



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE Cu(II) CON LIGANTES DE TIPO DIIMINA AROMÁTICO Y ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS DE TIPO [Cu(N-N)(L)]NO₃ CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y SU INCORPORACIÓN EN NANOGELES ESTIMULO SENSIBLES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. YOKARI GODINEZ LOYOLA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

FACULTAD DE QUÍMICA
CIUDAD DE MÉXICO DICIEMBRE 2018



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

Presidenta	Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Verónica García Montalvo	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Luz María Melgoza Contreras	UAM-Xochimilco
Vocal	Dra. Liliana Quintanar Vera	CINVESTAV, IPN
Secretaria	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	FES-Cuautitlán, UNAM

SUSTENTANTE

Q. YOKARI GODÍNEZ LOYOLA

ASESORA

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIOS 05, 100 Y 210.

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

LABORATORIOS 121, 122 Y 123

DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

LABORATORIO J-103.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA.

DURANTE SU DESARROLLO, ESTE TRABAJO SE PRESENTÓ EN LOS EVENTOS ACADÉMICOS:

- ❖ Encuentro de Química Inorgánica EQI-2017, que se llevó a cabo del 5 al 8 de septiembre del 2017, en Hermosillo, Sonora, México.
Presentación de poster: “Síntesis de compuestos mixtos de coordinación de Cu(II) tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})\text{L}]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$ con posible actividad antitumoral”.
- ❖ 52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación Química, que se llevó a cabo del 26 al 29 de septiembre del 2017 en Puerto Vallarta, Jalisco, México.
Presentación oral: “Síntesis de compuestos de coordinación de cobre(II) con diiminas aromáticas de tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ con posible actividad antitumoral y antiinflamatoria”.
- ❖ 53° Congreso Mexicano de Química y 37° Congreso Nacional de Educación Química, que se llevó a cabo del 2 al 5 de octubre del 2018 en Ciudad de México, México.
Presentación oral: “Síntesis de compuestos de coordinación de cobre(II) con diiminas aromáticas e indometacina con posible actividad antitumoral y su incorporación en un nanogel”.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, por acogerme en sus instalaciones durante los últimos diez años de mi vida y permitirme cumplir algunos de mis sueños.

A la Facultad de Química, lugar donde he desarrollado gran parte de mi vida científica y en cuyas instalaciones se llevó a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (Número de becario 604136).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por la beca otorgada para la asistencia al Encuentro de Química Inorgánica EQI-2017.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM), por los fondos otorgados a través del proyecto PAPIIT IT201518 “Síntesis y caracterización de sistemas nanohíbridos superparamagnéticos con posible aplicación en el tratamiento del cáncer.”

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los fondos otorgados a través del proyecto 179119 “Estudios de los mecanismos de acción de fármacos antineoplásicos de base metálica (Casiopeínas) y la evaluación de sus efectos *in vitro* e *in vivo* en leucemias humanas.”

A mi asesora, la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su gran grupo de investigación, por el apoyo constante, por la paciencia, por todos los conocimientos que ha compartido conmigo y sobre todo por la confianza que siempre depositó en mí y en mi trabajo.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la oportunidad de colaborar nuevamente en su proyecto Casiopeínas, por el apoyo y la motivación constante, por las invaluable enseñanzas y consejos, por no dejar ir las oportunidades de incentivar mi investigación científica y mi desarrollo personal.

Al Dr. Jesús Gracia Mora, el Dr. Armando Marín Becerra y el Dr. Rafael Moreno Esparza, por hospedarme en su laboratorio y grupo de trabajo, por los incesantes cuestionamientos que dieron lugar al desarrollo de este proyecto.

A los miembros del H. Jurado, por el tiempo y la dedicación a la revisión de mi trabajo, por las valiosas contribuciones y los consejos para la mejora de mi trabajo.

A la red temática de FARMOQUÍMICOS, por la estancia de investigación.

Al Dr. Luis Antonio Ortiz Frade del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, S.C. (CIDETEQ), por el apoyo en el desarrollo de la electroquímica.

A la M. en C. Virginia Gómez Vidales del Instituto de Química-UNAM, por el apoyo en todo momento para llevar a cabo los experimentos de resonancia paramagnética electrónica.

Al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda de la Universidad de Sonora, por la realización de las pruebas de actividad antiproliferativa.

Al Dr. Ernesto Rivera García del Instituto de Investigación en Materiales, UNAM por la obtención de las microscopias electrónicas de barrido.

Al Dr. Iván Darío Rojas Montoya, por la guía, el interés y la contribución al proyecto, por las interminables discusiones y la perseverancia en el día a día.

Al M. en C. José Guillermo Macías Cárdenas, Q.F.B. Brenda Esther Bravo Velasco, Q.F.B. Leticia Antonio Gutiérrez y Q.F.B. Mayra Martínez Pelaes, por las imponderables enseñanzas y las incontables ocasiones en las que dedicaron su tiempo a compartirme sus conocimientos y por el maravilloso trabajo en equipo que conlleva a hacer más ameno el trabajo diario en el laboratorio.

A los integrantes de los laboratorios 05, 100 y Química Inorgánica Medicinal del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, por las aportaciones y los consejos dedicados a la realización de este proyecto.

A los integrantes de los laboratorios 121, 122 y 123 del Departamento de Farmacia, por el invaluable interés, el constante apoyo y las grandes contribuciones hacia este trabajo.

Índice

Índice de Figuras.....	9
Índice de Tablas.....	12
Abreviaturas.....	14
Unidades.....	16
Resumen.....	17
Introducción.....	19
1. Antecedentes.....	20
1.1 Cáncer.....	20
1.1.1 Generalidades.....	20
1.1.2 Epidemiología.....	20
1.1.3 Biología del cáncer.....	22
1.1.4 Microambiente tumoral.....	23
1.2 Tratamiento contra el cáncer.....	25
1.2.1 Quimioterapia.....	26
1.2.2 Quimioterapia con compuestos inorgánicos.....	27
1.3 Cobre.....	30
1.3.1 Química del cobre.....	30
1.3.2 Importancia biológica del cobre.....	31
1.3.3 Quimioterapéuticos de cobre.....	31
1.4 Casiopeínas.....	32
1.4.1 Composición química de las Casiopeínas.....	32
1.4.2 Mecanismo de acción de las Casiopeínas®.....	34
1.4.3 Influencia de los ligantes en la actividad antitumoral.....	36
1.5 Indometacina.....	37
1.5.1 Indometacina en el tratamiento contra el cáncer.....	41
1.5.2 Compuestos de coordinación con indometacina.....	41
1.6 Sistemas de liberación.....	44
1.6.1 Sistemas de liberación modificada.....	45
1.7. Hidrogeles.....	47
1.7.1 Quitosán.....	48
1.7.2 Poli (N-isopropilacrilamida).....	50

1.7.3 Hidrogeles de CS y PNIPAAm	53
2. Planteamiento del proyecto	56
3. Hipótesis.....	58
4. Objetivos	59
4.1 Objetivo general.....	59
4.2 Objetivos particulares	59
5. Desarrollo experimental.....	61
5.1 Reactivos	61
5.2 Síntesis de los compuestos de coordinación	61
5.3 Caracterización de los compuestos de coordinación	62
5.3.1 Espectroscopia de infrarrojo.....	62
5.3.2 Espectroscopia electrónica de absorción en el UV-Visible.....	63
5.3.3 Análisis elemental	63
5.3.4 Conductividad eléctrica molar	63
5.3.5 Momento magnético.....	63
5.3.6 Temperatura de descomposición	63
5.3.7 Resonancia paramagnética electrónica	63
5.3.8 Voltamperometría cíclica.....	64
5.4 Determinación de la concentración inhibitoria media.....	65
5.5 Estudios de interacción mediante espectroscopia electrónica de absorción en el UV	67
5.6 Síntesis del nanogel	67
5.7 Liofilización del nanogel.....	69
5.8 Caracterización del nanogel	69
5.8.1 Espectroscopia de infrarrojo.....	69
5.8.2 Tamaño de partícula y potencial zeta.....	69
5.8.3 Calorimetría diferencial de barrido	70
5.8.4 Microscopía electrónica de barrido.....	70
5.9 Curvas de calibración	70
5.10 Encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃ en el nanogel	70
5.11 Separación del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre ..	71

5.12 Encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	72
5.13 Liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	72
6. Resultados y discusión.....	74
6.1 Síntesis de los compuestos de coordinación	74
6.2 Caracterización de los compuestos de coordinación	74
6.2.1 Espectroscopia de infrarrojo.....	74
6.2.2 Análisis elemental	78
6.2.3 Conductividad eléctrica molar	79
6.2.4 Momento magnético.....	80
6.2.5 Temperatura de descomposición	81
6.2.6 Espectroscopia electrónica de absorción en el UV-Visible.....	81
6.2.7 Resonancia paramagnética electrónica	89
6.2.8 Voltamperometría cíclica.....	95
6.2.8.1 Voltamperometría cíclica de los compuestos [Cu(bipy)(Indo)]NO ₃ y [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃ y [Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	100
6.2.8.2 Voltamperometría cíclica de los compuestos [Cu(fen)(Indo)]NO ₃ , [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃ , [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃ y [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO ₃	102
6.3 Concentración inhibitoria media.....	106
6.4 Estudios de interacción.....	107
6.5 Síntesis del nanogel #1.....	113
6.6 Caracterización del nanogel #1	113
6.6.1 Tamaño de partícula	113
6.7 Síntesis del nanogel #2.....	114
6.8 Caracterización del nanogel #2	114
6.8.1 Tamaño de partícula	114
6.8.2 Espectroscopia infrarroja del nanogel	115
6.8.3 Potencial zeta.....	117
6.8.4 Calorimetría diferencial de barrido	118
6.8.5 Microscopia electrónica de barrido.....	119
6.9 Curvas de calibración	121
6.10 Encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	122

6.11 Separación del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre	122
6.12 Liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	125
7. Resumen de resultados	132
8. Conclusiones	135
8. Perspectivas	136
9. Bibliografía	137
Anexo 1. Espectroscopia de infrarrojo	149
Anexo 2. Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis	153
Anexo 3. Espectros de resonancia paramagnética electrónica	161
Anexo 4. Voltamperogramas	168
Anexo 5. Gráficas de actividad antiproliferativa	171
Anexo 6. Datos de porcentaje de encapsulación	173

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplo de célula tumoral [1].	20
Figura 2. Las 10 principales causas de defunción en el mundo (2015) [2].	21
Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer para ambos sexos.	22
Figura 4. Principales marcadores del cáncer. Imagen modificada de [6].	23
Figura 5. Ruta de inflamación mediada por NF-κβ. Imagen modificada de [8].	24
Figura 6. a) Mecloretamina b) 5-Fluorouracilo c) Mitoxantrona d) Paclitaxel.	27
Figura 7. Quimioterapéuticos de platino a) Cis-platino b) Carboplatino c) Oxaliplatino d) Nedaplatino e) Lobaplatino f) Heptaplatino.	28
Figura 8. a) Titanoceno b) NAMI-A c) Auranofina d) KP46 o FFC11.	29
Figura 9. a) [Cu(KTS) ₂] b) Derivado de isatina c) [Cu(fen) ₂] ²⁺ .	32
Figura 10. Estructura general de las Casiopeínas®.	33
Figura 11. Estructura de las Casiopeínas (a) CasII-gly (b) CasIII-ia (c) Cas III-Ea.	34
Figura 12. Imágenes de MFA (a) CasII-gly (b) CasIII-ia (c) Cas III-Ea.	35
Figura 13. Mecanismo de generación de ERO. Imagen modificada de [35].	36
Figura 14. Actividad antiproliferativa de las Casiopeínas® con variaciones en el ligante primario y secundario. [37].	37
Figura 15. Estructura de la indometacina (HIndo).	38

Figura 16. Metabolismo del ácido araquidónico. [39]	40
Figura 17. Estructura del compuesto $[\text{Cu}_2(\text{Indo})_4(\text{DMF})_2] \cdot 1.6\text{DMF}$	42
Figura 18. Estructura general de los compuestos $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})_2]$	43
Figura 19. Actividad antitumoral y antiinflamatoria de los compuestos de la figura 18. Imágenes modificadas de [54].....	44
Figura 20. Gráfica de concentración plasmática vs tiempo.	45
Figura 21. Comparación entre sistemas de liberación convencionales y sistemas de liberación modificada.....	46
Figura 22. Estructura química del quitosán.	48
Figura 23. Hinchamiento de quitosán. Imagen modificada de [71].....	49
Figura 24. Liberación de doxorubicina de hidrogeles compuestos de.....	50
Figura 25. Estructura química del PNIPAAm.....	50
Figura 26. Comportamiento LCST y UCST. Imagen modificada de [54].	51
Figura 27. Modificación de la LCST en los nanogeles	52
Figura 28. Liberación de doxorubicina a diferentes condiciones de T y pH.	53
Figura 29. Variación de las propiedades del nanogel en función de la relación CS:PNIPAAm. Imagen modificada de [84].	53
Figura 30. Grado de hinchamiento de hidrogeles en función de la temperatura ...	54
Figura 31. Liberación de doxorubicina de hidrogeles de CS-PNIPAAm-HA. Imagen modificada de [86].	55
Figura 32. Diiminas empleadas en la síntesis de los compuestos de coordinación.	59
Figura 33. Esquemas generales para la síntesis de las Casiopeínas [®]	62
Figura 34. Arreglo de electrodos empleado en VC.....	64
Figura 35. Síntesis del nanogel.	68
Figura 36. Esquema del sistema de reacción.....	69
Figura 37. Esquema del sistema de liberación.....	73
Figura 38. Compuestos de coordinación de Cu(II) sintetizados.	74
Figura 39. Espectro en el IR del compuesto $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$, bipy y HIndo. ..	75
Figura 40. Espectro electrónico de absorción en el ultravioleta (220-350 nm) en MeOH a T=25 °C.....	82

Figura 41. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta (220-350 nm) en MeOH a T=25 °C.....	83
Figura 42. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta.....	85
Figura 43. Espectros electrónicos de absorción en el visible (450-900 nm) en MeOH a T=25 °C.....	87
Figura 44. Transiciones en un centro metálico de Cu(II) con grupo puntual C _{4v}	88
Figura 45. Espectro de RPE del compuesto [Cu(fen)(Indo)]NO ₃ en estado sólido a temperatura ambiente.	90
Figura 46. Espectro de RPE del compuesto [Cu(fen)(Indo)]NO ₃	92
Figura 47. Orbitales atómicos del centro metálico de Cu(II).....	94
Figura 48. Voltamperogramas del ligante HIndo 1 mmol L ⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L ⁻¹ de TBAPF ₆ en DMSO.	96
Figura 49. Voltamperogramas de HIndo y [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	97
Figura 50. Voltamperogramas del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃ 1 mmol L ⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L ⁻¹ de TBAPF ₆ en DMSO. Electrodo de trabajo de carbón vítreo a T=25 °C, Vel=100 mV s ⁻¹	98
Figura 51. Voltamperogramas del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃ 1 mmol L ⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L ⁻¹ de TBAPF ₆ en DMSO. Electrodo de trabajo de carbón vítreo a T=25 °C, Vel=100 mV s ⁻¹	99
Figura 52. Voltamperograma del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	100
Figura 53. Reducción y oxidación de los compuestos con bipy sobre la superficie del electrodo. Imagen a partir de [110].	101
Figura 54. Voltamperograma del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃ 1 mmol L ⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L ⁻¹ de TBAPF ₆ en DMSO. Electrodo de trabajo de carbón vítreo a T=25 °C.	102
Figura 55. Reducción y oxidación de los compuestos con fen sobre la superficie del electrodo. Imagen a partir de [110].	103
Figura 56. Agentes reductores y oxidantes con los que los compuestos sintetizados pueden reaccionar para generar ERO.	105
Figura 57. Estructura química de los monómeros y polímeros empleados	108
Figura 58. Espectros de absorción en el UV. Cas, Am y la interacción entre ambos.	109

Figura 59. Espectros de absorción en el UV. Cas, acrilonitrilo y la interacción entre ambos.	110
Figura 60. Espectros de absorción en el UV. Cas, PNIPAAm y la interacción entre ambos.	111
Figura 61. Espectros de absorción en el UV. Cas, CS y la interacción entre ambos.	112
Figura 62. Espectro en el IR de la PNIPAAm, el CS y el nanogel sintetizado.	115
Figura 63. Modelo descriptivo de potencial z.	117
Figura 64. Micrografía del nanogel liofilizado.	120
Figura 65. Micrografía del nanogel en dispersión a pH=5.0.	120
Figura 66. Micrografía del nanogel en dispersión a pH=7.4.	121
Figura 67. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta (225-400 nm) en buffer HOAc/NaOAc a pH=5.0 y T=25 °C.	123
Figura 68. Esquema del sistema de separación.....	124
Figura 69. Esquema del sistema de liberación.....	125

Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades generales de la indometacina.....	39
Tabla 2. Bandas características y sus posibles asignaciones en IR	77
Tabla 3. Resultados de análisis elemental	78
Tabla 4. Resultados de conductividad eléctrica molar	79
Tabla 5. Resultados de momento magnético	80
Tabla 6. Intervalo de descomposición de los compuestos de coordinación	81
Tabla 7. Resultados de espectroscopia de absorción en el UV	86
Tabla 8. Resultados de espectroscopia de absorción en el visible	88
Tabla 9. Resumen de resultados de RPE	93
Tabla 10. Resultados de VC de los compuestos con bipy	101
Tabla 11. Resultados de VC de los compuestos con fen	104
Tabla 12. Valores de E1/2 vs ENH.....	105
Tabla 13. Concentración inhibitoria media en la línea celular HeLa.....	107
Tabla 14. Tamaño de partícula del nanogel obtenido en la síntesis 1.....	114

Tabla 15. Tamaño de partícula e índice de polidispersión del nanogel obtenido en la síntesis 2	114
Tabla 16. Resultados de potencial zeta	117
Tabla 17. Resumen de resultados de encapsulación	124
Tabla 18. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar la cinética de liberación a diferentes modelos a pH=5.0	127
Tabla 19. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar la cinética de liberación a diferentes modelos a pH=7.4	129
Tabla 20. Parámetros del modelo de Peppas-Sahlin para la cinética de liberación	130
Tabla 21. Parámetros del modelo Korsmeyer-Peppas para la cinética de liberación	130

Abreviaturas

ΔE	diferencia de potencial
®	marca registrada
acac	acetil acetato
ADN	ácido desoxirribonucleico
AINE	antiinflamatorio no esteroideo
APS	persulfato de amonio
ATP	trifosfato de adenosina
ARN	ácido ribonucleico
bipy	2,2'-bipiridina
Cl_{50}	concentración inhibitoria media
$[Cu(bipy)_2](NO_3)_2$	nitrato de bis(2,2'-bipiridina) de cobre(II)
$[Cu(bipy)(Indo)]NO_3$	$[Cu(2,2'-bipiridina)(Indo)]NO_3$
$[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO_3$	$[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(Indo)]NO_3$
$[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO_3$	$[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(Indo)]NO_3$
$[Cu(fen)_2](NO_3)_2$	nitrato de bis(1,10-fenantrolina) de cobre(II)
$[Cu(fen)(Indo)]NO_3$	$[Cu(fen)(Indo)]NO_3$
$[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO_3$	$[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(Indo)]NO_3$
$[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO_3$	$[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(Indo)]NO_3$
$[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO_3$	$[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(Indo)]NO_3$
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
E_a	potencial de pico anódico
E_c	Potencial de pico catódico
ENH	electrodo normal de hidrógeno
ERO	especies reactivas de oxígeno
Fc^+	ferricinio
Fc	ferroceno
Fen	1,10-fenantrolina
HIndo	Indometacina, 2-[1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-il]ácido acético

HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía
H ₂ NaPO ₄	fosfato monobásico de sodio
HNa ₂ PO ₄	fosfato dibásico de sodio
HOAc	ácido acético
N-N	diimina aromática (2,2'-bipiridina o 1,10-fenantrolina)
NaOAc	acetato de sodio
I	momento magnético nuclear
Indo	indometacina desprotonada
IR	infrarrojo
LMCT	transferencia de carga ligante-metal
MBA	N,N-metilenbidacrilamida
MeOH	metanol
MLTC	transferencia de carga metal-ligante
Ph	potencial de hidrógeno
pH _e	potencial de hidrógeno extracelular
pH _i	potencial de hidrógeno intracelular
PNIPAAm	poli (N-isopropilacrilamida)
RPE	resonancia paramagnética electrónica
S	momento magnético de espín
TBAPF ₆	hexafluorofosfato de tetrabutilamonio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
UV-Visible	ultravioleta-visible

Unidades

°C	grado Celsius
μS	microsiemens
cm	centímetro
h	hora
K	kelvin
L	litro
mL	mililitro
mmol	milimol
mT	militesla
mV	milivolt
nm	nanómetro
Ohm	ohmio u ohm
rcf	fuerza centrífuga relativa o fuerza g
s	segundo
V	volt

Resumen

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la incidencia va en aumento. Dentro de los tratamientos empleados destaca la quimioterapia por su alta eficiencia; sin embargo, presenta inconvenientes como elevada toxicidad en células sanas debido a su baja selectividad y a la resistencia celular adquirida por parte de las células tumorales, por lo que actualmente continúa la búsqueda de nuevas moléculas con mayor actividad antitumoral, así como nuevas formas de administración de los fármacos quimioterapéuticos.

En este proyecto se llevó a cabo la síntesis y caracterización de siete compuestos de coordinación de cobre con estructura general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{Indo})]\text{NO}_3$, donde N-N representa ligantes bidentados de tipo diimina 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina con sustituyentes metilo en diferentes posiciones de los anillos aromáticos e Indo representa el fármaco indometacina desprotonado.

Los compuestos sintetizados se obtuvieron con buena pureza de acuerdo con el análisis elemental obtenido, se comportan como electrolitos 1:1 en disolución de MeOH, descomponen a temperaturas superiores a los 143 °C y el centro metálico de cobre se encuentra en estado de oxidación 2⁺ con un estado electrónico basal donde el HOMO posee principalmente un carácter $d_{x^2-y^2}$.

Todos los compuestos poseen un centro metálico de cobre en estado de oxidación 2⁺ que adopta una geometría pirámide de base cuadrada, con un núcleo de tipo CuN_2O_2 y los cuatro átomos donadores provenientes de la unión bidentada de la diimina y de la indometacina en el plano xy; la posición axial se encuentra ocupada por moléculas de disolvente y el anión nitrato está fuera de la esfera de coordinación. El estudio del comportamiento oxido reductor del proceso Cu(II)/Cu(I) muestra sistemas cuasi-reversibles en los que la transferencia electrónica se lleva a cabo de manera lenta.

La actividad antiproliferativa de los compuestos fue evaluada frente a una línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa). Se observó que la incorporación de la indometacina a compuestos de coordinación Cu-diimina permite la obtención de compuestos con actividad antitumoral con valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) en un intervalo entre 0.67 y 25.2 μM .

El compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ es uno de los más activos en la línea celular evaluada ($0.72 \pm 0.10 \mu\text{M}$), por lo que se seleccionó como fármaco modelo para llevar a cabo el diseño de un nanogel sensible a los estímulos de temperatura incrementada y pH ácido, lo que permitirá controlar la liberación del compuesto en condiciones similares a las que se encuentran en la zona tumoral.

El estudio de la interacción por espectroscopia de absorción en el ultravioleta del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ con monómeros o polímeros sensibles a temperatura (Am, acrilonitrilo, PNIPAAm) y a pH (CS) mostró que la PNIPAAm y el CS presentan una buena interacción con el compuesto de coordinación; además de que la PNIPAAm presenta una ligera influencia de la temperatura en dicha interacción, por lo que ambos polímeros fueron seleccionados como constitutivos del nanogel.

El nanogel se sintetizó vía la copolimerización de la PNIPAAm y el CS en atmósfera de N₂ y pH ácido. De acuerdo con la caracterización, este se encuentra conformado por ambos polímeros y muestra tamaños de aproximadamente 100 nm a pH=7.4 y 670 nm a pH=5.0, presenta estabilidad eléctrica en medio ácido y transiciones de fase muy similares a las reportadas en la literatura para la PNIPAAm.

Una vez sintetizado y caracterizado el nanogel, se llevó a cabo la encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en las condiciones en las que éste se encuentra hinchado (pH ácido y baja temperatura), obteniéndose un porcentaje de encapsulación del $69.47 \pm 1.41 \%$, con aproximadamente 0.0496 ± 0.0010 mg de compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ por cada mg de nanogel.

Al estudiar la liberación del compuesto por parte del nanogel en diferentes condiciones de pH (buffer HAOAc/NaOAc a pH= 5.0 y buffer H₂NaPO₄/HNa₂PO₄ a pH=7.4) se observó un incremento en la velocidad de liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en condiciones ácidas, lo cual se debe a que en éstas condiciones el nanogel se hincha y permite la liberación del compuesto. La cinética de liberación ajusta al modelo de Peppas-Sahlin, por lo que involucra la difusión pasiva debida al gradiente de concentraciones y la relajación de las cadenas poliméricas. Al mostrar el comportamiento deseado, el sistema podría ser útil para la liberación del compuesto en el microambiente tumoral.

Introducción

El cáncer, hoy en día, es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y debido a los inconvenientes que presentan los tratamientos empleados, continúa la búsqueda no sólo de nuevas moléculas con una mayor actividad, sino también el desarrollo de nuevos sistemas de administración que permitan obtener un control sobre las condiciones en las que se lleva a cabo la liberación de este.

Las Casiopeínas[®] son una familia de compuestos de coordinación de Cu(II) que han demostrado *in vitro* e *in vivo* actividad citotóxica, genotóxica y antitumoral mediante diversos mecanismos. La incorporación de un fármaco como ligante en la estructura de las Casiopeínas, permitirá estudiar la influencia de éste en la actividad antitumoral.

Por otra parte, la falta de especificidad de los medicamentos convencionales hace que la distribución de los fármacos sea generalizada, hecho que conlleva a efectos adversos al tratamiento. Actualmente, los nanogeles han surgido como una alternativa a los sistemas de liberación convencionales, al presentar un elevado grado de hinchamiento ante cambios en el medio.

En el presente proyecto se llevó a cabo la síntesis y evaluación de la actividad antiproliferativa en la línea celular HeLa de siete nuevos compuestos de coordinación de cobre con estructura general $[Cu(N-N)(Indo)]NO_3$, que al incorporar el fármaco indometacina (actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica) como ligante en su estructura, permitirá estudiar la influencia de ésta en la actividad antitumoral de los compuestos de coordinación.

Posteriormente, uno de los compuestos más activos frente a la línea celular HeLa ($[Cu(4,7\text{-dimetil-fen})(Indo)]NO_3$) se empleará como fármaco modelo para diseñar un nanogel que permita llevar a cabo la liberación del compuesto en condiciones de pH ácido y temperatura incrementadas, similares a las del microambiente tumoral.

1. Antecedentes

1.1 Cáncer

1.1.1 Generalidades

El cáncer es un término genérico empleado para designar un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y la diseminación incontrolada de las células. El tumor (figura 1) suele invadir el tejido circundante y adicionado a esto, algunas células cancerígenas pueden desprenderse y trasladarse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original mediante un proceso llamado metástasis. Actualmente se conocen más de 100 tipos de cáncer y éstos reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se encuentra el tumor. [1]

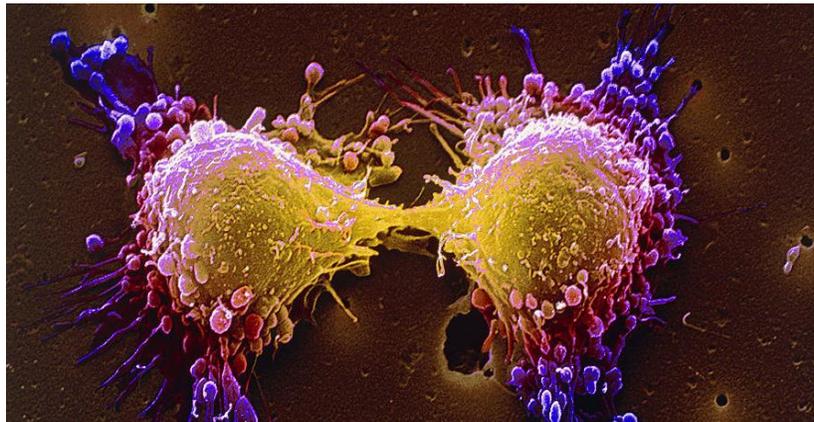


Figura 1. Ejemplo de célula tumoral [1].

1.1.2 Epidemiología

Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan que el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones y tan sólo los cánceres de tráquea, bronquios y pulmón ocuparon el quinto lugar en causas de defunción a nivel mundial con 1.69 millones de defunciones (figura 2). [2]

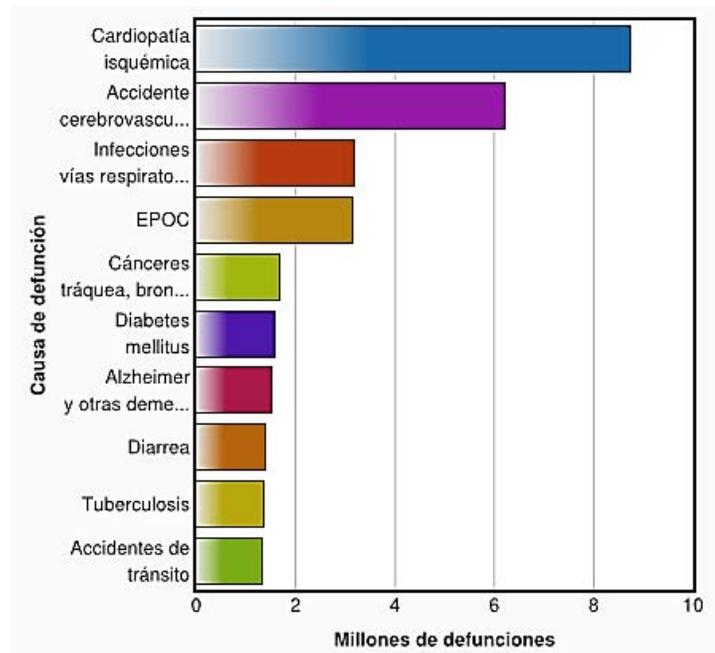


Figura 2. Las 10 principales causas de defunción en el mundo (2015) [2].

