



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio de la reactividad de la Casiopeína  
II-gly y Casiopeína III-ia Cisteína, Glutación y  
2-mercaptoetanol.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA**

**PRESENTA**

**ANA LUISA ALONSO SAENZ**

**MÉXICO, D.F**

**2013**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

---

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE     Dra. Lena Ruiz Azuara.  
VOCAL             Dra. Silvia Elena Castillo Blum.  
SECRETARIO     Dra. María Elena Bravo Gómez.  
1er. SUPLENTE   M en C. Juan Carlos García Ramos.  
2do. SUPLENTE   Dra. Itzel Guerrero Rios.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

LABORATORIO 210  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR.  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

---

**Dra. Lena Ruiz Azuara**

ASESOR DEL TEMA

---

**M EN C. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS**

SUPERVISOR TÉCNICO

---

**Ana Luisa Alonso Saenz**

**SUSTENTANTE**



## Agradecimientos.

A los proyectos PAPIIT IN227110, IN217613, PAIP3590-19 y CONACYT179119, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Por las becas para la realización de mis estudios de licenciatura que recibí por parte del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y la Red de Desarrollo de Fármacos y Métodos de Diagnóstico (REDFARMED).

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Fernando Cortes Guzmán por los cálculos teóricos facilitados para el análisis de resultados.

Se agradecen las facilidades proporcionadas por el laboratorio 100 del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química y a Alberto Huerta Delfino por la ayuda proporcionada en el Laboratorio C-2 del edificio C de la Facultad de Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.



## Dedicatorias.

A mis papas

A Mi hermana

A todos mis tíos

A todos mis primos

A todos mis sobrinos

A la Doctora Lena Ruiz, jefa gracias por permitirme ser parte de su maravilloso grupo de trabajo y por hacerme ver que la química es maravillosa cuando te la enseñan con tanto cariño como lo hizo usted.

A mis amigos de la secundaria Coral García y Fabián Bravo, gracias por las porras la presión y el ejemplo para concluir este ciclo.

A mis amigas de la gloriosa preparatoria 8, Sonia Zavala, Alicia Nieto, Merlín Taboada y Aura Dávila, gracias por estar conmigo en una de las etapas más bonitas de mi vida estudiantil y por enseñarme que a pesar del tiempo y la distancia la amistad existe.

A mis amigos de la facultad Susana Ramos, Eduardo Miranda, Saraí Almaraz, Fabiola Pantoja, Miriam Medina, Alejandro Herrera, por compartir tantos momentos tan maravillosos en nuestra hermosa facultad a la que le debemos tantas cosas.

A mis amigos de Carrera, Julio Mora, Elizabeth Uria, Salomon Jacinto, Miriam Hernández, Margarita, Nallely Morales, Gerardo Salinas, Erik



Ruiz, Sandra Aglae, porque es verdad que en equipo es más fácil y divertido salir adelante.

A mis amigos del laboratorio 210 Javier Díaz, gracias por enseñarme a lavar el material, por ayudarme en los problemas técnicos en el desarrollo de este trabajo y por el tiempo que disfrutamos experimentando y discutiendo hasta altas horas de la noche, Silvia Dávila por el impulso para terminar, Adrian Espinoza por ser tan paciente conmigo, por escucharme y porque siempre tienes una respuesta que no espero tener, Daniela García eres un ejemplo de lucha y superación te admiro, María Elena por confiar en mí, Gabriela Ballinas por qué hiciste muy ameno mi tiempo, mientras no podía aislar chichlatos, gracias por los consejos, las platicas, las risas y las enseñanzas, por enseñarme que se puede ser realmente una buena persona, Juan Carlos por todas las platicas de las cuales aprendí mucho.





7.3.5.- ESPECTROSCOPIA UV-VIS. ....	26
7.3.6.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONO CRISTAL. ....	26
7.4.- ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD ENTRE CASIOPEÍNAS® Y REDUCTORES. ....	27
7.5.- CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS ENTRE LAS CASIOPEÍNAS® Y LOS REDUCTORES CON COEFICIENTES ESTEQUIOMÉTRICOS 1:1.....	30
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
8.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y III-IA. ....	34
8.1.2.- ESPECTROSCOPIA UV-VIS DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA.....	35
8.2.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA CON CISTEÍNA.....	38
8.2.1.-OBSERVACIONES GENERALES PARA LA REACTIVIDAD CON CISTEÍNA (CYS).....	38
8.2.2.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY CON CISTEÍNA EN UN SISTEMA ABIERTO (PRESENCIA DE O <sub>2</sub> ATMOSFÉRICO).....	39
8.2.2.1.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY CON CISTEÍNA EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ). ....	44
8.2.3.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® III-IA CON CISTEÍNA EN UN SISTEMA ABIERTO (PRESENCIA DE O <sub>2</sub> ATMOSFÉRICO).....	53
8.2.3.1.- REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® III-IA CON CISTEÍNA EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ). ....	55
8.2.4.- CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTO AISLADOS EN LA INTERACCIÓN ENTRE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA CON CISTEÍNA.....	57
8.2.4.2.1.-DIFRACCIÓN DE RAYOS X DEL PRODUCTO AISLADO DE LA REACCIÓN CU(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4,4'-DM-2,2'-BIPI + CYS.....	63
8.3.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA CON GSH.....	66
8.3.1.-OBSERVACIONES GENERALES DE LA REACTIVIDAD CON GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH). ....	66
8.3.2.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY-GSH EN UN SISTEMA ABIERTO (PRESENCIA DE O <sub>2</sub> ATMOSFÉRICO). ....	67
8.3.2.1.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY CON GSH EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ). ....	72
8.3.3.1.- REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® III-IA Y GSH EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ). ....	81
8.3.4.1.- INTERACCIÓN ENTRE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y GSH.....	84
8.3.4.2.- INTERACCIÓN ENTRE LA CASIOPEÍNA® III-IA Y GSH.....	88
8.4.1.-OBSERVACIONES GENERALES PARA LA REACTIVIDAD CON.....	90
2-MERCAPTOETANOL. ....	90
8.4.2.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY CON.....	91
2-MERCAPTOETANOL EN UN SISTEMA ABIERTO (PRESENCIA DE O <sub>2</sub> ATMOSFÉRICO).....	91





---

---

8.4.2.1.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® II-GLY CON.....	93
2-MERCAPTOETANOL EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ).....	93
8.4.3.1.-REACTIVIDAD DE LA CASIOPEÍNA® III-IA CON.....	100
2-MERCAPTOETANOL EN UN SISTEMA CERRADO (ATMÓSFERA DE N <sub>2</sub> ).....	100
8.4.4.-CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AISLADOS EN LA INTERACCIÓN ENTRE CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA CON 2-MERCAPTOETANOL.....	103
8.4.4.1.-INTERACCIÓN ENTRE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y BME.....	103
8.4.4.2.- INTERACCIÓN ENTRE LA CASIOPEÍNA® III-IA Y BME.....	104
8.4.4.3.-ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE LOS PRODUCTOS AISLADOS ENTRE LA CASIOPEÍNA® II-GLY Y CASIOPEÍNA® III-IA CON BME. ....	104
9.- CONCLUSIONES.....	107
10.-ANEXO I.....	109
A.- ESPECTROS OBTENIDOS EN DISOLUCIÓN ACUOSA Y MEDIO AMORTIGUADO CON MOPS. ....	109
10.1.-ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA.....	110
11.-ABREVIATURAS.....	118
12.-ÍNDICE DE ELEMENTOS.....	119
12.1.-ECUACIONES.....	119
12.2.- FIGURAS.....	119
12.3.- GRÁFICAS.....	121
12.4.- TABLAS.....	125
13.- REFERENCIAS.....	127



---

## 1.-Resumen.

Estadísticas de la organización mundial de la salud (OMS), registraron en el año 2008, 7.6 millones de defunciones producidas únicamente por diferentes tipos de cáncer, las alarmantes estadísticas impulsaron a la investigación de estrategias para combatir esta enfermedad.

Entre las estrategias abordadas para su tratamiento se encuentra el empleo de metales esenciales en el desarrollo de quimioterapéuticos, como es el caso de las **Casiopeínas**<sup>®</sup>. Estudios realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* con las **Casiopeínas**<sup>®</sup> mostraron tener actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral.

Aunque no se conoce completamente cuál es el mecanismo de acción, algunas evidencias indican que su actividad puede llevarse a cabo principalmente a través de:

- Interacciones directas con el ADN a través de procesos de intercalación y la interacción con los surcos mayor y/o menor.
- La capacidad redox del Cu<sup>(II)</sup> que les permite participar en la generación de especies reactivas de oxígeno.
- Toxicidad mitocondrial.

Con el objetivo de entender el comportamiento de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> dentro de la célula, así como su participación en procesos redox y obtener más evidencias del mecanismo de acción, se realizó un estudio de la reactividad que presenta la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> y **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)]NO<sub>3</sub> con tres diferentes especies con capacidades reductoras como glutatión reducido (GSH) y cisteína (cys) que se encuentran presentes en el organismo y

---

2-mercaptoetanol ( $\beta$ ME), agente reductor exógeno que posee el mismo valor de potencial redox que GSH/GSSG. Éste estudio se realizó empleando espectroscopia ultravioleta visible, ya que esta técnica proporciona información de los cambios que se puedan generar en torno a la esfera de coordinación del Cu<sup>(II)</sup>.

De forma general se propone que en disolución, la cisteína se coordinó a las **Casiopeínas**<sup>®</sup> para formar las especies [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup> y [Cu<sup>(II)</sup>(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-cys)]<sup>+</sup> en proporciones equimolares de cisteína y **Casiopeína**<sup>®</sup>.

En presencia de una concentración mayor a la equivalencia de cisteína se observó la reducción de las especies [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup> y [Cu<sup>(II)</sup>(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-cys)]<sup>+</sup>, teniendo especies de Cu<sup>(I)</sup> en disolución. Los productos finales obtenidos por una reacción de dismutación en presencia de oxígeno se identificaron como [Cu(4,7-dm-1,0-fen)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, [Cu<sub>4</sub>(OH)<sub>4</sub>(4,4'-dm-2,2'-bipi)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y [Cu(cistinato)]<sub>n</sub>.

La **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** presentó una reacción de adición por parte del GSH al adicionar 0.8 equivalentes, cuando se agregó una concentración mayor de GSH, se presentó la reducción de la especie [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup>; el producto aislado y caracterizado al final de la reacción corresponde al producto [Cu<sub>2</sub>(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)<sub>2</sub>(GSSG)].

La **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** con GSH, así como ambas **Casiopeínas**<sup>®</sup> con  $\beta$ ME, presentan la coordinación por el átomo de azufre, además de la reacción reducción-oxidación del centro metálico, obteniendo como producto final de la reacción las **Casiopeínas**<sup>®</sup> re-oxidadas, es decir como Cu<sup>(II)</sup> en presencia de O<sub>2</sub>.

## 2.-Introducción.

Estadísticas de la organización mundial de la salud (OMS), registraron 57 millones de defunciones en el año 2008, de las cuales 36 millones corresponden a enfermedades no transmisibles, principalmente enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades pulmonares crónicas y cáncer. Solamente el cáncer provocó 7.6 millones de muertes [1].

Estadísticas del año 2010 mostraron que en México 70,235 de las defunciones registradas se debieron a tumores malignos, afectando a 34,412 individuos de sexo masculino, principalmente por tumores en la próstata, tráquea, bronquios y pulmón. En las mujeres se registro un total de 35,823 defunciones debidas principalmente a tumores de mama, cuello del útero, hígado y vías biliares intrahepáticas [2].

### 2.1.-Cáncer.

El término cáncer se refiere a un grupo de padecimientos, producto de la proliferación anormal de una célula cuya descendencia ha adquirido la habilidad de multiplicarse e invadir los tejidos circundantes debido al descontrol de su crecimiento [3]; el término cáncer fue introducido por un médico griego llamado Galeno, quien encontró parecido entre un cangrejo y la enfermedad de la glándula mamaria.

#### 2.1.1.-Tratamientos empleados contra el cáncer.

Existen diferentes tratamientos para combatir el cáncer, enfermedad que puede ser curable, dependiendo de su grado de

alteración en el ciclo celular. Con el fin de erradicarla se emplean diferentes procedimientos, entre los más empleados se encuentran:

- Cirugía.
- Radioterapia.
- Quimioterapia.

La **cirugía**, se practica cuando el tumor no presenta metástasis, el tumor se retira con el objetivo de eliminarlo por completo; la **radioterapia** consiste en el empleo de la radiación sobre la afectación y la **quimioterapia** que consiste en la administración de medicamentos. Estos procedimientos pueden ser aplicados de manera independiente o combinados dependiendo de la localización y el comportamiento del tumor. En la actualidad se cuenta con más estrategias, que en conjunto con las anteriores pueden presentar mejores resultados, entre ellas se encuentra la terapia fotodinámica, terapia génica y trasplante de médula ósea; sin embargo, la combinación de estos tratamientos incrementa los costos, haciendo que sean poco accesibles [4].

## 2.1.1.1.-Quimioterapia del cáncer.

El empleo de sustancias químicas para el tratamiento de diferentes enfermedades se conoce como quimioterapia, en particular para el cáncer, estas sustancias químicas se clasifican de acuerdo a su naturaleza como orgánicas o inorgánicas, o por su mecanismo de acción como alquilantes, intercalantes, anti metabólicos, alcaloides de plantas, antibióticos antitumorales, hormonas-antihormonas, generadores de ERO [5, 6].



metastáticos, padecimientos poco tratables en ese momento con los antitumorales existentes [7].

## 2.1.1.1.2.1.1.-El mecanismo de acción para el *cis*-platino y sus derivados.

El mecanismo por el cual actúan algunos compuestos de coordinación de platino es la unión directamente por el platino al ADN, esta unión se puede presentar en diferentes formas [8]: la coordinación del platino a una sola base del ADN, la coordinación intracatenaria y la coordinación intercatenaria del platino al ADN. Para que el platino llegue hasta el ADN, pasa por una serie de reacciones, una vez introducido en el organismo, el platino intercambia los ligantes cloro por moléculas de agua (**figura 2**), estas moléculas de agua serán sustituidas a su vez por los nitrógenos de las bases púricas y pirimídicas, siendo el nitrógeno siete de la guanina el favorecido termodinámica y cinéticamente, además de ser ésta posición la región más nucleofílica del ADN [9].

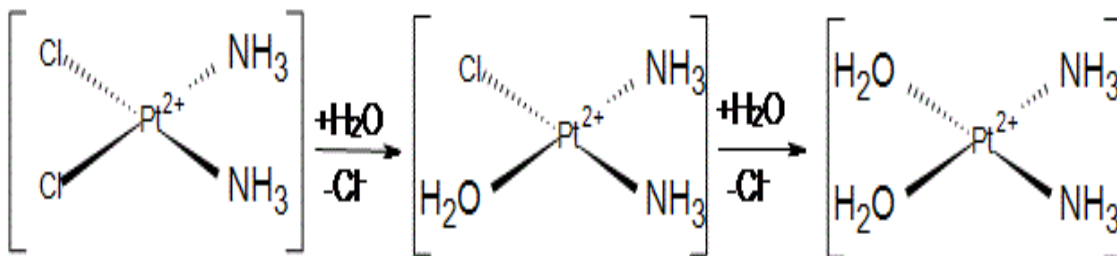
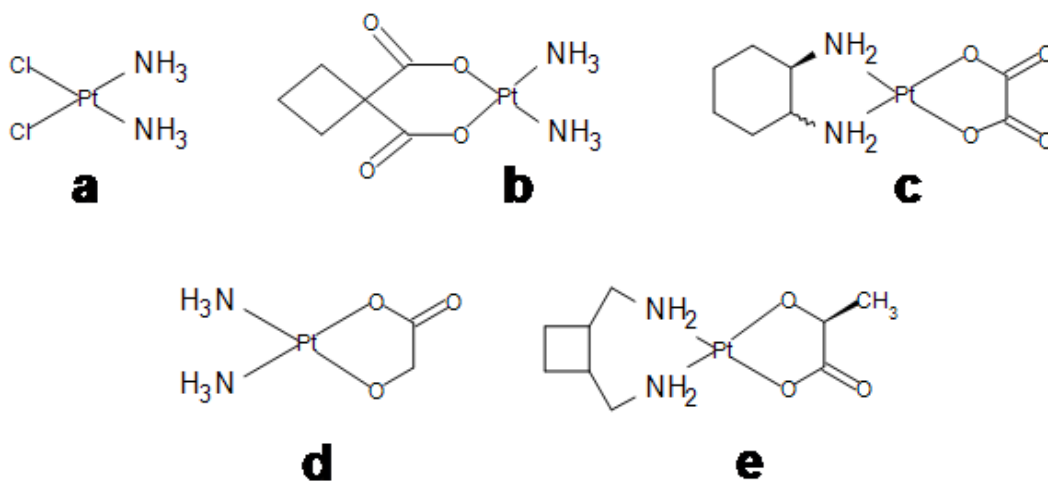


Figura 2.- Reacción de sustitución de ligantes de *cis*-platino dentro del organismo.

Actualmente el *cis*-platino se utiliza para el tratamiento de cáncer de células germinales, tumores de trofoblastos, cáncer epitelial de ovario y cáncer de hígado, aunque como ya se mencionó en cáncer testicular [10] se encuentra su mayor actividad [11, 12].

Con base en la estructura del *cis*-platino se diseñó la segunda y tercera generación de compuestos de platino (**figura 3**), buscando disminuir la toxicidad e incrementar la actividad, obteniendo en el año 1998 el uso clínico para el carboplatino, con una toxicidad menor que el *cis*-platino; en 2002 se aprobó en Estados Unidos el uso de oxaliplatino [trans-L-diaminociclohexano (oxalato) platino (II)], además del nedaplatino [*cis*-diamino-glicolato-O,O'-platino(II)] en China y en Japón el lobaplatino[7, 11].



**Figura 3.-** Principales compuestos de derivados de *cis*-platino; a) *cis*-platino, b) carboplatino, c) oxaliplatino, d) nedaplatino e) lobaplatino.

Sin embargo, todos estos compuestos presentan efectos secundarios como disfunción renal, alergias, sordera, cambios degenerativos y necrosis [13].

Una de las estrategias utilizadas recientemente para disminuir la toxicidad de los compuestos de coordinación es el empleo de metales esenciales.



## 2.1.1.1.2.2.-Otros metales de transición.

Entre los metales esenciales [14] necesarios para el correcto funcionamiento del metabolismo de los seres vivos, que se han utilizado en el diseño de nuevos compuestos de coordinación se encuentran el vanadio, cromo, hierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, entre otros.

Las ventajas de modificar los ligantes que conforman la esfera de coordinación así como el centro metálico son: el contar con sitios vacantes en la esfera de coordinación, estabilización de diversos estados de oxidación (lo que dificulta o facilita su participación en reacciones redox), así como la modulación de su afinidad por los ligantes y su cinética de intercambio, diseño para la interacción con un blanco molecular específico, entre otros.

Una vez que los compuestos metálicos se obtuvieron y mostraron actividad antitumoral, el siguiente paso importante por investigar es su comportamiento dentro del organismo, ya que con esta información es probable que se puedan hacer modificaciones en su estructura, para que éstos sean más selectivos y estén dirigidos sólo a aquellas células que lo requieren.

Algunos de los compuestos metálicos de los cuales se tienen datos de citotoxicidad en líneas celulares tumorales de pulmón, riñón, colon, recto, ovario, mama, próstata, sistema nervioso central, piel (melanoma) y tumores malignos hematológicos son: compuestos metálicos de Mn, Co, Cu con salen, compuestos metálicos de Cu y Mn con salicilaldehído, Bis( $\beta$ -dicetonas) de Ti<sup>(IV)</sup>, tris(ditiocarbamato) de Cr<sup>(III)</sup> [15].

## 2.1.1.1.2.2.1.-Mecanismo de acción de compuestos metálicos.

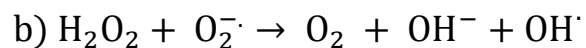
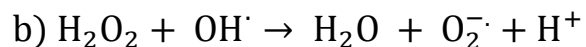
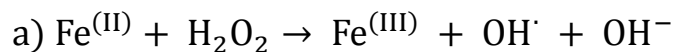
Son pocas las pruebas que existen para afirmar cual es el mecanismo de acción por medio del cual actúan los compuestos metálicos, sin embargo se pueden clasificar de acuerdo a [15]:

- Comportamiento como iones lipofílicos, entre los que se encuentran compuestos cargados positivamente, cuyos ligantes presentan un importante efecto estérico y son hidrofóbicos, obligando a la molécula a permanecer secuestrada en las membranas celulares, principalmente la mitocondrial, confiriéndole de esta forma cierta toxicidad selectiva.

- Afinidad por grupos sulfhidrilos, aquellos compuestos que contienen metales de transición del quinto y sexto periodo o metales pesados post-transicionales son clasificados como "ácidos blandos" y formarán compuestos estables con bases blandas [16] como azufre y selenio. Estos compuestos generalmente tienen ligantes hidrolizables o grupos salientes como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{RCOO}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , haciéndolos susceptibles a ataques nucleofílicos por ligantes biológicos como el sulfhidrilos (-SH) de los residuos de cisteína generando reacciones de adición y/o sustitución. Este tipo de reacciones trae como consecuencia la disminución del glutatión reducido, dependiendo del metal y su esfera de coordinación.

- Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), este tipo de compuestos contienen en su estructura metales con la capacidad de participar en ciclos de reducción-oxidación, ejemplo de estos metales son  $\text{Ti}^{(\text{III})}$ ,  $\text{V}^{(\text{II})}$ ,  $\text{Cr}^{(\text{II})}$ ,  $\text{Fe}^{(\text{II})}$ ,  $\text{Co}^{(\text{II})}$ ,  $\text{Ni}^{(\text{I})}$ , y  $\text{Cu}^{(\text{I})}$  [15]. Se propone que la generación de las ERO sea por medio de la reacción tipo Fenton

(**ecuación 1**), en donde los metales son capaces de generar radical  $\text{OH}^\cdot$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [17].



**Ecuación 1.-** Generación de radical  $\text{OH}^\cdot$  a partir de a) Reacción de Fenton y b) Ciclo de Haber-Weiss.

Las características descritas anteriormente para el desarrollo de compuestos de coordinación fueron tomadas en cuenta en el diseño de los compuestos de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  registrados con el título de marca **Casiopeínas<sup>®</sup>** [18-22].

## 3.-Antecedentes.

### 3.1.-Casiopeínas<sup>®</sup>.

Los compuestos de coordinación de Cu<sup>(II)</sup> llamados **Casiopeínas<sup>®</sup>**[18-22] se diseñaron tomando en cuenta diferentes factores que optimizaran su actividad y disminuyeran su toxicidad.

- El Cu<sup>(II)</sup> se empleó ya que es considerado un metal esencial y el organismo cuenta con mecanismos para su eliminación si es que se encuentra en altas concentraciones, lo que ayuda a disminuir la toxicidad de estos compuestos. Además el Cu<sup>(II)</sup> puede participar en procesos redox tipo Fenton y desequilibrar el ciclo de Haber-Weiss para producir especies reactivas de oxígeno (ERO) [23] una vez que se encuentre como Cu<sup>(I)</sup>.
- Se emplearon ligantes bidentados donadores por nitrógenos como 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridina ya que fuerzan la configuración *cis* en la esfera de coordinación del cobre, estos sistemas aromáticos facilitan las interacciones intercalantes tipo  $\pi-\pi$  con las bases nitrogenadas del ADN [24, 25].
- La diferencia de afinidades entre el cobre y los ligantes puede facilitar su intercambio con biomoléculas.
- Los ligantes utilizados proporcionan diferentes grados de hidrofobicidad a la molécula.
- Los compuestos formados deben ser catiónicos para facilitar su solubilidad en agua.

Estos compuestos de coordinación mixtos que involucran en su estructura ligantes bidentados con átomos donadores de nitrógeno y

oxígeno cuyas fórmulas generales son:  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ , en donde (N-N) se refiere a ligantes donadores por nitrógenos como 1,10-fenantrolina en donde  $\text{R}_{2-9} = \text{CH}_3, \text{H}, \text{fenilos}$  y  $\text{R}_5 = \text{NO}_2, \text{Cl}$  y 2,2'-bipiridina en donde  $\text{R}_{2'-9'} = \text{CH}_3, \text{H}, \text{fenilos}$ , ligantes (O-O) donadores por oxígeno como puede ser acetilacetato o salicilaldehído y ligantes (N-O) donadores por nitrógeno y oxígeno como  $\alpha$ -aminoácido en donde  $\text{R}_1$  representa los sustituyentes que conforman los diferentes aminoácidos o péptidos [18-22].

Las estructuras generales de estos compuestos se ilustran en la **figura 4**, los compuestos son catiónicos con una carga positiva que es neutralizada por el contra ión  $\text{NO}_3^-$ .

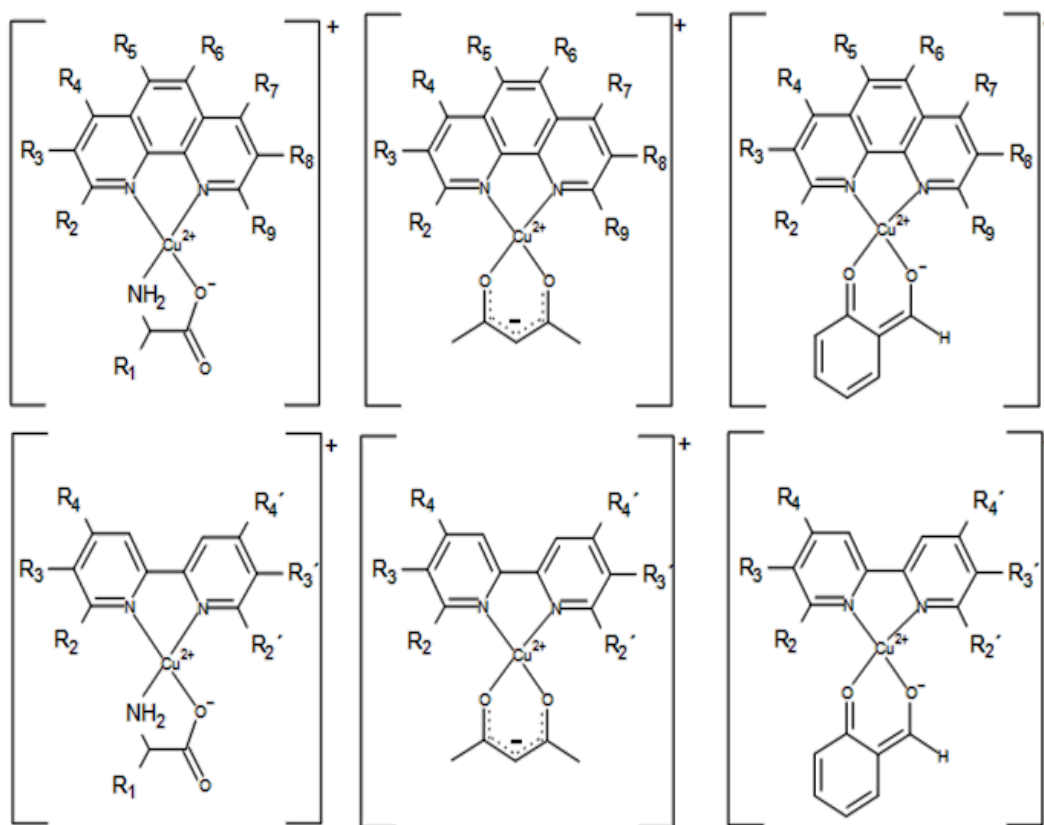


Figura 4.- Estructuras generales de las Casiopeínas®.

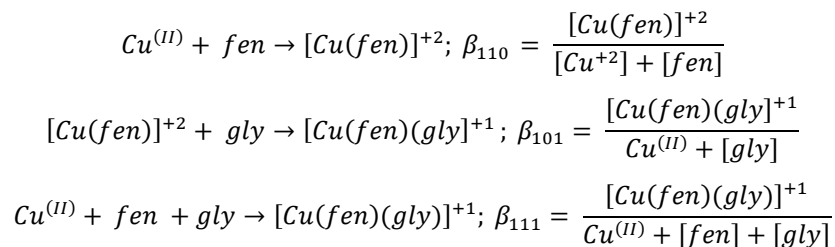
La combinación de los ligantes genera más de cien compuestos clasificados en diez familias como se muestra en la **tabla 1**:

Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína IIIa	[Cu(N-N)(acetilacetato)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína IIIs	[Cu(N-N)(salicilaldehidato)]NO <sub>3</sub>
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)] NO <sub>3</sub>
Casiopeína V	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO <sub>3</sub>
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-1,10-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-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO <sub>3</sub>
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)] NO <sub>3</sub>
Casiopeína X	[Cu(N-N)(péptidos)] NO <sub>3</sub>

Debido a que la Familia de las **Casiopeínas<sup>®</sup>** es muy numerosa, sólo algunas moléculas seleccionadas mediante discernimiento y estudios QSAR [26] han sido más estudiadas, entre las que se encuentran la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia**.

### 3.1.1.-Características fisicoquímicas de las Casiopeínas<sup>®</sup>.

Se han realizado diferentes estudios para la caracterización de esta numerosa familia de compuestos obteniendo constantes de estabilidad para los compuestos binarios y ternarios de Cu<sup>(II)</sup> con las diiminas, glicinato y acetilacetato [27, 28]. Las constantes de formación parcial y global se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:



**Ecuación 2.-** Expresiones de las constantes de estabilidad parciales para diferentes equilibrios.

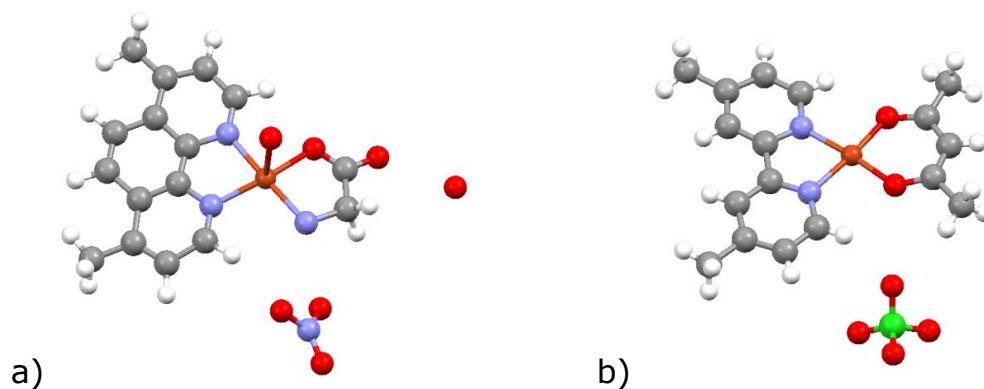
Para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{gly})]^+$  se informa una constante de estabilidad  $\log \beta_{111} = 16.99$ , mientras que para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{acac})]^+$  el valor de  $\log \beta_{111}$  es 17.40. Los valores para los compuestos binarios son  $\log \beta_{110} = 9.3$ ,  $\log \beta_{101} = 8.19$  para el caso de la glicina y  $\log \beta_{101} = 7.8$  para el acetilacetato. De estos datos podemos observar que la estabilidad del compuesto con acac es mayor que el compuesto con glicina, además, la estabilidad del compuesto  $[\text{Cu}(\text{fen})]^{+2}$  es mayor que la de los compuestos  $[\text{Cu}(\text{gly})]^+$  y  $[\text{Cu}(\text{acac})]$  [29].

Para los compuestos  $[\text{Cu}(\text{bipi})(\text{gly})]^+$  y  $[\text{Cu}(\text{bipi})(\text{acac})]^+$  los valores de  $\log \beta_{111}$  son 15.92 y 16.77, respectivamente. Para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{bipi})]^{+2}$  la constante de formación tiene un valor de  $\log \beta_{110} = 8.0$ ,  $\log \beta_{101} = 7.92$  para el caso de la glicina y  $\log \beta_{101} = 8.77$  para el acetilacetato. Se observa una tendencia similar a la descrita con los compuestos con fenantrolina respecto a la estabilidad de los compuestos ternarios, aunque no es tan clara la diferencia de estabilidad del compuesto  $[\text{Cu}(\text{bipiridina})]^{+2}$  con respecto a los de más ligantes en la formación de los compuestos binarios [27].

Mediante estudios de correlación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) se determinó que la presencia de un tercer anillo en el ligante (N-N) diimina incrementa la actividad antiproliferativa evaluada *in vitro* en diferentes líneas tumorales humanas [26]. En la literatura se informa que diiminas aromáticas como fenantrolina y bupiridina libres o compuestos de éstas pueden unirse al ADN por medio de interacciones intercalantes y no intercalantes [15]. También se encontró que los potenciales de media onda ( $E^{\circ}_{1/2}$ )  $-310 \pm 4\text{mV}$  (**Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**) y  $-338 \pm 3\text{mV}$  (**Casiopeína<sup>®</sup> III-ia**)

referidos al par Fc/Fc<sup>+</sup> a pH 7.0 obtenidos en una mezcla etanol/H<sub>2</sub>O 2/5 v/v, tienen una contribución importante en las ecuaciones QSAR, lo que lleva a pensar que el cobre desempeña un papel importante en diferentes reacciones redox que pueden estar implicadas en la generación de especies reactivas de oxígeno [26].

Con el análisis de la difracción de rayos X de estructuras cristalinas fue posible determinar la geometría que adoptan las **Casiopeínas**<sup>®</sup> en estado sólido, teniendo para la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** una geometría pirámide de base cuadrada en donde la posición apical generalmente es ocupada por una molécula de disolvente o el ion nitrato (**figura 5a**)[30], mientras que la **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** adopta una geometría cuadrada plana distorsionada con perclorato como contra ión (**figura 5b**)[31].

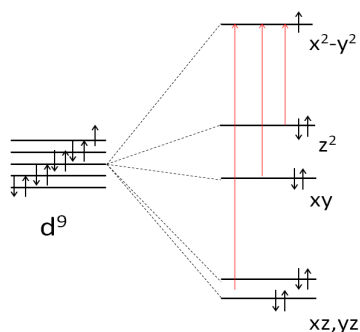


**Figura 5.-** Estructuras cristalinas de a) **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO<sub>3</sub> [30] y b) **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** ClO<sub>4</sub> [Cu(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)] ClO<sub>4</sub> [31].

El Cu<sup>(II)</sup> en la **Casiopeína**<sup>®</sup> tiene una configuración electrónica  $d^9$ , de acuerdo a su arreglo geométrico las transiciones electrónicas que pueden presentarse en estos compuesto son :  $d_{x^2-y^2} \leftarrow d_{yz}$ ,  $d_{xz}$ ;  $d_{x^2-y^2} \leftarrow d_{xy}$  y  $d_{x^2-y^2} \leftarrow d_z^2$  (transiciones electrónicas para una geometría pirámide



de base cuadrada mostradas en la **figura 6**), la energía asociada a estas transiciones electrónicas se verá reflejada en un espectro electrónico como una única señal alrededor de 600nm [32], debido a que las diferencias de energía necesarias para las transiciones electrónicas son similares en compuestos con Cu<sup>(II)</sup>. Encontrando el máximo de absorción para la **Casiopeína® II-gly** en 612nm y para la **Casiopeína® III-ia** en 600nm. Cuando se encuentran en disolución acuosa las **Casiopeínas®** presentan color en una gama de azules.



**Figura 6.-** Diagrama de orbitales *d* para una geometría bipirámide de base cuadrada y sus posibles transiciones para un sistema *d*<sup>9</sup>.

### 3.1.2.-Las **Casiopeínas®** en sistemas biológicos.

Además de su caracterización fisicoquímica, se han realizado diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, el resultado de estos estudios ha demostrado que las **Casiopeínas®** cuentan una amplia gama de actividades como antiproliferativa [33], citotóxica, genotóxica [34], y antitumoral [35-37].

#### 3.1.2.1.-Mecanismo de acción.

No ha sido posible determinar un mecanismo de acción en su totalidad, sin embargo, evidencias experimentales en diferentes líneas tumorales humanas tales como HeLa, [38], neuroblastoma CHP-212 [39] y SK-N-SH [40] y meduloblastoma [41], células HCT-15 (carcinoma de colon)[36] y en glioma murino C6 [35] sugieren que las

**Casiopeínas**<sup>®</sup> pueden inhibir la proliferación celular y provocar muerte por apoptosis.

### 3.1.2.1.1.-Evidencias de estrés oxidante.

Al administrar **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** en un cultivo de células de glioma murino C6, se observó un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Este incremento tiene como consecuencia la inhibición de la proliferación celular de una forma dosis-dependiente y el mecanismo sugerido para la muerte celular es apoptosis (muerte celular programada). El tratamiento de glioma C6 en ratas con **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** redujo el volumen de los tumores, la proliferación celular y el incremento del índice apoptótico[35].

La administración de diez **Casiopeínas**<sup>®</sup> en presencia y ausencia de ácido ascórbico en cultivos de células HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) provocó la ruptura de su material genético, siendo mayor el daño en presencia del reductor. La presencia del reductor incrementa la concentración de Cu<sup>(I)</sup>, el cual participa en la formación de ERO a través de una reacción tipo Fenton. Dado que la población de linfocitos aislados de sangre periférica humana, no presentó una disminución sustancial en su población en ninguno de los esquemas de tratamiento utilizados (**Casiopeína**<sup>®</sup> en presencia y ausencia de reductor) se puede sugerir un cierto grado de selectividad [42].

En un estudio similar se mostró que la degradación del material genético disminuyó cuando se agregó al sistema de estudio la enzima catalasa y pudo detenerse por completo cuando se agregó al sistema el agente quelatante EDTA. Cuando se agregó al sistema superóxido dismutasa (SOD) no se observó que esta enzima detuviera la degradación del material genético. El daño genético se cuantificó

siguiendo la formación de la especie 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina), especie formada cuando el radical  $\cdot\text{OH}$  interactúa con la base guanina. Estos resultados sugieren que la generación de ERO es la principal causa de la citotoxicidad [43].

### 3.1.2.1.1.1.-Disminución en la concentración de glutatión reducido (GSH).

La administración de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** en células HeLa (cáncer cérvico-uterino) en un intervalo de concentraciones de 10 a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  provocó citotoxicidad disminuyendo la cantidad de células vivas hasta un 30%. Por otro lado, cuando la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** era previamente reducida con ácido ascórbico solamente 15% de las células sobrevivieron. La presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) provocó una disminución en la citotoxicidad, funcionando como un atrapador de radicales  $\text{OH}\cdot$ . Además se midió la concentración de glutatión reducido encontrando una disminución del 87% después del tratamiento con 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [38].

