272	0.9998	40498.57	5.9*10 <sup>-4</sup>	274	0.9997	39929.19	-0.012
[Cu(5-me-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	277	0.9999	45652.81	-0.004	279	0.9995	45458.44	-0.004
[Cu(4,7-dime-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	273	0.9999	44271.32	0.014	274	0.9999	47796.47	-0.010
[Cu(5,6-dime-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	282	0.9996	44611.69	0.009	283	0.9998	47416.46	-0.013
[Cu(3,4,7,8-tetrame-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	278	0.9989	41915.30	0.016	280	0.9999	47719.2384	0.002
[Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	281	0.9998	42576.56	-0.027	285	0.9999	41603.97	-0.016
[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	286	0.9997	57409.84	-0.035	289	0.9999	55730.08	-0.011
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	280	0.9999	33187.57	-0.010	279	0.9999	32221.48	-0.021
[Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)acac)]NO <sub>3</sub>	276	0.9998	42513.28	0.006	278	0.9997	44643.32	-0.021
[Cu(2,2'-bipiridina)acac)]NO <sub>3</sub>	297	0.9999	26642.90	-0.008	300	0.9999	28811.94	-0.011
[Cu(4,4'-dime-2,2'-bipiridina)acac)]NO <sub>3</sub>	295	0.9999	28098.47	0.002	298	0.9999	31608.35	-0.010
[Cu(1,10-fenantrolina)(3-Cl-acac)]NO <sub>3</sub>	272	0.9999	39910.93	-0.003	274	0.9997	37705.28	-0.025
[Cu(1,10-fenantrolina)(1-benzoilacetona)]NO <sub>3</sub>	272	0.9999	42643.57	-0.005	273	0.9992	41306.14	-0.045

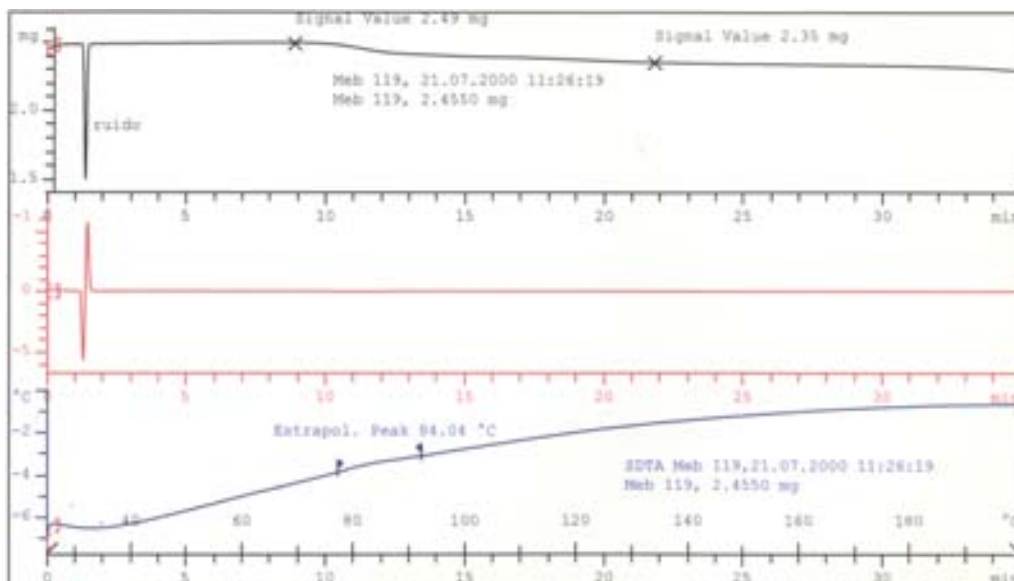
## Apéndice II: Análisis termogravimétrico

### Compuesto 1: $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$

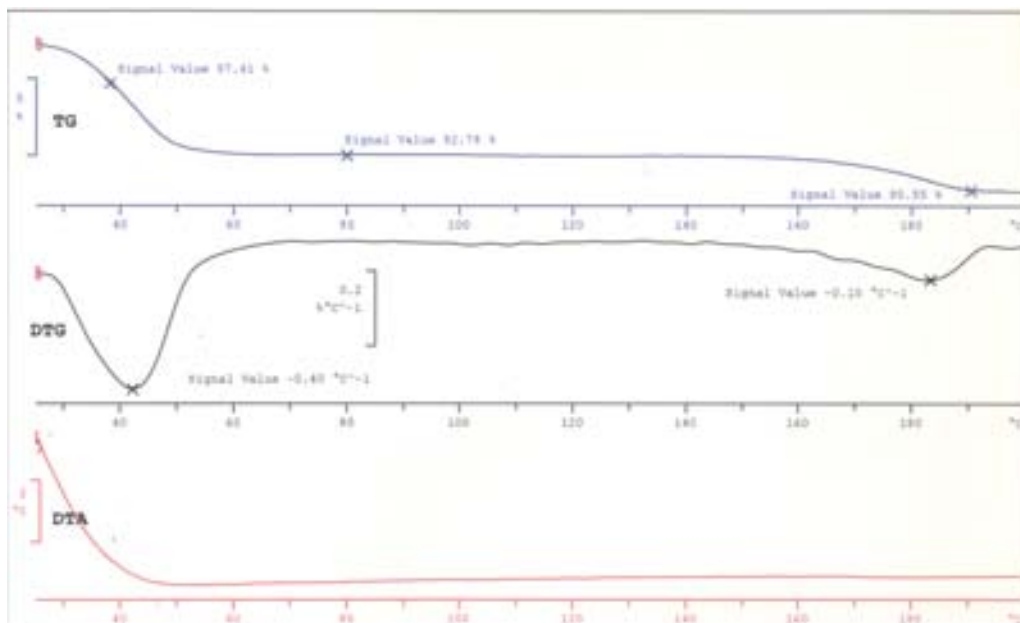


**Figura 32.** Análisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$ . La figura muestra una pérdida de peso del 8.78 % equivalente a 2 moléculas de agua.

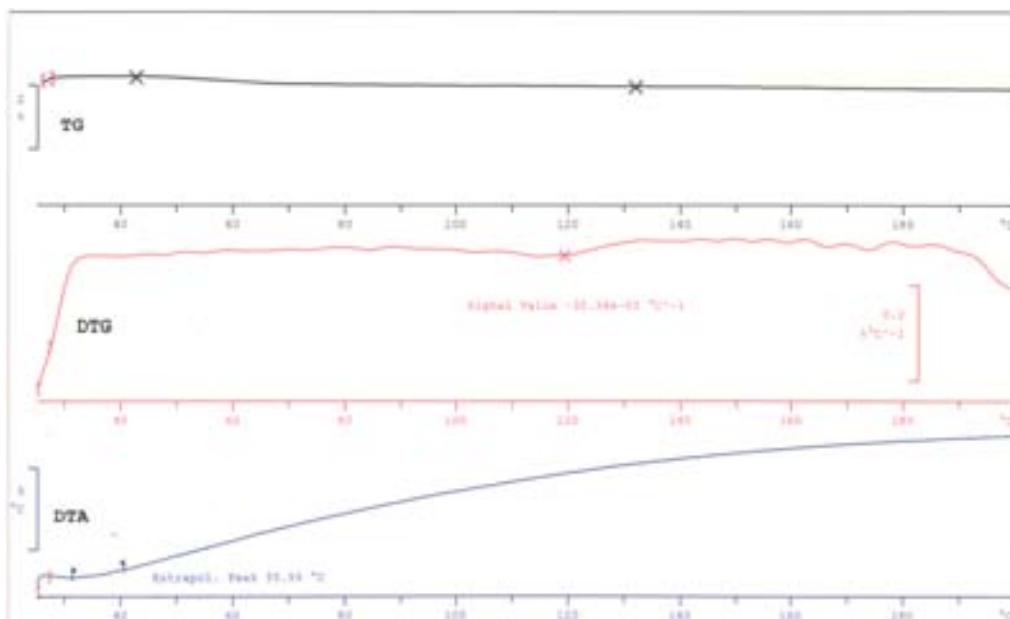
### Compuesto 2: $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$



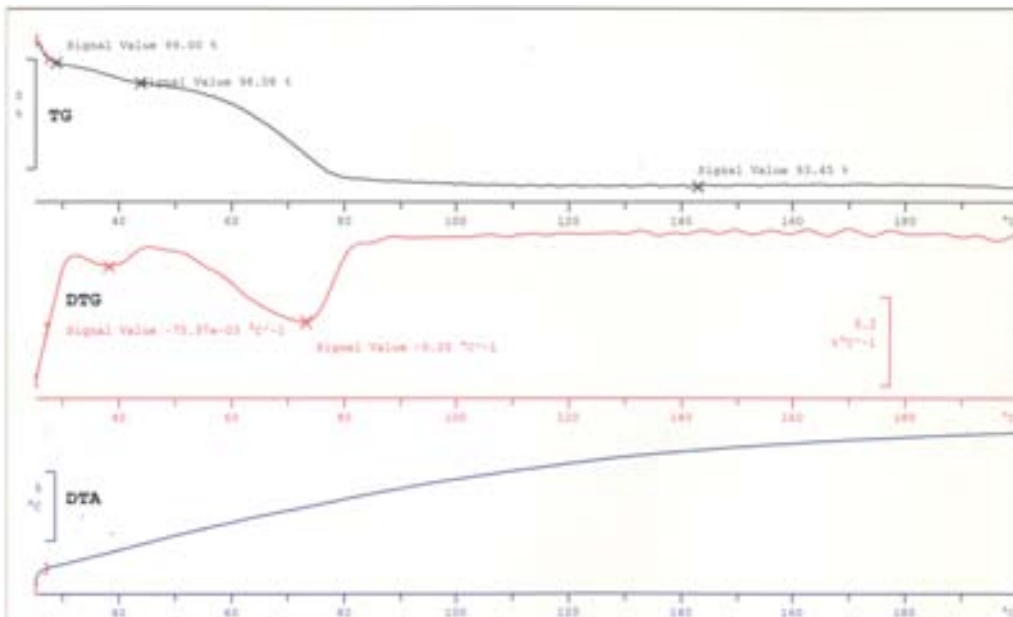
**Figura 33.** Análisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$ . La figura muestra una pérdida de peso del 4.28% equivalente a una molécula de agua.

**Compuesto 3:  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$** 

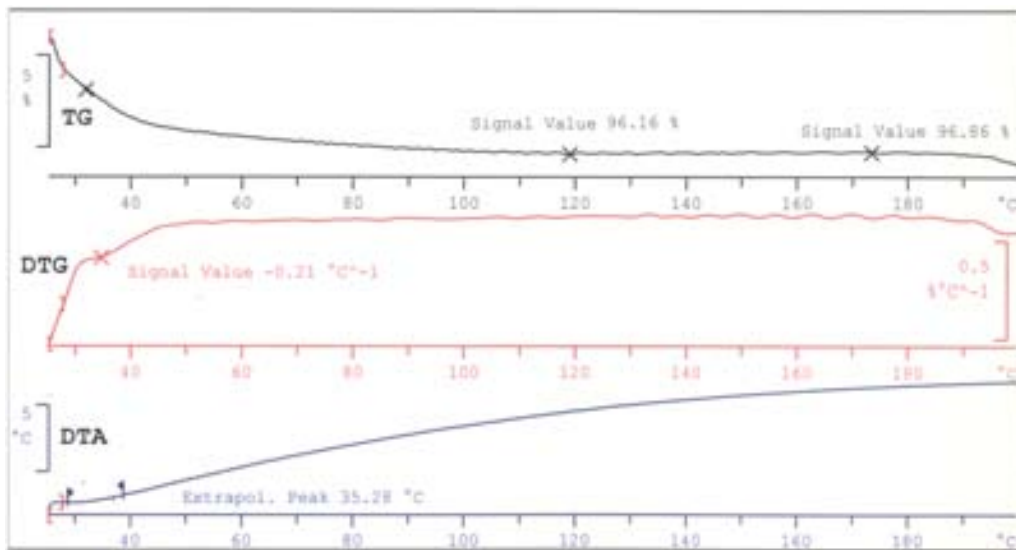
**Figura 34.** Analisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$ . La figura muestra una pérdida de peso del 7.22% equivalente a dos molécula de agua.

**Compuesto 4:  $[\text{Cu}(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$** 

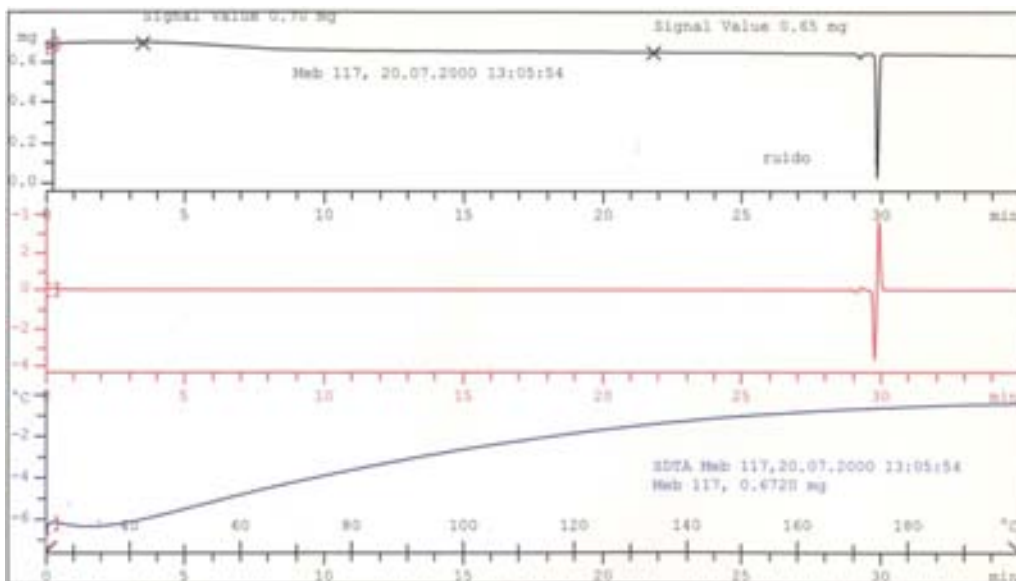
**Figura 35.** Analisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(4\text{-metil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3$ . La figura no muestra pérdidas de peso en función del incremento de temperatura.

**Compuesto 5: [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

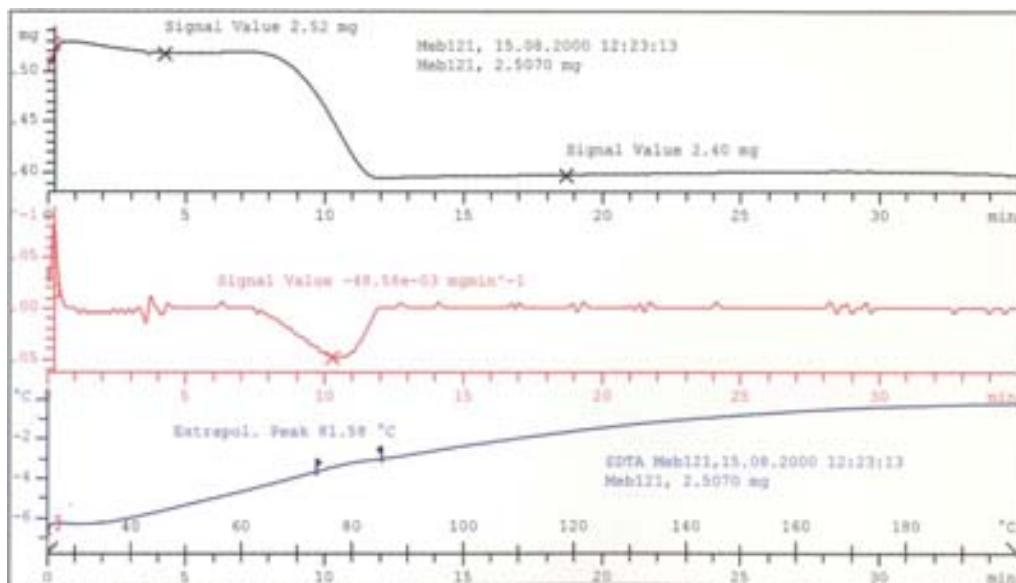
**Figura 36.** Analisis termogravimétrico para [Cu (5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. La figura muestra dos pérdidas de peso consecutivas que suman el 6.55% equivalente a 2 moléculas de agua.

**Compuesto 6: [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

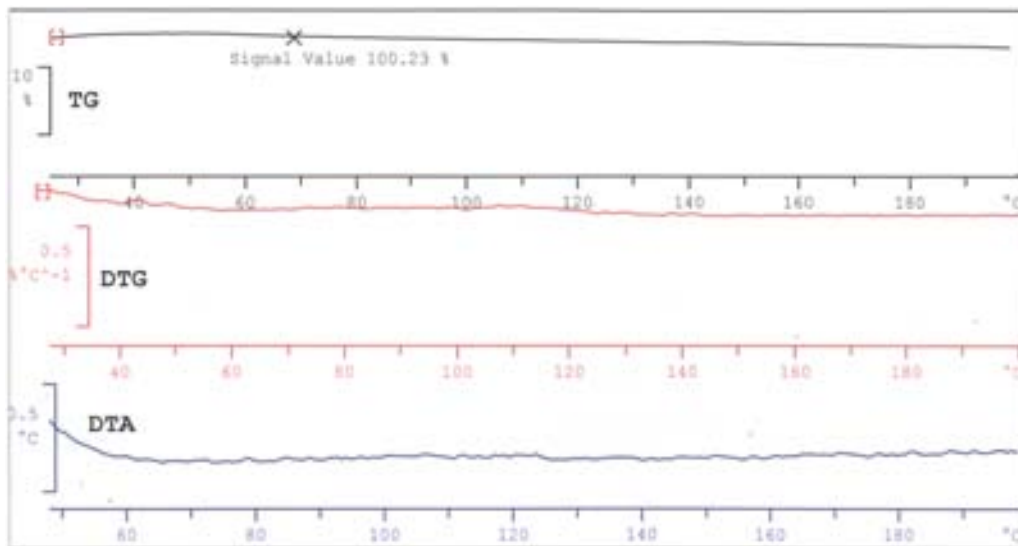
**Figura 37.** Analisis termogravimétrico para [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. La figura muestra una pérdida de peso de 3.84% equivalente a una molécula de agua.

**Compuesto 7: [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

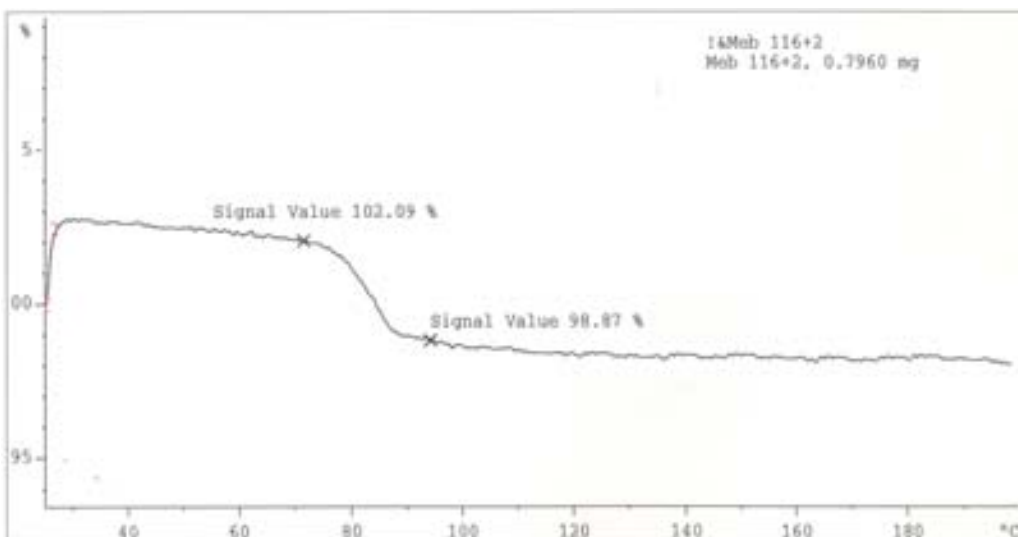
**Figura 38.** Analisis termogravimétrico para [Cu (5,6-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. La figura muestra una pérdida de peso de 7.14% equivalente a 2 moléculas de agua.

**Compuesto 8: [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

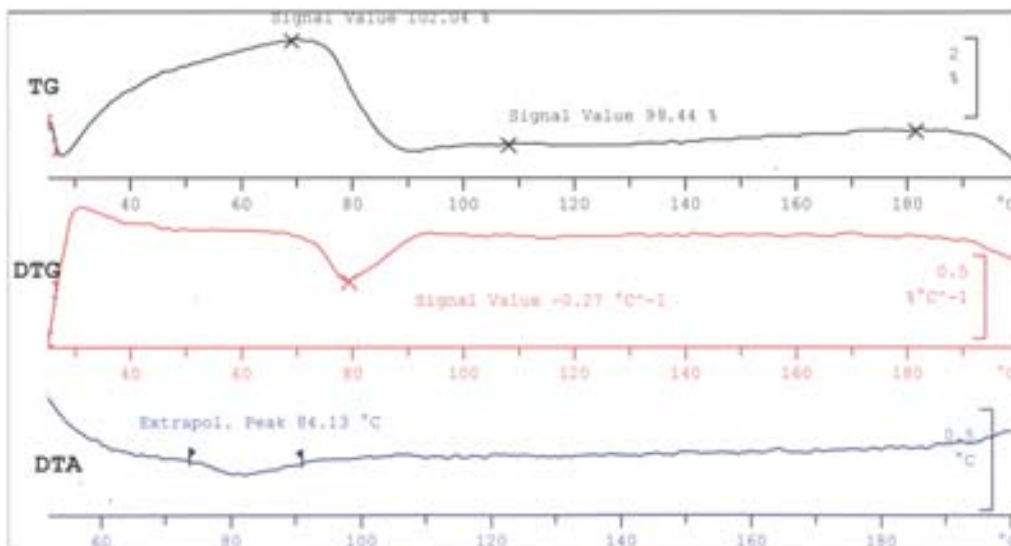
**Figura 39.** Analisis termogravimétrico para [Cu (3,4,7,8-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. La figura muestra una pérdida de peso de 4.27% equivalente a una molécula de agua.

**Compuesto 9:  $[\text{Cu}(5\text{-fenil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$** 

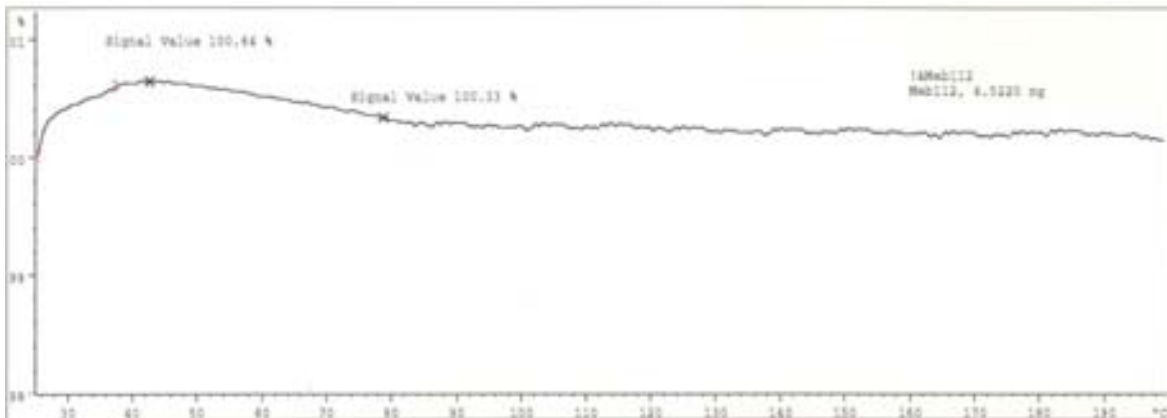
**Figura 40.** Analisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(5\text{-fenil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ . La figura no muestra pérdidas de peso en función del incremento de temperatura.

**Compuesto 10:  $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$** 

**Figura 41** Analisis termogravimétrico para  $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ . La figura muestra una pérdida de peso de 3.22% equivalente a una molécula de agua.

**Compuesto 11: [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>**

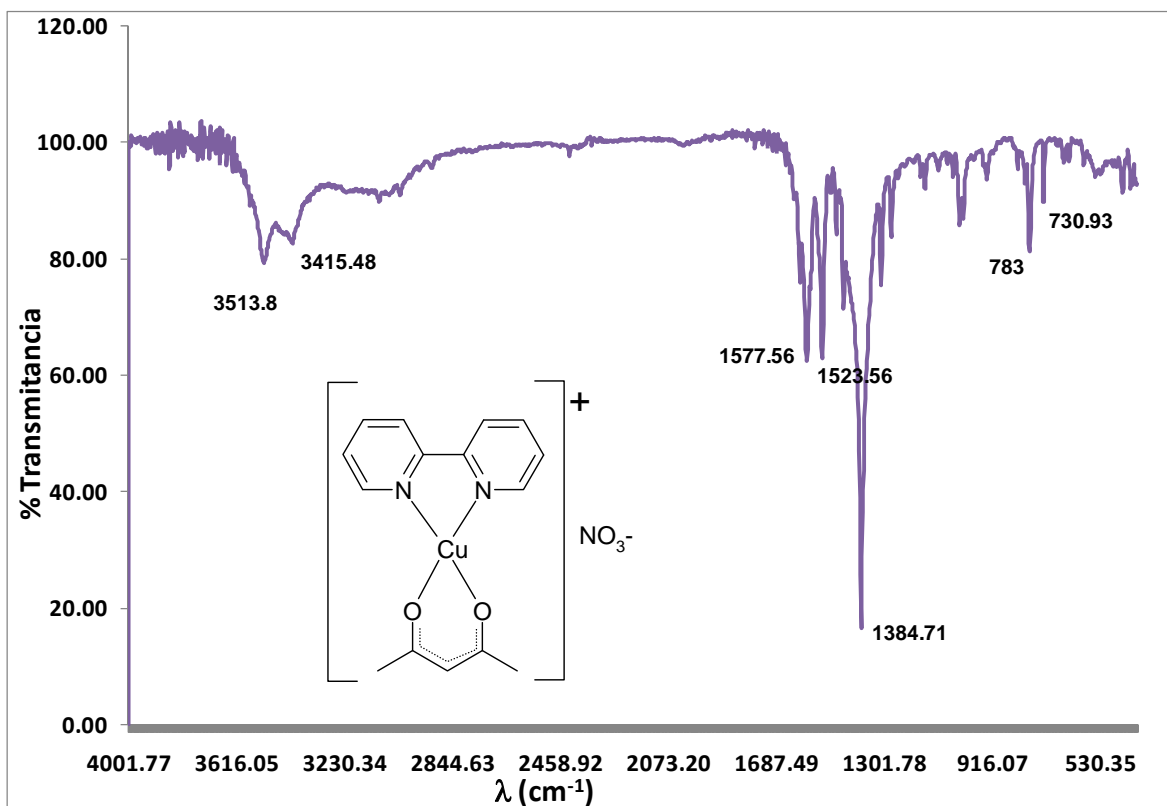
**Figura 42.** Analisis termogravimétrico para [Cu (5-Cl-1,10-fenantrolina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub>. La figura muestra una pérdida de peso de 3.60% equivalente a una molécula de agua.

**Compuesto 12: [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>**

**Figura 43.** Analisis termogravimétrico para [Cu (5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub>. La figura no muestra pérdidas de peso en función del incremento de temperatura.