Durante 2012 los tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia a nivel mundial fueron cáncer de pulmón (1.8 millones de casos, esto es el 13.0 % del total), cáncer de mama (1.7 millones, esto es el 11.9 %) y cáncer colorrectal (1.4 millones, esto es el 9.7 %). Así mismo, los que provocaron un mayor número de muertes fueron cáncer de pulmón (1.6 millones, esto es el 19.4 % del total), cáncer de hígado (0.8 millones, esto es el 9.1 %) y cáncer de estómago (0.7 millones, esto es el 8.8 %). Los países con mayor incidencia de cáncer fueron: Dinamarca, Francia, Australia, Bélgica y Noruega. [3]

En un principio las tasas de incidencia y mortalidad para ambos sexos se mostraban muy semejantes; sin embargo, el desarrollo de nuevos tratamientos ha permitido que la tasa de mortalidad se disminuya en algunos tipos de cáncer. En la figura 3 se puede observar como las tasas de incidencia y mortalidad continúan siendo muy similares para cáncer de pulmón, estómago, hígado, esófago, leucemias y páncreas.

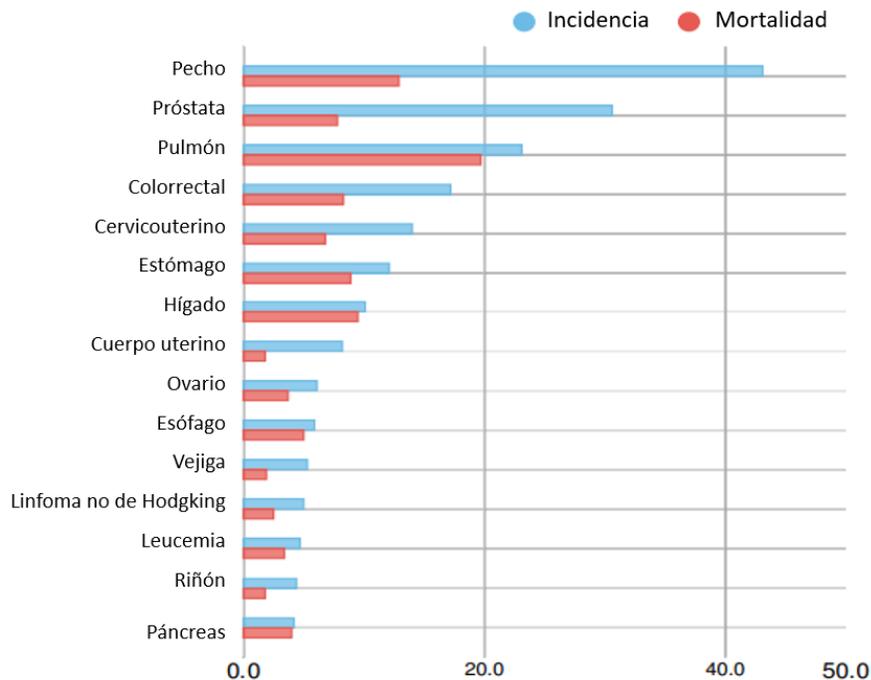


Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer para ambos sexos.

Imagen modificada de [3]

Lo anterior, aunado a que los 5 tipos de cáncer más comunes son pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago; resulta en considerables pérdidas humanas. Se estima que el número de personas que sobrevivían a un diagnóstico de cáncer en 2014 era tan sólo de 14.5 millones.

Según estadísticas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), aproximadamente el 39.6% de hombres y mujeres serán diagnosticados con cáncer en algún momento de su vida.

1.1.3 Biología del cáncer

El cáncer involucra una serie de mutaciones en genes recesivos o dominantes y cambios dinámicos en el genoma que conllevan a la alteración de diversas funciones como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

El genotipo de una célula tumoral presenta alteraciones que influyen en su regulación[4], tales como evasión de apoptosis, invasión de tejido o metástasis, angiogénesis, replicación ilimitada, autosuficiencia de señales de crecimiento e insensibilidad a las señales anticrecimiento. Recientemente se han sumado a estas desregulaciones la evasión del sistema inmune, la inestabilidad génica y mutación,

la desregulación en la energía celular y la promoción del proceso inflamatorio (figura 4). [5, 6]

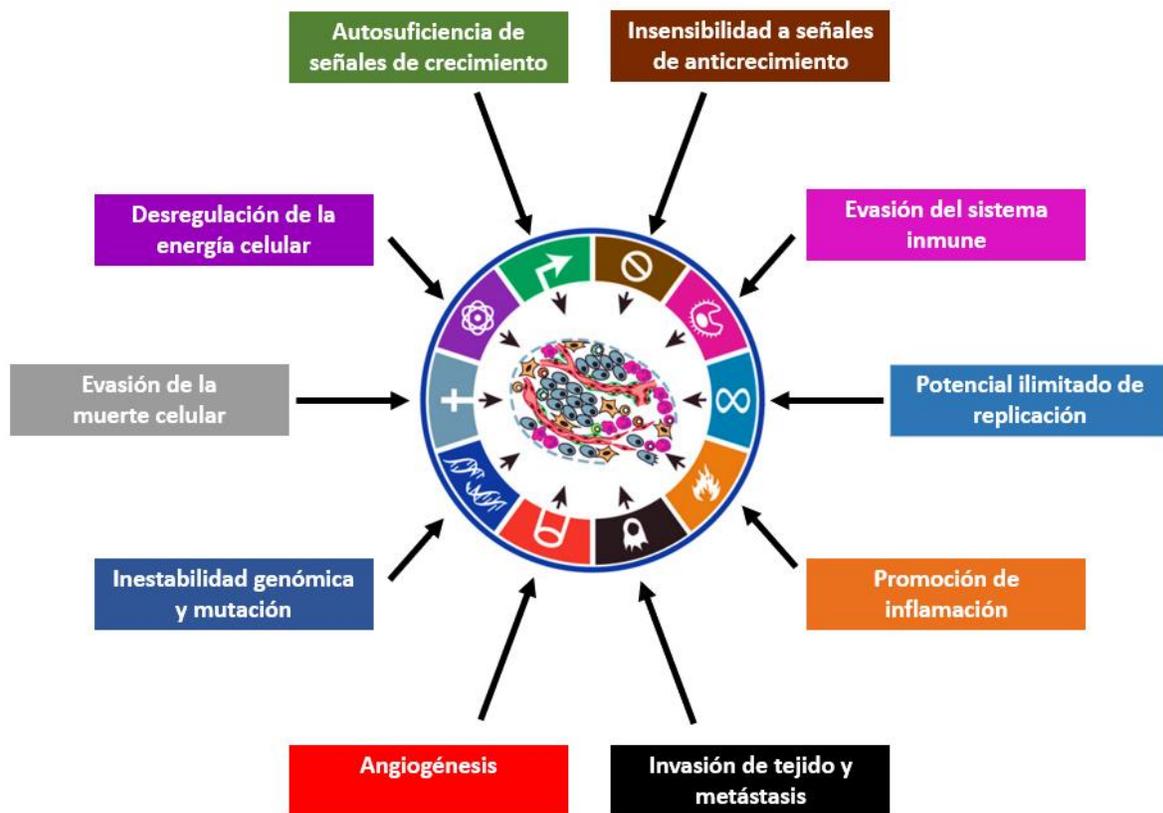


Figura 4. Principales marcadores del cáncer. Imagen modificada de [6].

1.1.4 Microambiente tumoral

La desregulación génica del tumor conlleva a la generación de un microambiente tumoral que favorece el metabolismo acelerado e inclusive la migración que caracteriza a las células tumorales.

El microambiente tumoral está compuesto de las células tumorales en proliferación, una alta demanda de nutrientes que conlleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos en la zona del tumor, generando una sobre vascularización mediante un proceso llamado angiogénesis, un incremento en las células inflamatorias infiltrantes, una variedad de células tisulares asociadas y una elevada concentración de ERO. [7]

Hoy en día se sabe que la "fase inmune" de la inflamación impulsada por el tumor implica afluencia de células antitumorales al sitio. El entorno hipóxico generado en el desarrollo del tumor favorece la afluencia de células inflamatorias

que dependen de la vía glucolítica para la supervivencia. Estas células no solo sobreviven en el entorno hipóxico, sino que contribuyen a él mediante la hiperproducción de ERO. Las actividades inmunoinhibitorias de ERO están mediadas por la ruta NF- κ B, que a su vez está regulada por hipoxia y/o reoxigenación (figura 5). [8, 9]

La activación de NF- κ B en estas células conduce a la secreción de TNF- α u otras citocinas proinflamatorias que inician y dirigen la expresión regulada de los genes de citocina responsables de la proliferación celular (figura 5). [8]

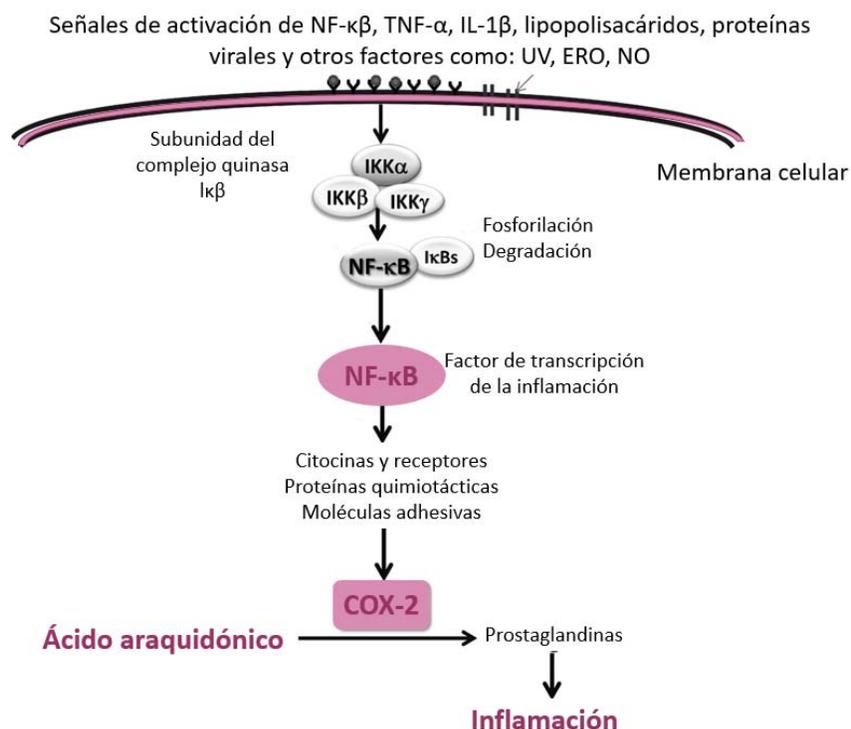


Figura 5. Ruta de inflamación mediada por NF- κ B. Imagen modificada de [8]

Del mismo modo, el transporte de iones y el control del pH tanto extracelular (pH_e) como intracelular (pH_i) juegan un rol crucial en variados procesos celulares y fisiológicos, incluyendo el control de la proliferación celular, el metabolismo, el potencial de membrana, la actividad mitocondrial, la síntesis de ADN y la síntesis de proteínas. Estudios *in vitro* han demostrado que las células tumorales poseen un control del transporte de protones y un balance ácido-base desregulado en comparación con las células sanas. [10]

El pH_e de los tejidos tumorales es a menudo ácido y metabolitos ácidos como el ácido láctico, generados por la glucólisis anaeróbica pueden ser una de las

causas principales. El pH_e ácido aumenta la expresión de algunos genes implicados con factores pro-metastásicos y también puede alterar la eficacia de fármacos sensibles a pH. [11, 12]

Aunque puede haber heterogeneidad en la composición del microambiente tumoral de acuerdo con el tipo de cáncer, las características comunes sugieren blancos para dirigir fármacos o sistemas acarreadores a la zona específica del tumor. [13]

1.2 Tratamiento contra el cáncer

Actualmente se cuenta con una gran variedad de tratamientos contra el cáncer, por lo que el que se suministre dependerá del tipo de cáncer, la etapa en que se encuentre e inclusive si se tiene algún otro problema de salud. Los tratamientos más eficaces son cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia; algunas veces en combinación [14]:

- ❖ **Cirugía:** Es el tratamiento más eficaz para el tratamiento de tumores sólidos y se puede llevar a cabo a diferentes niveles: cirugía de diagnóstico (se subdivide en laparoscopia y biopsia, ambas son empleadas para el análisis del tumor), cirugía curativa (extirpación del tumor primario), cirugía reconstructiva (o cirugía oncoplástica, principalmente empleada en aquellos casos cuyo procedimiento quirúrgico daña la imagen cosmética del paciente) y cirugía paliativa (procedimiento quirúrgico o colocación de dispositivos cuya finalidad es disminuir padecimientos relacionados con el cáncer o procedimientos quirúrgicos para la resección de un tumor).
- ❖ **Radioterapia:** Consiste en suministrar altas dosis de radiación para destruir células cancerígenas y reducir tumores. Puede ser administrada mediante la radioterapia externa (emplea fotones, electrones o protones), la implantación de radioisótopos (braquiterapia) o la inyección de éstos (radioterapia inyectada).
- ❖ **Inmunoterapia:** Se basa en la generación de la respuesta inmune por parte del organismo y puede ser de tipo específica, cuando la respuesta inmune generada va dirigida específicamente hacia el tumor o no específica, cuando se incrementa la respuesta inmune en general.

- ❖ Quimioterapia: Tratamiento que emplea fármacos citotóxicos, causando así la muerte celular mediante diferentes mecanismos.

En el desarrollo de este proyecto la quimioterapia es de especial interés.

1.2.1 Quimioterapia

La quimioterapia se utiliza para detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerígenas, así como reducir el tamaño de tumores antes y/o después de una cirugía o radioterapia. Los quimioterapéuticos se clasifican basándose en factores como estructura química, origen o mecanismo de acción. [15] Según esta última, los quimioterapéuticos se clasifican como:

- ❖ Agentes alquilantes: Compuestos que interactúan de manera directamente con el ADN, evitando así que la reproducción celular se lleve a cabo.
- ❖ Antimetabolitos: Actúan como inhibidores competitivos o no competitivos de metabolitos involucrados en la síntesis del ADN y del ARN.
- ❖ Antibióticos antineoplásicos: Son compuestos aislados de microorganismos con actividad antibacteriana y citotóxica cuyo mecanismo de acción es variado, las más utilizadas son las antraciclinas, las cuales se intercalan entre las bases del ADN.
- ❖ Inhibidores de la topoisomerasa: Interfieren con las enzimas topoisomerasas, las cuales se encuentran involucradas en los procesos para desenredar y religar las hebras del ADN durante la replicación.
- ❖ Inhibidores de la mitosis o agentes antimicrotubulares: Detienen la mitosis en la fase M del ciclo celular. Generalmente se unen a la tubulina para evitar la formación de microtúbulos (importantes en la morfología y división celular) aunque también pueden evitar la despolimerización de éstos (impidiendo así la división celular).
- ❖ Misceláneos: Tienen efecto citotóxico mediante diferentes mecanismos de acción, afectando varios blancos moleculares al mismo tiempo o el mecanismo de acción no se encuentra definido en alguno de los grupos anteriores.

En la figura 6 se muestran algunos de los quimioterapéuticos comúnmente utilizados: la mecloretamina (agente alquilante), la citarabina o 5-fluorouracilo

(antimetabolito), la mitoxantrona (antibiótico antitumoral) y el paclitaxel (inhibidor de la mitosis).

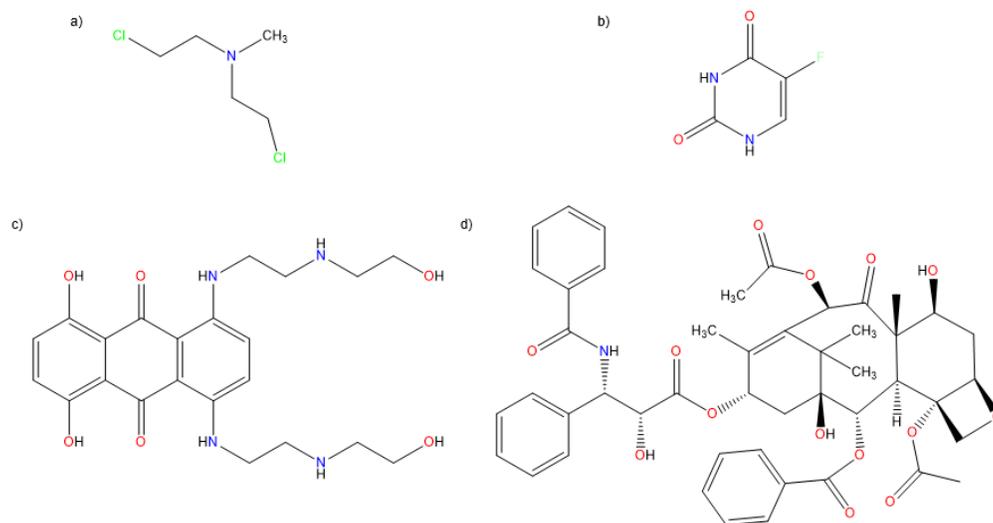


Figura 6. a) Mecloretamina b) 5-Fluorouracilo c) Mitoxantrona d) Paclitaxel.

En cuanto a la clasificación por estructura los quimioterapéuticos se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos, siendo éstos últimos de especial interés para el presente proyecto.

1.2.2 Quimioterapia con compuestos inorgánicos

El *cis*-platino fue el primer quimioterapéutico de origen inorgánico. Fue sintetizado por M. Peyrone en 1845 y A. Werner describió su estructura en 1893; sin embargo, fue hasta 1965 cuando B. Rosenberg descubrió su efecto inhibitorio de la proliferación celular al inhibir el crecimiento de un cultivo de *Escherichia coli*, dando pauta a una nueva era de fármacos antitumorales basados en iones metálicos. En 1971 entró a fase clínica y fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA por sus siglas en inglés) en 1978 bajo el nombre de Platinol®. [16, 17] Actualmente continúa siendo utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer entre los que se incluyen sarcomas y algunos carcinomas (pulmón, vejiga, tumores germinales, ovario, cabeza y cuello, esófago y estómago). [18]

Algunos de los inconvenientes del *cis*-platino son su elevada toxicidad (nefrotoxicidad y neurotoxicidad), la resistencia celular adquirida y su baja solubilidad en agua; por lo que una vez conocido el blanco molecular y los

mecanismos implicados se diseñaron compuestos basados en él, pero con ciertas mejoras en las propiedades, dando lugar a sus derivados de segunda y tercera generación.

Entre los compuestos de platino más destacados se encuentra el carboplatino (que pretende minimizar las interacciones con biomoléculas y fue aprobado por la FDA en 1998 bajo el nombre paraplatino®), el oxaliplatino (aprobado en 2002 por la FDA), el nedaplatino (aprobado en Japón, fase II en EE. UU.), el lobaplatino (aprobado en China, fase III en EE. UU.) y el heptaplatino (aprobado en Corea del Sur) (figura 7). [19]

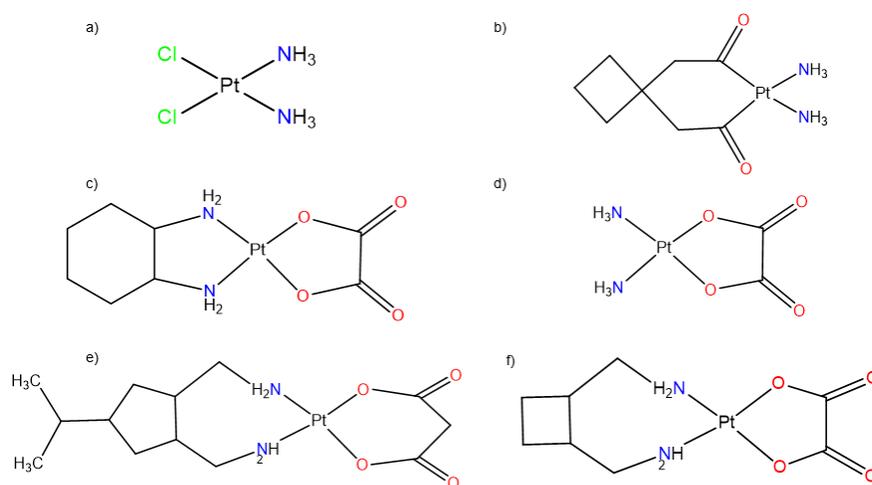


Figura 7. Quimioterapéuticos de platino a) Cis-platino b) Carboplatino c) Oxaliplatino d) Nedaplatino e) Lobaplatino f) Heptaplatino.

Los compuestos de platino se encuentran clasificados como agentes metalatantes, ya que forman enlaces covalentes preferentemente con el N⁷ de la guanina en el ADN. A partir del *cis*-platino y sus derivados, así como con los avances de la química bioinorgánica medicinal (rama de la química inorgánica que centra su estudio en la función de especies inorgánicas en los sistemas biológicos y la aplicación de metales en medicina) [20, 21], el desarrollo de quimioterapéuticos basados en centros metálicos se ha convertido en un área de gran interés.

Es así como en 1979 Köpf y Köpf-Maier estudiaron la actividad citotóxica del diclorobis(η^5 -pentadienil) titanio(IV), mejor conocido como titanoceno (figura 8 a)). El diseño de este compuesto consideró que por tratarse de un compuesto neutro con cloruros en posición *cis* presentaría una actividad similar a la del *cis*-platino. No

presentó nefrotoxicidad ni mielotoxicidad, por lo que se convirtió en el segundo compuesto inorgánico en entrar a fase clínica I para el tratamiento de cáncer. [22]

Diversos quimioterapéuticos metálicos han logrado llegar a fases clínicas, entre ellos destacan: NAMI-A, auranofina, y KP46 (figura 8 b), c) y d) respectivamente). El primero contiene en su estructura un centro metálico de Ru(III) y logró llegar a fase clínica II, donde fue descartado por presentar efectos secundarios como neutropenia, anemia, elevación de enzimas hepáticas, elevación de creatinina transitoria, náuseas, vómitos, estreñimiento, diarrea, fatiga y toxicidad renal; además, al combinar el tratamiento con gemcitabina (quimioterapéutico antimetabolito utilizado para tratar cáncer de ovarios, mama, pulmón no microcítico y páncreas) no mostró una mejora significativa frente a los resultados únicamente con la gemcitabina. [23, 24]

La auranofina (figura 8 c)) posee un centro metálico de Au(I) y se encuentra en fase clínica II en EE. UU. para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica.

El KP46 (figura 8 d), también conocido como FFC11 es un compuesto de Ga(III) que se encuentra en fase clínica I para el tratamiento de melanomas. [22]

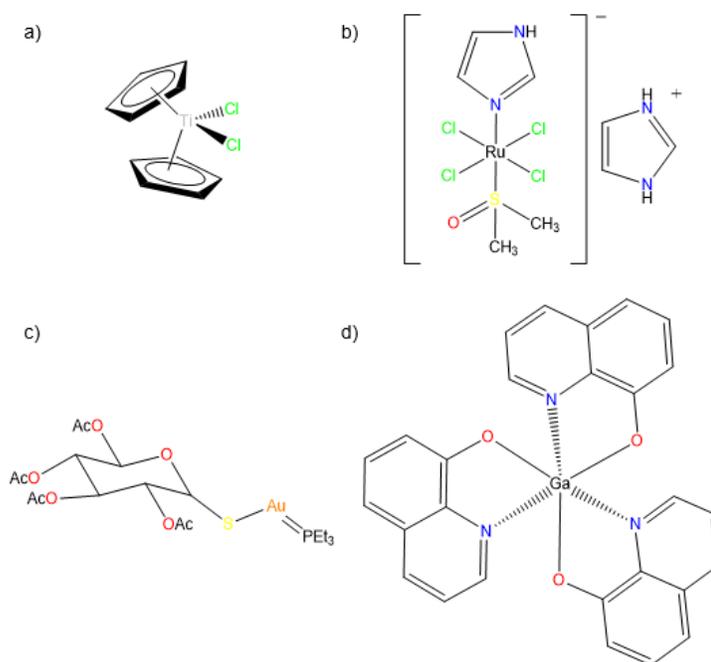


Figura 8. a) Titanoceno b) NAMI-A c) Auranofina d) KP46 o FFC11.

El diseño de los quimioterapéuticos se encuentra enfocado principalmente en interferir en las vías metabólicas de la proliferación celular; debido a esto aquellas células sanas que presenten replicación rápida como las de la médula ósea y la pared del intestino tienden a ser las más afectadas, produciendo así efectos secundarios como: fatiga, náusea, vómito, mielosupresión, leucopenia, trombocitopenia, anemia, ulceración de mucosas y alopecia.

Debido a esto, el reto de la química bioinorgánica medicinal consiste en desarrollar moléculas activas que presenten mayor actividad antitumoral y una menor toxicidad hacia las células sanas; siendo una de las estrategias el empleo de metales esenciales para los cuales el organismo posee un mecanismo homeostático, hecho que pudiera disminuir considerablemente su toxicidad.

Hoy en día se cuenta con la evaluación de citotoxicidad de compuestos desarrollados a partir de metales esenciales; entre ellos destacan compuestos de coordinación de manganeso, cobalto y cobre con ligantes tipo salen, cobre y manganeso con salicilaldehído y algunos de cromo. [22] En esta tesis se abordará el desarrollo de quimioterapéuticos cuya estructura está compuesta por un centro metálico de Cu(II).

1.3 Cobre

1.3.1 Química del cobre

El cobre es el primer elemento del grupo 11 de la tabla periódica, posee una configuración electrónica $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ y sus estados de oxidación son I, II y III.

El Cu(I) es un sistema d^{10} por lo que sus compuestos son diamagnéticos y generalmente incoloros. Los números de coordinación más comunes para el Cu(I) son 2 (lineal), 3 (trigonal plana) y 4 (tetraédrica). El Cu(II) es un sistema d^9 por lo que sus compuestos son paramagnéticos con distorsión Jahn-Teller y números de coordinación 4 (tetraedro distorsionado y cuadrado plano), 5 (pirámide de base cuadrada) y 6 (octaédrica). El Cu(III) es un sistema d^8 y es poco común, aunque ligantes de tipo amina basados en piridina, amida desprotonada, tioles o macrocíclicos pueden estabilizarlo. [25]

1.3.2 Importancia biológica del cobre

El cobre es un metal esencial, por lo que un adulto sano de aproximadamente 70 kg de peso posee 110 mg de éste distribuidos principalmente en cerebro, riñón, corazón e hígado.

En sistemas biológicos el cobre se encuentra formando parte de numerosas proteínas y sus funciones están relacionadas fundamentalmente con la transferencia electrónica, la catálisis de procesos redox y el transporte y la activación de dioxígeno. [26] Algunos ejemplos son: la plastocianina, proteína encargada de la transferencia de electrones entre el citocromo f del complejo del citocromo b₆^f del fotosistema II y P700+ del fotosistema I durante la fotosíntesis, Cu,Zn-SOD o SOD1, una enzima citoplasmática de cobre y zinc encargada de dismutar al radical superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, la hemocianina, proteína encargada del transporte de oxígeno en moluscos y artrópodos y la dopamina β-hidroxilasa, enzima que se encarga de catalizar la introducción de un átomo de oxígeno a la dopamina para formar noradrenalina. [25]

1.3.3 Quimioterapéuticos de cobre

Considerando la elevada toxicidad de los quimioterapéuticos empleados y la importancia biológica del cobre surge el proyecto Casiopeínas[®], encabezado por la Dra. Lena Ruiz Azuara, el cual tiene como objetivo el diseño de fármacos con un centro metálico de cobre con una mayor actividad y un menor costo; así como el desarrollo de quimioterapia nacional.

Algunos otros compuestos de cobre con actividad antitumoral han sido desarrollados. El compuesto [Cu(3-etoxioxibutiraldehído-bis-(tiosemicarbazona)] también conocido como [Cu(KTS)₂] demostró tener una buena actividad citotóxica (figura 9 a)); aunque no se continuó su evaluación en fases clínicas, fue un preámbulo para la investigación de compuestos de cobre con tiosemicarbazonas (R₁R₂C=N-NR₃-CS-NR₄R₅), los cuales generalmente presentan buena actividad antineoplásica, pero poseen inconvenientes como baja solubilidad y alta toxicidad en modelos *in vivo*.

En general, compuestos de cobre con ligantes tipo base de Schiff (R₁R₂C=N-R₃, donde R₃ es un grupo arilo o alquilo) han demostrado poseer actividad citotóxica. Padhye y su grupo de trabajo han evaluado y demostrado la actividad de estos

compuestos frente a líneas de tumor de páncreas, el mecanismo propuesto involucra la inhibición de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y la desregulación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (linfoma de células B 2) y Bcl-XL (linfoma de células B extra grande). [22]

Los derivados de isatina sintetizados por el grupo de Cerchiaro (figura 9 b)) presentan equilibrios ceto-enol y por tanto una elevada estabilidad, la actividad de estos compuestos se debe a la inducción de apoptosis a través de la vía mitocondrial con mecanismos dependientes e independientes de p53 (proteína supresora de tumores).