En otro estudio se determinó si la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** alteraba los niveles de glutatión intracelular (GSH) en células H157 y células A549 (ambas líneas celulares pertenecen a cáncer de pulmón). Se encontró que la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** utiliza al glutatión reducido como fuente de electrones para catalizar la reacción de Fenton. En ambas líneas celulares, se evidenció que el GSH juega papel importante como mecanismo de desintoxicación ya que al inhibir la síntesis de esta biomoléculas se observa una mayor citotoxicidad por parte de la **Casiopeína<sup>®</sup> IIgly**. Es importante mencionar que al agregar al medio glutatión reductasa los niveles de glutatión reducido no se regeneraron

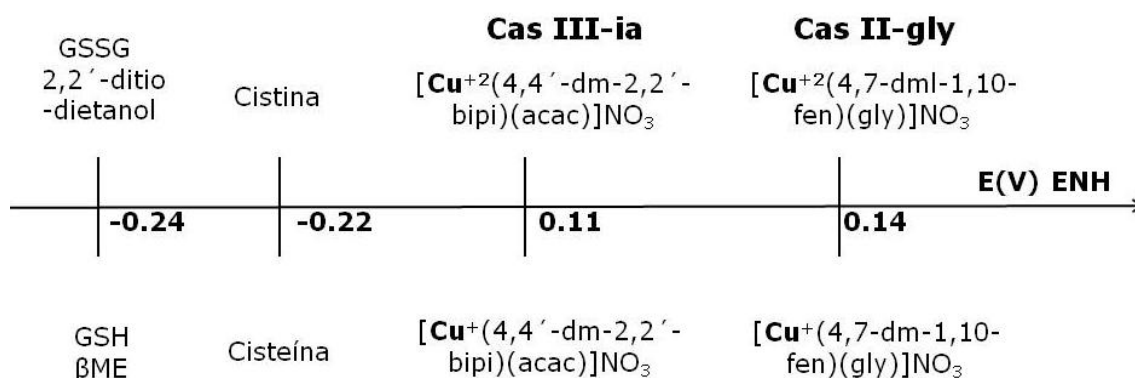
por completo, lo cual sugiere una interacción covalente entre un porcentaje de GSH con la **Casiopeína**<sup>®</sup>, provocando que el tiol no sea reconocido por la glutatión reductasa y a su vez regenerado [44]. La presencia de la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** produjo un exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mitocondria y la despolarización de la membrana mitocondrial. Además, provocó daños en el ADN mitocondrial desequilibrando la expresión de las apoproteínas de la cadena respiratoria, lo que también puede contribuir al aumento de la producción de ERO [44].

Se realizó la evaluación del efecto citotóxico inducido por la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** y *cis*-platino en células B16 (melanoma de ratón), en presencia y ausencia de ácido ascórbico. La **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** inhibe la proliferación celular con una  $CI_{50} = 54.5\mu\text{M}$ , este efecto se modifica cuando las células se incubaron con ácido ascórbico disminuyendo la  $CI_{50}$  a  $36.2\mu\text{M}$ . Lo anterior enfatiza la importancia de la generación de  $\text{Cu}^{(1)}$  para producir citotoxicidad en el sistema. Por otro lado, el *cis*-platino sólo presenta una  $CI_{50} = 59.33\mu\text{g/mL}$  en ambos casos [45]. Cuando las células se expusieron a una concentración de  $21.21\mu\text{g/mL}$  de **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly**, los niveles de GSH disminuyeron hasta un 54%, disminuyendo aún más cuando se administró la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** y ácido ascórbico encontrando hasta 33% de GSH. Es importante mencionar que en esta línea celular no se observó disminución de GSH con el tratamiento de *cis*-platino [46].

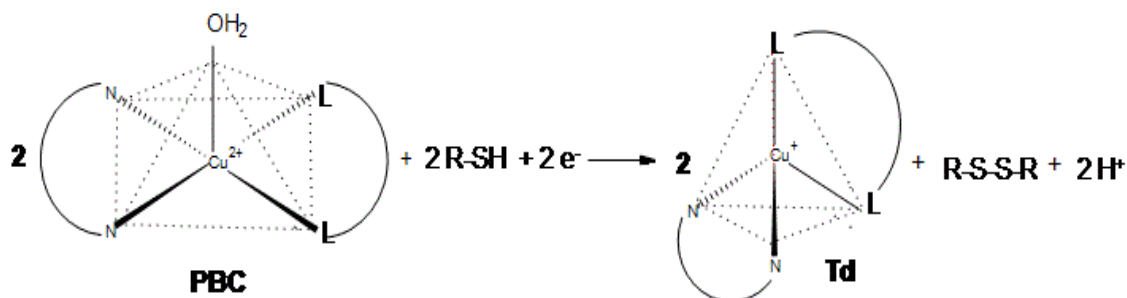
En la revisión anterior se mostró la importancia que tiene el glutatión reducido en la defensa celular, ya que al disminuir su concentración existe un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO).

## 4.- Justificación.

La diferencia de los valores de potencial redox entre las **Casiopeínas**<sup>®</sup> (II-gly y III-ia) [47] y los reductores cys[48], GSH [49] y βME [50] (**diagrama 1**) favorecerá la reacción de reducción del centro metálico de la **Casiopeína**<sup>®</sup> a través de la oxidación del grupo sulfhidrilo de los reductores formando en consecuencia un puente disulfuro (**figura 7**).



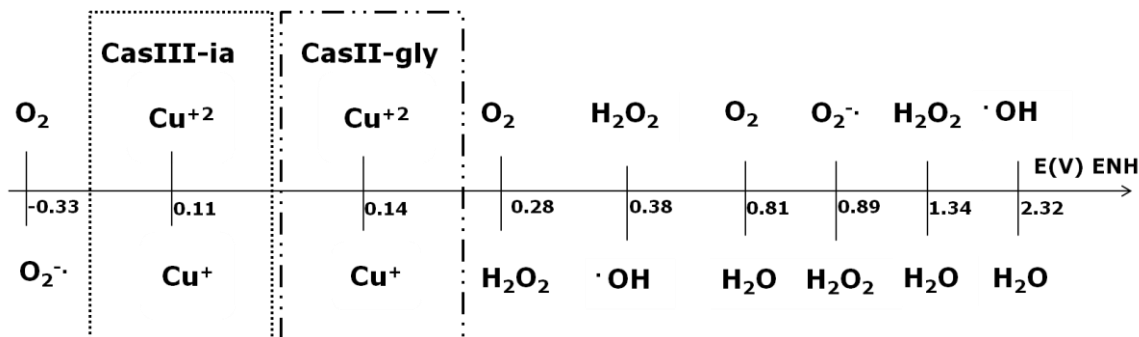
**Diagrama 1.-** Diagrama de potenciales oxido-reducción entre las **Casiopeínas**<sup>®</sup> y los tioles reductores[47-50].



**Figura 7.-** Reacción de reducción de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> por la oxidación de los grupos tiol, lo que produce un cambio de geometría, la formación de un puente disulfuro y la liberación de dos protones.

Una vez que la **Casiopeína**<sup>®</sup> se reduce podía participar de acuerdo a sus potenciales en reacciones redox con oxígeno o especies

reactivas de oxígeno [51] como se muestra en el **diagrama 2** para formar los radicales  $\cdot\text{OH}$ .



**Diagrama 2.-** Potenciales oxidación-reducción entre las **Casiopeínas<sup>®</sup>** y diferentes especies de oxígeno [51].

Por otro lado, se ha informado que compuestos de coordinación de tipo  $[\text{Cu}(1,10\text{-fen})_2]^+$  son capaces de reaccionar con oxígeno para generar el radical superóxido como intermediario en la obtención de peróxido de hidrógeno [52-54], aún cuando la reacción no es termodinámicamente favorable de acuerdo al diagrama de potenciales redox.

Por lo anterior es fundamental conocer la reactividad de las **Casiopeínas<sup>®</sup>** frente a especies reductoras como glutatión reducido y cisteína que son las encargadas de la protección celular, para entender cuál es su comportamiento y poder contribuir con datos químicos en el esclarecimiento del mecanismo de acción.

## 5.- Hipótesis.

La reactividad de la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** frente a los reductores endógenos glutatión reducido y cisteína presentes en la célula, así como con el reductor exógeno  $\beta$ -mercaptoetanol, será modulada por el potencial redox que posean estas moléculas.

## 6.- Objetivo general.

- Estudiar la reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** frente a reductores endógenos y exógenos.

### 6.1.-Objetivos particulares.

- Preparar e identificar las **Casiopeínas<sup>®</sup> II-gly** y **III-ia**.
- Estudiar mediante espectroscopia UV-vis la interacción de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con dos especies presentes en el organismo que actúan como reductores naturales glutatión reducido (GSH) y cisteína (cys).
- Estudiar mediante espectroscopia UV-vis la interacción de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con 2-mercaptoetanol ( $\beta$ ME), reductor químico que posee un valor de potencial de reducción igual al GSH y un carácter menos coordinante.
- Determinar mediante espectroscopia UV-vis con el método de las variaciones continuas, la estequiometría necesaria para obtener la especie **Casiopeína<sup>®</sup>** reducida.
- Aislar y caracterizar los posibles productos de las reacciones entre la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con los reductores GSH, cys y  $\beta$ ME.



## 7.- Metodología.

### 7.1.- Reactivos.

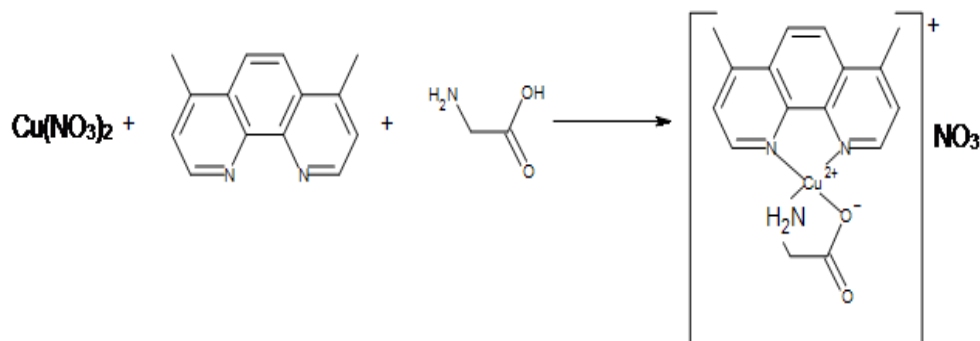
El nitrato de cobre hemipentahidratado  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (99.999%), acetilacetona, glutatión reducido GSH (99%), ácido 4-morfolin-propanosulfónico (MOPS, 99.5%) y bromuro de potasio (KBr, 99%) fueron comprados a Sigma-Aldrich Co., 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina y glicina (98.5%) fueron adquiridas en GFS Chemicals. La cisteína (99%) fue adquirida en Merck, el 2-mercaptoetanol (99.8%) y los disolventes empleados fueron adquiridos en J.T. Baker. Todos los reactivos se utilizaron sin purificación previa.

### 7.2.- Síntesis de **Casiopeínas**<sup>®</sup>.

Las síntesis de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> se realizaron con el proceso descrito en las patentes registradas [18-22]. Las **Casiopeínas**<sup>®</sup> preparadas son:

- Cas II-gly [ $\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})$ ] $\text{NO}_3$
- Cas III-ia [ $\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{acetilacetonato})$ ] $\text{NO}_3$

Las reacciones realizadas se presentan en la **figura 8 y 9**.



**Figura 8.-** Esquema de reacción para la preparación de **Casiopeína**<sup>®</sup> II-gly.

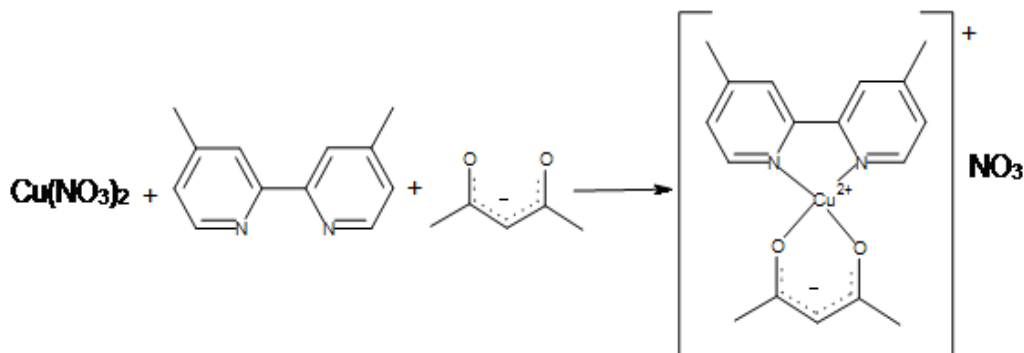


Figura 9.- Esquema de reacción para la preparación de **Casiopeína® III-ia**.

## 7.3.- Técnicas de caracterización de las **Casiopeínas®** preparadas.

### 7.3.1.- Espectroscopía Infrarroja.

Los espectros IR se adquirieron en un equipo Nicolet AVATAR 320 FT-IR en un intervalo de  $4000-400\text{cm}^{-1}$ , las muestras se prepararon en pastillas de bromuro de potasio KBr grado espectroscópico.

### 7.3.2.- Análisis Elemental.

Los análisis elementales se realizaron en la Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Se determinó el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre empleando un analizador elemental EAGER 200 (EAGER 200 chns/method).

### 7.3.3.- Conductividad.

Las conductividades se obtuvieron usando un Conductímetro Jenway Conductivity and pH meter 4330, empleando disoluciones 1mM en metanol. Todas las determinaciones se realizaron a  $25^{\circ}\text{C}$ . De acuerdo a la literatura el intervalo para electrolitos en metanol 1:1 corresponde al intervalo  $80-115\ \mu\text{S}$  y 1:2 a  $160-220\ \mu\text{S}$  [55].

### 7.3.4.- Momento magnético.

Las susceptibilidades magnéticas de las muestras sólidas se determinaron por medio del método de Gouy en una balanza magnética Shrewood- Scientific modelo MK. I con una constante C 1.013875 a una temperatura de 25° (293.15 K). El intervalo informado en la literatura para compuestos de cobre con un electrón desapareado es 1.70-2.20 MB [56].

### 7.3.5.- Espectroscopia UV-vis.

Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 845x UV-Visible system de arreglo de diodos en un intervalo de 200 a 1100 nm a temperatura ambiente empleando disoluciones de concentración final 2mM en agua y metanol. Los espectros electrónicos de las especies producto de la interacción de la **Casiopeína® IIgly** con GSH se realizaron en etilenglicol debido a su baja solubilidad en otros disolventes.

### 7.3.6.- Difracción de Rayos X de mono cristal.

Se disolvieron 0.1 g de **Casiopeína® III-ia** en agua, una vez disuelto se colocó en una cámara de acetona y se dejó por tres semanas a una temperatura de 4 °C. Los datos de difracción para los compuestos se colectaron a 130 K usando radiación monocromada de Mo K<sub>α</sub> ( $\lambda=0.71073 \text{ \AA}$ ) en un difractómetro Oxford Diffraction Gemini-Atlas. La colección de datos de rutina y la reducción de los mismos se hizo empleando el programa CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., Oxford Diffraction. Las estructuras se resolvieron por métodos directos usando SHELXS-97-2, el refinamiento se realizó empleando el método de mínimos cuadrados basados en F<sup>2</sup> en SHELXL-97-2[57]. Los átomos

diferentes a hidrógeno fueron refinados con parámetros térmicos anisotrópicos. Los átomos de hidrógeno se localizaron utilizando el mapa de diferencia de densidad y se refinaron con parámetros térmicos isotrópicos fijos.

### 7.4.- Estudio de la reactividad entre **Casiopeínas**<sup>®</sup> y Reductores.

Para el estudio de la reactividad de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> con los reductores cys, GSH y BME se realizó un ensayo espectrofotométrico Uv-vis. Se utilizaron disoluciones iniciales 6.25mM para las **Casiopeínas**<sup>®</sup> (II-gly y III-ia) y 50mM para los reductores (cys, GSH y BME) todo esto en amortiguador MOPS 150mM pH 7.4 (el espectro de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> en disolución amortiguada con MOPS no presenta modificaciones en comparación con disoluciones acuosas, los espectros se presentan en el **anexo I**). La mezcla de reacción tuvo un volumen total de 5ml, manteniendo constante la concentración de **Casiopeína**<sup>®</sup> en 2mM y adicionando alícuotas para alcanzar concentraciones finales de reductor 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6 y 4mM, es decir, hasta una proporción molar final 1:2, **Casiopeína**<sup>®</sup>: reductor, como se muestra en la **tabla 2**. Los espectros se obtuvieron en un tiempo de 30 segundos después de realizar la mezcla de los reactivos, los espectros se obtuvieron en una celda de cuarzo en un intervalo de 200 a 1100nm a 25°C en un sistema abierto, es decir, con el oxígeno atmosférico.

**Tabla 2.-** Concentración y proporción molar de reactivos para la mezcla de reacción.

No. de mezcla	[Casiopéina®]	[Reductor]	Proporción molar
	mM		
1	2	0	1 : 0.0
2	2	0.4	1 : 0.2
3	2	0.8	1 : 0.4
4	2	1.2	1 : 0.6
5	2	1.6	1 : 0.8
6	2	2	1 : 1.0
7	2	2.4	1 : 1.2
8	2	2.8	1 : 1.4
9	2	3.2	1 : 1.6
10	2	3.6	1 : 1.8
11	2	4	1 : 2.0

### 7.4.1.- Determinación de la estequiometría de la reacción.

Bajo el principio del método de variaciones continuas o método de Job [58], se realizó un estudio de espectroscopía Uv-vis para determinar la estequiometría de la reacción entre los reductores y las **Casiopéinas®**. Las concentraciones empleadas para el ensayo fueron de 3mM para ambos reactivos en amortiguador MOPS 200mM a pH 7.4.

Partiendo de las disoluciones concentradas, se toman las cantidades correspondientes de ambos reactivos en diferentes proporciones con la única condición de que la suma de los moles del reactivo A y B se mantenga constante en todas las mezclas de reacción, como se muestra en la **ecuación 3**.



**Ecuación 3.-** Reacción para la mezcla de reactivos siguiendo el método de las variaciones continuas.

La concentración de **Casiopeína®** como de reductor en las diferentes mezclas se muestra en la **tabla 3**.

**Tabla 3.-** Concentración, proporción molar y fracción molar de los reactivos en las mezclas de reacción.

No. de mezcla	[Casiopeína®]	[Reductor]	Proporción molar	Fracción molar.
			Casiopeína: reductor	$\chi$
	mM			
1	3	0	1:0	0
2	2.7	0.3	0.9 : 0.1	0.1
3	2.4	0.6	0.8 : 0.2	0.2
4	2.1	0.9	0.7 : 0.3	0.3
5	1.8	1.2	0.6 : 0.4	0.4
6	1.5	1.5	0.5 : 0.5	0.5
7	1.2	1.8	0.4 : 0.3	0.6
8	0.9	2.1	0.3 : 0.7	0.7
9	0.6	2.4	0.2 : 0.8	0.8
10	0.3	2.7	0.1 : 0.9	0.9
11	0	3	0 : 1	1

Las disoluciones se burbujearon con N<sub>2</sub> por 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto, las mezclas de reacción se realizaron bajo atmósfera inerte, obteniendo los espectros Uv-vis 30 segundos después de la mezcla de los reactivos.

Para calcular la relación estequiométrica se realizan gráficas A (absorbancia) vs  $\chi$  (fracción molar), en donde se obtiene la absorbancia de todas las mezclas a la longitud de onda en donde absorbe el compuesto, la fracción molar  $\chi$  se determina con la **ecuación 4**:

$$\chi = \frac{[\text{reductor}]}{[\text{Casiopeína}^{\text{®}}] + [\text{reductor}]}$$

**Ecuación 4.-** Determinación de la fracción molar.

Una vez construidas las gráficas, se extrapola al valor de  $\chi$  fracción molar en donde se observa un punto de inflexión, ya sea un máximo o un mínimo y se sustituye en la **ecuación 5** para obtener el coeficiente estequiométrico  $n$ .

$$n = \frac{\chi}{(1 - \chi)}$$

**Ecuación 5.-** Determinación del coeficiente estequiométrico.

### 7.5.- Caracterización de los productos obtenidos entre las **Casiopeínas**<sup>®</sup> y los reductores con coeficientes estequiométricos 1:1.

Con los datos obtenidos de la determinación del coeficiente estequiométrico se limitó la caracterización de los productos obtenidos a la relación estequiométrica 1:1 (**Casiopeína**<sup>®</sup>: reductor) para todas los casos en presencia de oxígeno. Se prepararon disoluciones patrón 3mM tanto de **Casiopeína**<sup>®</sup> como de reductor en amortiguador MOPS 200mM a pH 7.4.

Además se realizó una síntesis con relaciones estequiométricas 1:1:1 de Cu<sup>(II)</sup>: (N-N): R-SH en medio amortiguado en presencia de oxígeno y los resultados de la caracterización se compararon con la caracterización de los productos aislados de la interacción **Casiopeína**<sup>®</sup>: reductor, 1:1. Sólo se realizaron las síntesis de aquellos sistemas que mostraron la formación de nuevos productos durante la interacción de la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** y **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** con reductores. Las reacciones preparadas y sus claves se muestran en la **tabla 4**. Los compuestos de interacción preparados son:

**Tabla 4** .- Mezclas de reacción estudiadas con una estequiometría 1:1 **Casiopeína<sup>®</sup>**: reductor

Clave de los productos aislados	Reacción.	Compuesto Aislado
<b>AS43-1A</b>	CasII gly + cys	[Cu(cistinato)]n
<b>AS43-1B</b>		[Cu(4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>AS47-1A</b>	CasIII-ia + cys	[Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (4,4'-dm-2,2'-bipi) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>
<b>AS47-1C</b>		[Cu(cistinato)]n
<b>AS34</b>	CasII gly + GSH	[Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> (GSSG)]
<b>AS45</b>	CasIII-ia + GSH	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)H <sub>2</sub> O]NO <sub>3</sub>
<b>AS44</b>	CasII-gly + βME	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)H <sub>2</sub> O]NO <sub>3</sub>
<b>AS48</b>	CasIII-ia + βME	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)H <sub>2</sub> O]NO <sub>3</sub>

Los posibles productos de reacción se muestran en la **tabla 5**:

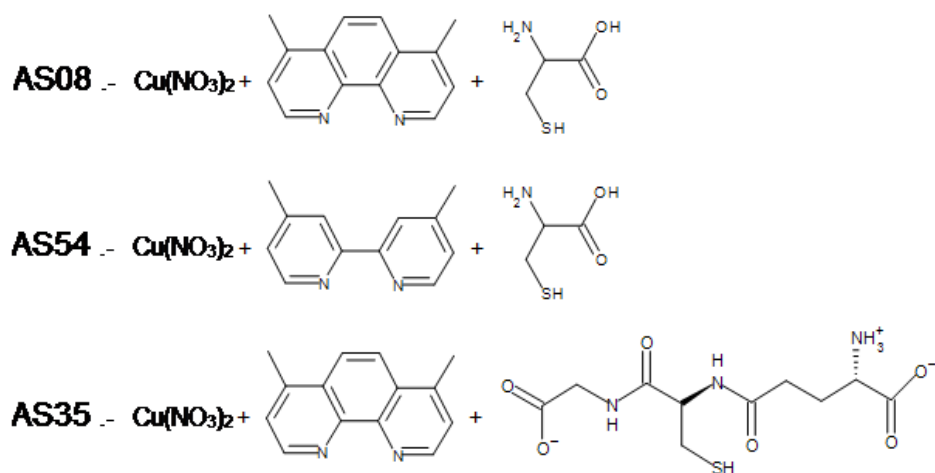
**Tabla 5.-** Síntesis de Cu<sup>(II)</sup> : (N-N) : R-SH 1:1:1 para identificación de productos.

Clave de los productos aislados	Reacción.	Compuesto Aislado.
<b>AS08-A</b>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4,7-dm-1,10-fen +cys	[Cu(cistinato)]n
<b>AS08-B</b>		[Cu(4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>AS54</b>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4,4'-dm-2,2'-bipi +cys	[Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (4,4'-dm-2,2'-bipi) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>
<b>AS35</b>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4,7-dm-1,10-fen +GSH	[Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> (GSSG)]
<b>AS49</b>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4,7-dm-1,10-fen +GSSG	[Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> (GSSG)]

El esquema general de las reacciones de interacción llevadas a cabo entre las **Casiopeínas<sup>®</sup>** y reductores se muestran en la **figura 10 a** y **10 b**, además de las síntesis de los posibles productos finales se muestran en la **figura 11**.







**Figura 11.**-Esquemas generales de síntesis 1:1:1 ( $\text{Cu}^{(II)}$ : (N.N) : R-SH reductor) para la identificación de los probables productos que se pueden obtener de la interacción **Casiopeína<sup>®</sup>**: reductor.

## 8.- Resultados y Discusión.

### 8.1.- Caracterización de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **III-ia**.

El espectro infrarrojo de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** en la región de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  muestra las frecuencias de vibración  $\nu$  (C=C) y  $\nu$  (C=N) asociadas a la fenantrolina, además de las frecuencias  $\nu\text{ NH}_2$  y  $\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$  asociadas al glicinato coordinado; en el caso de la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** se observaron las frecuencias de las vibraciones  $\nu$ (C=C) y  $\nu$ (C=N) asociadas a la biperidina, y la frecuencia asociada a la vibración  $\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$  del acetilacetato, se encontró para ambas **Casiopeínas<sup>®</sup>** la banda correspondiente al contra ión nitrato  $\text{NO}_3^-$ .

Las bandas características para cada una de las **Casiopeínas<sup>®</sup>** fueron asignadas de acuerdo a lo reportado por el grupo de trabajo [59, 60] y se muestran en la **tabla 6**.

<b>Tabla 6.-</b> Asignación de las bandas en los Espectros Infrarrojo ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ ) obtenidos en KBr para las <b>Casiopeínas<sup>®</sup> II-gly</b> y <b>III-ia</b> .										
Clave		glicinato coordinado				fenantrolina coordinada				$\text{NO}_3^-$ iónico
<b>Cas II-gly</b>	OH	$\nu\text{NH}_2$	$\nu\text{NH}_2$	$\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$	$\delta\text{NH}_2$	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C-H)	
	3414	3446	3255	1602	637	1525	1429	871	727	1384
<b>Cas III-ia</b>		acac coordinado				biperidina coordinada				
		$\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$				$\nu$ C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C-H)	
	3463	1587				1616	1525	1490	730	1384

El análisis elemental nos permite sugerir la fórmula mínima  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con peso molecular de  $443.89\text{g/mol}$  para la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**, mientras que la fórmula mínima propuesta para la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** es  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$  con un peso molecular de  $427.91\text{ g/mol}$ . Los valores de conductividad (**tabla 7**) corresponden a electrolitos tipo 1:1 confirmando la presencia de la banda de  $\text{NO}_3^-$  iónico observada en el infrarrojo. Se enlistan también los valores de momento

magnético efectivo que corresponden un electrón desapareado, es decir, un sistema Cu<sup>(II)</sup>.

**Tabla 7.-** Caracterización de las **Casiopeínas® II-gly** y **III-ia** preparadas.

Compuesto	A.E. Exp (Cal) % C; % N; % H	Fórmula	PM g/mol	$\Lambda^a$ (Sm <sup>2</sup> /mol)	$\mu_{\text{eff}}^b$ (MB)	$\lambda_{\text{max}}^c$ (nm)	$\epsilon^c$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
<b>CasII gly</b>	42.890; (43.29) 12.580; (12.62) 4.690; (4.54)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> Cu ·2H <sub>2</sub> O	443.89	93.8	1.76	612	53.68 $\lambda_{612\text{nm}}$
<b>CasIII-ia</b>	48.030; (47.71) 10.190; (9.81) 5.10; (5.18)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> Cu ·H <sub>2</sub> O	427.91	117.0	1.80	600	57.76 $\lambda_{600\text{nm}}$

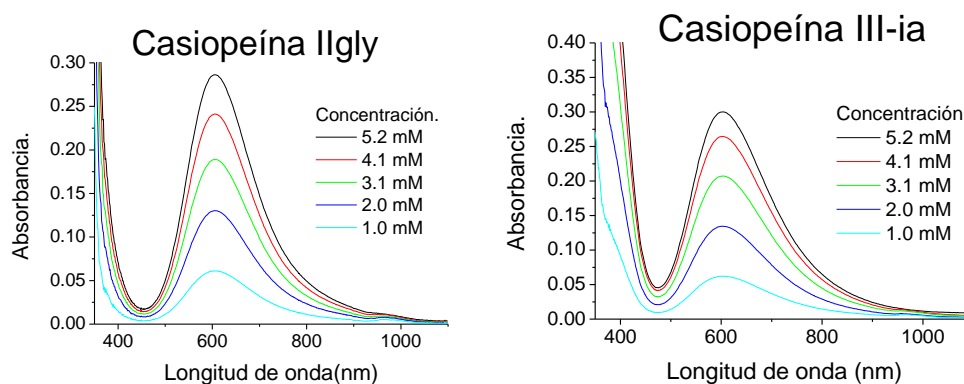
a.-valor obtenido de una disolución en metanol de concentración 1mM.

b.-valor obtenido en sólido.

c.- valor obtenido en disolución acuosa a partir de una concentración 5mM.

## 8.1.2.- Espectroscopia UV-vis de la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia**.

Es importante describir los espectros electrónicos de las **Casiopeínas®** ya que el estudio de su reactividad con las especies reductoras se relacionará con los cambios que se presenten en la forma, la longitud de onda y las absorbancias de los espectros electrónicos. Los espectros electrónicos obtenidos (**gráfica 1**) para una disolución acuosa 5mM de las **Casiopeína®** presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 612nm ( $\epsilon = 53.68 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) para la **Casiopeína® II-gly** y 600nm ( $\epsilon = 57.76 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) para la **Casiopeína® III-ia**, debido a que el espectro de las **Casiopeínas®** obtenido en disolución amortiguada con MOPS no presenta cambios en el espectro, estos valores serán utilizados en el análisis de datos.

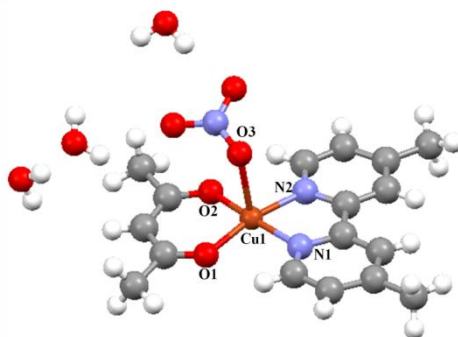


**Gráfica 1.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia** obtenidos de disoluciones acuosas con una concentración inicial 5mM, la cual fue diluida hasta 1mM para obtener el coeficiente de absortividad molar.

### 8.1.3.- Difracción de Rayos X de mono cristal de la **Casiopeína® III-ia**.

Se obtuvo un cristal de color índigo adecuado para el estudio de difracción de rayos X del compuesto **Casiopeína® III-ia**. Las dimensiones del cristal seleccionado son  $0.30 \times 0.15 \times 0.06 \text{ mm}^3$ . La **Casiopeína® III-ia** cristaliza en un sistema triclinico en donde el ion  $\text{Cu}^{(II)}$  se encuentra en una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada. La base de la pirámide está constituida por los átomos donadores  $\text{N}_1$  y  $\text{N}_2$  de la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina y los átomos  $\text{O}_1$  y  $\text{O}_2$  del acetilacetato. La posición apical está ocupada por un átomo de oxígeno de una molécula del contra ion  $\text{NO}_3^-$ . El ion  $\text{Cu}^{(II)}$  se encuentra desplazado fuera del plano que conforman los átomos donadores  $\text{N}_1/\text{N}_2/\text{O}_1/\text{O}_2$  por una distancia de  $0.158 \text{ \AA}$ . Las distancias de enlace en la base de la pirámide son ligeramente más largas que las observadas en el cristal reportado con una geometría cuadrada plana con  $\text{ClO}_4^-$  como contra ión [31]. Para la pirámide de base cuadrada las distancias de enlace son  $\text{Cu-N}_1 = 1.994(3)$ ,  $\text{Cu-N}_2 = 1.991(3)$ ,  $\text{Cu-O}_1 =$

1.911(2) y Cu-O<sub>2</sub> = 1.912(2) Å, mientras que para la geometría cuadrada estas distancias son 1.973(4), 1.983(4), 1.896(4) y 1.885(4) Å, respectivamente. El incremento en las distancias de enlace en la geometría pirámide de base cuadrada puede explicarse por la presencia del ion NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que ocupa la posición apical, pues al incrementar la densidad electrónica sobre el ion Cu<sup>(II)</sup> se fuerza al sistema a llegar a un nuevo equilibrio que se alcanza al aumentar la distancia de enlace con los átomos donadores que conforman la base de la pirámide. La **figura 12** muestra la estructura de la **Casiopeína® III-ia** con las tres aguas de solvatación con las que cristalizó. Las distancias y ángulos de enlace seleccionados se enlistan en la **tabla 8**.



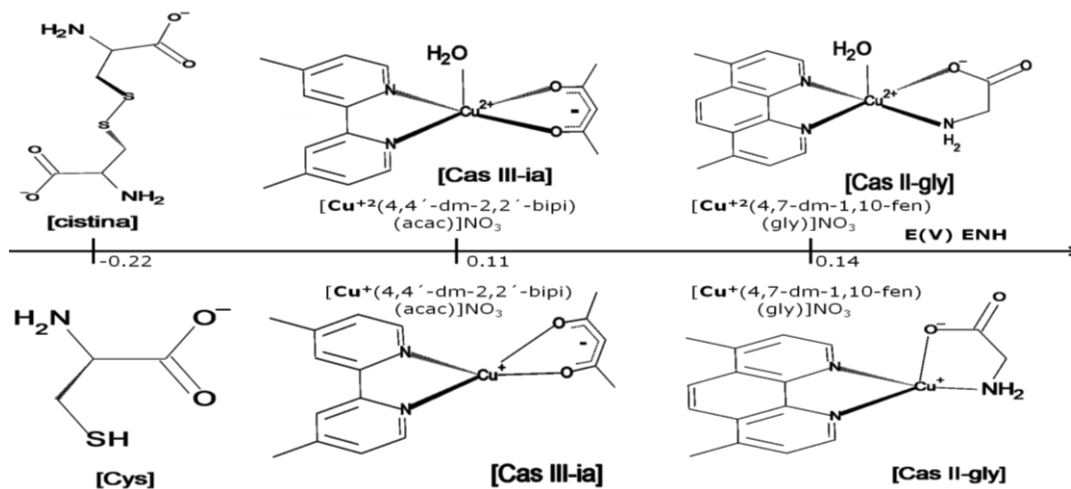
**Figura 12.-** Estructura molecular del compuesto [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)(nitrato)] (H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>.

<b>Tabla 8.-</b> Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados del compuesto [Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)(nitrato)] (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> .			
<b>Distancias (Å)</b>			
Cu-N1	1.994(3)	Cu-O1	1.911(2)
Cu-N2	1.991(3)	Cu-O2	1.912(2)
		Cu-O3	2.364(2)
<b>Ángulos (°)</b>			
N1-Cu-N2	81.37(11)	N2-Cu-O2	91.81(10)
N1-Cu-O1	91.09(11)	N2-Cu-O3	93.88(10)
N1-Cu-O2	171.61(10)	O1-Cu-O2	94.88(9)
N1-Cu-O3	96.84(10)	O1-Cu-O3	95.73(10)
N2-Cu-O1	168.43(11)	O2-Cu-O3	88.43(9)

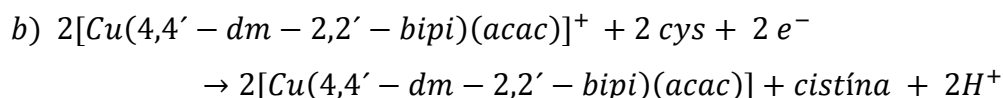
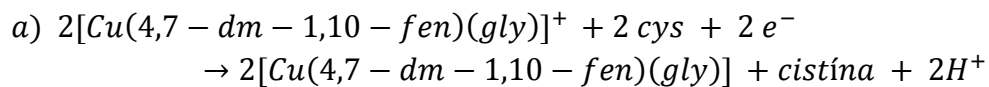
## 8.2.-Reactividad de la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia** con cisteína.

### 8.2.1.-Observaciones generales para la reactividad con cisteína (cys).

Con base en los potenciales de oxidación-reducción mostrados en el **diagrama 3** respecto al electrodo normal de hidrógeno para **Casiopeína® II-gly** ( $E^{\circ}=147\text{mV}$ ), **Casiopeína® III-ia** ( $E^{\circ}=119\text{mV}$ ) [47] y cisteína ( $E^{\circ}=-220\text{mV}$ ) [61], se propone que la reacción termodinámicamente favorecida será la reducción del centro metálico, la oxidación de cisteína a cistina y la liberación de dos protones como se muestra en las **ecuaciones 6a** y **6b**.



**Diagrama 3.**-Potenciales redox de la **Casiopeína® II-gly**, **Casiopeína® III-ia** y cisteína.



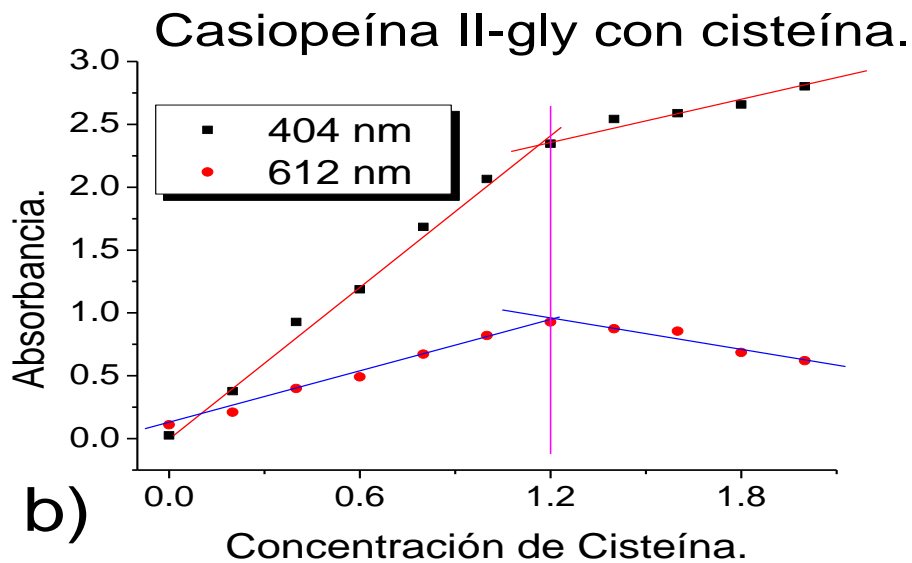
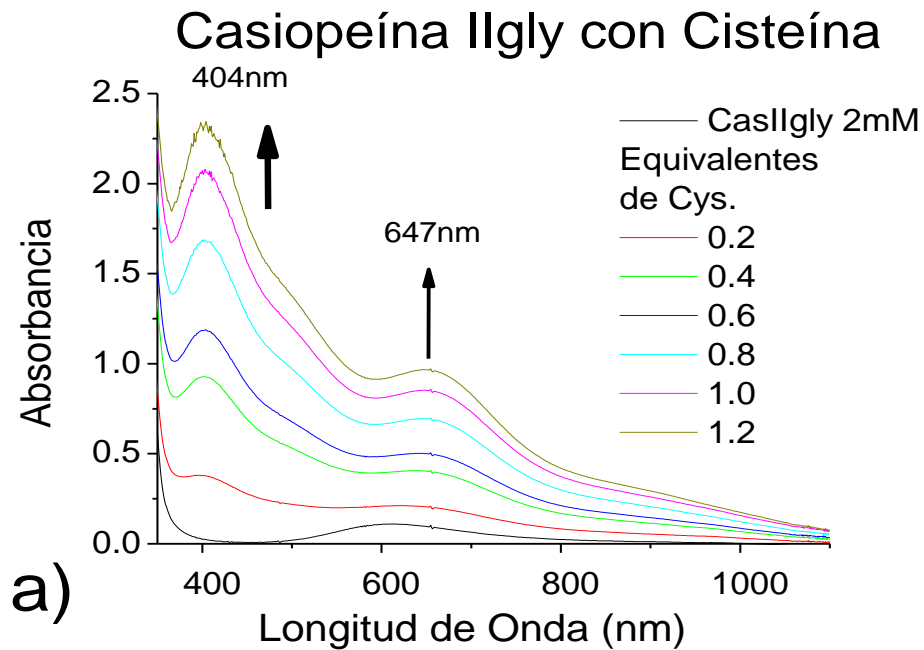
**Ecuación 6.**-Reacciones propuestas entre la **Casiopeína® II-gly**, **Casiopeína® III-ia** y cisteína.