## Apéndice III: Espectros IR

### Compuesto 1: $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO_3$



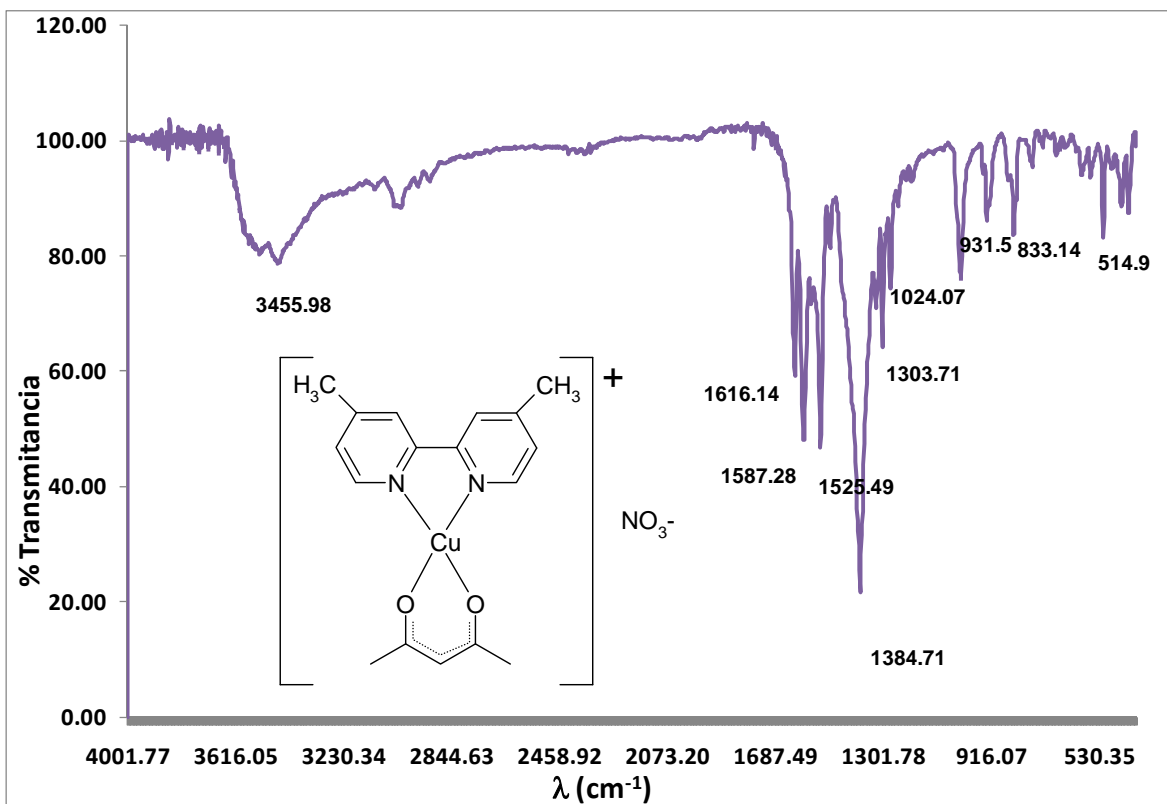
**Figura 44** Espectro de IR 4000 – 400  $cm^{-1}$  de  $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO_3$

**Tabla 17** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400  $cm^{-1}$  de  $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO_3$

asignación	$\lambda$ ( $cm^{-1}$ )	%T	asignación	$\lambda$ ( $cm^{-1}$ )	%T
$\nu$ (O-H)	3415.5	82.63	$\nu$ (C=C)	1446.4	71.30
$\nu$ (C=N)	1600.7	75.88	$\nu$ (N-O), ( $NO_3$ )	1384.7	16.66
$\nu_{asim}$ ( $COO^-$ )	1577.6	62.47	$\nu$ (C-H)	730.9	89.72
$\nu$ (C=C)	1523.5	62.97			



**Compuesto 2: [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

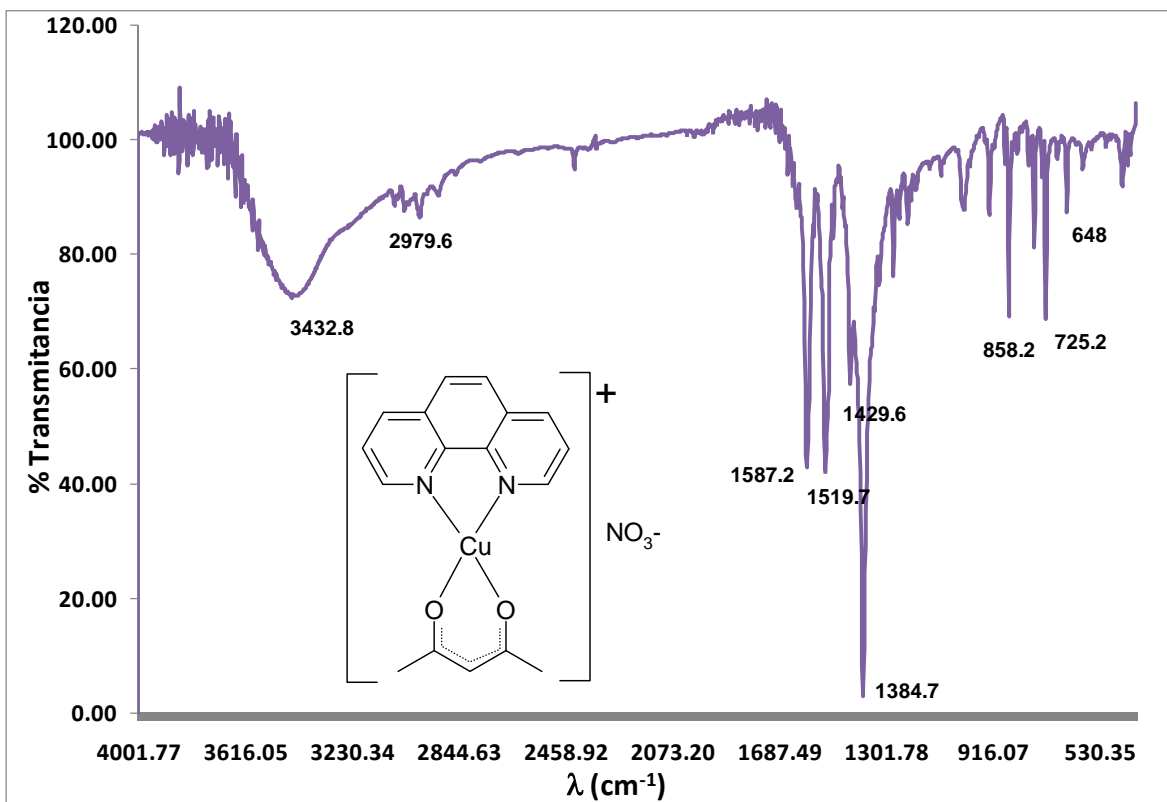


**Figura 45** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 18** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3463.7	78.67	v (C=C)	1490.8	81.39
v (C=N)	1616.14	59.24	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	21.63
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1587.2	48.12	v (C-H)	730.9	98.63
v (C=C)	1525.5	46.84			

**Compuesto 3: [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

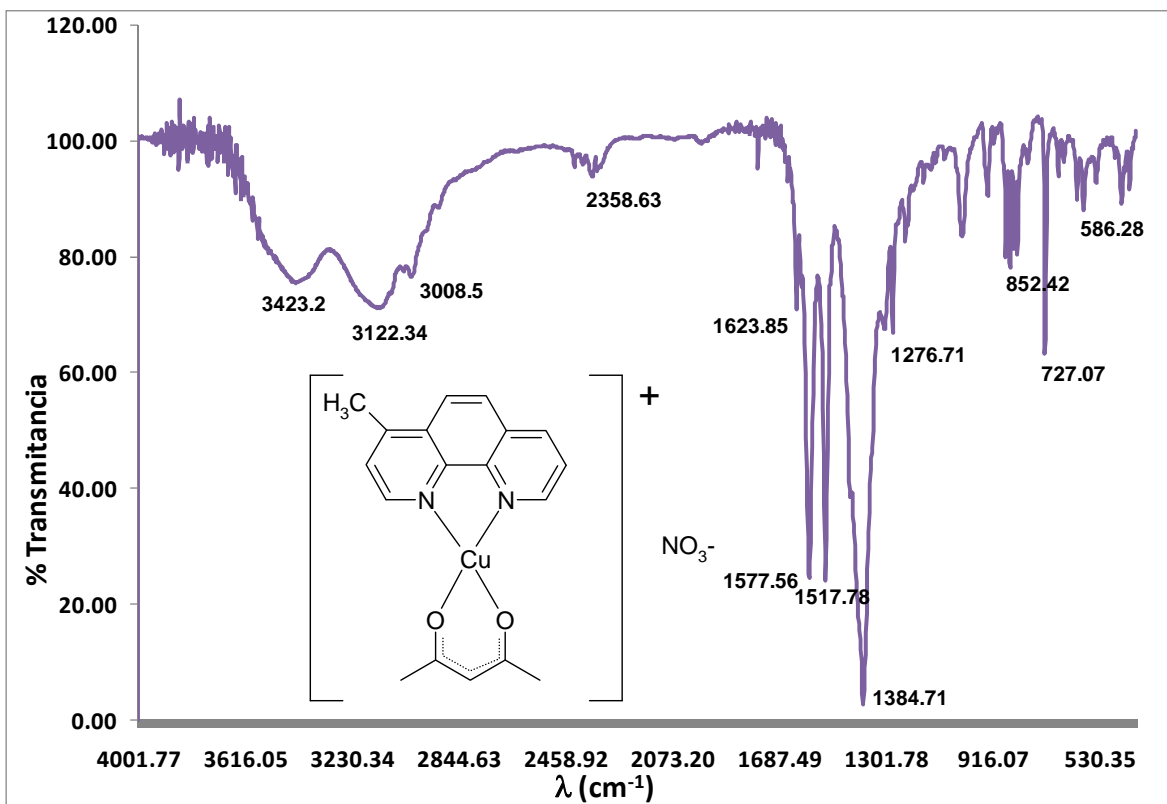


**Figura 46** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 19** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3432.84	72.74	v (C=C)	1429.06	57.30
v (C=N)	1623.8	88.15	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.71	2.96
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1587.21	42.82	v (C-H)	858.21	69.07
v (C=C)	1519.7	42.15	v (C-H)	725.14	68.62

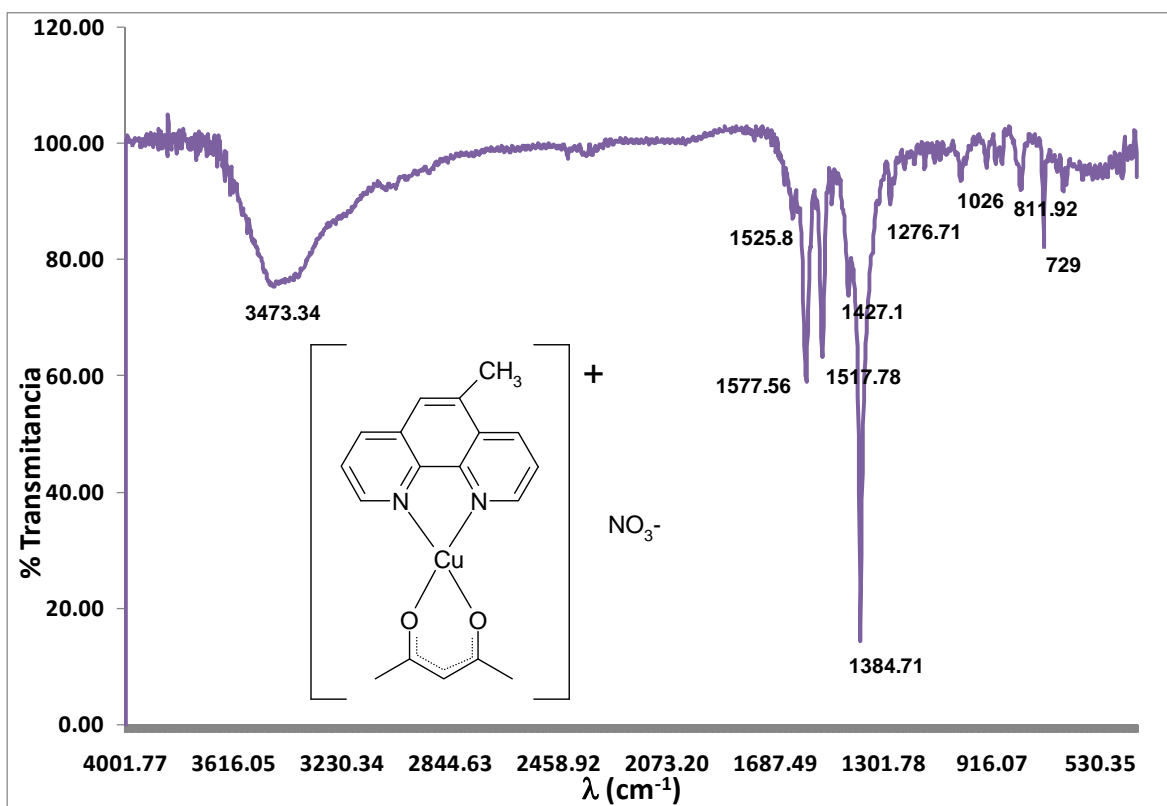
**Compuesto 4: [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



**Figura 47** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 20** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3432.8	75.58	v (C=C)	1428.3	38.45
v (C=N)	1623.8	70.97	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	2.63
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1577.6	24.46	v (C-H)	852.4	78.19
v (C=C)	1518.6	24.54	v (C-H)	727.1	63.35

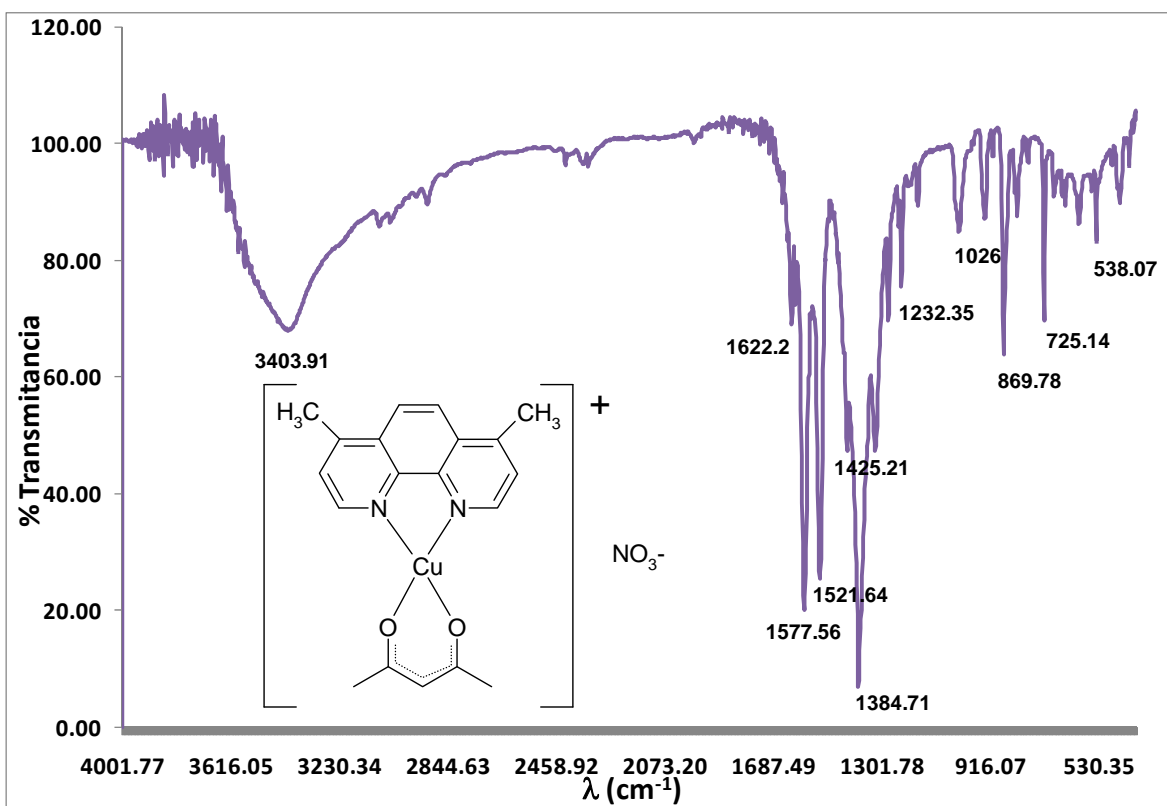
**Compuesto 5: [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**


**Figura 48** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 21** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3473.3	75.31	v (C=C)	1427.1	73.93
v (C=N)	1625.8	87.08	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	14.37
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1577.6	59.11	v (C-H)	811.9	92.04
v (C=C)	1519.7	63.29	v (C-H)	729.0	82.34

**Compuesto 6: [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

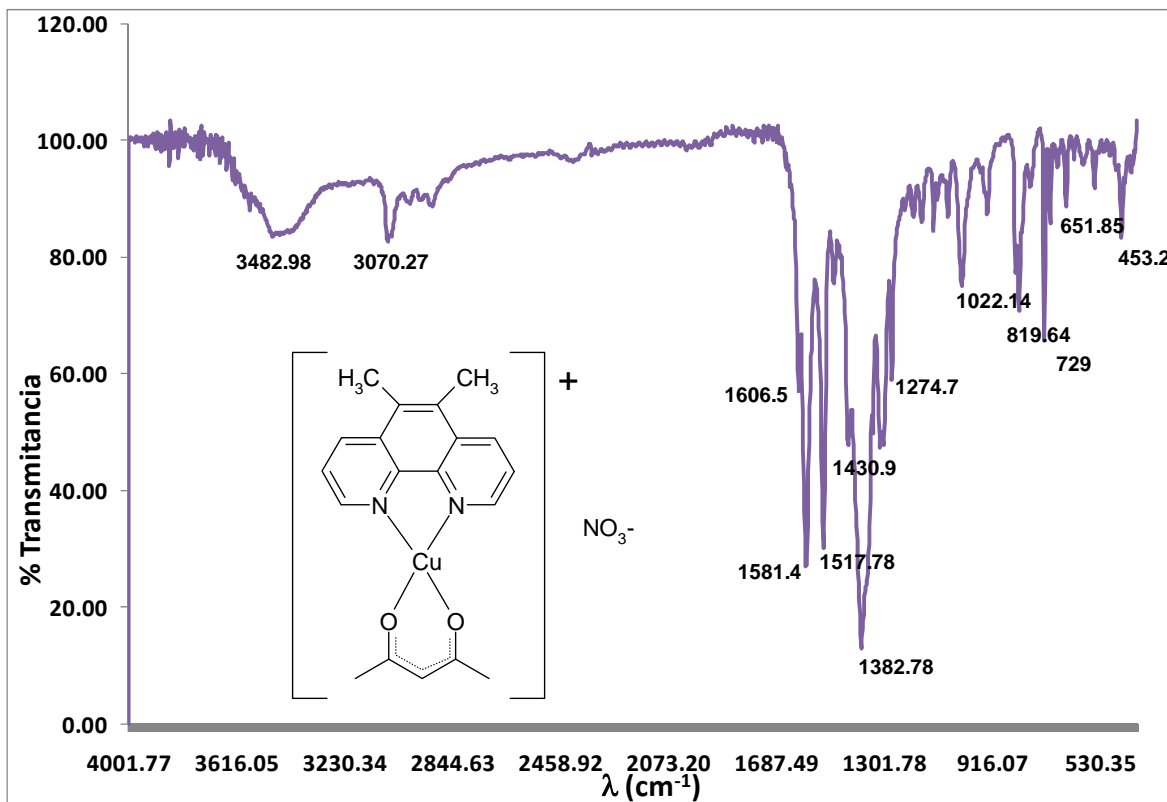


**Figura 49** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 22** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3413.5	67.98	v (C=C)	1425.2	47.43
v (C=N)	1622.2	69.02	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	6.96
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1577.6	20.06	v (C-H)	869.8	63.88
v (C=C)	1521.6	25.52	v (C-H)	725.1	69.63

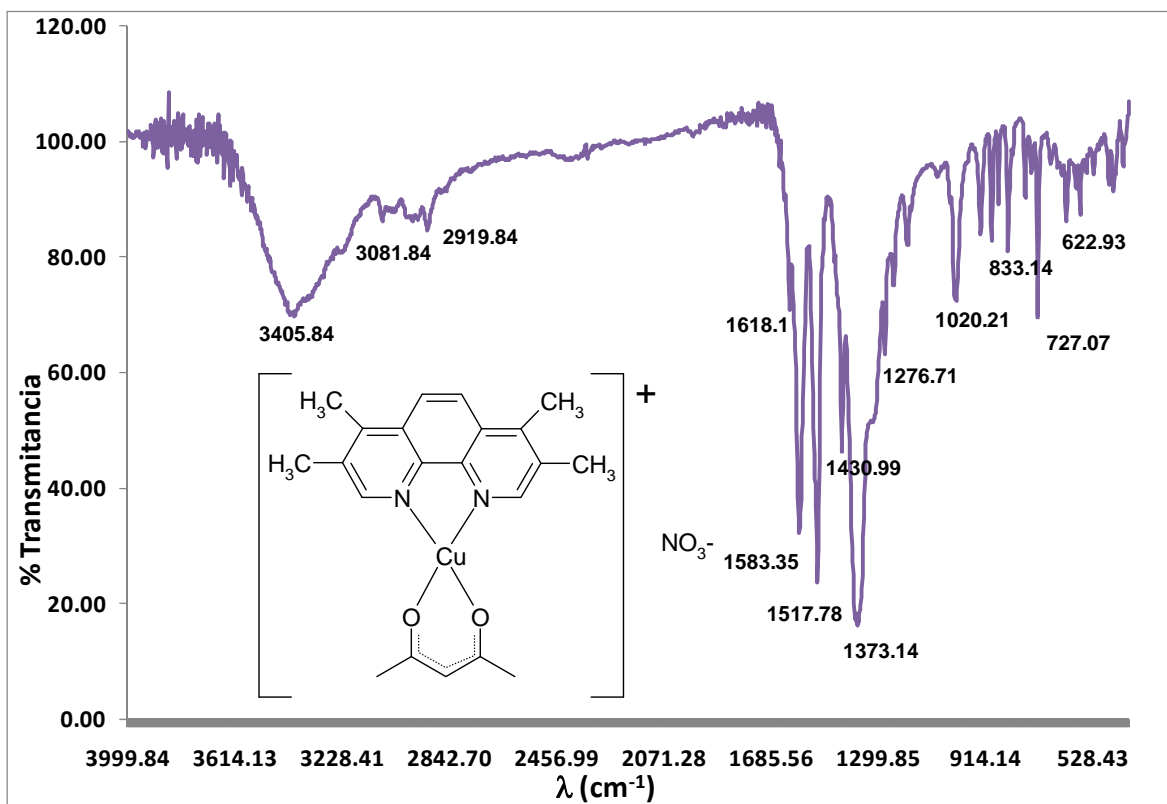
**Compuesto 7: [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



**Figura 50** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 23** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3488.7	83.66	v (C=C)	1430.9	47.80
v (C=N)	1606.5	57.27	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	13.01
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1581.4	27.13	v (C-H)	819.6	70.92
v (C=C)	1517.8	30.14	v (C-H)	729.9	65.59

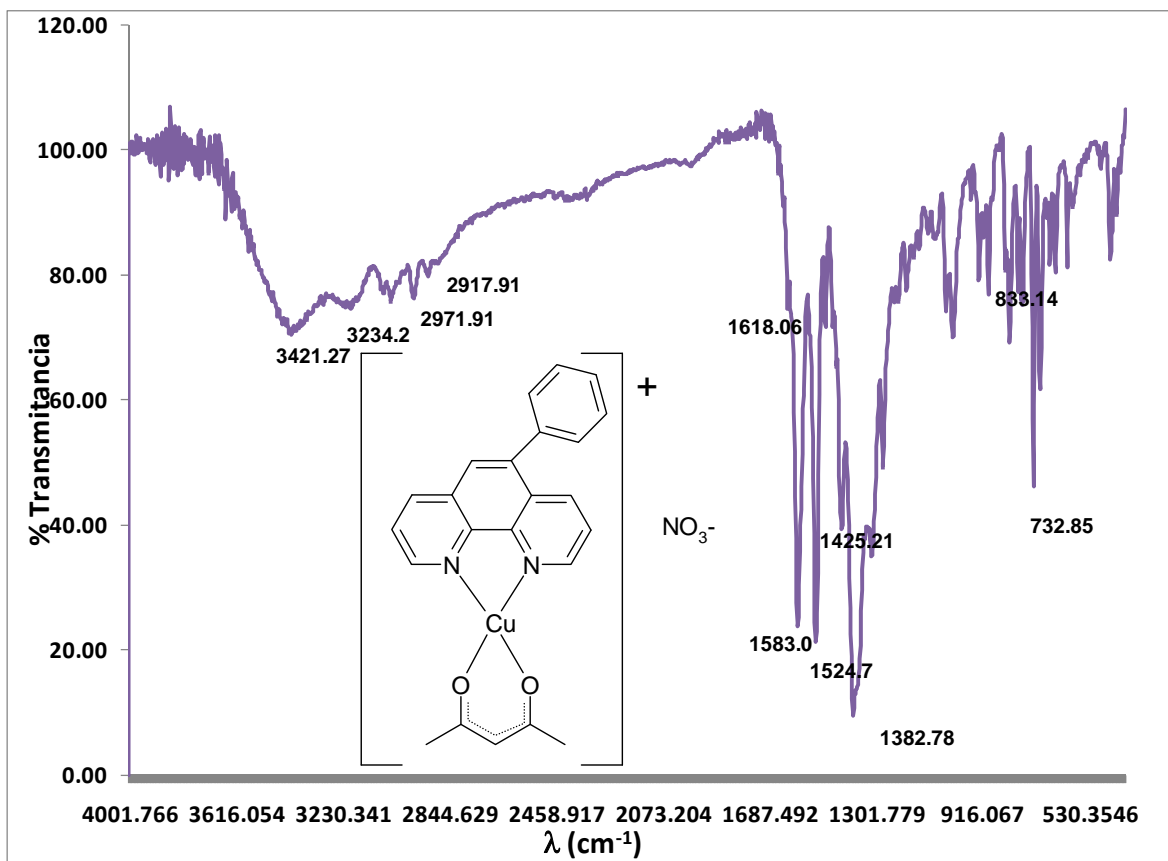
**Compuesto 8: [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>**


**Figura 51** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 24** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3338.1	73.06	v (C=C)	1430.9	46.37
v (C=N)	1618.1	70.86	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.2	17.41
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1583.3	32.17	v (C-H)	833.1	80.83
v (C=C)	1517.8	23.55	v (C-H)	727.1	69.75

**Compuesto 9: [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



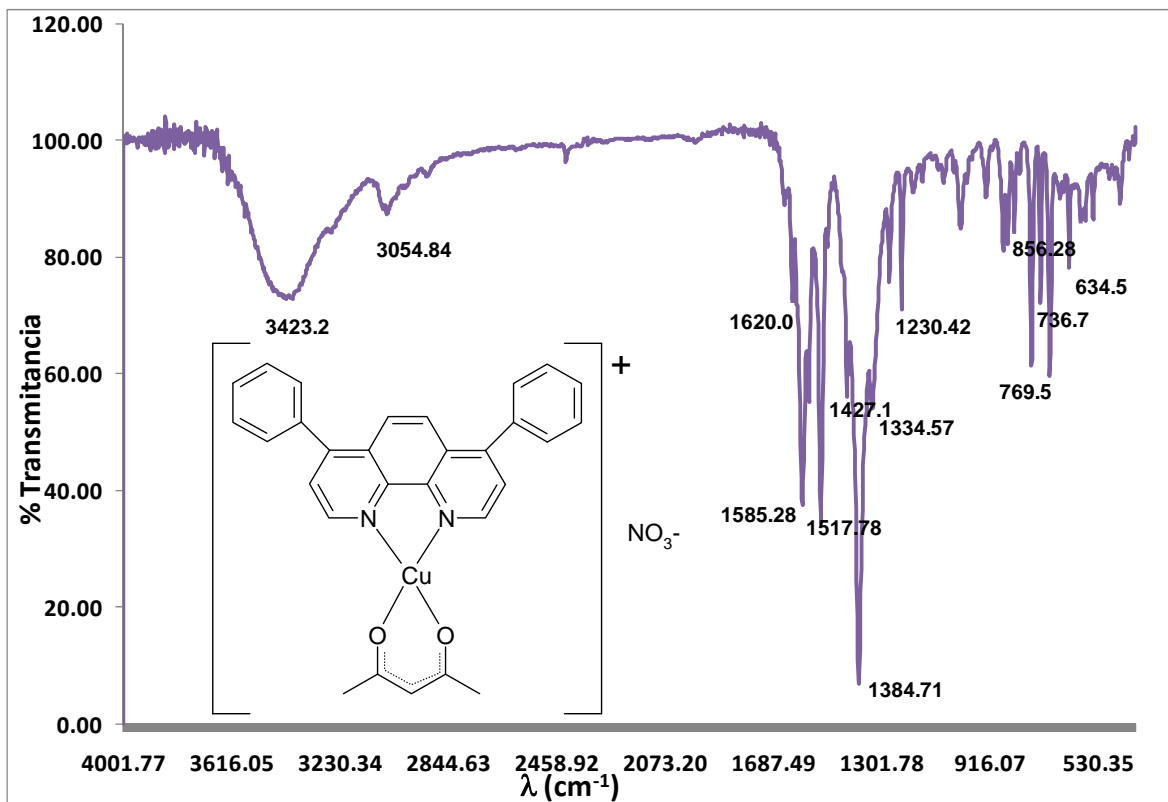
**Figura 52** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 25** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3421.27	70.70	v (C=C)	1425.21	39.47
v (C=N)	1618.06	74.50	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1382.78	9.47
V <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1583.35	23.90	v (C-H)	833.14	80.89
v (C=C)	1524.7	30.48	v (C-H)	732.85	46.26