Por otro lado, Zhou *et al.* reportaron que el compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$ (figura 9 c)) induce apoptosis en la fase G1 del ciclo celular en carcinoma de hígado Bel-7402, además de catalizar reacciones redox para producir ERO y disminuir la relación GSH/GSSG (glutati6n/glutati6n oxidado). Posteriormente se report6 la elevada actividad citot6xica de dicho compuesto frente a l6neas tumorales humanas (leucemia HL60 y estomacal SGC-7901). [22]

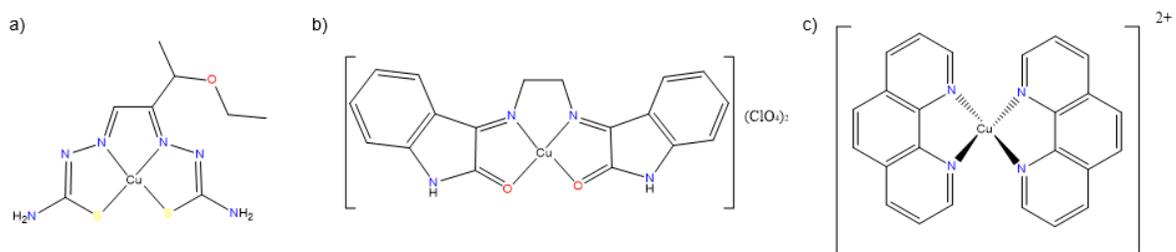


Figura 9. a) $[\text{Cu}(\text{KTS})_2]$ b) Derivado de isatina c) $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$.

1.4 Casiopeínas

1.4.1 Composici6n qu6mica de las Casiope6nas

Las Casiope6nas[®] (figura 10) son una familia de compuestos de coordinaci6n con f6rmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$. [27, 28] Presentan en su estructura un n6cleo Cu(II) cuya esfera de coordinaci6n contiene un ligante primario bidentado de tipo diimina arom6tica como 2,2'-bipiridina y 1,10-fenantrolina con diferentes sustituyentes en los anillos arom6ticos (N-N) y un ligante secundario que var6 de acuerdo con la generaci6n, pero que presenta 6tomos donadores (N-O), (N-N) u (O-O).

La primera generación posee ligantes cargados donadores (N-O) como α -aminoácidos, acetilacetatos o salicilaldehídos; la segunda generación posee ligantes neutros donadores (N-N), como 2-aminometilbenzimidazol, etilendiamina y 4,5-dimetil-o-fenilendiamina y la tercera generación incorpora como ligante donador un fármaco con actividad conocida.

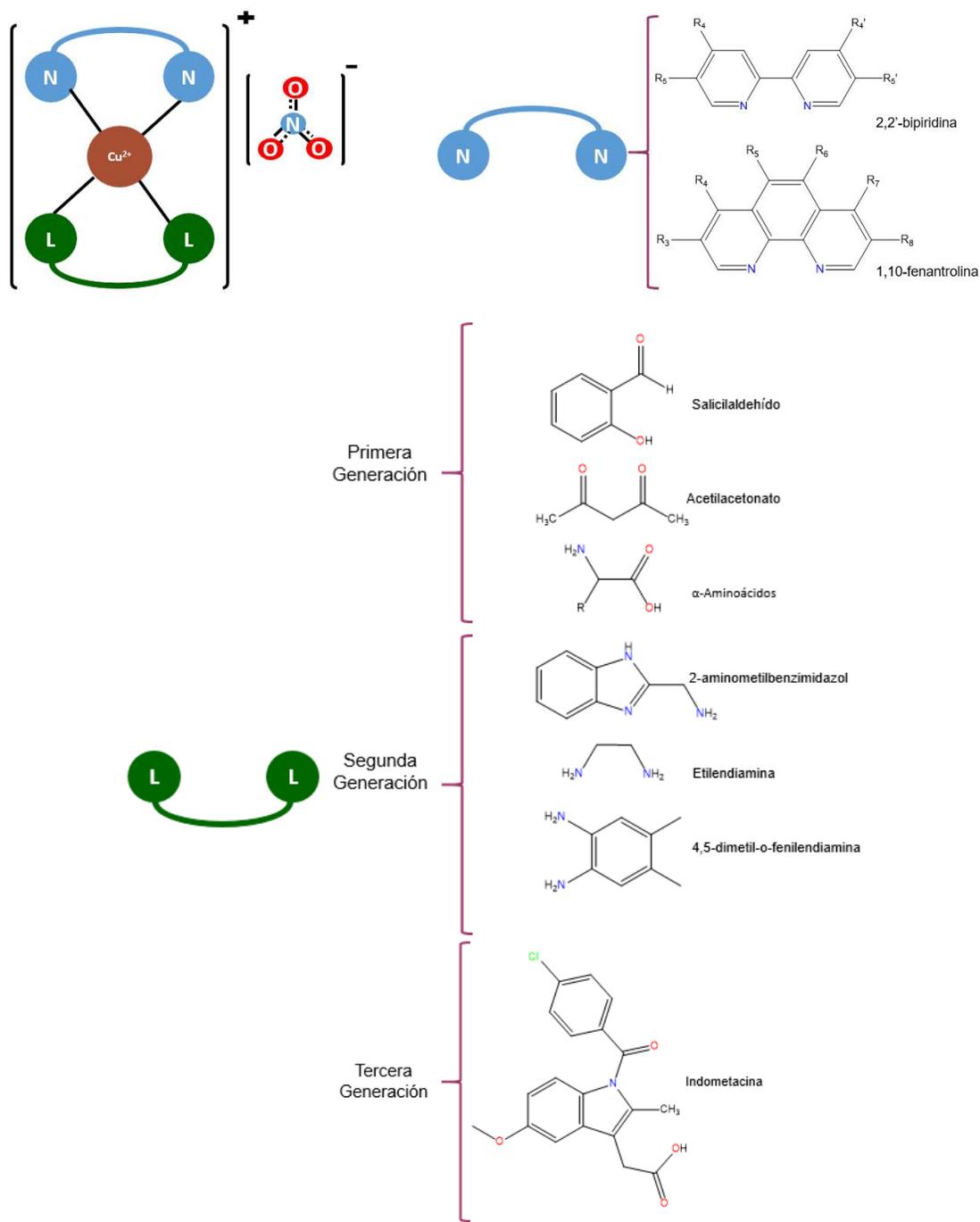


Figura 10. Estructura general de las Casiopeínas®.

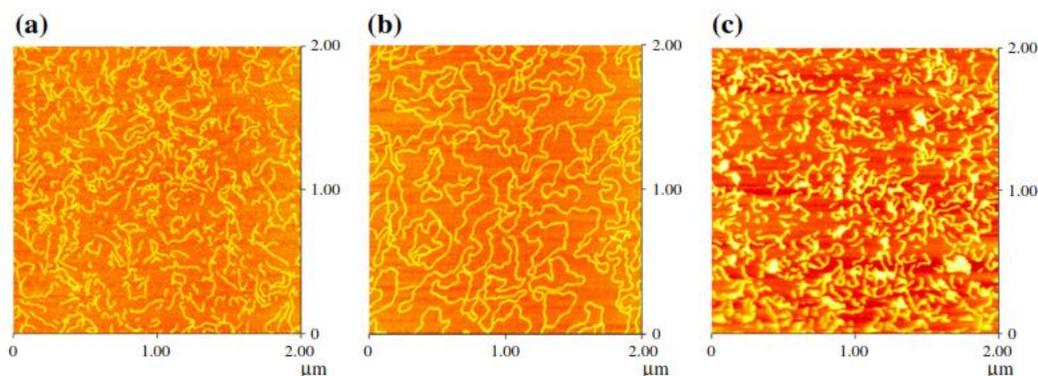


Figura 12. Imágenes de MFA (a) CasII-gly (b) CasIII-ia (c) Cas III-Ea.

Imagen modificada de [34].

b) Disminución de reductores endógenos

Experimentalmente se ha observado que las Casiopeínas[®] pueden tener una coordinación directa con reductores endógenos (como GSH) para formar ERO, que, a su vez, favorecen la muerte celular. Aunado a esto, la disminución de los niveles de GSH producen una disfunción mitocondrial.

c) Generación de ERO

El Cu(I) es capaz de llevar a cabo reacciones tipo Fenton, por lo que las Casiopeínas[®] una vez reducidas por algún reductor endógeno como GSH puede catalizar la reducción de H_2O_2 a $\cdot OH$, lo cual se ha observado en diversas líneas tumorales y ensayos *in vitro*. Kachadourian *et al.*, [35] empleando la cuantificación de DMPO (N-óxido de 5,5'-dimetil-1-pirrolina) mediante RPE propusieron el siguiente mecanismo (figura 13):

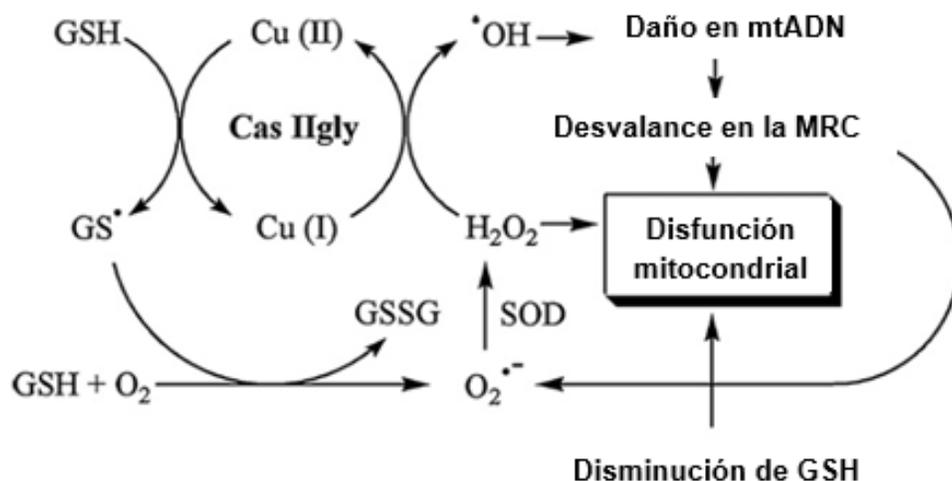


Figura 13. Mecanismo de generación de ERO. Imagen modificada de [35].

d) *Interferencia en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en la mitocondria.*

Los compuestos CasII-gly [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(acac)]NO₃ y Cas III-ia [Cu(4,7-dimetil-fen)(acac)]NO₃ desacoplan la cadena respiratoria al inhibir la producción de ATP, lo cual tiene como consecuencia la modificación del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c, produciendo la muerte celular vía apoptosis por mecanismos dependientes e independientes de caspasas.

1.4.3 Influencia de los ligantes en la actividad antitumoral

Debido a que la familia de las Casiopeínas[®] es muy amplia, ha sido posible llevar a cabo estudios de correlación cuantitativa estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés); los cuales permitieron determinar que las Casiopeínas[®] que poseen en su estructura 1,10-fenantrolina presentan una mayor actividad antiproliferativa *in vitro* en diferentes líneas tumorales humanas que aquellas que poseen 2,2'-bipiridina. En este mismo estudio se observó que sustituyentes en la diimina de tipo electrodonador desplazan el E_{1/2} hacia potenciales más negativos y por tanto poseen un carácter más reductor. Las Casiopeínas[®] con el E_{1/2} más reductor y carácter hidrofóbico presentan mayor actividad (CI₅₀ menor). [36]

En una serie de Casiopeínas[®] con fórmula general [Cu(4,7-dimetil-fen)(α-aminoacidato)]⁺ ante las líneas tumorales HeLa (cáncer cérvico-uterino), HCT-15 (adenocarcinoma de colon) y SKL-U (adenocarcinoma de pulmón), se observó que la modificación del ligante secundario no influye de manera significativa la actividad antiproliferativa *in vitro*. [37, 38]

La siguiente gráfica muestra que modificaciones en los sustituyentes de la 1,10-fenantrolina generan diferencias mayores que aquellas provocadas por el cambio de aminoácido como ligante secundario (figura 14).

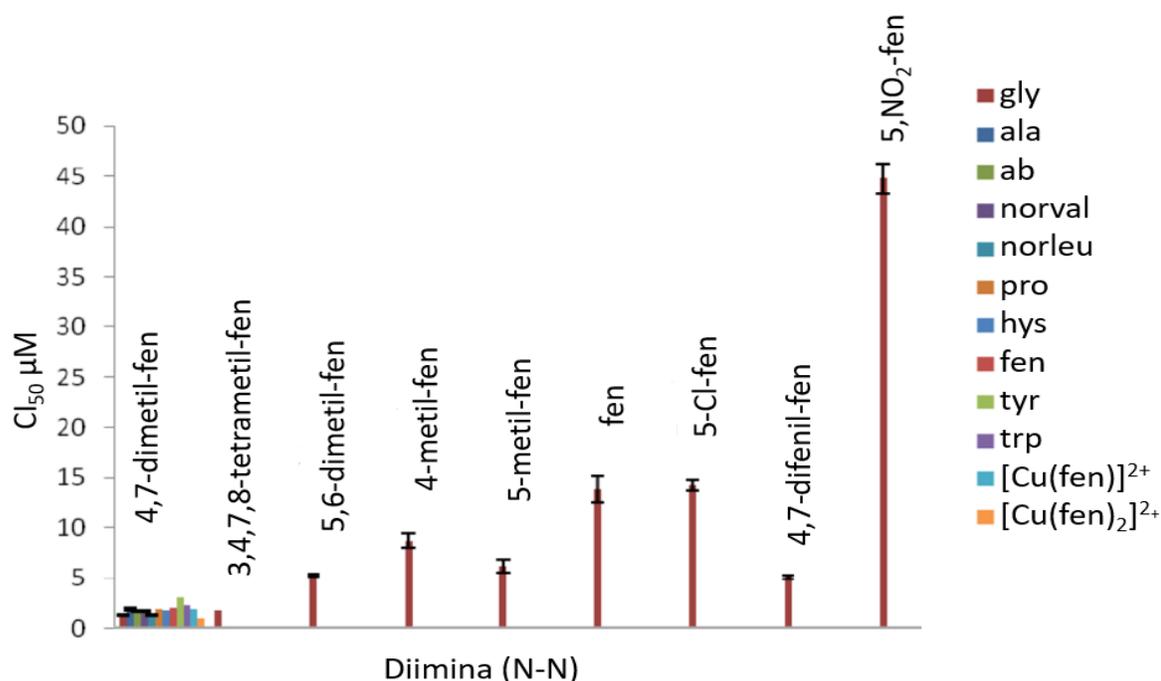


Figura 14. Actividad antiproliferativa de las Casiopeínas® con variaciones en el ligante primario y secundario. [37]

Por lo anterior, y debido al uso de antiinflamatorios como terapia paliativa en el tratamiento contra el cáncer, se consideró que la incorporación de un fármaco con actividad antiinflamatoria conocida como ligante secundario no conllevaría a una variación significativa en la actividad antitumoral y permitiría explorar la actividad dual por parte de los compuestos. El fármaco que se seleccionó para llevar a cabo dicha modificación fue indometacina.

1.5 Indometacina

La inflamación es una respuesta protectora del organismo frente infecciones, heridas o problemas médicos crónicos. Los fármacos antiinflamatorios se dividen en dos categorías, esteroideos y no esteroideos. Los antiinflamatorios esteroideos muestran una mayor respuesta que los no esteroideos; sin embargo, pueden tener efectos secundarios graves como pérdida de hueso, cataratas, problemas con la capacidad de combatir infecciones, hinchamiento, aumento de peso, cambios de

humor, presión arterial alta y problemas con la médula ósea, por lo que se prefiere la prescripción de los antiinflamatorios no esteroideos.

La indometacina (figura 15) es un fármaco analgésico, antiinflamatorio y antipirético perteneciente a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE o NSAID). Se sintetizó por primera vez en 1963 y fue aprobada por la FDA en 1965; es uno de los AINEs más activos y se encuentra comercialmente disponible en diversas presentaciones como tabletas, cápsulas, supositorios, gel, ungüento, solución y suspensión. [39]

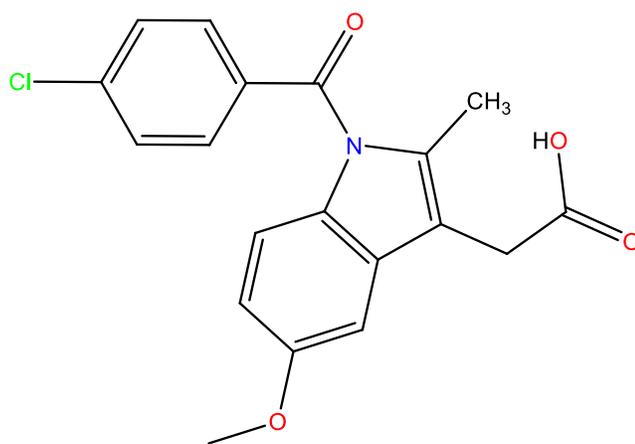


Figura 15. Estructura de la indometacina (HIndo).

La indometacina es comúnmente prescrita para el tratamiento de la artritis reumatoide moderada a severa, que incluye brotes agudos de enfermedades crónicas, espondilitis anquilosante, osteoartritis, hombro agudo doloroso (bursitis y/o tendinitis) y artritis gotosa aguda. El fármaco muestra una excelente biodisponibilidad por vía oral, una vez ingerido alcanza concentraciones máximas en 1 o 2 h y es de 10 a 40 veces más potente que la aspirina. Sólo entre el 10 y 20 % del producto se excreta sin cambios por la orina, en parte por secreción tubular. En la tabla 1 se muestran las propiedades generales de la indometacina.

Tabla 1. Propiedades generales de la indometacina

Propiedad	
Masa molecular	357.79 g/mol
Fórmula mínima	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄
Metabolismo	Hepático
pKa	4.5
Solubilidad	0.937 mg/L (en agua a 25 °C)
Tiempo de vida media	4.5 horas
Ruta de eliminación	Excreción renal y biliar, metabolismo.
Unión a proteína	97 %
Posología	25 mg, 2-3 veces al día; 75-100 mg por la noche
CI₅₀	1.67 μM (COX-1) y 24.6 μM (COX-2)

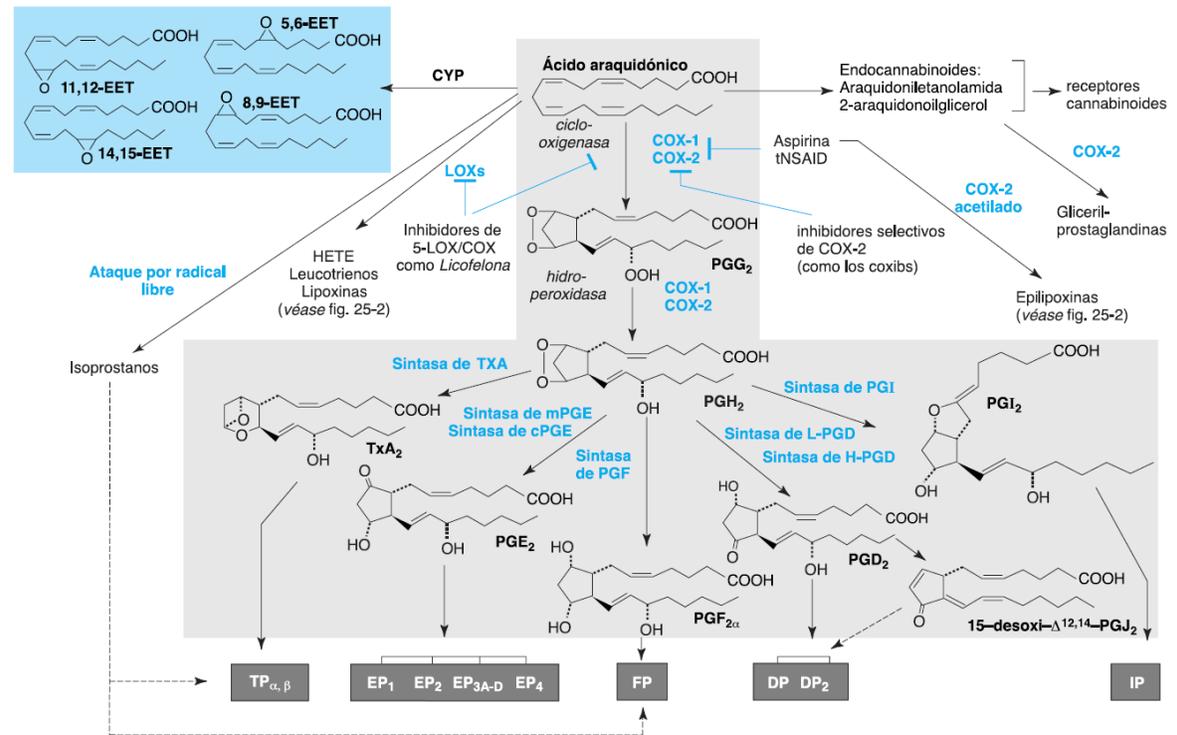
En 1971 el farmacólogo británico John Robert Vane publicó el efecto inhibitorio de la indometacina sobre la enzima ciclooxigenasa (trabajo que le otorgó el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1982). [40, 41] Actualmente es bien conocido que el mecanismo de acción de la indometacina es vía la inhibición antagónica de las enzimas ciclooxigenasas (COX); uniéndose a la porción superior del sitio activo y evitando que el sustrato (ácido araquidónico, AA) ingrese al sitio activo para convertirse en prostaglandinas, hormonas conocidas por ser la principal señal bioquímica de inflamación, dolor y fiebre en el organismo. La indometacina, a diferencia de otros AINEs, también inhibe la fosfolipasa A2, la enzima responsable de liberar el ácido araquidónico de los fosfolípidos. Hay pruebas de que actúa a nivel del sistema nervioso central y periférico y el uso frecuente de AINEs como la aspirina y la indometacina ha demostrado reducir significativamente la incidencia de cáncer de colon. [42, 43]

La indometacina inhibe las dos isoformas de COX, COX-1 y COX-2, con una mayor selectividad para COX-1 (figura 16).

COX-1 es una enzima expresada constitutivamente que participa en la protección de la mucosa gástrica, la función plaquetaria y renal. Cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina (PG)G₂ y PGG₂ a PGH₂. La

COX-1 está involucrada en las vías de síntesis de PGE₂, PGD₂, PDF_{2a}, PGI₂ (también conocida como prostaciclina) y tromboxano A₂ (TXA₂).

COX-2 se expresa constitutivamente y es altamente inducible por estímulos inflamatorios. Se encuentra en el sistema nervioso central, los riñones, el útero y otros órganos. También cataliza la conversión de ácido araquidónico a PGG₂ y PGG₂ a PGH₂. En la vía mediada por COX-2, PGH₂ se convierte posteriormente en PGE₂ y PGI₂. La PGE₂ interviene en la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que una disminución en los niveles de PGE₂ conduce a una disminución de la inflamación. [44, 45]



Se muestra en gris la vía de la ciclooxigenasa (COX). Los endoperóxidos cíclicos (PGG₂ y PGH₂) provienen de las acciones de ciclooxigenasa e hidropoxidasa secuenciales de COX-1 o COX-2 en el ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de membrana. Los productos ulteriores son generados por sintasas histo-específicas y transducen sus efectos a través de receptores de la membrana (*cuadros grises*). Las líneas interrumpidas indican interacciones supuestas entre ligando y receptor. EET (*fondo azul*) y los isoprostanos se producen por la actividad de CYP y el ataque no enzimático de radicales libres, respectivamente. La aspirina y tNSAID son inhibidores no selectivos de COX-1 y COX-2, pero no afectan la actividad de LOX.

Figura 16. Metabolismo del ácido araquidónico. [39]

Entre los efectos secundarios comunes de la indometacina se encuentran: náuseas, vómito, diarrea, acidez, dolor estomacal, salpullido, dolor de cabeza, mareos y somnolencia. Algunos otros son retención de líquidos, coágulos de sangre, ataques al corazón, hipertensión e insuficiencia cardíaca. [39] Entre el 15 y 30 % de los pacientes que consumen indometacina con regularidad muestran importante daño gastrointestinal debido a la inhibición de COX-1, convirtiéndolo así, en su principal limitante para uso recurrente.

1.5.1 Indometacina en el tratamiento contra el cáncer

Estudios inmunohistológicos han demostrado que la COX-2 se expresa en una variedad de cánceres humanos sólidos y en la neovasculatura del tumor, dando lugar a la supervivencia de éste y la metástasis. Dado que los vasos sanguíneos únicamente expresan COX-1, el uso de AINEs que inhiban COX-2 surge como posible estrategia para limitar el crecimiento tumoral. [46]

Por lo anterior, la influencia de la indometacina en la proliferación celular se ha estudiado en modelos *in vitro* e *in vivo*; y se ha observado que además de haber una disminución en la proliferación, hay un aumento en la apoptosis y una atenuación en el crecimiento metastásico. [47]

En pacientes sometidos a quimioterapéuticos a base de platino generalmente no se recomienda el suministro de AINEs debido al severo daño renal; sin embargo, un estudio reciente en pacientes sometidos al tratamiento de CAPOX (oxaliplatino más capecitabina) y *cis*-platino muestra la disminución de PIFA (ácidos grasos inducidos por platino asociados a la resistencia celular) al combinar el tratamiento con indometacina. [48]

Por otro lado, al evaluar la viabilidad celular en una línea de carcinoma de vejiga canina, se observó que el suministro de indometacina con AB1010 (inhibidor de la tirosina quinasa), potencializa la actividad de éste, generando una mayor disminución en la viabilidad celular y la producción de PGE₂ respecto a AB1010. [49]

1.5.2 Compuestos de coordinación con indometacina

La unión de la indometacina a metales divalentes como zinc, cobalto, níquel, magnesio y cobre surgió como una alternativa para disminuir la toxicidad gastrointestinal. Los compuestos de coordinación con cobre mostraron una mayor inhibición de la producción de prostaglandinas PGE₂ con $119.0 \pm 8.9 \mu\text{g L}^{-1}$ respecto

a $215.9 \pm 16.7 \mu\text{g L}^{-1}$ en ausencia de ion metálico. Lo anterior, aunado a la actividad redox del cobre sugirió que este tipo de compuestos podrían ser una prometedora alternativa para incrementar la actividad de la indometacina y disminuir el daño gástrico. [50]

La síntesis genera compuestos tipo $[\text{Cu}_2(\text{Indo})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}_2(\text{Indo})_4(\text{DMF})_2] \cdot 1.6\text{DMF}$ (figura 17), donde la estructura obtenida es muy similar al acetato de cobre monohidratado. Consiste en especies diméricas con un núcleo Cu_2O_{10} donde los dos átomos de cobre se encuentran en estado de oxidación 2^+ , unidos por el grupo carboxilato con distancias Cu-Cu de aproximadamente 2.61-2.63 Å, siendo la geometría de cada cobre un octaedro con distorsión de Jahn-Teller. [51]

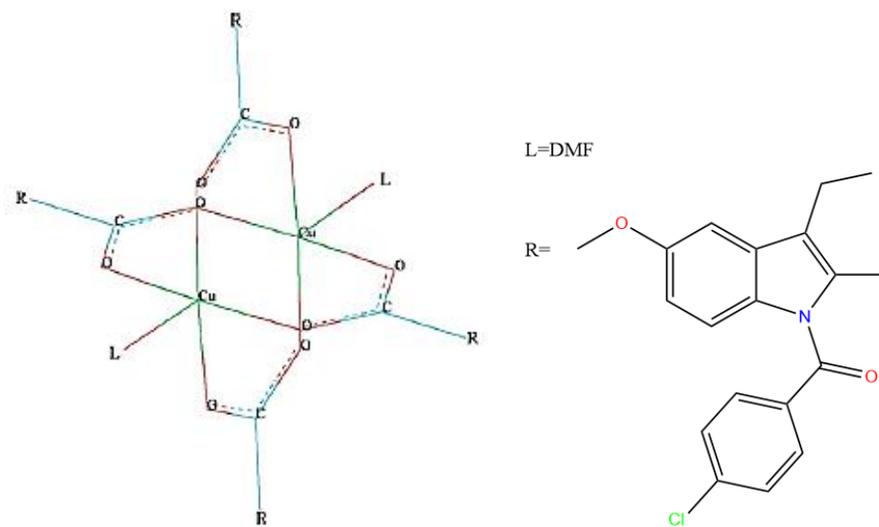


Figura 17. Estructura del compuesto $[\text{Cu}_2(\text{Indo})_4(\text{DMF})_2] \cdot 1.6\text{DMF}$.