La adición de cisteína en disoluciones independientes de **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** provocó un cambio inmediato en la coloración, de azul a diferentes tonos de verde en función de la concentración de cisteína, obteniendo después de la equivalencia una disolución café. La tonalidad café permanece por algunas semanas sin importar que el sistema sea abierto o cerrado.

### 8.2.2.-Reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** con cisteína en un sistema abierto (presencia de O<sub>2</sub> atmosférico).

El espectro Uv-vis de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** (2mM) muestra un solo máximo de absorción en la región visible en 612nm con una absorbancia de 0.1090 u.a. Al adicionar alícuotas de cisteína hasta 1.2 equivalentes, la absorbancia incrementa de forma proporcional hasta alcanzar un valor de 0.9666 u.a. El incremento en la absorbancia fue acompañado de un desplazamiento en la longitud de onda del máximo de absorción que ahora se presenta en un valor de 647nm, además se forma una señal definida en 404nm que también incrementa su absorbancia en función de la cisteína agregada (**gráfica 2a**). En la **gráfica 2b** se puede observar que la absorbancia de los máximos en 612nm (señal que es característica del sistema **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**) y en 404 nm (señal que representa un cambio en el sistema **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**) incrementa de manera proporcional a la concentración de cisteína agregada, presentando este comportamiento hasta 1.2 equivalentes. Cuando se agregan más de 1.2 y hasta 2 equivalentes el comportamiento de ambos máximos es distinto, el máximo en 612 nm asociado al Cu<sup>(II)</sup> disminuye en absorbancia, mientras que el máximo en 404 nm sigue incrementando su absorbancia hasta saturar la señal, ambos cambios se presentan como función de la cisteína agregada.

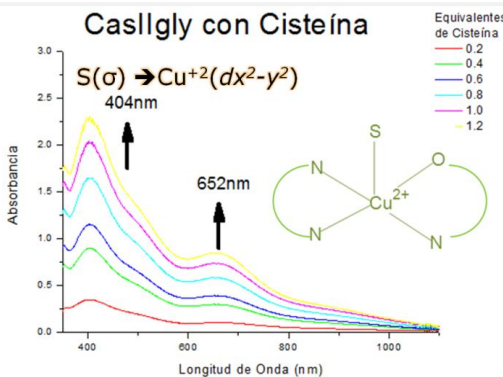




**Gráfica 2.- a)** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina® II-gly** (2mM) con 0 hasta 1.2 equivalentes de cys (0 a 2.4mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; **b)** gráfica de absorbancia vs. Concentración de cisteína agregada (0 a 2.0 equivalentes de cys) en 612nm y 404nm obtenida a partir de la gráfica a en un sistema abierto.

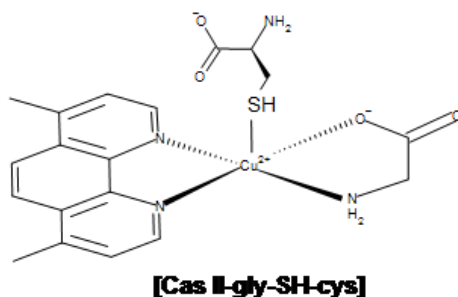
De acuerdo a los cambios observados y para identificar el máximo de absorción de la nueva especie de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  formada, a los espectros electrónicos obtenidos de la mezcla de reacción se le restó el espectro de la **Casiopeína**<sup>®</sup> y de la cisteína a las concentraciones correspondientes, considerando que la primera reacción que se lleva a cabo entre la cisteína y la **Casiopeína**<sup>®</sup> es la coordinación con una estequiometría 1:1. Como resultado del procesamiento de datos se observa que el máximo de absorción se encuentra en 652 nm (el comportamiento de la absorbancia seguido a esta longitud de onda es el mismo que el descrito para el máximo de 612nm) y la banda en 404 nm se conserva (**gráfica 3**).

Los átomos donadores presentes en la esfera de coordinación del  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  en la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** son nitrógeno y oxígeno. Éste entorno provoca un máximo de absorción en 612nm. Al hacer las mezclas de reacción el máximo de absorción de la nueva especie aparece en 652 nm. De acuerdo al modelo de campo cristalino y a la serie espectroquímica se sabe que el oxígeno y el nitrógeno son átomos clasificados de campo intermedio y fuerte, respectivamente. La aparición del máximo de absorción a mayores longitudes de onda puede ser explicado con la incorporación de un átomo donador de campo débil en la esfera de coordinación del metal, lo cual implica una disminución en el valor del  $10Dq$ , en este caso el azufre de la cisteína que sustituye a la molécula de agua de la posición apical. Esta propuesta se apoya en el hecho de que aparece un máximo de absorción en 404nm, que es asignada a una transferencia de carga  $S(\sigma) \rightarrow \text{Cu}^{(\text{II})}_{(dx^2-y^2)}$ , que según la literatura aparece en un valor de 403nm en metaloproteínas de cobre tipo I [62](**gráfica 3**).



**Gráfica 3.-** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de especies, desde 0 hasta 1.2 equivalentes de cisteína en donde se asignan las bandas que permiten proponer una nueva especie.

El análisis anterior permite proponer la especie  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$  (**figura 13**) formada cuando se agregan hasta 1.2 equivalentes de cisteína.

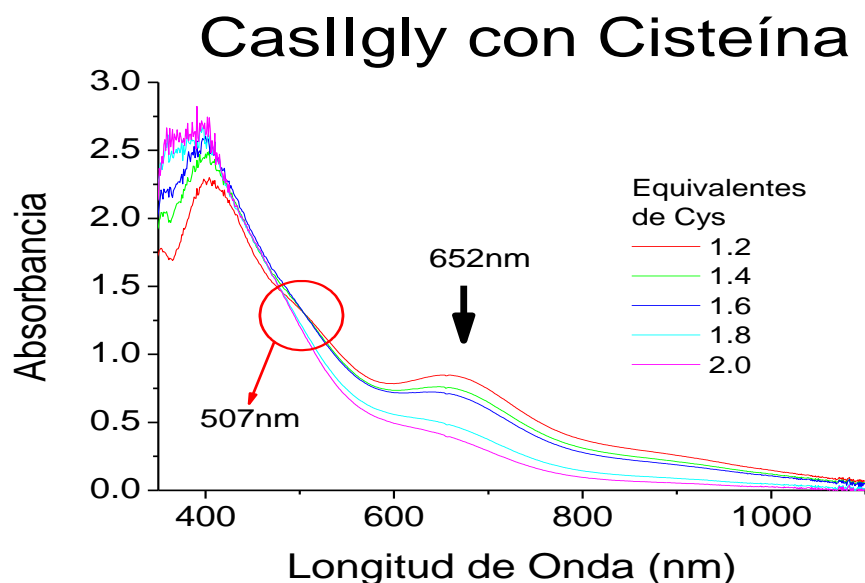


**Figura 13.-** Estructura de la Especie propuesta formada en disolución  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$ , de acuerdo con los cambios obtenidos en las señales de la gráfica 3.

A partir de la **gráfica 3** es posible hacer una determinación aproximada del coeficiente de absorptividad molar de ambos máximos de absorción asociados a la especie  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$  cuyos valores son  $\epsilon_{652} = 396.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{404} = 933.75 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Debido a que el coeficiente de absorptividad molar de esta nueva especie es casi un orden de magnitud mayor que el coeficiente de absorptividad molar de la **Casiopéina® II-gly** ( $\epsilon_{612} = 53.68 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), no se puede apreciar el punto isobéptico esperado para el equilibrio de las especies de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$ .

La coloración verde de la mezcla se debe a la combinación del color amarillo (transferencia de carga) y el color azul de la **Casiopéina**<sup>®</sup> que aun no ha reaccionado.

Cuando se agregaron hasta 2.0 equivalentes de cisteína (**gráfica 4**), la intensidad de la absorbancia disminuye tanto en 404nm como en 652nm, en función de la concentración de cisteína agregada. Esta disminución en la absorbancia se asocia a la reducción de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup> y por ende, la pérdida de la interacción S ( $\sigma$ ) $\rightarrow$ Cu<sup>(II)</sup> ( $dx^2-y^2$ ). Aunque el azufre que es una base blanda es más afín al Cu<sup>(I)</sup> (ácido blando), esta interacción no es posible debido a que los átomos de azufre están comprometidos en la formación del puente disulfuro. Además es posible observar la formación de un punto isobéptico en 507nm, lo que permite sugerir la presencia de al menos dos especies en disolución, muy probablemente las especies de Cu<sup>(II)</sup> y Cu<sup>(I)</sup>.

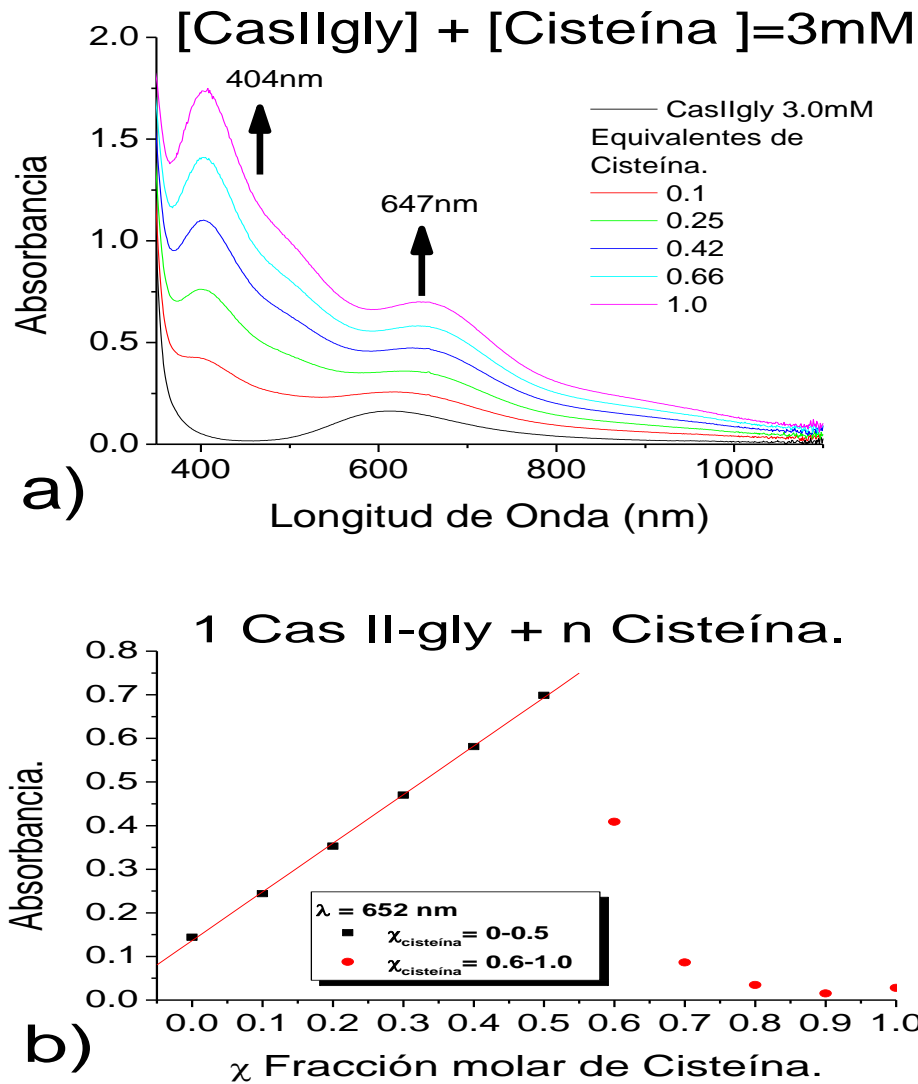


**Gráfica 4.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina**<sup>®</sup> II-gly (2mM) con 1.2 hasta 2.0 equivalentes de cys (2.4 a 4.0mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.

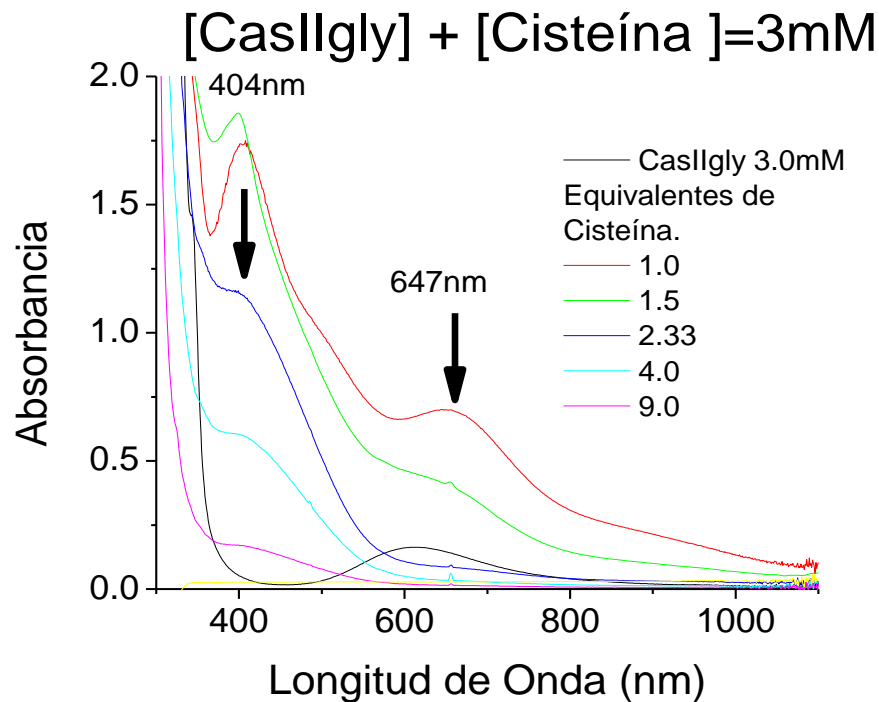
### 8.2.2.1.-Reactividad de la **Casiopeína® II-gly** con cisteína en un sistema cerrado (atmósfera de N<sub>2</sub>).

En el sistema en ausencia de O<sub>2</sub> el comportamiento de las absorbancias de los máximos de absorción en 404nm y 612nm en función de la concentración de la cisteína agregada es prácticamente el mismo, la diferencia radica en el número de equivalentes consumidos. En el sistema en presencia de oxígeno se consumen 1.2 equivalentes de reductor para completar la formación de la nueva especie y una cantidad mayor de cisteína reduce al producto recién formado, por otro lado, en el sistema sin oxígeno sólo es necesario 1.0 equivalente (**gráfica 5a**), para formar en su totalidad [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen) (gly) (SH-cys)]<sup>+</sup> y el exceso de equivalentes se emplea en la reacción de reducción (**gráfica 5b**).

Cuando se agregaron más de 1.0 (**gráfica 6**) equivalentes de cisteína, se observó la disminución de la banda en 652nm por la transformación de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup>, además en la región de 404nm, se observa como la banda comienza a perder intensidad, por la pérdida de la transferencia de carga  $S(\sigma) \rightarrow Cu^{(II)}_{(dx^2-y^2)}$ .



**Gráfica 5.-** a) Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina® II-gly** a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 0.1$  a 1.0 (2.7 hasta 1.5 mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado; b) gráfica de absorbancia vs fracción molar de cisteína en 652nm obtenida a partir de la grafica a.



**Gráfica 6** .- Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (1.5 a 0.3mM) con una diferente fracción molar  $c = 1.0$  a  $9.0$  (1.5 hasta 3mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

Los resultados obtenidos hasta este momento en ausencia de oxígeno indican que la primer reacción que se lleva a cabo es la coordinación del azufre a la **Casiopeína®** con una estequiometria 1:1. Con esta propuesta se pueden obtener los valores reales de los coeficientes de absortividad  $\epsilon_{652} = 327.94 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{404} = 1076.86 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , estos valores son similares a los obtenidos en el sistema abierto molar que ya se habían aproximado en el sistema abierto cuyos valores fueron  $\epsilon_{652} = 396.4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{404} = 937.75 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

De manera cualitativa se ha observado que la **Casiopeína® II-gly**, presentan una reacción de adición de cisteína, cuando se tienen proporciones 1:1.2 en un sistema abierto y 1:1 en un sistema cerrado,

para transformar toda la **Casiopeína**<sup>®</sup> presente en disolución a la especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$ . El modo de coordinación en la especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$  fue propuesto de acuerdo a los cambios observados en el estudio en disolución. La sustitución del ligante secundario implicaría una adición en la posición apical por cualquiera de los átomos donadores de la cisteína, seguida de un cambio de la geometría del metal de pirámide de base cuadrada a bipirámide trigonal facilitando la ruptura de los enlaces con el ligante secundario y la formación de los enlaces con el nuevo ligante. De ser posible una sustitución del glicinato por cisteínato a través de los átomos donadores N-O, se observaría en el espectro un incremento en la absorbancia y un ligero desplazamiento en la longitud de onda en la región visible a mayor o menor longitud de onda en función del sustituyente del aminoácido pero con la ausencia de la banda de transferencia de carga alrededor de los 400 nm.

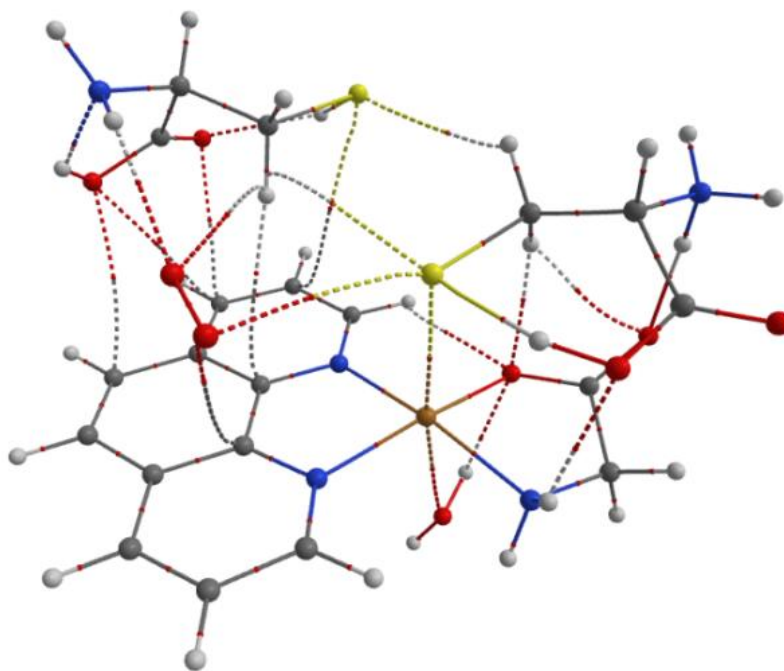
Suponiendo que la sustitución del glicinato por el cisteínato sea empleando los tres átomos donadores de la cisteína (N, O y S), los ángulos y las distancias de enlace no permitirían este tipo de coordinación pues estarían muy tensionados, haciendo que la molécula sea inestable.

Estudios teóricos realizados por el Dr. Fernando Cortes Guzmán del Instituto de Química apoyan la formación de la especie propuesta con el estudio espectroscópico en disolución, además mostraron que la presencia de oxígeno en las disoluciones de **Casiopeína**<sup>®</sup> es importante ya que acelera la reacción de reducción del metal.

Cuando una molécula de cisteína se pone en contacto con una molécula de **Casiopeína**<sup>®</sup> hay una reacción de adición de la cisteína, en donde el átomo de azufre interacciona directamente con el átomo de



Cu<sup>(II)</sup> ocupando la posición apical del compuesto de coordinación desplazando a la molécula de H<sub>2</sub>O (**figura 14**). La especie intermediaria se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno donde participan los grupos amino y carboxilo de ambos aminoácidos.

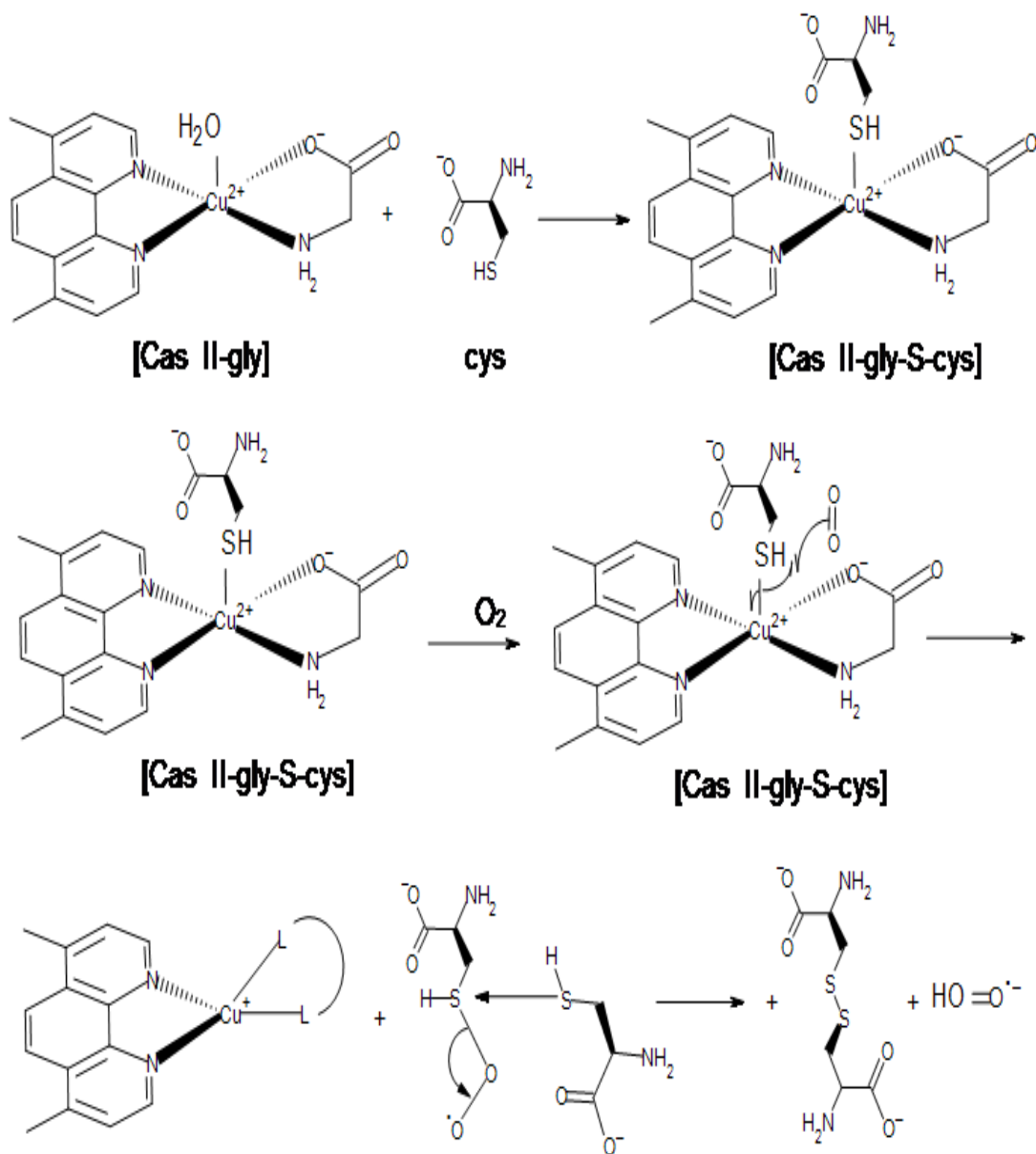


**Figura 14.-** Intermediario reactivo en donde se lleva a cabo la reducción de la **Casiopéina® II-gly**, obtenido mediante cálculos teóricos.

El ataque electrofílico del oxígeno hacia el átomo de azufre coordinado promueve la ruptura del enlace Cu-S de forma homolítica provocando la reducción del centro metálico y la formación del enlace S-O. Una segunda molécula de cisteína participa en un ataque electrofílico hacia el átomo de azufre unido al oxígeno generando una molécula de cistina y el radical superóxido.

Estos estudios teóricos ayudan a entender el por qué fue necesario 0.2 equivalentes más de cisteína cuando existía oxígeno en la disolución para generar la máxima cantidad de especie [Cu<sup>(II)</sup>] (4,7-dm-1,10-

fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup>. El mecanismo de reducción en presencia de oxígeno se muestra en la **figura 15**.



**Figura 15.-** Mecanismo propuesto de la formación, reducción y reducción de la especie [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup> en presencia de O<sub>2</sub>.

La consecuencia inmediata de la reducción del centro metálico es el cambio en la geometría, la especie [Cu<sup>(II)</sup>(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]<sup>+</sup> con una geometría pirámide de base cuadrada cambiará a una

geometría tetraédrica, este cambio provoca un re-arreglo de los ligantes, en donde el  $\text{Cu}^{(I)}$  generado en disolución preferirá coordinarse con los átomos de azufre que se encuentran en disolución, sin embargo, los átomos de azufre están comprometidos en un puente disulfuro evitando que se puedan unir con la especie  $[\text{Cu}^{(I)}-(4,7\text{-dm-1,10-fen})]^+$ , el siguiente átomo con el que el  $\text{Cu}^{(I)}$  tiene preferencia a coordinarse es el nitrógeno, conservando en la esfera de coordinación la fenantrolina. Además de los nitrógenos de la diimina, éstos átomos donadores pueden provenir de la cistina o del glicinato, para formar las especies  $[\text{Cu}^{(I)}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{N-glicinato})(\text{N-cistinato})]$  o  $[\text{Cu}^{(I)}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{N-glicinato})_2]$  ó  $[\text{Cu}^{(I)}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{N-cistinato})_2]$ . De acuerdo a la teoría de ácidos y bases duros y blandos [56] las especies que involucran los aminoácidos coordinados por el átomo de oxígeno no estarían favorecidas. Las especies propuestas se muestran en la **figura 16**.

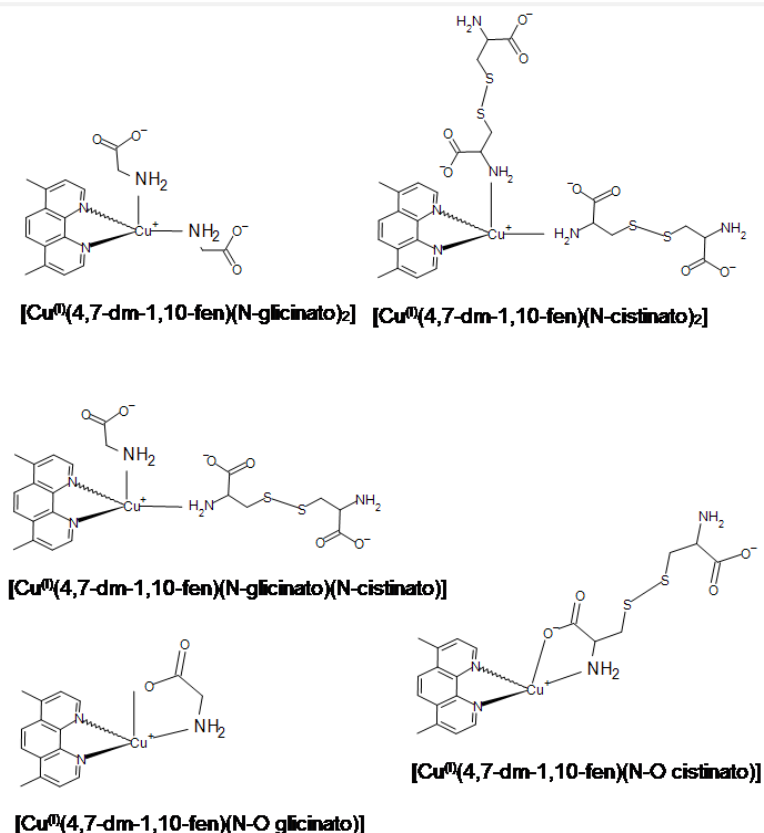


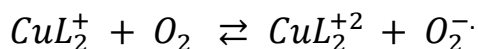
Figura 16.- Especies de Cu<sup>(I)</sup> propuestas.

Una vez que las especies de Cu<sup>(I)</sup> propuestas son expuestas a O<sub>2</sub>, estas serán oxidadas, en esta reacción de oxidación nuevamente habrá un cambio en la geometría provocando que se formen nuevas especies las cuales serán identificadas más adelante.

De acuerdo a lo reportado en la literatura la generación del radical superóxido puede provenir de la reacción entre compuestos de Cu<sup>(I)</sup> reducido y oxígeno molecular aún cuando la reacción no es termodinámicamente favorable de acuerdo a los valores de potencial redox de las especies involucradas [54, 63, 64]. Se ha informado que el mecanismo de reacción de (1,10-fenantrolina)<sub>2</sub>-Cu<sup>(I)</sup> con O<sub>2</sub> en medio acuoso tiene como intermediario la formación del radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con una constante de velocidad  $k = 5.0 \pm 0.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  siendo un mecanismo

de primer orden dependiente de la concentración de  $[\text{Cu}^{(I)}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$  y de  $\text{O}_2$  [52].

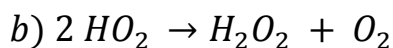
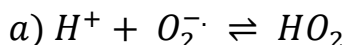
En un estudio empleando diferentes fenantrolinas y bipyridinas sustituidas, se encontró una fuerte influencia de los grupos electro atractores y electrodonadores en las velocidades de auto oxidación de complejos de  $\text{Cu}^{(I)}$ , las gráficas de  $\text{pK}_a$  vs potencial y  $\log$  de  $k$  donde  $k$  hace referencia a la reacción de la **ecuación 7**:



**Ecuación 7.-** Generación de  $\text{O}_2^-$ . A partir de la reacción de oxidación del complejo  $\text{CuL}_2^+$  en presencia de  $\text{O}_2$ .

La pendiente de ambas gráficas es 1.2 lo que significa que una disminución de 100 veces el valor de  $\text{pK}_a$  para el ligante libre resulta en un incremento en 100 veces la constante de velocidad de la transformación de segundo orden. En este mismo trabajo se hizo evidente que un impedimento estérico que evita adoptar una geometría cuadrada para la especie de  $\text{Cu}^{(I)}$  disminuye sustancialmente el valor de  $k$  de transformación de  $\text{Cu}^{(II)}$  a  $\text{Cu}^{(I)}$  [65].

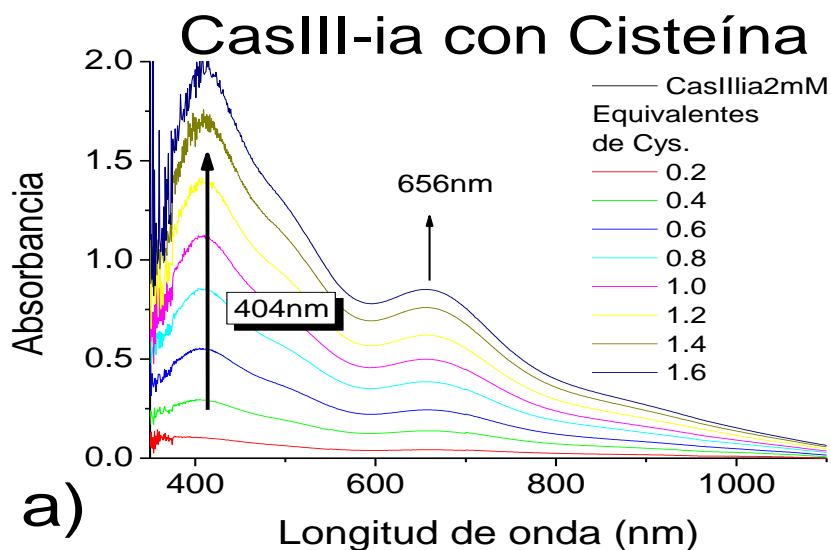
Una vez que el radical superóxido se forma por la re oxidación de la especie de  $\text{Cu}^{(I)}$  este puede formar peróxido de hidrógeno. De acuerdo a lo informado en la literatura se reporta que el radical superóxido en medio acuoso puede transformarse en primera instancia en radical hidroperoxo ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) (**ecuación 8a**) y finalmente en peróxido de hidrógeno (**ecuación 8b**) [66].

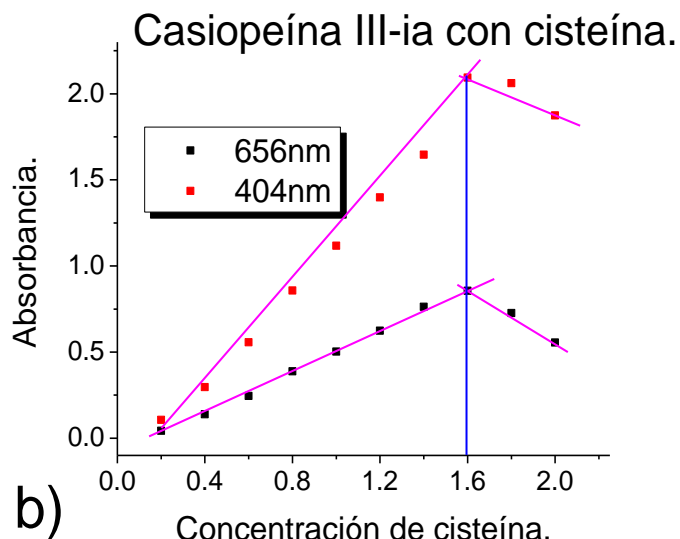


**Ecuación 8.-** Formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio acuoso a partir de radical superóxido.

### 8.2.3.-Reactividad de la **Casiopeína® III-ia** con cisteína en un sistema abierto (presencia de O<sub>2</sub> atmosférico).

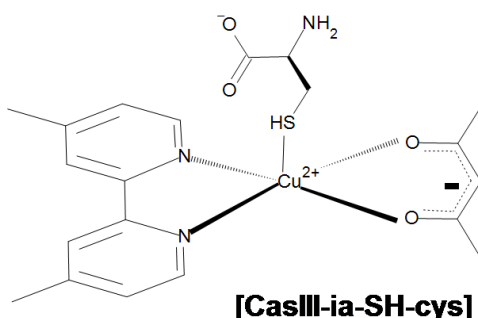
Los resultados obtenidos en la reacción entre la **Casiopeína® III-ia** con cisteína muestran el comportamiento descrito anteriormente para la **Casiopeína® II-gly**. El espectro de la **Casiopeína® III-ia** (2mM) con una absorbancia de 0.1228 u.a en 600nm, incrementó su absorbancia con las diferentes adiciones de cisteína, manteniendo este comportamiento hasta 1.6 equivalentes. Una vez que se realiza la resta de los espectros con el proceso descrito anteriormente se encontró que la longitud de onda correspondiente a la especie  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$  se encuentra en 656nm, además de la aparición de una nueva banda asociada a la transferencia de carga  $\text{S}(\sigma) \rightarrow \text{Cu}^{(\text{II})}_{(dx^2-y^2)}$  en 404nm (**gráfica 7a**). Al agregar más cisteína la absorbancia en 656nm disminuyó al igual que la absorbancia de la banda en 404 nm, estos cambios se producen por la reducción de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  a  $\text{Cu}^{(\text{I})}$ , aunque la reducción no es completa con 2.0 equivalentes como se aprecia en la **gráfica 7b**.





**Gráfica 7.- a)** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de especies **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** (2mM) y cisteína desde 0 hasta 1.6 equivalentes (0 a 3.2mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; **b)** gráfica de absorbanza vs. Concentración de cisteína agregada (0 a 2.0 equivalentes de cys) en 656nm y 404nm obtenida a partir de la gráfica a en un sistema abierto.

La especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,4'\text{-dm-2,2'}\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$  formada con 1.6 equivalentes de cisteína que se propone en la **figura 17**, tiene asociados los siguientes coeficientes de absorptividad molar:  $\epsilon_{656} = 302.31 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{404} = 748.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , calculados mediante la obtención de la pendiente en la gráfica de absorbanza vs concentración de cisteína, ya que se considera que únicamente hay una reacción de coordinación entre la **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** y la cisteína con una estequiometría 1:1.

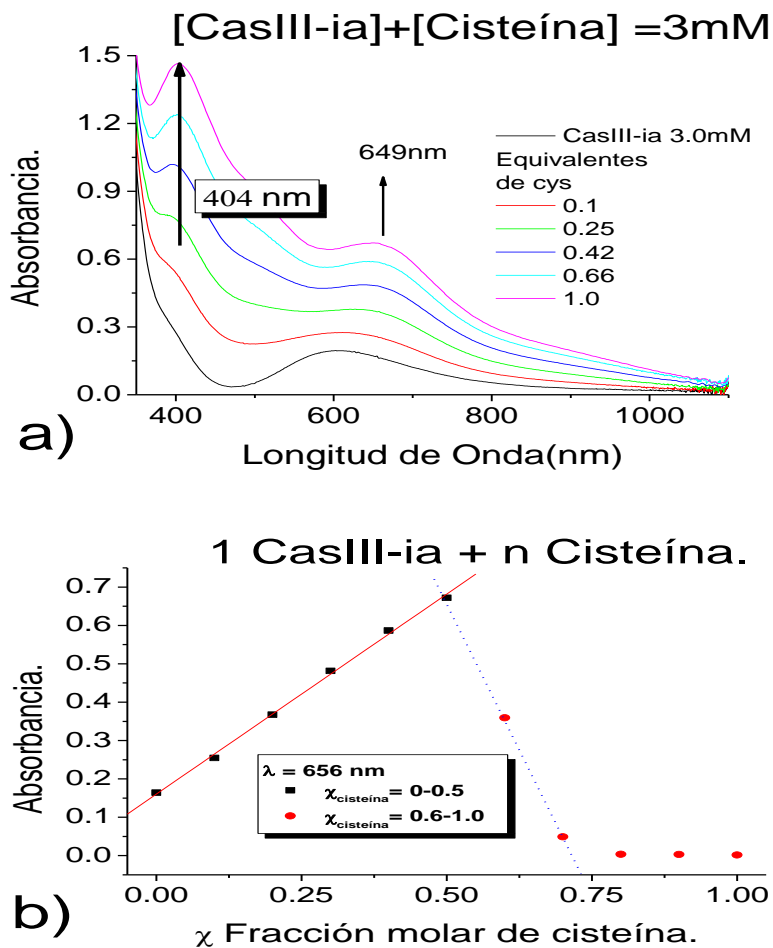


**Figura 17** .- Especies propuestas  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$  de acuerdo con los cambios observados en las señales de los espectros Uv-vis de la gráfica 7a

### 8.2.3.1.- Reactividad de la **Casiopeína® III-ia** con cisteína en un sistema cerrado (atmósfera de $\text{N}_2$ ).

En ausencia de  $\text{O}_2$ , el comportamiento parece ser el mismo, con la diferencia de que el máximo cambio en los espectros se alcanza al adicionar 1.0 equivalente de cisteína y no 1.6 equivalentes como cuando el  $\text{O}_2$  está presente en la disolución. La especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$  hace que el máximo de absorción aparezca hasta 649nm, presentando la banda característica de transferencia de carga  $\text{S}(\sigma) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})(d_x^2-y^2)$  en 404nm (**gráfica 8a**). Cuando se agregaron más de 1.0 equivalente se observa la disminución de la banda de  $\text{Cu}^{\text{(II)}}$  y la de transferencia de carga  $\text{S}(\sigma) \rightarrow \text{Cu}^{\text{(II)}}(d_x^2-y^2)$  hasta desaparecer(**gráfica 8b**), aunque lo último sólo se logró al adicionar 1.8 equivalentes de cisteína.