**Compuesto 10: [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**

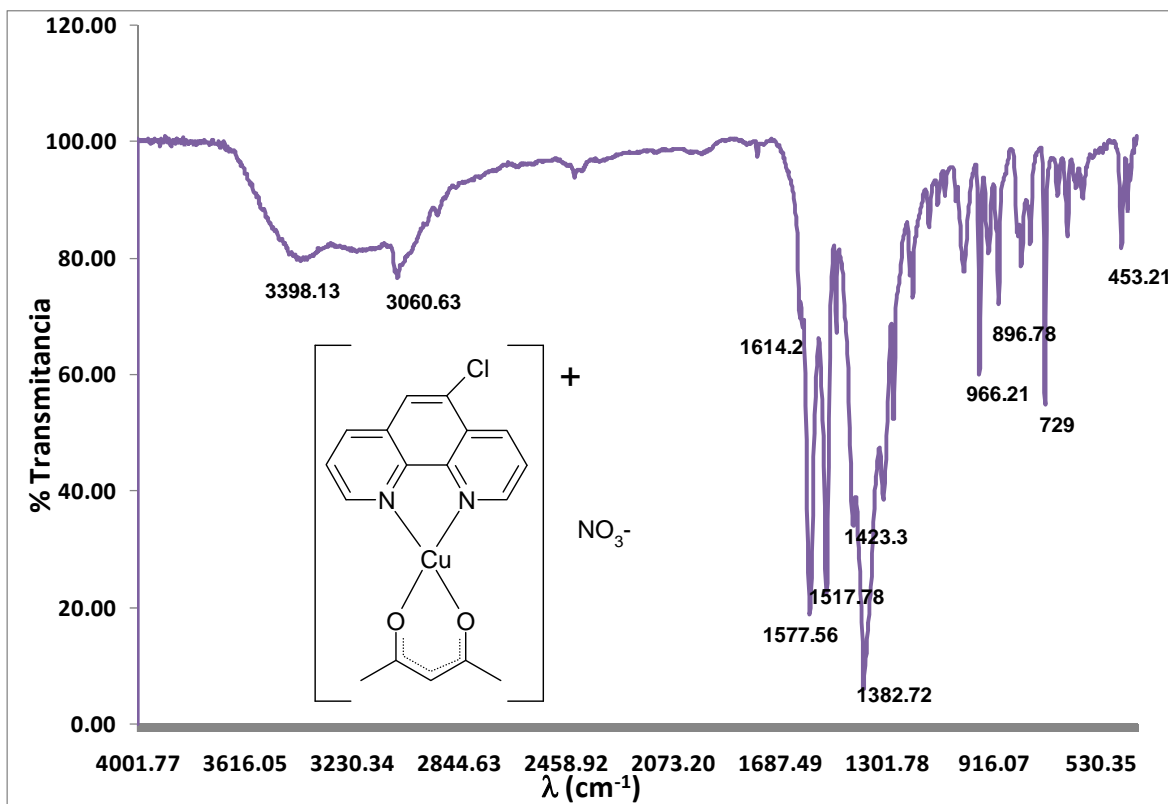


**Figura 53** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 26** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3417.4	73.35	v (C=C)	1427.1	55.98
v (C=N)	1620.0	72.66	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	6.91
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1585.3	37.43	v (C-H)	854.4	82.29
v (C=C)	1517.8	34.35	v (C-H)	736.7	72.16

**Compuesto 11: [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>**

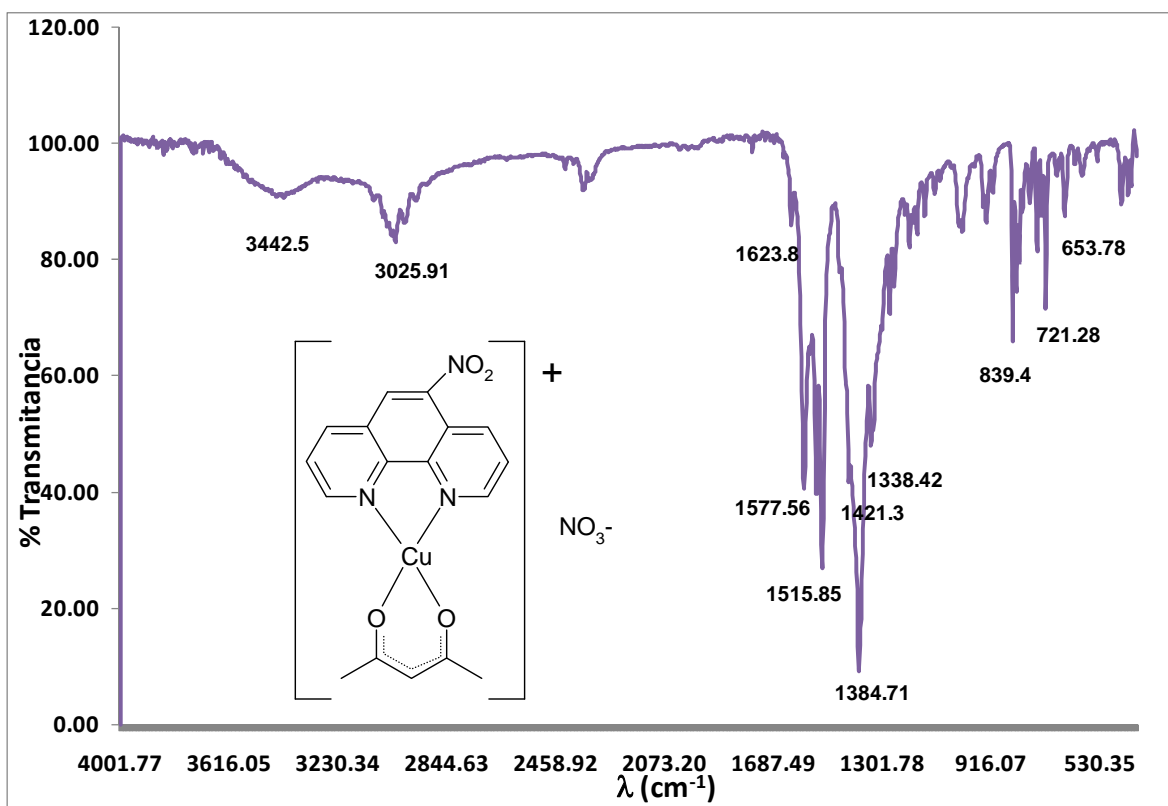


**Figura 54** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 27** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3401.9	79.81	v (C=C)	1423.3	34.19
v (C=N)	1614.2	69.57	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	6.21
v <sub>asim</sub> (COO')	1577.6	18.88	v (C-H)	896.8	72.08
v (C=C)	1517.8	22.41	v (C-H)	729.0	54.84

**Compuesto 12: [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



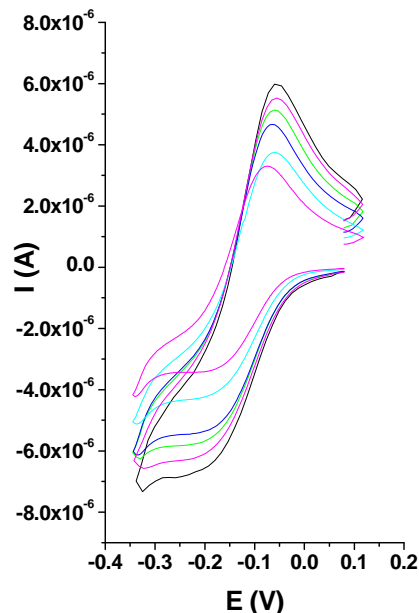
**Figura 55** Espectro de IR 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-NO<sub>3</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 28** Principales bandas y probables asignaciones del espectro de IR 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> de [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T	asignación	λ (cm <sup>-1</sup> )	%T
v (O-H)	3442.5	91.08	v (C=C)	1421.3	42.40
v (C=N)	1623.8	85.92	v (N-O), (NO <sub>3</sub> )	1384.7	9.14
v <sub>asim</sub> (COO <sup>-</sup> )	1579.5	40.63	v (C-H)	839.4	65.83
v (C=C)	1515.8	26.89	v (C-H)	721.3	71.46

## Apéndice IV: Voltamperogramas

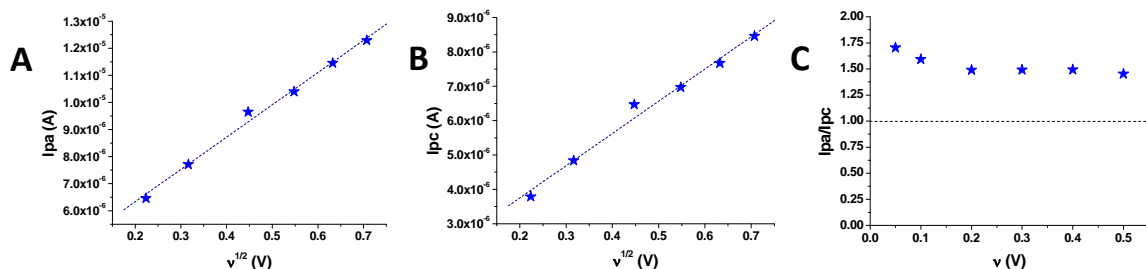
### Compuesto 1: $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO_3$



**Figura 56** Voltamperograma de  $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]^+$  obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $H_2O$  2/5 (v/v), amortiguador BTP  $6.25 \times 10^{-3}$  M,  $KNO_3$  0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

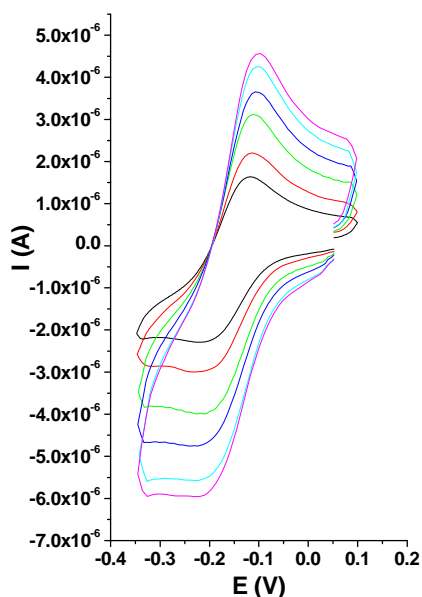
**Tabla 29.** Datos voltamperometría clica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $H_2O$  2/5 (v/v),  $6.25 \times 10^{-3}$  M amortiguador BTP, 0.05 M  $KNO_3$ . Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -154 \pm 4$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio ( $Fc/Fc^+$ ) resultando  $E_{1/2} = -318 \pm 4$

$v$ ( $Vs^{-1}$ )	Epc	Epa	$\Delta E$	$E_{1/2}$	$E_p$	$i_{pc}$ ( $\mu A$ )	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )
0.05	-234	-73	162	-153	-94	3.79	6.47
0.1	-236	-58	178	-147	-92	4.84	7.71
0.2	-245	-64	180	-155	-92	6.47	9.64
0.3	-258	-53	205	-156	-93	6.97	10.0
0.4	-254	-56	198	-155	-94	7.67	11.0
0.5	-259	-60	199	-159	-94	8.46	12.0



**Figura 57** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para  $[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonate)]NO_3$ . A.  $i_{pa}$  contra  $v^{1/2}$ ; B.  $i_{pc}$  contra  $v^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C.  $i_{pa}/i_{pc}$  vs.  $v$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones con una reacción química reversible acoplada (mecanismo ErCr).

### Compuesto 2: [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

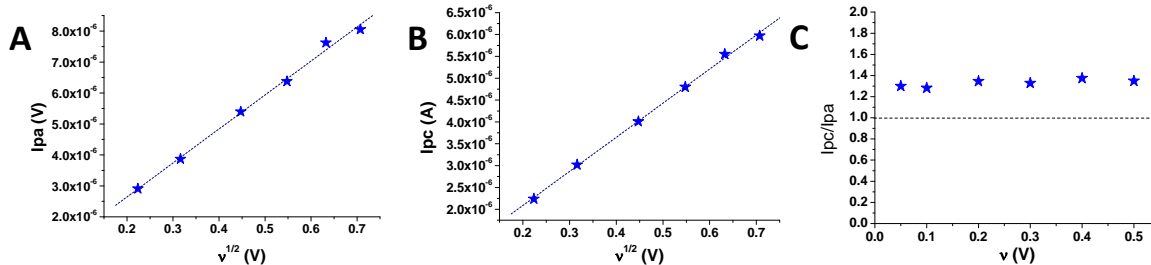


**Tabla 30.** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>.

Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -168 \pm 3$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando  $E_{1/2} = -338 \pm 3$

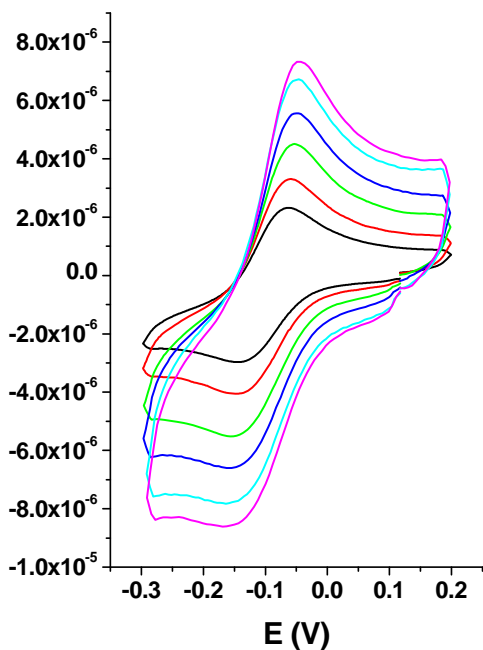
$v$ (V <sup>s<sup>-1</sup>)</sup>	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	$\Delta E$	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-218	-117	100	-167	-126	2.24	2.91
0.1	-231	-114	117	-172	-122	3.02	3.87
0.2	-224	-111	112	-168	-116	4.01	5.40
0.3	-237	-102	135	-169	-117	4.8	6.38
0.4	-230	-104	126	-167	-113	5.55	7.63
0.5	-230	-101	128	-166	-116	5.97	8.05

**Figura 58** Voltamperograma de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 59** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra  $v^{1/2}$ ; B. I<sub>pc</sub> contra  $v^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs.  $v$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas.

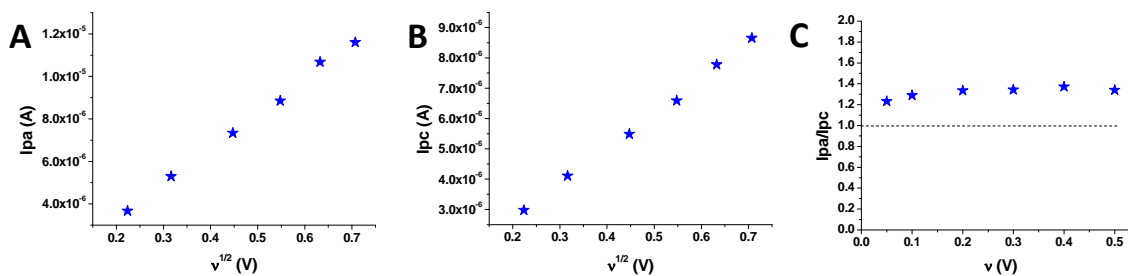
### Compuesto 3: $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]NO_3$



**Figura 60** Voltamperograma de  $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]^+$  obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $H_2O$  2/5 (v/v), amortiguador BTP  $6.25 \times 10^{-3}$  M,  $KNO_3$  0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

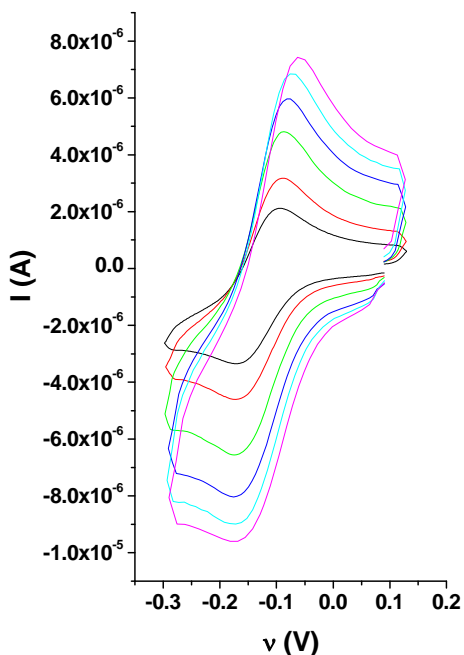
**Tabla 31** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $H_2O$  2/5 (v/v),  $6.25 \times 10^{-3}$  M amortiguador BTP, 0.05 M  $KNO_3$ . Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -104 \pm 1$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio ( $Fc/Fc^+$ ) resultando  $E_{1/2} = -271 \pm 1$

$v$ (V)	$E_{pc}$	$E_{pa}$	$\Delta E$	$E_{1/2}$	$E_{p2}$	$I_{pc}$ ( $\mu A$ )	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )
0.05	-144	-62	82	-103	71	2.98	3.67
0.1	-147	-60	88	-104	69	4.11	5.30
0.2	-153	-53	100	-103	65	5.49	7.33
0.3	-164	-46	117	-105	61	6.59	8.85
0.4	-163	-46	118	-105	57	7.78	10.7
0.5	-169	-43	126	-106	57	8.66	11.6



**Figura 61** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para  $[Cu(1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]NO_3$ . A.  $I_{pa}$  contra  $v^{1/2}$ ; B.  $I_{pc}$  contra  $v^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C.  $I_{pa}/I_{pc}$  vs.  $v$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas.

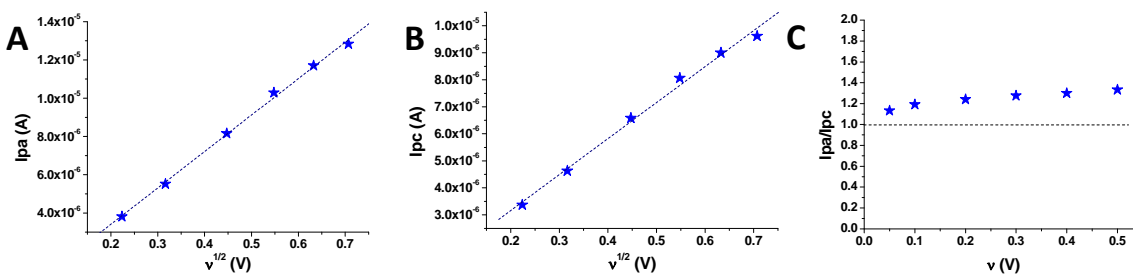
### Compuesto 4: [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>



**Tabla 32** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es E<sub>1/2</sub>= -128 ± 4. Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando E<sub>1/2</sub>= -290 ± 4

v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-171	-94	77	-132	-100	3.37	3.82
0.1	-175	-88	86	-132	-95	4.63	5.52
0.2	-176	-87	88	-132	-91	6.58	8.16
0.3	-176	-82	94	-129	-85	8.06	10.3
0.4	-172	-76	96	-124	-80	9.00	11.7
0.5	-182	-63	119	-122	-71	9.62	12.8

**Figura 62** Voltamperograma de [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

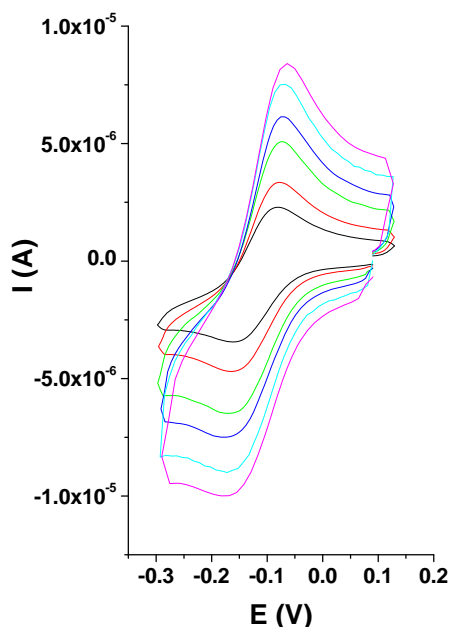


**Figura 63** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra v<sup>1/2</sup>; B. I<sub>pc</sub> contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas.

### Compuesto 5: [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>

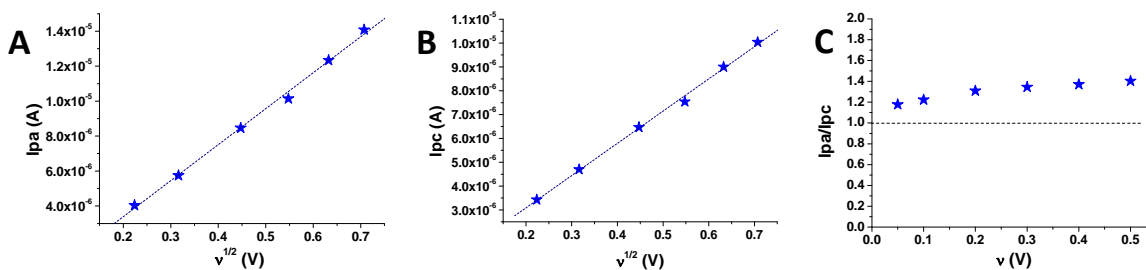
**Tabla 33** Datos voltamperométría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>.

Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es E<sub>1/2</sub> = -121 ± 2. Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando E<sub>1/2</sub> = -282 ± 2



v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-162	-81	81	-121	-87	3.43	4.04
0.1	-163	-78	86	-121	-85	4.70	5.75
0.2	-171	-74	97	-123	-82	6.47	8.47
0.3	-177	-69	108	-123	-80	7.54	10.1
0.4	-172	-67	105	-119	-77	9.00	12.30
0.5	-174	-64	111	-119	-71	10.00	14.10

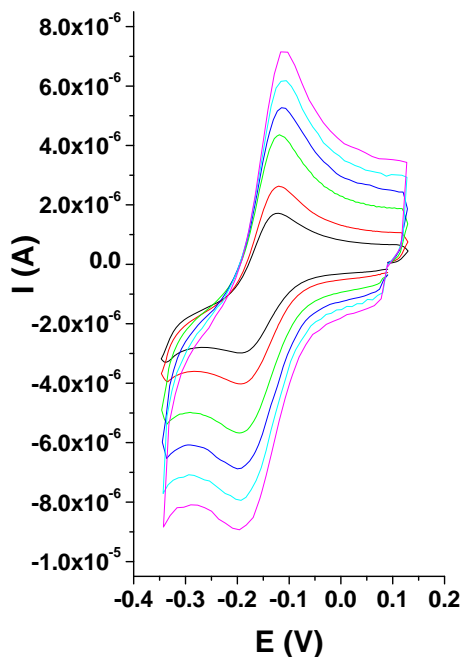
**Figura 64** Voltamperograma de [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 65** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra v<sup>1/2</sup>; B. I<sub>pc</sub> contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas.



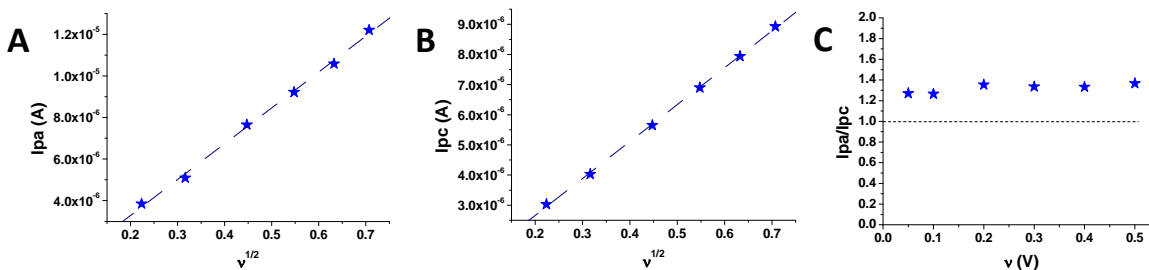
### Compuesto 6: $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$



**Figura 66** Voltamperograma de  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]^+$  obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  2/5 (v/v), amortiguador BTP  $6.25 \times 10^{-3}$  M,  $\text{KNO}_3$  0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

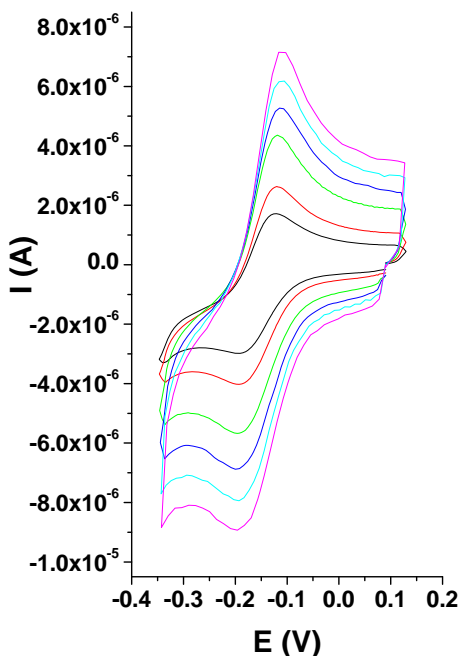
**Tabla 34** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/ $\text{H}_2\text{O}$  2/5 (v/v),  $6.25 \times 10^{-3}$  M amortiguador BTP, 0.05 M  $\text{KNO}_3$ . Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -157 \pm 2$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) resultando  $E_{1/2} = -318 \pm 2$

$\nu$ (V)	$E_{pc}$	$E_{pa}$	$\Delta E$	$E_{1/2}$	$E_{p2}$	$I_{pc}$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )
0.05	-194	-123	72	-158	-124	3.03	3.85
0.1	-196	-120	76	-158	-119	4.03	5.10
0.2	-200	-119	82	-160	-115	5.65	7.65
0.3	-200	-115	85	-157	-111	6.90	9.22
0.4	-193	-115	78	-154	-109	7.94	10.6
0.5	-196	-116	80	-156	-107	8.93	12.2



**Figura 67** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{acetilacetonato})]\text{NO}_3$ . A.  $I_{pa}$  contra  $\nu^{1/2}$ ; B.  $I_{pc}$  contra  $\nu^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C.  $I_{pa}/I_{pc}$  vs.  $\nu$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas.