El compuesto $[\text{Cu}_2(\text{Indo})_4(\text{DMF})_2] \cdot 1.6\text{DMF}$ actualmente se encuentra aprobado en Australia y Nueva Zelanda para uso veterinario y ha completado la fase clínica I en humanos para el tratamiento de proctitis (proceso inflamatorio del recto). Estudios *in vivo* han demostrado una disminución de la toxicidad gastrointestinal del compuesto de coordinación en comparación con la indometacina libre, así como una disminución de la excreción de Na^+ , K^+ y Cl^- pero no de fosfato, lo que resulta en menos toxicidad tubular y glomerular a los riñones. [52]

Por otro lado, la incorporación de un ligante bidentado como la 1,10-fenantrolina y sus derivados permite la obtención de compuestos monoméricos de Cu(II) con núcleos CuN_2O_4 y geometría octaédrica distorsionada (figura 18). [53]

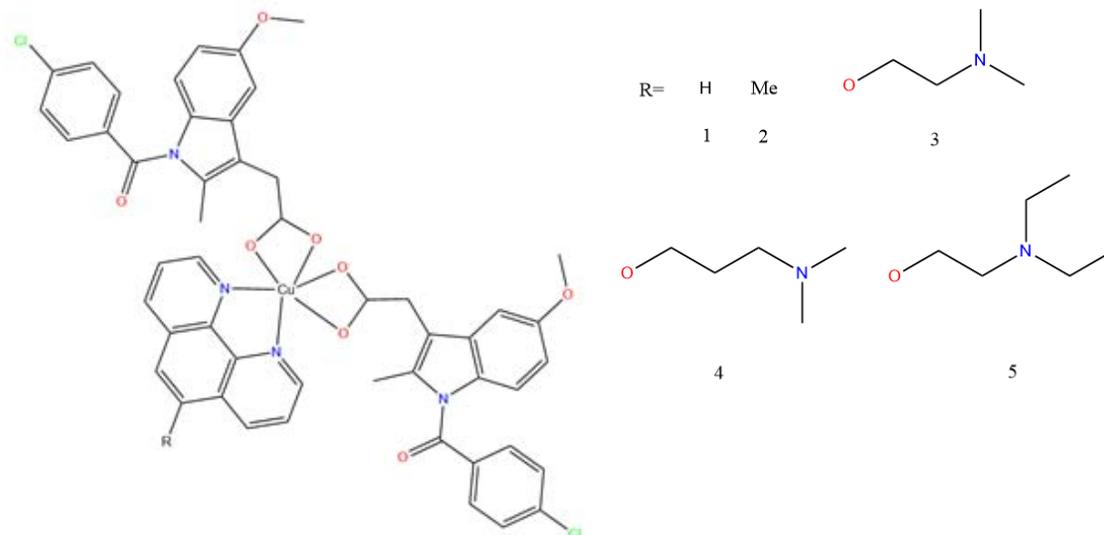


Figura 18. Estructura general de los compuestos $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})_2]$.

Los compuestos mostraron actividad micromolar frente a dos líneas de epitelio mamario (HMLER y HMLER-shEcad), observándose que los compuestos 3 y 4 mostraron selectividad por la línea HMLER-shEcad y que el compuesto 4 induce toxicidad por la elevación de ERO intracelular (figura 19). [54]

En ese mismo trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de ciclooxigenasas (figura 19). Los compuestos 3 a 5 muestran una inhibición de COX-2 concentración dependiente. El compuesto 3 muestra la misma inhibición que la indometacina con la mitad de la concentración y ambos inhiben COX-1 en menor proporción que los fármacos de referencia indometacina y aspirina, lo que podría conllevar a un menor daño gástrico. [54]

Compuesto	HMLER IC ₅₀ [μM] ^[a]	HMLER-shEcad IC ₅₀ [μM] ^[a]	Mammosphere IC ₅₀ [μM] ^[b]
1	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	n.d.
2	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1	n.d.
3	7.5 ± 1.4	2.7 ± 0.2	16.6 ± 0.6
4	7.4 ± 0.3	2.2 ± 0.5	13.8 ± 0.8
5	6.9 ± 1.4	4.2 ± 0.6	26.3 ± 1.3
[Cu(fen)Cl ₂]	4.9 ± 0.2	7.9 ± 0.3	n.d.
Salinomicina	11.4 ± 0.4	4.2 ± 0.3	40.3 ± 2.2

[a] Determinación después de 72 hrs de incubación, promedio con n=3 ± SD.

[b] Determinación después de 96 hrs de incubación, promedio con n=3 ± SD.

n.d. No determinado

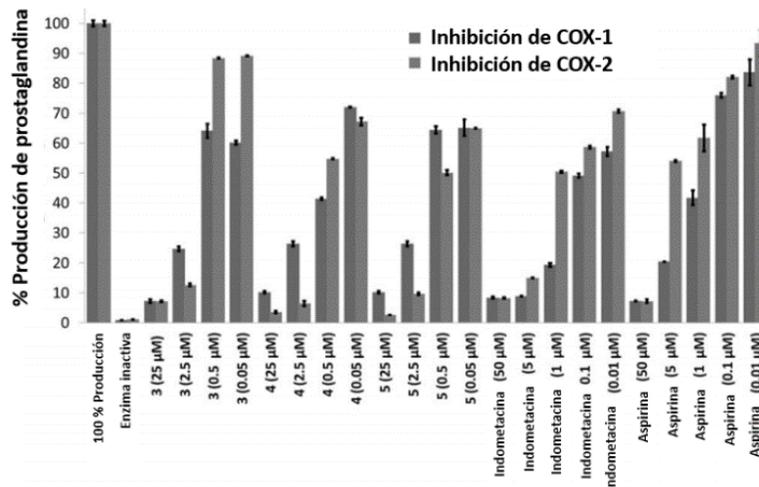


Figura 19. Actividad antitumoral y antiinflamatoria de los compuestos de la figura 18. Imágenes modificadas de [54]

1.6 Sistemas de liberación

Durante muchas décadas el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica se ha llevado a cabo mediante la administración de fármacos en diversas formas farmacéuticas sólidas (tabletas, cápsulas blandas y duras, polvos, supositorios, óvulos), líquidas (emulsiones, jarabes, suspensiones, aerosoles, disoluciones) y semisólidas (cremas, ungüentos, líquidos, pastas, geles). [55]

Los sistemas de liberación convencionales proporcionan una liberación inmediata del fármaco, por lo que, para mantener su concentración en la ventana terapéutica se requieren aplicaciones repetitivas, lo que resulta en fluctuaciones significativas (figura 20). Aunque continúan siendo los más ampliamente prescritos y disponibles en el mercado, estas desventajas han dado lugar al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas y novedosos sistemas de liberación modificada a partir de 1980.

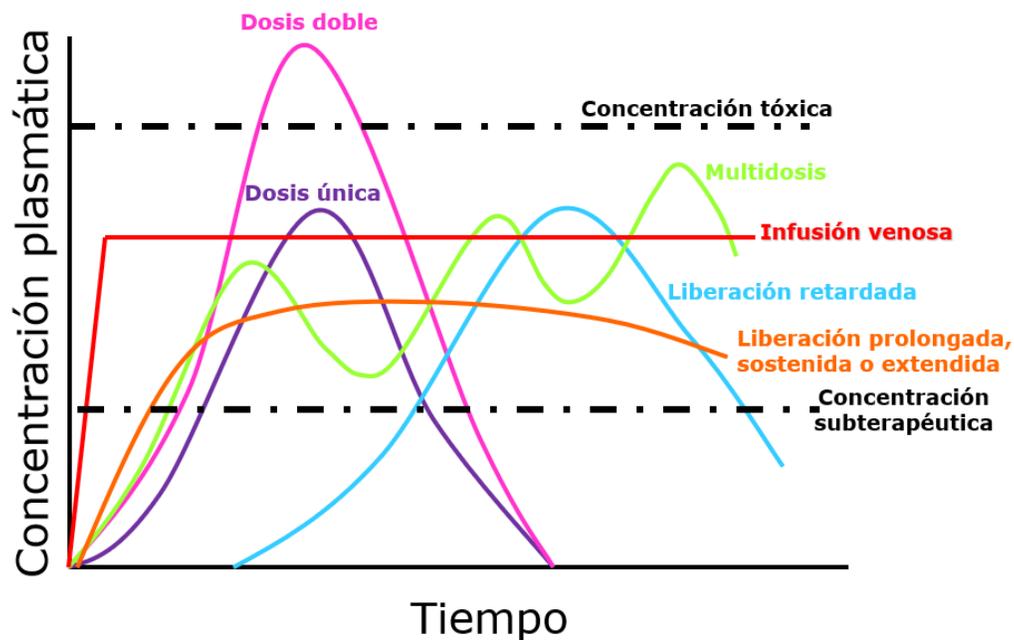


Figura 20. Gráfica de concentración plasmática vs tiempo.

1.6.1 Sistemas de liberación modificada

Los sistemas de liberación modificada tienen como objetivo controlar la administración del fármaco, mantener la dosis en la ventana terapéutica y/o dirigir la liberación del fármaco a un tejido específico. Los sistemas de liberación modificada presentan modificaciones en el proceso LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción) respecto a los sistemas de liberación convencionales, por lo que el comportamiento farmacocinético varía a partir de diversos equilibrios, como se muestra en la figura 21. En general, los sistemas de liberación convencionales se caracterizan por una velocidad de liberación mayor a la de absorción, por lo que ésta última gobierna el suministro del fármaco; en los sistemas de liberación modificada la velocidad de liberación es menor a la de absorción, por lo que el suministro se rige por la velocidad de liberación y hay un control sobre ésta. [55, 56]

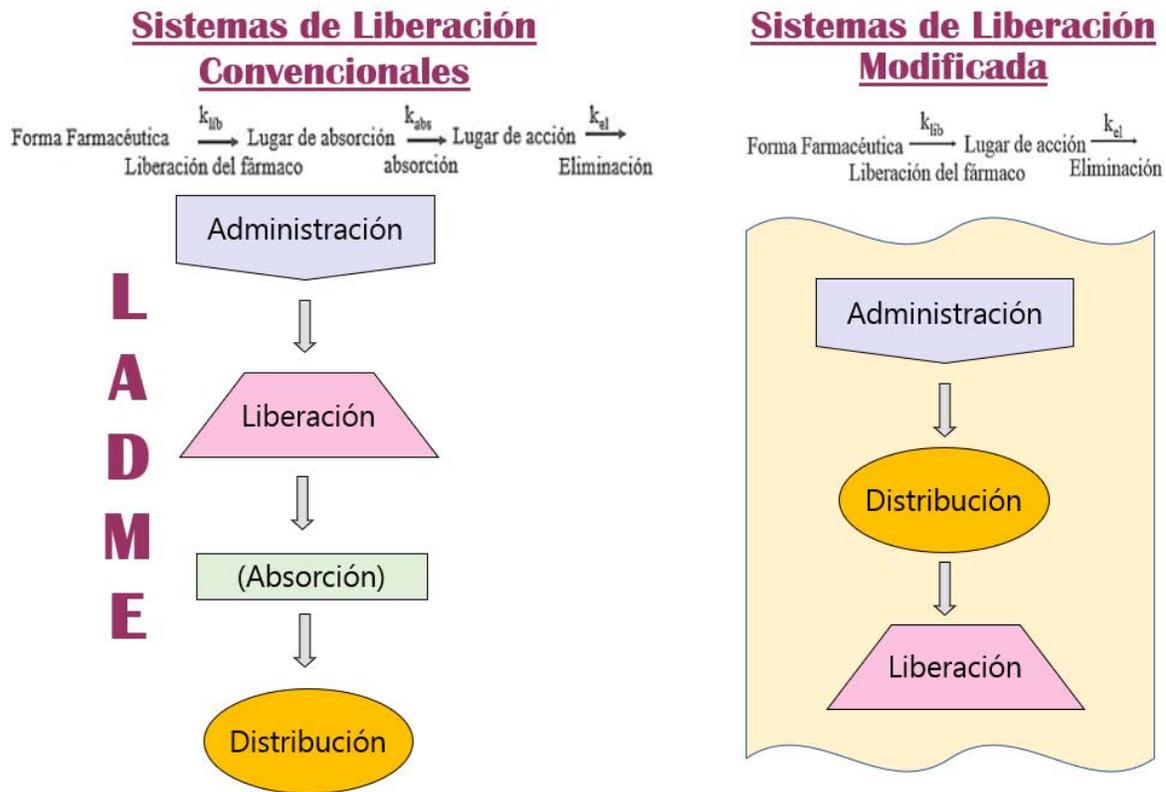


Figura 21. Comparación entre sistemas de liberación convencionales y sistemas de liberación modificada.

Lo anterior conlleva a diversas ventajas en los sistemas de liberación modificada como: disminución en los efectos secundarios y/o adversos, aumento de la biodisponibilidad y eficiencia, prevención de la biodegradación del fármaco durante su distribución, liberación constante (con cinética de orden cero que permita mantener concentración terapéutica y disminuir fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas); además de la posibilidad de desarrollar sistemas pulsátiles.

Entre los diversos sistemas de liberación modificada destacan aquellos modulados por estímulos ambientales físicos (activados mecánica o magnéticamente, por temperatura o por presión osmótica, hidrodinámica y/o de vapor), químicos (activados por pH, iones o hidrólisis) y/o bioquímicos (activados por enzimas).

En el caso particular de cáncer, la elevada toxicidad, la baja solubilidad o el rápido metabolismo de los quimioterapéuticos en el mercado; así como el

conocimiento adquirido respecto al ambiente tumoral han generado especial interés en el desarrollo de sistemas de liberación modificada que permitan una liberación específica a través de vectorización pasiva o activa. [57]

Aunado a esto, los sistemas de liberación modificada de tamaño nanométrico poseen algunas otras ventajas como: el tamaño subcelular permite su incorporación a la célula por transporte pasivo, pueden mejorar la estabilidad del fármaco dentro del organismo, son biocompatibles cuando se sintetiza a partir de materiales biodegradables y pueden ser funcionalizados en superficie con biomoléculas para su vectorización. En este trabajo son de especial interés los hidrogeles de tamaño nanométrico.

1.7. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras hidrofílicas compuestas por redes poliméricas tridimensionales de homopolímeros o copolímeros capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Los componentes poliméricos hidrofílicos están reticulados en una red covalente (reticulación química) o interacciones no covalentes (entrecruzamiento físico). La reticulación proporciona estabilidad dimensional que es crítica para mantener la estructura de red de los hidrogeles y previene la disolución de las cadenas hidrofílicas. [58, 59]

Los nanogeles son partículas estables constituidas de hidrogel que, en el área farmacéutica, generalmente poseen tamaños en un intervalo entre 100 nm y 1 μm . [60] Generalmente son sintetizados en ausencia de fármaco y posteriormente cargados a través de interacciones no covalentes entre el fármaco y la matriz polimérica; lo que resulta en una gran capacidad de encapsulación de fármaco. [61]

La clasificación de los hidrogeles puede basarse en diversos criterios que van desde la naturaleza de los grupos funcionales que posee (neutros o iónicos), características mecánicas y estructurales, método de preparación (homopolímeros o copolímeros), estructura (amorfos, semicristalinos, unidos por puentes de hidrógeno, supramoleculares o hidrocoloidales) y respuesta a estímulo (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.); sin embargo, la más común es de acuerdo al origen del polímero (naturales, sintéticos o semisintéticos).

Dentro de los polímeros naturales empleados en farmacia destacan ácido algínico, almidón y quitosán (CS); mientras que dentro de los sintéticos destacan

acetato de polivinilo (PVA), óxido de polietileno (PEO), polietilenimina (PEI), polivinilpirrolidona (PVP) y poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). [62]

1.7.1 Quitosán

El quitosán (CS) (figura 22), polímero conformado por la distribución aleatoria de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), es un polisacárido natural parcialmente N-desacetilado proveniente de la quitina, la cual se encuentra presente como soporte de crustáceos e insectos. Dependiendo del método de preparación, posee masas moleculares de entre 300 y 1000 kDa y un grado de desacetilación de entre el 30 y el 95 %. [63]

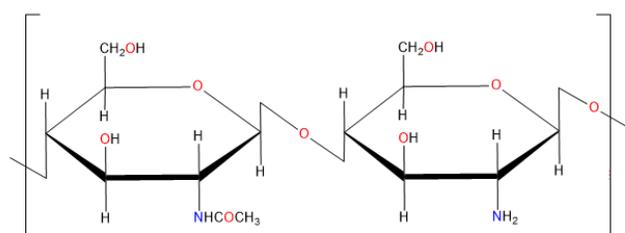


Figura 22. Estructura química del quitosán.

Los sistemas de liberación de fármacos estudiados con quitosán presentan formas farmacéuticas que van desde tabletas, cápsulas, películas, emulsiones, nanopartículas e hidrogeles. Inicialmente el quitosán se usaba en medicina para vendaje de heridas e ingeniería de tejidos; sin embargo, actualmente cuenta con diversas aplicaciones en el área de liberación de fármacos basadas en sus propiedades como: habilidad para formar geles, biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de adsorción. Su principal limitación es su baja solubilidad (únicamente es soluble en disoluciones diluidas de ácidos como acético y fórmico).

Particularmente en el tratamiento de cáncer el quitosán ha sido empleado como matriz para formulaciones de doxorubicina [64, 65], gemcitabina [66] y 5-fluorouracilo, por mencionar algunos. [67]

El quitosán puede formar compuestos de coordinación con el cobre, los cuales presentan interacción con el ADN. Además, nanopartículas de óxido de cobre recubiertas de quitosán (CS-CuO NP) para el suministro de doxorubicina han mostrado una liberación dependiente del pH, siendo ésta más rápida en condiciones

ácidas. [68] En el grupo de trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas de CS cargadas con CasIII-ia ($[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{acac})]\text{NO}_3$). [69, 70]

Los hidrogeles de quitosán poseen propiedades variadas en dependencia con la masa molecular, el grado de desacetilación, el grado de entrecruzamiento, las cargas y el grado de absorción de agua, generalmente presentan hinchamiento a pH ácido (como el del micromambiente tumoral) debido a repulsiones intramoleculares entre los grupos amino protonados libres en las cadenas principales o laterales (figura 23), permitiendo así la liberación controlada de fármacos. [71, 72]

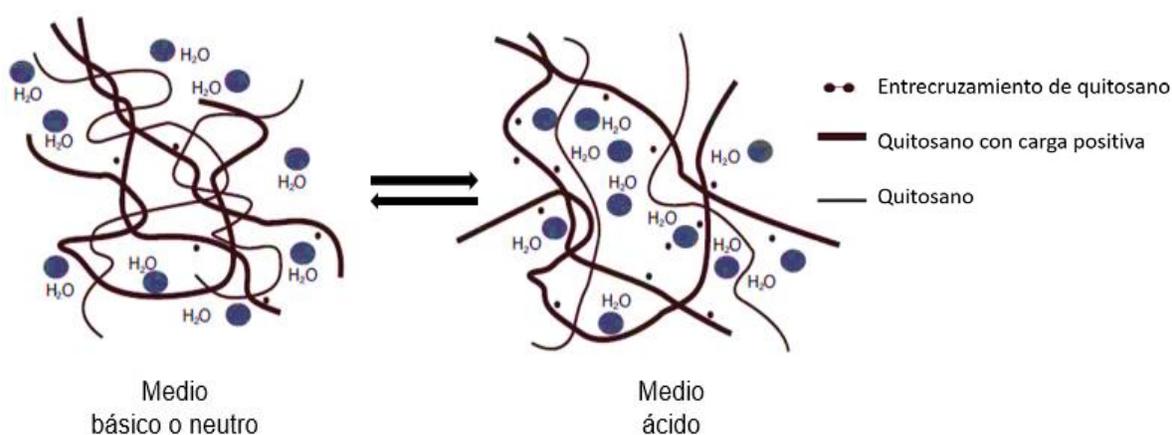
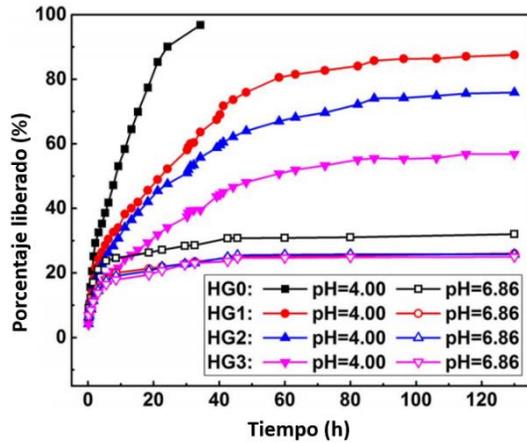


Figura 23. Hinchamiento de quitosán. Imagen modificada de [71].

Los hidrogeles de quitosán pueden ser modificados química o físicamente para incrementar la solubilidad, la biodistribución y el tiempo de circulación. [73] Un ejemplo son los hidrogeles de quitosán, β -Glicerofosfato y ácido hialurónico (HA) (figura 24), los cuales muestran una liberación de doxorubicina en función de la concentración de ácido hialurónico (la liberación se lleva a cabo a una mayor velocidad en ausencia de éste y disminuye conforme se aumenta la concentración) y del pH. El incremento en la velocidad de liberación a condiciones de pH ácido es característico de los sistemas de quitosán. [74]



HG0: Sin ácido hialurónico
 HG1: 1 % (m/V) ácido hialurónico
 HG2: 2 % (m/V) ácido hialurónico
 HG3: 3 % (m/V) ácido hialurónico

Figura 24. Liberación de doxorubicina de hidrogeles compuestos de CS/ácido hialurónico/β-glicerofosfato. Imagen modificada de [74].

Los hidrogeles de quitosán no muestran termosensibilidad; sin embargo, la copolimerización con poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) le permite adquirir dicha propiedad.

1.7.2 Poli (N-isopropilacrilamida)

La poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) (figura 25) es un polímero importante debido a su estructura y sus propiedades como biocompatibilidad, la capacidad de formar hidrogeles y principalmente por la sensibilidad a temperatura. [56, 75]

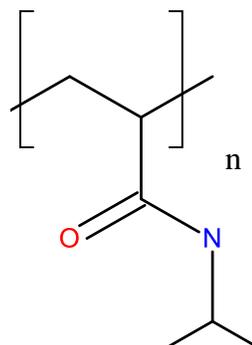


Figura 25. Estructura química del PNIPAAm.

Los polímeros sensibles a temperatura tienen dos clasificaciones: UCST (upper critical solution temperature) y LCST (lower critical solution temperature) (figura 26). La PNIPAAm posee un comportamiento de tipo LCST, por lo que cuando se calienta en agua a más de 32 °C experimenta una transición de fase reversible de un estado hidratado e hinchado a un estado deshidratado reducido, perdiendo aproximadamente el 90% de su volumen. [76] Copolímeros de PNIPAAm han sido estudiados para la administración oral de calcitonina e insulina. [77]

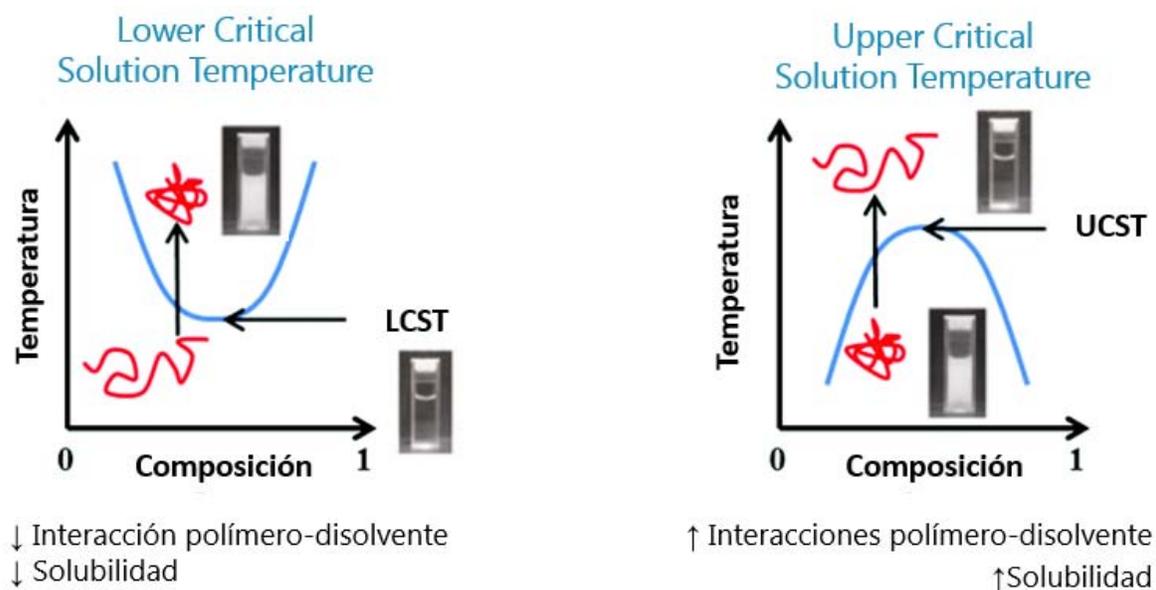


Figura 26. Comportamiento LCST y UCST. Imagen modificada de [54].

Diversas aplicaciones de los hidrogeles de PNIPAAm en el área de sistemas de liberación modificada e ingeniería de tejidos han sido estudiadas debido a que, al sintetizar entrecruzados con otros polímeros puede generar hidrogeles más estables y la LCST puede ser desplazada. [78, 79] En general, la copolimerización con polímeros hidrofóbicos conlleva a una disminución de la LCST, mientras que con polímeros hidrofílicos (como el quitosán) hay un incremento en la LCST. [80, 81]

Recientemente, Belali *et al.* reportaron síntesis la nanogeles de PNIPAAm con 5,10,15,20-tetrakis (4-N-carbonilacrílico aminofenil) porfirina al 2% y 4% m/m PNIPAAm-co-CAA-TPP(2%) y PNIPAAm-co-CAA-TPP(4%). La copolimerización conlleva a una modificación de la LCST de la PNIPAAm a 40 y 43 °C respectivamente, como dependencia del pH (figura 27). [82]

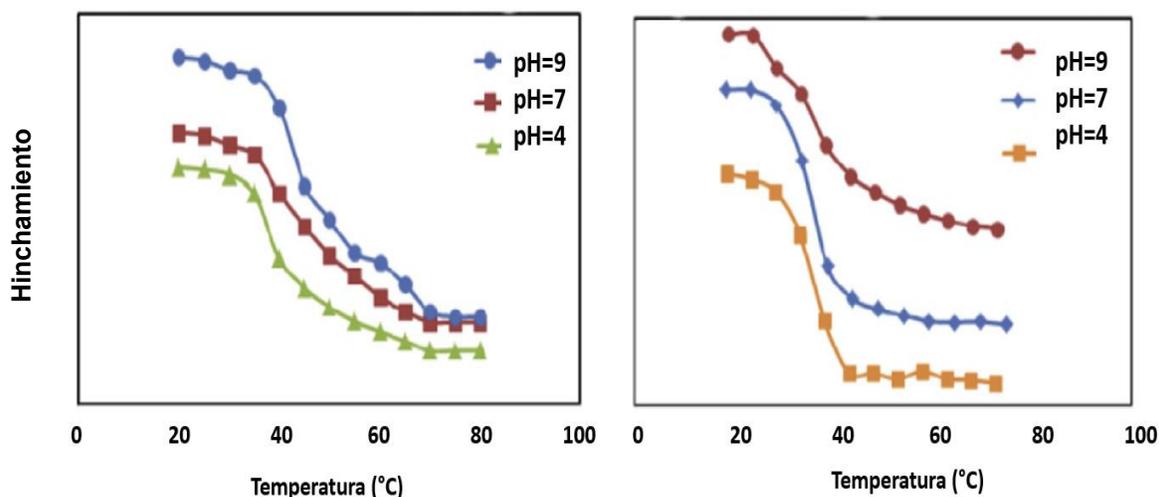


Figura 27. Modificación de la LCST en los nanogeles PNIPAAm-co-CAA-TPP(2%) izquierda y PNIPAAm-co-CAATPP(4%) derecha.

Imagen modificada de [82].

Los nanogeles copoliméricos se han estudiado para su posible aplicación en terapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son aquellos obtenidos de Selecán, PNIPAAm y ácido metacrílico (MAA), los cuales muestran un hinchamiento y liberación de doxorubicina en dependencia de las condiciones de temperatura y pH, siendo ésta más eficiente a 37°C y pH=5 (figura 28). Los hidrogeles no mostraron actividad en las líneas HepG2 (cáncer de hígado humano) y A549 (adenocarcinoma epitelial basales alveolar humano). [83]

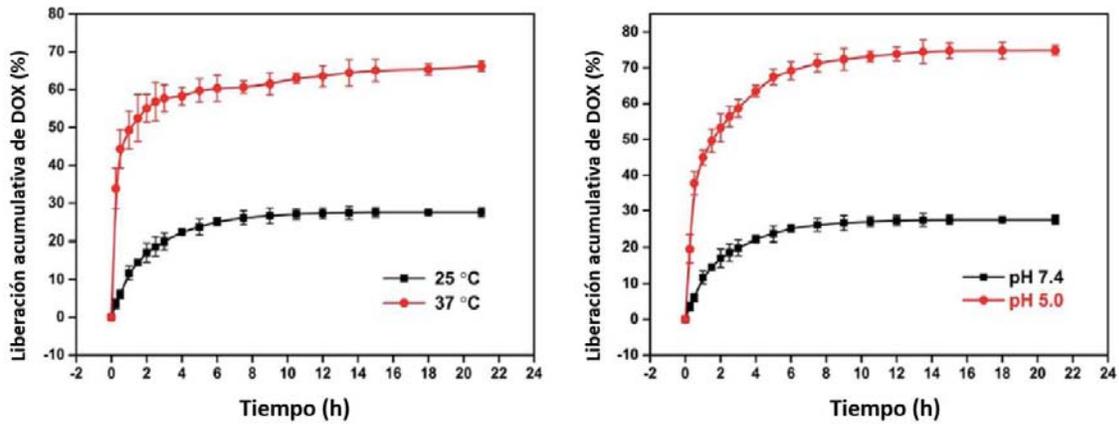


Figura 28. Liberación de doxorrubicina a diferentes condiciones de T y pH.

Imagen modificada de [83].