**Gráfica 8.-** a) Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 0.1$  a 1.0 (2.7 hasta 1.5 mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado; **b)** gráfica de absorbancia vs fracción molar de cisteína en 656nm obtenida a partir de la grafica a.

Con la seguridad de que la única reacción que se lleva a cabo es la coordinación de la cisteína a la **Casiopeína<sup>®</sup>** para formar la especie  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(4,4' \text{-dm-}2,2' \text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$ , es posible obtener el coeficiente de absortividad molar calculando el valor de la pendiente en la gráfica absorbancia vs. Concentración de **Casiopeína<sup>®</sup>**. Los valores obtenidos son:  $\epsilon_{656} = 296.37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{404} = 702.09 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 8.2.4.- Caracterización e identificación de los producto aislados en la interacción entre la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con cisteína.

De acuerdo con los estudios espectroscópicos realizados siguiendo el método de las variaciones continuas, se determinó que la formación de una nueva especie es completa cuando el coeficiente estequiométrico (**n**) de ambos reactivos en la reacción es igual a 1. Tomando en cuenta lo anterior, se limitó el estudio de los productos con la estequiometría **Casiopeína<sup>®</sup>**: cisteína 1:1 en cantidades suficientes que permitan la obtención de sólido suficiente para tener una caracterización completa en presencia de oxígeno.

#### 8.2.4.1.-Interacción entre la **Casiopeína<sup>®</sup> IIgly** y cisteína.

Los cambios observados al mezclar los reactivos en esta estequiometría son los mismos que los descritos en el ensayo espectrofotométrico. La disolución final se llevó a sequedad obteniéndose un sólido azul marino. Al lavar este producto con acetona se obtiene un sólido azul pálido y una disolución naranja. La disolución adquiere una tonalidad verde en muy poco tiempo al estar en contacto con el oxígeno del ambiente. La disolución verde se lleva a sequedad obteniendo un sólido verde esmeralda pálido.

El compuesto azul pálido (AS43-1A) es insoluble en disolventes polares y no polares. Fue caracterizado por análisis elemental, espectroscopia IR y se determinó su momento magnético efectivo.

El análisis elemental permite sugerir la fórmula mínima  $C_6H_{10}O_2N_2S_2Cu \cdot 2H_2O$  con peso molecular de 287.8 g/ mol. En el espectro IR se identificaron bandas de vibración en 2921, 3301 y 3238, 1618, 476, 667

$\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a los grupos funcionales  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COO}^-$ , S-S y C-S, respectivamente. El momento magnético efectivo tiene un valor de 1.45 MB lo que indica que el cobre se encuentra como  $\text{Cu}^{(\text{II})}$ . Estos resultados permiten proponer que el compuesto aislado corresponde a  $[\text{Cu}(\text{cistinato})]_n$ , como los informados en la literatura[67].

El sólido verde esmeralda pálido (AS43-1B) tiene una fórmula mínima  $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{N}_6\text{Cu} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con peso molecular de 832.35 g/ mol de acuerdo a los resultados de análisis elemental. Las bandas observadas en el espectro de IR permiten identificar la presencia de los grupos  $-\text{CH}_3$  (2923),  $-\text{C}=\text{C}$  (1521),  $-\text{C}=\text{N}$  (1425) y  $\text{NO}_3^-$ (1353), el valor de conductividad obtenido corresponde a un electrolito 1:2, por lo que se propone que el compuesto sea  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-}1,10\text{-fen})_2] (\text{NO}_3)_2$ .

Estos mismos compuestos se obtuvieron cuando se realizó la reacción  $\text{Cu}^{(\text{II})}$ : cisteína: 4,7-dm-1,10-fen (1:1:1). La síntesis anterior se realizó con la finalidad de obtener el producto  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-}1,10\text{-fen})(\text{cisteinato})]_n$ , sin embargo, sólo se obtuvieron el sólido azul pálido y el sólido verde esmeralda pálido antes descritos.

La asignación de las bandas en los espectros Infrarrojo y los datos de caracterización obtenidos de las reacciones entre la **Casiopeína<sup>®</sup>** **Igly** y los productos de la síntesis con cisteína se muestran en la **tabla 9 y 10**.

**Tabla 9 .-** Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm<sup>-1</sup> en KBr para los compuestos aislados de la interacción entre la **Casiopeína® II-gly** y cisteína, además de la síntesis Cu(II)-(N-N)-cisteína.

Clave	Compuesto	cisteína						fenantrolina			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
		v SH	v CH <sub>3</sub>	v NH <sub>2</sub>	v (COO)	v (S-S)	v (C-S)	v (CH <sub>3</sub> )	v (C=C)	v (C=N)	
AS43-1A	[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub>	*	2921	3301 3238	1618	476	667				
AS43-1B	[Cu(4,7-dm-1,10-fen)]NO <sub>3</sub>							2923	1521	1425	1353
AS08-A	[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub>	*	2924	3301 3238	1618	476	667				
AS08-B	[Cu(4,7-dm-1,10-fen)]NO <sub>3</sub>							2923	1521	1425	1353

**Tabla 10.-** Datos de caracterización de los productos obtenidos entre la **Casiopeína® II-gly** y cisteína.

Clave del producto aislado	Compuesto aislado	A.E. Exp (Cal) % C; % N; % H;%S	Fórmula	PM g/mol	μ <sup>a</sup> <sub>eff</sub> (MB)	Λ <sup>b</sup> (Sm <sup>2</sup> /mol)	λ <sup>c</sup> <sub>max</sub> (nm)
AS43-1A	[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub>	25.42;(23.87) 9.97;(9.28) 3.94;(3.33) 17.94;(21.24)	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> Cu · 2 H <sub>2</sub> O	287.8	1.45	*	*
AS43-1B	[Cu(4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	57.10;(54.062) 12.29;(13.51) 4.57;(3.86)	C <sub>37</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> N <sub>6</sub> Cu · 3 H <sub>2</sub> O	832.3	1.62	154	721
AS08-A	[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub>	25.04;(23.87) 9.69;(9.28) 3.46;(3.33) 18.75;(21.24)	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> Cu	287.8	1.58	*	*
AS08-B	[Cu(4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> ]NO <sub>3</sub>	53.44;(55.67) 9.76;(13.91) 5.55;(3.97)	C <sub>37</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> N <sub>6</sub> Cu · 3H <sub>2</sub> O	832.3	1.70	260	721

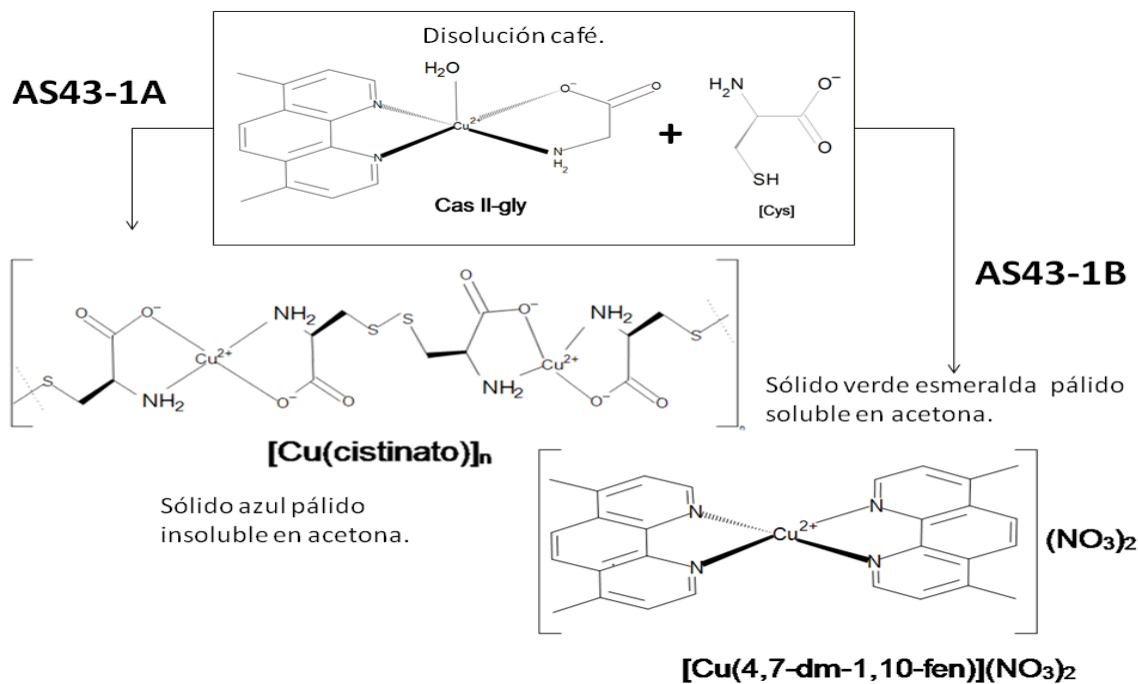
\* compuestos insolubles.

a valores obtenidos en sólido

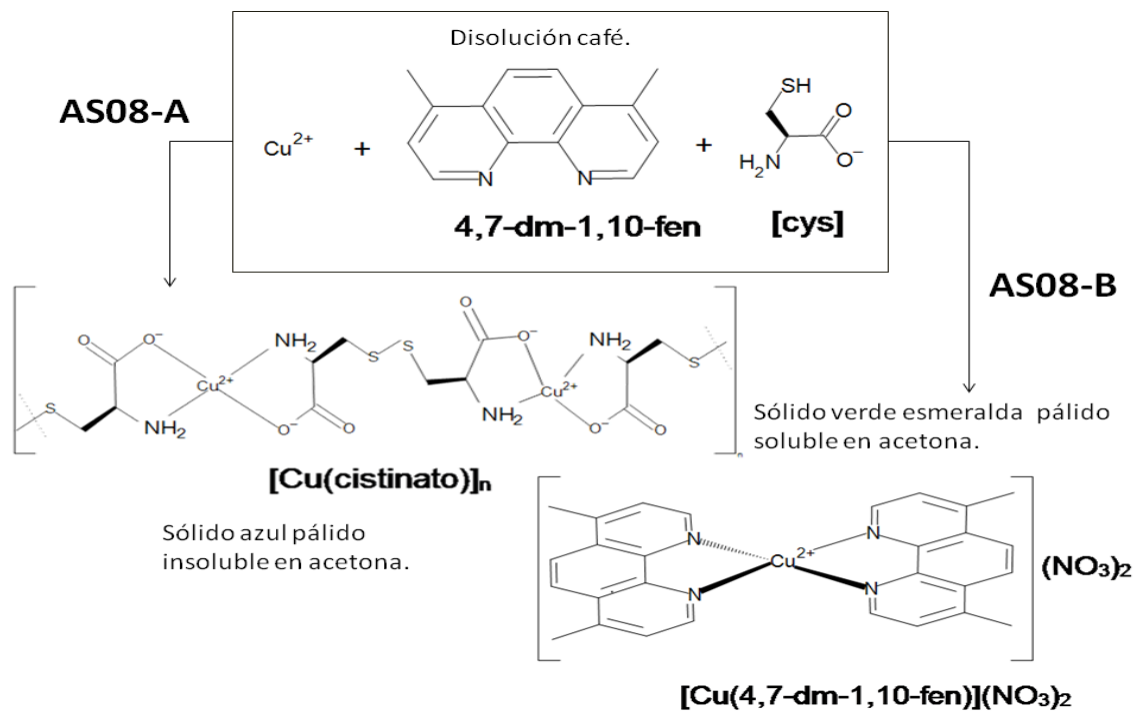
b valores obtenidos de disoluciones 1mM en metanol.

c valores obtenidos de disoluciones 2mM en metanol.

En la **figura 17** y **figura 18** se representan los diagramas de flujo para los compuestos identificados en cada una de las reacciones, en donde se puede ver que las especies de Cu<sup>(I)</sup> propuestas si sufren cambios importantes en la esfera de coordinación en el momento de la re oxidación facilitado porque el medio de reacción es acuoso.



**Figura 18.-** Diagrama de flujo de los productos aislados en la reacción entre la **Casiopéina® II-gly** y cisteína.



**Figura 19.-** Diagrama de flujo de los productos aislados en la reacción entre  $\text{Cu}^{(II)}$ , 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.

### 8.2.4.2.- Interacción entre la **Casiopeína® III-ia** con cisteína.

Al momento de mezclar la **Casiopeína® III-ia** con la cisteína, se observaron los mismos cambios descritos que en el estudio espectrofotométrico. Una vez mezclados los reactivos, la disolución se filtró al observar un precipitado. La fase acuosa presenta una coloración azul que no presenta modificaciones con el paso del tiempo, al evaporar el disolvente se obtiene un sólido de color azul prusia.

El sólido azul proveniente de la fase acuosa (AS47-1A) se caracterizó encontrando una fórmula mínima de  $C_{48}H_{64}O_{22}N_{12}Cu$  con un peso de 1342 g/mol asociada al compuesto  $[Cu_4(OH)_4(dmbipi)_4(H_2O)_2](NO_3)_4$ . Las bandas identificadas en IR se asocian a la presencia de bipyridina en 1620, 1560, 1490  $cm^{-1}$ , una banda en 1348  $cm^{-1}$  asociada al contra ión nitrato y una banda más en 3442  $cm^{-1}$  correspondiente al grupo -OH. La conductividad que se obtuvo fue de 220  $\mu S$  correspondiente a un electrolito tipo 1:2 en metanol, lo que sugiere que en disolución la especie que se encuentra puede ser  $[Cu_2(OH)_2(dmbipi)_2(H_2O)](NO_3)_2$ . El  $\mu_{eff} = 2.71$  MB es tan bajo debido a la cercanía de los cuatro átomos de cobre y al consecuente acoplamiento antiferromagnético de los electrones desapareados.

El sólido azul (AS47-1C) obtenido al filtrar la disolución se caracterizó obteniendo la fórmula mínima  $C_6H_{10}O_4N_2S_2Cu$  con un peso molecular de 287.8 g/mol obtenidos mediante análisis elemental. En el espectro IR se identifican las vibraciones que corresponden a los grupos funcionales -CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -COO, -S-S, -C-S en 2921, 3301 y 3238, 1618, 476, 667  $cm^{-1}$  respectivamente. Corroborando el estado de oxidación Cu<sup>(II)</sup> con el valor de momento magnético obtenido 1.47 MB que corresponde a un electrón desapareado. Concluyendo que el compuesto corresponde a  $[Cu(\text{cistinato})]_n$

Para identificar los productos propuestos anteriormente se realizó la reacción  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ : 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina: cisteína (1:1:1) esperando que el producto fuera  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipi})(\text{cisteinato})]\text{NO}_3$ , sin embargo, los productos obtenidos fueron  $[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbipi})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$  (AS54) y AS54-A la cantidad de polvo obtenido no fue suficiente para su caracterización, sin embargo presentó las mismas características del compuesto  $[\text{Cu}(\text{cistinato})]_n$ , los mismos que se obtienen de la interacción entre la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** y cys. Los datos de asignación de las bandas en el espectro infrarrojo se muestran en la **tabla 11**, en la **tabla 12** se muestran los datos de caracterización.

**Tabla 11 .-** Espectroscopia infrarroja de  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $400\text{cm}^{-1}$  en KBr para la interacción de **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** + cisteína y la síntesis  $\text{Cu}^{(II)}$ : 4,4'-dm-2,2'-bipi: cys.

Clave	Compuesto	Cistínato coordinado.						bipiridina coordinada			$\text{NO}_3^-$ ionico
		-CH <sub>3</sub>	-NH <sub>2</sub>	-COO <sup>-</sup>	S-S	C-S	OH	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=C)	
AS47-1A	$[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbipi})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$						3442	1620	1560	1490	1384
AS47-1C	$[\text{Cu}(\text{cisteinato})]_n$	2921	3301 3238	1618	476	667	3400				
AS54-A	$[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbipi})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$						3442	16120	1560	1490	1384

**Tabla 12.-** Datos de caracterización de los compuestos aislados de la interacción con CasIII-ia y síntesis con cisteína.

Clave	Compuesto	A.E. Exp (Cal) % C; % N; % H;%S	Fórmula	PM g/mol	$\Lambda^a$ ( $\text{Sm}^2/\text{mol}$ )	$\mu^b_{\text{eff}}$ (MB)	$\lambda^c_{\text{max}}$ (nm)
AS47-1A	$[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbpy})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$	41.30;(40.73) 11.23;(11.87) 4.75;(4.55)	$\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{O}_{20}\text{N}_{12}\text{Cu}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1415.2	220	2.71	607nm
AS47-1C	$[\text{Cu}(\text{cisteinato})]_n$	23.80;(23.87) 9.51;(9.28) 3.66;(3.33) 20.984(21.24)	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}_2\text{Cu}$	287.8	**	1.47	**
AS54	$[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbpy})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$	41.30;(40.73) 11.23;(11.87) 4.75;(4.55)	$\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{O}_{20}\text{N}_{12}\text{Cu}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1415.2	220	2.72	607nm

a valores obtenidos de disolución 1mM en metanol.

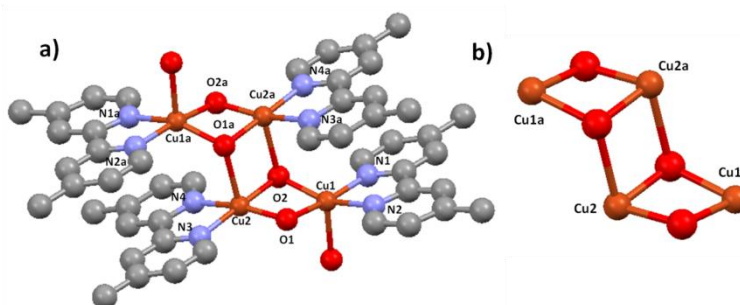
b valores obtenidos en sólido.

c valores obtenidos de disoluciones 2mM en metanol.

Fue posible obtener monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos-X del compuesto  $[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbipi})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4$

### 8.2.4.2.1.-Difracción de Rayos X del producto aislado de la reacción $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 4,4'$ -dm-2,2'-bipi + cys.

La unidad asimétrica de este cristal está conformada por dos unidades  $[\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{dmbipi})_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ , donde dmbipi = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, unidas por dos puentes hidroxilo  $\mu_3$ -OH y  $\mu_2$ -OH que ocupan las posiciones axiales de dos de los átomos de cobre, en los dos átomos de cobre restantes las posiciones axiales están ocupadas por moléculas de agua, por lo que todos los iones metálicos se encuentran en una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada. Las unidades diméricas están relacionadas por un eje de rotación 2. La estructura molecular del compuesto  $[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbipi})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$  se muestra en la **figura 19**, así como un acercamiento a la conformación de silla adoptado por el sistema central  $\text{Cu}_4(\text{OH})_4$ .



**Figura 20.-** Estructura molecular del compuesto  $[\text{Cu}_4(\text{OH})_4(\text{dmbpy})_4(\text{H}_2\text{O})_4](\text{NO}_3)_4$

El plano ecuatorial de cada átomo de cobre está constituido por dos nitrógenos de la 4,4'-dm-2,2'-bipi con distancias que varían de 1.987 (4) Å a 2.006(4) Å y dos átomos de oxígeno de los puentes  $\mu$ -OH con distancias que van de 1.915(3) Å a 1.969(3) Å. La distancia del átomo de cobre con la molécula de agua en la posición apical ( $\text{Cu}_1$ -OH<sub>2</sub>)



es de 2.220(4) Å, mientras que la distancia del metal con el átomo de oxígeno del puente hidroxilo que ocupa la posición apical (Cu<sub>2</sub>-OH) es de 2.346(4) Å. Éste último enlace es el responsable de la conformación tetranuclear del compuesto estudiado. La distancia Cu<sub>1</sub>-Cu<sub>2</sub> es de 2.9401 (9) Å y en todos los casos el átomo de cobre está ligeramente desplazado del plano definido por (N-N-O-O) con distancias de 0.202 y 0.261 Å. Se puede apreciar una diferencia en los ángulos de cada átomo de cobre relacionada con el desplazamiento del metal respecto al plano ecuatorial. Los ángulos N<sub>1</sub>-Cu<sub>1</sub>-O<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>-Cu<sub>1</sub>-O<sub>2</sub> son 178.63 (16) y 167.73 (17) ° respectivamente, mientras que los ángulos para Cu<sub>2</sub> tienen valores N<sub>3</sub>-Cu<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> = 172.42 (16) ° y N<sub>4</sub>-Cu<sub>2</sub>-O<sub>1</sub> = 157.02 (16) °. Con estos valores es posible calcular la distorsión angular que presenta cada cobre empleando la ecuación  $\tau = (\theta - \phi) / 60$ , siendo los valores de  $\tau$  para Cu<sub>1</sub> y Cu<sub>2</sub> de 0.181 y 0.256. De estos valores se observa que Cu<sub>2</sub> presenta una mayor desviación de la geometría pirámide de base cuadrada ideal.

En la **figura 21** y **figura 22** se muestran los diagramas de los productos obtenidos en cada una de las reacciones con cisteína, en ambas reacciones se obtuvo un compuesto identificado como [Cu<sub>4</sub>(OH)<sub>4</sub>(dmbpy)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. La formación de este compuesto se favoreció al adicionar NH<sub>4</sub>OH a la mezcla de reacción hasta alcanzar un pH de 7.4, el mismo comportamiento que se describe al agregar NaOH a un sistema con Cu<sup>(II)</sup> y dmbpy [68]. La identificación de este compuesto comprueba que en la reacción de reducción del centro metálico el ligante diimina se queda en la esfera de coordinación de cobre, que al reoxidarse forma los compuestos mostrados en las figuras citadas anteriormente.

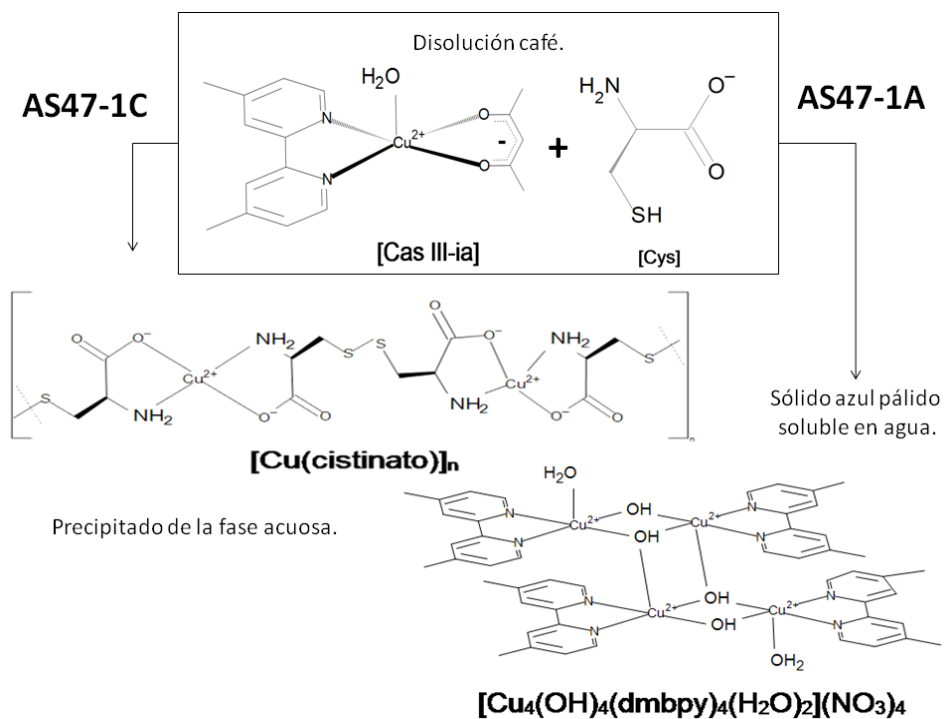
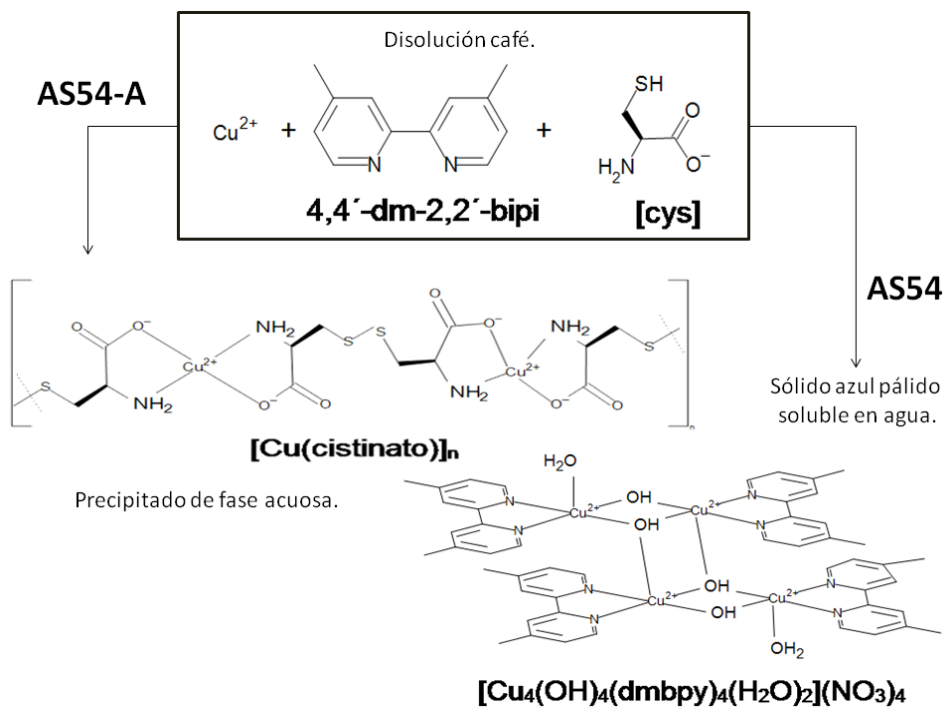


Figura 21.- Diagrama de flujo de los productos aislados de la reacción entre la **Casiopéina® III-ia** con cisteína.

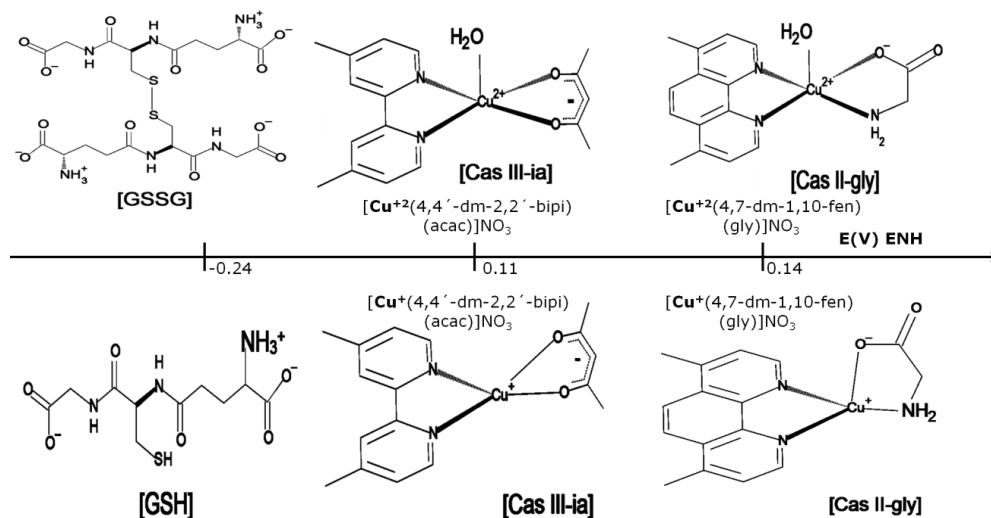


**Figura 22.-** Diagrama de flujo de los productos aislados de la reacción Cu<sup>(II)</sup>: 4,7 para la síntesis con cisteína.

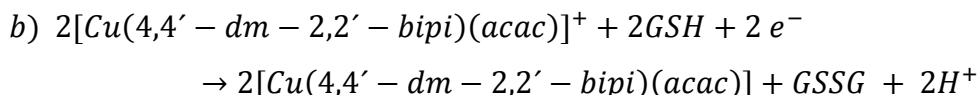
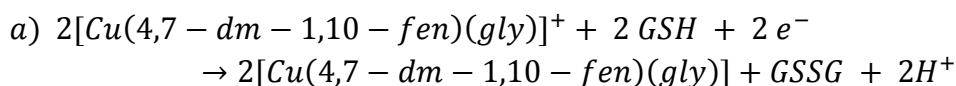
## 8.3.-Reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con GSH.

### 8.3.1.-Observaciones generales de la reactividad con glutatión reducido (GSH).

De acuerdo con los potenciales de oxidación-reducción mostrados en el **diagrama 4** respecto al electrodo normal de hidrógeno para **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** ( $E^{\circ}=147\text{mV}$ ), **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** ( $E^{\circ}=119\text{mV}$ )[47] y glutatión reducido ( $E=-240\text{mV}$ ) [49], se propone que la reacción termodinámicamente favorecida será la reducción del centro metálico, la oxidación de GSH a GSSG y la liberación de dos protones como se muestra en las **ecuaciones 9a** y **9b**.



**Diagrama 4.-** Potenciales redox de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**, **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** y GSH.

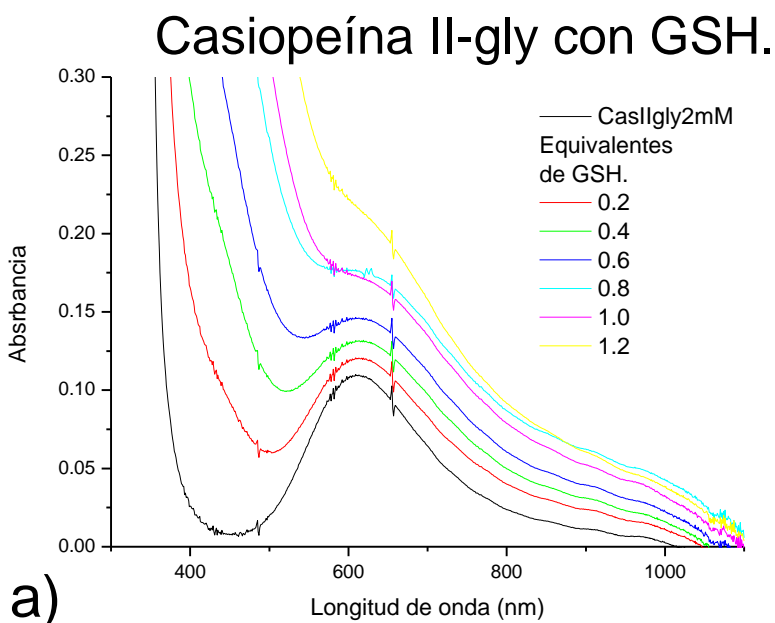


**Ecuación 9.-** Reacciones propuestas entre la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly**, **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** y GSH.

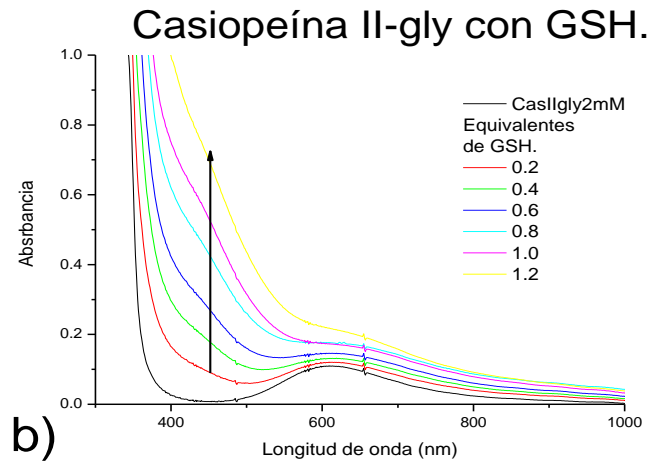
En las mezclas de reacción entre la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** con GSH y **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** con GSH se observó un cambio inmediato en el color de la disolución de azul a amarillo. Después de un equivalente agregado, la coloración amarilla se intensificó en función de la concentración de GSH permaneciendo por unos minutos en el sistema abierto y algunas horas cuando se trataba del sistema cerrado.

### 8.3.2.-Reactividad de la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly**-GSH en un sistema abierto (presencia de O<sub>2</sub> atmosférico).

La adición de hasta 1.2 equivalentes de GSH a una disolución de **Casiopéina II-gly<sup>®</sup>** provocó un incremento en la absorbancia del máximo de 612nm (**gráfica 9a**), además de observarse la aparición de una nueva señal en 450nm (**gráfica 9b**).

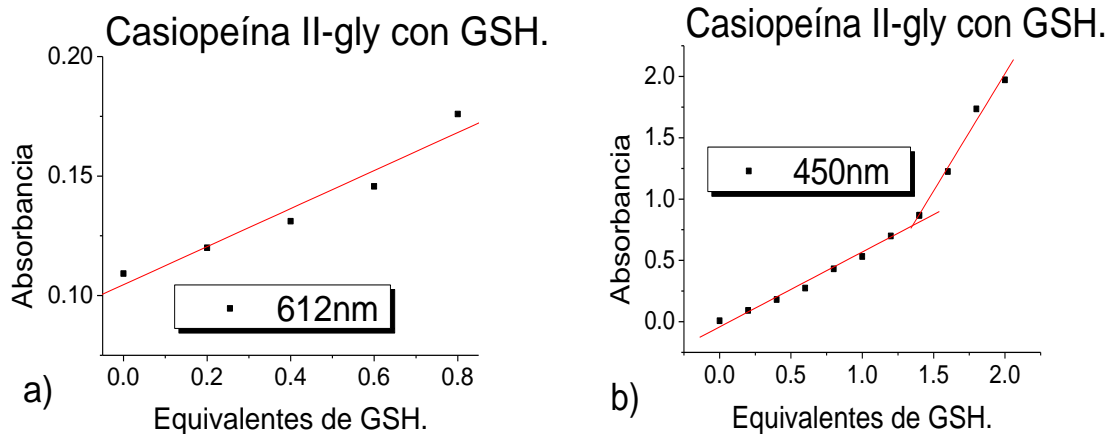


**Gráfica 9 a.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** (2mM) en la región visible con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto



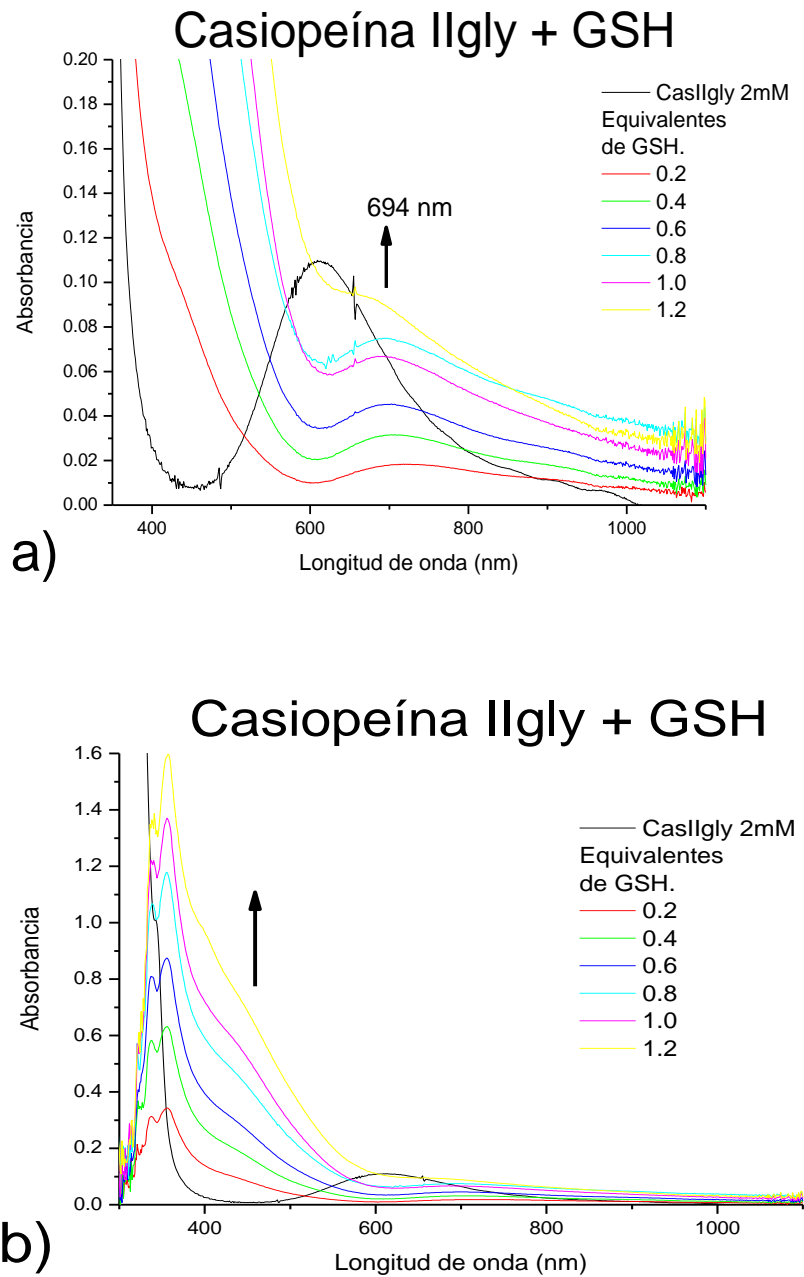
**Gráfica 10b.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** (2mM) en la región ultravioleta con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto

En las **gráficas 10a y 10b**, se puede observar la dependencia de la absorbancia en función de la concentración de GSH agregado al sistema, tanto en la banda de 612nm como en la nueva señal en 450nm.



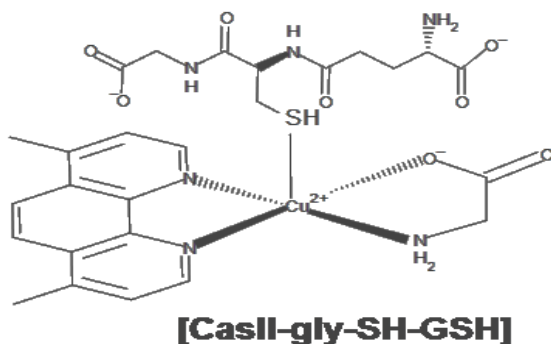
**Gráfica 11.-** a) Absorbancia en 612nm vs. Equivalentes de GSH de la mezcla de reacción **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** (2mM) con GSH (0 a 3.6mM); b) Absorbancia en 450nm vs. Equivalentes de GSH de la mezcla de reacción **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** (2mM) con GSH (0 a 4.0mM), todos los espectros se obtuvieron en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.

Una vez obtenidos los espectros de las mezclas se realizó el mismo tratamiento a los espectros que el hecho para las mezclas con cisteína para conocer el valor de la longitud de onda en donde se presenta el máximo de absorción de la nueva especie. El nuevo máximo de absorción se encuentra desplazado hacia mayores longitudes de onda respecto al espectro original de **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** hasta 694nm (**gráfica 11a**). El máximo valor de absorbancia a esta nueva longitud de onda se alcanza al agregar 1.2 equivalentes de GSH acompañado de la presencia de un hombro característico de la transferencia de carga  $S(\sigma) \rightarrow Cu^{(II)} (dx^2-y^2)$  en 450nm, además de esto, se registraron dos máximos de absorción adicionales en 337nm y 356nm asociadas a la transferencia de carga  $Cu^{(I)} \rightarrow \text{fenantrolina} (d-\pi)$  (**gráfica 11b**)[69]. Es importante mencionar que las bandas de transferencia de carga sólo pueden apreciarse al hacer el tratamiento de los espectros. Considerando que la primera reacción entre la **Casiopeína<sup>®</sup>** y GSH es la coordinación del átomo de azufre al  $Cu^{(II)}$  y que los potenciales redox de ambas especies hacen más favorable la reacción de reducción, tomando en cuenta las absorbancias registradas en 694nm se puede decir que sólo una pequeña cantidad de  $Cu^{(II)}$  se mantiene con la coordinación del átomo de azufre del GSH (**gráfica 11a**), mientras que la otra fracción está siendo reducida después de que se coordinó azufre del GSH (**gráfica 11b**).