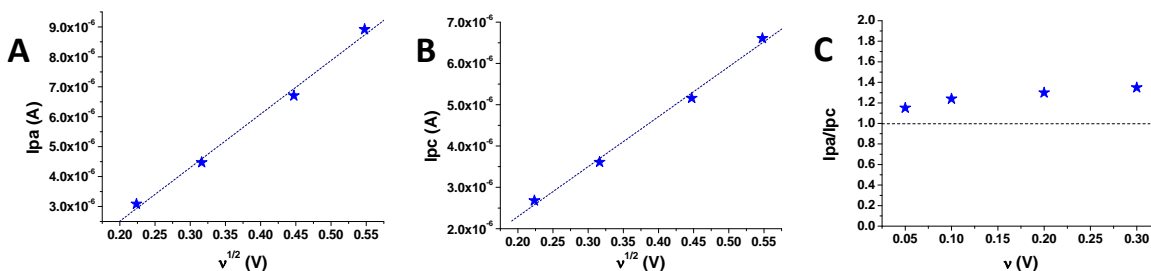
**Compuesto 7: [Cu(5,6- dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



**Tabla 35** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es E<sub>1/2</sub>= -123 ± 3. Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando E<sub>1/2</sub>= -298 ± 3

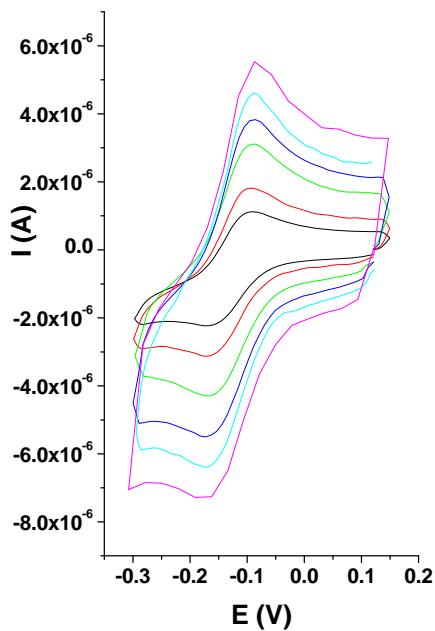
v (V)	Epc	Epa	ΔE	E <sub>1/2</sub>	Ep <sub>2</sub>	Ipc (μA)	Ipa (μA)
0.05	-161	-82	78	-121	-89	2.68	3.09
0.1	-164	-74	90	-119	-82	3.61	4.47
0.2	-168	-82	86	-125	-77	5.16	6.71
0.3	-185	-65	121	-125	-74	6.61	8.92

**Figura 68** Voltamperograma de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 69** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. A. Ipa contra v<sup>1/2</sup>; B. Ipc contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. Ipa/Ipc vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas

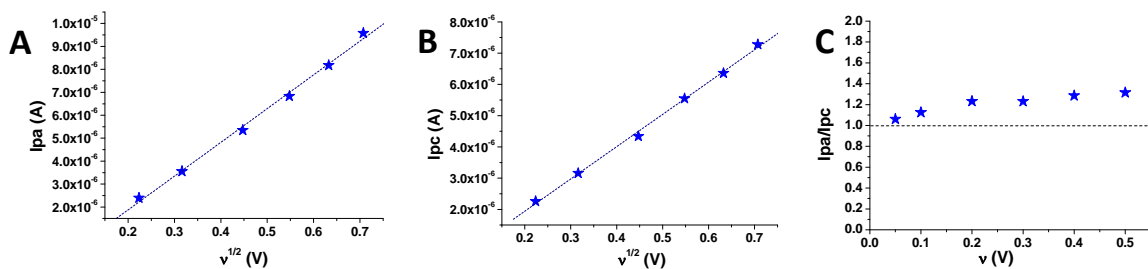
**Compuesto 8: [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>**



**Tabla 36** Datos voltamperométría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es E<sub>1/2</sub>= -131 ± 1. Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando E<sub>1/2</sub>= -307 ± 1

v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-170	-91	78	-130	-99	2.26	2.40
0.1	-170	-93	76	-131	-97	3.16	3.56
0.2	-172	-92	80	-132	-88	4.34	5.35
0.3	-173	-91	82	-131	-72	5.55	6.83
0.4	-173	-86	87	-129	-86	6.36	8.18
0.5	-177	-88	89	-132	-78	7.28	9.58

**Figura 70** Voltamperograma de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

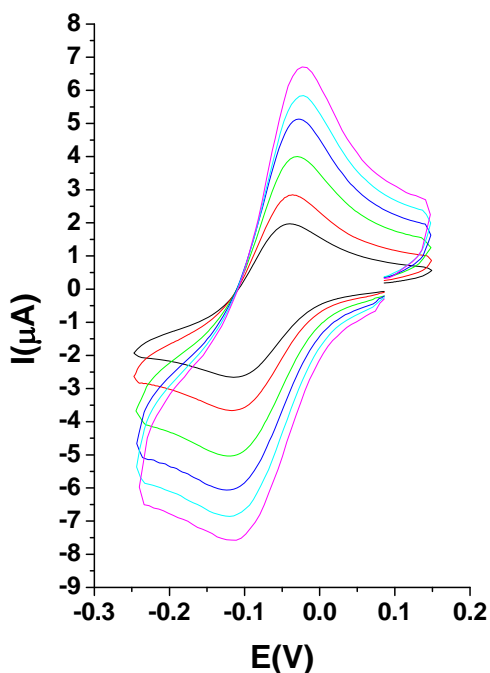


**Figura 71** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra v<sup>1/2</sup>; B. I<sub>pc</sub> contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas

### Compuesto 9: [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

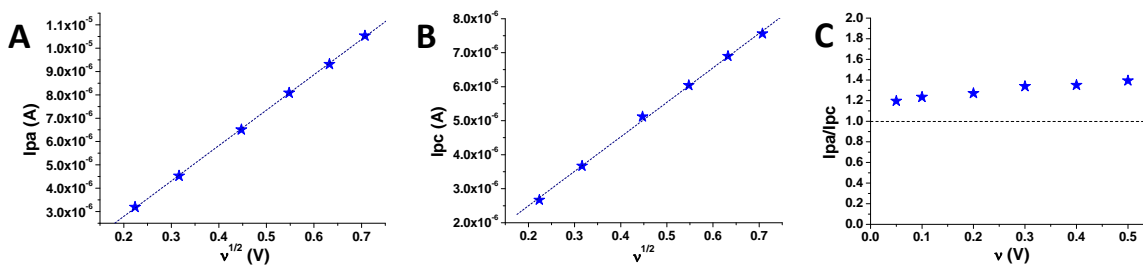
**Tabla 37** Datos voltamperométría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>.

Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -74 \pm 4$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando  $E_{1/2} = -248 \pm 4$



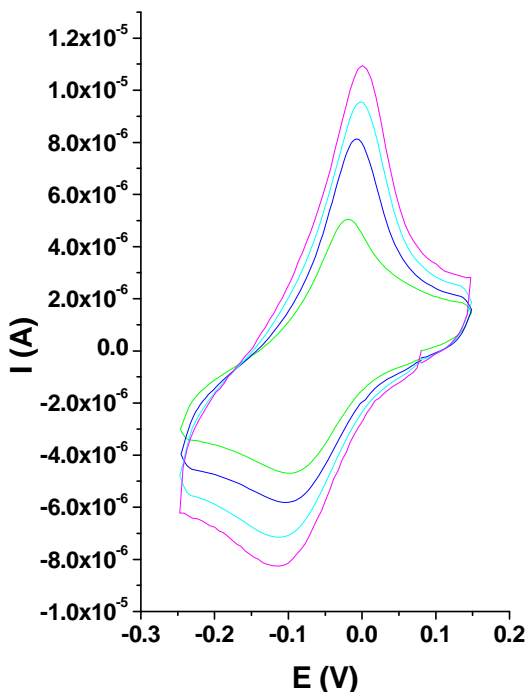
v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (µA)	I <sub>pa</sub> (µA)
0.05	-114	-39	75	-77	-44	2.67	3.19
0.1	-116	-36	79	-76	-43	3.67	4.53
0.2	-120	-29	91	-75	-42	5.12	6.51
0.3	-122	-29	93	-75	-39	6.04	8.08
0.4	-120	-22	98	-71	-35	6.90	9.32
0.5	-111	-23	88	-68	-31	7.56	10.50

**Figura 72** Voltamperograma de [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 73** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-fenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra  $v^{1/2}$ ; B. I<sub>pc</sub> contra  $v^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs.  $v$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas

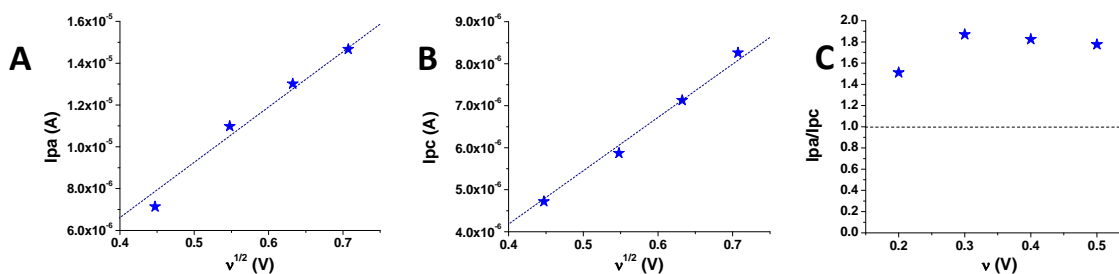
**Compuesto 10: [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>**



**Figura 74** Voltamperograma de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.

**Tabla 38** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es E<sub>1/2</sub> = -56 ± 1. Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando E<sub>1/2</sub> = -222 ± 1

v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-89	56	145	-16	-25	2.12	2.65
0.1	-92	41	133	-25	-22	3.02	3.79
0.2	-98	-18	80	-58	-23	4.72	7.14
0.3	-104	-78	96	-56	-23	5.87	11.0
0.4	-110	-3	107	-56	-24	7.13	13.0
0.5	-111	0	112	-55	-26	8.26	14.7

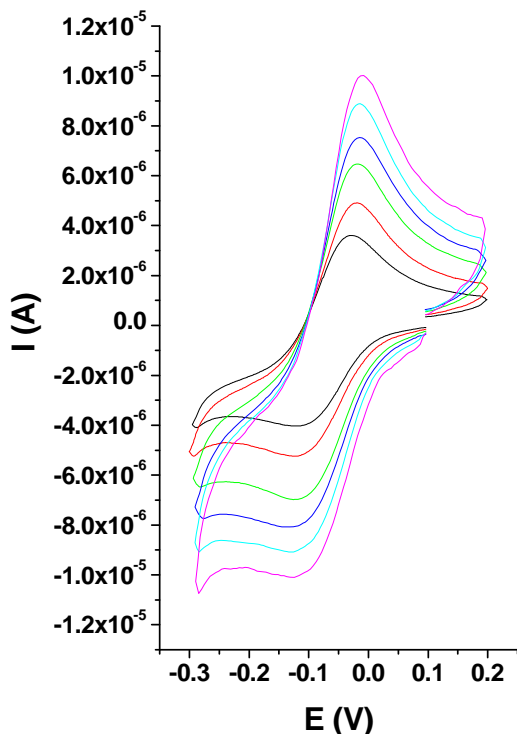


**Figura 75** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra v<sup>1/2</sup>; B. I<sub>pc</sub> contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas

### Compuesto 11: [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

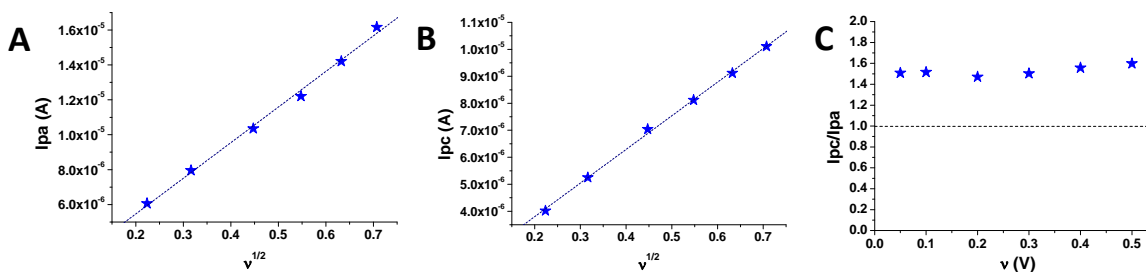
**Tabla 39** Datos voltamperometría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>.

Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El promedio de 6 determinaciones a diferentes velocidades de barrido es  $E_{1/2} = -72 \pm 3$ . Este valor se estandarizó contra el par ferroceno /ferricinio (Fc/Fc<sup>+</sup>) resultando  $E_{1/2} = -236 \pm 3$



v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-124	-28	96	-76	-37	4.02	6.06
0.1	-119	-19	100	-69	-35	5.25	7.96
0.2	-126	-19	107	-72	-34	7.04	10.4
0.3	-133	-16	117	-75	-34	8.12	12.2
0.4	-133	-14	120	-73	-30	9.12	14.2
0.5	-127	-8	119	-67	-25	10.1	16.2

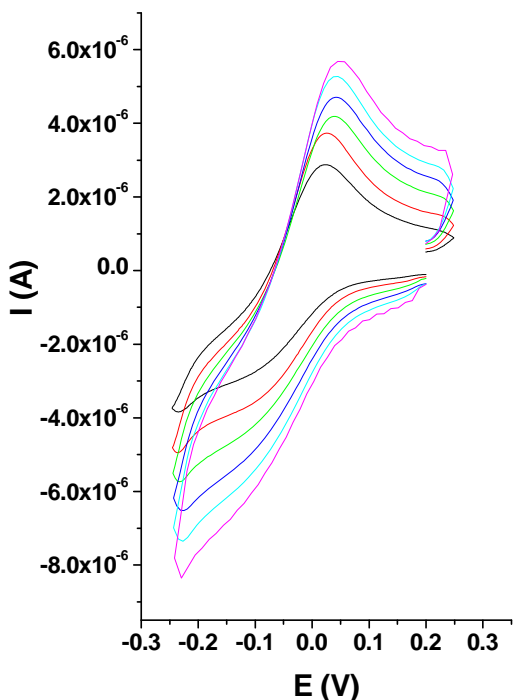
**Figura 76** Voltamperograma de [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 77** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-Cl-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra  $v^{1/2}$ ; B. I<sub>pc</sub> contra  $v^{1/2}$ ; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pc</sub>/I<sub>pa</sub> vs.  $v$  (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones sin reacciones químicas acopladas

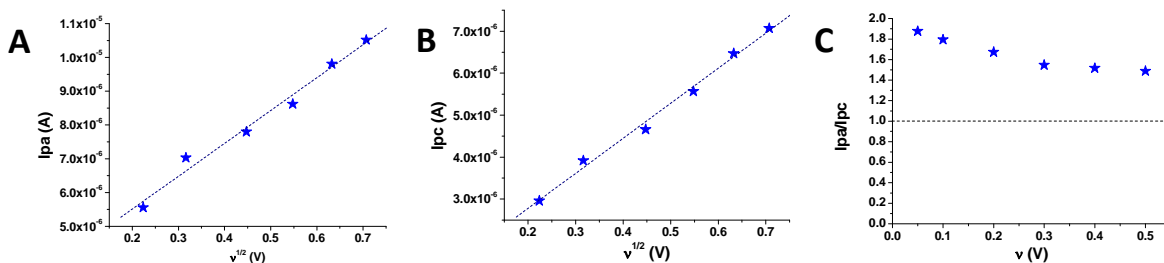
### Compuesto 12: [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO<sub>3</sub>

**Tabla 40** Datos voltamperométría cíclica obtenida en dirección reductiva a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), 6.25 x 10<sup>-3</sup> M amortiguador BTP, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. Los potenciales están reportados en mV contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1 M. El potencial E<sub>pc</sub> fue calculado a partir de la primera derivada de cada voltamperograma. No se reporta el valor promedio.



v (V)	E <sub>pc</sub>	E <sub>pa</sub>	ΔE	E <sub>1/2</sub>	E <sub>p2</sub>	I <sub>pc</sub> (μA)	I <sub>pa</sub> (μA)
0.05	-151	23	174	-64	-17	2.96	5.58
0.1	-147	26	172	-60	-13	3.92	7.03 <sup>6</sup>
0.2	-155	38	193	-58	-11	4.66	7.80 <sup>6</sup>
0.3	-158	46	203	-56	-14	5.57	8.62 <sup>6</sup>
0.4	-161	45	207	-58	-15	6.47	9.81 <sup>6</sup>
0.5	-168	57	226	-56	-15	7.07	10.5 <sup>5</sup>

**Figura 78** Voltamperograma de [Cu(5-NO<sub>2</sub>-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]<sup>+</sup> obtenido a pH 7.0 en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 (v/v), amortiguador BTP 6.25 x 10<sup>-3</sup> M, KNO<sub>3</sub> 0.05 M, a diferentes velocidades de barrido. Los potenciales se reportan contra el electrodo de Ag/AgCl 0.1M.



**Figura 79** Gráficas representativas del análisis de datos de los voltamperogramas para [Cu(5-Cl-1,10-fenanthroline)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub>. A. I<sub>pa</sub> contra v<sup>1/2</sup>; B. I<sub>pc</sub> contra v<sup>1/2</sup>; estas relaciones lineales revelan procesos controlados por difusión. C. I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> vs. v (V), el cociente superior a 1 revela una posible adsorción en el electrodo, la forma de la gráfica es compatible con un proceso reversible de transferencia de electrones con una reacción química reversible acoplada (mecanismo ErCr).





## APÉNDICE V: ARTÍCULO J.INORG. BIOCHEM. 103(2009)299-309

Journal of Inorganic Biochemistry 103 (2009) 299–309



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinorgbio](http://www.elsevier.com/locate/jinorgbio)

## Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopéinas<sup>®</sup>)

María Elena Bravo-Gómez<sup>a</sup>, Juan Carlos García-Ramos<sup>a</sup>, Isabel Gracia-Mora<sup>b</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, México, DF 04510, México<sup>b</sup>Facultad de Química, Unidad de Experimentación Animal, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 May 2008

Received in revised form 6 October 2008

Accepted 8 October 2008

Available online 17 October 2008

## Keywords:

Mixed chelate complexes

Copper(II)

Casiopéinas

Anticancer agents

QSAR

## ABSTRACT

Mixed chelate copper(II) complexes patented and mark title registered as Casiopéinas<sup>®</sup> are antineoplastic agents with general formulas [Cu(N–N)( $\alpha$ -*l*-amino acidato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(O–O)]NO<sub>3</sub>, where the N–N donor is an aromatic substituted diimine (1,10-phenanthroline (*phen*) or 2,2'-bipyridine (*bpy*)) and the O–O donor is acetylacetonate (*acac*) or salicylaldehyde (*salal*). In the present work, the series of complexes [Cu(N–N)(*acac*)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(*gly*)]NO<sub>3</sub> with several substituents on the diimine ligand were selected to perform a quantitative structure–activity relationship (QSAR) study. Two main analysis were performed: (1) the study of the influence of the substituents on diimine ligand on physicochemical properties such as half-wave potential ( $E_{1/2}$ ) and their relationship with medial lethal dose (LD50) or medial inhibitory concentration (IC50) on several tumor cell lines and (2) the study of the influence of the secondary ligand when *acac* is changed for glycinate (*gly*). Results showed that the presence of the central fused aromatic ring in the *phen* containing complexes is necessary to preserve the antiproliferative activity. The QSAR equations showed a strong relationship between the IC50 and  $E_{1/2}$ : the most active complexes are the weaker oxidants. The change of secondary ligand from *acac* to *gly* has less influence on biological activity than the changes on the diimine ligand.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Metals and metal-containing compounds have been extensively studied due to their important enzymatic, structural or reactive roles in biological processes [1]. Over the years, their properties have awoken the interest in developing novel means to use metals or metal-containing agents to modulate biological systems searching for their potential use in medicine. Several research groups have reported the development of new metal-containing anticancer agents [2,3]. The cytotoxic activity of a metal complex, which is closely related with its antitumor activity, is found to be dictated by both the identity of the metal and the ligands bound to it and, in many cases, one could be the dominating factor over the other [2].

Our interest focuses on the rational design of novel copper complexes as potential antitumor agents. Copper is an essential transition metal related to a wide range of aspects of life processes and especially involved in redox biology [1]. Due to its properties as a redox active metal, copper and its complexes have the ability to catalyze the generation of reactive oxygen species (ROS) that might cause the oxidative modification of cellular components (lipids,

proteins and DNA), disturb the redox balance in the cell, and/or interfere with the redox-related cellular signaling pathways [2,4]. We have synthesized, characterized and patented a series of new antineoplastic agents based on mixed chelate copper(II) complexes named Casiopéinas<sup>®</sup> [5,6] with general formulas [Cu(N–N)( $\alpha$ -*l*-amino acidato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(O–O)]NO<sub>3</sub>, where the N–N donor is an aromatic substituted diimine (1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine) and the O–O donor is *acac* or *salal*.

Substituted 2,2'-bipyridines (*bpy*) and substituted 1,10-phenanthrolines (*phen*) are nitrogen-donor bidentate ligands with a relatively high affinity for copper [7–9]; their extended aromatic ring system allows these ligands to bind to DNA by intercalative and non-intercalative interactions either as free ligands or in metal complexes [2,10].  $\alpha$ -*l*-amino acids were chosen as secondary ligands due to their affinity for (*bpy*) and (*phen*)/copper(II) complexes [11,12], and their low toxicity. Finally *salal* and *acac* ligands have also good affinity for (*phen*)/copper(II) complexes [11] and might modulate the redox properties of the metal center. The chemical and structural data reported so far show that the copper(II) center in this type of ternary complexes is placed in a slightly distorted square planar geometry [13–21]. These considerations have led to the study of the potential antitumor activity of this type of copper(II) complexes. Our hypothesis is that the nature, number and

\* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56223329.

E-mail address: [ruizazuara@gmail.com](mailto:ruizazuara@gmail.com) (L. Ruiz-Azuara).





position of the substituents on the diimine ligands, and also the modification of  $\alpha$ - $\alpha$ -amino acidate or O–O donor will have an effect either on the selectivity or on the degree of biological activity shown by the ternary copper(II) complexes. This effect would be due to the modification of physicochemical properties of the complexes, e.g. the redox behavior of metal center or the water solubility of the complex.

Several complexes of this family have been tested *in vivo* and *in vitro*, and have shown cytotoxic [22,23], genotoxic [23] and anti-tumor activity [24,25]. Their mode of action remains to be satisfactorily elucidated, however, there is evidence that supports that these compounds are able to inhibit cell proliferation and produce cell dose-dependent death by apoptosis through mechanisms dependent and independent of caspase activation [24,26]. The apoptosis observed might be the result of one or several signals which lead to this final effect. These signals could be mediated by generation of ROS [23], by the observed mitochondrial toxicity [24,27,28], or both, and might play, alone or cooperatively, an important role in the regulation of cell death induced by this type of complexes. Inhibition of respiration and ATP synthesis was observed in mitochondria as result of damage in several different mitochondrial sites in a dose-dependent manner, which compromises the energy dependent processes in cells [29]. The inhibition of cell proliferation [23,24] and DNA degradation [23,24,30] in the presence of reducing agents is simultaneous to ROS generation in several studies suggesting that DNA oxidation observed on cells might also be triggering the cell death. On the other hand, there also exists the possibility of direct interaction of complexes with DNA by intercalative and non-intercalative interactions as expected for these complexes due to the planar aromatic moiety of its diimine ligands [2,10,31]. Nevertheless, the cellular targets could be others beyond mitochondria and DNA; the administration *in vivo* of complexes of this family produces severe damage in erythrocytes which is expressed as hemolytic anemia [32]. These cells are lack the two mentioned main cellular targets; therefore it is reasonable to conclude that other cellular targets are also involved. In summary, at the molecular level, the evidence points to several biological targets of damage mediated by quite heterogeneous mechanisms working simultaneously.

Two of the most studied complexes in several models *in vivo* and *in vitro* are [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)acetylacetonato][NO<sub>3</sub>] (Casiopina III-ia) and [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)]NO<sub>3</sub> (Casiopina II-gly), both complexes have shown cytotoxic, proapoptotic and antitumor properties [22,24–26]. On the basis of these results, [Cu(N–N)(*acac*)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N–N)(*gly*)]NO<sub>3</sub> complexes with several substituents on the diimine ligand have been selected in the present work to perform a quantitative structure–activity relationship (QSAR) study in order to identify the physicochemical and structural characteristics regulating the biological activity shown and to guide their rational redesign.

QSAR modeling is a tool widely used to understand and predict diverse activities on biological systems [33,34], but very little in this area has been done with metal complexes due the paucity of highly accurate and transferable linear free energy relationships (LFER) parameters, such as distribution coefficient (Log*P*), for metal chelates in the literature. To circumvent this difficulty, experimental values as distribution ratio (*D*) and  $E_{1/2}$  for the complexes studied here were determined in order to use them along with traditional substituent descriptors for developing QSAR equations. Two main goals were pursued in this work: (1) the study of the influence of the substituents on diimine ligand on physicochemical properties such as electrochemical behavior of metal center and their relationship with acute toxicity *in vivo* (LD50) on ICR mice or medial inhibitory concentration (IC50) on HeLa, SiHa, MCF-7 and HCT-15 tumor cell lines and (2) the study of the influence of

the change of *acac* ligand for *gly*. The resulting equations adequately describe the biological activity of complexes and support the current hypotheses about their mode of action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and solvents

All differently substituted 1,10-phenanthrolines, substituted 2,2'-bipyridines, and glycine, employed to synthesize the studied complexes, were acquired to GPS Chemicals Inc. and used without further purification. Acetylacetonone, copper(II) nitrate hemipentahydrate (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O, 99.999%), 4-morpholine propanesulfonic acid (MOPS, 99+%), potassium bromide (KBr, 99+%), bis tris propane (BTP, 96+%), nitric acid (HNO<sub>3</sub>), potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>, 99+%), cisplatin, sulforhodamine B and solvents employed to synthesize (A.R. grade), purify (A.R. grade) and perform physicochemical measurements (Spectrophotometric grade) were acquired in Sigma-Aldrich, Inc. Deionized water was employed in conductimetric measurements and cyclic voltammetry.

### 2.2. Synthesis of the complexes

The copper complexes were synthesized following the methodology previously reported [5,6,35]. Briefly, equimolar solution of copper(II) nitrate and the suitable substituted diimine were mixed together followed by addition of equimolar quantity of the corresponding O–O donor (*acac*) or N–O donor (*gly*) previously deprotonated. Products were precipitated by partial evaporation of the solvent, recrystallized from water/ethanol at least two times, characterized by IR spectra and its purity was confirmed by elemental analysis. The ternary complexes exhibit IR absorptions typical of coordinated ligands: *phen*: 1625–1590 cm<sup>-1</sup>, 1524–1516 cm<sup>-1</sup>, 1430–1421 cm<sup>-1</sup> (fused phenyl rings), 736–711 cm<sup>-1</sup> and 896–811 cm<sup>-1</sup> ( $\delta$  C–H out of plane); *bpy*: 1616–1600 cm<sup>-1</sup>, 1525–1523 cm<sup>-1</sup>, 1490–1446 cm<sup>-1</sup> (aromatic rings), 783–769 cm<sup>-1</sup> and 730 cm<sup>-1</sup> ( $\delta$  C–H out of plane); *acac*: 1587–1577 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  C=O); *gly*: 1634–1602 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_{as}$  COO<sup>-</sup>), 648–597 cm<sup>-1</sup> ( $\delta$  NH<sub>2</sub>), 3300–3240 cm<sup>-1</sup> and 3449–3395 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  NH<sub>2</sub>). All IR spectra show an absorption band in 1384.7 cm<sup>-1</sup> associated with the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> counter ion: the spectra of complexes 1–3, 5–8, 10 and 11 display wide absorption bands between 3398 cm<sup>-1</sup> and 3489 cm<sup>-1</sup> assigned to water, for *gly* complexes this band overlaps with the vibration of the amino group.

### 2.3. Physical measurements

Carbon, hydrogen and nitrogen content were determined using EAGER 200 elemental analyzer; UV–vis spectra were recorded on a Agilent 8453 spectrophotometer; infrared spectra were recorded in the 4000–400 cm<sup>-1</sup> region using KBr pellets and a Nicolet Avantar 320 FT-IR spectrophotometer; thermogravimetric analyses were performed by TG/SDTA method in a Mettler Toledo Star<sup>®</sup> system (25–200 °C, 5 °C/min). Conductimetric measurements were done in 1 mM ethanolic solution in an YSI 3100 conductivity instrument and a magnetic susceptibility balance Mki, Sherwood Scientific was employed for magnetic susceptibility measurements.