1.7.3 Hidrogeles de CS y PNIPAAm

La copolimerización de CS y PNIPAAm permite la obtención de sistemas sensibles a pH y temperatura, por lo que han llamado la atención. Jaiswal M. y colaboradores sintetizaron una serie de nanogeles con diferentes proporciones de CS:PNIPAAm, observando que el incremento en la proporción de CS conlleva a un incremento en la temperatura de transición de fase y a una disminución en el tamaño (figura 29). [84]

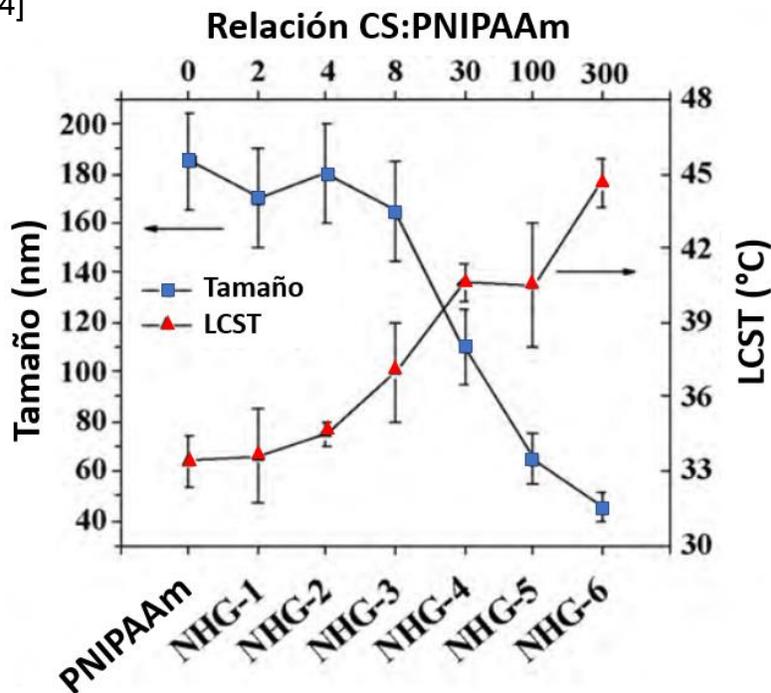


Figura 29. Variación de las propiedades del nanogel en función de la relación

CS:PNIPAAm. Imagen modificada de [84].

El trabajo de Guo Bao-Lin *et al.* reporta hidrogeles con un grado de hinchamiento influenciado no sólo por la proporción de ambos polímeros, sino también por la temperatura y las condiciones de pH. Se observa que hay un mayor grado de hinchamiento a bajas temperaturas y pH=7.4, lo que se refleja en una mayor liberación de coenzima A en estas condiciones (figura 30). En este caso el hinchamiento del quitosán a pH ácido no se observa debido a que se encuentra en baja proporción respecto a la PNIPAAm. [85]

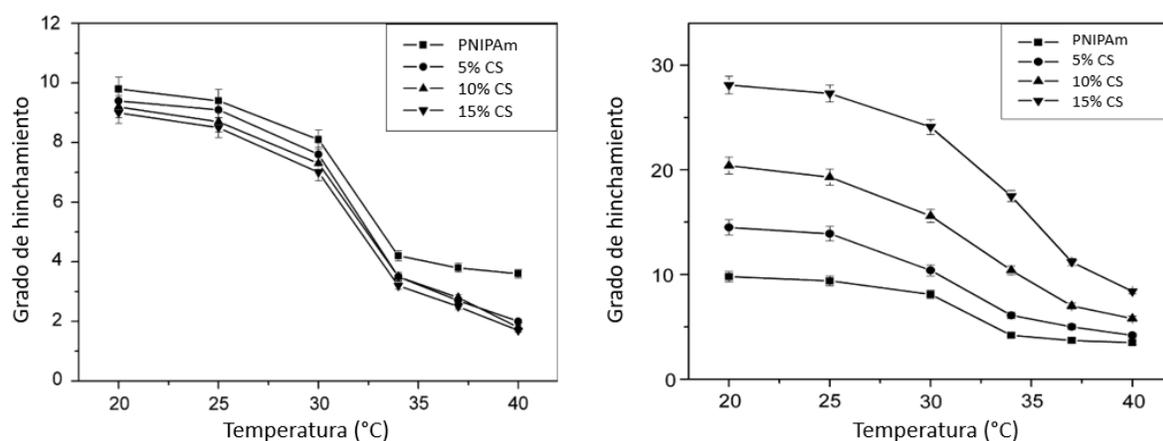


Figura 30. Grado de hinchamiento de hidrogeles en función de la temperatura a) pH = 2.1 b) pH = 7.4. Imagen modificada de [85].

Hidrogeles de CS, PNIPAAm y ácido hialurónico (HA) pueden ser generados *in situ* debido a la transición de fase inducida por la temperatura fisiológica (comportamiento atribuido a la presencia de la PNIPAAm). La carga del hidrogel con conjugados de óxidos de grafeno y ácido fólico para la liberación intratumoral de doxorubicina muestran una cinética de liberación en dependencia del pH. La liberación se lleva a cabo aproximadamente 5 veces más rápido en condiciones ácidas (comportamiento característico de sistemas con CS) (figura 31). [86]

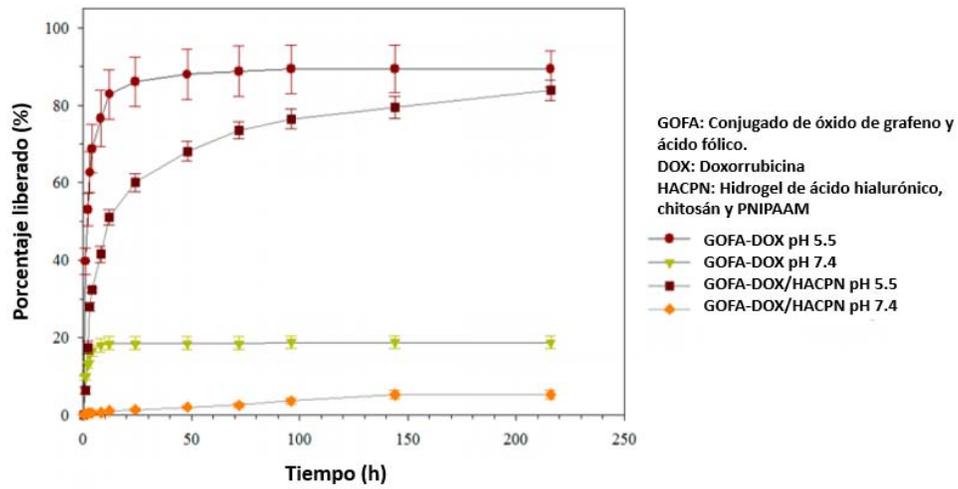


Figura 31. Liberación de doxorubicina de hidrogeles de CS-PNIPAAm-HA.
 Imagen modificada de [86].

2. Planteamiento del proyecto

La alta incidencia de cáncer aunada a los inconvenientes que presentan los quimioterapéuticos actualmente empleados, conlleva a la búsqueda de nuevas moléculas con una mayor actividad antitumoral y al desarrollo de nuevas formas de administración que permitan disminuir los efectos adversos al tratamiento.

En el presente proyecto se planteó la síntesis de compuestos de coordinación de cobre con diiminas aromáticas sustituidas con metilos en los anillos aromáticos y el fármaco antiinflamatorio indometacina con la finalidad de observar si la inserción de este último permitía obtener compuestos con ambas actividades (antitumoral y antiinflamatoria); y posteriormente incorporar uno de los compuestos sintetizados en un nanogel diseñado para su liberación en condiciones similares a las del microambiente tumoral.

El uso del cobre como centro metálico se plantea debido a que, al ser un metal esencial, el organismo posee un mecanismo homeostático para autorregular las concentraciones de éste, lo que podría disminuir la toxicidad hacia células sanas por parte de los compuestos sintetizados.

Las Casiopeínas, compuestos de coordinación de cobre con diiminas aromáticas bipy y fen han demostrado buena actividad antitumoral, principalmente cuando las diiminas presentan sustituyentes de tipo electrodonador e hidrofóbico. Se ha observado poca influencia sobre la actividad antitumoral al variar el segundo ligante del compuesto de coordinación, por lo que la incorporación de la indometacina como ligante permitirá la obtención de compuestos que conserven dicha actividad.

La administración de fármacos antiinflamatorios suele emplearse como terapia paliativa en el tratamiento contra cáncer debido a los procesos de inflamación que se encuentran presentes en la zona tumoral. La indometacina, además de presentar actividad antiinflamatoria, ha demostrado limitar el crecimiento tumoral y disminuir la proliferación y viabilidad celular, lo que sugiere que su incorporación a compuestos quimioterapéuticos podría potencializar la actividad antitumoral. Aunado a esto, la coordinación de la indometacina a centros metálicos divalentes como el cobre, metal empleado en este proyecto, ha demostrado un incremento en la actividad antiinflamatoria al inhibir las enzimas COX-1 y COX-2.

Una vez llevada a cabo la síntesis y caracterización de los compuestos con estructura general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{Indo})]\text{NO}_3$, la evaluación de la actividad antiproliferativa frente a una línea de cáncer cervicouterino (HeLa) permitirá estudiar la influencia de la indometacina en la actividad antitumoral.

Posteriormente, la selección de uno de los compuestos más activos como fármaco modelo ($[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$) se empleará para el diseño de un nanogel como sistemas de liberación modificada.

En cuanto al desarrollo de sistemas de liberación modificada, los nanogeles, estructuras compuestas por redes poliméricas sensibles a diversos estímulos ambientales, han sido estudiados para la liberación de fármacos en condiciones específicas. En cáncer, las condiciones de pH_e ácido y temperatura incrementada suelen emplearse como estímulos que dan lugar a la liberación del fármaco.

Los polímeros o monómeros que suelen emplearse para la síntesis de nanogeles son variados; sin embargo, en este proyecto se consideraron como candidatos aquellos con capacidad para formar hidrogeles sensibles a temperatura (Am, acrilonitrilo y PNIPAAm) y a pH (CS). La evaluación de la interacción entre el compuesto $\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ y estos monómeros o polímeros permitirá seleccionar las materias primas (CS y PNIPAAm) empleadas en la síntesis del nanogel.

La incorporación del compuesto $\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ en un nanogel, que al someterse a condiciones similares a las del microambiente tumoral se hinche y libere, conllevará a un control de las condiciones en las cuales se lleva a cabo la liberación del fármaco, lo que a su vez podría tener como consecuencia una disminución en los efectos adversos y/o secundarios del tratamiento.

3. Hipótesis

La implementación de indometacina como ligante en compuestos quelatos mixtos de Cu(II) permitirá la obtención de compuestos con actividad antitumoral y, su posterior incorporación en un nanogel sensible a temperatura y pH permitirá la liberación en condiciones similares a las del microambiente tumoral.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Llevar a cabo la síntesis y evaluación de la actividad antitumoral de compuestos de coordinación de Cu(II) y seleccionar uno para su incorporación en un nanogel que permita controlar la liberación de éste en condiciones similares a las del microambiente tumoral.

4.2 Objetivos particulares

Llevar a cabo la síntesis de siete nuevos compuestos de coordinación pertenecientes a la tercera generación de Casiopeínas® empleando las siguientes diiminas (figura 32):

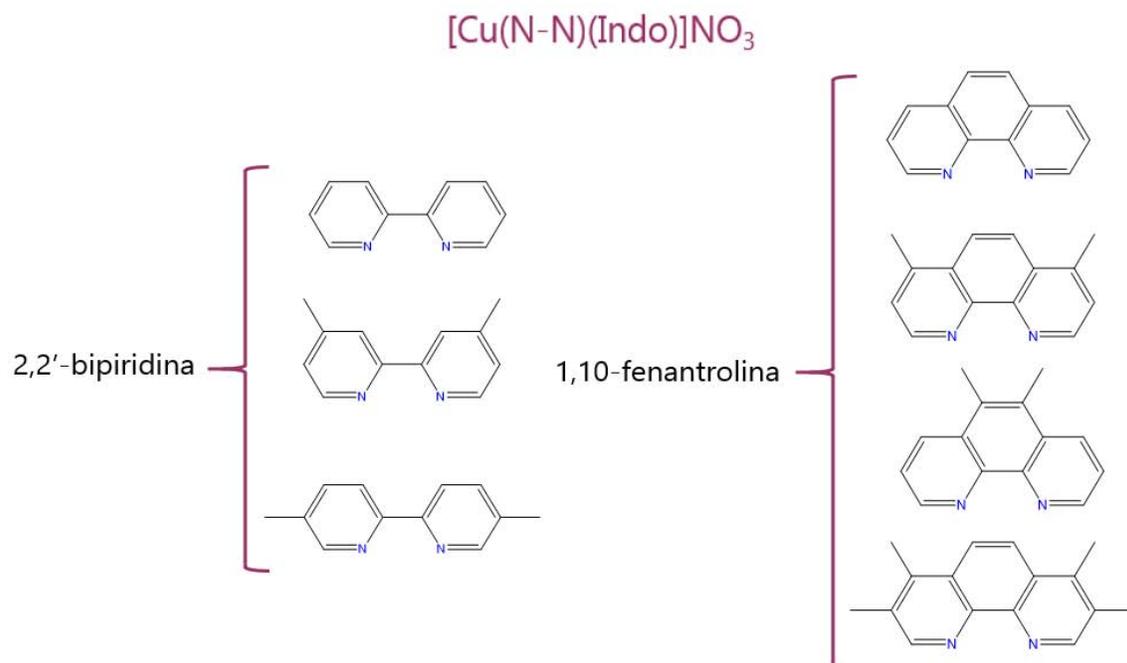


Figura 32. Diiminas empleadas en la síntesis de los compuestos de coordinación.

Caracterizar los compuestos sintetizados mediante diferentes técnicas: espectroscopia de infrarrojo (IR), análisis elemental, conductividad eléctrica molar, susceptibilidad magnética, intervalo de descomposición, espectroscopia de absorción en el ultravioleta-visible (UV-Visible), resonancia paramagnética electrónica (RPE) y voltamperometría cíclica (VC).

Determinar la CI_{50} en una línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

Seleccionar uno de los compuestos más activos en la línea celular HeLa, ([Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃) para su formulación en un sistema de liberación modificada.

Estudiar la interacción entre el compuesto de coordinación [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ y los posibles constituyentes del nanogel: acrilamida (Am), poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), acrilonitrilo y quitosán (CS).

Sintetizar el nanogel.

Caracterizar el nanogel mediante diferentes técnicas: espectroscopia de infrarrojo (IR), tamaño y distribución de partícula, potencial zeta, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopia electrónica de barrido (MEB o SEM).

Incorporar el compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en el nanogel sintetizado previamente.

Estudiar la cinética de liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ del nanogel a diferentes condiciones de pH.(5.0 y 7.4) y seleccionar el modelo que las describa.

5. Desarrollo experimental

5.1 Reactivos

El nitrato de cobre(II) hemipentadhidratado $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (99.99+ %), la 1,10'-fenantrolina (99+ %), la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (98 %), la 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (98 %), la 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (99+ %), la 2,2'-bipiridina (99+ %), la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (99 %), la 5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina (99 %), la indometacina (99+ %), el hidróxido de sodio (97+ %), la acrilamida (99.9+ %), el acrilonitrilo (99+ %), la poli (N-isopropilacrilamida) (99 %), el quitosán (caparazón de camarón, $190\ 000\text{-}220\ 000\ \text{g mol}^{-1}$), la N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (99 %) y la N-N'-metilenbisacrilamida (99 %) se adquirieron en Sigma-Aldrich Co.

El bromuro de potasio (grado FT-IR 99 %) y el persulfato de amonio se adquirieron en J.T.Baker S.A. de C.V., el hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF_6 99+ %) y los disolventes se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. Todos los reactivos se emplearon sin purificación previa.

5.2 Síntesis de los compuestos de coordinación

La síntesis de las Casiopeínas[®] se llevó a cabo de acuerdo con el esquema de reacción descrito en la figura 33. El proceso de síntesis consiste en mezclar una cantidad estequiométrica de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ con el ligante diimina correspondiente y el ligante indometacina empleando MeOH y H_2O en una proporción 1:3. Una cantidad estequiométrica de NaOH se empleó como base para llevar a cabo la desprotonación de la indometacina, de acuerdo con el método descrito en las patentes. [87, 88] Todas las síntesis se llevaron a cabo en condiciones ambientales. El producto se precipitó a través de la evaporación del disolvente. El sólido obtenido se filtró, se recrystalizó por par de disolventes empleando MeOH y éter etílico anhidro y se procedió a su caracterización.

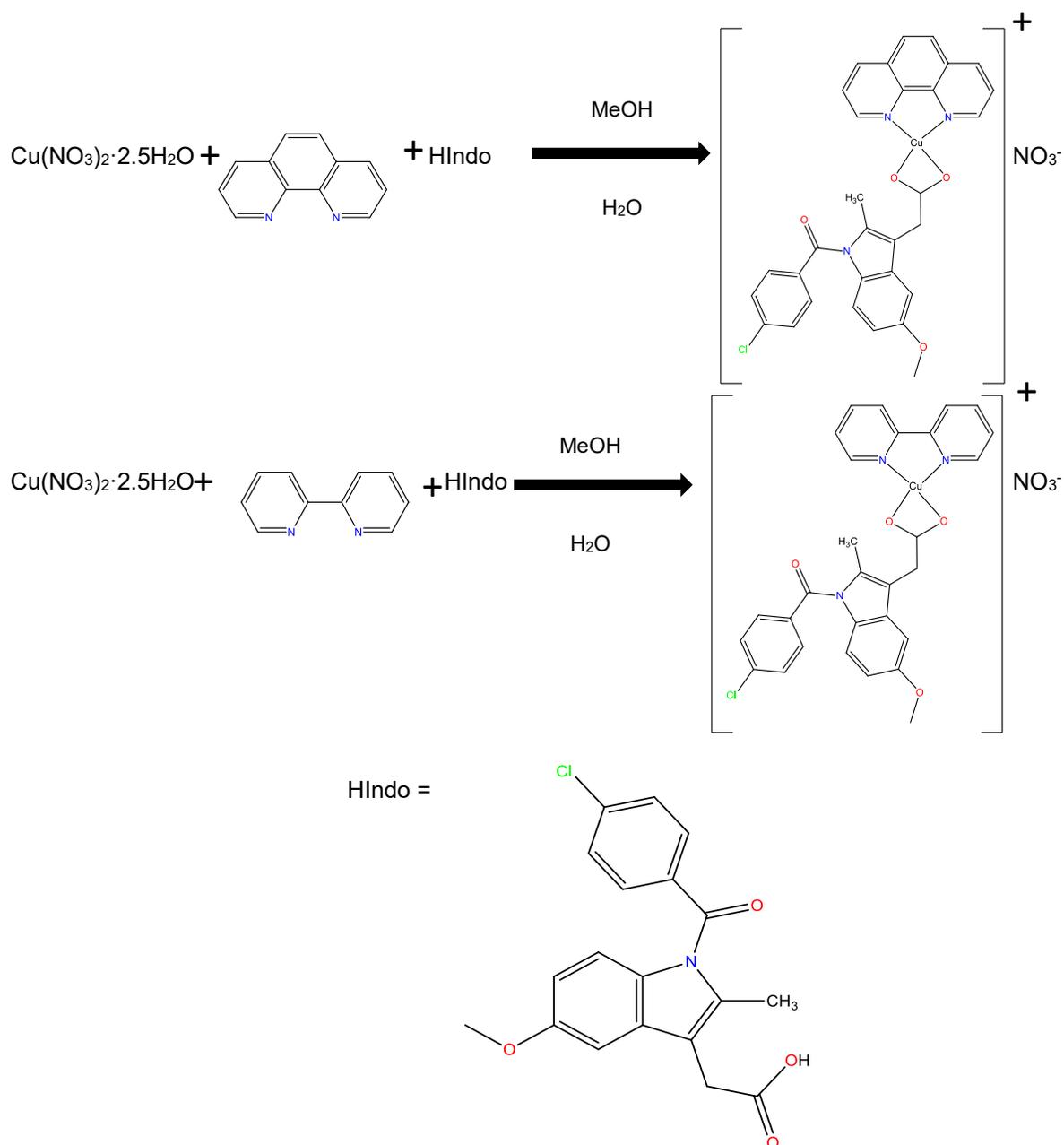


Figura 33. Esquemas generales para la síntesis de las Casiopeínas[®].

5.3 Caracterización de los compuestos de coordinación

5.3.1 Espectroscopia de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en estado sólido empleando el método de pastilla de bromuro de potasio KBr grado espectroscópico en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} en el equipo Nicolet AVATAR 320 FT-IR. El análisis de los espectros se efectuó con el software ACD/SpecManager para Windows.

5.3.2 Espectroscopia electrónica de absorción en el UV-Visible

Los espectros electrónicos de absorción en el UV-Visible se obtuvieron en un espectrofotómetro GENESYS THERMO SCIENTIFIC de arreglos de diodos en un intervalo de 190 a 1100 nm a una temperatura controlada de 25 °C (293.15 K) en una celda de cuarzo. Se prepararon disoluciones con una concentración aproximada de 10 mmol L⁻¹ para todos los compuestos de coordinación empleando como disolvente MeOH (UV Cutoff=205 nm). A partir de estas disoluciones se llevaron a cabo diluciones con la finalidad de generar una colección de espectros a diferentes concentraciones y obtener los coeficientes de absorción molar.

5.3.3 Análisis elemental

Los análisis elementales se llevaron a cabo en el Instituto de Química, UNAM empleando un analizador elemental Thermo Scientific/Flash 2000. Se determinó el porcentaje de carbono, hidrógeno y nitrógeno para cada uno de los compuestos.

5.3.4 Conductividad eléctrica molar

La conductividad eléctrica molar se obtuvo utilizando un conductímetro Jenway Conductivity and pH meter 4330, en disoluciones 1 mmol L⁻¹ del compuesto, nuevamente, empleando MeOH como disolvente. Las determinaciones se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 25 °C (293.15 K).

5.3.5 Momento magnético

La susceptibilidad magnética de los compuestos de coordinación se determinó por el método de Gouy en una balanza magnética Shrewoood-Scientific modelo MK.I con una constante C=1.012367 a una temperatura de 23 °C (291.15 K).

5.3.6 Temperatura de descomposición

El punto de descomposición se midió en un equipo Fisher-Jhons.

5.3.7 Resonancia paramagnética electrónica

Las mediciones de resonancia paramagnética electrónica (RPE) se realizaron en tubos de cuarzo utilizando un espectrómetro de RPE JOEL JES-TE300 en banda X a 100 KHz de frecuencia de modulación con una cavidad cilíndrica del modo TE₀₁₁. La calibración del campo magnético se realizó con un gaussmetro de precisión JEOL ES-FC5.

Las curvas de absorción se obtuvieron en estado sólido a temperatura ambiente y en disoluciones con concentración aproximada 3 mmol L^{-1} empleando MeOH como disolvente a $-196.15 \text{ }^\circ\text{C}$ (77.00 K).

La adquisición, manipulación y simulación de los espectros se llevó a cabo con el software ES-IPRITS-TE de JEOL Ltd y éstos se reportan como la primera derivada de la curva de absorción.

Los valores de g_{iso} , A_{iso} y f se calculan como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$g_{\text{iso}} = \frac{g_{\text{II}} + 2g_{\text{L}}}{3} \quad A_{\text{iso}} = \frac{A_{\text{II}} + 2A_{\text{L}}}{3} \quad f = \frac{g_{\text{II}}}{A_{\text{II}}}$$

5.3.8 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica se llevó a cabo utilizando un potenciostato/galvanostato Biologic SP-300 con un arreglo convencional de tres electrodos, empleando un electrodo de trabajo de carbón vítreo, un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de pseudo referencia de plata como el que se muestra en la figura 34.

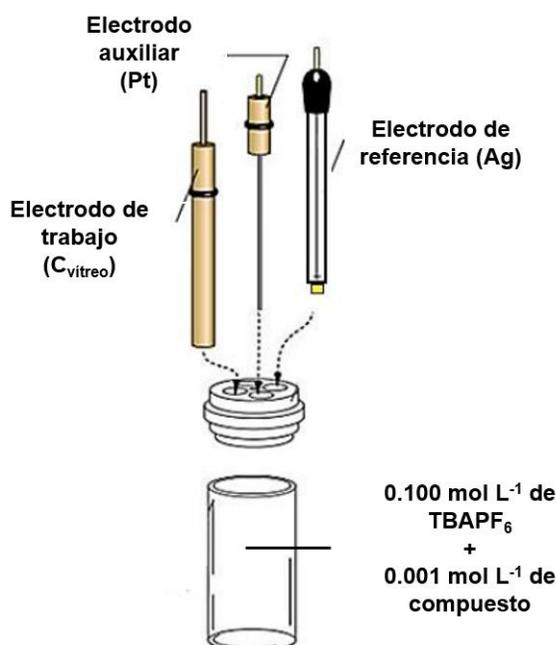


Figura 34. Arreglo de electrodos empleado en VC.

Se empleó hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF_6) como electrolito soporte y DMSO calidad pureza malla molecular como disolvente. Se prepararon 10

mL de disoluciones 0.100 mol L⁻¹ del electrolito soporte a la cual se le añadió la cantidad requerida de compuesto de coordinación para preparar una disolución 0.001 mol L⁻¹. Para llevar a cabo las mediciones se burbujeó nitrógeno de alta pureza durante 10 minutos con la finalidad de desplazar el oxígeno presente en la disolución. Se compensó la caída óhmica por retroalimentación positiva del sistema en todos los experimentos.

Entre cada experimento se llevó a cabo la limpieza del electrodo de trabajo, el cual se enjuagó con agua destilada, se le retiró el disolvente con paños absorbentes poliprotectores antiestáticos marca Kimberly-Clark. Posteriormente se pulió con polvo de diamante en forma de ocho 30 veces, se retiró el polvo con agua destilada y se sonicó en agua durante 60 segundos, se enjuagó con agua destilada, se retiró el disolvente con paños absorbentes poliprotectores antiestáticos marca Kimberly-Clark, se sumergió en acetona, se esperó a que se evaporara el disolvente y finalmente se sumergió en DMSO. Los voltamperogramas se obtuvieron a diferentes velocidades de barrido (10, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mV s⁻¹) en dirección anódica y catódica iniciando en el potencial de corriente nula para todos los casos.

De manera independiente en 10 mL de una disolución con una concentración 0.100 mol L⁻¹ de TBAPF₆ y 0.001 mol L⁻¹ de ferroceno en DMSO se llevó a cabo la determinación del E_{1/2} del sistema ferricinio(Fc⁺)/ferroceno(Fc) para poder emplearlo como referencia interna, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC. [89, 90]

A partir de los valores obtenidos, se calculó el ΔE y el E_{1/2} como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} \qquad E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

5.4 Determinación de la concentración inhibitoria media

a) Ensayo de actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa se evaluó en una línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa) mediante el ensayo de reducción del MTT [3 - (4, 5 - dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difenyltetrazolio] con algunas modificaciones. [91]

Las células HeLa (1×10^4 por pozo, 50 μL) se colocaron en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos. Después de 24 h de incubación a temperatura controlada de 37°C en una atmosfera al 5% de CO_2 (para permitir que las células se adhieran), alícuotas (50 μL) de medio (DMEM 5% FBS) conteniendo diferentes concentraciones (un intervalo de 0.05 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de los compuestos previamente disueltos en DMSO se adicionaron a las células para su incubación por 48 h. La concentración máxima empleada de DMSO fue del 2% (v/v).

En las últimas 4 h del período de incubación, las células se lavaron con PBS, y se adicionaron a cada pozo 100 μL de medio de cultivo fresco y 10 μL de solución de MTT (5 mg mL^{-1}).

La viabilidad de las células se evaluó por la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio (color amarillo) a formazan (color violeta). Los cristales de formazan formados se disolvieron con 100 μL de isopropanol ácido. La absorbancia de las muestras se midió con un lector de microplacas de ELISA iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad, empleando como longitud de onda de prueba 570 nm y como longitud de onda de referencia 630 nm. Las células proliferativas se expresan en términos de porcentaje, donde la absorbancia medida de las células tratadas únicamente con el vehículo (DMSO) se consideró como el 100% de proliferación. La actividad antiproliferativa de los compuestos se reporta en términos de valores de CI_{50} y se calculó empleando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA).

b) Curvas de proliferación celular

Una vez que las líneas celulares alcanzaron el 70-80% de confluencia, las células se contaron en una cámara de Neubauer empleando el colorante azul de tripano. Contadas las células, se preparó una suspensión celular a una concentración de 10,000 células mL^{-1} y 10 mL de esta suspensión se adicionaron en un frasco de cultivo de 25 cm^2 . Sin hacer recambio alguno de medio el número total de células viables en cada cultivo se contó cada 24 h por 7 días. La tasa de proliferación se determinó por análisis de regresión lineal (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., CA, EUA).

c) Análisis estadístico

Para el cálculo de los valores de CI_{50} se analizaron los porcentajes de proliferación de al menos tres experimentos, por triplicado, y se sometieron a un análisis de regresión lineal o no lineal dependiendo del comportamiento de los datos. Para el cálculo de la regresión no lineal los datos se log transformaron, normalizaron y analizaron para generar una curva dosis-respuesta y calcular los valores de CI_{50} . Las diferencias en las medias se analizaron empleando análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey (Sigma Stat 3; Systat Software Inc., CA, USA). La tasa de proliferación de las líneas celulares se determinó por análisis de regresión lineal (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., CA, USA).