**Gráfica 12.-** Espectros obtenidos por la resta de espectros **a)** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina® II-gly** (2mM) en la región visible **b)** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de la **Casiopéina® II-gly** (2mM) en la región ultravioleta, ambos espectros con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto

La especie que se propone de acuerdo a lo observado en los espectros hasta 1.2 equivalentes de GSH se muestra en la **figura 23**.



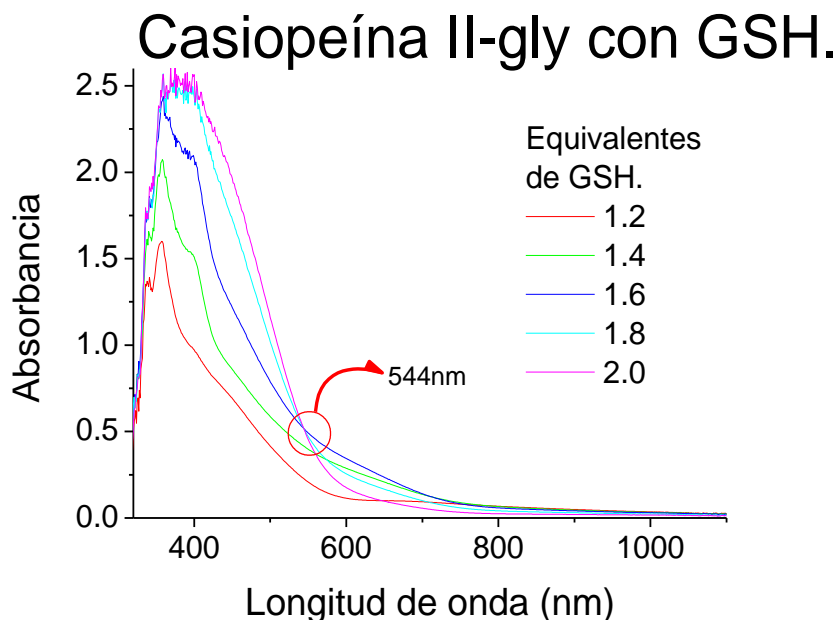
**Figura 23.**-Especie de Cu<sup>(II)</sup> propuesta de acuerdo a los cambios observados en la reacción entre la **Casiopeína® II-gly** y GSH.

Tomando en cuenta el comportamiento lineal que se presenta en las **gráficas 10a** y **10b** se obtiene un coeficiente de absorptividad molar aproximado en cada una de las señales registradas asociadas a una especie:  $[\text{Cu}^{\text{(I)}}\text{-4,7-dm-1,10-fen}] \epsilon_{337\text{nm}} = 825.64 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{356\text{nm}} = 1279.00 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-GSH})]^+ \epsilon_{450\text{nm}} = 1031.05 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , esto para las transferencias de carga en la región ultravioleta, mientras que en la región visible el coeficiente es  $\epsilon_{694\text{nm}} = 89.35 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para la especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$ .

Dado que el valor de los coeficientes de absorptividad molar de ambas especies de Cu<sup>(II)</sup> sólo difieren en 30 unidades y que sólo una pequeña cantidad de especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$  se genera, solamente se observa un aparente incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 612 nm y no el desplazamiento hasta 694 nm como se esperaba. Las transferencias de carga en 337 y 356 nm asociadas a Cu<sup>(I)</sup>  $\rightarrow$  fenantrolina ( $d-\pi$ ) [69] tienen un coeficiente de absorptividad molar tan grande que son las responsables de la coloración amarilla de la disolución.



Cuando se agregaron hasta 2.0 equivalentes de GSH (**gráfica 12**) la banda en 694nm disminuye hasta perder la forma característica asociada a la presencia de Cu<sup>(II)</sup>. Por otro lado, la absorbancia de la banda entre 337 y 356nm sigue aumentando por el incremento de la concentración de Cu<sup>(I)</sup>. Un punto isosbético en 544nm, confirma la presencia de las especies de Cu<sup>(II)</sup> y Cu<sup>(I)</sup> en la disolución.

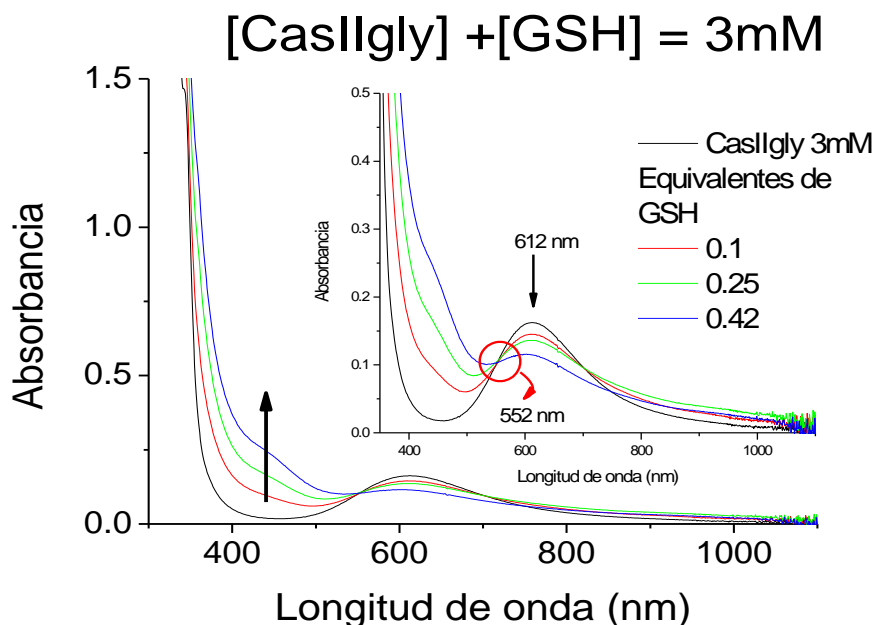


**Gráfica 13.-** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de la **Casiopeína® II-gly** (2mM) en la región visible con 1.2 hasta 2.0 equivalentes de GSH (2.4 a 4.0 mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto

### 8.3.2.1.-Reactividad de la **Casiopeína® II-gly** con GSH en un sistema cerrado (atmósfera de N<sub>2</sub>).

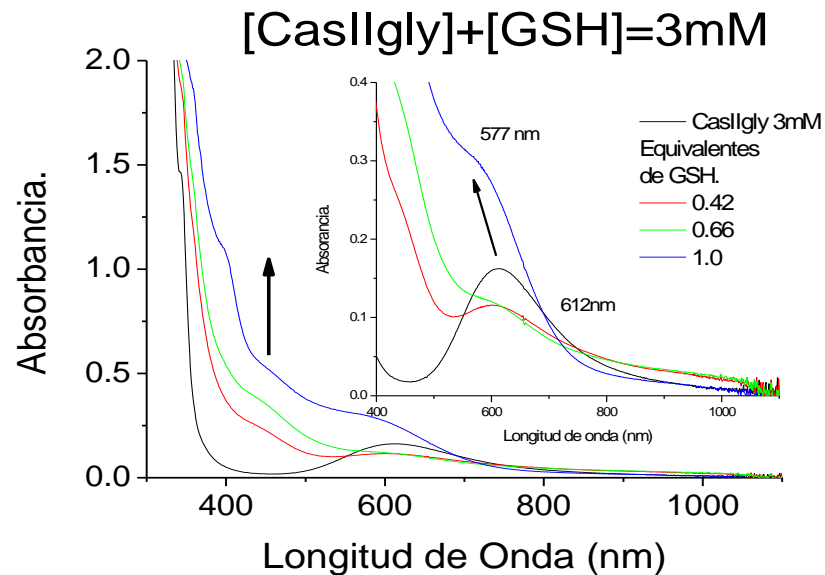
Al adicionar alícuotas de GSH la absorbancia de la **Casiopeína® II-gly** en 612nm disminuye de forma proporcional a la adición de reductor hasta alcanzar 0.42 equivalentes, esto es por la reducción de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup>. La presencia de estas especies provoca la aparición de un punto isosbético en 552nm (**gráfica 13**). El hombro en 450nm indica

la formación de la especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-GSH})]^+$  y sugiere que éste es el primer paso para que se dé el proceso de reducción.

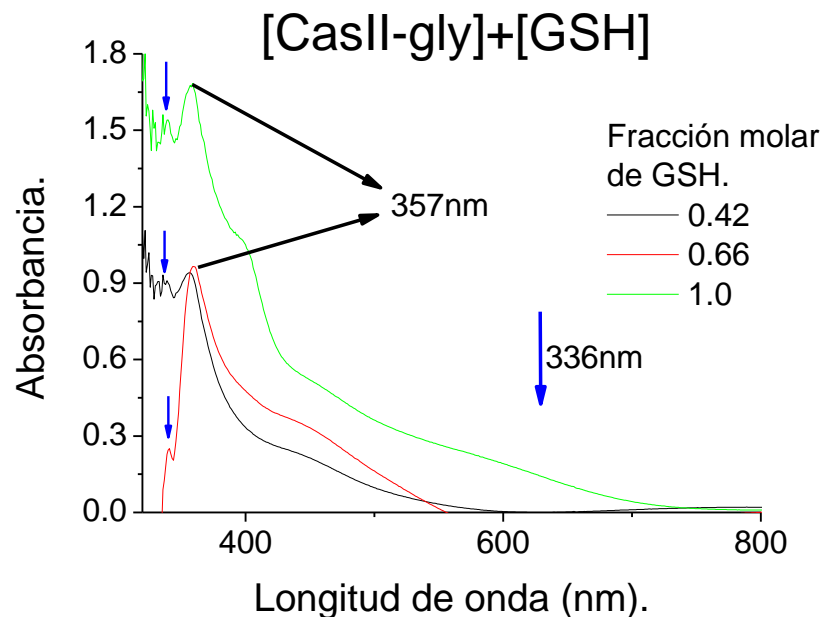


**Gráfica 14.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (3mM a 2.1mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.1$  a 0.42 (0.3 hasta 0.9 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

Cuando se agrega 1.0 equivalente de GSH (**gráfica 14**), la absorbancia aumentó y se presenta un desplazamiento del máximo hasta 577nm; hasta este punto se propone que existan varias especies en la disolución. Dado el desplazamiento del máximo de absorción hacia menores longitudes de onda (577nm) se sugiere la formación de la especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{N-O-GSSG})]$  como producto de la sustitución de la glicina por el glutatión oxidado. Además, por la presencia de la señal en 450 nm debe existir la especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$ , así como una especie de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  asociada a la señal de 336 y 357 nm [69](**gráfica 15**).

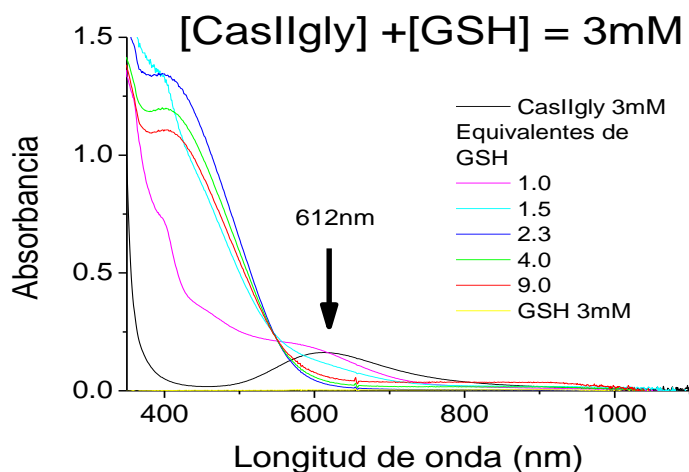


**Gráfica 15.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (2.1mM a 1.5mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.42$  a 1.0 (0.9 hasta 1.5 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

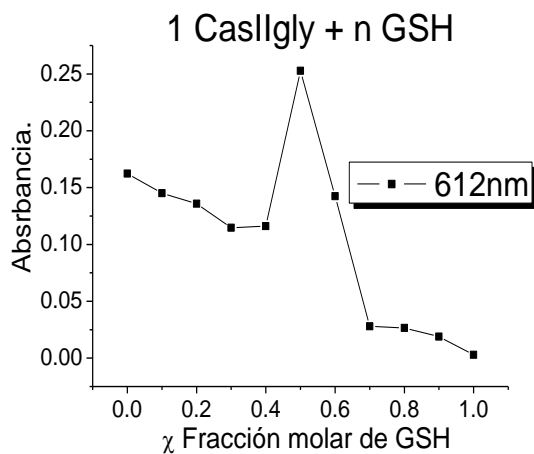


**Gráfica 16.-** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de espectros de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (2.1mM a 1.5mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.42$  a 1.0 (0.9 hasta 1.5 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

Al agregar más de 1.0 equivalentes de GSH, la absorbancia disminuye de manera proporcional a la concentración de GSH en 612nm, teniendo este mismo espectro una banda intensa en 404nm, asociada a la transferencia de carga  $\text{Cu}^{(I)}$ -fenantrolina ( $d-\pi$ ) [69](**gráfica 16**). La **gráfica 17** muestra la desaparición de la señal de  $\text{Cu}^{(II)}$  después de 1.0 equivalentes de GSH (0.5 fracción molar) hasta ser prácticamente de cero.



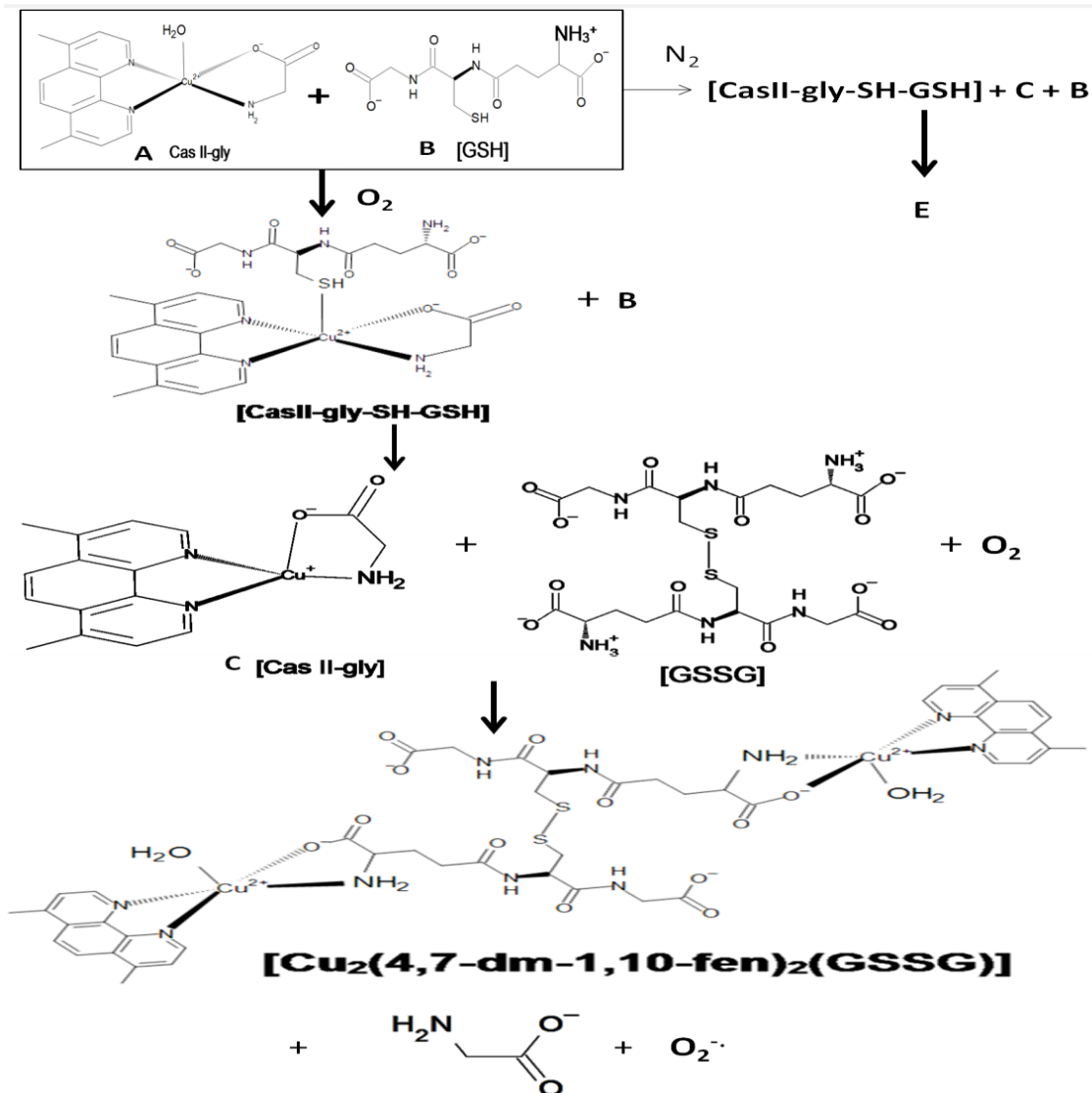
**Gráfica 17.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con diferente fracción molar  $\chi = 1.0$  a 9.0 (1.5 hasta 2.7 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.



**Gráfica 18.-** Absorbancia vs. Fracción molar ( $\chi$ ) de GSH obtenido a partir de los estudios en el sistema cerrado con **Casiopéina® IIgly** (3mM) y GSH (3mM).

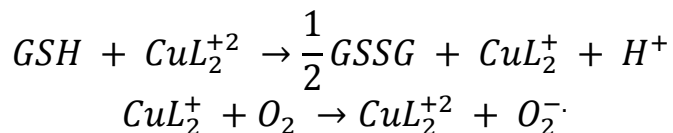
Las especies propuestas en la mezcla de reacción son:  $[\text{Cu}_2^{(\text{II})}(\text{4,7-dm-1,10-fen})_2(\text{N-O-GSSG})]$  (estructura **E** en la **figura 24**) y  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(\text{4,7-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$  mostrada en la **figura 23** (sistema abierto).

En resumen, las reacciones que se presentan en ambos sistemas se muestran en la **figura 24**.



**Figura 24.-** Propuesta de especies formadas por la reacción entre la **Casiopéina® II-gly** y GSH en un sistema abierto y cerrado.

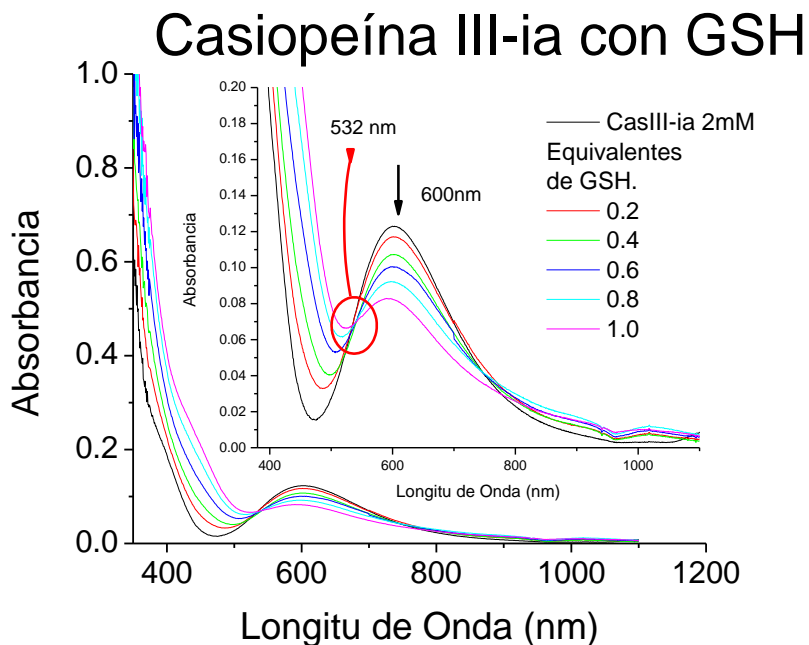
En la literatura se reporta el mecanismo de acción propuesto para la reducción del Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup> por el GSH y la formación de radical superóxido [54] como se describe en la **ecuación 10**, lo que apoya la propuesta de re oxidación en la **figura 24**.



**Ecuación 10.-** Mecanismo propuesto para la formación de radical superóxido [54].

### 8.3.3.- Reactividad de la **Casiopeína® III-ia** y GSH en un sistema abierto (presencia de O<sub>2</sub> atmosférico).

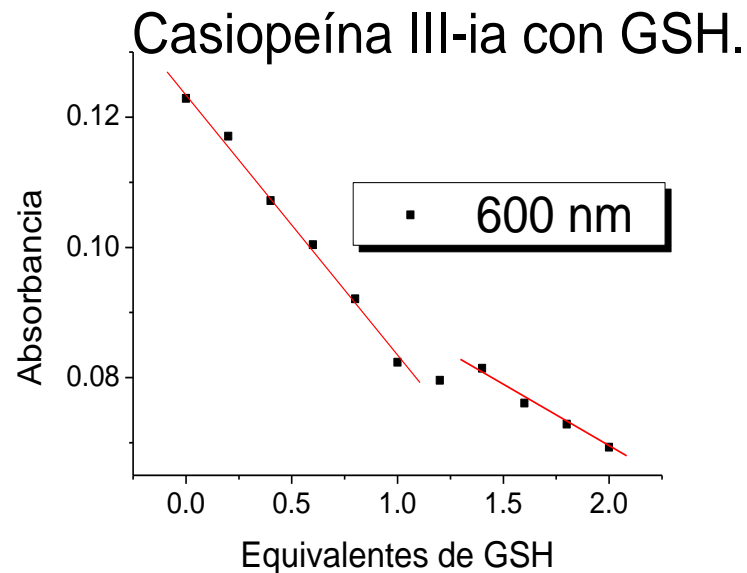
El espectro de la **Casiopeína® III-ia** (2mM) muestra una sola señal en 600nm. Cuando se adicionó 1.0 equivalente de GSH la absorbancia disminuyó (**gráfica 18**) en la misma longitud de onda, por la transformación de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup>, la generación de la especie reducida provoca la aparición de un punto isobéptico en 532nm. En la región Uv se observa la señal deformada en 450nm aproximadamente que puede asociarse a la transferencia de carga  $S(\sigma) \rightarrow Cu^{(II)}_{(dx^2-y^2)}$ , por la absorbancia registrada, es probable que sólo una pequeña cantidad del compuesto  $[Cu^{(II)}(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-GSH)]^+$  permanezca como Cu<sup>(II)</sup> mientras que el resto ya ha sido reducido.



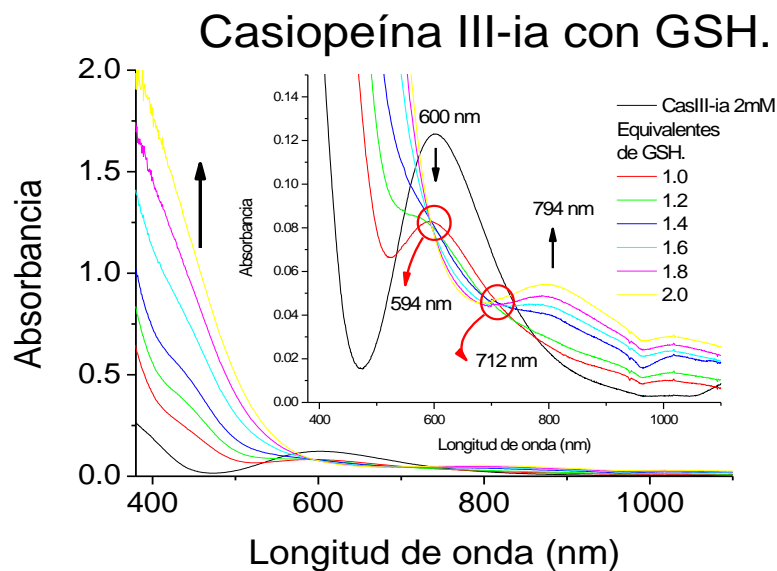
**Gráfica 19.**-Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® III-ia** (2mM) con diferentes concentraciones (0.4 a 1.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.

Cuando se agregan hasta 2.0 equivalentes de GSH, la señal de  $\text{Cu}^{(II)}$  disminuye como se puede ver en la **gráfica 19**, sin embargo, como se puede observar en la **gráfica 20** una banda de  $\text{Cu}^{(II)}$  aparece en 794nm. A partir de 1.0 equivalente se observó la formación de dos puntos isobéuticos, el primero en 594nm y el segundo en 712nm. EL primer punto isobéutico es producto del equilibrio de especies  $[\text{Cu}^{(II)}(4,4'\text{-dm-2,2'}\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-GSH})]^+$  y  $[\text{Cu}^{(I)}(4,4'\text{-dm-2,2'}\text{-bipi})(\text{acac})]$  reducida, el segundo corresponde al equilibrio de dos especies de  $\text{Cu}^{(II)}$ ,  $[\text{Cu}^{(II)}(4,4'\text{-dm-2,2'}\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-GSH})]^+$  y  $[\text{Cu}^{(II)}(4,4'\text{-dmbipi})_2]^{2+}$  especie que absorbe en 730nm. Lo anterior es propuesto en base al incremento que ambas bandas presentan en función de la cantidad de GSH agregado. El incremento observado tanto en la señal de 450 nm como en la de 794 nm sugiere que, aunque se está consumiendo  $\text{Cu}^{(II)}$  por la generación de la especie  $[\text{Cu}^{(II)}(4,4'\text{-dmbipi})_2]^{2+}$ , la reacción entre la especie de  $\text{Cu}^{(I)}$  con oxígeno producirá la regeneración de  $\text{Cu}^{(II)}$  y radical superóxido, permitiendo así que exista  $\text{Cu}^{(II)}$  disponible para interactuar con el azufre del GSH que aún no ha sido oxidado (**gráfica 20**). Además, se debe de tomar en cuenta que el radical superóxido en disolución acuosa es capaz de transformarse a  $\text{H}_2\text{O}_2$  [66], tal como se propuso en el apartado en donde se discute la interacción de las **Casiopeínas®** con cisteína.





**Gráfica 20.-** Absorbancia vs equivalentes de GSH en 600nm, los datos se obtuvieron de las mezclas de reacción de la **Casiopéina® III-ia** (2mM) con diferentes concentraciones (0 a 4.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.

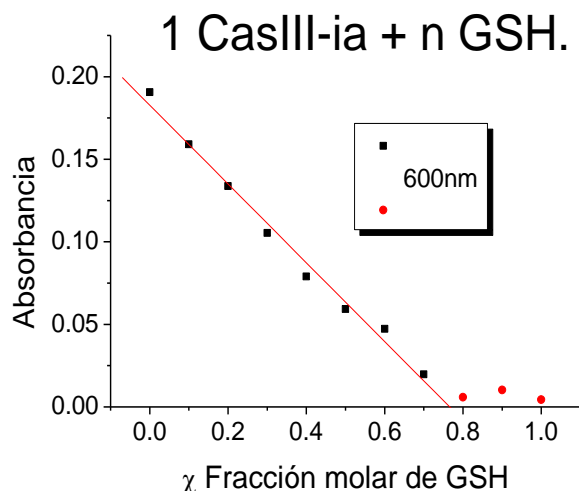


**Gráfica 21.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina® III-ia** (2mM) con diferentes concentraciones (1.0mM a 4.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.

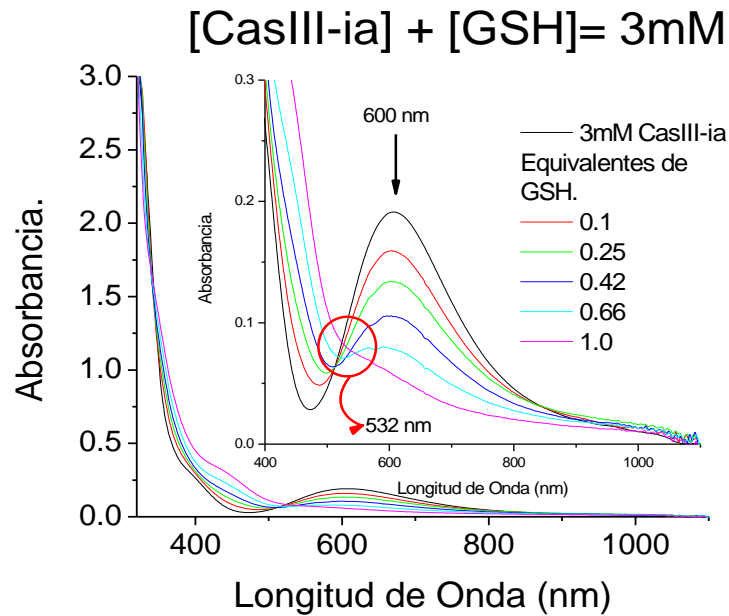
### 8.3.3.1.- Reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** y GSH en un sistema cerrado (atmósfera de N<sub>2</sub>).

El espectro de la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** (3mM) presenta una señal en 600nm que disminuyó de forma proporcional hasta 1.0 equivalentes de GSH agregada sin mostrar desplazamientos en la longitud de onda del máximo de absorción. La disminución de la absorbancia es asociada a la reducción del centro metálico Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup> (**gráfica 21**), equilibrio de especies que provocan un punto isobéptico en 552nm (**gráfica 22**), mientras que en la región Uv se observa una señal muy parecida a la transferencia de carga S(σ) → Cu<sup>(II)</sup> (dx<sup>2</sup>-y<sup>2</sup>).

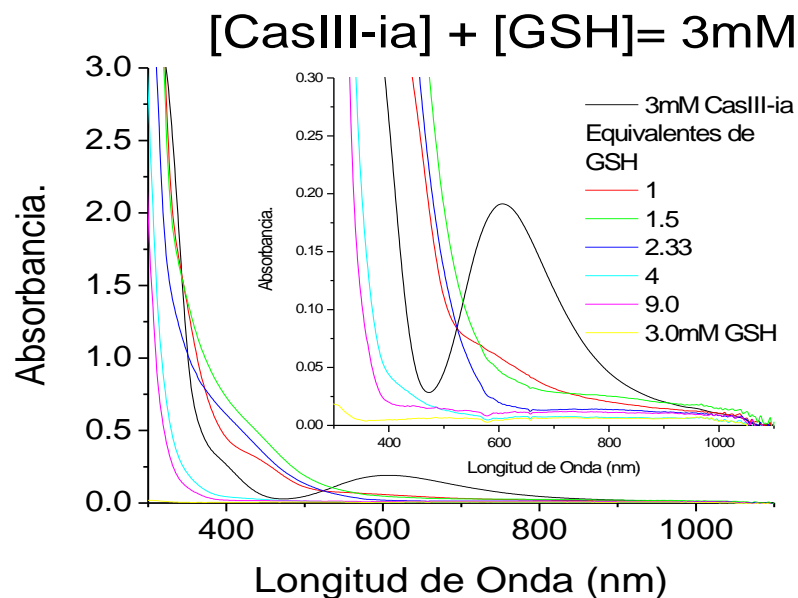
Después de 1.0 equivalente de GSH agregado a la disolución de **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** la absorbancia debida a la presencia de Cu<sup>(II)</sup> es prácticamente cero. Mientras que la banda en 400nm también disminuye hasta desaparecer (**gráfica 23**).



**Gráfica 22.**- absorbancia vs fracción molar de GSH en 600nm obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

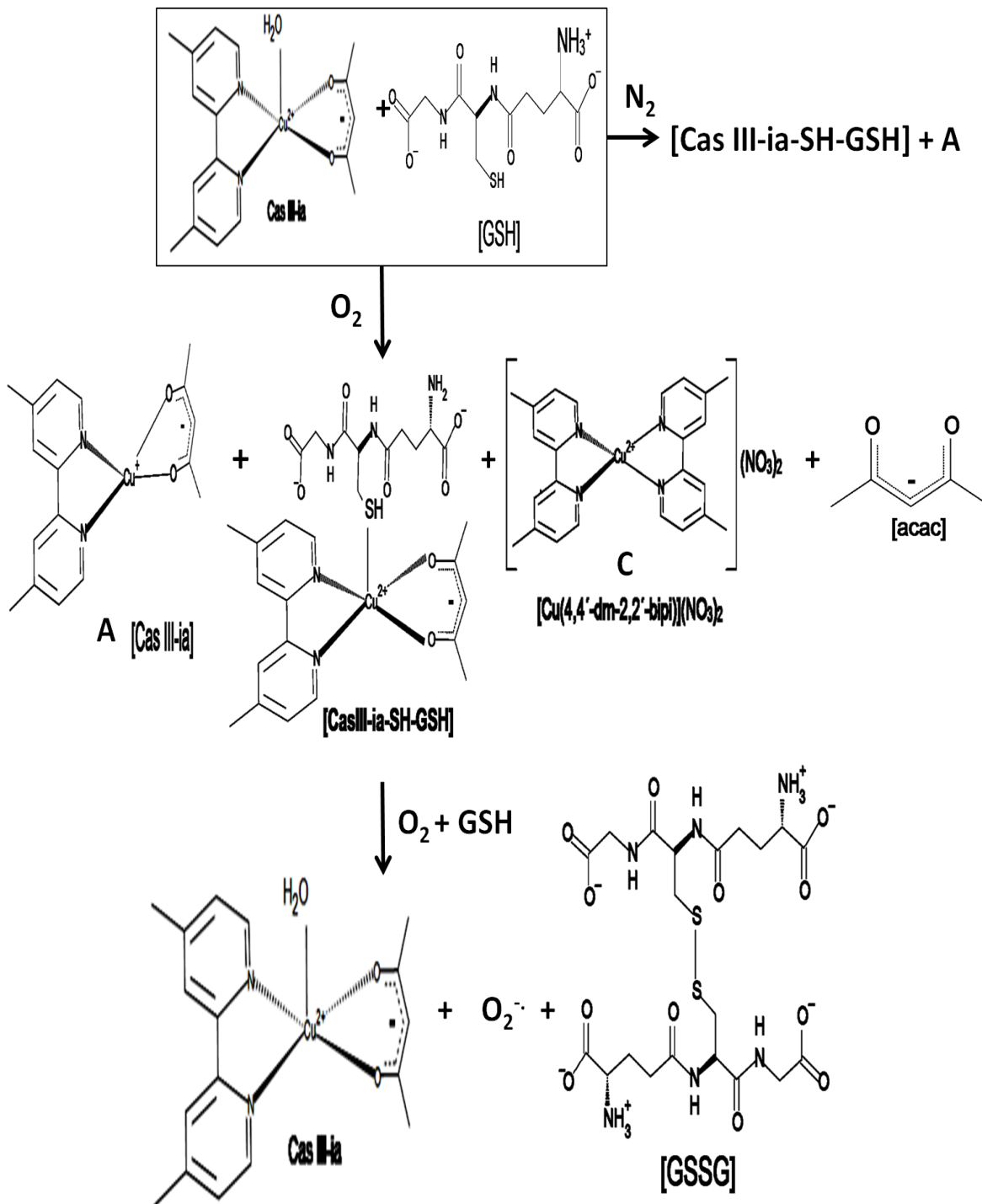


**Gráfica 23.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® III-ia** con diferentes fracciones molares ( $\chi$ ) (0.1 a 1.0) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.



**Gráfica 24.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® III-ia** con diferentes fracciones molares ( $\chi$ ) (1.0 a 9.0) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

En resumen, las especies que se presentan en disolución se muestran en la **figura 25**.



**Figura 25.-** Ciclo redox en el que participa la **Casiopeína<sup>®</sup>** III-ia en presencia de GSH, para los sistemas abierto y cerrado.

### 8.3.4.-Caracterización e identificación de los productos aislados en la interacción entre la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia** con GSH.

#### 8.3.4.1.- Interacción entre la **Casiopeína® II-gly** y GSH.

Los cambios observados en las mezclas de reacción ya fueron descritos en el estudio espectroscópico. En la disolución final se observó un sólido azul marino, el cual se filtró y mientras se secó cambió su coloración a azul claro. Este polvo azul se obtuvo en las reacciones Cas II-gly + GSH y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 4,7\text{-dm-1,10-fen} + \text{GSH}$ , mientras que la mezcla de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 4,7\text{-dm-1,10-fen} + \text{GSSG}$  llevó a la obtención de un sólido azul más intenso. Todos los sólidos aislados de las reacciones antes descritas son solubles únicamente en etilenglicol.

En el espectro IR de los tres sólidos se encontraron las bandas de vibración que presentan un desplazamiento importante comparando con el GSH [70] y GSSG libre. La ausencia de la banda en  $2523\text{cm}^{-1}$  asociada a la vibración  $\nu(\text{SH})$  indica que el grupo  $-\text{SH}$ , se encuentra desprotonado y oxidado de acuerdo a la banda que aparece en  $539\text{cm}^{-1}$  asociada a la vibración  $(\text{S-S})$ [71]. La banda en  $3260\text{ cm}^{-1}$  para la vibración  $\nu(\text{NH})$  en el GSSG se desplaza a  $3239\text{cm}^{-1}$ , además de las frecuencias de vibración  $\text{C=O}$  en  $1657\text{ cm}^{-1}$  desplazada a  $1643\text{ cm}^{-1}$  asignadas al grupo carboxilato coordinado. Para la 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina se observaron las frecuencias  $\nu(\text{C=C})$  en  $1523\text{ cm}^{-1}$  y  $\nu(\text{C=N})$  en  $1425\text{ cm}^{-1}$ , lo que permite establecer la coordinación de ambos ligantes (**tabla 13**).

**Tabla 13.-** Principales bandas de absorción en el infrarrojo de 4000-a 400cm<sup>-1</sup> en KBr para los productos obtenidos de la **Casiopeína® II-gly** con GSH.

		GSH y GSSG				fenantrolina		
		v SH	v NH	v (C=O) <sub>pep</sub>	v(S-S)	v (C=C)	v (C=N)	v (C=N)
GSH	GSH	2523	3340	1657	*			
GSSG	GSSG	*	3260	1635	534			
fen	4,7-dm-1,10-fenantrolina					1508	1414	724
		GSSG coordinado				fenantrolina coordinada.		
AS34	CasII gly + GSH	*	3239	1642	538	1523	1425	725
AS35	Cu <sup>+2</sup> +4,7-dm-fen+ GSH	*	3240	1643	539	1523	1425	726
AS49	Cu <sup>+2</sup> +4,7-dm-fen+ GSSG	*	3239	1642	538	1523	1425	725

El análisis elemental para los tres compuestos muestra la fórmula mínima [Cu<sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-fen)<sub>2</sub>(GSSG)] ajustado con seis moléculas de agua, con un peso molecular de 1260.3 g/mol. El momento magnético calculado en 3.0 MB aproximadamente, indicando que se tienen dos átomos de Cu<sup>(II)</sup> en la molécula, al obtener el valor correspondiente para cada electrón desapareado, se encuentra que el valor está ligeramente por debajo del valor esperado para Cu<sup>(II)</sup>, es probable que algunos átomos de Cu<sup>(II)</sup>, se encuentren tan cercanos, que puedan tener un comportamiento antiferromagnético. La cercanía puede deberse al empaquetamiento en estado sólido que pueden tener las moléculas orientándose por efecto de las nubes de densidad electrónica de las fenantrolinas, haciendo de esta forma que los Cu<sup>(II)</sup> se encuentren cercanos, no es posible que los átomos de Cu<sup>(II)</sup> de la misma molécula se encuentren cercanos, pues en la estructura que se propone, estos átomos están impedidos estéricamente posicionando a los átomos de Cu<sup>(II)</sup> en los extremos de la molécula (**tabla 14**).