### 2.4. Voltammetry

Half-wave potentials ( $E_{1/2}$ ) for the Cu(II)/Cu(I) couple were determined by cyclic voltammetry. Measurements were performed using a three-electrode setup system in a cell of 10 ml of volume: a glassy carbon disk working electrode of 4 mm diameter, platinum auxiliary electrode and Ag/AgCl 0.1 M reference electrode. Ethanol/water mixture (2/5, v/v) containing 50 mM KNO<sub>3</sub> electrolyte,





6.25 mM bis tris propane-HNO<sub>3</sub> buffer (pH = 7.37 ± 0.02), and 2 mM ternary complex were used; final apparent pH of the test solution was 7.00 ± 0.02. Prior to each measurement, the working electrode was cleaned and polished with alumina and a soft cloth. Solutions were deoxygenated by bubbling 99.999% pure nitrogen through during 10 min prior to measurements. A pre-oxidation at equilibrium potential was applied during 30 s. Voltammograms were recorded at 50, 100, 200, 300, 400 and 500 mVs<sup>-1</sup> in reductive direction.

### 2.5. Distribution ratio (LogD)

Hydrophobicity was evaluated by measurement of distribution ratio (*D*) in the 1-octanol/water system using the shake flask method. A MOPS buffer 10<sup>-2</sup> M pH = 7.40 ± 0.02 was employed as aqueous phase. Both phases, organic and aqueous, were presaturated with 10<sup>-4</sup> M of each test complex, then the UV spectrum (Agilent 8453 spectrophotometer) was recorded for each phase before placing them together in a 8 ml vial carefully degassed. The vial was shaken vigorously inside a water bath with constant temperature *T* = 25.0 ± 0.5 °C, protected from light for 3 h. At the end of the incubation, the mixture was centrifuged for 10 min at 3000 rpm to break the emulsion, the layers were separated with a Pasteur pipette, and concentrations in both phases were measured by electronic absorption spectroscopy in the UV region at the second band of absorption around 290 nm. The wavelengths used for each complex and their molar extinction coefficient are reported in Table 1. The test was done by triplicate and *D* was calculated as the average concentration ratio  $C_o/C_a$ , where *C<sub>o</sub>* is the final concentration in the organic phase and *C<sub>a</sub>* is the final concentration in the aqueous phase.

### 2.6. Animals

Male mice were purchased from Harlan Mexico Inc. with average weight 23 ± 3 g and from 12 to 15 weeks old. The mice remained in the UNEXA (Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, UNAM) under controlled environmental conditions: temperature (22 ± 1 °C), 50–60% relative humidity, 12/12 h, light-darkness cycles. Water and food were supplied *ad libitum* and consisted in Sterilizable Harlan Teklad Global Diet 20185 and water purified by reverse osmosis and acidulated with HCl to pH = 2.5 for gastrointestinal parasites control.

### 2.7. Medial lethal dose (LD50)

For each drug, six different doses were tested in groups of 10 ICR male mice per group. The drugs were administered intraperitoneally (ip) with a single dose of each complex and were kept on observation during 14 days. The surviving mice per group were counted at 24 h. LD50 was computed by sigmoidal fit in a dose-quantal response graphic (Microcal Origin 6.0, Microcal software Inc.).

### 2.8. Tumor cell lines

HeLa (cervix adenocarcinoma), SiHa (cervix; squamous cell carcinoma), MCF-7 (mammary adenocarcinoma) and HCT-15 (Colorectal adenocarcinoma) cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco invitrogen corporation) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco invitrogen corporation).

### 2.9. Measurements of cell growth inhibition

Details of measuring cell growth inhibition are described elsewhere [36,37]. Briefly, 2 × 10<sup>4</sup> cells/well were plated in 96-well

microplate with Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS), and allowed to attach incubating at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. At the end of incubation timing, the medium was aspirated and cells were exposed to drugs in six different concentrations (0.1, 0.3, 1, 3, 10 and 30 μg/ml) for 24 h in the conditions mentioned above. Cis-platin was employed as drug control. Cell growth was determined according to the sulforhodamine B assay [36,37]. Absorbance was measured at 564 nm in a BIO-RAD 550 Microplate reader and % cell growth by each concentration of drug was calculated as: % growth = 100 × [T/C]; where *T* is the absorbance of treated wells and *C* is the absorbance of untreated wells. The 50% growth inhibition (IC50) was calculated by Probit survival analysis in StatPlus® 2005 [38]. Reported IC50 values are the average of at least three independent experiments.

### 2.10. QSAR analysis

Values for standard LFER descriptors used in the development of QSAR models were obtained from the literature (references in Table 2). Log*P* was calculated for the diimine ligand in the CLOGP module of ACD/Labs/ChemSketch 3.00 [39]. The General PLS module of STATISTICA 7.0 [40] was employed initially to run a partial least squares (PLS) statistical analysis in order to select appropriate descriptor variables from available substituent tables and experimental data. The final QSAR equations were generated by multiple regression and statistically tested by ANOVA. Coefficients of predictor variables are reported at significance level 0.05. The final descriptor variables used to develop QSARs for IC50 and LD50 are shown in Table 2.

## 3. Results

### 3.1. Chemical characterization

Complexes (Fig. 1) were characterized by conventional techniques (IR and UV-vis spectroscopies), and the purity was assessed by elemental analysis (Table 1). All complexes are paramagnetic and 1:1 electrolytes with nitrate as counter ion in agreement with effective moment ( $\mu_{\text{eff}}$ ) and conductimetric measurements, respectively. The ternary complexes exhibit IR absorptions typical of coordinated ligands, NO<sub>3</sub> counter ion and water for the complexes 1–3, 5–8, 10 and 11. Hydrates were confirmed by thermogravimetric analysis also, the loss of water was observed between 40 and 100 °C.

Characterization data obtained for all the complexes studied, which included X-ray structure determination for complexes 2 [13], 3 [41], 13 [16], 16 [14] and 18 [21] previously reported, supported the assumption that the coordination environment around the copper atom always has the same slightly distorted square planar structure and a water molecule in the apical position for compounds 1–3, 5–8, 10, 11, 13–17 and 19–21.

### 3.2. Electrochemical measurements

The cyclic voltammetric curve shown in Fig. 2 is representative of the behavior of the metallic center in the compounds studied for the redox couple Cu(II)/Cu(I); all responses are in agreement with a single-electron transfer process. The reaction reversibility (data not shown) and the *E*<sub>1/2</sub> values (Table 2) are affected by both the type of diimine ligand and their substituents.

Different reversibility degrees are found depending on the nature and position of the substituents on the diimine ligand. The separation between cathodic and anodic peak potentials (data not

**Table 1**  
Chemical characterization.

No	X	Secondary ligand	Color	UV absorptions <sup>a</sup> $\lambda_{max}$ (nm); $\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	E. A. <sup>b</sup> (XN; XC; XH)	Formula <sup>c</sup>	FW (g/mol)	$\mu_{eff}$ (BM) <sup>d</sup>	Cond. ( $\mu S$ ) <sup>e</sup>
<b>Pyridine group (Fig. 1A)</b>									
1	H	Acac	Blue	Aq: 197; 48267.8 297; 29823.6 Oct: 205; 34063.7 300; 24661.6	10.32; 43.13; 4.42 (10.08; 43.22; 4.59)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·2H <sub>2</sub> O	416.54	1.74	46.90
2	4,4-dMe	Acac	Blue	Aq: 206; 54778.7 295; 28098.5 Oct: 210; 57396.4 298; 31608.3	9.97; 47.48; 5.07 (9.84; 47.83; 4.96)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·H <sub>2</sub> O	426.92	1.80	40.23
<b>Phenanthroline group (Fig. 1B and 1C)</b>									
3	H	Acac	Blue	Aq: 206; 43809.8 272; 32160.6 Oct: 212; 40813.5 274; 31289.8	9.23; 45.93; 4.17 (9.53; 46.31; 4.34)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.90	1.88	38.57
4	4-Me	Acac	Indigo	Aq: 205; 56843.5 272; 40498.6 Oct: 207; 50981.0 274; 39929.2	10.24; 51.16; 4.16 (10.03; 51.61; 4.09)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub>	418.90	1.94	39.51
5	5-Me	Acac	Blue	Aq: 206; 56384.8 277; 45652.8 Oct: 209; 58384.8 279; 45458.4	9.15; 47.66; 4.92 (9.24; 47.52; 4.65)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·2H <sub>2</sub> O	454.91	1.89	40.10
6	4,7-dMe	Acac	Blue	Aq: 208; 50526.4 273; 44271.3 Oct: 209; 60257.6 274; 47796.5	9.30; 50.23; 4.55 (9.32; 50.61; 4.69)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·H <sub>2</sub> O	450.94	1.80	38.48
7	5,6-dMe	Acac	Indigo	Aq: 207; 41402.0 282; 36119.5 Oct: 210; 35629.8 282; 30968.9	9.03; 48.82; 4.93 (8.96; 48.66; 4.94)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·2H <sub>2</sub> O	468.95	1.82	38.90
8	3,4,7,8-tetraMe	Acac	Indigo	Aq: 211; 59953.9 278; 41915.3 Oct: 213; 55153.2 280; 47719.2	8.95; 52.79; 5.41 (8.77; 52.66; 5.26)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·H <sub>2</sub> O	478.99	1.78	37.32
9	5-phenyl	Acac	Blue	Aq: 204; 63658.9 281; 42576.6 Oct: 208; 58538.2 285; 41604.0	8.46; 57.47; 4.09 (8.74; 57.44; 3.98)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub>	480.97	1.81	36.77
10	4,7-diphenyl	Acac	Blue	Aq: 205; 55653.2 280; 57409.8 Oct: 205; 61186.7 280; 55730.1	7.22; 60.43; 4.22 (7.31; 60.57; 4.38)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ·H <sub>2</sub> O	575.06	1.87	36.00
11	5-Cl	Acac	Indigo	Aq: 207; 54385.8 276; 42513.3 Oct: 210; 53849.5 278; 44643.3	9.41; 44.46; 3.49 (9.19; 44.65; 3.53)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>12</sub> Cl·H <sub>2</sub> O	457.31	1.83	39.74
12	5-NO <sub>2</sub>	Acac	Dark green	Aq: 201; 57918.9 280; 33187.6 Oct: 206; 49124.1 279; 32221.5	12.62; 44.95; 3.25 (12.45; 45.39; 3.14)	CuC <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> H <sub>14</sub>	449.87	1.82	34.80
13	H	Gly	Blue	–	14.52; 44.11; 3.12 (14.75; 44.27; 3.18)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·H <sub>2</sub> O	406.4	1.8	34.1
14	4-Me	Gly	Blue	–	13.53; 43.37; 3.68 (13.60; 43.74; 3.88)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·H <sub>2</sub> O	411.5	1.8	40.5
15	5-Me	Gly	Blue	–	13.57; 43.47; 3.75 (13.60; 43.74; 3.88)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·H <sub>2</sub> O	411.5	1.85	35.9
16	4,7-dMe	Gly	Blue	–	12.61; 43.53; 4.70 (12.62; 43.29; 4.54)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·2H <sub>2</sub> O	443.9	1.76	38.8
17	5,6-dMe	Gly	Blue	–	12.78; 47.37; 4.15 (12.72; 47.11; 3.95)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·H <sub>2</sub> O	425.9	1.71	35.3
18	3,4,7,8-tetraMe	Gly	Blue	–	12.76; 47.27; 4.95 (12.34; 47.63; 4.88)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	435.9	1.78	35.9
19	4,7-diphenyl	Gly	Blue	–	10.01; 55.81; 4.11 (10.01; 55.81; 4.11)	CuC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·1.5H <sub>2</sub> O	559.0	1.85	37.6
20	5-Cl	Gly	Blue	–	13.05; 38.63; 3.05 (12.96; 38.88; 3.00)	CuC <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Cl·H <sub>2</sub> O	432.0	1.76	41.0
21	5-NO <sub>2</sub>	Gly	Blue	–	15.54; 37.48; 3.01 (15.81; 37.96; 2.93)	CuC <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ·H <sub>2</sub> O	442.5	1.71	36.6

<sup>a</sup> UV absorptions in aqueous solutions at pH 7.40 ± 0.02, 298 K (Aq.) and octanol (Oct.) at 298 K.

<sup>b</sup> E. A. elemental analysis experimental data (calculated data).

<sup>c</sup> Formulated per metal ion.

<sup>d</sup> Magnetic effective moment.

<sup>e</sup> Conductivity 1 mM ethanolic solution at 298 K.

shown), that can be taken as a measure of the reversibility on the electrode of the redox couple involved, ranges from 0.079 V, for complex 8, to 0.193 V, for complex 12, at a potential scan rate of 0.2 V s<sup>-1</sup>. The general trend shows that the electron donor substituents on the diimine favor the reaction reversibility in this experimental system.

The E<sub>1/2</sub> values (Table 2) were computed as the half-sum of anodic and cathodic peak potentials. For complexes 12 and 21 the irreversibility affects the electrode charge transfer, in consequence the cathodic peak responses are very broad and that makes impossible to determine accurately the E<sub>1/2</sub>, thus they are not reported in this paper. The electronic effects of the sub-



**Table 2**  
 Biological and physicochemical data.

No	Log D <sup>a</sup>	E <sub>1/2</sub> <sup>b</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>c</sup> (ref.)	LD50 <sup>d</sup>	KCS <sup>e</sup>			
					HeLa	SiHa	MCF-7	HCT-15
1	-1.38 ± 0.03	-318 ± 4	4.42 (1)	71.73 ± 6.53	42 ± 3.1	40.5 ± 2.0	103.7 ± 9.6	67.3 ± 1.6
2	-0.95 ± -0.95	-338 ± 3	5.34 (2)	51.43 ± 2.39	18.2 ± 2.7	14.5 ± 1.5	15.9 ± 1.8	40.5 ± 4.6
3	-1.18 ± 0.00	-271 ± 1	4.93 (1)	29.18 ± 1.03	10.7 ± 0.9	6.8 ± 0.9	8.1 ± 0.5	7.3 ± 0.7
4	-1.18 ± 0.06	-290 ± 4	-	28.21 ± 1.38	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.5	5.6 ± 0.7	6.0 ± 3.9
5	-1.06 ± 0.07	-282 ± 2	5.27 (3)	25.76 ± 1.74	6.2 ± 0.7	3.2 ± 0.2	4.4 ± 0.5	2.6 ± 3.4
6	-0.81 ± 0.06	-318 ± 2	5.95 (4)	22.82 ± 1.82	1.4 ± 0.1	0.96 ± 0.09	4.9 ± 0.6	2.1 ± 3.1
7	-0.81 ± 0.02	-298 ± 3	5.60 (4)	26.38 ± 1.39	3.4 ± 0.5	1.7 ± 0.2	3.9 ± 0.4	1.9 ± 3.3
8	-0.49 ± 0.01	-307 ± 1	6.48 (5)	16.23 ± 2.63	1.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.3	1.4 ± 3.2
9	0.06 ± 0.01	-248 ± 4	4.90 (6)	28.38 ± 3.33	3.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.5 ± 3.3
10	1.06 ± 0.08	-222 ± 1	4.84 (7)	24.93 ± 1.79	4.2 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.2 ± 0.3	3.2 ± 3.4
11	-0.74 ± 0.06	-236 ± 3	4.07 (8)	33.69 ± 1.84	4.5 ± 0.5	8.8 ± 0.6	9.8 ± 0.5	12.9 ± 3.5
12	-0.84 ± 0.04	-	3.22 (9)	51.65 ± 0.78	21.3 ± 2.6	10.2 ± 1.1	14.7 ± 1.4	35.0 ± 2.4
13	-	-259 ± 3	4.93 (1)	-	13.9 ± 1.3	27.3 ± 2.2	9.6 ± 1.1	21.2 ± 2.5
14	-	-281 ± 7	-	-	8.7 ± 0.7	10.2 ± 1.0	7.7 ± 0.6	5.3 ± 3.5
15	-	-273 ± 7	5.27 (3)	-	6.2 ± 0.6	5.7 ± 0.6	4.7 ± 0.2	3.7 ± 3.4
16	-	-310 ± 4	5.95 (4)	-	5.5 ± 0.7	5.5 ± 0.8	4.6 ± 0.4	2.0 ± 3.2
17	-	-292 ± 3	5.60 (4)	-	5.3 ± 0.1	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.3	2.1 ± 3.1
18	-	-302 ± 5	6.48 (5)	-	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2	1.8 ± 3.4
19	-	-214 ± 4	4.84 (7)	-	5.1 ± 0.2	6.6 ± 0.9	4.1 ± 0.4	7.6 ± 3.7
20	-	-221 ± 4	4.07 (8)	-	14.3 ± 0.5	13.9 ± 1.3	23.2 ± 2.3	22.3 ± 1.6
21	-	-	3.22 (9)	-	44.8 ± 1.5	17.9 ± 2.2	28.64 ± 3.4	47.3 ± 5.5
Comp	-	-	-	-	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.5	5.6 ± 0.8	71.8 ± 7.4

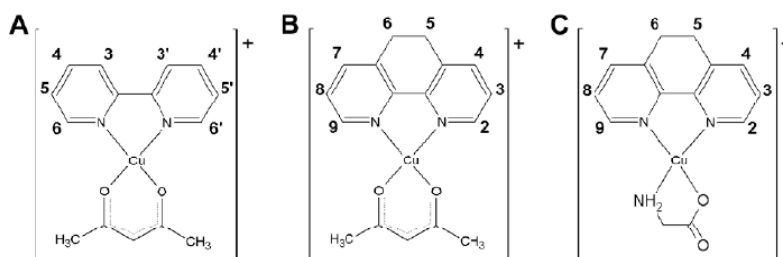
<sup>a</sup> Logarithm of distribution ratio octanol/water measured at pH = 7.4 and 25 °C. LogD is given as the mean of three measurements ±SD.

<sup>b</sup> Half-wave potential obtained at pH 7.0 in 2/5 (v/v) ethanol/water mixture, 6.25 × 10<sup>-3</sup> M BTP buffer, 0.05 M KNO<sub>3</sub>. E<sub>1/2</sub> is given in mV as the mean of six measurements at different scan rates ±SD. The potentials were standardized against ferrocene/ferricenium ion couple (Fc/Fc<sup>+</sup>).

<sup>c</sup> pK<sub>a</sub> for N–N ligand (H<sub>1</sub>/H + 1), 1 [68], 2 [69], 3 [7], 4 [70], 5 [71], 6 [72], 7 [73], 8 [74], 9 [75].

<sup>d</sup> LD50 (μM/kg) in male mice ICR ±SE.

<sup>e</sup> K50 (μM) on HeLa, SiHa, MCF-7 and HCT-15, the values are given as the mean of three independent experiments ±SE.



**Fig. 1.** Structures of the complexes studied. A: [Cu(2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)]<sup>+</sup>; B: [Cu(1,10-phenanthroline)(acetylacetonato)]<sup>+</sup>; and C: [Cu(1,10-phenanthroline)(glycinate)]<sup>+</sup>.

stituents on the phen or bpy ring influence significantly the redox potential of the Cu(II)/Cu(I) couple in both groups of compounds with different secondary ligand (gly or acac). The half-wave potential is an experimental parameter widely accepted to indirectly measure ligands' π acceptor properties, which is closely related with the π-back bonding effect from the metal ion to the aromatic amine and the consequent increment of thermodynamic stability constants [42]. The π-acceptor properties of a ligand decrease regularly as their σ-donor properties (pK<sub>a</sub> values) increases. As expected, it was found an inverse relationship between redox potential and phenanthroline pK<sub>a</sub> (pK<sub>a<sub>obs</sub></sub>) for the two independent groups of complexes: acac group (complexes 3–12; R = -0.87) and gly group (complexes 13–21; R = -0.94). This behavior is also in agreement with the relationship previously reported for Cu(II) complexes with substituted phenanthrolines with 1:2 metal to ligand stoichiometry [43].

For the reasons explained above, and since E<sub>1/2</sub> describes the redox behavior of the metallic center which might be involved in the mode of action, it was selected as an electronic parameter to ana-

lyze the influence of the electronic environment around the metallic center on the biological activity (LD50 or IC50) in QSAR analysis.

### 3.3. Hydrophobicity

The LogD experimental values of the acac group of complexes (compounds 1–12) span the range from -1.38 to 1.06. As these complexes are electrolytes 1:1, they all have a total charge 1+ which makes them mostly hydrophilic with the exception of the phenyl substituted derivatives 9 and 10. In order to analyze if the effects of substitution on diimine ligand have the same contribution to hydrophobicity when they are coordinated, LogP was calculated for substituted N–N ligands (CLogP<sub>N–N</sub>) and the values were compared with experimental LogD values for their corresponding Cu(II) ternary complexes; theoretical and experimental values are linearly related according to the equation LogD = -2.16 + 0.55 × CLogP<sub>N–N</sub> (R = 0.9418, n = 12). The substituent contribution to lipophilicity is proportional in both, ligand and complexes, despite the presence of the metallic center. This finding

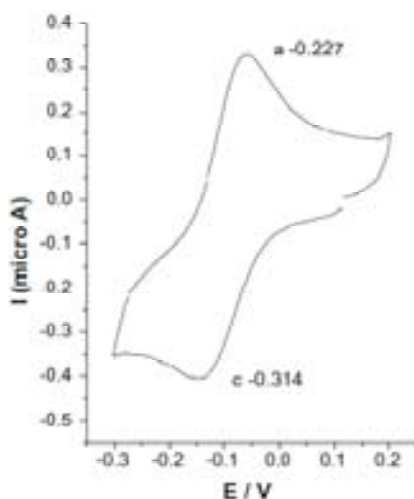


Fig. 2. Cyclic voltammogram of  $[\text{Cu}(1,10\text{-phenanthroline})\text{acetylacetonate}]$  obtained at pH 7.0 in 2/5 (v/v) ethanol/water mixture,  $6.25 \times 10^{-3}$  M BTF buffer, 0.05 M  $\text{KNO}_3$ , scan rate 0.1 V/s. The potentials were standardized against ferrocene/ferrocenium ion couple ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ).

opens the alternative of using traditional hydrophobic substituent descriptors reported in the literature or calculation LOGP methods for the ligands involved instead of experimental values of the complexes in order to identify trends in further QSAR studies for related coordination compounds.

### 3.4. Biological assays

#### 3.4.1. Acute toxicity (median lethal dose)

LD50 for the ternary complexes tested are reported in Table 2 as  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  doses. The complexes with *phen* as ligand are approximately 2.5 times more toxic than their *bpy* analogues. The comparison of LD50 values for *phen* compounds 3 and 6 with their *bpy* analogues 1 and 2 reveals an abrupt decrease in toxicity attributable to the absence of the central aromatic ring which is the only structural difference between them. These results are in agreement with IC50 values for *in vitro* tests discussed below.

#### 3.4.2. Cell growth inhibition

IC50 are reported in Table 2 as micromolar doses. Experimental cisplatin IC50 is close to the values previously reported by National Cancer Institute (USA) on cell lines HCT-15 and MCF-7. The same trend previously discussed for LD50 is found for IC50 when the *acac* group is analyzed (compounds 1–12); the compounds with *phen* as N–N donor are more active than those with *bipyridine*. This behavior is conserved in all four tumor cell lines tested and it is attributed to the lack of the third aromatic ring in complexes 1 and 2.

### 3.5. QSAR analysis

As mentioned before, there exist few QSAR analyses for coordination compounds, and usually due to the lack of available parameters for the whole complexes the authors put into equations descriptors reported in literature or theoretically calculated only for the ligands. One of our goals in this work is the construction of QSAR equations employing as predictor variables some experimental values which describe the properties of the whole complexes, and to compare them with QSAR equations constructed

with molecular or substituents descriptors obtained from literature only for the ligands instead; this comparison has the aim of analyzing whether this practice is predictive for coordination compounds which have related structures with the complexes in this study. The experimental values employed were Log D as hydrophobic descriptor and  $E_{1/2}$  represented as  $pE_{1/2}$  ( $pE_{1/2} = E_{1/2}/0.059$  V) as descriptor of the electronic properties of the metallic center. Two subsets of data were employed to perform the analyses: (1) *acac* group (compounds 1–12) in order to assess the influence of N–N donor on the biological activity, to analyze the relationship between acute toxicity *in vivo* and IC50 *in vitro* and to evaluate the predictive accuracy of the model when only physicochemical properties or substituent descriptors for the ligands are employed in QSARs and (2) *phen* group (compounds 3–21) in order to evaluate the influence of the secondary ligand on IC50.

#### 3.5.1. Influence of N–N donor analysis

In order to analyze the influence of diimine ligand on biological activity, LD50 or IC50, QSAR equations were constructed for the *acac* group (compounds 1–12). Fig. 3 shows the distribution of  $\text{Log } 1/\text{IC50}$  on SiHa ( $\text{Log } 1/\text{IC50}_{\text{SiHa}}$ ) for complexes 1–11 according to their  $E_{1/2}$ , the complexes are clustered in two groups depending on the diimine present in the structure. The same behavior is observed in all four tumor cell lines where the general trend shows a sudden decrease in the activity when the N–N donor is changed from phenanthroline to bipyridine. The only structural difference between the diimines is the third aromatic ring, which results in possible changes in several physicochemical characteristic, e.g. hydrophobicity and electronic properties. Their individual effects on biological activity are difficult to distinguish because they all vary simultaneously. This fact led us to introduce in the equations an indicator variable  $I_{N-N}$  in order to analyze the importance of the central aromatic ring, the variable takes the value of one or zero according to the presence or absence of the central aromatic moiety ( $I_{N-N} \text{ phen} = 1$ ;  $I_{N-N} \text{ bpy} = 0$ ).

The final equations generated with experimental values (eqs. (1)–(4)) successfully model IC50 and describe similar trends on each cellular line. The equations predict a mean increment on the activity observed of one order of magnitude attributable to the change of diimine in the structure. The positive sign for  $I_{N-N}$  variable predicts a noticeable increment on activity for the complexes with *phen* as N–N donor.

$pE_{1/2}$  is also an important contributor to the QSAR model, activity increases as the substituents on diimine becomes more electron-donating. The shift to more negative  $E_{1/2}$  favors the activity.

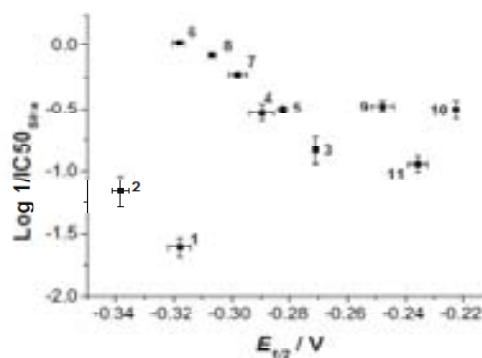


Fig. 3. Plot of activity of the acetylacetonate group of complexes on SiHa cell line ( $\text{Log } 1/\text{IC50}_{\text{SiHa}} \mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) vs. half-wave potential  $\text{Cu}/\text{Cu}^2+$  standardized against ferrocene/ferrocenium ion couple in volts ( $E_{1/2} \pm \text{SD}$ ).



thus the more active complexes are those which are weaker oxidants. Since  $E_{1/2}$  is a measure of the behavior of the metallic center, this implies that copper might play an important role in the mechanism of action. Finally, according to PLS analysis, the complexes' hydrophobicity is the smallest contribution to the model; however, there exist a slight increment in activity for more hydrophobic compounds. The increment of copper hydrophobicity due to chelation might facilitate its transport across membranes. In summary, analysis of the observed relationships from Eqs. (1)–(4) suggests that complexes with electron donor and hydrophobic substituents on the N–N donor produce higher activity measured as IC50.