En todos los ensayos biológicos los resultados se presentan como la media de triplicados de las determinaciones correspondientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas entre medias se evaluaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por comparaciones contra control empleando la prueba de diferencias mínimas significativas de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

5.5 Estudios de interacción mediante espectroscopia electrónica de absorción en el UV

La interacción entre acrilamida, poli (N-isopropilacrilamida), acrilonitrilo y quitosán, con el compuesto $[Cu(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]NO_3$ se llevó a cabo mezclando una disolución de concentración fija y conocida (aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) del compuesto de coordinación con diferentes concentraciones de los monómeros o polímeros a diferentes temperaturas (22, 25, 28, 31, 34, 37 y 40 °C) en un espectrofotómetro OCEAN OPTICS con una fuente DT-MINI-2-GS adaptado a un controlador de temperatura QUANTUM NORTH WEST TC125.

5.6 Síntesis del nanogel

Se revisó en la literatura la síntesis de nanogeles y se encontró que este tipo de reacciones de polimerización se llevan a cabo generalmente vía la generación de radicales libres y por tanto es importante mantener una atmósfera libre de oxígeno que pueda reaccionar con éstos e interferir en la reacción. Además, es

importante evitar el contacto con la luz. [92] El esquema de reacción se muestra en la figura 35.

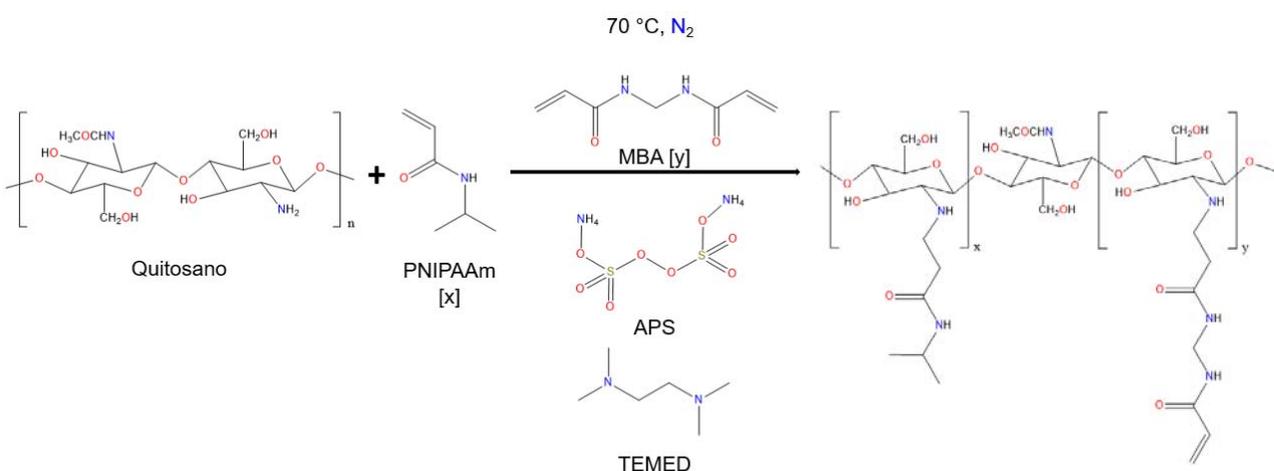


Figura 35. Síntesis del nanogel.

El procedimiento experimental es el siguiente:

- 1) Disolver una cantidad de quitosán en 500 mL de agua y 5 mL de ácido acético glacial. Tapar la disolución y mantener en agitación durante 24 h.
- 2) Colocar la disolución obtenida en un matraz de tres bocas, montar el reflujo en la línea de nitrógeno y hacer una purga del sistema por al menos 30 minutos. El sistema montado se muestra en la figura 36.
- 3) Cubrir el sistema con papel aluminio.
- 4) Agregar una determinada cantidad de PNIPAAm y 0.21 g de N-N-metilenbisacrilamida (MBA) previamente disueltos en agua y burbujeados con nitrógeno.
- 5) Estabilizar la temperatura del sistema a 70 °C (343.15 K).
- 6) Agregar el equivalente a 1 % en mol de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) como catalizador de la reacción.
- 7) Agregar 0.7 g de persulfato de amonio (APS) previamente disuelto en agua y burbujeado con nitrógeno como iniciador de la reacción.
- 8) Dejar reaccionar durante 24 h manteniendo la temperatura del sistema y la atmósfera libre de oxígeno.

- 9) Centrifugar el crudo de reacción a 2598 rcf y recuperar el sobrenadante, ya que contiene al nanogel.

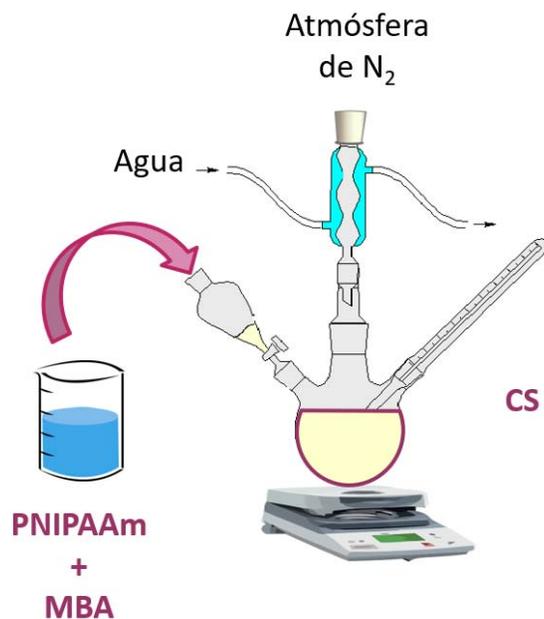


Figura 36. Esquema del sistema de reacción.

5.7 Liofilización del nanogel

Para la obtención del nanogel en sólido se llevó a cabo la liofilización de éste. La eliminación del agua de muestras de 1 mL previamente congeladas se efectuó a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.035 mbar por 24 h en una atmósfera de nitrógeno.

5.8 Caracterización del nanogel

5.8.1 Espectroscopia de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en estado sólido empleando el método de pastilla de bromuro de potasio KBr grado espectroscópico en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} en el equipo Nicolet AVATAR 320 FT-IR. El análisis de los espectros se llevó a cabo con el software ACD/SpecManager para Windows.

5.8.2 Tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño de partícula y el potencial zeta se obtuvieron mediante dispersión dinámica de luz en un equipo Zetasaizer Nano Zen 3600, empleando 2 mL de una dispersión del nanogel en buffer de HOAc/NaOAc para las mediciones a $\text{pH}=5.0$ y 2 mL de una dispersión del nanogel en buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ para las mediciones a $\text{pH}=7.4$, las cuales se llevaron a cabo a diferentes condiciones de

temperatura (25 y 37 °C). Para todos los casos se reporta el promedio de las determinaciones correspondientes \pm desviación estándar con $n=3$.

El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el software Malvern Zetasizer versión 7.12.

5.8.3 Calorimetría diferencial de barrido

La evaluación del comportamiento térmico de la PNIPAAm y el nanogel a diferentes condiciones de pH se llevó a cabo en un equipo DSC1 Mettler Toledo en un régimen cíclico de 25 a 60 °C, de 60 a 25 °C y de 25 a 60 °C con incrementos de 2 °C min^{-1} .

5.8.4 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido se llevó a cabo empleando un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL 7600.

La preparación de la muestra se llevó a cabo colocando una gota de la dispersión del nanogel en buffer de HOAc/NaOAc a pH=5.0 y una dispersión del nanogel en buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ a pH=7.4 sobre una cinta de carbono y posteriormente se recubrió con oro.

Para el nanogel en estado sólido se colocaron aproximadamente 5 mg del producto liofilizado en la cinta de carbono y posteriormente se llevó a cabo el recubrimiento con oro.

5.9 Curvas de calibración

Para la cuantificación del compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ se construyeron dos curvas de calibración por triplicado en buffer de HOAc/NaOAc a pH=5.0 y en buffer $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$ a pH=7.4. Para todos los casos se consideró como variable dependiente la absorbancia y como variable independiente la concentración (mol L^{-1}).

$$\text{Lineal: } Y = a + b \cdot X$$

Los datos se procesaron empleando el software STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04.

5.10 Encapsulación del compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ en el nanogel

La encapsulación del compuesto se llevó a cabo en celdas termostataadas a 20 °C con 2 mL de una dispersión del nanogel con concentración 10 mg mL^{-1} en

buffer de HOAc/NaOAc a pH=5.0 más 1 mL de una disolución 6.03 mmol L⁻¹ (4.275 mg mL⁻¹) del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en MeOH. El sistema permaneció tapado y en agitación durante 36 h.

5.11 Separación del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre

Una vez llevada a cabo la encapsulación se procedió a separar el compuesto cargado en el nanogel del compuesto libre. Diferentes métodos de separación se evaluaron y se seleccionó el que proporcionó mejores resultados (Filtración #2). Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo empleando los resultados de curvas de calibración obtenidas mediante espectroscopia de absorción en el ultravioleta en la sección 5.9.

a) Centrifugación #1

La dispersión se centrifugó a 2598 rcf en tubos Falcon a 25 °C durante 2 h. El sobrenadante se empleaba para cuantificar la concentración de compuesto libre.

b) Centrifugación #2

La dispersión se centrifugó a 19 098 rcf en tubos Eppendorf a 25 °C durante 2 h. Nuevamente, el sobrenadante se empleaba para cuantificar la concentración de compuesto libre.

c) Filtración #1

La dispersión se filtró empleando filtros de jeringa de polifluoruro de vinilideno (PVDF) no esterilizados con un tamaño de poro de 0.22 µm, marca Millipore. Para evitar errores porque el compuesto permaneciera adherido al filtro de PVDF, se tomaba una muestra de 1 mL de dispersión y se hacía pasar por el filtro, el filtrado se desechaba y posteriormente una muestra de 2 mL se hacía pasar por el mismo filtro. El filtrado se empleaba para cuantificar la concentración de compuesto libre.

d) Membrana de diálisis

Se empleó un tubo de diálisis de 25 kDa con una anchura de 12 mm y diámetro de 7.5 mm marca Spectrum Labs, a partir del cual se construyeron bolsas de aproximadamente 2 cm de largo. En el interior de la bolsa se colocó una disolución del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ con una concentración conocida, se tomaron muestras cada 10 minutos y se evaluó el tiempo en que se igualaban las concentraciones internas y externas, esto con la finalidad de verificar que el compuesto no se absorbiera en la bolsa de diálisis. Una vez corroborada esta

parte, se colocó en el interior la dispersión del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre y se procedió a esperar que el compuesto libre atravesara la membrana, mientras que el sistema nanogel con compuesto, permanecería en el interior de la bolsa. La disolución externa se empleaba para la cuantificación del compuesto libre.

e) Filtración #2

La dispersión se filtró en un matraz Kitasato con embudo buchner, empleando filtros GSWP01300 de ésteres mezclados de celulosa hidrófila no esterilizados con un tamaño de poro de 0.22 μm marca Millipore. El filtrado se empleaba para cuantificar la concentración de compuesto libre.

5.12 Encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

Una vez seleccionado el método adecuado para la separación, se procedió al cálculo del porcentaje de encapsulación y la concentración del compuesto encapsulado en el nanogel empleando las siguientes ecuaciones:

$$\% E = \left(\frac{\text{mg de compuesto encapsulado}}{\text{mg de compuesto inicial}} \right) * 100$$

$$\% C = \frac{\text{mg de compuesto encapsulado}}{\text{mg de nanogel}}$$

5.13 Liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

La liberación del compuesto del nanogel se llevó a cabo en un sistema como el que se muestra en la figura 37:

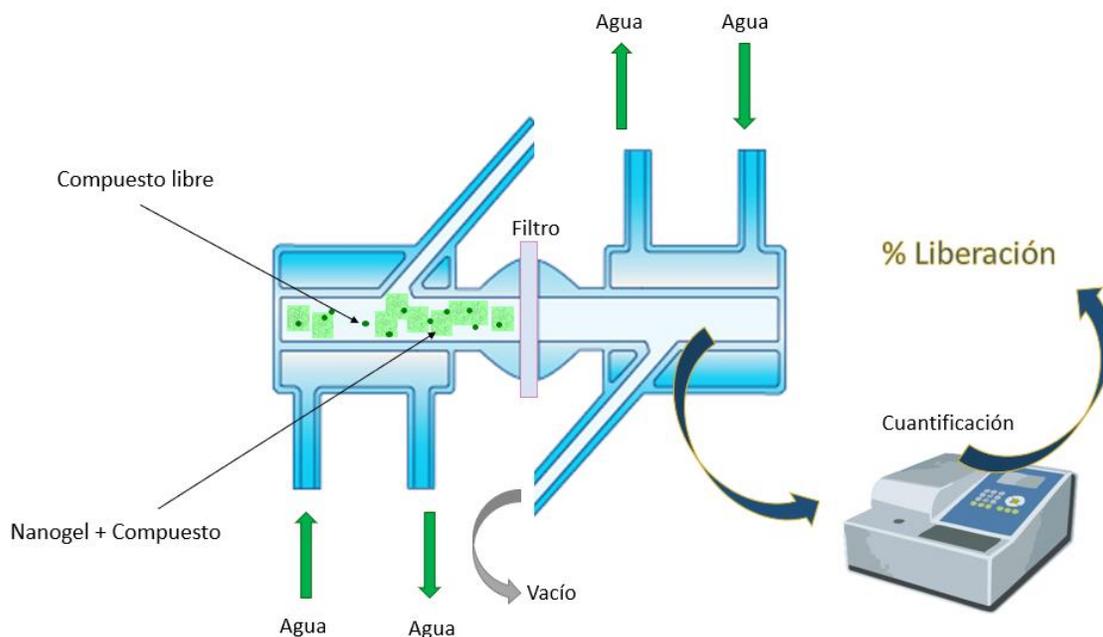


Figura 37. Esquema del sistema de liberación.

Las liberaciones se llevaron a cabo a 37 °C en 3 mL de buffer de HOAc/NaOAc a pH=5.0 y en buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH=7.4, según sea el caso. Ambos medios se mantuvieron en agitación constante y se evaluaron por triplicado. Para tomar cada una de las muestras, se hizo vacío en la celda del lado derecho y se tomaron 200 μL de disolución a diferentes tiempos (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 6, 9, 24, 27, 31 y 55 h). La concentración del filtrado se obtuvo a partir de las curvas de calibración obtenidas mediante espectroscopia de absorción en el ultravioleta en la sección 5.9.

El ajuste de las cinéticas de liberación a diferentes modelos se llevó a cabo empleando el complemento DDSolver para Excel.

6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis de los compuestos de coordinación

Como resultado de la síntesis se obtuvieron compuestos sólidos de color verde para todas las diiminas empleadas (figura 38).



Figura 38. Compuestos de coordinación de Cu(II) sintetizados.

6.2 Caracterización de los compuestos de coordinación

6.2.1 Espectroscopia de infrarrojo

Para iniciar la caracterización se obtuvieron los espectros de IR de los reactivos fen, bipy e HIndo, así como de los compuestos $[\text{Cu}(\text{fen})_2](\text{NO}_3)_2$ y $[\text{Cu}(\text{bipy})_2](\text{NO}_3)_2$. Lo anterior, con la finalidad de observar las bandas asociadas a los modos vibracionales de los enlaces presentes en los ligantes libres, así como la modificación de éstos cuando el ligante se coordina al centro metálico de Cu(II). [93]

Una vez observadas las variaciones que presentan los ligantes libres respecto a los coordinados al centro metálico, se obtuvieron los espectros de los compuestos mixtos sintetizados. A continuación, se muestra el espectro del compuesto de coordinación $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ a manera de ejemplo y los espectros correspondientes a los ligantes libres bipy y HIndo (figura 39).

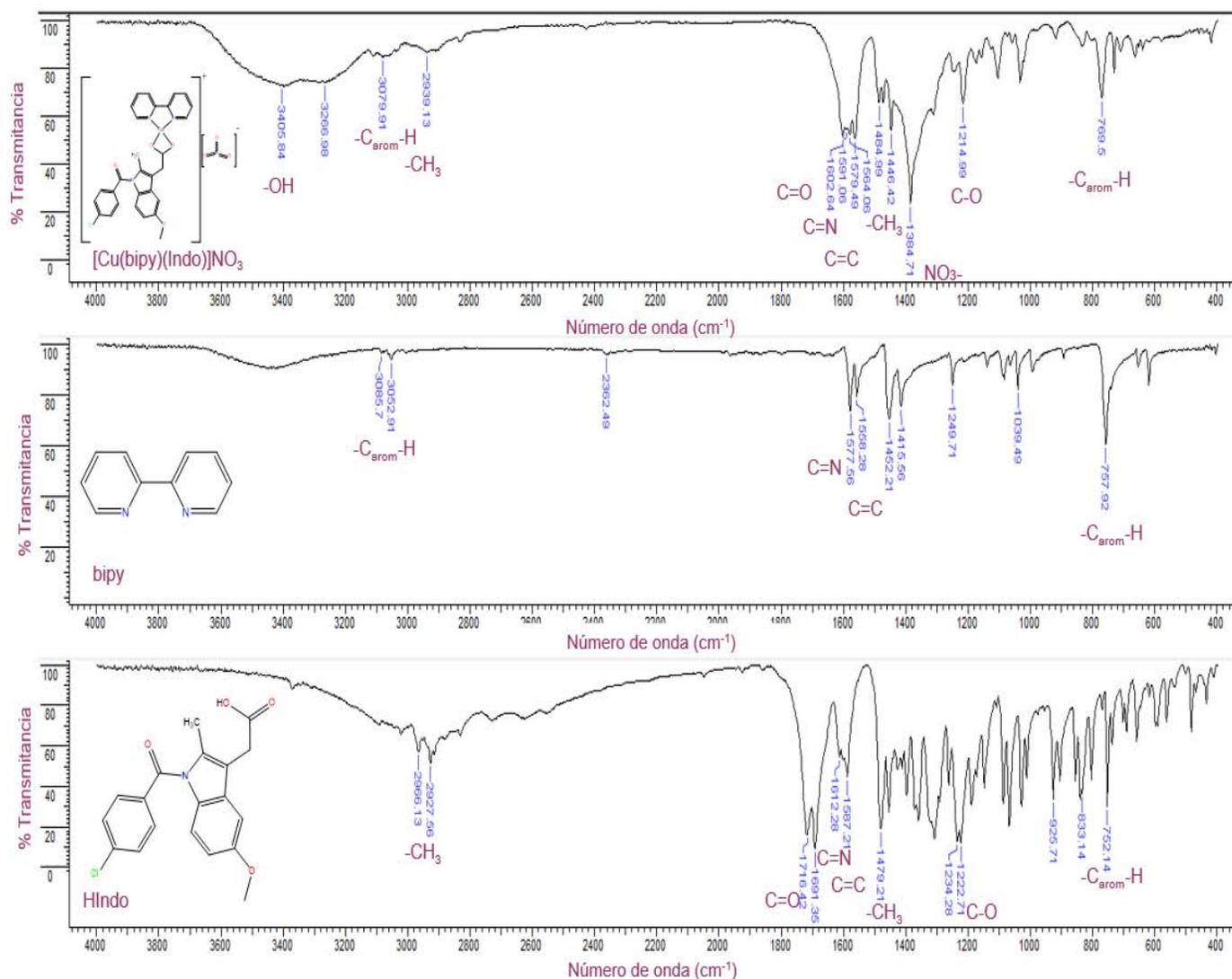


Figura 39. Espectro en el IR del compuesto [Cu(bipy)(Indo)]NO₃, bipy y HIndo.

La coordinación de los ligantes al centro metálico de Cu(II) conlleva a una modificación en la energía requerida para provocar una transición entre los estados vibracionales de baja energía (fundamentales) y los de alta energía (excitados), lo que a su vez resulta en la modificación de la longitud de onda de la radiación absorbida y por tanto un corrimiento de las bandas presentes en el espectro de IR.

Las bandas características de las diiminas libres son: la banda presente en 3070 cm⁻¹ que se atribuye al modo normal vibracional de los enlaces $\nu_{\text{C}_{\text{arom}}-\text{H}}$, la banda en 1580 cm⁻¹ atribuida al modo normal vibracional de los enlaces $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ y la banda en 1520 cm⁻¹ correspondiente al modo normal vibracional de los enlaces $\nu_{\text{C}=\text{C}}$. Es importante mencionar que las bandas asociadas a los enlaces $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ y $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ generalmente se encuentran mezcladas debido a que la masa reducida de

ambos tipos de enlace es muy similar. Se observan bandas de mediana intensidad asociadas a los modos normales vibracionales de las flexiones fuera del plano del enlace $\delta C_{\text{arom-H}}$ presente en los anillos aromáticos de las fen en 850 y 720 cm^{-1} y de las bipy en 771 cm^{-1} .

Las bandas características de la indometacina libre son: una banda muy intensa en 1691 cm^{-1} correspondiente al modo normal vibracional del enlace $\nu C=O$, en 2928 y 1479 cm^{-1} las bandas asociadas a los modos normales vibracionales de elongación y flexión de los $-CH_3$ (νCH_3 y δCH_3 , respectivamente), en 1234 y 1222 cm^{-1} las bandas atribuidas a los modos normales vibracionales de los enlaces $\nu C-O$.

Los compuestos $[Cu(\text{fen})_2](NO_3)_2$ y $[Cu(\text{bipy})_2](NO_3)_2$ presentan las bandas características de las diiminas con ligeros desplazamientos; generalmente, a menores números de onda, lo que indica la coordinación de éstos ligantes al centro metálico de Cu(II). Los compuestos mixtos además presentan desplazamientos de las bandas asociadas a los modos vibracionales normales de la indometacina.

La banda en aproximadamente 3400 cm^{-1} se debe al modo normal vibracional del enlace $\nu O-H$; lo cual posiblemente se deba a la presencia de aguas de coordinación en las posiciones axiales vacantes del centro metálico de Cu de las Casiopeínas. La presencia de moléculas de agua de coordinación se corroborará posteriormente con otras técnicas. [94, 95]

Las bandas asociadas a las diiminas coordinadas son: una banda presente en 3060 cm^{-1} atribuida al modo normal vibracional del enlace $\nu C_{\text{arom-H}}$, una banda en 1580 cm^{-1} correspondiente al modo normal vibracional del enlace $\nu C=N$ y la banda en 1520 cm^{-1} debida al modo normal vibracional del enlace $\nu C=C$. Nuevamente, las bandas asociadas a los enlaces $\nu C=N$ y $\nu C=C$ se encuentran mezcladas. Se observan bandas de mediana intensidad correspondientes al modo vibracional normal de las flexiones fuera del plano de los enlaces $\delta C_{\text{arom-H}}$ presentes en los anillos aromáticos de las fen en 850 y 720 cm^{-1} y de las bipy en 750 cm^{-1} .

Las bandas atribuidas a la presencia de indometacina coordinada son: una banda muy intensa en aproximadamente 1620 cm^{-1} correspondiente al modo normal vibracional del enlace $\nu C=O$, en 2930 y 1430 cm^{-1} las bandas correspondientes a los modos normales vibracionales de elongación y flexión de los $-CH_3$ (νCH_3 y δCH_3 ,

respectivamente), en 1217 cm^{-1} la banda correspondiente al modo normal vibracional del enlace $\nu\text{C-O}$.

En todos los compuestos se observa la presencia de la banda correspondiente al modo normal vibracional del nitrato en su forma iónica en 1385 cm^{-1} , lo que indica que este no se encuentra coordinado al centro metálico de Cu(II) .

El resto de los compuestos presentaban las bandas características en los espectros de IR en valores muy similares. Las posibles asignaciones para todos los compuestos se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Bandas características y sus posibles asignaciones en IR

*NA = No aplica

Compuesto	$\nu_{\text{(O-H)}}$	$\nu_{\text{(Carom-H)}}$	$\begin{matrix} \nu_{\text{(CH}_3\text{)}} \\ \delta_{\text{(CH}_3\text{)}} \end{matrix}$	$\nu_{\text{(C=O)}}$	$\nu_{\text{(C=N)}}$	$\nu_{\text{(C=C)}}$	$\nu_{\text{(NO}_3^-)}$	$\nu_{\text{(C-O)}}$	$\delta_{\text{(Carom-H)}}$
<i>fen</i>	3381	3059	NA	NA	1585	1546	NA	NA	854, 739
<i>bipy</i>	3419	3085	NA	NA	1578	1558	NA	NA	758
<i>HIndo</i>	3396	3093	2928	1716, 1691	1612	1587	NA	1234, 1222	833, 752
<i>[Cu(fen)₂](NO₃)₂</i>	3394	3052	NA	NA	1626	1585	1385	NA	852, 723
<i>[Cu(bipy)₂](NO₃)₂</i>	3405	3080	NA	NA	1637	1599	1385	NA	771
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	3392	3068	2928, 1429	1673	1589	1520	1385	1217	721, 849
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	3400	3084	2926, 1425	1621	1564	1524	1385	1215	723, 868
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	3392	3074	2939, 1433	1606	1587	1524	1385	1215	727, 810
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	3417	3063	2926, 1430	1618	1593	1531	1385	1217	721, 835
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	3406	3080	2939, 1446	1602	1580	1564	1385	1215	770
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	3439	3068	2928, 1477	1616	1597	1570	1385	1225	754
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	3396	3047	2924, 1481	1610	1591	1568	1385	1217	727

6.2.2 Análisis elemental

El análisis elemental permitió determinar el contenido relativo de carbono, nitrógeno e hidrógeno presente en los compuestos de coordinación.

Considerando un error del 5 % como el máximo aceptado se observa que los porcentajes calculados y los obtenidos de manera experimental se asemejan entre sí, permitiéndonos proponer la fórmula molecular y la masa molar de cada uno de los compuestos, así como asegurar que estos se obtuvieron con una buena pureza.

El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Resultados de análisis elemental

Análisis elemental calculado, análisis elemental experimental
(% de error).

Compuesto	Fórmula Mínima	Masa molecular (g/mol)	%C	%N	%H
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	[C ₃₁ H ₂₃ N ₄ O ₇ CuCl]	662.53	56.49, 57.42 (2.18)	8.45, 8.16 (3.43)	3.49, 3.52 (0.85)
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	[C ₃₃ H ₂₇ N ₄ O ₇ CuCl(H ₂ O)]	708.60	55.93, 55.23 (1.25)	4.12, 3.97 (3.64)	7.90, 8.07 (2.15)
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	C ₃₃ H ₃₁ N ₄ O ₇ CuCl	690.58	57.39, 56.49 (2.09)	8.11, 8.48 (4.56)	3.94, 4.04 (2.53)
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	[C ₃₅ H ₃₁ N ₄ O ₇ CuCl(H ₂ O)]	736.65	57.06, 54.38 (4.69)	4.51, 4.54 (0.66)	7.60, 7.87 (3.55)
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	[C ₂₉ H ₂₃ N ₄ O ₇ CuCl(H ₂ O) ₂]	674.54	51.63, 50.48 (2.22)	8.30, 8.36 (0.72)	4.03, 4.00 (0.74)
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	[C ₃₁ H ₂₇ N ₄ O ₇ CuCl(H ₂ O)]	683.10	54.38, 56.51 (3.91)	8.18, 7.97 (2.56)	4.26, 4.31 (1.17)
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	[C ₃₁ H ₂₇ N ₄ O ₇ CuCl(H ₂ O) _{1.5}]	693.59	53.68, 51.61 (3.85)	8.07, 8.38 (3.84)	4.35, 4.54 (4.36)

En algunos casos el ajuste de los porcentajes se mejoró al proponer que los compuestos se encontraban hidratados. La hidratación que presentan los compuestos es variable y se propuso que las moléculas de agua se encuentran dentro de la esfera de coordinación ya que el centro metálico de Cu(II) esperado para estos compuestos generalmente presenta cuatro átomos donadores en el plano xy y uno o dos átomos donadores en las posiciones axiales (número de

coordinación 5 con geometría pirámide de base cuadrada y 6 con geometría octaédrica, respectivamente). Además, espectroscopia infrarroja ya había demostrado que el nitrato se encontraba fuera de la esfera de coordinación del Cu en su forma iónica y en el grupo de trabajo se ha observado que cuando esto sucede, las estructuras cristalinas muestran moléculas de agua coordinadas.

Las moléculas de agua coordinadas se corroboraron con las técnicas de conductividad eléctrica molar, intervalo de descomposición y resonancia paramagnética electrónica, como se discutirá más adelante. [94, 95]

6.2.3 Conductividad eléctrica molar

La tabla 4 muestra la conductividad eléctrica molar que presentaron cada uno de los compuestos:

Tabla 4. Resultados de conductividad eléctrica molar

Compuesto	Conductividad ($\text{Ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	91.3
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	105.9
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	93.1
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	89.5
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	102.9
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	90.5
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	82.4

De acuerdo con la literatura, [96, 97] en una disolución de MeOH un valor de conductividad eléctrica molar entre 85 y 115 $\text{Ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ corresponde a un electrolito de tipo 1:1. Se observa que en general los compuestos de coordinación presentan una conductividad eléctrica molar entre dichos valores y por tanto en disolución se comportan como electrolitos de tipo 1:1.

El compuesto *[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃* presenta una conductividad eléctrica de 82.4 $\text{Ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Este valor se encuentra ligeramente debajo del reportado en la literatura para electrolitos 1:1; sin embargo, se localiza alejado del valor reportado para no electrolitos (70 $\text{Ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$), por lo que también se clasificó como electrolito 1:1.

6.2.4 Momento magnético

La medición de la susceptibilidad magnética se llevó a cabo con la finalidad de confirmar el estado de oxidación 2^+ esperado para el centro metálico de Cu.

Se llevaron a cabo las mediciones de susceptibilidad magnética para los ligantes diimina y los compuestos de coordinación. Todos los ligantes presentaron una susceptibilidad magnética negativa, es decir, son diamagnéticos.