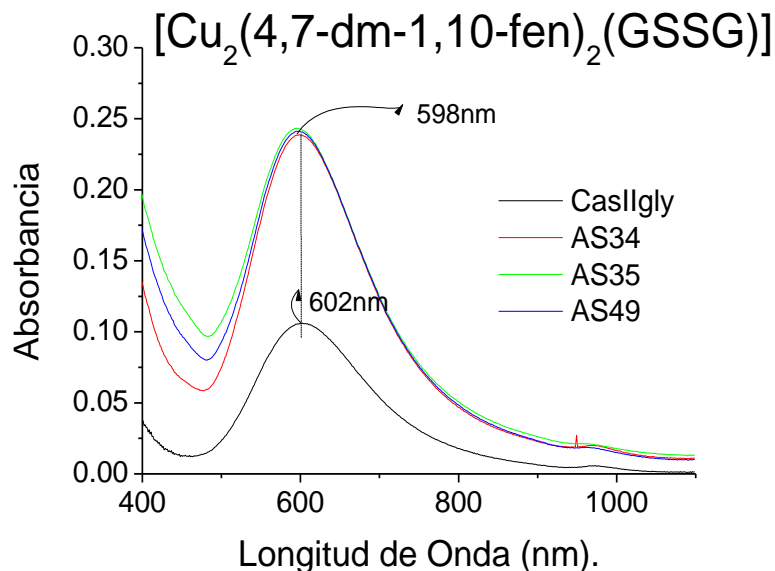
**Tabla 14** .- Caracterización de los productos obtenidos de la reacción entre la **Casiopeína® II-gly** y la síntesis  $\text{Cu}^{(II)}$ : 4,7-dm-1,10-fen: GSH y GSSG.

Compuesto (clave)	A.E. Exp (Cal) % C; % N; % H;%S	Fórmula	PM g/mol	$\mu^a_{\text{eff}}$ (MB)	$\mu^{\text{eff}}(\text{MB})$ por átomo de $\text{Cu}^{(II)}$	$\lambda^b_{\text{max}}$ (nm)
<b>bAS34</b> .-CasII gly + GSH	43.64; (45.74) 10.69; (11.11) 4.75; (5.11) 4.84; (5.08)	$\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{S}_2\text{O}_{12}\text{Cu}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1260.3	3.24	1.62	598
<b>AS35</b> $\text{Cu}^{(II)}$ : <b>4,7-dm-1,10-fen-GSH</b>	44.18; (45.74) 10.82 (11.11) 4.72 (5.11) 4.87 (5.08)	$\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{S}_2\text{O}_{12}\text{Cu}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1260.3	3.05	1.52	598
<b>AS49</b> $\text{Cu}^{(II)}$ : <b>4,7-dm-1,10-fen-GSH</b>	44.16; (45.74) 10.72; (11.11) 4.23; (5.11) 4.78; (5.08)	$\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{S}_2\text{O}_{12}\text{Cu}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1260.3	3.11	1.55	598

a valores obtenidos en sólido.

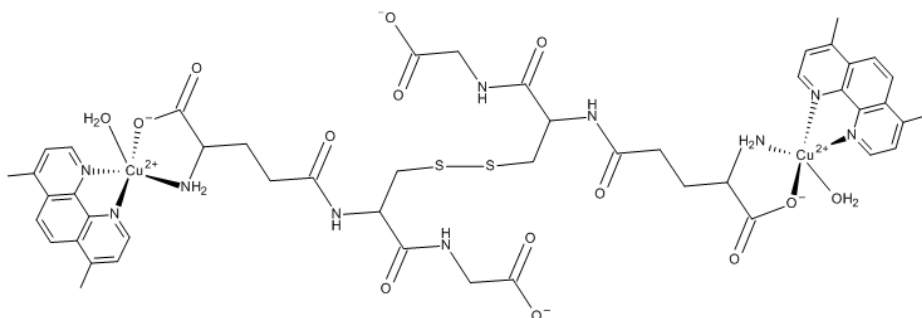
b valores obtenidos en etilenglicol 1mM.

El espectro Uv-vis obtenido en etilenglicol, muestra el mismo espectro para los tres compuestos, obteniendo un máximo de absorción en una longitud de onda de 598nm (**gráfica 24**).



**Gráfica 25**.- Espectro Uv-Vis obtenido en etilenglicol del producto  $[\text{Cu}_2(4,7\text{-dm-1,10-feni})_2(\text{GSSG})]$  aislado de las reacciones con GSH.

Los resultados obtenidos en la caracterización demuestran que el producto final de la reacción entre la **Casiopeína® II-gly** y GSH, es la sustitución del ligante glicinato, por el extremo glutamilo, del glutatión oxidado como se muestra en la **figura 26**.



**Figura 26.-** Estructura que corresponde con el compuesto GSH  $[Cu_2(4,7\text{-dm-}1,10\text{-feni})_2(\text{GSSG})]$  aislado de las reacciones con GSH.

En los antecedentes se mencionó que la **Casiopeína® II-gly** alteraba los niveles de glutatión reducido intracelular en células H157 y células A549 (ambas líneas celulares pertenecen a cáncer de pulmón). Al agregar al medio glutatión reductasa los niveles de glutatión reducido no se regeneraron por completo [72], por lo que se sugería una interacción covalente entre un porcentaje de GSH con la **Casiopeína®** provocando que el tiol no sea reconocido por la glutatión reductasa y a su vez regenerado. De acuerdo con la caracterización del producto final de la reacción entre **Casiopeína® IIgly** con GSH, si el producto  $[Cu(4,7\text{-dm-}1,10\text{-fen})_2(\text{GSSG})]$  se forma dentro de la célula puede ser el responsable de que la glutatión reductasa no reconozca al GSSG. Además de evitar la reducción de GSSG, el compuesto dinuclear puede excretarse de la célula y posteriormente eliminarse provocando un desbalance en el sistema de defensa celular [61].



### 8.3.4.2.- Interacción entre la **Casiopeína® III-ia** y GSH.

Los cambios observados en la mezcla de reacción ya se describieron anteriormente en el estudio espectroscópico. La mezcla final de la reacción se dejó secar en el vacío obteniendo un líquido azul rey muy denso, el cual fue lavado con éter para poder tener un sólido azul claro.

El espectro infrarrojo del sólido azul muestra las bandas que pertenecen a las vibraciones  $\nu$  (C=C) y  $\nu$  (C=N) de la biperidina coordinada, además de la banda para contra ión  $\text{NO}_3^-$  en  $1384 \text{ cm}^{-1}$ . Las frecuencias de vibración se asignaron de acuerdo a los valores reportados por el grupo de trabajo, los valores se encuentran en la **tabla 15**.

**Tabla 15.-** Principales bandas de vibración de la **Casiopeína® III-ia** recuperada después de su reacción con GSH.

Clave	Acetilacetato Coordinado		Biperidina coordinada				$\text{NO}_3$
	OH	$\nu_{\text{as}} \text{COO}^-$	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C-H)	
<b>AS45</b>	3428	1560	1620	1523	1490	829	1380

Los datos de caracterización del polvo aislado se encuentran en la **tabla 16**.

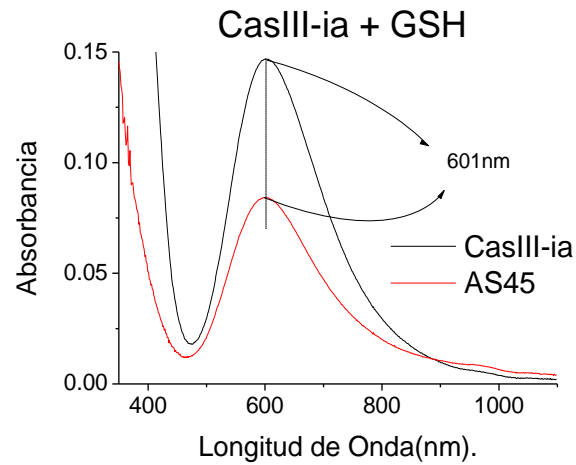
**Tabla 16 .-** Datos de caracterización de las **Casiopeínas® III-ia** recuperada.

Compuesto	A.E. Exp (Cal) % C; % N; % H	Fórmula	PM g/mol	$\mu^a_{\text{eff}}$ (MB)	$\Lambda^a$ ( $\text{Sm}^2/\text{mol}$ )	$\lambda^a_{\text{max}}$ (nm)
<b>CasIII-ia recuperada</b>	47.48; (47.83) 9.97; (9.84) 5.07 ;(4.96)	$\text{C}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{H}_{19}\text{Cu}$ $\cdot \text{H}_2\text{O}$	426.92	1.82	115	601

<sup>a</sup> valores obtenidos de una disolución acuosa 1mM en metanol.

En el espectro de la **figura 27** se muestra un comparativo entre la **Casiopeína® III-ia** sin reacción de reducción y **Casiopeína® III-ia**

recuperada, en ella se puede ver que tienen el mismo máximo de absorción y la misma forma.

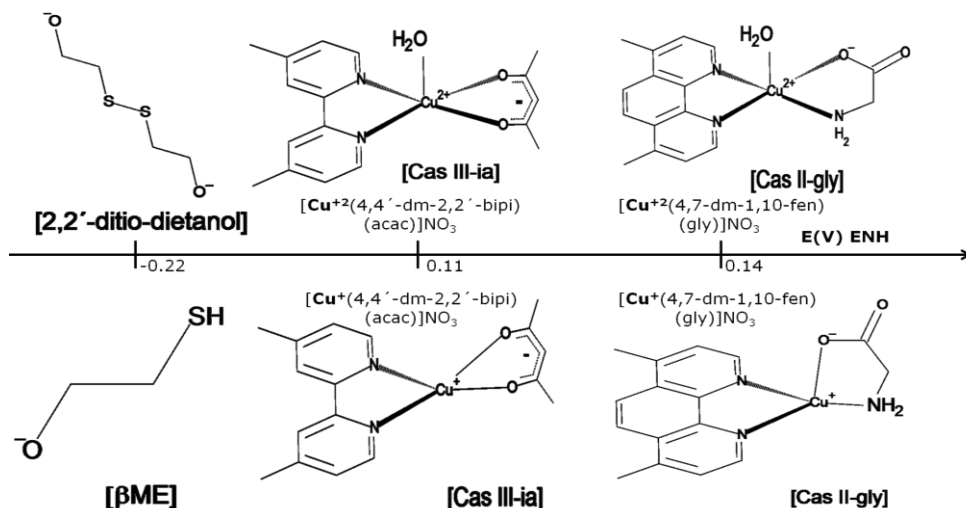


**Figura 27.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® III-ia** recuperada en comparación con una disolución sin reaccionar.

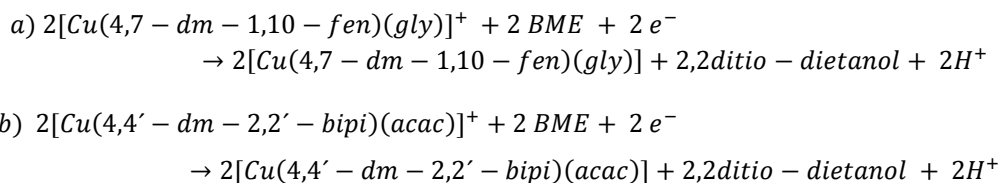
## 8.4.-Reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con 2-mercaptoetanol.

### 8.4.1.-Observaciones generales para la reactividad con 2-mercaptoetanol.

Con apoyo en el los potenciales oxidación-reducción referidos respecto al electrodo normal de hidrógeno reportados en el **diagrama 5** para **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** ( $E^{\circ}=147\text{mV}$ ), **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** ( $E^{\circ}=119\text{mV}$ ) [47] y  $\beta\text{ME}$  ( $E^{\circ}=-240\text{mV}$ )[50], se encuentra que la reacción de reducción del centro metálico es termodinámicamente favorable por la oxidación del  $\beta$ -mercaptoetanol a 2,2'-ditio-dietanol y la liberación de dos protones, reacción que se muestra en las **ecuaciones 11a y 11b**.



**Diagrama 5.-** Potenciales redox de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**, **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con  $\beta\text{ME}$ .



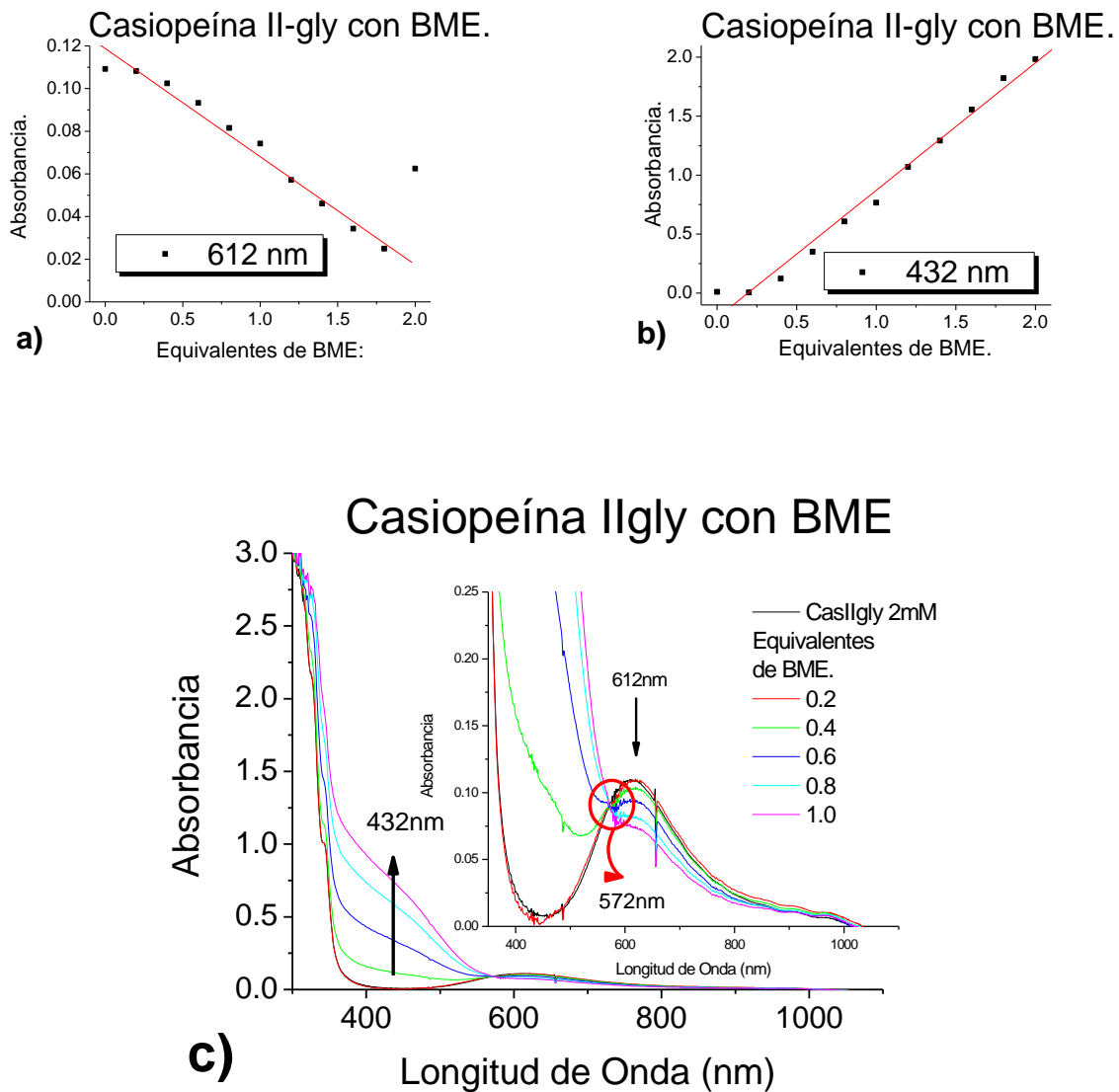
**Ecuación 11.-** Reacciones propuestas entre la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**, **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** y  $\beta\text{ME}$ .

La adición de BME a las disoluciones de **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** produjo el cambio inmediato en la coloración azul a diferentes tonos de naranja traslúcido en función de la concentración de  $\beta$ ME, obteniendo después de la equivalencia una disolución naranja intenso traslúcido, la tonalidad naranja permanece por algunos días en ausencia de  $O_2$ , de lo contrario, la tonalidad naranja se torna nuevamente azul en cuestión de segundos. Este cambio de coloración muestra la importancia que tiene la presencia del oxígeno en las mezclas de reacción, pues interviene en la auto oxidación del  $Cu^{(I)}$  generado.

### 8.4.2.-Reactividad de la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** con 2-mercaptoetanol en un sistema abierto (presencia de $O_2$ atmosférico).

La señal en 612nm con una absorbancia de 0.1090 perteneciente a la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** (2mM) disminuye su intensidad cuando se agregan diferentes alícuotas de  $\beta$ ME (**gráfica 25a**), este decremento se presenta en la misma longitud de onda y representa la reducción del  $Cu^{(II)}$  a  $Cu^{(I)}$  provocando la formación de un punto isobéptico en 572nm (**gráfica 25c**). El comportamiento descrito se mantiene hasta 1.8 equivalentes de  $\beta$ ME, encontrando que aún existe la señal asociada al  $Cu^{(II)}$  en la disolución a pesar de estos equivalentes. El  $Cu^{(II)}$  existente forma el intermediario  $[Cu^{(II)}(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-\beta ME)]^+$  que ya no es posible observar debido a su baja absorbancia en 612 nm pero se observa la señal característica de transferencia de carga  $S(\sigma) \rightarrow Cu^{(II)}$  en 432nm, señal que se intensifica en función de la concentración de  $\beta$ ME agregado (**gráfica 25b**). La presencia de oxígeno regenera el metal en estado de oxidación (II) provocando que sea susceptible a una nueva

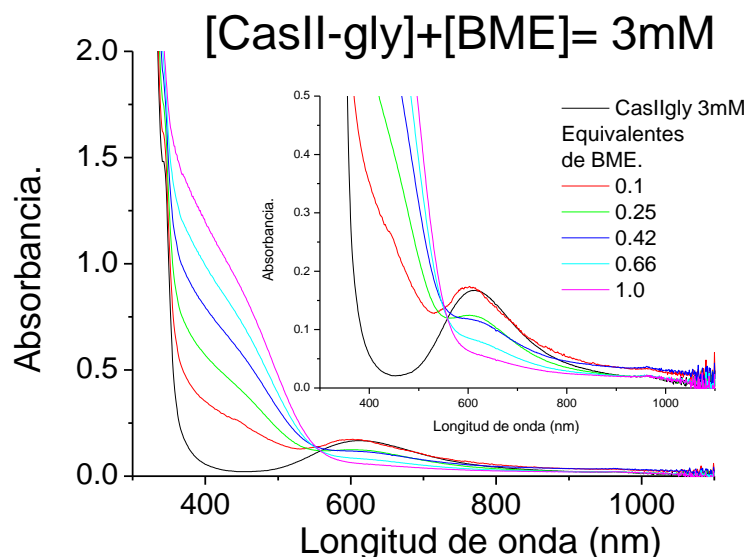
coordinación con  $\beta$ ME, esta regeneración es la que permite explicar el comportamiento observado en las **gráficas 25 a, b, c**, donde la absorbancia en 612 nm disminuye en todos los equivalentes de  $\beta$ ME agregado, mientras que en 432 nm la absorbancia incrementa.



**Gráfica 26.-** a) Absorbancia vs equivalentes de  $\beta$ ME en 612nm; b) Absorbancia vs equivalentes de  $\beta$ ME en 432nm; los datos de las gráficas a y b fueron obtenidos de la gráfica c; c) Espectro UV-Vis de la **Casiopeína® II-gly** (2mM) con diferentes concentraciones (0 a 2.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto

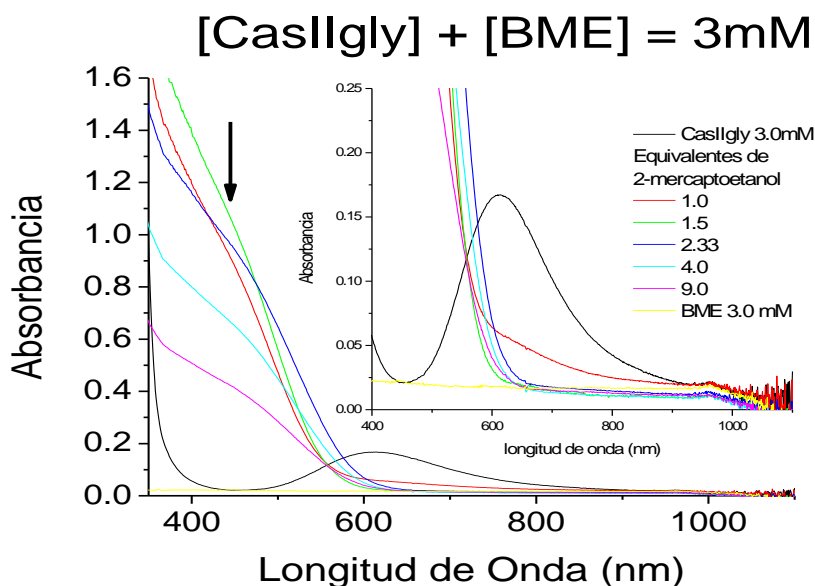
### 8.4.2.1.-Reactividad de la **Casiopéina® II-gly** con 2-mercaptoetanol en un sistema cerrado (atmósfera de N<sub>2</sub>).

En el sistema cerrado la adición de hasta 1.5 equivalentes de  $\beta$ ME presenta el mismo comportamiento que en el sistema abierto. Se observa la disminución de la absorbancia en 612nm acompañada de un incremento en la absorbancia en 432nm (**gráfica 26**). El consumo de 0.5 equivalentes adicionales puede deberse a la preferencia de  $\beta$ ME a coordinarse con la especie de Cu<sup>(I)</sup> generada que a seguir participando en el proceso de reducción. Lo anterior podría ayudar a explicar por qué la banda en 432 nm aparenta un incremento constante en función de los equivalentes agregados de  $\beta$ ME, pues sería la suma de las contribuciones de la transferencia de carga de las especies Cu<sup>(I)</sup>-fenantrolina ( $d-\pi$ ) entre 300nm y 400nm, S( $\sigma$ ) $\rightarrow$  Cu<sup>(II)</sup> ( $dx^2-dy^2$ ) entre 400nm y 450nm y S( $\sigma$ ) $\rightarrow$  Cu<sup>(I)</sup> en 350nm aproximadamente [73].



**Gráfica 27.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina® II-gly** a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 0.1$  a 1.0 (2.7 hasta 1.5 mM) de  $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

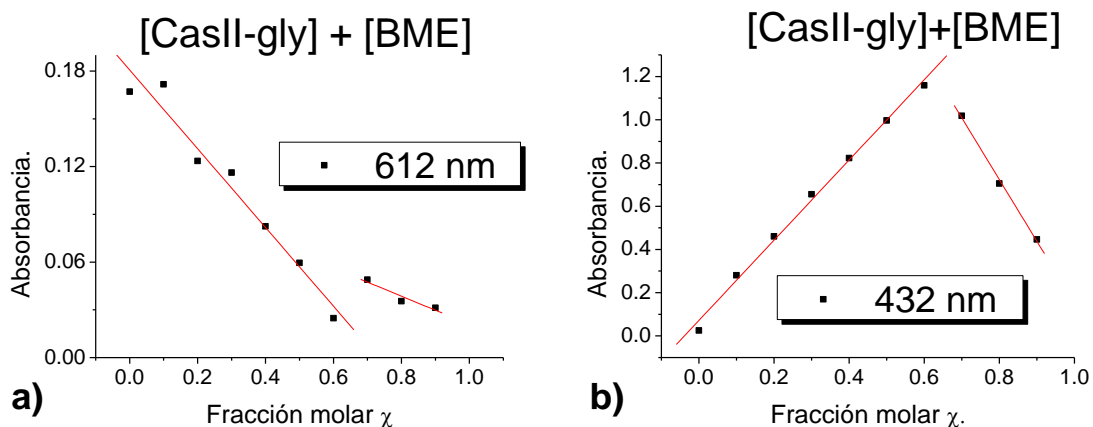
Cuando se agrega una concentración mayor a 1.0 equivalente de de  $\beta$ ME ambas bandas disminuyen, tanto en 612nm como en 432nm. A diferencia del sistema abierto, en este sistema no existe  $O_2$  que pueda reaccionar con las especies de  $Cu^{(I)}$  para regenerar especies de  $Cu^{(II)}$  susceptibles a coordinarse con  $\beta$ ME y hacer que la banda de 432 nm siga incrementando (**gráfica 27**).



**Gráfica 28.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® II-gly** a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 1.0$  a 9.0 (1.5 mM a 3mM) de  $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.

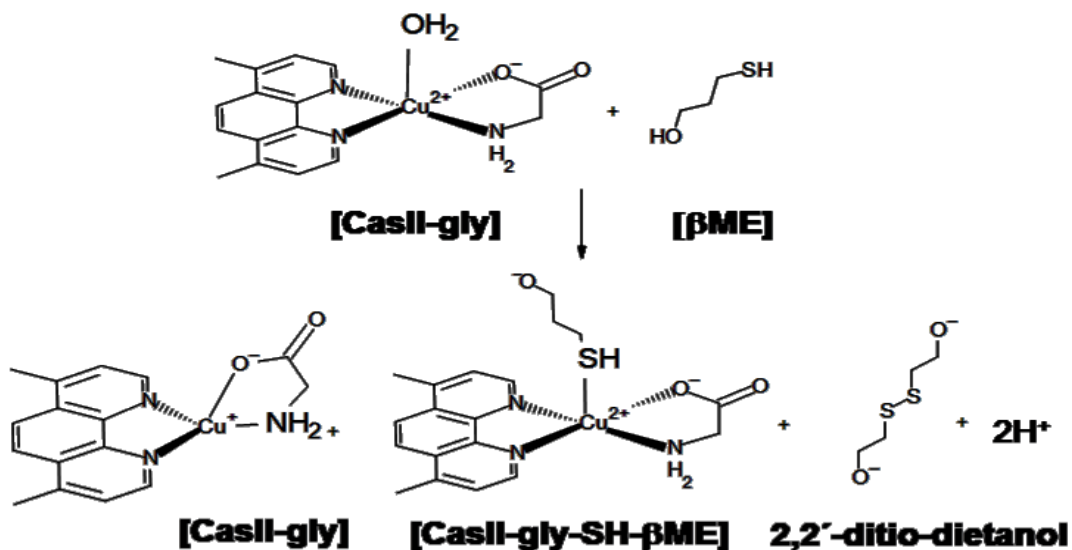
En la **gráfica 28a** se puede observar la disminución de la absorbancia en 612 nm asociada a la reducción del centro metálico cuando se agregan diferentes fracciones molares de  $\beta$ ME, mientras que en la **gráfica 28b** se observa como incrementa la señal en 432nm por la formación de la especie  $[Cu^{(II)}(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-\beta ME)]^+$  hasta 2.5 equivalentes de  $\beta$ ME agregado. Cuando se agregaron más de 2.5 equivalentes de  $\beta$ ME lo que se observa es la pérdida de la

absorbancia por la reducción de la especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+$ .



**Gráfica 29** .- a) absorbancia vs fracción molar de la **Casiopeína® II-gly** con  $\beta$ ME desde 0 a 1.0 fracción mol en 612nm y b) absorbancia vs fracción molar de la **Casiopeína® II-gly** con  $\beta$ ME desde 0 a 1.0 fracción mol en 432nm; los datos para las gráficas se obtuvieron de las gráficas 25 y 26.

De acuerdo con los resultados del estudio espectroscópico se puede decir que una fracción de la **Casiopeína® II-gly** es reducida por el  $\beta$ ME, mientras que otra fracción presenta una reacción de adición por parte del azufre del  $\beta$ ME como se muestra en la **figura 28**.

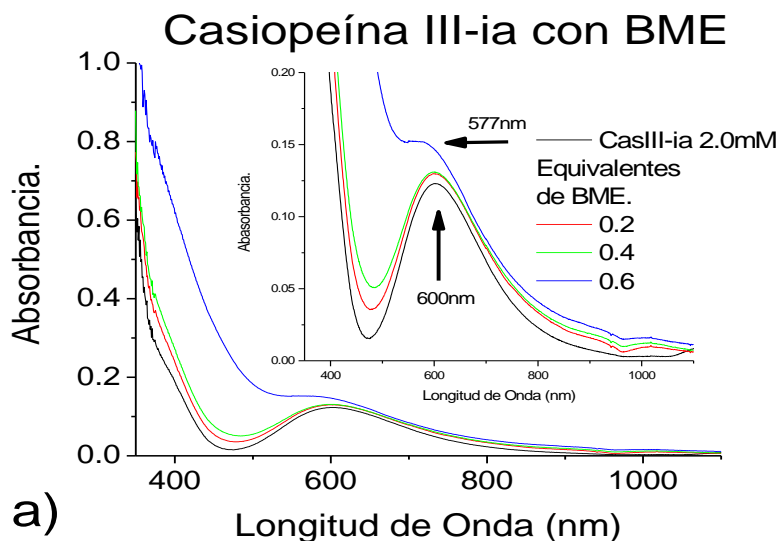


**Figura 28**.- Mecanismo propuesto de acuerdo con los cambios observados en el estudio espectroscópico para la reducción de la **CasII-gly** en presencia de  $\beta$ ME.

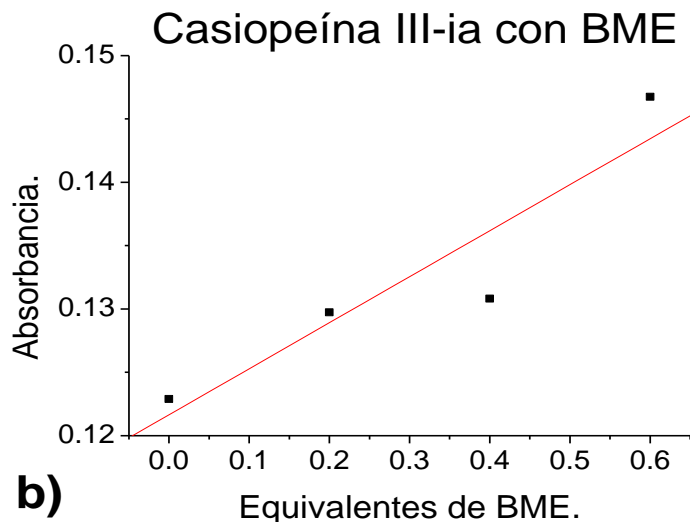


### 8.4.3 Reactividad de la **Casiopeína® III-ia** con 2-mercaptoetanol en un sistema abierto (presencia de O<sub>2</sub> atmosférico).

El espectro Uv-vis de la **Casiopeína® III-ia** (2mM) mostró sólo una señal en 600nm que incrementa su absorbancia cuando se adicionaron hasta 0.6 equivalentes de  $\beta$ ME, la absorbancia incrementó con un desplazamiento de la longitud de onda hasta 577nm (**gráfica 29a**). Esto se asoció a la formación de una nueva especie de Cu<sup>(II)</sup> con un coeficiente de absortividad molar mayor a la **Casiopeína® III-ia**, lo que provocó el desplazamiento de la longitud de onda. En la **gráfica 29b** se observó el incremento de la absorbancia en función de la concentración de  $\beta$ ME hasta 0.6 equivalentes de  $\beta$ ME agregados.



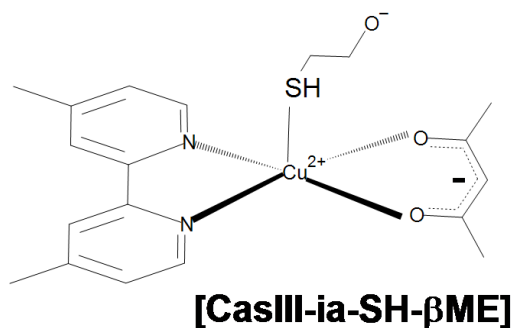
**Gráfica 30 a.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína® III-ia** (2mM) con diferentes concentraciones (0 a 1.2mM) de  $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.



**Gráfica 31b.**-Absorbancia vs equivalentes de  $\beta$ ME en 600nm, los datos fueron obtenidos de la gráfica (a).

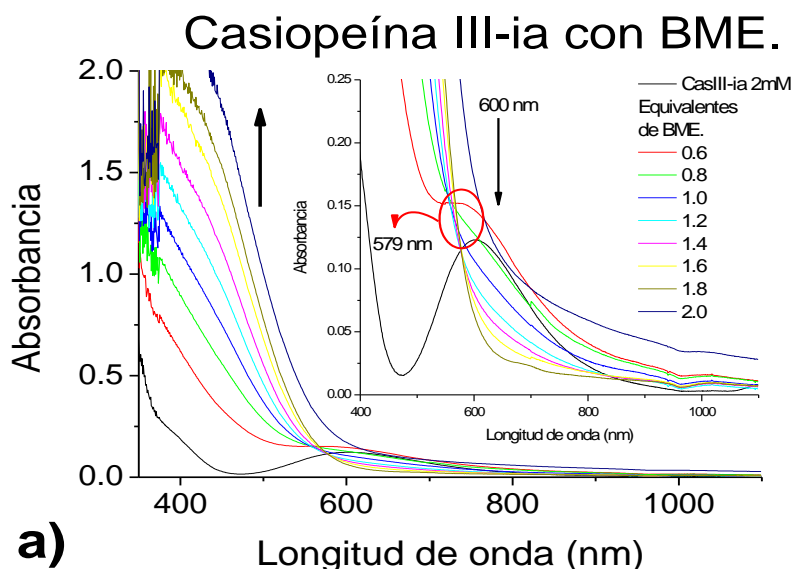
La señal que aparece entre 400nm y 450nm incrementa su absorbancia en función de la cantidad de reductor agregado y presenta la forma característica de la coordinación de un átomo de azufre al átomo de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$ , por lo que esta deformación en la señal se asigna a una transferencia de carga  $\text{S}(\sigma) \rightarrow \text{Cu}^{(\text{II})}(\text{dx}^2\text{-dy}^2)$ .

De acuerdo con las modificaciones observadas en el espectro Uv-vis, la especie propuesta  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(\text{4,4}'\text{-dm-2,2}'\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+$  se dibuja en la **figura 29**.

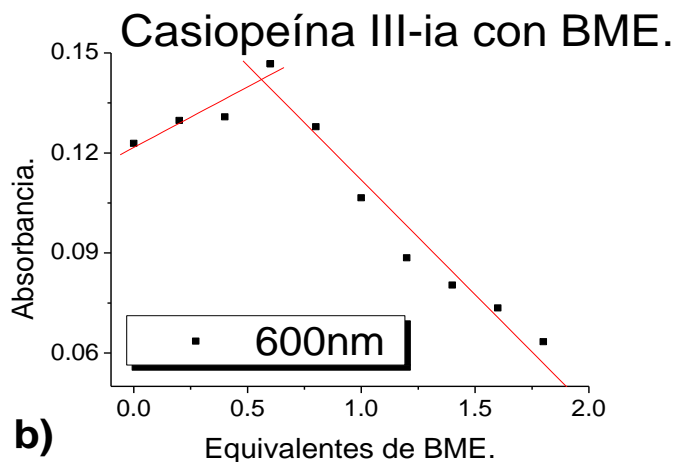


**Figura 29.**-Especie  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(\text{4,4}'\text{-dm-2,2}'\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+$  propuesta de acuerdo a los cambios observados en el estudio.

Después de 0.6 y hasta 1.8 equivalentes de  $\beta$ ME, la absorbancia disminuyó en 577nm de forma proporcional en función del  $\beta$ ME agregado (**gráfica 30a**), por la reducción del centro metálico  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  a  $\text{Cu}^{(\text{I})}$ , este equilibrio de especies trae como consecuencia la formación de un punto isobéptico en 579nm. Cuando están presentes 2.0 equivalentes el espectro ya no intersectó el punto isobéptico, por ser solamente una especie de  $\text{Cu}^{(\text{I})}$ . Mientras que entre 400nm-450nm la señal asignada a la transferencia de carga  $\text{S}(\sigma) \rightarrow \text{Cu}^{(\text{II})}_{(dx^2-dy^2)}$  incrementó su absorbancia hasta saturarse, debido a que la presencia de  $\text{O}_2$  regenera especies de  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  en donde se pueden coordinar átomos de azufre de  $\beta$ ME. En la **gráfica 30b** se observó la disminución de la absorbancia después de 0.6 equivalentes de  $\beta$ ME, siendo necesario más de 2.0 equivalentes para reducir todo el  $\text{Cu}^{(\text{II})}$  presente en la disolución, ya sea como **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** o como  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(4,4'\text{-dm-2,2'\text{-bipi})(acac)(\text{SH-}\beta\text{ME})}]^+$ .

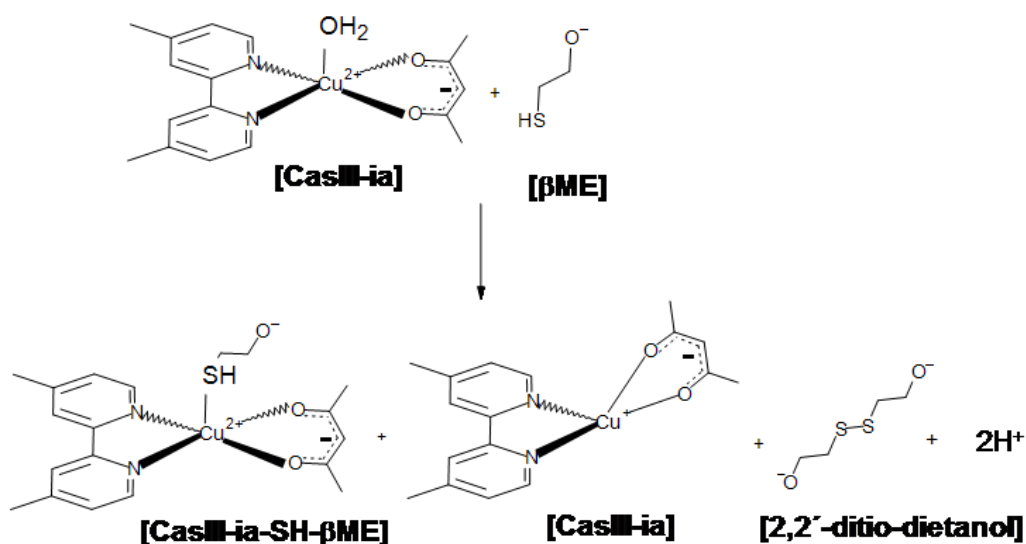


**Gráfica 32a.-** Espectro Uv-Vis de la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** (2mM) con 0.6 hasta 2.0 equivalentes de  $\beta$ ME (1.2 a 4.0mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.



**Gráfica 33b.**-Absorbancia vs. Concentración de  $\beta$ ME agregado, los datos fueron obtenidos de la gráfica a.

De forma cualitativa se puede decir que la reacción entre la **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** y  $\beta$ ME es la formación de la especie  $[\text{Cu}^{\text{II}}(4,4'\text{-dm-2,2-bipi})(\text{acac})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+$  con 0.6 equivalentes de  $\beta$ ME y la reducción con 0.8 y hasta 2.0 equivalentes de  $\beta$ ME, sin embargo, no es suficiente para tener todo el  $\text{Cu}^{\text{II}}$  reducido. Las reacciones propuestas se muestran en la **figura 30**.