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{HeLa}} &= -3.78(\pm 1.71) + 1.19(\pm 0.41)I_{\text{N-N}} \\ &\quad - 0.47(\pm 0.33)pE_{1/2} + 0.23(\pm 0.26)\text{LogD} \\ R^2 &= 0.8262, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.7517, \quad \text{sd} = 0.2263, \\ F &= 11.09, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{SfHa}} &= -4.94(\pm 0.56) + 1.35(\pm 0.11)I_{\text{N-N}} \\ &\quad - 0.72(\pm 0.09)pE_{1/2} + 0.39(\pm 0.07)\text{LogD} \\ R^2 &= 0.9893, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9847, \quad \text{sd} = 0.0597, \\ F &= 214.87, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{MCF-7}} &= -3.37(\pm 1.31) + 1.08(\pm 0.32)I_{\text{N-N}} \\ &\quad - 0.40(\pm 0.25)pE_{1/2} + 0.42(\pm 0.20)\text{LogD} \\ R^2 &= 0.9046, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.8636, \quad \text{sd} = 0.1742, \\ F &= 22.11, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{HCT-15}} &= 4.57(\pm 1.18) + 1.49(\pm 0.29)I_{\text{N-N}} \\ &\quad - 0.59(\pm 0.23)pE_{1/2} + 0.39(\pm 0.18)\text{LogD} \\ R^2 &= 0.9449, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9212, \quad \text{sd} = 0.1565, \\ F &= 39.98, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (4)$$

### 3.5.2. Acute toxicity (LD50) vs. medial inhibitory concentration (IC50)

QSAR analysis was performed for LD50 following the same assumptions made before for IC50 analyses. Eq. (5) shows the same general trend found for IC50; the terms, signs and values of regression coefficients are comparable in all five equations, indicating that both activities are closely related. Linear regression models for relationship between LD50 and IC50 in the different cell lines are shown in Table 3. The very similar values and the positive sign of the slope in these relationships lead us to think that the toxicity and cytotoxicity mechanisms are similar.

$$\begin{aligned} \text{Log1/DL50} &= -2.63(\pm 0.49) + 0.47(\pm 0.12)I_{\text{N-N}} \\ &\quad - 0.17(\pm 0.09)pE_{1/2} + 0.11(\pm 0.07)\text{LogD} \\ R^2 &= 0.9373, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9104, \quad \text{sd} = 0.0519, \\ F &= 34.87, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (5)$$

### 3.5.3. QSARs using descriptors only for the ligands

Results obtained from the QSAR Eqs. (1)–(5) can be reproduced when only properties of the ligands are taken into account in the model as predictor variables. As shown above, the influence of the N–N ligand basicity on redox behavior and copper electronic properties results in a linear relationship between  $E_{1/2}$  and  $pK_{\text{a}}^{\text{phen}}$ ; this fact allows the change of electronic descriptor without significant change in the model. On the other hand, for the oac group of complexes the changes in hydrophobicity depends only of substituents in the N–N donor because all them share the same secondary ligand, thus the influence of hydrophobic properties on the activity can be modeled either with the experimental LogD for the complexes or with  $\text{CLogP}_{\text{N-N}}$  obtaining equivalent results. These two

**Table 3**  
Acute toxicity (LD50 ( $\mu\text{M}$ )(kg) in male mice (B6) vs. inhibitory concentration (IC50 ( $\mu\text{M}$ )) on HeLa, SfHa, MCF-7 and HCT-15 cell lines:  $\text{IC50}_{\text{cell line}} = \text{mLD50} + b$ . (R) correlation coefficient; (SD) standard deviation; (n), number of points in the raw data curve; and (P), the P value for the t-test of the slope = 0.

Cell line	n	b	R	SD	n	P
HeLa	0.72	14.78	0.96	3.73	12	<0.0001
SfHa	0.64	-13.68	0.92	4.54	12	<0.0001
MCF-7	0.41	-5.64	0.95	1.54	11	<0.0001
HCT-15	1.31	-29.46	0.98	4.08	12	<0.0001

hypotheses were considered to construct a new set of Eqs. (6)–(10). The new models describe the same trends and effects found before for Eqs. (1)–(5). In Eqs. (6), (7), (9) the  $\text{CLogP}_{\text{N-N}}$  parameter is missing, and in Eq. (10) its contribution is very small despite its statistical significance, this fact confirms the small contribution of the hydrophobicity to the model.

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{HeLa}} &= -2.94(\pm 0.72) + 0.73(\pm 0.30)I_{\text{N-N}} \\ &\quad + 0.31(\pm 0.14)pK_{\text{a}}^{\text{phen}} \\ R^2 &= 0.8348, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.7935, \quad \text{sd} = 0.2077, \\ F &= 20.21, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{SfHa}} &= 3.11(\pm 0.54) + 0.82(\pm 0.23)I_{\text{N-N}} \\ &\quad + 0.35(\pm 0.10)pK_{\text{a}}^{\text{phen}} \\ R^2 &= 0.9218, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9022, \quad \text{sd} = 0.1546, \\ F &= 47.14, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{MCF-7}} &= -2.87(\pm 0.55) + 0.70(\pm 0.25)I_{\text{N-N}} \\ &\quad + 0.19(\pm 0.11)pK_{\text{a}}^{\text{phen}} + 0.16(\pm 0.09)\text{CLogP}_{\text{N-N}} \\ R^2 &= 0.9269, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.8956, \quad \text{sd} = 0.1557, \\ F &= 29.59, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/IC50}_{\text{HCT-15}} &= -3.81(\pm 0.61) + 1.04(\pm 0.26)I_{\text{N-N}} \\ &\quad + 0.43(\pm 0.12)pK_{\text{a}}^{\text{phen}} \\ R^2 &= 0.9325, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9155, \quad \text{sd} = 0.1763, \\ F &= 55.23, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \text{Log1/DL50} &= -2.44(\pm 0.14) + 0.30(\pm 0.06)I_{\text{N-N}} \\ &\quad + 0.12(\pm 0.03)pK_{\text{a}}^{\text{phen}} + 0.03(\pm 0.02)\text{CLogP}_{\text{N-N}} \\ R^2 &= 0.9811, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.9730, \quad \text{sd} = 0.0307, \\ F &= 121.05, \quad n = 11 \end{aligned} \quad (10)$$

The findings obtained of the analyses and comparisons performed for all equations reveal that physicochemical constants for the ligands or even substituent constants can be used as predictors in QSAR models for coordination complexes. The exact value for a complex property is different from the ligand but the relative trend is conserved and thus predictive in a QSAR model.

### 3.5.4. Influence of the secondary ligand analysis

Once it was established how the activity is modified as result of the variations in the structure of N–N donor, the next step in the understanding of the properties related to biological activity of this type of copper complexes is the analysis of the influence of the secondary ligand. In order to obtain QSAR equations which help understanding these effects, the phen group was selected as second subset of complexes where the secondary ligand is changed from oac to gly. A new indicator variable ( $I_{2-\text{ligand}}$ ) was introduced in the model, as explained above this type of variable allows to weight the influence of structural changes on the biological activity

without knowing the changes in specific physicochemical properties resultant of this modifications. In this third analysis this variable takes the value of one for the *acac* complexes and the value of zero for the *gly* complexes. Since the hydrophobic effects in the complex can be successfully modeled employing  $\text{CLogP}_{\text{NLS}}$  as it has been demonstrated before in Eqs. (6)–(10), the experimental  $\text{LogD}$  was not obtained for *gly* complexes and  $\Sigma\text{CLogP}$  defined as the sum of phenanthroline  $\text{CLogP}$  and second ligand  $\text{CLogP}$  was employed instead. The following Eqs. (11)–(14) were obtained for IC50 on all tumor cell lines (Fig. 4):

$$\text{Log1/IC50}_{\text{SiHa}} = -3.13(\pm 0.51) - 0.42(\pm 0.11)\text{p}E_{1/2} + 0.17(\pm 0.05)\Sigma\text{CLogP}$$

$$R^2 = 0.8301, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.8089, \\ \text{sd} = 0.1728,$$

$$F = 29.10, \quad n = 19$$

(11)

$$\text{Log1/IC50}_{\text{HeLa}} = -3.04(\pm 0.59) - 0.42(\pm 0.12)\text{p}E_{1/2} + 0.17(\pm 0.06)\Sigma\text{CLogP}$$

$$R^2 = 0.7840, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.7570, \\ \text{sd} = 0.1995,$$

$$F = 29.03, \quad n = 19$$

(12)

$$\text{Log1/IC50}_{\text{MCF-7}} = -2.50(\pm 0.43) - 0.28(\pm 0.09)\text{p}E_{1/2} + 0.16(\pm 0.04)\Sigma\text{CLogP}$$

$$R^2 = 0.8126, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.7892, \quad \text{sd} = 0.1434,$$

$$F = 34.69, \quad n = 19$$

(13)

$$\text{Log1/IC50}_{\text{HCT-15}} = -3.74(\pm 0.60) - 0.57(\pm 0.13)\text{p}E_{1/2} + 0.16(\pm 0.06)\Sigma\text{CLogP}$$

$$R^2 = 0.8342, \quad R^2_{\text{adj}} = 0.8134, \quad \text{sd} = 0.2050,$$

$$F = 40.24, \quad n = 19$$

(14)

The main contribution to the model is the experimental value of half-wave potential, suggesting the participation of copper in the mode of action. As found before in the first QSAR analysis (Eq. (1)–(5)) the activity increases as the complexes are weaker oxidants. On the other hand, the variation in the hydrophobicity of the whole complex due to the change of secondary ligand modifies positively the activity; the more hydrophobic *acac* complexes are slightly more active than their *gly* analogues. The lack of the  $I_{\text{rT}_{\text{ligand}}}$  term in the equations and the presence of  $\Sigma\text{CLogP}$  instead reveals that possibly the only contribution of this part of the molecule to the activity is the change in hydrophobicity which might facilitates the non-regulated transport across membranes. However, it is necessary to study further structural variations in this second ligand in order to clarify if this hypothesis explains the differences on the activity for a wider variety of modifications in this moiety.

On the other hand, the biological activity is significantly influenced by copper electronic properties ( $E_{1/2}$ ); this value is very close between compounds which share the same N–N donor. The relationship between groups is described by Eq. (15) (Fig. 5)

$$E_{1/2} \text{ gly complexes} = 1.05 E_{1/2} \text{ acac complexes} + 0.02$$

$$R^2 = 0.9973, \quad \text{sd} = 0.00284, \quad N = 8$$

(15)

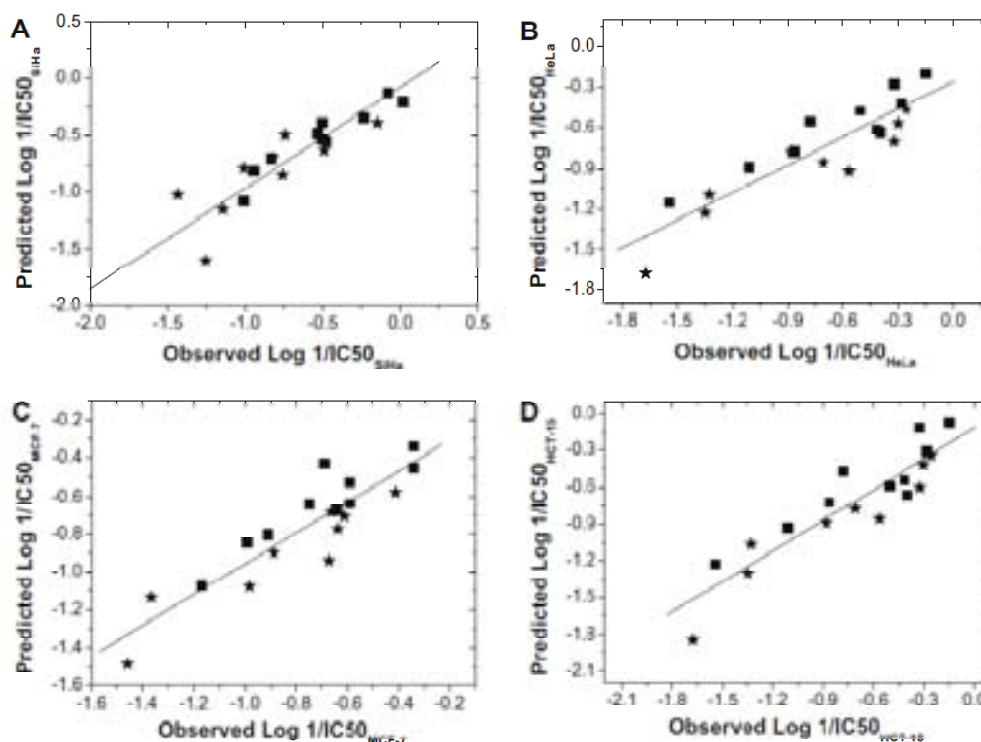


Fig. 4. A. Plot of predicted vs. observed activity on SiHa ( $1/\text{IC50}_{\text{SiHa}}$ ) for phen group of complexes. B. Plot of predicted vs. observed activity on HeLa ( $1/\text{IC50}_{\text{HeLa}}$ ) for phen group of complexes. C. Plot of predicted vs. observed activity on MCF-7 ( $1/\text{IC50}_{\text{MCF-7}}$ ) for phen group of complexes. D. Plot of predicted vs. observed activity on HCT-15 ( $1/\text{IC50}_{\text{HCT-15}}$ ) for phen group of complexes. (■)  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{acac})]^+$  complexes; (★)  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gly})]^+$  complexes.



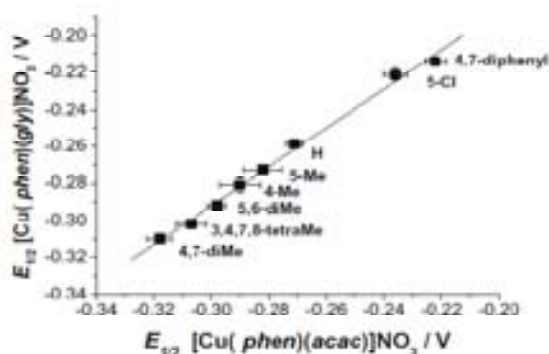


Fig. 5. Half-wave potentials for the  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$  redox couple of  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{acac})]\text{NO}_3$  complexes vs.  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{gly})]\text{NO}_3$  complexes. The values are standardized against ferrocene/ferricinium ion couple ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) and reported in volts  $\pm$  SD.

The slope in Eq. (15) is close to one indicating that the  $E_{1/2}$  in both groups is determined almost exclusively by the basicity of the N–N donor. This fact could explain why the change of secondary ligand has such a small effect on the biological activity since the main difference in properties between the two groups of compounds is the hydrophobicity of the secondary ligand and as explained above this property is not the main contribution to the model.

#### 4. Discussion

In this paper, we have attempted to understand the structural properties underlying the activity and toxicity of these new antitumor agents in order to provide ideas for more potent compounds in this series and reduce the experimental screening *in vitro* and *in vivo*. Two subsets of complexes were employed to perform a traditional QSAR analysis using experimental data for the chelates or reported values for the ligands as predictor variables in the equations. The QSAR equations obtained successfully model the activity (IC50 or LD50) and show similar trends in all cases.

It was found that the third aromatic ring is necessary in the diimine ligand to increase the activity of the complex. These two diimine ligands, free or as a part of a metal complex, are able to bind to DNA by intercalative and non-intercalative interactions. DNA intercalators represent one of the most important classes of anticancer drugs and their structural requirements are well studied, the presence of a planar polycyclic system is a common characteristic they all share [44,45]. The more extended aromatic ring system of phen might be the reason for the higher activity of phen group of complexes allowing them to increase DNA binding affinity. This finding is in agreement with studies by EPR spectra where it was shown that the three-fused aromatic rings in phen are critical for the intercalative binding of these complexes [10]. Although results indicate a positive relationship between the presence of the three-fused aromatic rings in the structure and cytotoxic activity, and this characteristic, in turn, is closely related with intercalative DNA binding mode which has been proposed as a part of the mode of action of these ternary complexes, it is normally accepted that DNA intercalation is a necessary but not sufficient condition for antitumor activity of intercalators [44].

Another main contribution to the models is the  $E_{1/2}$  values which seem to account for most of the observed cytotoxicity as demonstrated by the good correlation. The significance of this factor in the QSAR models leads us to think that copper center is involved in some way in the toxicity mode of action. This is not surprising as copper is a redox active metal and is very efficient

in catalyzing oxygen-mediated oxidations. In fact, copper phen complexes have been characterized in the past three decades as agents for the oxidative modification of DNA [46–48]. Oxidative damage to DNA and/or other critical targets is thus a prime suspect for the toxicity of our complexes, this effect has been observed in several models where the increment of ROS is concomitant with DNA degradation [23], DNA oxidation [30], depletion of reduced glutathione [49] and/or cell death by apoptotic and non apoptotic dose-dependent mechanisms [24–26]. Multiple mechanisms might be involved in the production of ROS, e.g. the observed mitochondrial toxicity [28,29], or the catalyzed Haber-Weiss reaction (Fenton) which is commonly associated with copper and its complexes [4,50]. The latter mechanism requires the activation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and a suitable reducing agent to yield  $\cdot\text{OH}$  radicals. It is well known that the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is tightly regulated by antioxidant enzymatic systems in cells [51]; however, due to cancer cells are active in energy metabolism they produce high levels of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and other ROS [52,53]. ROS concentrations act as modulators of several cell signals that control paradoxically promotion of cell proliferation and cell death by apoptosis depending on the nature and the level of ROS produced [51,54]; this fact allows to exploit the overproduction of ROS in cancer cells as therapeutic target by selective killing through amplification of pre-existing oxidant stress [52,54,55]. The copper complexes might contribute to intensify the redox imbalance by activation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  leading to cell damage and consequently to cell death by apoptosis or another mechanisms; in fact, several low molecular weight synthetic metal complexes that are SOD mimetics, including some copper complexes, exhibit antitumor activity and the Fenton-like reaction with  $\text{H}_2\text{O}_2$  generating  $\cdot\text{OH}$  is their proposed mode of action [2].

The mechanism proposed above requires the reduction to  $\text{Cu}(\text{I})$  as previous step by a reducing agent or by  $\text{O}_2^{\cdot-}$  itself. The half-wave potential of the  $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$  redox couple for the complexes studied ranges from 0.119 to 0.235 V/SHE; in the other hand, the redox potentials of some cellular reductants such as NADH, GSH, and ascorbate are -0.320 [56], -0.240 [57,58], and +0.054 V/SHE [59,60], respectively. Therefore, the reduction of the metal center in these complexes from  $\text{Cu}(\text{II})$  to  $\text{Cu}(\text{I})$  by cellular reductants is thermodynamically feasible and they might catalyze oxidations of biomolecules and the production of  $\cdot\text{OH}$  as is expected for transition metals such as copper and iron [61]. The weaker oxidants are more difficult to reduce, but once reduced they will be better reducing agents which is necessary in the subsequent Fenton-like reaction. The cytotoxic activity through ROS generation might be dependent of the rate constant of one of these reactions which in turn is dependent of the electronic properties of metal center. The question about how the rate constants of the reactions involved vary according to redox potential remains to be solved, but it is feasible to propose that the copper complexes with more negative  $E_{1/2}$  might have higher rate constants at the rate-controlling step. In order to illustrate this behavior, some data reported in literature are shown in Table 4; the redox potential of the  $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$  couple for three bis-phenanthroline copper (II) complexes ( $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ ) [43] and their pseudo rate constants for the  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$ -catalyzed oxidation of GSH by  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  to yield  $\cdot\text{OH}$  [62] are linearly related ( $r = -0.9914$  and  $r = -0.9999$ , respectively), both oxidations are efficiently catalyzed by  $\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  complexes through different mechanisms and different intermediates are involved, but nevertheless, their pseudo rate constants increases with the shift of  $E^{\circ}\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  toward weaker oxidants (Table 4). It is noteworthy that  $E^{\circ}\text{Cu}(\text{phen})_2^{2+}$  also linearly fits with  $E_{1/2}$  acac complexes ( $r = 0.9831$ ) and  $E_{1/2}$  gly complexes ( $r = 0.9787$ ). These relationships support the hypothesis that the rate of ROS production increases for more negative  $E_{1/2}$  and might explain the trend found in the QSAR models which predicts an increment of biological activity for weaker oxidants. The more



**Table 4**  
Kinetics of copper complex-catalyzed reactions and redox potentials for the Cu(II)/Cu(I) couple.

Phen	GSH + O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	E <sup>o</sup> Cup/phen <sup>2+</sup> <sup>b</sup>	E <sub>1/2</sub> acac Complexes <sup>c</sup>	E <sub>1/2</sub> gly Complexes <sup>c</sup>
	k <sub>cat</sub> , mol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> × 10 <sup>3</sup>	k <sub>2</sub> , mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	mV vs. NHE		
H	5.52	17.1	321	186	198
4,7-DiMe	48.3	30.7	255	139	147
5,6-DiMe	18	22.5	294	159	165

<sup>a</sup> Pseudo rate constants at 25 °C for the oxidation of GSH by O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [62].

<sup>b</sup> Redox potentials of the bis-phenanthroline copper (II) complexes. The original values against standard calomel electrode (SCE)[43] were converted into mV vs. standard hydrogen electrode (SHE) employing the value of 241.2 mV vs. SHE for the SCE [76].

<sup>c</sup> Half-wave potentials of the acetylacetonate and glycinate groups of complexes were converted into mV vs. SCE employing the experimental value of ferrocene/ferrocenium ion couple (Fc<sup>+/0</sup>) vs. SCE followed by the conversion into mV vs. SHE as in b.

quickly the cellular redox imbalance increases, the more active the complex will be.

Concerning compartmentalization, copper is a tightly regulated metal in cellular environments, possibly for the aforementioned catalysis that could cause oxidative damage if not strictly controlled. Copper is incorporated to cells as Cu(I) and remains reduced throughout its intracellular traffic to its final destination in copper enzymes [63]. Copper intake is mediated by the specific membrane transporter Ctrl1 that is regulated by intracellular sensing and excretion/secretion pathways for the same ion [64,65]. Importantly, it has recently been shown that phen ligands can facilitate non-regulated copper intake and cause copper overload in cell culture [66] concomitant with oxidative modification of DNA, glutathione depletion and apoptosis. This effect is attributed to the hydrophobicity of the ligands that assist the passive transport; which might explain the positive contribution of LogP in the QSAR models. Interestingly, according to results, the hydrophobicity is the smallest contribution to the model; in fact, no hydrophobic parameter was needed in some equation despite the variation in substituents. This finding led us to think that the hydrophobic requirements for *in vitro* activity are satisfied by most molecules tested; this means that hydrophobicity is not the main limiting factor in the mode of action. The ligands act as carriers in the cellular uptake of copper(II) [66], however, the influence of the substituents on electronic parameters and the type of diimine govern the activity at molecular level. It is possible that hydrophobic properties become more important influencing directly the biological activity on a whole organism, where this property is necessary for drug transport to the site of action.

In this work we have used the same complexes to correlate physical chemical properties with toxicity in cell culture but also *in vivo* in mice. It is expected that if the correlation holds for both models at least part of the oxidative toxicity observed in cell culture should also be present in the mouse model which is consistent with the *in vivo* reduction of toxicity when antioxidants are co-administrated with this type of copper complexes [67]. The close relationship between cytotoxicity and acute toxicity *in vivo* generate a concern about the selectivity of production of oxidative damage in cancer cells only or at least mainly, therefore there is a need of conducting adequate trials to prove the therapeutic efficacy and selectivity of these potential anticancer agents acting by oxidative stress.

This work has shown that the cytotoxicity of this type of copper complexes may be successfully described by QSARs constructed with experimental values for the whole complex or with descriptors only for the ligands. These equations, in turn, can provide a model to design analogs of potentially higher cytotoxicity through judicious choice of substituents and ligands. The models also support, at least in part, the modes of action proposed for the cytotoxicity of these complexes. Although the knowledge about the behavior of these complexes in biological systems points to a com-

plex network of mechanisms of toxicity, it seems that the DNA intercalation and ROS production are the two dominant factors involved. The exact contribution of the secondary ligand to the activity remains to be fully understood and the relevant studies are currently under way.

### 5. Abbreviations

Acac	acetylacetonate
Bpy	substituted 2,2'-bipyridines
CLogP <sub>N-N</sub>	calculated LogP for substituted N-N ligands
Cupphen <sup>2+</sup>	bis-phenanthroline copper(II) complexes
D	distribution ratio
E <sub>1/2</sub>	half-wave potential
Gly	glycinate
HCT-15	colorectal adenocarcinoma cell line
HeLa	cervix adenocarcinoma cell line
I <sub>2-stannic</sub>	indicator variable for secondary ligand
IC50	medial inhibitory concentration
I <sub>N-N</sub>	indicator variable for diimine ligands
LD50	medial lethal dose
LFER	linear free energy relationships
Log D	distribution coefficient
MCF-7	mammary adenocarcinoma cell line
MOPS	4-morpholine propanesulfonic acid
N-N	aromatic substituted diimine
N-O	α-aminoacidate
O-O	oxygen-donor bidentate ligands
pE <sub>1/2</sub>	E <sub>1/2</sub> /0.059V
phen	substituted 1,10-phenanthrolines
pK <sub>a,phen</sub>	phenanthroline pKa
Salicyl	salicylaldehyde
SiHa	cervix squamous cell carcinoma cell line
SHE	standard hydrogen electrode
ΣCLogP	sum of phenanthroline CLogP and second ligand CLogP

### Acknowledgments

The present work was financially supported by Trusteeship 634-UNAM, CONACyT 60085, Sectorial Salud C01-2002-7677 and PAPIIT IN2109907 from CONACyT-México (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - México). Ma. Elena Bravo-Gómez was supported by grants for doctoral studies from SNI-México (Sistema Nacional de Investigadores - México), DGEP-UNAM (Dirección General de Estudios de Posgrado - UNAM) and CONACyT-México. The authors thank Dr. Gerardo Ferrer Sueta for the helpful discussions to manuscript; Dr. Ulrich Nickel and the Friederich-Alexander Nürnberg Universität; for the training in electrochemistry methods; Dr. Luis Ortiz-Frade for the helpful discussions to electrochemistry studies; MVZ, Mabel Tinoco and MVZ, Lucía Macías for the technical support in biological tests.