En la tabla 5 se muestran los valores de momento magnético efectivo obtenido para los compuestos de coordinación:

Tabla 5. Resultados de momento magnético

Compuesto	μ_{eff} (MB)
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	1.66
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	2.21
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	1.98
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	1.96
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	2.22
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	1.78
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	1.92

El valor de momento magnético efectivo informado en la literatura para compuestos con un electrón desapareado en su estructura se encuentra entre 1.70 y 2.20 MB; asimismo, el valor para compuestos con dos electrones desapareados es entre 2.60 y 4.00 MB. [98, 99]

Se observa que, el valor de momento magnético para todos los compuestos se encuentra en el intervalo de entre 1.66 y 2.22 MB, lo que corresponde a compuestos con un electrón desapareado en su estructura; confirmándose así que el centro metálico de Cu se encuentra en estado de oxidación 2^+ y posee una configuración electrónica [Ar] d^9 .

A pesar de que el compuesto [Cu(fen)(Indo)]NO₃ presenta valores ligeramente inferiores al intervalo reportado en la literatura, éste permanece más cercano al valor reportado para únicamente un electrón desapareado por lo que puede afirmarse que el centro metálico de Cu presenta un electrón desapareado, una configuración electrónica [Ar] d^9 y un estado de oxidación 2^+ . Una posible explicación para el valor inferior de la susceptibilidad magnética es que esta técnica la muestra se encuentra en estado sólido y, por tanto, hay cercanía entre los núcleos

de Cu, lo que conlleva a un acoplamiento entre los momentos de espín electrónicos de los electrones desapareados del Cu y por tanto, una ligera disminución en el momento magnético obtenido. [100]

6.2.5 Temperatura de descomposición

La medición del punto de fusión de los compuestos de coordinación mostró que éstos sufren descomposición térmica a temperaturas comprendidas entre los 143 y 180 °C.

En la tabla 6 se muestra el intervalo de temperatura en el que se observó la descomposición de cada uno de los compuestos:

Tabla 6. Intervalo de descomposición de los compuestos de coordinación

Compuesto	Intervalo de descomposición (°C)
$[Cu(fen)(Indo)]NO_3$	145-148
$[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO_3$	178-180
$[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO_3$	176-178
$[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO_3$	173-175
$[Cu(bipy)(Indo)]NO_3$	145-148
$[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO_3$	143-146
$[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO_3$	161-163

Es importante mencionar que en el proceso de descomposición de los compuestos no se observó la pérdida de moléculas de agua de hidratación a temperaturas cercanas a 100 °C.

6.2.6 Espectroscopia electrónica de absorción en el UV-Visible

La espectroscopia de absorción en el UV-Visible permite observar transiciones que ocurren entre el estado fundamental Ψ_g y estados excitados Ψ_e de una molécula. La probabilidad de la transición debida a la interacción de un fotón con los electrones se expresa a través del operador de momento de transición \hat{M} , que en UV-Visible se encuentra dominado por el termino asociado al dipolo eléctrico. La energía de la transición entonces dependerá de la siguiente integral:

$$\int \Psi_g \hat{M}_{dipolo\ eléctrica} \Psi_e d\tau$$

Las transiciones cuya $\int \neq 0$ se dice que se encuentran permitidas y presentarán una elevada intensidad y energía en el espectro de absorción. Las

transiciones cuya $f = 0$ se encuentran prohibidas y aunque suceden en ciertas ocasiones que se discutirán más adelante, presentan una menor intensidad y energía en el espectro de absorción.

Para llevar a cabo la asignación de las señales se obtuvieron los espectros electrónicos de absorción en la región del UV de la indometacina, las diiminas y los compuestos de coordinación.

El espectro electrónico de absorción de la indometacina sin coordinar (figura 40) presenta una banda ancha entre 225 y 280 nm con valor de ϵ de entre 2000 y 4500 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y una banda pequeña en 317 nm con valor de ϵ de 1385 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

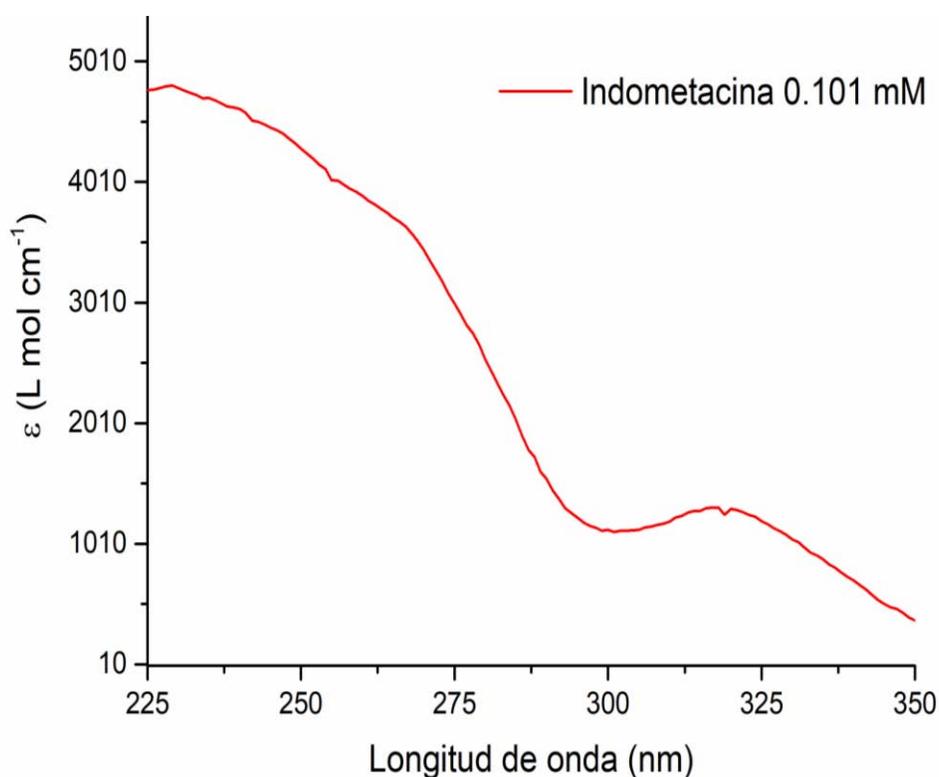


Figura 40. Espectro electrónico de absorción en el ultravioleta (220-350 nm) en MeOH a $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A continuación, se muestra el traslape entre los espectros de absorción obtenidos para los ligantes indometacina, bipy y 5,6-dimetil-fen y los compuestos de coordinación $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ $[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ (figura 41):

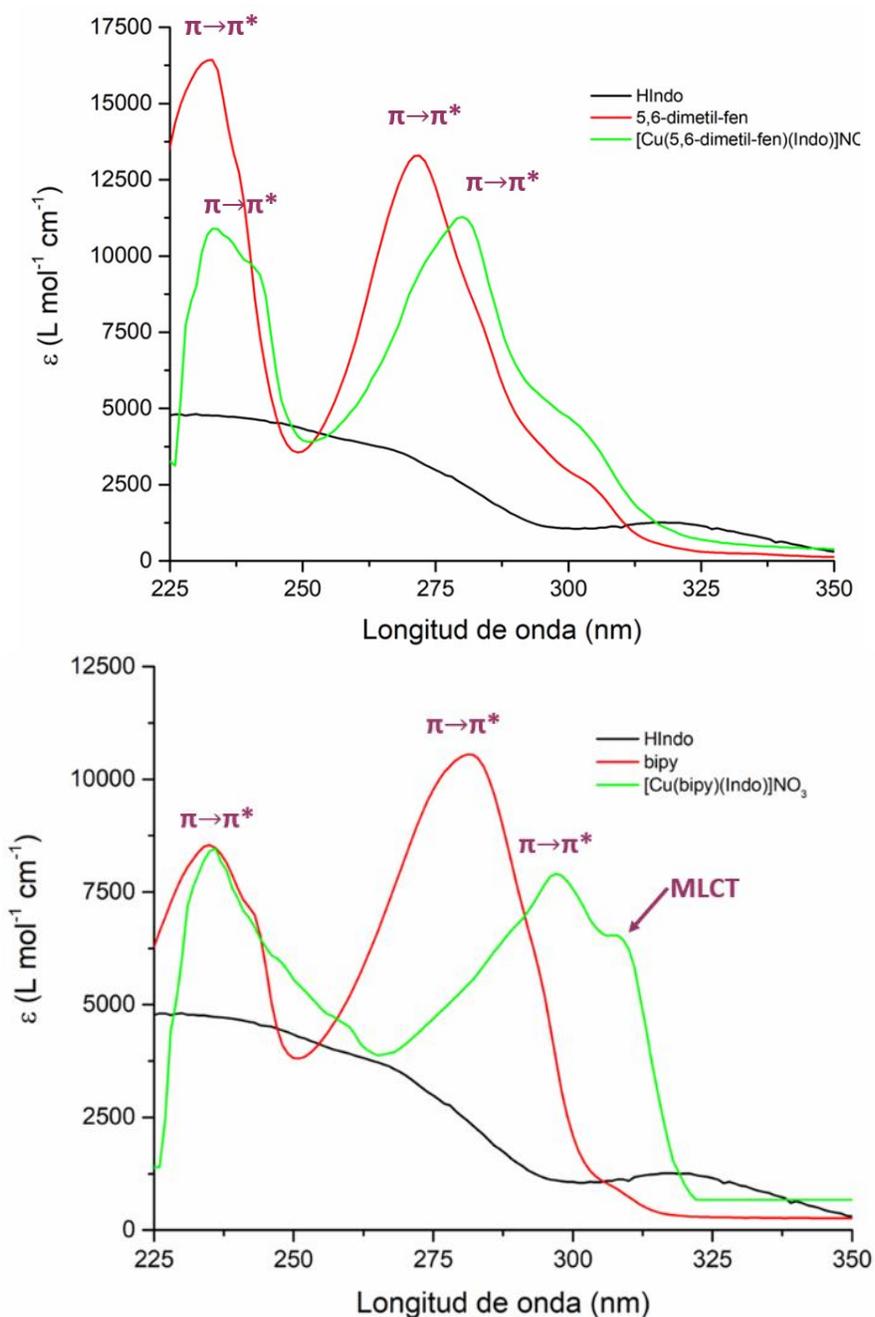


Figura 41. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta (220-350 nm) en MeOH a T=25 °C.

Como es apreciable en los espectros de la figura 41, los ligantes diimina presentan dos máximos ubicados en aproximadamente 230 y 270 nm, los cuales se atribuyen a transiciones permitidas entre los orbitales π de enlace y π de antienlace ($\pi \rightarrow \pi^*$), típicas en compuestos orgánicos con sistemas aromáticos y múltiples enlaces π . El valor de coeficiente de extinción molar confirma las transiciones

asignadas, ya que la literatura informa que para estas ϵ debe encontrarse alrededor de $10\ 000\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. [101]

Los compuestos de coordinación presentan una forma muy similar a los espectros obtenidos para los ligantes diimina, aquellos que incluyen fen en su estructura presentan dos máximos ubicados en aproximadamente 230 y 280 nm y los que incluyen bipy presentan dos máximos en aproximadamente 230 y 300 nm. En este sentido, los máximos en los compuestos de coordinación en la región del UV se atribuyen a transiciones permitidas entre los orbitales π de enlace y π de antienlace ($\pi \rightarrow \pi^*$) debidas a la presencia de los sistemas altamente conjugados de las diiminas aromáticas en los compuestos de coordinación. El desplazamiento de las transiciones a valores superiores de longitud de onda indica que, aunque estas siguen llevándose a cabo cuando el ligante diimina se coordina, son de menor energía. Los valores de ϵ para este tipo de transiciones son superiores a $10\ 000\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

Las transiciones de la indometacina no se observan en los compuestos de coordinación debido a que las transiciones tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ correspondientes a la diimina aromáticas poseen ϵ mayores y por tanto enmascaran las de la indometacina.

En todos los compuestos con bipy se observa un tercer máximo entre 306 y 316, el cual, según lo reportado por Morgan *et al.* [102] y al no aparecer en las bipy sin coordinar, se atribuye a transferencias de carga metal-ligante, MLCT u oxidativas que ocurren de los orbitales d del metal con configuración electrónica $t_{2g}^6 e_g^3$ hacia los orbitales de antienlace vacíos del ligante (π^*). La transferencia de carga en 220 nm no se observa, posiblemente por que ésta es cubierta por las transiciones tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ de las diiminas que son de mayor intensidad y por tanto poseen valores de ϵ superiores. [103]

En aproximadamente 220 nm se esperaría una señal débil asociada a la transición de orbitales moleculares no enlazantes a orbitales moleculares de antienlace $n \rightarrow \pi^*$ que ocurre en el anión NO_3^- ; sin embargo, el valor del ϵ para el máximo en 230 nm es mucho mayor al informado para este tipo de transiciones ($10\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ a $1\ 000\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), lo que indica que esta transición es enmascarada por las transiciones tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema diimina. [100, 101]

Se muestran los espectros obtenidos para todos los compuestos de coordinación (figura 42):

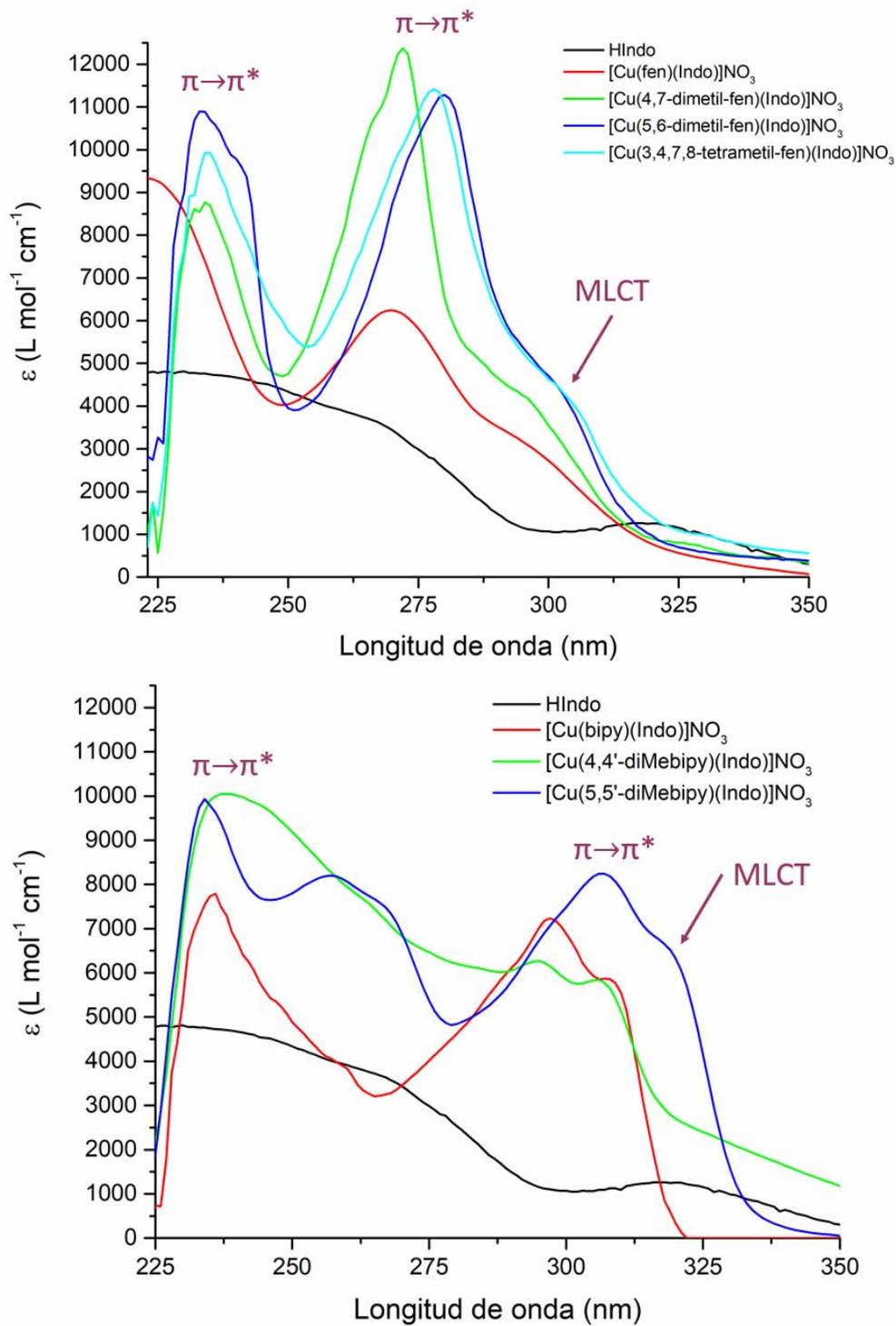


Figura 42. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta (225-350 nm) en MeOH a T=25 °C.

La tabla 7 muestra la longitud de onda a la que aparecen los máximos de cada uno de los compuestos, así como el valor correspondiente al coeficiente de absorptividad molar.

Tabla 7. Resultados de espectroscopia de absorción en el UV

Compuesto	λ_{\max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{\max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{\max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
[Cu(fen)(Indo)]NO ₃	222	9035	272	6404	298	3010
[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)] NO ₃	234	9837	272	12364	295	4209
[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)] NO ₃	235	9439	280	11285	301	4545
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)] NO ₃	234	9924	278	11420	302	4446
[Cu(bipy)(Indo)] NO ₃	236	7787	297	7233	308	5882
[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)] NO ₃	236	9924	294	6289	305	5872
[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)] NO ₃	235	9931	307	8377	319	6586

En lo que se refiere a la región del visible los ligantes fen, bipy y HIndo no presentan transiciones, por lo que las transiciones que se observan en esta región se atribuyen al centro metálico de Cu(II). Aunque las transiciones entre los microestados que surgen a partir del desdoblamiento de los orbitales d del Cu(II) $d \rightarrow d$ se encuentran prohibidas debido a que $\int \Psi_g \hat{M}_{dipolo\ eléctrica} \Psi_e d\tau = 0$, los fenómenos de acoplamiento espín-órbita o vibracional y las distorsiones de la geometría inducidas por los ligantes permiten que éstas se lleven a cabo, aunque con una menor intensidad y energía que las transiciones tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e inclusive que las tipo LMCT o MLCT.

A continuación, se muestran los espectros electrónicos de absorción obtenidos (figura 43):

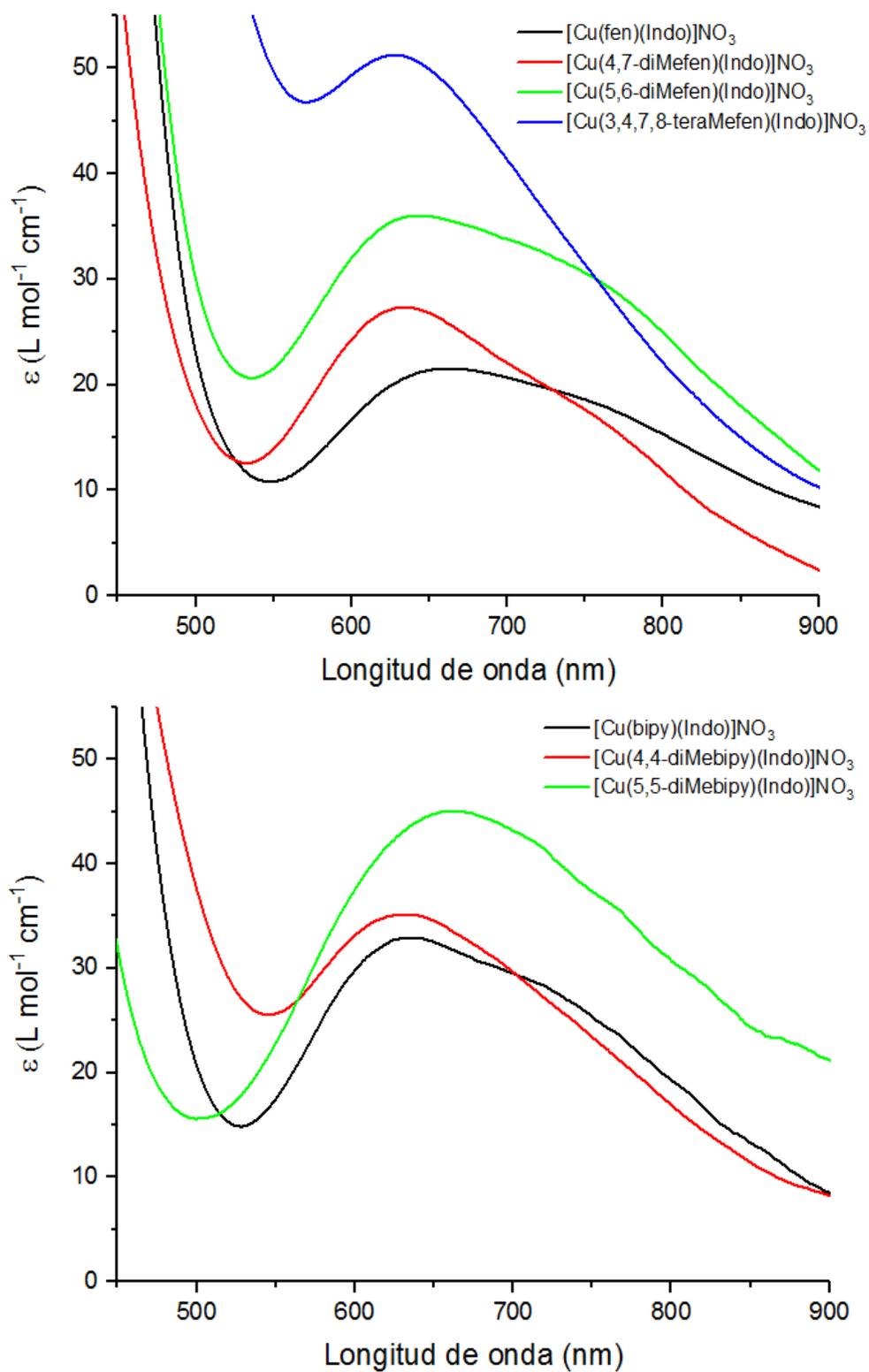


Figura 43. Espectros electrónicos de absorción en el visible (450-900 nm) en MeOH a $T=25\text{ }^\circ\text{C}$.

La tabla 8 muestra los máximos de longitud de onda para cada uno de los compuestos, así como el valor correspondiente al coeficiente de extinción molar.

Tabla 8. Resultados de espectroscopia de absorción en el visible

Compuesto	λ_{max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
[Cu(fen)(Indo)]NO ₃	653	22	758	15
[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)] NO ₃	633	28	754	14
[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)] NO ₃	643	36	763	29
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)] NO ₃	632	51	756	25
[Cu(bipy)(Indo)] NO ₃	638	33	768	17
[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)] NO ₃	633	35	763	18
[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)] NO ₃	656	45	788	24

De acuerdo con los resultados obtenidos en RPE, el centro metálico de Cu(II) en disolución de MeOH presenta una geometría pirámide de base cuadrada, como se discutirá más adelante (Sección 6.2.7). La disminución de la simetría del ion Cu(II) libre ²D a un campo con geometría pirámide de base cuadrada (C_{4v}) hace posible que se lleven a cabo al menos tres transiciones del estado basal del Cu(II) con configuración electrónica t_{2g}⁶e_g³ (²B₁) a los estados excitados (²A₁, ²B₂ y ²E).

El diagrama siguiente muestra las energías involucradas (figura 44):

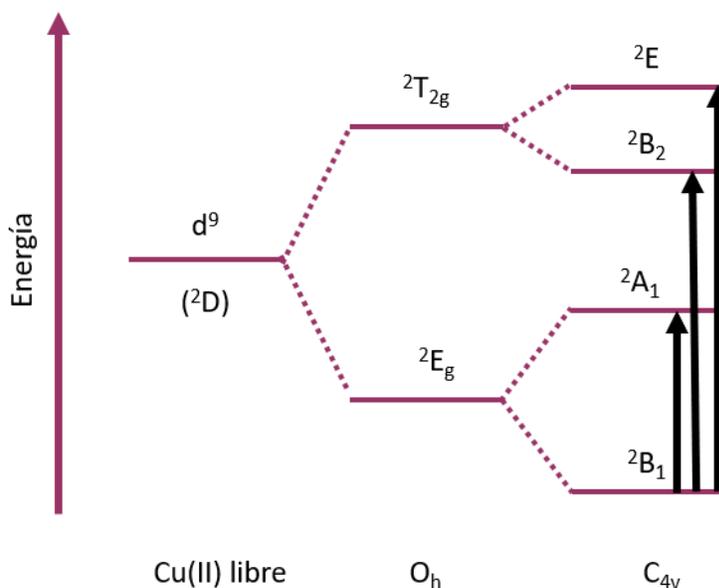


Figura 44. Transiciones en un centro metálico de Cu(II) con grupo puntual C_{4v}.

La presencia de bandas anchas y no simétricas en los espectros de absorción de los compuestos evidencian la distorsión que presenta el centro metálico y sugieren que en los compuestos se lleva a cabo más de una transición.

El máximo que se observa en valores de longitud de onda entre 631 y 656 nm se asigna a la transición ${}^2B_1 \rightarrow {}^2E$, ya que de acuerdo con las energías del grupo puntual C_{4v} es la transición de mayor energía y, por tanto, la que sucederá a una menor longitud de onda. En los espectros de absorción de los compuestos $[Cu(bipy)(Indo)]NO_3$, $[Cu(fen)(Indo)]NO_3$ y $[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO_3$ es posible distinguir un segundo máximo entre 758 y 768 nm, que se asigna a la transición ${}^2B_1 \rightarrow {}^2B_2$, que es la segunda transición de mayor energía y, por tanto, la que sucederá a una mayor longitud de onda. Para el resto de los compuestos el máximo de absorción se toma como la longitud de onda correspondiente a la mitad de la absorbancia del máximo de la transición ${}^2B_1 \rightarrow {}^2E$. En ambos máximos el valor obtenido de ϵ concuerda con el valor reportado en la literatura, la cual informa que éste debe encontrarse entre 1 y $10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. [98, 104, 105]

6.2.7 Resonancia paramagnética electrónica

La resonancia paramagnética electrónica proporciona información acerca del ambiente electrónico en el que se encuentra el centro metálico.

En los espectros obtenidos en estado sólido a temperatura ambiente (figura 45) es posible observar únicamente una señal ancha que si bien, confirma la presencia de Cu(II), no muestra los acoplamientos hiperfino y superhiperfino lo cual se explica por las interacciones vibracionales entre moléculas vecinas y por el incremento de la temperatura que conlleva a la disminución de los tiempos de relajación.

En moléculas con más de un centro metálico de Cu(II) ($S=1/2$), la cercanía entre los átomos de Cu(II) da lugar al acoplamiento entre el espín electrónico del electrón desapareado de cada átomo de Cu(II); generando señales en aproximadamente 500 Hz. La ausencia de éstas señales indica la obtención de especies monoméricas de Cu(II). [102]

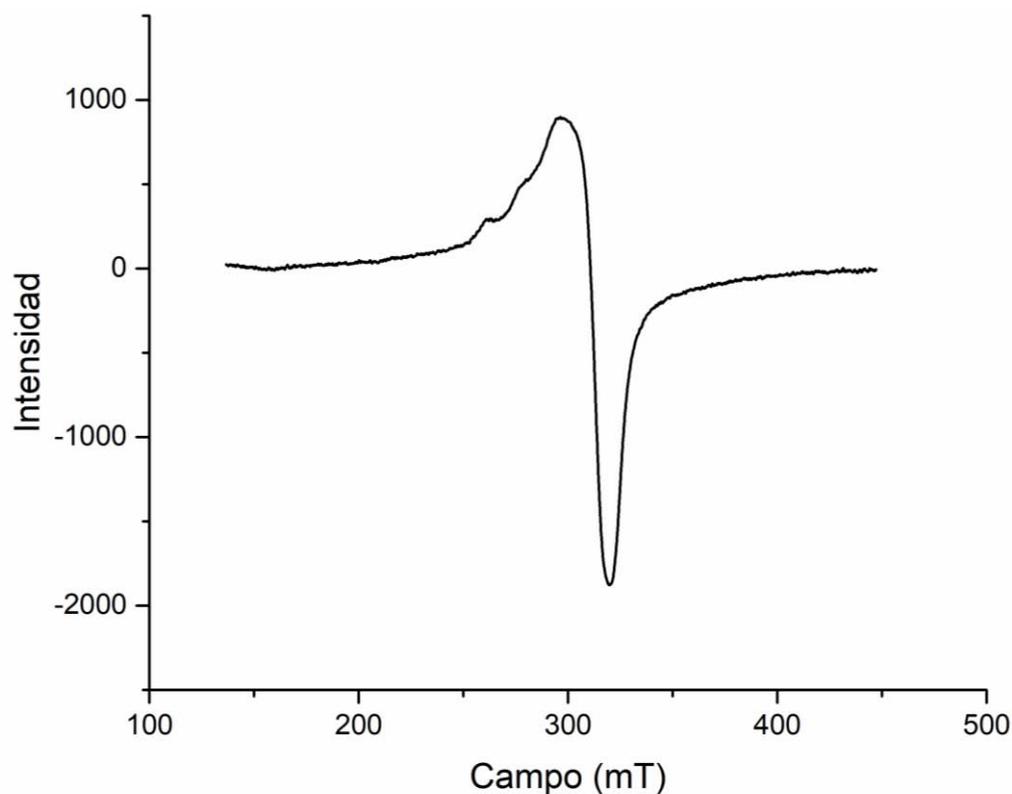


Figura 45. Espectro de RPE del compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ en estado sólido a temperatura ambiente.