**Figura 30.**- Mecanismo propuesto de acuerdo a lo observado en el estudio espectroscópico de la reacción **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** y  $\beta$ ME en un sistema abierto.

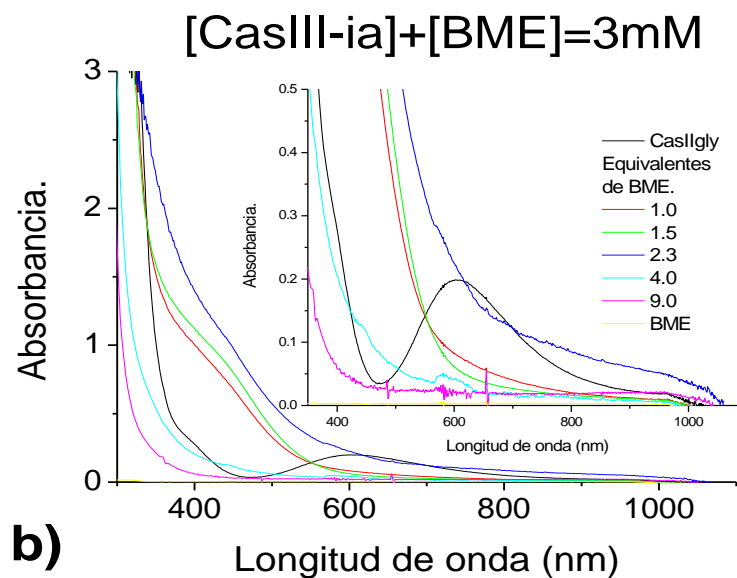
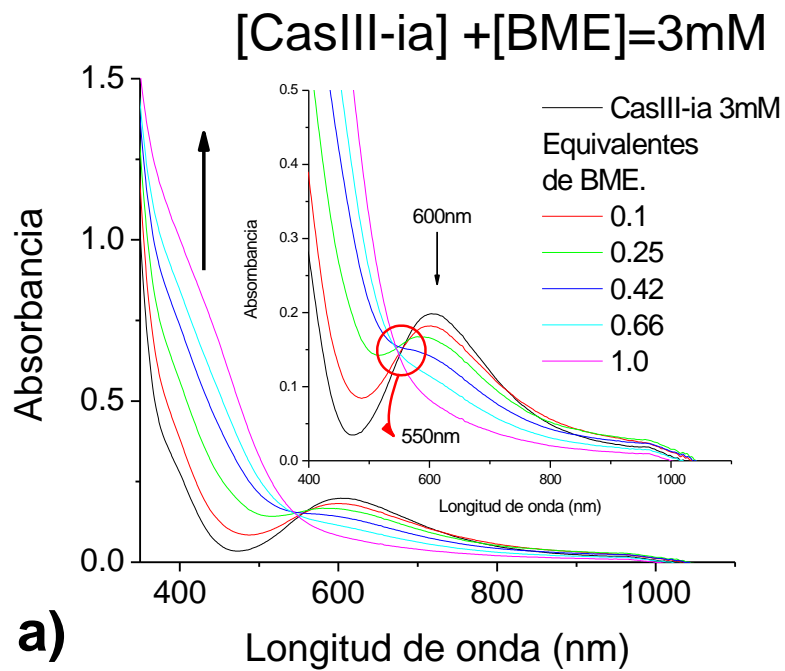
### 8.4.3.1.-Reactividad de la **Casiopeína® III-ia** con 2-mercaptoetanol en un sistema cerrado (atmósfera de N<sub>2</sub>).

La adición de hasta 1.0 equivalente de  $\beta$ ME provocó la disminución proporcional de la absorbancia en la señal de 600nm en función de la concentración de  $\beta$ ME en la misma longitud de onda por la reducción de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup>, equilibrio de especies que provocan la formación de un punto isobéptico en 550nm.

La formación de un hombro entre 400 y 450nm muestra la formación de una especie  $[\text{Cu}^{(\text{II})}(\text{4,4}'\text{-dm-2,2}'\text{-bipi})(\text{acac})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+$  (**gráfica 31a**).

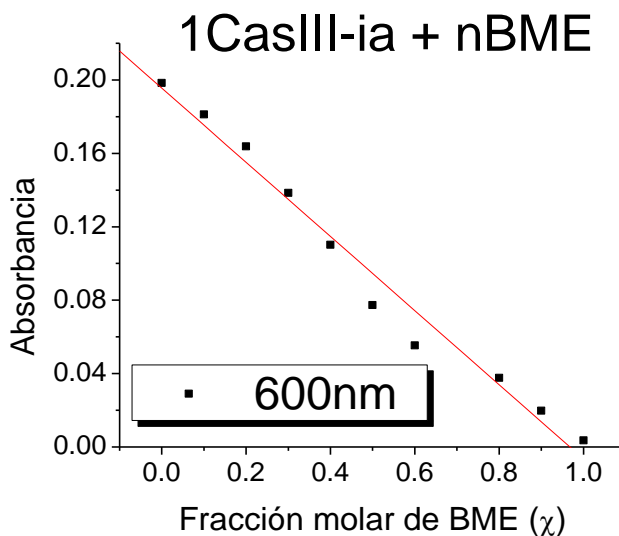
Después de agregar 1.5 equivalentes de  $\beta$ ME la absorbancia en 600nm disminuyó hasta ser prácticamente cero por la transformación completa a Cu<sup>(I)</sup> (**gráfica 31b**). Mientras que la señal en 400nm también disminuye hasta desaparecer.

La **gráfica 32** muestra la reducción del centro metálico en diferentes fracciones molares de  $\beta$ ME, sin embargo el proceso que se lleva a cabo se muestra en la **figura 30**.



**Gráfica 34** .- **a)** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 0$  a 1.0 (0 hasta 1.5mM) de  $\beta$ ME; **b)** Espectro Uv-Vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con una diferente fracción molar  $\chi = 1.0$  a 9.0 (1.5mM hasta 3mM) de  $\beta$ ME, los espectros fueron obtenidos en medio

amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.



**Gráfica 35.-** Absorbancia vs fracción molar de  $\beta$ ME en 600nm obtenida a partir de la grafica 31 a y b.

En este punto es importante resaltar que la reactividad de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> frente a los tres reductores muestra un comportamiento diferente en cuanto a la facilidad de reducción en el sistema abierto. Para determinar cual reductor transforma más **Casiopeína**<sup>®</sup> se obtiene la concentración de  $\text{Cu}^{\text{(II)}}\text{-SH}$  formada con 1.0 equivalente de reductor a partir del coeficiente de absortividad molar obtenido en el sistema cerrado en una longitud de onda de 400 a 450 nm aproximadamente los datos de coeficiente de absortividad molar para la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** son :  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+ = 1076.86 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-GSH})]^+ = 1384.33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+ = 756 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y para la **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** :  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+ = 702.09 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ;  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-GSH})]^+ = 782.66 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-}\beta\text{ME})]^+ = 452 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  . Para la **Casiopeína**<sup>®</sup> **IIgly** se obtienen los siguientes valores  $9.82 \times 10^{-5} \text{ M}$  con

$\beta$ ME,  $1.24 \times 10^{-4}$  M con GSH y  $7.62 \times 10^{-4}$  M con cys, mientras que para **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** los valores son  $1.36 \times 10^{-4}$  M con GSH,  $2.82 \times 10^{-4}$  M con  $\beta$ ME y  $8.31 \times 10^{-4}$  M con cys.

Si se comparan las concentraciones de Cu<sup>(II)</sup>-SH entre la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia**, se puede decir que la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** presenta una mayor transformación de Cu<sup>(II)</sup> a Cu<sup>(I)</sup>. Si comparamos las concentraciones para cada **Casiopeína<sup>®</sup>**, se puede ver que la **Casiopeína<sup>®</sup> IIgly** tiene una mayor transformación en presencia de  $\beta$ ME, seguida de GSH y por ultimo con cys, mientras que la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** tiene una mayor transformación con GSH seguida de  $\beta$ ME y por último cys.

La reacción con cisteína es la que más Cu<sup>(II)</sup> presenta, este comportamiento puede deberse a la velocidad de reducción informada como lenta en la literatura [61, 74].

#### 8.4.4.-Caracterización e identificación de los productos aislados en la interacción entre **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** con 2-mercaptoetanol.

Con los resultados obtenidos en el estudio espectroscópico se determinó que la reducción de las **Casiopeínas<sup>®</sup>** está en función de la concentración de  $\beta$ ME, por lo cual se prepararon disoluciones para poder obtener cantidades suficientes de **Casiopeína<sup>®</sup>** y confirmar que aunque se tienen reacciones de adición del átomo de azufre a la **Casiopeína<sup>®</sup>** el producto aislado es la **Casiopeína<sup>®</sup>** dada la poca capacidad de coordinación de  $\beta$ ME.

##### 8.4.4.1.-Interacción entre la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y $\beta$ ME.



Los cambios observados al realizar a mezcla de reacción fueron los mismos descritos en el estudio espectroscópico. El disolvente de la mezcla de reacción fue evaporado, obteniendo un sólido azul con una apariencia aceitosa, fue lavado con acetona obteniendo un sólido azul, soluble en agua y metanol.

### 8.4.4.2.- Interacción entre la **Casiopeína® III-ia** y $\beta$ ME.

Los cambios observados al realizar a mezcla de reacción fueron los mismos descritos en el estudio espectroscópico. El disolvente de la mezcla de reacción se evaporó, obteniendo un sólido azul esmeralda que se lavó con acetona obteniendo un sólido azul, soluble en agua y metanol.

### 8.4.4.3.-Espectroscopia Infrarroja de los productos aislados entre la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia** con $\beta$ ME.

En los espectros IR obtenidos de la **Casiopeína® II-gly** y **Casiopeína® III-ia**, se identificaron las vibraciones que pertenecen al glicinato y la fenantrolina coordinados y al  $\text{COO}^-$  del acetilacetato y la biperidina coordinados, la señal para el ion nitrato se encontró en 1384 y 1388  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Los valores para las frecuencias de absorción reportadas en la **tabla 17**, fueron asignados de acuerdo a los valores reportados por el grupo de trabajo [60, 75].

**Tabla 16-** Datos obtenidos del análisis Infrarrojo ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ ) de la reacción AS44) **CasII gly** + 2-mercaptoetanol y AS48) **CasIII-ia** + 2-mercaptoetanol.

Compuesto	OH	glicina coordinada				fenantrolina coordinada				$\text{NO}_3$
		$\nu$ $\text{NH}_2$	$\nu$ $\text{NH}_2$	$\nu_{\text{as}}$ $\text{COO}^-$	$\delta$ $\text{NH}_2$	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (C=C)	$\nu$ (C=N)	
CasII-gly + $\beta$ ME		3420	3300	1650	649	1580	1425	872	727	1380
	OH	acac <sup>-</sup> coordinado				biperidina coordinada				

		$\nu_{\text{as COO}^-}$	$\nu (\text{C=N})$	$\nu (\text{C=C})$	$\nu (\text{C=C})$	$\nu (\text{C-H})$	
CasIII-ia + $\beta$ ME	3457	1590	1618	1519	1492	774	1390

Los resultados de análisis elemental confirman la fórmula mínima  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_4\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$  con un peso molecular de 443.89 g/mol para la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**, mientras que la fórmula mínima obtenida para la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** es  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_3\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 427.91 g/mol peso molecular. El momento magnético corresponde a un electrón desapareado para la especie de Cu<sup>(II)</sup> observando la señal que provocan las transiciones electrónicas en un sistema  $d^9$  obteniendo los máximos de absorción en 604nm y 601nm respectivamente, confirmando que se trata de un electrolito 1:1 por los valores de conductividad obtenidos y que concuerda con la banda de  $\text{NO}_3^-$  observada en el espectro IR. Todos estos valores para ambas **Casiopeínas<sup>®</sup>** se muestran en la **tabla 18**.

**Tabla 17 .-** Datos de caracterización de las **Casiopeínas<sup>®</sup>** después de la reacción redox.

Clave	Compuesto	A.E. Exp (Cal) % C; % N; %H;%S	Fórmula	PM g/mol	$\mu^{\text{a}}_{\text{eff}}$ (MB)	$\Lambda^{\text{b}}$ ( $\text{Sm}^2/\text{mol}$ )	$\lambda^{\text{c}}_{\text{max}}$ (nm)
AS44	CasII-gly	43.50; (43.29) 12.75; (12.62) 4.39; (4.54)	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$ $\bullet 2\text{H}_2\text{O}$	443.89	1.66	83.6	604
AS48	CasIII-ia	48.89; (43.29) 10.58; (12.62) 5.69; (4.54)	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cu}$ $\bullet \text{H}_2\text{O}$	427.91	1.78	91.4	601

a valores obtenidos en sólido.

b valores obtenidos de una disolución 1mM en metanol.

c valores obtenidos de una disolución 2mM en metanol.

Los datos de caracterización confirman que la **Casiopeína<sup>®</sup> II gly** y **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** participan en un ciclo redox, aun cuando aparentemente el  $\beta$ ME se coordina con la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** (**figura 32**).

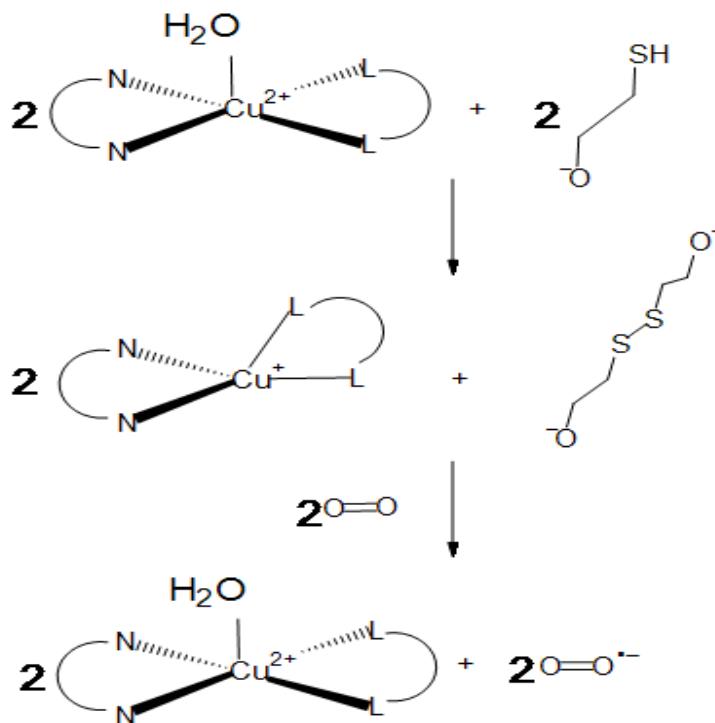


Figura 31.- Ciclo redox para el centro metálico de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> en presencia de βME y O<sub>2</sub>.

### 9.- Conclusiones.

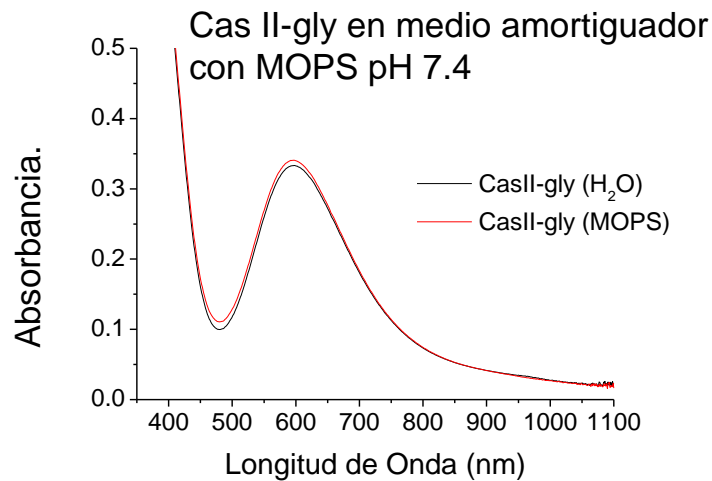
- La reactividad de las **Casiopeínas**<sup>®</sup> no sólo depende de su potencial redox, también depende de la capacidad de coordinación de los reductores y de la estabilidad del intermediario [Casiopeína<sup>®</sup>-SH] formado.
- La especie que se forma por la presencia de **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** y cisteína en una relación estequiométrica 1:1 es  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-fen})(\text{gly})(\text{SH-cys})]^+$ . Esta especie presenta una reacción de reducción cuando la cisteína excede la equivalencia y la re-oxidación del metal trae como consecuencia la obtención de bis quelato de fenantrolina  $[\text{Cu}(4,7\text{-dm-1,10-fen})_2](\text{NO}_3)_2$ , y  $[\text{Cu}(\text{cistínato})]_n$  como productos finales.
- La especie  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})(\text{SH-cys})]^+$  se forma por la presencia de **Casiopeína**<sup>®</sup> **III-ia** y cisteína en una relación estequiométrica 1:1. Al igual que con **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** el exceso de tiol provoca la reducción del metal y este sistema en presencia de oxígeno genera los productos bis quelato de fenantrolina  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})_2](\text{NO}_3)_2$ , y  $[\text{Cu}(\text{cistínato})]_n$ .
- La formación del compuesto identificado como  $[\text{Cu}_2(4,7\text{-dm-1,10-fen})_2(\text{GSSG})]$ , puede ser una de las probables causas de la disminución de GSH intracelular.
- El intermediario que se forma entre la **Casiopeína**<sup>®</sup> **II-gly** y el GSH cuando la relación estequiométrica es 1:1  $[\text{Cu}^{\text{(II)}}(4,7\text{-dm-1,10-$

fen)(gly)(SH-GSH)]<sup>+</sup> se reduce cuando se excede la relación 1:1, obteniendo al final de la reacción [Cu<sub>2</sub>(4,7-dm-1,10-fen)<sub>2</sub>(GSSG)].

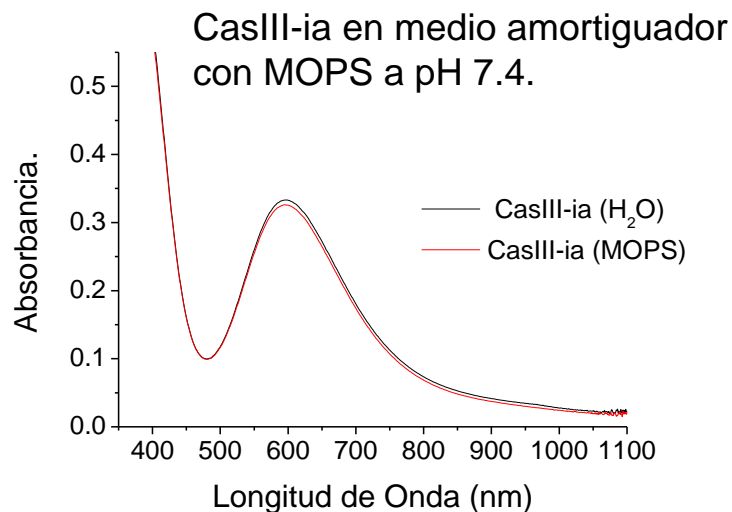
- La **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** presenta una coordinación por el átomo de azufre de GSH, formando un intermediario [Cu<sup>(II)</sup>(4,4-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-GSH)]<sup>+</sup>. El intermediario formado se reduce con un exceso de GSH. En presencia de O<sub>2</sub> el producto obtenido es nuevamente la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia**.
- La **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** al reaccionar con βME forma [Cu(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-βME)] que se reduce al existir un exceso de βME. El producto al final de la reacción en presencia de oxígeno es la **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly**.
- La **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** presenta la reducción del centro metálico una vez que se forma la especie [Cu<sup>(II)</sup>(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-βME)]<sup>+</sup> con un exceso de βME. El producto obtenido después de que reacciona la especie reducida con O<sub>2</sub> es la **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia**.
- En todas las reacciones se propone que la oxidación de Cu<sup>(I)</sup> es provocada por O<sub>2</sub> formando radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).

## 10.-Anexo I.

A.- Espectros obtenidos en disolución acuosa y medio amortiguado con MOPS.



**Gráfica 36.-** Espectro UV-vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> II-gly** (2mM) obtenido en disolución acuosa y en medio amortiguado, para comprobar que no hay cambios en el espectro por la presencia del MOPS.



**Gráfica 37.-** Espectro UV-vis de la **Casiopéina<sup>®</sup> III-ia** (2mM) obtenido en disolución acuosa y en medio amortiguado, para comprobar que no hay cambios en el espectro por la presencia del MOPS.

## 10.1.-Espectroscopía infrarroja.

Casiopeína® II-gly preparada.									
	glicinato coordinado				fenantrolina coordinada				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> iónico
OH	vNH <sub>2</sub>	vNH <sub>2</sub>	vas COO <sup>-</sup>	δNH <sub>2</sub>	v(C=C)	v(C=N)	v(C=C)	v(C=N)	
3414	3446	3255	1602	637	1525	1429	871	727	1384

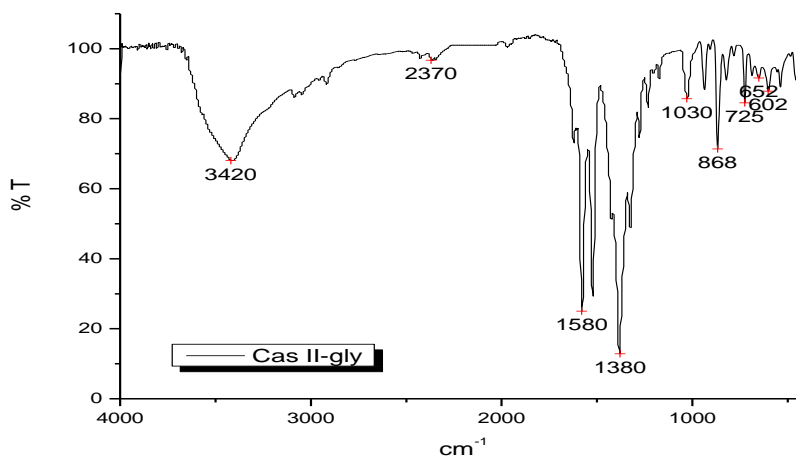


Figura 32.-Espectro infrarrojo de la Casiopeína® II-gly preparada.

Casiopeínas® III-ia preparada.						
	acac coordinado	bipiridina coordinada			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> iónico	
OH	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>	v(C=C)	v(C=N)	v(C=C)	v(C-H)	
3463	1587	1616	1525	1490	730	1384

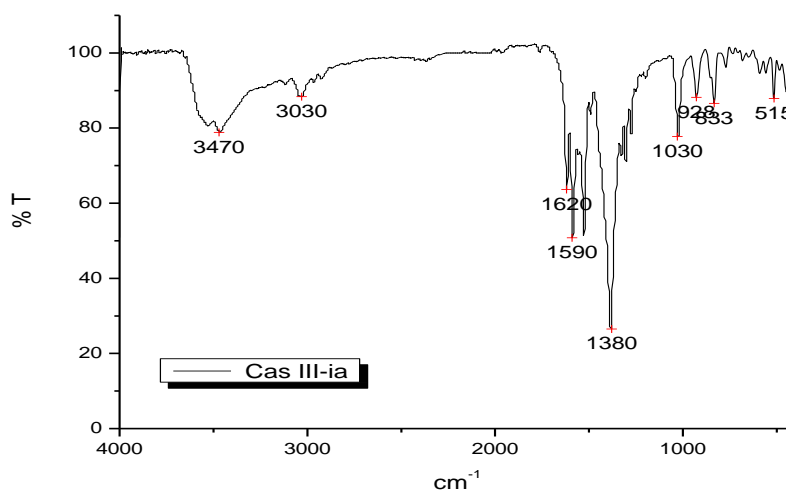
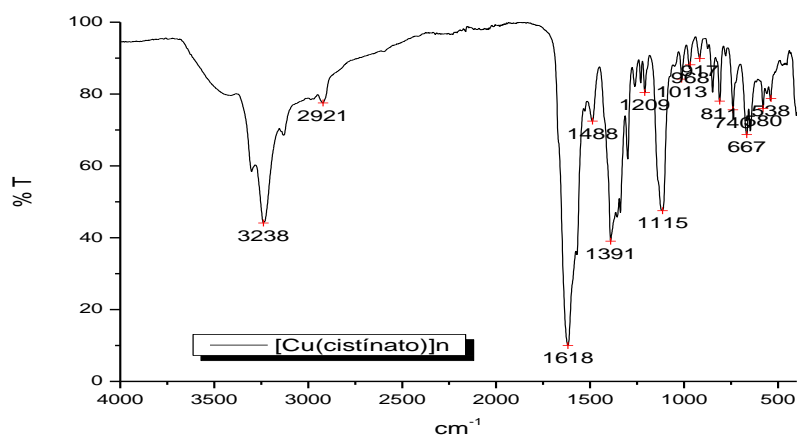


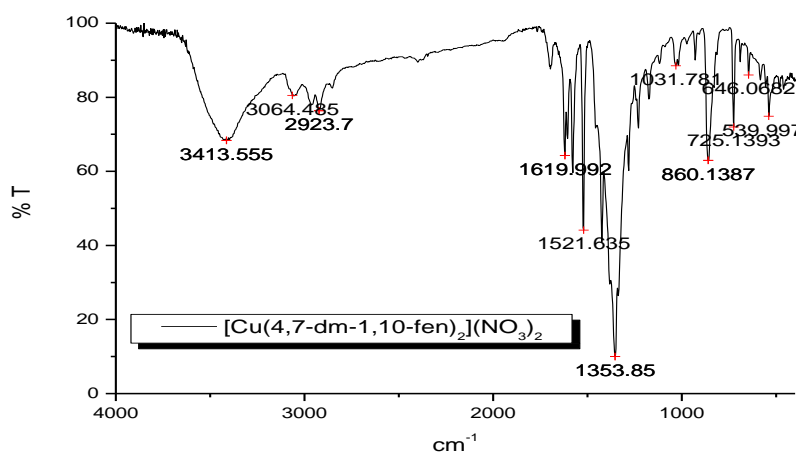
Figura 33.- Espectro infrarrojo de la Casiopeína® III-ia preparada.

[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub> aislados de la interacción entre la <b>Casiopeína® II-gly</b> y cisteína.					
cisteína					
v SH	v CH <sub>3</sub>	v NH <sub>2</sub>	v (COO <sup>-</sup> )	v (S-S)	v (C-S)
*	2921	3301 3238	1618	476	667



**Figura 34.-** Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS43-1A) obtenido de la reacción entre **Casiopeína® IIgly** y cisteína.

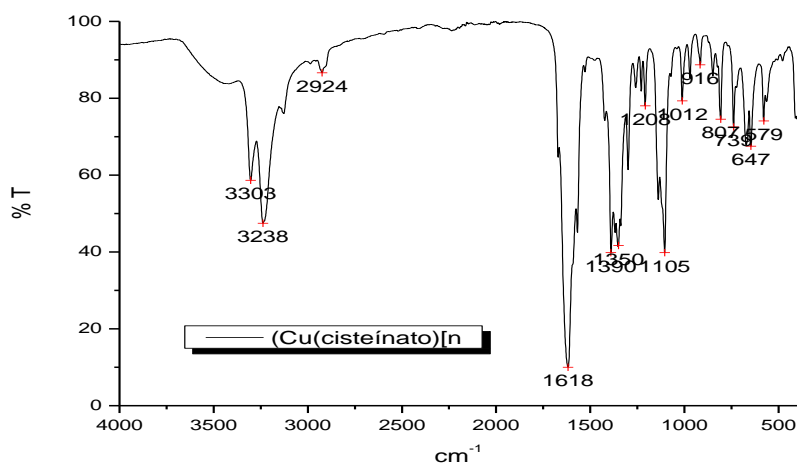
[Cu(4,7-dm-1,10-fen)]NO <sub>3</sub> aislado de la interacción entre la <b>Casiopeína® II-gly</b> y cisteína.			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
fenantrolina			
v (CH <sub>3</sub> )	v (C=C)	v (C=N)	
2923	1521	1425	1353



**Figura 35.-** Espectro Infrarrojo del polvo verde esmeralda pálido (AS43-1B) obtenido de la reacción entre **Casiopeína® IIgly** y cisteína.

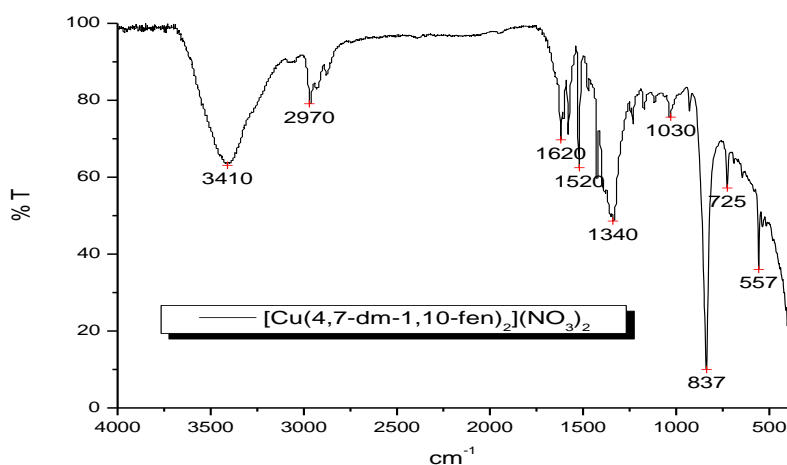


[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub> aislado de la síntesis Cu <sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.					
cisteína					
v SH	v CH <sub>3</sub>	v NH <sub>2</sub>	v (COO <sup>-</sup> )	v (S-S)	v (C-S)
*	2921	3301 3238	1618	476	667



**Figura 36.-** Espectro Infrarrojo de del polvo azul pálido (AS08-A) obtenido de la reacción entre Cu<sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.

Compuesto obtenido de la síntesis de Cu <sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.					
Clave	Compuesto	fenantrolina			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
		v (CH <sub>3</sub> )	v (C=C)	v (C=N)	
<b>AS08-B</b>	[Cu(4,7-dm-1,10-fen)]NO <sub>3</sub>	2923	1521	1425	1353



**Figura 37.-** Espectro Infrarrojo del polvo azul esmeralda pálido (AS08-B) obtenido de la reacción entre Cu<sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.

[Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (dmbipi) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> obtenido de la síntesis Cu <sup>(II)</sup> : 4,4'-dm-2,2'-bipi: cys.				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ionico
	bipiridina coordinada			
OH	v (C=N)	v (C=C)	N (C=C)	
3442	1620	1560	1490	1384

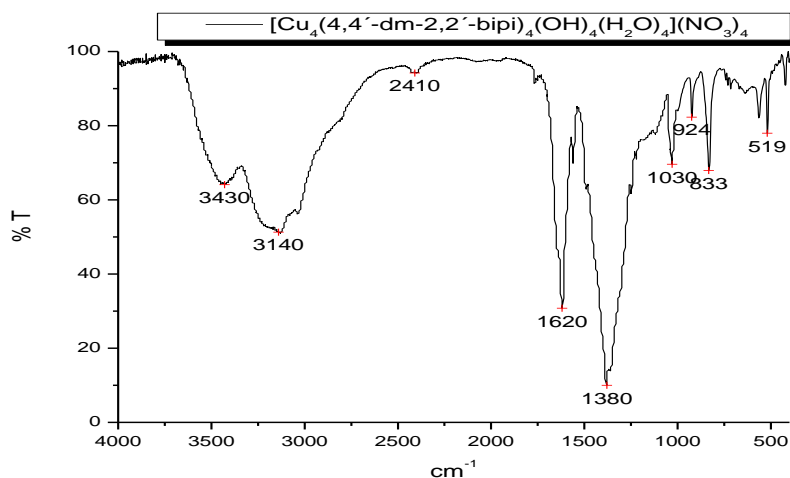


Figura 38.- Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS47-1A) obtenido de la reacción entre Casiopeína® III-ia y cisteína.

[Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (dmbipi) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> aislado de la interacción de CasIII-ia + cisteína				
	bipiridina coordinada			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ionico
OH	v (C=N)	v (C=C)	v (C=C)	
3410	1620	1560	1490	1390

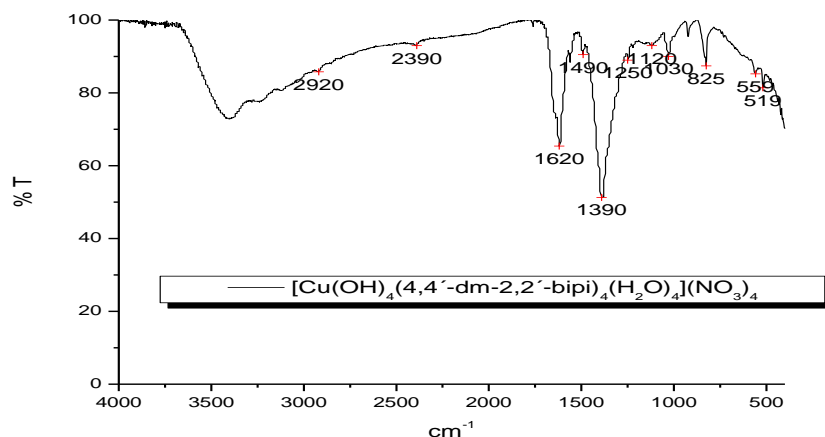
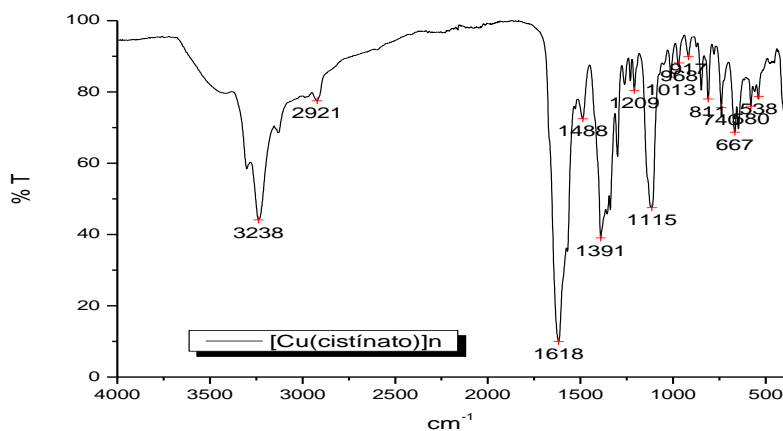


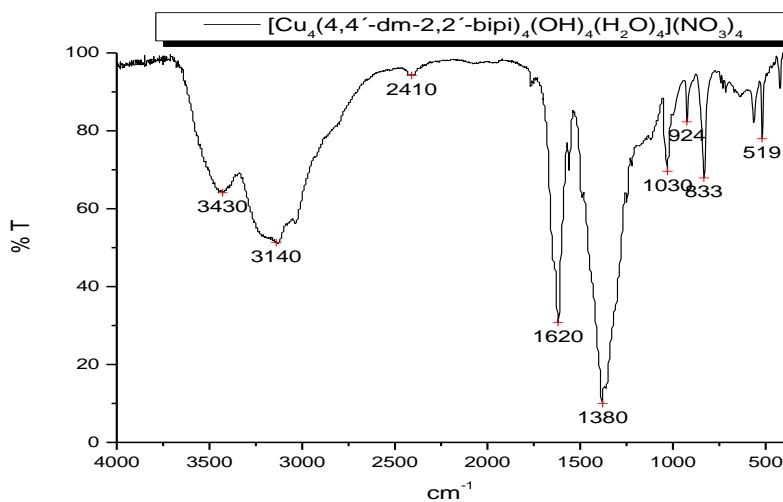
Figura 39.- Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS47-1A) obtenido de la reacción entre Casiopeína® III-ia y cisteína.

[Cu(cisteinato)] <sub>n</sub> aislado de la interacción de CasIII-ia + cisteína				
Cistinato coordinado.				
-CH <sub>3</sub>	-NH <sub>2</sub>	-COO <sup>-</sup>	S-S	C-S
2921	3301 3238	1618	474	667



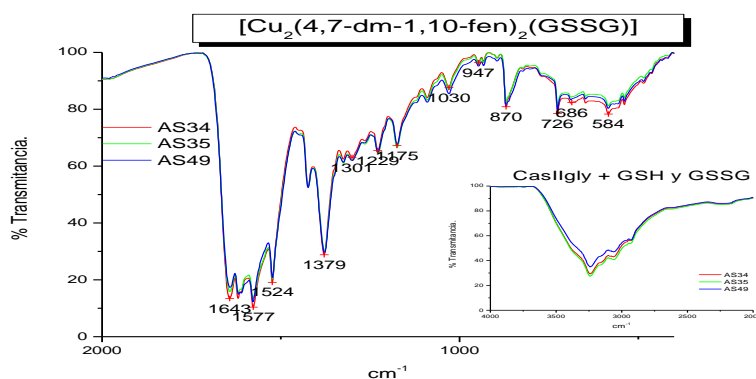
**Figura 40.-** Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS47-1C) obtenido de la reacción entre Casiopeína<sup>®</sup> III-ia y cisteína.

[Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (dmbipi) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> aislado de la síntesis Cu <sup>(II)</sup> : 4,4'-dm-2,2'-bipi: cys.				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ionico
bipiridina coordinada				
OH	v (C=N)	v (C=C)	v (C=C)	
3442	1620	1560	1490	1384



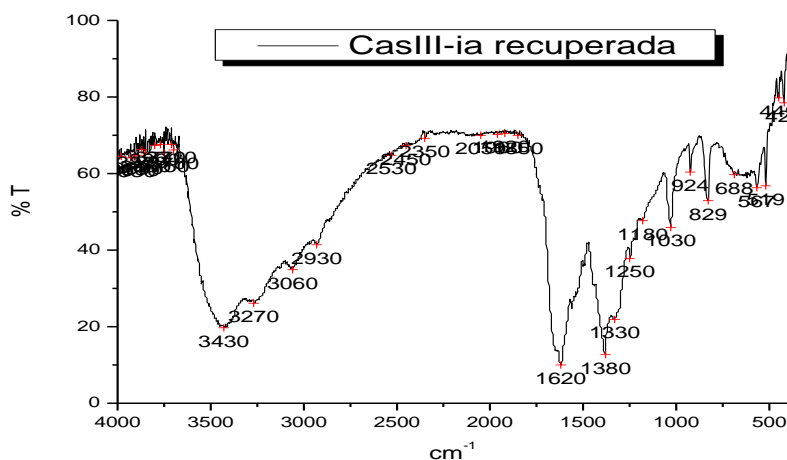
**Figura 41.-** Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS54-A) obtenido de la reacción entre Cu<sup>(II)</sup> 4,4'-dm-2,2'-bipi y cisteína.

[Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-fen) <sub>2</sub> (GSSG)] aislado de la síntesis e interacción entre la CasII-gly y GSH.							
		GSSG coordinado			fenantrolina coordinada.		
AS34	CasII gly + GSH	3239	1642	538	1523	1425	725
AS35	Cu <sup>+2</sup> +4,7-dm-fen+ GSH	3240	1643	539	1523	1425	726
AS49	Cu <sup>+2</sup> +4,7-dm-fen+ GSSG	3239	1642	538	1523	1425	725



**Figura 42.-** Espectro Infrarrojo de los polvos azules obtenido de la reacción entre: **Casiopeína<sup>®</sup> II-gly** y GSH (AS34), Cu<sup>(II)</sup>, 4,7-dm-1,10-fen, GSH (AS35) y Cu<sup>(II)</sup>, 4,7-dm-1,10-fen, GSSG (AS49).