## References

- [1] J.J.R. Fraiso da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements – The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, Oxford, 1991.
- [2] A.W. Ruii Huang, David G. Covell, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 1009–1029.
- [3] S.P. Fricker, *Metal Compounds in Cancer Therapy*, Chapman & Hall, London, 1994.
- [4] L.M. Gantke, C.K. Chow, *Toxicology* 189 (2003) 147–163.
- [5] L. Ruiz-Azuara, United States Patent 1992, vol. RE 35458, February 18, 1997.
- [6] L. Ruiz-Azuara, United States Patent 1996, vol. 5,576,326.
- [7] W.A.E. McBryde, D.A. Brislin, H. Irving, *J. Chem. Soc.* (1962) 5245–5253.
- [8] H.J.A.D.H. Melko, *J. Chem. Soc.* (1962) 5237–5245.
- [9] H.J.A.D.H. Melko, *J. Chem. Soc.* (1962) 5222–5237.
- [10] M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sanano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W.E. Antholine, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 163–173.
- [11] L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, *J. Inorg. Biochem.* 48 (1992) 121–127.
- [12] W.I. Kwik, K.P. Ang, G. Chen, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 42 (1980) 303–313.
- [13] A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramírez, A. Campeno, A. Romero, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosales-Hoz, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1045–1053.
- [14] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, *Acta Crystallogr. C* 49 (1993) 890–893.
- [15] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, *Acta Crystallogr. C* 48 (1992) 1785–1788.
- [16] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, J.L. Brioso, *Acta Crystallogr. C* 44 (Pt 4) (1988) 628–631.
- [17] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, L. Gasque, J.L. Brioso, *Acta Crystallogr. C* 43 (1987) 478–481.
- [18] R. Moreno-Esparza, E. Molins, J.L. Brioso-Penalva, L. Ruiz-Ramírez, R. Redón, *Acta Crystallogr. C* 51 (1995) 1505–1508.
- [19] L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Medina-Dickinson, *Acta Crystallogr. C* 55 (1999) 1065–1067.
- [20] L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Medina-Dickinson, *Acta Crystallogr. C* 55 (1999) 1063–1065.
- [21] A. Alvarez-Larena, J.L. Brioso-Penalva, J.F. Piniella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Ferrer-Sueta, *Acta Crystallogr. C* 51 (1995) 852–854.
- [22] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiriones, L. Romero-De Lira, A. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, M.E. Bravo-Gómez, *Metal-Based Drugs* 8 (2001) 19–28.
- [23] R. Alemon-Medina, M. Brena-Valle, J.L. Munoz-Sanchez, M.I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 219–228.
- [24] C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zaniga, A. Rodriguez-Ropon, L. Osorio-Rico, S.T. Luvira, I. Gracia-Mora, L. Marquez-Rosado, A. Sanchez, M.E. Moreno-García, A. Cruz, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Ramirez, S. Rodriguez-Enriquez, *J. Sotelo, Neoplasia* 7 (2005) 563–574.
- [25] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solis, C. Gomez-Ruiz, L. Rodriguez-Aguilera, L. Macias-Rosales, I. Cortes-Barberena, C. Credillo-Pelaez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, *Biomaterials* 21 (2000) 17–28.
- [26] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, G.E. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobret, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 1–5.
- [27] I. Hernandez-Esquivel, A. Marin-Hernandez, N. Favon, K. Carvajal, R. Moreno-Sanchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212 (2006) 79–88.
- [28] A. Marin-Hernandez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramirez, R. Moreno-Sanchez, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1979–1989.
- [29] S. Rodriguez-Enriquez, P.A. Vidal-Gonzalez, F.L. Flores-Rodriguez, A. Marin-Hernandez, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Sanchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215 (2006) 208–217.
- [30] A. Rivero-Muller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Platt, L. Ruiz, M. Dobret, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 189–199.
- [31] R. Moreno-Esparza, S. Escalante-Tovar, L. Ruiz-Ramirez, *Acta Crystallogr. A* 58 (Suppl.) (2002) C18.
- [32] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, J.A. Howarth, M. Dobret, *Toxicology* 194 (2002) 103–112.
- [33] H. Rubinyi, *Drug Discov. Today* 2 (1997) 457–467.
- [34] H. Rubinyi, *Drug Discov. Today* 2 (1997) 538–546.
- [35] L. Ruiz-Azuara, vol. Re 35,458, USA, 1992.
- [36] L.V. Rubinstein, R.H. Shoemaker, K.D. Paull, R.M. Simon, S. Tosini, P. Slehan, D.A. Scudiero, A. Monks, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1113–1118.
- [37] P. Slehan, R. Steneng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107–1112.
- [38] AnalystSoft, Robust Business Solutions, StatPlus 2005 Professional Build Version 3.3.3.0, 2005.
- [39] Advanced Chemistry Development Inc. ACD/InChI/Chem Sketch, Version 3.00, 1997.
- [40] StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), Version 7.0, 2004.
- [41] A. Paulowicz, U. El-Ayaan, Y. Fukuda, *Inorg. Chim. Acta* 321 (2001) 96–62.
- [42] H. Sigel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 14 (1975) 394–402.
- [43] G. Sanna, M.I. Pilo, M.A. Zoroddu, R. Seiber, S. Mosca, *Inorg. Chim. Acta* 208 (1993) 153–158.
- [44] W.A. Denny, *Anticancer Drug Des.* 4 (1989) 241–263.
- [45] R. Martinez, L. Chacon-Garcia, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 127–151.
- [46] B.C. Bales, T. Kodama, Y.N. Wleedji, M. Pitie, B. Meunier, M.M. Greenberg, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) 5371–5379.
- [47] D.S. Sigman, *Biochemistry* 25 (1990) 9097–9105.
- [48] D.S. Sigman, D.R. Graham, V. O'Auara, A.M. Stern, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 12269–12272.
- [49] R. Alemon-Medina, J.L. Munoz-Sanchez, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, *Toxicol. In Vitro* 22 (2008) 710–715.
- [50] C. Hyun, L.J. Filippich, *J. Ver. Sci.* 5 (2004) 19–28.
- [51] M. Valko, O. Leibfried, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [52] P.J. Schumacker, *Cancer Cell* 10 (2006) 175–176.
- [53] T.P. Starzowski, C.F. Nathan, *Cancer Res.* 51 (1991) 704–708.
- [54] A. Laurent, C. Nicco, C. Chereau, C. Gouvestre, J. Alexandre, A. Alves, E. Levy, F. Goldwasser, Y. Paris, O. Soubrane, B. Weil, F. Batteux, *Cancer Res.* 65 (2005) 948–956.
- [55] D. Trachootham, Y. Zhou, H. Zhang, Y. Demizu, Z. Chen, B. Pelicano, P.J. Chao, G. Achanta, R.B. Arlinghaus, J. Liu, P. Fuang, *Cancer Cell* 10 (2006) 241–252.
- [56] I.H. Segel, *Biochemical Calculations*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1976.
- [57] D.P. Jones, *Methods Enzymol.* 348 (2002) 93–112.
- [58] J. Rust, S. Rapoport, *Nature* 231 (1964) 185.
- [59] E.G. Ball, *J. Biol. Chem.* 118 (1937) 219.
- [60] N.H. Williams, J.K. Vandell, *Aust. J. Chem.* 35 (1982) 1133–1144.
- [61] D.M. Miller, G.R. Burtner, S.D. Aust, *Free Radic. Biol. Med.* 8 (1990) 95–108.
- [62] T.M. Florence, *J. Inorg. Biochem.* 28 (1986) 33–37.
- [63] K.A. Markessian, B.I. Kurganov, *Biochemistry (Mosc)* 68 (2003) 827–837.
- [64] D.L. Huffman, T.V. O'Halloran, *Annu. Rev. Biochem.* 70 (2001) 677–701.
- [65] J. Lee, M.M.D. Peña, Y. Nose, D.J. Thiele, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4380–4387.
- [66] X. Cai, N. Fan, G. Zou, *Biomaterials* 20 (2007) 1–11.
- [67] M. Leal-García, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, J. Luna-Del Villar, F. Sumano, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101 (2007) 151–158.
- [68] K.P. Ang, *J. Solution Chem.* 1 (1972) 369–375.
- [69] H.A. Schwarz, C. Creutz, N. Sutin, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 433–433.
- [70] D.A. Brislin, W.A.E. McBryde, *Can. J. Chem.* 41 (1963) 1135–1141.
- [71] J. Schenleber, P. Lichon, *Comp. Rendus Acad. Sci.* 278C (1974) 1235.
- [72] S. Kotrl, L. Sucha, *Handbook of Chemical Equilibrium in Analytical Chemistry*, Chichester, UK, 1995.
- [73] A.A. Schilt, G.F. Smith, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1546–1548.
- [74] C.V. Banks, R.I. Bystroff, *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 6153–6158.
- [75] L.A. Ashton, J.I. Bullock, F.W.G. Simpson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* (78) (1982) 19C1.
- [76] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, 2001.



## REFERENCIAS

1. Bertrand, G., *On the role of trace substances in agriculture*. 8th Int Congr Appl Chem 1912. **28**: p. 30-40.
2. Fraústo da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P., *The Biological Chemistry of the Elements - The Inorganic Chemistry of Life*. 1991, Oxford: Oxford University Press.
3. Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Muallem, S., y Zeng, W., *Borate transport and cell growth and proliferation. Not only in plants*. Cell Cycle, 2005. **4**(1): p. 24-6.
4. Levina, A. y Lay, P.A., *Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium*. Coord. Chem. Rev., 2005. **249**(3-4): p. 281-298.
5. Camilleri, C., Markich, S.J., Noller, B.N., Turley, C.J., Parker, G., y van Dam, R.A., *Silica reduces the toxicity of aluminium to a tropical freshwater fish (Mogurnda mogurnda)*. Chemosphere, 2003. **50**(3): p. 355-64.
6. Lippard, S.J., *Bioinorganic chemistry: a maturing frontier*. Science, 1993. **261**(5122): p. 699-700.
7. Williams, R.J.P. y Fraústo da Silva, J.J.R., *Biological Chemistry of the Elements*. 2001, Oxford: Oxford University Press.
8. Bertini, I., Sigel, H., y Sigel, A., *Handbook on Metalloproteins*. 2001, New York: Marcel Dekker.
9. Karlin, K.D., *Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models*. Science, 1993. **261**(5122): p. 701-8.
10. Pyle, A.M., *Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes*. Science, 1993. **261**(5122): p. 709-14.
11. O'Halloran, T.V., *Transition metals in control of gene expression*. Science, 1993. **261**(5122): p. 715-25.
12. Theil, E.C., *Iron regulatory elements (IREs): a family of mRNA non-coding sequences*. Biochem. J., 1994. **304** ( Pt 1): p. 1-11.
13. Cohen, S.M., *New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry*. Curr Opin. Chem. Biol., 2007. **11**(2): p. 115-20.
14. Farrel, N., *Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview*. Coord. Chem. Rev., 2002. **232**: p. 1-4.
15. Reedijk, J., *Medicinal applications of heavy-metal compounds*. Curr. Opin. Chem. Biol., 1999. **3**(2): p. 236-40.
16. Ronconi, L. y Sadler, P.J., *Using coordination chemistry to design new medicines*. Coord. Chem. Rev., 2007. **251**: p. 1633-1648.
17. Thorp, H.H., *Bioinorganic chemistry and drug design: here comes zinc again*. Chem. Biol., 1998. **5**(6): p. R125-7.
18. Thompson, K.H. y Orvig, C., *Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design*. Dalton Trans., 2006(6): p. 761-4.
19. Andersen, O., *Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents*. Mini Rev. Med. Chem., 2004. **4**(1): p. 11-21.
20. Jacobsen, F.E., Lewis, J.A., y Cohen, S.M., *The design of inhibitors for medically relevant metalloproteins*. Chem. Med. Chem., 2007. **2**(2): p. 152-71.
21. Rieter, W.J., Taylor, K.M.L., An, H., y Lin, W., *Nanoscale metal-organic frameworks as potential multimodal contrast enhancing agents*. J. Am. Chem. Soc., 2006. **128**: p. 9024-2025.





22. Horcajada, P., Serre, C., Vallet-Regí, M., Sebban, M., Taulelle, F., y Férey, G., *Metal-organic frameworks as efficient materials for drug delivery*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006. **45**: p. 5974-5978.
23. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004. **19**: p. 5-14.
24. Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., y Lauffer, R.B., *Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2293-352.
25. Jurisson, S.S. y Lydon, J.D., *Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2205-18.
26. Cohen, S.M. y Lippard, S.J., *Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy*. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001. **67**: p. 93-130.
27. Shaw, I.C., *Gold-based therapeutic agents*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2589-600.
28. Birch, N.J., *Inorganic pharmacology of lithium*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2659-82.
29. Claussen, C.A. y Long, E.C., *Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2797-816.
30. Anderson, C.J. y Welch, M.J., *Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2219-34.
31. Thompson, K.H., McNeill, J.H., y Orvig, C., *Vanadium compounds as insulin mimics*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2561-72.
32. Clarke, M.J., Zhu, F., y Frasca, D.R., *Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2511-34.
33. Andersen, O., *Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2683-710.
34. *Chelating agents antidotes and antagonists*, en *Martindale. The Extra Pharmacopoeia*. 1996, Royal Pharmaceutical Society: London. p. 973.
35. Goyer, R.A. y Clarkson, T.W., *Toxic Effects of Metals*, en *Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poisons*, Klaassen, C.D., Editor. 2001, McGraw-Hill, Medical publishing division: New York. p. 811-867.
36. Ockwig, N.W., Delgado-Friedrichs, O., O'Keeffe, M., y Yaghi, O.M., *Reticular chemistry: occurrence and taxonomy of nets and grammar for the design of frameworks*. *Acc. Chem. Res.*, 2005. **38**: p. 176-182.
37. Kitagawa, S., Kitaura, R., y S.I., N., *Functional porous coordination polymers*. *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 2004. **43**: p. 2334-2375.
38. Bertini, I. y Rosato, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. **100**.
39. Fricker, S.P., *Metal Compounds in Cancer Therapy*. 1994, London: Chapman & Hall. 1-31.
40. Wong, E. y Giandomenico, C.M., *Current status of platinum-based antitumor drugs*. *Chem. Rev.*, 1999. **99**(9): p. 2451-2466.
41. Greene, R.F., Chatterji, D.C., Hiranaka, P.K., y Gallelli, J.F., *Stability of cisplatin in aqueous solution*. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1979. **36**(1): p. 38-43.
42. Kleinwachter, V. y Zaludova, R., *Reaction of cis and trans isomers of platinum(II) diamminedichloride with purine, adensine and its derivatives in dilute solutions*. *Chem. Biol. Interact.*, 1977. **16**(2): p. 207-22.
43. LeRoy, A.F., *Some quantitative data on cis-dichlorodiammineplatinum(II) species in solution*. *Cancer Treat. Rep.*, 1979. **63**(2): p. 231-3.
44. Repta, A.J., Long, D.F., y Hincal, A.A., *cis-Dichlorodiammineplatinum(II) stability in aqueous vehicles: an alternate view*. *Cancer Treat. Rep.*, 1979. **63**(2): p. 229-31.



45. Ruili Huang, A.W., David G. Covell., *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*. *Biochem. Pharmacol.*, 2005. **69**: p. 1009-1039.
46. Pearson, R.G., *Acids and Bases*. Science, 1966. **151**(3707): p. 172-177.
47. Ballatori, N., *Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes*. *Drug Metab. Rev.*, 1991. **23**(1-2): p. 83-132.
48. Anderson, M.E., Naganuma, A., y Meister, A., *Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester*. *FASEB J.*, 1990. **4**(14): p. 3251-5.
49. Naganuma, A., Anderson, M.E., y Meister, A., *Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity. Prevention of toxicity by giving glutathione monoester*. *Biochem. Pharmacol.*, 1990. **40**(4): p. 693-7.
50. Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., y Gallo, G., *Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues*. *Aquat Toxicol.*, 1999. **46**(1): p. 67-76.
51. Hennighausen, G. y Merkord, J., *Non-protein sulfhydryl groups and glutathione-S-transferases in acute toxic effects of Di-n-alkyltin dichlorides in mice and rats*. *Pharmazie*, 1985. **40**(6): p. 415-6.
52. Henry, R.A. y Byington, K.H., *Inhibition of glutathione-S-aryltransferase from rat liver by organogermanium, lead and tin compounds*. *Biochem. Pharmacol.*, 1976. **25**(20): p. 2291-5.
53. Gromer, S., Arscott, L.D., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H., y Becker, K., *Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds*. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**(32): p. 20096-101.
54. Smith, A.D., Guidry, C.A., Morris, V.C., y Levander, O.A., *Aurothioglucose inhibits murine thioredoxin reductase activity in vivo*. *J. Nutr.*, 1999. **129**(1): p. 194-8.
55. Cunningham, M.L. y Fairlamb, A.H., *Trypanothione reductase from Leishmania donovani. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials*. *Eur. J. Biochem.*, 1995. **230**(2): p. 460-8.
56. Samuel, P.M., Roy, S., Jaiswal, K.A., y Rao, J.V., *Differential effects of organometallic tin compounds on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity*. *J. Appl. Toxicol.*, 1998. **18**(5): p. 383-6.
57. Munter, K., Athanasiou, M., y Stournaras, C., *Inhibition of cellular activities by triethyllead. Role of glutathione and accumulation of triethyllead in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 1989. **38**(22): p. 3941-5.
58. Guo, A. y Sadler, P.J., *Metals in medicine*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999. **38**: p. 1512-1531.
59. Jeon, K.I., Byun, M.S., y Jue, D.M., *Gold compound auranofin inhibits I $\kappa$ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK $\beta$  subunit*. *Exp. Mol. Med.*, 2003. **35**(2): p. 61-6.
60. Yamashita, M., Ashino, S., Oshima, Y., Kawamura, S., Ohuchi, K., y Takayanagi, M., *Inhibition of TPA-induced NF- $\kappa$ B nuclear translocation and production of NO and PGE<sub>2</sub> by the anti-rheumatic gold compounds*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003. **55**(2): p. 245-51.
61. Adams, J., *Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer*. *Drug. Discov. Today*, 2003. **8**(7): p. 307-15.
62. Buss, J.L., Torti, F.M., y Torti, S.V., *The role of iron chelation in cancer therapy*. *Curr. Med. Chem.*, 2003. **10**(12): p. 1021-1034.
63. Sproull, M., Brechbiel, M., y Camphausen, K., *Antiangiogenic therapy through copper chelation*. *Expert. Opin. Ther. Targets.*, 2003. **7**(3): p. 405-409.
64. Tarn, T.F., Leung-Toung, R., Li, W., Wang, Y., Karimian, K., y Spino, M., *Iron chelator research: past, present, and future*. *Curr. Med. Chem.*, 2003. **10**(12): p. 983-995.
65. Lovejoy, D.B. y Richardson, D.R., *Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells*. *Blood*, 2002. **100**(2): p. 666-676.



66. Hall, I.H., Miller III, M.C., y West, D.X., *Antineoplastic and cytotoxic activities of nickel(II) complexes of thiosemicarbazones*. *Metal-Based Drugs*, 1997. **4**(2): p. 89-95.
67. Easmon, J., Heinisch, G., Puerstinger, G., Langer, T., Oesterreicher, J.K., y Grunicke, H.H., *Diazinyl hydrazones derived from aryl N-heteroaryl ketones: synthesis and antiproliferative activity*. *J. Med. Chem.*, 1997. **40**(26): p. 4420-4425.
68. Ainscough, E.W., Brodie, A.M., Denny, W.A., Finlay, G.J., Gothe, W.A., y Ranford, J.D., *Cytotoxicity of salicylaldehyde benzoylhydrazone analogs and their transition metal complexes: quantitative structure-activity relationships*. *J. Inorg. Biochem.*, 1999. **77**(3-4): p. 125-133.
69. Koh, L.L., Kon, O.L., Loh, K.W., Long, Y.C., Ranford, J.D., y Tan, A.L.C., *Complexes of salicylaldehyde acylhydrazones: cytotoxicity QSAR and crystal structure of the sterically hindered t-butyl dimer*. *J. Inorg. Biochem.*, 1998. **72**(3,4): p. 155-162.
70. Nordenberg, J., Novogrodsky, A., Beery, E., Patia, M., Wasserman, L., y Warshawsky, A., *Anti-proliferative effects and phenotypic alterations induced by 8-hydroxyquinoline in melanoma cell lines*. *Eur. J. Cancer*, 1990. **26**(8): p. 905-907.
71. Collery, P., Lechenault, F., Cazabat, A., Juvin, E., Khassanova, L., y Evangelou, A., *Inhibitory effects of gallium chloride and tris (8-quinolinolato)gallium(III) on A549 human malignant cell line*. *Anticancer Res.*, 2000. **20**(2A): p. 955-958.
72. Al-Allaf, T.A.K. y Rshan, L.J., *Synthesis, characterization, cytotoxicity and anticomplementary activity of a novel dimethyltin(IV) cyclobutyl dicarboxylate complex of 8-hydroxyquinoline*. *Asian J. Chem.*, 2001. **13**(4): p. 1613-1617.
73. Smith, K.A., Deacon, G.B., Jackson, W.R., Tiekink, E.R.T., Rainone, S., y Webster, L.K., *Preparation and anti-tumor activity of some arylbismuth(III) oxine complexes*. *Metal-Based Drugs*, 1998. **5**(5): p. 295-304.
74. Bottari, B., Maccari, R., Monforte, F., Ottana, R., Vigorita, M.G., y Bruno, G., *Nickel(II) 2,6-diacetylpyridine bis(isonicotinoylhydrazonate) and bis(benzoylhydrazonate) complexes: structure and antimycobacterial evaluation. Part XI*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001. **9**(8): p. 2203-2211.
75. Liu, Z.D. y Hider, R.C., *Design of iron chelators with therapeutic application*. *Coord. Chem. Rev.*, 2002. **232**(1/2): p. 151-171.
76. McBryde, W.A.E., Brisbin, D.A., y Irving, H., *The stability of metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part III. 5-Methyl-1,10-phenanthroline*. *J. Chem. Soc.*, 1962: p. 5245-5253.
77. Mellor, H.I.a.D.H., *The stability of Metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part I. 1,10-Phenanthroline and 2,2'-bipyridyl*. *J. Chem. Soc.*, 1962: p. 5222-5237.
78. Mellor, H.I.a.D.H., *The stability of Metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part II. 2-methyl- and 2,9-dimethyl-phenanthroline*. *J. Chem. Soc.*, 1962: p. 5237 - 5245.
79. Chikira, M., Tomizawa, Y., Fukita, D., Sugizaki, T., Sugawara, N., Yamazaki, T., Sasano, A., Shindo, H., Palaniandavar, M., y Antholine, W.E., *DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids*. *J. Inorg. Biochem.*, 2002. **89**(3-4): p. 163-73.
80. Zhao, L.X., Kim, T.S., Ahn, S.H., Kim, T.H., Kim, E.K., y Cho, W.J., *Synthesis, topoisomerase I inhibition and antitumor cytotoxicity of 2,2':6',2''-, 2,2':6',3''- and 2,2':6',4''-terpyridine derivatives*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. **11**(19): p. 2659-2662.



81. Modica-Napolitano, J.S. y Aprille, J.R., *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001. **49**(1/2): p. 63-70.
82. Kopf-Maier, P. y Klapotke, T., *Ionic rhenocene derivatives with antitumor activity*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1992. **29**(5): p. 361-6.
83. Rideout, D.C., Calogeropoulou, T., Jaworski, J.S., Dagnino, R., Jr., y McCarthy, M.R., *Phosphonium salts exhibiting selective anti-carcinoma activity in vitro*. *Anticancer Drug Des.*, 1989. **4**(4): p. 265-80.
84. Delikatny, E.J., Roman, S.K., Hancock, R., Jeitner, T.M., Lander, C.M., Rideout, D.C., y Mountford, C.E., *Tetraphenylphosphonium chloride induced MR-visible lipid accumulation in a malignant human breast cell line*. *Int. J. Cancer.*, 1996. **67**(1): p. 72-9.
85. Madar, I., Weiss, L., y Izbicki, G., *Preferential accumulation of (3)H-tetraphenylphosphonium in non-small cell lung carcinoma in mice: comparison with (99m)Tc-MIBI*. *J. Nucl. Med.*, 2002. **43**(2): p. 234-8.
86. Patel, J., Rideout, D., McCarthy, M.R., Calogeropoulou, T., Wadwa, K.S., y Oseroff, A.R., *Antineoplastic activity, synergism, and antagonism of triarylalkylphosphonium salts and their combinations*. *Anticancer Res.*, 1994. **14**(1A): p. 21-8.
87. Wardman, P. y Candeias, L.P., *Fenton chemistry: an introduction*. *Radiat. Res.*, 1996. **145**(5): p. 523-31.
88. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., y Telser, J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
89. Schumacker, P.T., *Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(3): p. 175-6.
90. Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P.J., Achanta, G., Arlinghaus, R.B., Liu, J., y Huang, P., *Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(3): p. 241-52.
91. Yoshikawa, T., Kokura, S., Tainaka, K., Naito, Y., y Kondo, M., *A novel cancer therapy based on oxygen radicals*. *Cancer Res.*, 1995. **55**(8): p. 1617-20.
92. Kong, Q., Beel, J.A., y Lillehei, K.O., *A threshold concept for cancer therapy*. *Med. Hypotheses*, 2000. **55**(1): p. 29-35.
93. Oberley, T.D. y Oberley, L.W., *Antioxidant enzyme levels in cancer*. *Histol. Histopathol.*, 1997. **12**(2): p. 525-35.
94. Keppler, B.K., Friesen, C., Vongerichten, H., y Vogel, E., *Budotitane, a new tumor-inhibiting titanium compound: preclinical and clinical development*. *Complexes Cancer Chemother.*, 1993: p. 297-323.
95. Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., y Preuss, H.G., *Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium*. *Toxicology*, 2002. **180**(1): p. 5-22.
96. Evangelou, A.M., *Vanadium in cancer treatment*. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002. **42**(3): p. 249-265.
97. Kasugai, N., Murase, T., Ohse, T., Nagaoka, S., Kawakami, H., y Kubota, S., *Selective cell death by water-soluble Fe-porphyrins with superoxide dismutase (SOD) activity*. *J. Inorg. Biochem.*, 2002. **91**(2): p. 349-355.
98. Kensler, T.W., Bush, D.M., y Kozumbo, W.J., *Inhibition of tumor promotion by a biomimetic superoxide dismutase*. *Science*, 1983. **221**(4605): p. 75-77.
99. Zhang, Q., Zhai, J.-J., Zhang, Y.-R., Liu, Y.-M., Wang, L.-F., y Li, S.-B., *Antioxidative and antitumor properties of metal(H) solid complexes with 8-acetyl-4-methyl umbelliferone*. *Transition Metal Chem. (Dordrecht The Netherlands)*, 2000. **25**(1): p. 93.



100. Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., y Scott, K.C., *Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope  $^{65}\text{Cu}$* . *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998. **67**(6): p. 1219-25.
101. Linder, M.C. y Hazegh-Azam, M., *Copper biochemistry and molecular biology*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996. **63**(5): p. 797S-811S.
102. Turnlund, J.R., *Copper*, in *Modern Nutrition in Health and Disease*, Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., y Ross, A.C., Editors. 1999, Lippincott Williams and Wilkins: Baltimore, MD.
103. Olivares, M. y Uauy, R., *Copper as an essential nutrient*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996. **63**(5): p. 791S-6S.
104. Sandstead, H.H., *Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995. **61**(3 Suppl): p. 621S-624S.
105. Barceloux, D.G., *Copper*. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 1999. **37**(2): p. 217-30.
106. Fitzgerald, D.J., *Safety guidelines for copper in water*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1098S-1102S.
107. Wapnir, R.A., *Copper absorption and bioavailability*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1054S-1060S.
108. Jacob, R.A., Skala, J.H., Omaye, S.T., y Turnlund, J.R., *Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men*. *J. Nutr.*, 1987. **117**(12): p. 2109-15.
109. Hyun, C. y Filippich, L.J., *Inherited copper toxicosis with emphasis on copper toxicosis in Bedlington terriers*. *J. Exp. Anim. Sci.*, 2004. **43**: p. 39-64.
110. Gaetke, L.M. y Chow, C.K., *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*. *Toxicology*, 2003. **189**(1-2): p. 147-63.
111. Harris, E.D., *The transport of copper*. *Prog Clin Biol Res*, 1993. **380**: p. 163-79.
112. Cousins, R.J., *Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin*. *Physiol. Rev.*, 1985. **65**(2): p. 238-309.
113. Harris, E.D., *Copper transport: an overview*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1991. **196**(2): p. 130-40.
114. Winge, D.R. y Mehra, R.K., *Host defenses against copper toxicity*. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1990. **31**: p. 47-83.
115. Dameron, C.T. y Harrison, M.D., *Mechanisms for protection against copper toxicity*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1091S-1097S.
116. Luza, S.C. y Speisky, H.C., *Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996. **63**(5): p. 812S-20S.
117. Linder, M., *The Biochemistry of Copper*. 1991, New York: Plenum.
118. Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., y O'Halloran, T.V., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. *Science*, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
119. Puig, S., Lee, J., Lau, M., y Thiele, D.J., *Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(29): p. 26021-30.
120. DiDonato, M., Narindrasorasak, S., Forbes, J.R., Cox, D.W., y Sarkar, B., *Expression, purification, and metal binding properties of the N-terminal domain from the wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B)*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(52): p. 33279-82.
121. Lutsenko, S., Petrukhin, K., Cooper, M.J., Gilliam, C.T., y Kaplan, J.H., *N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease*





- proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(30): p. 18939-44.
122. Safei, R. y Howell, S.B., *Regulation of the Cellular Pharmacology and Cytotoxicity of Cisplatin by Copper Transporters*, in *Cancer Drug Discovery and Development: Cancer Drug Resistance*, Teicher, B., Editor. 2006, Humana Press Inc.: Totowa, NJ. p. 309-327.
123. Lee, J., Pena, M.M., Nose, Y., y Thiele, D.J., *Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(6): p. 4380-7.
124. Moller, L.B., Petersen, C., Lund, C., y Horn, N., *Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene*. *Gene*, 2000. **257**(1): p. 13-22.
125. Zhou, B. y Gitschier, J., *hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997. **94**(14): p. 7481-6.
126. Klomp, A.E., Tops, B.B., Van Denberg, I.E., Berger, R., y Klomp, L.W., *Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1)*. *Biochem. J.*, 2002. **364**(Pt 2): p. 497-505.
127. Lee, J., Prohaska, J.R., y Thiele, D.J., *Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001. **98**(12): p. 6842-7.
128. Kuo, Y.M., Zhou, B., Cosco, D., y Gitschier, J., *The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001. **98**(12): p. 6836-41.
129. Eisses, J.F. y Kaplan, J.H., *Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein*. *J. Biol. Chem.*, 2002. **277**(32): p. 29162-71.
130. Xiao, Z., Loughlin, F., George, G.N., Howlett, G.J., y Wedd, A.G., *C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from *Saccharomyces cerevisiae* binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster: sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. **126**(10): p. 3081-90.
131. Hartter, D.E. y Barnea, A., *Brain tissue accumulates 67copper by two ligand-dependent saturable processes. A high affinity, low capacity and a low affinity, high capacity process*. *J. Biol. Chem.*, 1988. **263**(2): p. 799-805.
132. Puig, S. y Thiele, D.J., *Molecular mechanisms of copper uptake and distribution*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002. **6**(2): p. 171-80.
133. Carrasco-Pozo, C., Aliaga, M.E., Olea-Azar, C., y Speisky, H., *Double edge redox-implications for the interaction between endogenous thiols and copper ions: In vitro studies*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008. **16**(22): p. 9795-803.
134. Suzuki, K.T., Someya, A., Komada, Y., y Ogra, Y., *Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice*. *J. Inorg. Biochem.*, 2002. **88**(2): p. 173-82.
135. Amaravadi, R., Glerum, D.M., y Tzagoloff, A., *Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment*. *Hum. Genet.*, 1997. **99**(3): p. 329-33.
136. Culotta, V.C., Klomp, L.W., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., y Gitlin, J.D., *The copper chaperone for superoxide dismutase*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(38): p. 23469-72.
137. Harada, M., Kumemura, H., Sakisaka, S., Shishido, S., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., Hanada, S., Koga, H., Kumashiro, R., Ueno, T., Suganuma, T., Furuta, K., Namba, M., Sugiyama, T., y Sata, M., *Wilson disease protein ATP7B is localized in the late endosomes in a polarized human hepatocyte cell line*. *Int. J. Mol. Med.*, 2003. **11**(3): p. 293-8.