Casiopeína <sup>®</sup> III-ia recuperada después de su reacción con GSH.						
	Acetilacetato Coordinado	Bipiridina coordinada				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> iónico.
OH	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>	v (C=N)	v (C=C)	v (C=C)	v (C-H)	
3428	1560	1620	1523	1490	829	1380



**Figura 43.-** Espectro Infrarrojo del polvo azul obtenido de la reacción entre: **Casiopeína<sup>®</sup> III-ia** y GSH (AS45).

Casiopeína® IIgly recuperada de la reacción con βME								
glicina coordinada				fenantrolina coordinada				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Iónico.
v NH <sub>2</sub>	v NH <sub>2</sub>	vas COO <sup>-</sup>	δ NH <sub>2</sub>	v (C=C)	v (C=N)	v (C=C)	v (C=N)	
3420	3300	1650	649	1580	1425	872	727	1380

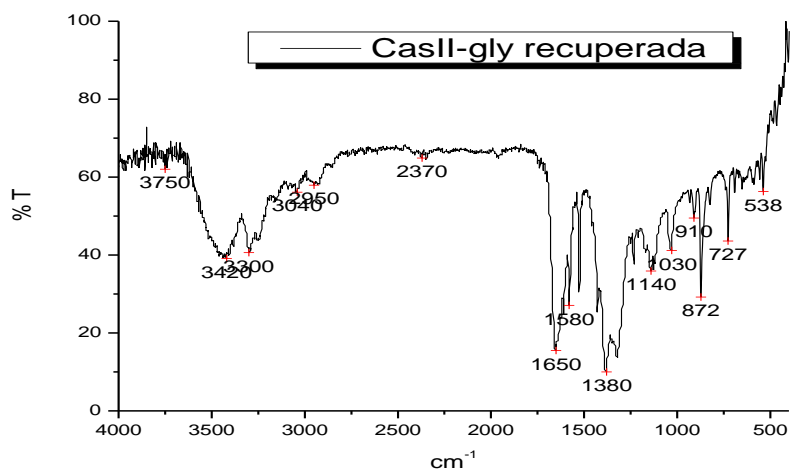


Figura 44.- Espectro Infrarrojo la **Casiopeína® II-gly** recuperada de la reacción con βME (AS44).

Casiopeína® III-ia recuperada de la reacción con βME.						
OH	acac <sup>-</sup> coordinado					NO <sub>3</sub>
	v <sub>as</sub> COO <sup>-</sup>	v (C=N)	v (C=C)	v (C=C)	v (C-H)	
3457	1590	1618	1519	1492	774	1390

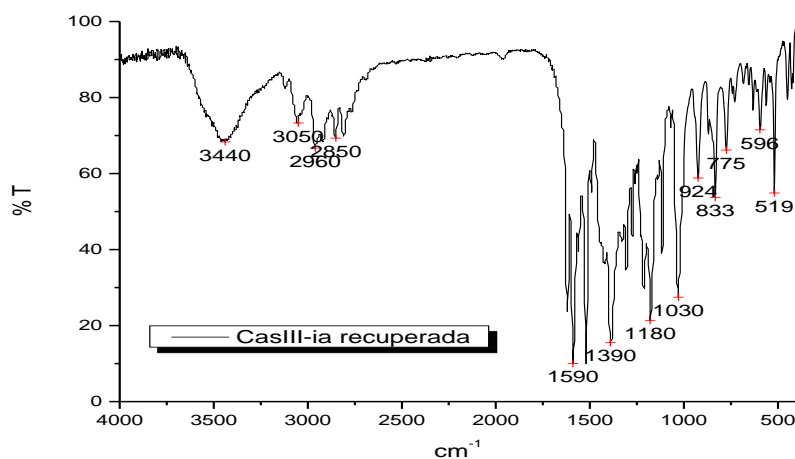


Figura 45.- Espectro Infrarrojo de la **Casiopeína® III-ia** recuperada de la reacción con βME (AS48).

Los resultados aquí presentados se divulgaron parcialmente o en su totalidad en los siguientes congresos y reunión de trabajo:

- 45° Congreso mexicano de química y 29° Congreso nacional de educación química, 18 al 22 de septiembre de 2010 en Rivera Maya en Quintana Roo.
- II Congreso Nacional de Innovación en Salud y Química Médica, 13 al 16 de Abril de 2011 en San Miguel de Allende.
- Reunión anual del grupo de investigación en **Casiopeínas<sup>®</sup>**, 25 a 28 de noviembre de 2012, Taxco Guerrero.

## 11.-Abreviaturas.

CasII-gly o **Casiopeína® II-gly** [nitrato de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicinato de cobre (II)]

CasIII-ia o **Casiopeína® III-ia** [nitrato de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina acetilacetato de cobre (II)]

GSH glutatión reducido

Cys cisteína.

$\beta$ ME  $\beta$ -mercaptoetanol.

GSSG glutatión oxidado.

[CasII-gly-SH-cys] [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(S-cistinato)]

[CasIII-ia-SH-cys] [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)(S-cistinato)]

[Cu (N-N)<sub>2</sub>](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> nitrato de bis-4,7'-dimetil-1,10-fenantrolina de cobre (II)

[Cu(cistinato)]<sub>n</sub>. polímero de cobre(II) cisteínato

[CasII-gly-SH-GSH] [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(S-glutacion reducido)]

OMS Organización mundial de la salud.

ERO Especies reactivas de oxígeno.

*cis*-DDP *cis*-diamino-dicloro-platino (II) ó *cis*-platino

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos por sus siglas en inglés.

ADN ácido desoxirribonucleico.

QSAR estudios de correlación cuantitativa estructura-actividad

Fen 1,10-fenantrolina.

Bipi 2,2'-bipiridina

Gly glicinato

Acac acetilacetato

E<sub>1/2</sub> potenciales de media onda

Fc/Fc<sup>+</sup> par ferroceno/ ferrocinio

HeLa cáncer cérvico-uterino humano

CHP-212 neuroblastoma

SK-N-SH neuroblastoma

HCT-15 (carcinoma de colon)

C6 glioma murino

EDTA etilediamin tetra acetato

SOD superóxido dismutasa.

DMSO dimetilsulfóxido

H157 y A549 líneas celulares de cáncer de pulmón

B16 melanoma de ratón

MB magnetones de Born.

JOB método de las variaciones continuas.

MOPS ácido morfolin propanosulfónico.

u.a unidades arbitrarias.

## 12.-Índice de elementos.

### 12.1.-Ecuaciones.

Ecuación 1.- Generación de radical $\cdot\text{OH}$ a partir de a) Reacción de Fenton y b) Ciclo de Haber-Weiss. ....	10
Ecuación 2.- Expresiones de las constantes de estabilidad parciales para diferentes equilibrios....	13
Ecuación 3.- Reacción para la mezcla de reactivos siguiendo el método de las variaciones continuas. ....	28
Ecuación 4.- Determinación de la fracción molar. ....	29
Ecuación 5.- Determinación del coeficiente estequiométrico. ....	30
Ecuación 6.-Reacciones propuestas entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly, Casiopeína <sup>®</sup> III-ia y cisteína. ....	38
Ecuación 7.- Generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ A partir de la reacción de oxidación del complejo $\text{CuL}_2^+$ en presencia de $\text{O}_2$ . ....	52
Ecuación 8.- Formación de $\text{H}_2\text{O}_2$ en medio acuoso a partir de radical superóxido.....	52
Ecuación 9.- Reacciones propuestas entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly, Casiopeína <sup>®</sup> III-ia y GSH. ....	67
Ecuación 10.- Mecanismo propuesto para la formación de radical superóxido.....	78
Ecuación 11.- Reacciones propuestas entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly, Casiopeína <sup>®</sup> III-ia y $\beta\text{ME}$ . ....	90

### 12.2.- Figuras.

Figura 1.- Estructuras de los compuestos orgánicos a) vorinostat (Zolinza <sup>®</sup> ) b) romidepsina (Istodax <sup>®</sup> ). ....	5
Figura 2.- Reacción de sustitución de ligantes de <i>cis</i> -platino dentro del organismo.....	6
Figura 3.- Principales compuestos de derivados de <i>cis</i> -platino; a) <i>cis</i> -platino, b) carboplatino,.....	7
Figura 4.- Estructuras generales de las Casiopeínas <sup>®</sup> . ....	12
Figura 5.- Estructuras cristalinas de a) CasII-gly $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ y b) CasIII-ia $\text{ClO}_4$ $[\text{Cu}(4,4'\text{-dm-2,2'-bipi})(\text{acac})]\text{ClO}_4$ . ....	15
Figura 6.- Diagrama de orbitales <i>d</i> para una geometría bipirámide de base cuadrada y sus posibles transiciones para un sistema $d^9$ . ....	16
Figura 7.- Reacción de reducción de las Casiopeínas <sup>®</sup> por la oxidación de los grupos thiol, lo que produce un cambio de geometría, la formación de un puente disulfuro y la liberación de dos protones. ....	20
Figura 8.- Esquema de reacción para la preparación de Casiopeína <sup>®</sup> II-gly. ....	24
Figura 9.- Esquema de reacción para la preparación de Casiopeína <sup>®</sup> III-ia. ....	25
Figura 10.- Esquemas generales de reacción para la interacción de la Casiopeína <sup>®</sup> II gly y Casiopeína <sup>®</sup> III-ia con reductores.....	32



Figura 11.-Esquemas generales de síntesis 1:1:1 (Cu <sup>(II)</sup> : (N.N) : R-SH reductor) para la identificación de los probables productos que se pueden obtener de la interacción Casiopeína <sup>®</sup> : reductor.....	33
Figura 12.- Estructura molecular del compuesto.....	37
Figura 13.- Estructura de la Especie propuesta formada en disolución [Cu(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]+, de acuerdo con los cambios obtenidos en las señales de la gráfica 3. ....	42
Figura 14.- Intermediario reactivo en donde se lleva a cabo la reducción de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly, obtenido mediante cálculos teóricos.....	48
Figura 15.- Mecanismo propuesto de la formación, reducción y reducción de la especie [Cu(4,7-dm-1,10-fen)(gly)(SH-cys)]+ en presencia de O <sub>2</sub> . ....	49
Figura 16.- Especies de Cu <sup>(I)</sup> propuestas.....	51
Figura 17 .- Especies propuestas [Cu(4,4'-dm-2,2'-bipi)(acac)(SH-cys)]+ de acuerdo con los cambios observados en las señales de los espectros Uv-vis de la gráfica 7a .....	55
Figura 18.- Diagrama de flujo de los productos aislados en la reacción entre la Casiopeína <sup>®</sup> III-gly y cisteína. ....	60
Figura 19.- Diagrama de flujo de los productos aislados en la reacción entre Cu <sup>(II)</sup> , 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.....	60
Figura 20.- Estructura molecular del compuesto [Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>4</sub> (dmbpy) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .....	63
Figura 21.- Diagrama de flujo de los productos aislados de la reacción entre la Casiopeína <sup>®</sup> III-ia con cisteína.....	65
Figura 22.- Diagrama de flujo de los productos aislados de la reacción Cu <sup>(II)</sup> : 4,7para la síntesis con cisteína. ....	66
Figura 23.-Especie de Cu <sup>(II)</sup> propuesta de acuerdo a los cambios observados en la reacción entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly y GSH.....	71
Figura 24.- Propuesta de especies formadas por la reacción entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly y GSH en un sistema abierto y cerrado. ....	77
Figura 25.- Ciclo redox en el que participa la Casiopeína III-ia en presencia de GSH, para los sistemas abierto y cerrado.....	83
Figura 26.- Estructura que corresponde con el compuesto GSH [Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-feni) <sub>2</sub> (GSSG)] aislado de las reacciones con GSH. ....	87
Figura 27.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína III-ia recuperada en comparación con una disolución sin reaccionar. ....	89
Figura 28.- Mecanismo propuesto de acuerdo con los cambios observados en el estudio espectroscópico para la reducción de la CasII-gly en presencia de βME.....	95
Figura 29.- a) Cambios observados en el estudio espectroscópico asignados a la especie b) [Cas-III-ia-SH-βME]. ....	97
Figura 30.- Mecanismo propuesto de acuerdo a lo observado en el estudio espectroscópico de la reacción CasIII-ia y βME en un sistema abierto. ....	99
Figura 32.- Ciclo redox para el centro metálico de las Casiopeínas <sup>®</sup> en presencia de βME y O <sub>2</sub> ....	106

Figura 33.-Espectro infrarrojo de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly preparada. ....	110
Figura 34.- Espectro infrarrojo de la Casiopeína <sup>®</sup> III-ia preparada. ....	110
Figura 35.- Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS43-1A) obtenido de la reacción entre Casiopeína <sup>®</sup> IIgly y cisteína. ....	111
Figura 36.- Espectro Infrarrojo del polvo verde esmeralda pálido (AS43-1B) obtenido de la reacción entre Casiopeína <sup>®</sup> IIgly y cisteína.....	111
Figura 37.- Espectro Infrarrojo de del polvo azul pálido (AS08-A) obtenido de la reacción entre Cu <sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína. ....	112
Figura 38.- Espectro Infrarrojo del polvo azul esmeralda pálido (AS08-B) obtenido de la reacción entre Cu <sup>(II)</sup> 4,7-dm-1,10-fen y cisteína.....	112
Figura 39.- Espectro Infrarrojo del polvo azul pálido (AS47-1A) obtenido de la reacción entre Casiopeína <sup>®</sup> III-ia y cisteína.....	113
Figura 39.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr del polvo azul pálido (AS47-1A) obtenido de la reacción entre Cas III-ia y cisteína. ....	113
Figura 40.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr del polvo azul pálido (AS47-1C) obtenido de la reacción entre Cas III-ia y cisteína. ....	114
Figura 41.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr del polvo azul pálido (AS54-A) obtenido de la reacción entre Cu <sup>(III)</sup> 4,4'-dm-2,2'-bipi y cisteína.....	114
Figura 42.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr de los polvos azules obtenido de la reacción entre: Cas II-gly y GSH (AS34), Cu <sup>(III)</sup> , 4,7-dm-1,10-fen, GSH (AS35) y Cu <sup>(III)</sup> , 4,7-dm-1,10-fen, GSSG (AS49).....	115
Figura 43.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr del polvo azul obtenido de la reacción entre: Cas III-ia y GSH (AS45). ....	115
Figura 44.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr de la Cas II-gly recuperada de la reacción con βME (AS44). ....	116
Figura 45.- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr de la CasIII-ia recuperada de la reacción con βME (AS48). ....	116

## 12.3.- Gráficas.

Gráfica 1.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly y Casiopeína <sup>®</sup> III-ia obtenidos de disoluciones acuosas con una concentración inicial 5mM, la cual fue diluida hasta 1mM para obtener el coeficiente de absortividad molar. ....	36
Gráfica 2.- a) Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) con 0 hasta 1.2 equivalentes de cys (0 a 2.4mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; b) gráfica de absorbancia vs. Concentración de cisteína agregada	

(0 a 2.0 equivalentes de cys) en 612nm y 404nm obtenida a partir de la gráfica a en un sistema abierto.....	40
Gráfica 3.- Espectro Uv-Vis resultado de la resta de especies, desde 0 hasta 1.2 equivalentes de cisteína en donde se asignan las bandas que permiten proponer una nueva especie.....	42
Gráfica 4.- Espectro Uv-Vis de la CasII-gly (2mM) con 1.2 hasta 2.0 equivalentes de cys (2.4 a 4.0mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.....	43
<b>Gráfica 5.- a)</b> Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar $\chi = 0.1$ a 1.0 (2.7 hasta 1.5 mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado; <b>b)</b> gráfica de absorbancia vs fracción molar de cisteína en 652nm obtenida a partir de la grafica <b>a</b> .....	45
Gráfica 6.- Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (1.5 a 0.3mM) con una diferente fracción molar $c = 1.0$ a 9.0 (1.5 hasta 3mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.....	46
Gráfica 7.- a) Espectro Uv-Vis resultado de la resta de especies Casiopeína <sup>®</sup> III-ia (2mM) y cisteína desde 0 hasta 1.6 equivalentes (0 a 3.2mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; b) gráfica de absorbancia vs. Concentración de cisteína agregada (0 a 2.0 equivalentes de cys) en 656nm y 404nm obtenida a partir de la gráfica a en un sistema abierto. ....	54
<b>Gráfica 8.- a)</b> Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar $\chi = 0.1$ a 1.0 (2.7 hasta 1.5 mM) de cys obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado; <b>b)</b> gráfica de absorbancia vs fracción molar de cisteína en 656nm obtenida a partir de la grafica <b>a</b> .....	56
Gráfica 9 a.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) en la región visible con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.....	67
Gráfica 9b.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) en la región ultravioleta con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.....	68
<b>Gráfica 10.- a)</b> Absorbancia en 612nm vs. Equivalentes de GSH de la mezcla de reacción <b>Casiopeína<sup>®</sup> II-gly</b> (2mM) con GSH (0 a 3.6mM); <b>b)</b> Absorbancia en 450nm vs. Equivalentes de GSH de la mezcla de reacción <b>Casiopeína<sup>®</sup> IIgly</b> (2mM) con GSH (0 a 4.0mM), todos los espectros se obtuvieron en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto. ....	68
Gráfica 11.- Espectros obtenidos por la resta de espectros a) Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) en la región visible b) Espectro Uv-Vis resultado de la resta de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly	

---



---

(2mM) en la región ultravioleta, ambos espectros con 0 hasta 1.2 equivalentes de GSH (0 a 2.4mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto ..... 70

Gráfica 12.- Espectro Uv-Vis resultado de la resta de la CasII-gly (2mM) en la región visible con 1.2 hasta 2.0 equivalentes de GSH (2.4 a 4.0 mM); obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto ..... 72

**Gráfica 13.-** Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (3mM a 2.1mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.1$  a 0.42 (0.3 hasta 0.9 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado..... 73

**Gráfica 14.-** Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (2.1mM a 1.5mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.42$  a 1.0 (0.9 hasta 1.5 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado..... 74

**Gráfica 15.-** Espectro Uv-Vis resultado de la resta de espectros de la CasII-gly a diferentes concentraciones (2.1mM a 1.5mM) con diferente fracción molar  $\chi = 0.42$  a 1.0 (0.9 hasta 1.5 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. .... 74

**Gráfica 16.-** Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con diferente fracción molar  $\chi = 1.0$  a 9.0 (1.5 hasta 2.7 mM) de GSH obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. .... 75

Gráfica 17.- Absorbancia vs. Fracción molar ( $\chi$ ) de GSH obtenido a partir de los estudios en el sistema cerrado con Casiopeína® IIgly (3mM) y GSH (3mM). .... 76

**Gráfica 18.-** Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia (2mM) con diferentes concentraciones (0.4 a 1.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto. .... 79

Gráfica 19.- a) Absorbancia vs equivalentes de GSH en 600nm, los datos se obtuvieron de las mezclas de reacción de la CasIII-ia (2mM) con diferentes concentraciones (0 a 4.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto..... 80

Gráfica 20.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína® III-ia (2mM) con diferentes concentraciones (1.0mM a 4.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto. .... 80

Gráfica 21.- a) absorbancia vs fracción molar de GSH en 600nm obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. .... 81

Gráfica 22.- b) Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia con diferentes fracciones molares ( $\chi$ ) (0.1 a 1.0) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. ....	82
Gráfica 23.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> III-ia con diferentes fracciones molares ( $\chi$ ) (1.0 a 9.0) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. ....	82
Gráfica 24.- Espectro Uv-Vis obtenido en etilenglicol del producto [Cu <sub>2</sub> (4,7-dm-1,10-feni) <sub>2</sub> (GSSG)] aislado de las reacciones con GSH. ....	86
Gráfica 25.- a) Absorbancia vs equivalentes de $\beta$ ME en 612nm; b) Absorbancia vs equivalentes de $\beta$ ME en 432nm; los datos de las gráficas a y b fueron obtenidos de la gráfica c; c) Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) con diferentes concentraciones (0 a 2.0mM) de GSH obtenido en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto.....	92
Gráfica 26.- Espectro Uv-Vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar $\chi = 0.1$ a $1.0$ (2.7 hasta 1.5 mM) de $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. ....	93
Gráfica 27.- Espectro Uv-Vis de la CasII-gly a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con una diferente fracción molar $\chi = 1.0$ a $9.0$ (1.5 mM a 3mM) de $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado. ....	94
Gráfica 28. - a) absorbancia vs fracción molar de la CasII-gly con $\beta$ ME desde 0 a 1.0 fracción mol en 612nm y b) absorbancia vs fracción molar de la CasII-gly con $\beta$ ME desde 0 a 1.0 fracción mol en 432nm; los datos para las gráficas se obtuvieron de las gráficas 25 y 26.....	95
Gráfica 29. - a) Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia(2mM)con diferentes concentraciones (0 a 1.2mM) de $\beta$ ME obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; b) absorbancia vs equivalentes de $\beta$ ME en 600nm , los datos fueron obtenidos de la gráfica (a).....	97
<b>Gráfica 30.- a)</b> Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia (2mM) con 0.6 hasta 2.0 equivalentes de $\beta$ ME (1.2 a 4.0mM) obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema abierto; <b>b)</b> gráfica de absorbancia vs. Concentración de $\beta$ ME agregado, los datos fueron obtenidos de la gráfica <b>a</b> .....	99
Gráfica 31. - a) Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia a diferentes concentraciones (3mM a 1.5mM) con una diferente fracción molar $\chi = 0$ a $1.0$ (0 hasta 1.5mM) de $\beta$ ME; b) Espectro Uv-Vis de la CasIII-ia a diferentes concentraciones (1.5mM a 0.3mM) con una diferente fracción molar $\chi = 1.0$ a $9.0$ (1.5mM hasta 3mM) de $\beta$ ME, los espectros fueron obtenidos en medio amortiguado con MOPS pH 7.4 a los 30 s después de las mezclas de reacción en un sistema cerrado.....	101

---

<b>Gráfica 32.-</b> Absorbancia vs fracción molar de $\beta$ ME en 600nm obtenida a partir de la grafica 30 a y b. ....	102
Gráfica 33.- Espectro UV-vis de la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly (2mM) obtenido en disolución acuosa y en medio amortiguado, para comprobar que no hay cambios en el espectro por la presencia del MOPS.....	109
Gráfica 34.- Espectro UV-vis de la Casiopeína <sup>®</sup> III-ia (2mM) obtenido en disolución acuosa y en medio amortiguado, para comprobar que no hay cambios en el espectro por la presencia del MOPS.....	109

## 12.4.- Tablas.

Tabla 1.- Clasificación de las Casiopeínas <sup>®</sup> .....	13
Tabla 2.- Concentración y proporción molar de reactivos para la mezcla de reacción. ....	28
Tabla 3.- Concentración, proporción molar y fracción molar de los reactivos en las mezclas de reacción.....	29
Tabla 4 .- Mezclas de reacción estudiadas con una estequiometria 1:1 Casiopeína <sup>®</sup> : reductor.....	31
Tabla 5.- Síntesis de Cu <sup>(II)</sup> : (N-N) : R-SH 1:1:1 para identificación de productos. ....	31
Tabla 6.- Asignación de las bandas en los Espectros Infrarrojo (4000-400cm <sup>-1</sup> ) obtenidos en KBr para las Casiopeínas <sup>®</sup> II-gly y III-ia. ....	34
Tabla 7.- Caracterización de las Casiopeínas <sup>®</sup> II-gly y III-ia preparadas.....	35
Tabla 8.- Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados del compuesto .....	37
Tabla 9 .- Espectro Infrarrojo de 4000 a 400cm <sup>-1</sup> en KBr para los compuestos aislados de la interacción entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly y cisteína, además de la síntesis Cu(II)-(N-N)-cisteína. ....	59
Tabla 10.- Datos de caracterización de los productos obtenidos entre la Casiopeína <sup>®</sup> II-gly y cisteína. ....	59
Tabla 11 .- Espectroscopia infrarroja de 4000cm <sup>-1</sup> a 400cm <sup>-1</sup> en KBr para la interacción de CasIII-ia + cisteína y la síntesis Cu <sup>(II)</sup> : 4,4'-dm-2,2'-bipi: cys. ....	62
Tabla 12.- Datos de caracterización de los compuestos aislados de la interacción con CasIII-ia y síntesis con cisteína.....	62
Tabla 13.- Principales bandas de absorción en el infrarrojo de 4000-a 400cm <sup>-1</sup> en KBr para los productos obtenidos de la CasII-gly con GSH.....	85
Tabla14 .- Caracterización de los productos obtenidos de la reacción entre la Cas II-gly y la síntesis Cu(II): 4,7-dm-1,10-fen: GSH y GSSG.....	86
Tabla 15.- Principales bandas de vibración de la Casiopeína III-ia recuperada después de su reacción con GSH. ....	88

Tabla 17- Datos obtenidos del análisis Infrarrojo ( $4000-400\text{cm}^{-1}$ ) de la reacción AS44) CasII gly + 2-mercaptoetanol y AS48) CasIII-ia + 2-mercaptoetanol. ....	104
Tabla 18 .- Datos de caracterización de las Casiopeínas después de la reacción redox. ....	105

## 13.- Referencias.

1. Global Health Observatory. 2008 [cited; Available from: [www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/index.html).
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Estadísticas de Mortalidad, Principales causas, Total 2011*. Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2011 [cited; Available from: <http://www.inegi.org.mx/Sistemas/temasV2/Default.aspx?s=est&c=17484>.
3. Smart, R.C., *Chemical Carcinogenesis*, in *A Textbook of Modern Toxicology*, ed. E. J.W. Sons. 2004.
4. Kelley William N, *Medicina Interna*. 2a ed. Editorial Medica Panamericana. Vol. 1. 1992, Uruguay.
5. Wu, X.-Z., *A new classification system of anticancer drugs Based on cell biological mechanisms*. Medical Hypotheses, 2006. **66**: p. 883-887.
6. Espinosa E., Z.P., Feliu J., González Barón M. , *Classification of anticancer drugs a new system based on therapeutic targets*. Cancer Treatment Reviews, 2003. **29**: p. 515-523.
7. Guo Z., S.P.J., *Metals in medicine*. Angewante Chemie International., 1999. **38**: p. 1521-1531.
8. McBrien, D.C.H., Slater, T.F. , *Biochemical Mechanisms of platinum Antitumor Drugs*, ed. I. Press. 1986, Oxford, Reino Unido.
9. Mu-Hyun Baik, R.A.F.a.S.J.L., *Theoretical Study of cisplatin Binding to Purine Bases: Why Does Cisplatin Prefer Guanine over Adenine?* Journal of American Chemical Society, 2003. **125**: p. 14082-14092.
10. Higby, D.J., *Diamminodichloroplatinum in the chemotherapy of testicular tumors*. Journal of Urology, 1974(112): p. 100-104.
11. Moosa, A.R., Schimpff, S. C. y Robson, M.C, *Comprehensive textbook in oncology*. Williams & Wilkins. Baltimore ed. Vol. 1. 1991, Estados Unidos.
12. Guo, Z., Sadler, P.J., *Metals in medicine*. Angewante Chemie International, 1999. **38**: p. 1521-1531.
13. Kui, W., L. Jingfen, and L. Ronchang., *The events that occur when cisplatin encounters cells*. . Coordination Chemistry Reviews, 1996. **151**: p. 53-88.
14. J.Sergio Casas, V.M., Ángeles Sánchez, José L. Sánchez, José Sordo., *Química Bioinorgánica*., ed. E. síntesis.
15. Ruili Huang, A.W., David G. Covell., *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action*. Biochemical Pharmacology 2005. **69**: p. 1009-1039.
16. Pearson, R.G., *Acids and Bases*. Science, 1966. **151**(3707): p. 172-177.
17. Wardman P. Candeias L P., *Fenton chemistry: an introduction*. Radiation Research, 1996. **145**(5): p. 523-531.
18. Ruiz-Azuara, L., *Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos*. 1990: Mexico.
19. Ruiz-Azuara, L., *Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes from phenylate phenanthrolines to be used as "anticancerigenic" agents*. 1992: US.



20. Ruiz-Azuara, L., *Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos*. 1993: México.
21. Ruiz-Azuara, L., *Copper amino acidate diimine nitrate compounds and their methyl derivatives and a process for preparing them*. 1996: U.S.
22. Ruiz-Azuara, L., *Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents*. 1997: U.S.
23. Dekker, M., *Metal ions in biological Systems: Interrelation between free radicals and metal ions in live process*, ed. s.y.s. editores. Vol. 36. 1999.
24. Sigman, D.S., *Chemical Nuclease*. *Biochemistry*, 1990. **29**(39): p. 9097-9105.
25. Chikira, M., Tomizawa, Y., Fusita, D., Sugizaki, T., Sugawara, N., Yamazaki, T., Sasano, A., Shindo, H., Palanandiavanar, M y Antholine, W.E. , , *DNA-fibre EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenantroline and its derivates bound to DNA: mono(phenantroline)-copper(II) and its ternary complexes with minoacids*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002. **89**: p. 163-173.
26. María Elena Bravo-Gómez, J.C.G.-R., Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Azuara. , , *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, Casiopeínas*. . *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008.
27. Gasque Silva L M *Sintesis, Caracterización y constantes de estabilidad de Compuestos mixtos de cobre(II)*, in *División de Estudios de Posgrado Facultad de Química: Universidad Nacional Autónoma de México*.
28. Gasque. Silva. L.M., M.E., R., Ruiz-Ramirez. L., *Stability of Ternary Copper and Nickel Complexes With 1,10-Phenanthroline* *Journal of Inorganic Biochemisty*, 1992. **48**: p. 121-127.
29. L. Gasque, R.M.-E., L. Ruiz-Ramirez., *Stability of Ternary Copper and Nickel Complexes With 1,10-Phenanthroline* *Journal of Inorganic Biochemisty*, 1992. **48**: p. 121-127.
30. Solans X., R.-R.L., Martinez A., Gasque L., Moreno-Esparza R.. *Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(acua)(4,7-diphenil -1,10-phenantroline)copper(II) nitrite monohydrate and acua(4,7-dimethyl -1,10-phenantroline)(glicinato)(nitrato)copper(II) monohydrate*. *Acta Cryst C*, 1993. **49**: p. 890-893.
31. Tovar-Tovar Araceli. Ruiz-Ramírez Lena , C.A., Romerosa Antonio, Moreno-Esparza Rafael, Rosales-Hoz Maria 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*. *Journa of Inorganic Biochemistry*, 2004. **98**: p. 1045-1053.
32. Kwik, W.L., Ang, K.P y Chen, G., *Complexes of (2,2'-bipyridyl)copper(II) and (1,10-phenantroline)copper(II) whit some aminoacids* *Journal of inorganic and Nuclear Chemistry*, 1980. **42**: p. 303-313.
33. Gracia-Mora, I.R.-R., L. Gómez-Ruiz, C. Tinoco-Méndez, M. Márquez-Quiñones, A. Romero-De Lira, L. Marín-Hernández, A.Macías-Rosales, L. Bravo-Gómez, M.E., *Knigth'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**: p. 19-28.

34. J. Serment-Guerrero, P.C.-S., E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas*. *Toxicology in Vitro*, 2011. **25**: p. 1376-1384.
35. Cristina Trejo-Solís, G.P., Sergio Zuñiga, Andrea Rodríguez-Ropon, Laura Osorio-Rico, Sanchez Torres Luvia, Isabel Gracia-Mora, Lucrecia Marquez-Rosadoy, Aurora Sánchez, Miguel E. Moreno-García, Arturo Cruz, María Elena Bravo-Gómez, Lena Ruiz-Ramírez, Sara Rodríguez-Enriquez y Julio Sotelo *Cas II-gly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. Neoplasia*. 2005. **7**: p. 563 - 574.
36. Carvallo-Chaigneau, F.T.-S., 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. 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**: p. 17-28.
37. Ruiz-Ramírez L. Gracia-Mora I. de la Rosa M.E. Sumano H. Gómez C. Arenas F. Gómez E. Pimentel E. Cruces, M., *Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeinas I, II, III*. *Journal Inorganic Biochemistry*, 1993. **51**: p. 406.
38. Radamés Alemón-Medina, J.L.M.-S., Lena Ruiz-Azuara, Isabel Gracia-Mora., *Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. *Toxicology in Vitro*, 2008. **22**: p. 710-715.
39. Valencia-Cruz AI, U.-F.L., Galindo-Murillo R, Baca-López K, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, Ruiz-Azuara L, Hernández-Lemus E, Mejía C., *Whole genome gene expression analysis reveals casiopeína-induced apoptosis pathways*. *PLoS One*, 2013. **8**(1).
40. Grizett Gutiérrez Anllely., V.A.A., García Ramos J.C., Alonso Saenz A.L., Flores Alamo M., Hernández Lemus E., Ruiz Azuara L., Mejía C. , *Mitochondrial apoptosis pathway is activated by Casiopeínas in SK-N-SH neuroblastoma cells*. *CHEM MED CHEM En preparación*.
41. Mejia, C.R.-A., L. , *Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma Cells*. *Pathology and Oncology Research*, 2008. **14**: p. 467-472.
42. Alemon-Medina, R.B.-V., M.; Munoz-Sanchez, J.L.; Gracia-Mora, M.I.; Ruiz-Azuara, L., *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas)*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. **60**(2): p. 219-228.
43. Rivero-Muller, A.D.V.-R., A.; Plant, N.; Ruiz, L.; Dobrota, M., *Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity*. *Chemico-Biological Interactions* 2007. **165**(3): p. 189-199.
44. Remy Kachadouriana, H.M.B., Lena Ruiz-Azuara, Isabel Gracia-Mora, Brian J. Day., *Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. *Toxicology in Vitro*, 2010. **268**: p. 176-183.
45. Radamés Alemón-Medina, M.E.B.-G., María Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Azuara., *Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells*. *Toxicology in Vitro*, 2011. **25**: p. 868-873.
46. Alemón Medina R, B.G.M.E., Gracia Mora M.I., Ruiz Azuara L., *Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína*

- Igly and cisplatin in murine melanoma B16 cells*. Toxicology in Vitro, 2011. **25**: p. 868-873.
47. Bravo Gómez. M. E., G.R.J.C., Gracia Mora. I., Ruiz Azuara. L., *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub> complexes, Casiopeínas*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008. **103**(2): p. 299-309.
  48. Dekker, M., *Metal ions in biological Systems: Interrelation between free radicals and metal ions in live process*. Siegel y Siegel editores. Vol. 36. 1999.
  49. Rost, J.y.R., S., *Reduction-Potential of Glutathione* Nature, 1964. **201**: p. 185.
  50. Watson J. Lees., G.M.W., *Equilibrium Constants for Thiol-Disulfide Interchange Reactions: A Coherent Corrected Set*. Journal of Organic Chemistry 1993. **58**: p. 642-647.
  51. M Wood Paul., *The potential diagram for oxygen at pH 7*. Biochem. Journal, 1988. **253**: p. 287-289.
  52. Czapski, S.G.y.G., *Mechanisms of the Dismutation of Superoxide Catalyzed by the Copper(II) Phenanthroline Complex and of the Oxidation of the Copper(I) Phenanthroline Complex by Oxygen in Aqueous Solution*. Journal American Chemistry Society 1983. **105**: p. 1276-1280.
  53. Czapski, G.S.y.G., *The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O<sub>2</sub><sup>-</sup>*. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine., 1986. **2**: p. 3-11.
  54. T.M.Florence, *The Production of Hydroxyl Radical from Hydrogen Peroxide*. Journal of Inorganic Biochemistry 1984. **22**: p. 221-230
  55. Girolami, G.S., Rauchfuss, T.B. y Angelici, R.J., ed. *Syntesis and tecniques in inorganic chemistry: a laboratory manual.*, ed. U.S.B. Sausalito. Vol. Apendice 2. 1998: California.
  56. Huheey J E., K.E.A., Keiter R L., *Química Inorgánica . Principios de estructura y reactividad*. 4ªedición. ed. Press Harla ed. O. University. 1997.
  57. Sheldrick, G.M., *SHELXL 97, Program for the solution of crystal structure*. . 1997, University of Göttingen: Germany
  58. Ayres., G.H., *Analisis químico cuantitativo*. 2a ed, ed. Harla. 1970, México.
  59. Garcia Ramos J C., *Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre de tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>*, in *Facultad de Química*. 2007, Universidad Nacional Autónoma de México.: México, D.F.
  60. Gómez, M.E.B., *Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre (II) [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> y [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>*, in *Facultad de Química*. 2009, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F.
  61. Mazza., R.M.G., *Glutathione and Sulfun amino acid in human health and disease*. 2009, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
  62. Downes J. Michael, W.J., Bosnich B., *Biological Analogues. Spectroscopic Characteristics of Mercapto- and Disulfide-Copper(II) Coordination in Relation to Type I Proteins*. Inorganic Chemistry 1981. **20**: p. 1081-1086.
  63. Goldstein S., C.G., *Mechanisms of the Dismutation of Superoxide Catalyzed by the Copper(II) Phenanthroline Complex and of the Oxidation of the Copper(I) Phenanthroline Complex by Oxygen in Aqueous Solution*. Journal American Chemistry Society 1983. **105**: p. 1276-1280.

64. Goldstein S., C.G., *The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of  $O_2^-$* . Journal of Free Radicals in Biology & Medicine., 1986. **2**: p. 3-11.
65. Goldstein S., C.G., *Kinetics of Oxidation of Cuprous Complexes of Substituted Phenanthroline and 2,2'-Bipyridyl by Molecular Oxygen and by Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution*. Inorganic Chemistry, 1985. **24**(7).
66. Benon H. J. Bielski, D.E.C., Ravindra L, Arudi. Alberta B. Ross., *Reactivity of  $HO_2/O_2^-$  Radicals in Aqueous Solution*. Journal of Physical Chemistry 1985. **14**(4): p. 1040-1086.
67. Hawkins C.J., D.D.P., *Polynuclear Complexes Formation. II. Copper(II) with Cystine and Related Ligands*. Inorganic Chemistry, 1963. **2**: p. 843.
68. A Gerard., A.V., Mutikainen L., Roubeau O., Turpeinen U., Reedijk J. , *Ferromagnetic trinuclear carbonato-bridged and tetranuclear hydroxo-bridged Cu(II) compounds with 4,4\_-dimethyl-2,2\_-bipyridine as ligand. X-ray structure, spectroscopy and magnetism*. Inorganica Chimica Acta, 2002. **331** p. 208–215.
69. Uehara S., H.Y., Minkovska S., Suzuki K., Ubukata T.,Yokoyama Y., *Photochromic behavior of a bisthiénylene bearing Cu(I)-1,10-phenanthroline complexes*. . Dyes and Pigments, 2012. **92**
70. Deo Nandan K., B.K.S., Bhagwan Singh G., Pramod Kumar S., *Spectral studies on copper(II) of biological active glutatione*. Spectrochimica Acta Part A, 2003. **59**: p. 1487-1496.
71. Müller A., J.W., H. Enemark Jonh., *Disulfur complexes*. Coordination Chemistry Reviews, 1982. **46**: p. 245-280.
72. Kachadouriana Remy , H.M.B., Lena Ruiz Azuara, Isabel Gracia Mora, Brian J. Day., , *Casiopéina Ilgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. Toxicology in Vitro, 2010. **268**: p. 176-183.
73. Bruce C. Hill, D.A., *Differential affinity of BsSCO for Cu(II) and Cu(I) suggests a redox role in copper transfer to the CuA center of cytochrome c oxidase* Biochimica et Biophysica Acta, 2012. **1817**: p. 948-954.
74. Sigel, H., *Metal ions in biological systems. Amino acids and derivates as ambivalent ligands*. Vol. 9. 1979.
75. Ramos., J.C.G., *Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre de tipo  $[Cu(N-N)(glicinato)]NO_3$* , in Facultad de Química. 2007, Universidad Nacional Autónoma de México.: México, D.F.