138. Petris, M.J., Mercer, J.F., Culvenor, J.G., Lockhart, P., Gleeson, P.A., y Camakaris, J., *Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking*. EMBO J., 1996. **15**(22): p. 6084-95.
139. Kachur, A.V., Koch, C.J., y Biaglow, J.E., *Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione*. Free Radic. Res., 1998. **28**(3): p. 259-69.
140. Murata, Y., Kodama, H., Abe, T., Ishida, N., Nishimura, M., Levinson, B., Gitschier, J., y Packman, S., *Mutation analysis and expression of the mottled gene in the macular mouse model of Menkes disease*. Pediatr. Res., 1997. **42**(4): p. 436-42.
141. Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., y Gitschier, J., *Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase*. Nat. Genet., 1993. **3**(1): p. 7-13.
142. Chelly, J., Tumer, Z., Tonnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N., y Monaco, A.P., *Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein*. Nat. Genet., 1993. **3**(1): p. 14-9.
143. Mercer, J.F., Livingston, J., Hall, B., Paynter, J.A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimes, A., Bhawe, M., y Siemieniak, D. *Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning*. Nat. Genet., 1993. **3**(1): p. 20-5.
144. Tanzi, R.E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J.L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D.M., Parano, E., Pavone, L., y Brzustowicz, L.M. *The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene*. Nat. Genet., 1993. **5**(4): p. 344-50.
145. Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., y Cox, D.W., *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nat. Genet., 1993. **5**(4): p. 327-37.
146. Yamaguchi, Y., Heiny, M.E., y Gitlin, J.D., *Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993. **197**(1): p. 271-7.
147. Dijkstra, M., In 't Veld, G., van den Berg, G.J., Muller, M., Kuipers, F., y Vonk, R.J., *Adenosine triphosphate-dependent copper transport in isolated rat liver plasma membranes*. J. Clin. Invest., 1995. **95**(1): p. 412-6.
148. Petris, M.J., Voskoboinik, I., Cater, M., Smith, K., Kim, B.E., Llanos, R.M., Strausak, D., Camakaris, J., y Mercer, J.F., *Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(48): p. 46736-42.
149. Roelofsen, H., Wolters, H., Van Luyn, M.J., Miura, N., Kuipers, F., y Vonk, R.J., *Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion*. Gastroenterology, 2000. **119**(3): p. 782-93.
150. Mercer, J.F. y Llanos, R.M., *Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals*. J. Nutr., 2003. **133**(5 Suppl 1): p. 1481S-4S.
151. Brewer, G.J., *Wilson disease and canine copper toxicosis*. Am. J. Clin. Nutr., 1998. **67**(5 Suppl): p. 1087S-1090S.
152. *Cancer in your country*. 2008, World Health Organization, WHO Global InfoBase: Data for Saving Lives. <http://www.who.int/infobase/report.aspx>.
153. Stewart, B.W. y Kleihues, P., eds. *Word cancer report*. 2003, IARC Press: Lyon. 351.
154. *Compendio de mortalidad y morbilidad*. 2003, Registro Histopatológico de Neoplasias en México, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud: México.



155. Ruiz-Azuara, L., *Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes from phenylate phenanthrolines to be used as "anticancerigenic" agents*. 1992: USA. United States Patent No. de patente 5,107,005. Re 35,458. Feb. 18, 1997.
156. Ruiz-Azuara, L., *Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*. 1992: United States Patent . No. de tatente 5,107,005. Re 35,458. Feb. 18, 1997
157. Ruiz-Azuara, L., *Copper amino acidate diimine nitrate compounds and their methyl derivatives and a process for preparing them*. 1996: United States Patent . No. de patente 5,576,326. Nov. 19, 1996.
158. Gasque, L., Moreno-Esparza, R., y Ruiz-Ramírez, L., *Stability of Ternary Copper and Nickel Complexes with 1,10-phenanthroline*. J. Inorg. Biochem., 1992. **48**: p. 121-127
159. Kwik, W.L., Ang, K.P., y Chen, G., *Complexes of (2,2'-bipyridyl) copper(II) and (1,10-phenanthroline) copper(II) with some amino acids*. J. Inorg. Nucl. Chem., 1980. **42**(2): p. 303-313.
160. Alemon-Medina, R., Munoz-Sanchez, J.L., Ruiz-Azuara, L., y Gracia-Mora, I., *Casiopeina IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. Toxicol. In Vitro, 2008. **22**(3): p. 710-5.
161. Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Gómez-Ruiz, C., Tinoco-Méndez, M., Márquez-Quiñones, A., Romero-De Lira, L., Marín-Hernández, A., Macías-Rosales, L., y Bravo-Gómez, M.E., *Knigh't's Move in the Periodic Table, From Copper to Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeinas, Evaluated by an in Vitro Human and Murine Cancer Cell Line Panel*. Metal-Based Drugs 2001. **8**(1): p. 19-28.
162. Carvallo-Chaigneau, F., Trejo-Solis, C., Gomez-Ruiz, C., Rodriguez-Aguilera, E., Macias-Rosales, L., Cortes-Barberena, E., Cedillo-Pelaez, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V., y Constantino-Casas, F., *Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*. Biometals, 2008. **21**(1): p. 17-28.
163. Trejo-Solis, C., Palencia, G., Zuniga, S., Rodriguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S.T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sanchez, A., Moreno-Garcia, M.E., Cruz, A., Bravo-Gomez, M.E., Ruiz-Ramirez, L., Rodriguez-Enriquez, S., y Sotelo, J., *Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 563-74.
164. Alemon-Medina, R., Brena-Valle, M., Munoz-Sanchez, J.L., Gracia-Mora, M.I., y Ruiz-Azuara, L., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas)*. Cancer Chemother. Pharmacol., 2007. **60**(2): p. 219-28.
165. Rivero-Muller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz, L., y Dobrota, M., *Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity*. Chem. Biol. Interact., 2007. **165**(3): p. 189-99.
166. Rao, R., Patra, A.K., y Chetana, P.R., *DNA binding and oxidative cleavage activity of ternary (L-proline)copper (II) complexes of heterocyclic bases*. Polyhedron, 2007. **26**: p. 5331-5338.
167. Bales, B.C., Kodama, T., Weledji, Y.N., Pitie, M., Meunier, B., y Greenberg, M.M., *Mechanistic studies on DNA damage by minor groove binding copper-phenanthroline conjugates*. Nucleic Acids Res., 2005. **33**(16): p. 5371-9.
168. Patra, A.K., Nethaji, M., y Chakravarty, A.R., *Synthesis, crystal structure, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity of (S-methyl-L-cysteine)copper(II) complexes of heterocyclic bases*. J. Inorg. Biochem., 2007. **101**: p. 2007.



169. Patra, A.K., Roy, S., y Chakravarty, A.R., *Synthesis, crystal structures, DNA binding and cleavage activity of L-glutamine copper (II) complexes of heterocyclic bases*. Inorg. Chim. Acta, 2009. **362**: p. 1591-1599.
170. Hernandez-Esquivel, L., Marin-Hernandez, A., Pavon, N., Carvajal, K., y Moreno-Sanchez, R., *Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2006. **212**(1): p. 79-88.
171. Marin-Hernandez, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramirez, L., y Moreno-Sanchez, R., *Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions*. Biochem. Pharmacol., 2003. **65**(12): p. 1979-89.
172. Gasque, L., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L., y Medina-Dickinson, G., *Aqua(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate monohydrate*. Acta Cryst. C, 1999. **55**: p. 1065-1067
173. Gasque, L., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L., y Medina-Dickinson, G., *(5,6-Dimethyl-1,10-phenanthroline)(nitrato)(salicylaldehydato)copper(II)*. Acta Cryst. C, 1999. **55**: p. 1063-1065
174. Moreno-Esparza, R., Molins, E., Briansó-Penalva, J.L., Ruiz-Ramírez, L., y Redón, R., *Aqua(1,10-phenanthroline)(L-serinato)copper(II) Nitrate*. Acta Cryst. C, 1995. **51**: p. 1505-1508
175. Solans, X., Ruiz-Ramírez, L., Gasque, L., y Briansó, J.L., *Structure of (1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate*. Acta Cryst. C, 1987. **43**: p. 428-430
176. Solans, X., Ruiz-Ramirez, L., Martinez, A., Gasque, L., y Brianso, J.L., *Structures of chloro(glycinato)(1,10-phenanthroline)copper(II) monohydrate (I) and aqua(1,10-phenanthroline)(L-phenylalaninato)copper(II) nitrate monohydrate (II)*. Acta Cryst. C, 1988. **44 ( Pt 4)**: p. 628-31.
177. Solans, X., Ruíz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L., y Moreno-Esparza, R., *Mixed chelate complexes. III. Structures of (L-alaninato)(aqua)(2,2'-bipyridine)copper(II) nitrate monohydrate and aqua(2,2'-bipyridine)(L-tyrosinato)copper(II) chloride trihydrate*. Acta Cryst. C, 1992. **48**: p. 1785-1788
178. Solans, X., Ruíz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L., y Moreno-Esparza, R., *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)(nitrato)copper(II) monohydrate*. Acta Cryst. C, 1993. **49**: p. 890-893.
179. Tovar-Tovar, A., Ruiz-Ramirez, L., Campero, A., Romerosa, A., Moreno-Esparza, R., y Rosales-Hoz, M.J., *Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques*. J. Inorg. Biochem., 2004. **98**(6): p. 1045-1053.
180. Alvarez-Larena, A., Briansó-Penalva, J.L., Piniella, J.F., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L., y Ferrer-Sueta, G., *Aqua(glycinato)(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)copper(II) Nitrate*. Acta Cryst. C, 1995. **51**: p. 852-854.
181. Sánchez-Bartéz, F. Tesis Maestro en Ciencias Químicas "*Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas Igly, Ilgly y III-ia en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo*". Asesor: Ruiz-Azuara, L. Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
182. Mejia, C. y Ruiz-Azuara, L., *Casiopeinas Igly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells*. Pathol. Oncol. Res., 2008.



183. Bravo-Gomez, M.E. Tesis Química Farmaceutica Bióloga "*Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino*". Asesor: Ruiz-Azuara, L. Universidad Nacional Autónoma de México, 1998.
184. Gracia-Mora, I. Tesis Maestría en Ciencias Veterinarias. "*Evaluación preclínica de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación*". Asesor: Ruiz-Azuara, L., Vargas-García, R., y Sumano-Lopez, H. Universidad Nacional Autónoma de México, 1999.
185. Mayet-Cruz, M.d.L. Tesis Químico Farmacético Biólogo "*Cernimiento antineoplásico de nuevos complejos de coordinación empleando el modelo tumoral murino Melanoma B16*". Asesor: Ruiz-Azuara, L. y Gracia-Mora, I. Universidad Veracruzana, 1991.
186. Tinoco-Méndez, M.C. Tesis MVZ "*Administración de Casiopeína I por vía intraperitoneal. Estudio anatomo-histológico en ratones*". Asesor: Gracia-Mora, I. Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
187. De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Kass, G.E., Kelland, L.R., Orr, R.M., y Dobrota, M., *Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells*. Toxicol. In Vitro, 2000. **14**(1): p. 1-5.
188. Dias, N. y Bailly, C., *Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth*. Biochem. Pharmacol., 2005. **70**(1): p. 1-12.
189. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., y Wang, X., *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1999. **15**: p. 269-90.
190. Rodriguez-Enriquez, S., Vital-Gonzalez, P.A., Flores-Rodriguez, F.L., Marin-Hernandez, A., Ruiz-Azuara, L., y Moreno-Sanchez, R., *Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2006. **215**(2): p. 208-17.
191. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., y Saldanha, C., *Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects*. Biochem. Pharmacol., 2003. **65**(7): p. 1035-41.
192. Moreno-Esparza, R., Escalante-Tovar, S., y Ruiz-Ramirez, L., *DNA-planar copper complexes interaction, - stacking vs H bond*. Acta Cryst. A, 2002. **A58 (Supplement)**: p. C18
193. Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., y Dawson, V.L., *Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor*. Science, 2002. **297**(5579): p. 259-63.
194. Hernández-de la Paz, A.L. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo "*Evaluación de actividad antineoplásica de dos Casiopeínas usando el modelo de xenotransplatación (ratón desnudo)*". Asesor: Ruiz-Azuara, L. y Bravo-Gomez, M.E. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
195. Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., y Vogelstein, B., *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J. Clin. Invest., 1999. **104**(3): p. 263-9.
196. Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C., y Levrero, M., *DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes*. Mol. Cell, 2002. **9**(1): p. 175-86.
197. De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J.A., y Dobrota, M., *Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II*. Toxicology, 2003. **194**(1-2): p. 103-13.





198. Peláez-Sánchez, F.M. Tesis "*Cinética de inhibición y recuperación de la proliferación celular de líneas tumorales y linfocitos humanos tratados con Casiopeína® Ilgly y Casiopeína III-ia*". Asesor: Gracia-Mora, I. y Bravo-Gomez, M.E. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
199. Asano, R., Kaseda, M., y Hokari, S., [*The effect of copper and copper . o-phenanthroline complex on cattle erythrocytes.*]. Nippon Juigaku Zasshi, 1983. **45**(1): p. 77-83.
200. Hill, R., *Copper toxicity II*. Br Vet J, 1977. **133**(4): p. 365-73.
201. Hill, R., *Copper toxicity. I*. Br Vet J, 1977. **133**(3): p. 219-24.
202. Gómez, E. Tesis "*Determinación de la toxicidad aguda de la Casiopeína en perros.*". Asesor: Universidad Nacional Autónoma de México., 1992.
203. Leal-Garcia, M., Garcia-Ortuno, L., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Luna-Delvillar, J., y Sumano, H., *Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs*. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., 2007. **101**(3): p. 151-8.
204. Bocanegra-Astivia, D. y Altamirano-Lozano, M.A., *Toxicología reproductiva inducida por la casiopeína III-ia en ratones macho de la cepa CD-1*, in *Congreso Nacional de Química Médica*. 2006: Querétaro, México
205. Santiago-Moreno, Y. Tesis Biólogo "*Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y sub-crónico de la casiopeína II-gli en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1*". Asesor: Altamirano-Lozano, M.A. Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
206. Grover, I.I., Singh, I.I., y Bakshi, I.I., *Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research - Part 1*. Pharm. Sci. Technol. Today, 2000. **3**(1): p. 28-35.
207. Brown, A.C. y Fraser, T.R., *On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with special reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia*. J. Anat. Physiol., 1868. **2**(2): p. 224-42.
208. Richet, M.C., *Compt. Rend. Soc. Biol. Ses. Fil.*, 1893. **9**(5): p. 775-776.
209. Meyer, H., *Arch. Exp. Path. Pharm.*, 1899. **42**: p. 109-118.
210. Overton, C.E., *Studien uber die Narkose*. Fischer:Jena, 1901.
211. Hammett, L.P., *Some relations between reaction rates and equilibrium constants*. Chem. Rev., 1935. **17**: p. 125-136.
212. Taft, R.W., *Separation of polar, steric and resonance effects in reactivity*, in *Steric Effects in Organic Chemistry*, Newman, M.S., Editor. 1956, Wiley. p. 556-675.
213. Free, S.M., Jr. y Wilson, J.W., *A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies*. J. Med. Chem., 1964. **7**: p. 395-9.
214. Hansch, C. y Steward, A.R., *The Use of Substituent Constants in the Analysis of the Structure--Activity Relationship in Penicillin Derivatives*. J. Med. Chem., 1964. **7**: p. 691-4.
215. Doweyko, A.M., *QSAR: dead or alive?* J Comput. Aided Mol. Des., 2008. **22**(2): p. 81-9.
216. Kubinyi, H., in *Burger's Medicinal Chemistry*, Wolff, M.F., Editor. 1995, John Wiley & Sons. p. 497-571.
217. Hansch, C., ed. *Comprehensive Medicinal Chemistry. The rational design, mechanistic study & therapeutic applications of chemical compounds*. Primera ed. Vol. 4. 1990, Pergamon Press plc: Oxford, Inglaterra.
218. Kubinyi, H., *QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: methodology*. Drug Discov. Today, 1997. **2**(11): p. 457-467.
219. Kubinyi, H., *QSAR and 3D QSAR in drug design Part 2: applications and problems*. Drug Discov. Today, 1997. **2**(12): p. 538-546.



220. Schaad, L.J., Hess, B.A., Jr., Purcell, W.P., Cammarata, A., Franke, R., y Kubinyi, H., *Compatibility of the Free-Wilson and Hansch quantitative structure-activity relations*. J. Med. Chem., 1981. **24**(7): p. 900-1.
221. Marshall, G.R. y Cramer, R.D., 3rd, *Three-dimensional structure-activity relationships*. Trends Pharmacol. Sci., 1988. **9**(8): p. 285-9.
222. Cramer, R.D., 3rd, Patterson, D.E., y Bunce, J.D., *Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA)*. Prog. Clin. Biol. Res., 1989. **291**: p. 161-5.
223. Green, S.M. y Marshall, G.R., *3D-QSAR: a current perspective*. Trends Pharmacol. Sci., 1995. **16**(9): p. 285-91.
224. Kubinyi, H., Folkers, G., y Martin, Y.C., eds. *Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity*. 3D QSAR en Drug Design. Vol. 2. 1997, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.
225. Kubinyi, H., Folkers, G., y Martin, Y.C., eds. *Recent Advances*. 3D QSAR en Drug Design. Vol. 3. 1997, Kluwer Academic Publisher: Dordrecht.
226. Topliss, J.G. y Costello, R.J., *Change correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis*. J. Med. Chem., 1972. **15**(10): p. 1066-8.
227. Hansch, C., *Quantitative structure-activity relationships and the unnamed science*. Acc. Chem. Res., 1993. **26**(4): p. 147-153.
228. Kubinyi, H. y Kehrhahn, O.H., *Quantitative structure-activity relationships. 3.1 A comparison of different Free-Wilson models*. J. Med. Chem., 1976. **19**(8): p. 1040-9.
229. Kubinyi, H. y Kehrhahn, O.H., *Quantitative structure-activity relationships. 1. The modified Free-Wilson approach*. J. Med. Chem., 1976. **19**(5): p. 578-86.
230. Sjöström, M. y Eriksson, L., *Application of statistical experimental design and PLS modeling in QSAR*, en *Chemometrics Methods in Molecular Design*, van de Waterbeemd, H., Editor. 1995, VCH. p. 63-90.
231. Fujita, T., *Recent success stories leading to commercializable bioactive compounds with the aid of traditional QSAR procedures*. Quantitative Structure-Activity Relationships, 1997. **16**(2): p. 107-112.
232. Fujita, T., *Drug Des: Fact Fantasy?*, en *Proc Rhone-Poulenc Round Table Conf 3rd edn: 19*. 1984.
233. Rekker, R.F., *LD50 values: are they about to become predictable?* Trends. Pharmacol. Sci., 1980. **1**(2): p. 383-384.
234. Aptula, A.O. y Roberts, D.W., *Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity*. Chem. Res. Toxicol., 2006. **19**(8): p. 1097-105.
235. Kniewald, J., Kmetec, I., Gaurina-Srcek, V., y Kniewald, Z., *Alternative models for toxicity testing of xenobiotics*. Arh. Hig. Rada. Toksikol., 2005. **56**(2): p. 195-204.
236. Gerner, I., Barratt, M.D., Zinke, S., Schlegel, K., y Schlede, E., *Development and prevalidation of a list of structure-activity relationship rules to be used in expert systems for prediction of the skin-sensitising properties of chemicals*. Altern. Lab. Anim., 2004. **32**(5): p. 487-509.
237. Phillips, J.C., Gibson, W.B., Yam, J., Alden, C.L., y Hard, G.C., *Survey of the QSAR and in vitro approaches for developing non-animal methods to supersede the in vivo LD50 test*. Food Chem. Toxicol., 1990. **28**(5): p. 375-94.
238. Hansch, C., *The physicochemical approach to drug design and discovery (QSAR)*. Drug Dev. Res., 1981. **1**(4): p. 267-309.
239. Szafran, Z., Pike, R.M., y Singh, M.M., *Microscale Inorganic Chemistry; A Comprehensive Laboratory Experience*. 1991, John Wiley & Sons: USA. p. 49-57.



240. Drago, R.S., *Physical methods in inorganic chemistry*. 1965, New York: New York, Reinhold Pub. Corp.
241. Gritzner, G. y Küta, J., *Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents*. Pure & Appl. Chem., 1984. **56**(4): p. 461-466.
242. Cunliffe-Beamer, T.L. y Lees, E.P., *The laboratory Mouse*, in *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals.*, Poole, T.B., Editor. 1987, Longman Scientific and Technical: Great Britain.
243. Hall, J.E., White, W.J., y Lang, C.M., *Acidification of drinking water: its effects on selected biologic phenomena in male mice*. Lab. Anim. Sci., 1980. **30**(4 Pt 1): p. 643-51.
244. OriginLab\_Corporation, *Origin Pro v. 7.0383*. 2002, Sony electronics, Inc.: Northampton, USA.
245. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., y Boyd, M.R., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J. Natl. Cancer Inst., 1990. **82**(13): p. 1107-12.
246. AnalystSoft, *StatPlus 2005 Professional Build 2005*, AnalystSoft, Robust Business Solutions.
247. Advanced\_Chemistry\_Development\_Inc, *ACD labs/Chem Sketch v. 3.00*. 1997, Advanced Chemistry Development Inc.
248. StatSoft-Inc, *STATISTICA (data analysis software system)*. 2004, StatSoft, Inc
249. Paulovicova, A., El-Ayaan, U., y Fukuda, Y., *Synthesis, characterization and X-ray crystal structures of two five-coordinate ternary copper (II) complexes containing acetylacetonate with 1,10-phenanthroline and 2,9-dimethyl phenanthroline*. Inorganica Chim. Acta, 2001. **321**(1-2): p. 56-62.
250. García-Ramos, J.C. Tesis Licenciatura "Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre del tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>". Asesor: Bravo-Gomez, M.E. y Ruiz-Azuara, L. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
251. Lee, C.W. y Anson, F.C., *Electron exchange between bis(1,10-phenanthroline)copper(1+) adsorbed on graphite and bis(1,10-phenanthroline)copper(2+) in solution*. Inorg. Chem., 1984. **23**(7): p. 837-844.
252. Sigel, H., *Ternary Cu<sub>2</sub><sup>+</sup> Complexes: Stability, Structure, and Reactivity*. Angew. Chem. Internat. Edit., 1975. **14**(6): p. 394-402.
253. Sanna, G., Pilo, M.I., Zoroddu, M.A., R., S., y Mosca, S., *Electrochemical and spectroelectrochemical study of copper complexes with 1,10-phenanthrolines*. Inorganica Chim. Acta, 1993. **208**(2): p. 153-158.
254. Ang, K.P., *The dissociation constant of m-nitroanilinium ion in water-sulfolane solvents at 25°C*. J. Solution Chem. 1972. **1**(4): p. 369-375.
255. Schwarz, H.A., Creutz, C., y Sutin, N., *Cobalt(II) Polypyridine Complexes. Redox and Substitutional Kinetics and Thermodynamics in the Aqueous 2,2'-Bipyridine and 4,4'-Dimethyl-2,2'-Bipyridine Series Studied by the Pulse-Radiolysis Technique*. Inorg. Chem., 1985. **24**: p. 433-439.
256. Brisbin, D.A. y McBryde, W.A.E., *The stability of metallic complexes of two dimethyl phenanthrolines*. Can. J. Chem., 1963. **41**(5): p. 1135-1141
257. Schoenleber, J. y Lochon, P., *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences* 1974. **278C**: p. 1235.
258. Kotrl, S. y Sucha, L., *Handbook of Chemical Equilibrium in Analytical Chemistry*. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, ed. Horwood, E. 1985, Chinchester, UK.
259. Schilt, A.A. y Smith, G.F., *Acid Dissociation Constants of Substituted 1,10-Phenanthrolines*. J. Phys. Chem., 1956. **60**(11): p. 1546-1548.





260. Banks, C.V. y Bystroff, R.I., *Stability orders in transition metal-1,10-phenanthroline complexes*. J. Am. Chem. Soc., 1959. **81**(23): p. 6153-6158.
261. Ashton, L.A., Bullock, J.I., y Simpson, P.W.G., *Effect of temperature on the protonation constants of some aromatic, heterocyclic nitrogen bases and the anion of 8-hydroxyquinoline*. J. Chem. Soc., Faraday Transactions 1, 1982. **78**(6): p. 1961.
262. Denny, W.A., *DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design*. Anticancer Drug Des., 1989. **4**(4): p. 241-63.
263. Martinez, R. y Chacon-Garcia, L., *The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work*. Curr. Med. Chem., 2005. **12**(2): p. 127-51.
264. Sigman, D.S., *Chemical nucleases*. Biochemistry, 1990. **29**(39): p. 9097-105.
265. Sigman, D.S., Graham, D.R., D'Aurora, V., y Stern, A.M., *Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I*. J. Biol. Chem., 1979. **254**(24): p. 12269-72.
266. Hyun, C. y Filippich, L.J., *Inherited canine copper toxicosis in Australian Bedlington Terriers*. J. Vet. Sci., 2004. **5**(1): p. 19-28.
267. Szatrowski, T.P. y Nathan, C.F., *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res., 1991. **51**(3): p. 794-8.
268. Laurent, A., Nicco, C., Chereau, C., Goulvestre, C., Alexandre, J., Alves, A., Levy, E., Goldwasser, F., Panis, Y., Soubrane, O., Weill, B., y Batteux, F., *Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species*. Cancer Res., 2005. **65**(3): p. 948-56.
269. Segel, I.H., *Biochemical calculations*. 2nd edition ed. 1976, New York, USA: John Wiley & Sons.
270. Jones, D.P., *Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance*. Methods Enzymol., 2002. **348**: p. 93-112.
271. Rost, J. y Rapoport, S., *Reduction-Potential of Glutathione*. Nature, 1964. **201**: p. 185.
272. Ball, E.G., *Studies on oxidation-reduction, XXIII. Ascorbic Acid*. J. Biol. Chem., 1937. **118**: p. 219.
273. Williams, N.H. y Yandell, J.K., *Outer-Sphere Electron-Transfer. Reactions of Ascorbate Anions*. Aust. J. Chem., 1982. **35**: p. 1133-44.
274. Miller, D.M., Buettner, G.R., y Aust, S.D., *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions*. Free Radic. Biol. Med., 1990. **8**(1): p. 95-108.
275. Florence, T.M., *The production of hydroxyl radical from the reaction between hydrogen peroxide and NADH*. J. Inorg. Biochem., 1986. **28**(1): p. 33-7.
276. Bard, A.J. y L., F.L., *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications*. 2nd ed. 2001: Wiley.
277. Markossian, K.A. y Kurganov, B.I., *Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. Function, structure, and mechanism of action*. Biochemistry (Mosc), 2003. **68**(8): p. 827-37.
278. Huffman, D.L. y O'Halloran, T.V., *Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins*. Annu. Rev. Biochem., 2001. **70**: p. 677-701.
279. Cai, X., Pan, N., y Zou, G., *Copper-1,10-phenanthroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage*. Biometals, 2007. **20**(1): p. 1-11.