Dado que la condición de resonancia en RPE está dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta E = h\nu = g_e\beta H$$

Donde g_e es el factor del electrón libre, ΔE es la energía de la transición, β es la constante del magnetón de Bohr y H el campo magnético aplicado. El valor de g correspondiente a un electrón en una molécula se ve influenciado por la interacción entre el momento de espín electrónico intrínseco del electrón y su entorno, por lo que g se emplea como parámetro para determinar el ambiente químico del electrón desapareado.

La anisotropía en torno al electrón desapareado da lugar a valores de g diferentes a lo largo de los ejes x , y y z (g_x , g_y y g_z respectivamente). Al asumir que el eje z de la molécula se alinea con el campo magnético impuesto y que los ligantes se encuentran en el plano xy , es posible distinguir entre compuestos axiales en los que $g_z \neq g_y = g_x$ o lo que es lo mismo, $g_{\parallel} \neq g_{\perp}$ (prólata $g_{\parallel} > g_{\perp}$ y oblata $g_{\parallel} < g_{\perp}$) y compuestos rómbicos donde $g_z \neq g_y \neq g_x$.

En todos los espectros obtenidos en disolución de MeOH a 77 K, los compuestos mostraron espectros anisotrópicos de tipo axial prólata [106] característicos de centros de Cu(II) con acoplamiento hiperfino como resultado de la interacción del espín electrónico del electrón desapareado del Cu(II) ($S=1/2$) con el espín nuclear del cobre [^{63}Cu (abundancia isotópica=69.17 %, $I=3/2$) y ^{65}Cu (abundancia isotópica=30.83 %, $I=3/2$)]; generando un cuarteto de señales en la región paralela ($2nI+1$, donde n es el número de núcleos involucrados).

Adicionalmente se obtuvo desdoblamiento superhiperfino en la región perpendicular correspondiente al acoplamiento entre el espín electrónico del electrón desapareado del Cu(II) ($S=1/2$) con el espín nuclear de los dos átomos de nitrógeno de la diimina [^{14}N (abundancia isotópica=99.632 %, $I=1$) y ^{15}N (abundancia isotópica del 0.368 %, $I=1/2$)]. Este tipo de señales confirman la presencia de especies monoméricas de Cu(II).

A manera de ejemplo se muestra el espectro de RPE del compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ con su respectiva simulación (figura 46). El resto de los compuestos presentan una forma similar.

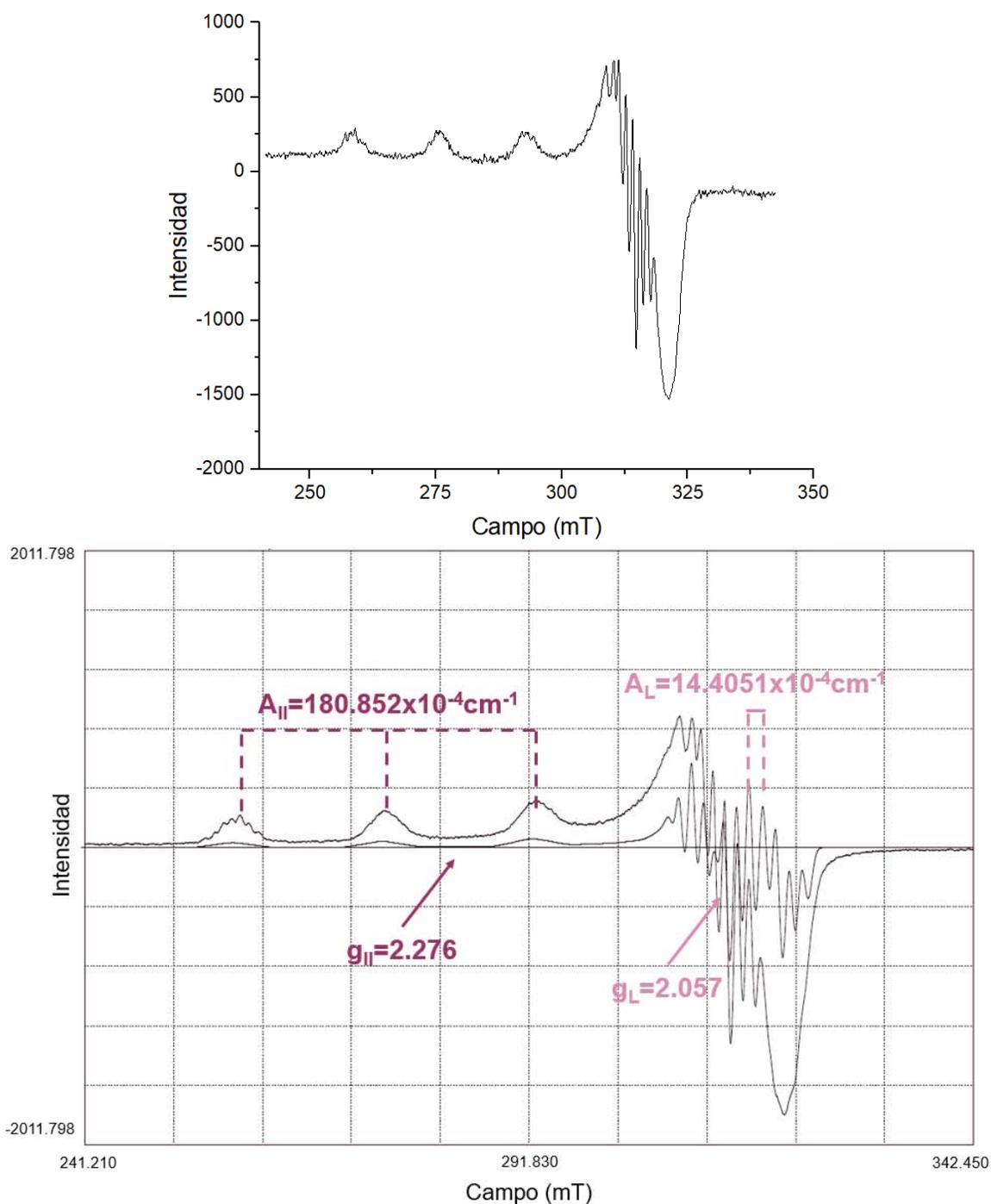


Figura 46. Espectro de RPE del compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ en disolución de MeOH a 77 Km, experimental y calculado.

En la tabla 9 se muestra el resumen de los resultados obtenidos a partir de la simulación del espectro experimental:

Tabla 9. Resumen de resultados de RPE

(a) Unidades en $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, (b) Unidades en cm

A_N constante de acoplamiento con los átomos de N

Compuesto	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel}^{(a)}$	$A_{\perp}^{(a)}$	g_{iso}	$A_{\text{iso}}^{(a)}$	$A_N^{(a)}$	$f^{(b)}$
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	2.276	2.057	180.852	14.405	2.130	66.361	0.0014	126
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	2.270	2.057	182.558	13.757	2.128	66.534	0.0014	124
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	2.270	2.057	180.428	14.232	2.128	66.196	0.0013	126
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	2.258	2.054	189.689	15.957	2.122	70.411	0.0013	119
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	2.265	2.056	185.593	15.896	2.126	69.015	0.0013	122
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	2.274	2.056	181.808	14.916	2.129	67.025	0.0007	125
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	2.262	2.055	188.970	16.310	2.124	70.386	0.0013	120

Debido a que se considera que los ligantes se encuentran en el plano xy, el valor de g_{\parallel} , es altamente influenciado por el ambiente químico del electrón desapareado del Cu(II), permitiendo diferenciar el enlace del metal con los átomos donadores de carácter predominantemente iónico $g_{\parallel} > 2.3$ de uno donde predomina un ambiente covalente $g_{\parallel} < 2.3$ [107]. Con base en los resultados obtenidos, el enlace entre el centro metálico y los átomos donadores presentan carácter predominantemente covalente.

El cuarteto de señales en la región paralela muestran la relación $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$, indicativo de la presencia de un estado electrónico basal con el HOMO con carácter predominantemente $d_{x^2-y^2}$ para Cu(II), el cual puede describirse como: [108]

$$g_{\parallel} = 2.0023 \pm \frac{8\lambda}{E(d_{x^2} - d_{y^2}) - E(d_{xy})}$$

$$g_{\perp} = 2.0023 \pm \frac{2\lambda}{E(d_{x^2} - d_{y^2}) - E(d_{xz}, d_{yz})}$$

Donde:

λ Constante de acoplamiento espín-órbita del Cu(II) = -828 cm^{-1}

E Energía de los orbitales

Por lo que los orbitales atómicos del Cu(II) se desdoblan como se muestra en la figura 47:

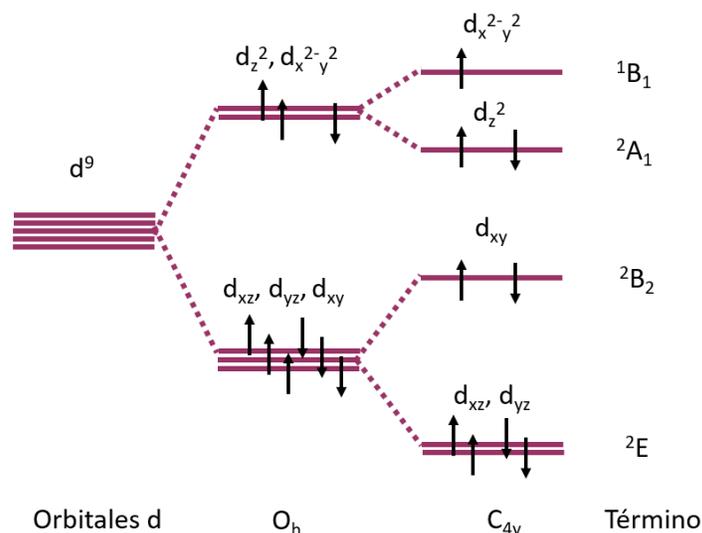
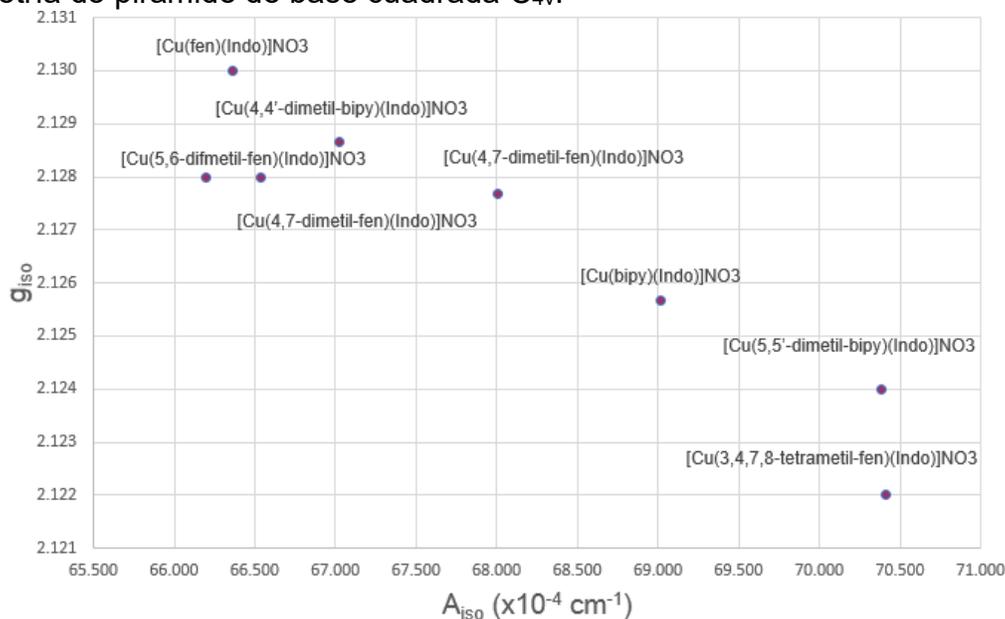


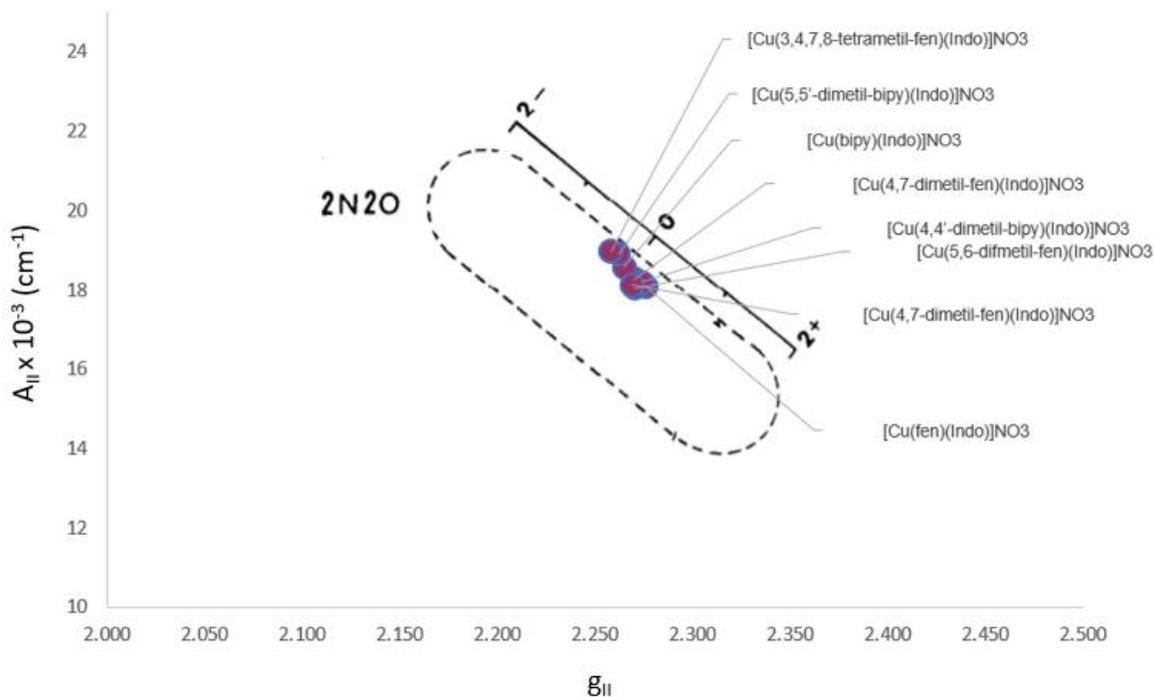
Figura 47. Orbitales atómicos del centro metálico de Cu(II).

Con base en lo reportado por Kivelson D. [107] y su grupo de investigación los compuestos de Cu(II) con una geometría pirámide de base cuadrada presentan valores de A_{iso} entre 65 y $75 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y valores de g_{iso} entre 2.090 y 2.130 . Como se puede observar en la gráfica 1, los valores A_{iso} para los compuestos sintetizados se encuentran entre 66.196 y $70.411 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y los valores de g_{iso} entre 2.122 y 2.130 , por lo que se determinó que los siete compuestos sintetizados poseen una geometría de pirámide de base cuadrada C_{4v}.



Gráfica 1. g_{iso} vs A_{iso} .

Peishach J. y Blumberg W. E. demostraron que los valores de A_{II} y g_{II} , al ser ampliamente influenciados por el ligante, pueden ser empleados para asignar la naturaleza de los átomos unidos al centro metálico. En la gráfica 2 se muestra como todos los compuestos sintetizados coinciden con el intervalo de valores esperados para un Cu(II) unido a dos átomos de oxígeno y dos átomos de nitrógeno (núcleo CuN_2O_2). [109]



Gráfica 2. A_{II} vs g_{II}

El valor de f (g_{II}/A_{II}) suele emplearse como un indicador del grado de distorsión de la perfecta geometría, siendo 110 cm el valor para un sistema “perfecto” y 250 cm uno fuertemente distorsionado. Para los compuestos sintetizados f se encuentra entre 119 y 126, lo que indica que la geometría pirámide de base cuadrada se encuentra poco distorsionada. [110]

6.2.8 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica permitió determinar el comportamiento redox de los compuestos de coordinación, ya que éste se ha empleado como descriptor en el estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad de compuestos de coordinación de cobre con diiminas aromáticas. [36]

Los voltamperogramas de los ligantes fen y bipy no obtuvieron, ya que los procesos de reducción y oxidación sobre éstos se encuentran estudiados y la literatura reporta que estos procesos suceden a potencial muy negativos, por lo que no se espera tener una interferencia con las señales asociadas al centro metálico de Cu(II).

El voltamperograma obtenido para el ligante indometacina sin coordinar se muestra a continuación (figura 48):

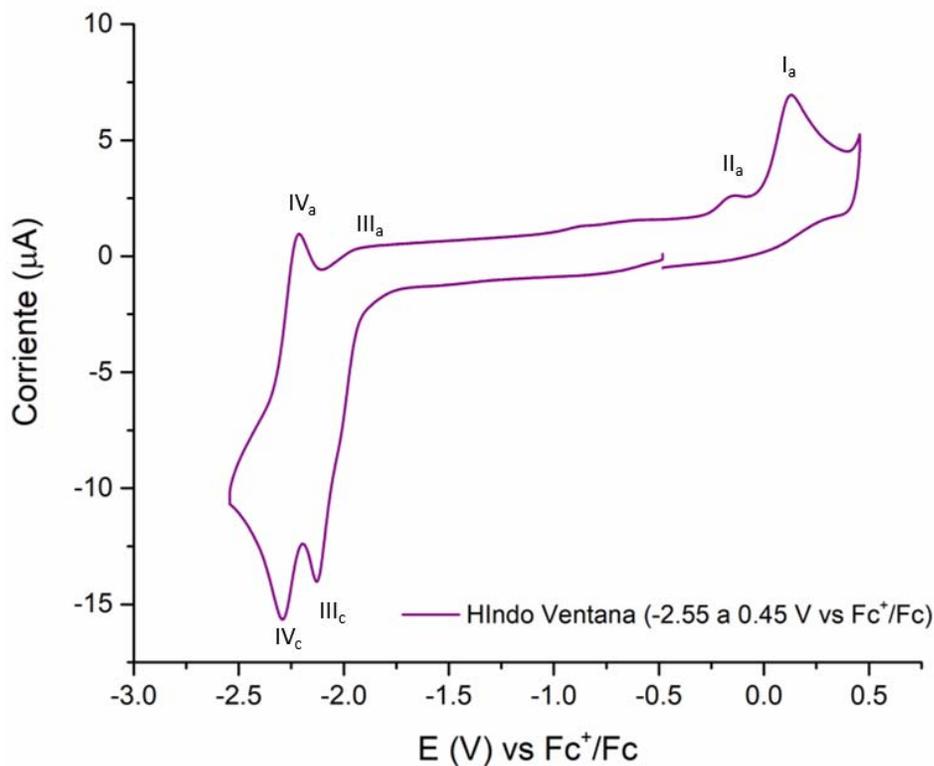


Figura 48. Voltamperogramas del ligante HIndo 1 mmol L^{-1} en sentido catódico en una disolución 100 mmol L^{-1} de TBAPF6 en DMSO.

Electrodo de trabajo de carbón vítreo a $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Vel}=100 \text{ mV s}^{-1}$.

El voltamperograma obtenido concuerda con los procesos reportados en la literatura para la indometacina, la cual presenta dos procesos reversibles en potenciales muy negativos de aproximadamente -2.13 y $-2.30 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$ (III_c , IV_c , IV_a y III_a) y dos picos de oxidación irreversibles a potenciales de -0.15 y $0.13 \text{ V vs Fc}^+/\text{Fc}$ (I_a y II_a). [111]

Una vez conocido el comportamiento electroquímico de la HIndo, se procedió a estudiar el comportamiento de los compuestos de coordinación. Se muestra la sobreposición entre el voltamperograma de la HIndo y el compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ (figura 49).

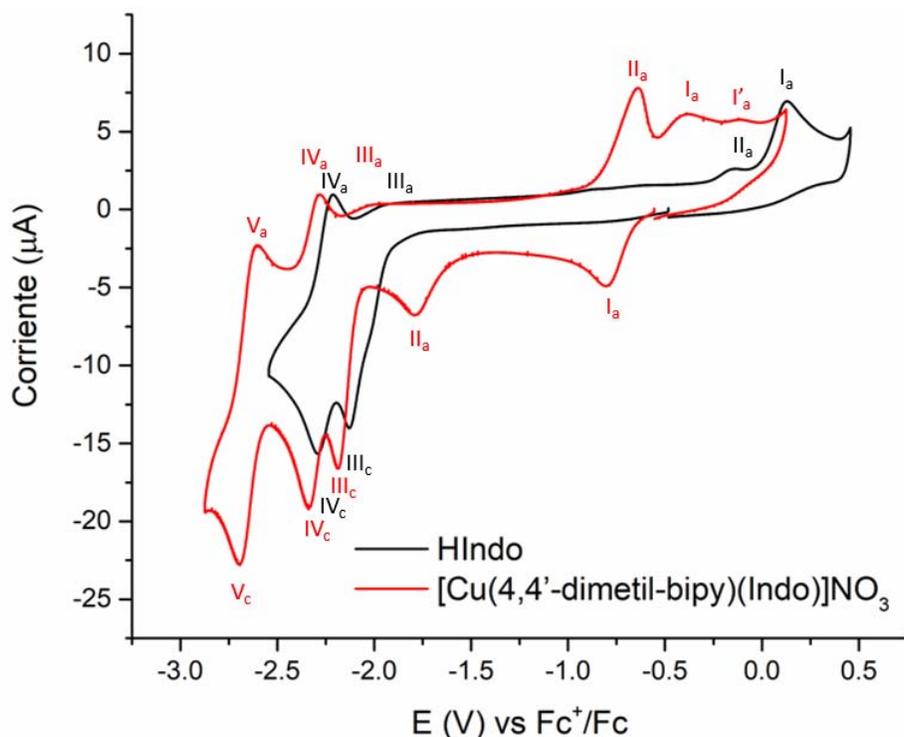


Figura 49. Voltamperogramas de HIndo y $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ 1 mmol L^{-1} en sentido catódico en una disolución 100 mmol L^{-1} de TBAPF6 en DMSO. Electrodo de trabajo de carbón vítreo a $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $V_{el}=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Se observa que en comparación con el voltamperograma de la HIndo, el voltamperograma del compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ presenta nuevas señales. Los procesos I_c , II_c , II_a y I_a se asocian a la presencia del centro metálico de Cu, los procesos III_c , IV_c , IV_a , III_a y I_a' al aparecer en potenciales e intensidades de corriente muy similares a los de la indometacina libre, se asocian a la presencia de esta en el compuesto de coordinación; por último, los procesos V_c y V_a en valores de potencial muy negativos coinciden con los valores esperados para las reducciones y oxidaciones de las diiminas aromáticas.

Posteriormente, se obtuvo una colección de voltamperogramas para el compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ en diferentes intervalos de potencial

(figura 50), esto con la finalidad de corroborar la correspondencia de las señales de reducción y oxidación.

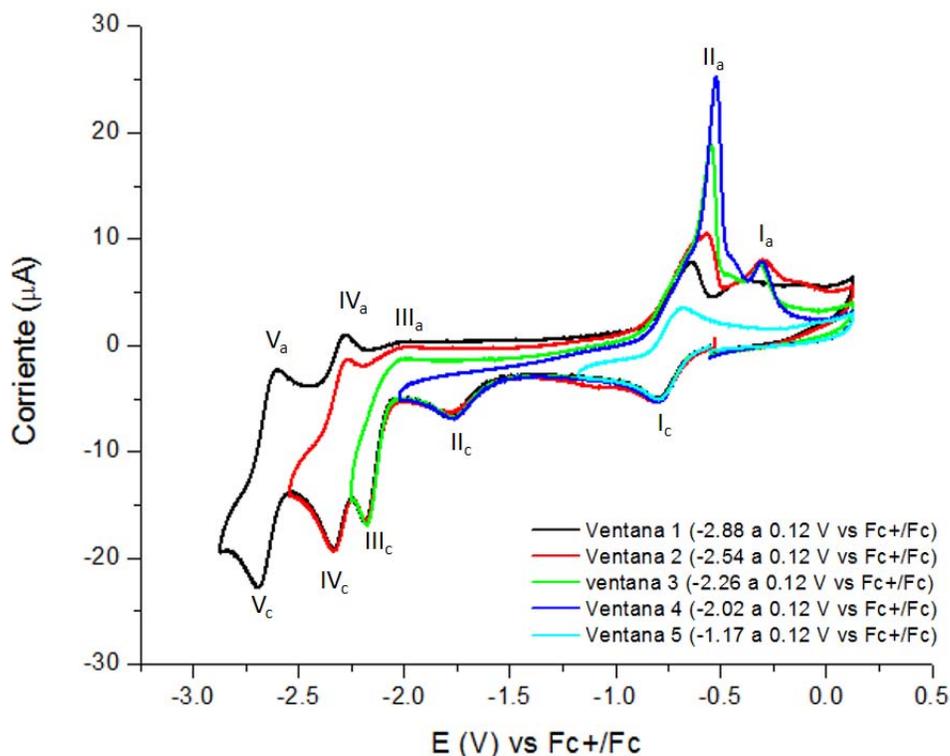


Figura 50. Voltamperogramas del compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ 1 mmol L^{-1} en sentido catódico en una disolución 100 mmol L^{-1} de TBAPF_6 en DMSO . Electrodo de trabajo de carbón vítreo a $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Vel}=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Debido a que, en este trabajo, sólo se desea indagar en el comportamiento del cobre, se muestran los voltamperogramas del mismo compuesto en las ventanas de potencial en las que ocurren los procesos asociados a este: en un intervalo de -2.02 a 0.12 V (rojo). Se observan dos señales de reducción I_c y II_c ; y al continuar con el barrido de potencial y completar el ciclo se observan dos procesos de oxidación II_a y I_a . En el intervalo de -1.17 a 0.12 V (azul) se observa un solo proceso de reducción I_c y al completar el ciclo un proceso de oxidación I_a (figura 51). La indometacina permanece inactiva en la ventana de potenciales estudiados, lo cual coincide con lo reportado por Tarushi A. para compuestos de coordinación de Cu con indometacina (figura 49). [53]

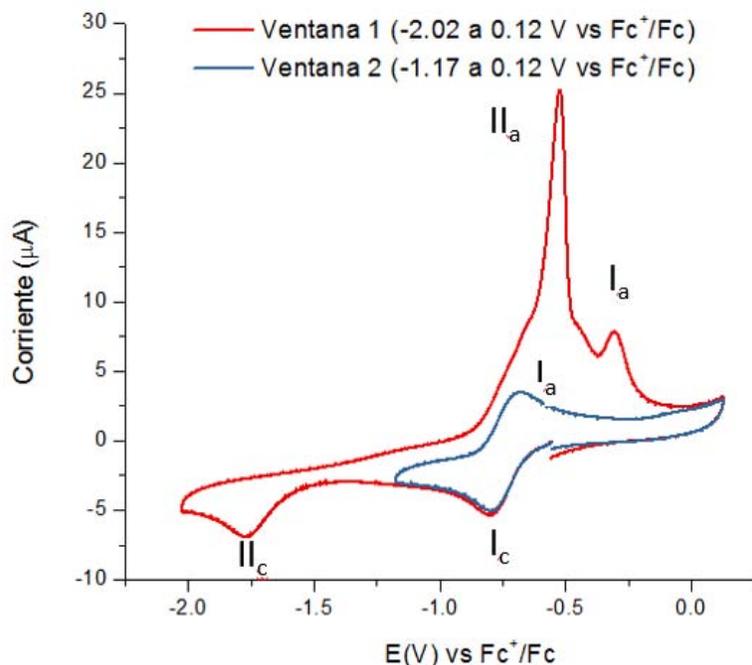
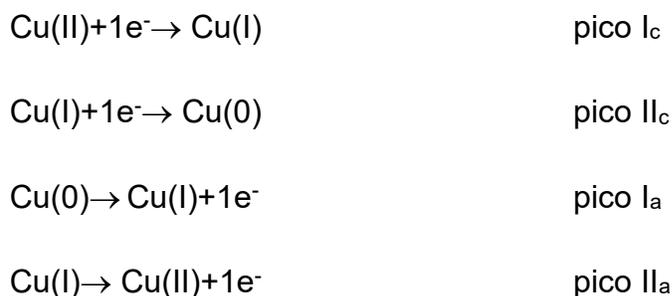


Figura 51. Voltamperogramas del compuesto $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ 1 mmol L^{-1} en sentido catódico en una disolución 100 mmol L^{-1} de TBAPF_6 en DMSO . Electrodo de trabajo de carbón vítreo a $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{Vel}=100 \text{ mV s}^{-1}$.

El primer proceso de reducción se asocia al paso de Cu(II) a Cu(I) y el segundo al paso de Cu(I) a Cu(0) . La señal II_a está asociada a la oxidación Cu(0) a Cu(I) con la redisolución del Cu(0) adherido a la superficie del electrodo (lo cual se explica por la intensidad de corriente) y la señal I_a puede ser asociada a la oxidación de Cu(I) a Cu(II) . Se propone el siguiente mecanismo:



El proceso relacionado con la actividad biológica de los compuestos es la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la reoxidación de este Cu(I) a Cu(II) , por lo que se llevó a cabo el estudio a diferentes velocidades de dicho proceso (azul). Los compuestos

a partir de este estudio presentaron comportamientos diferentes de acuerdo con la diimina aromática, por lo que se dividirán en dos grupos para su discusión.

6.2.8.1 Voltamperometría cíclica de los compuestos [Cu(bipy)(Indo)]NO₃ y [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃ y [Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃.

Se presenta el estudio a diferentes velocidades del proceso Cu(II)/Cu(I) para el compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃ a manera de ejemplo (figura 52).

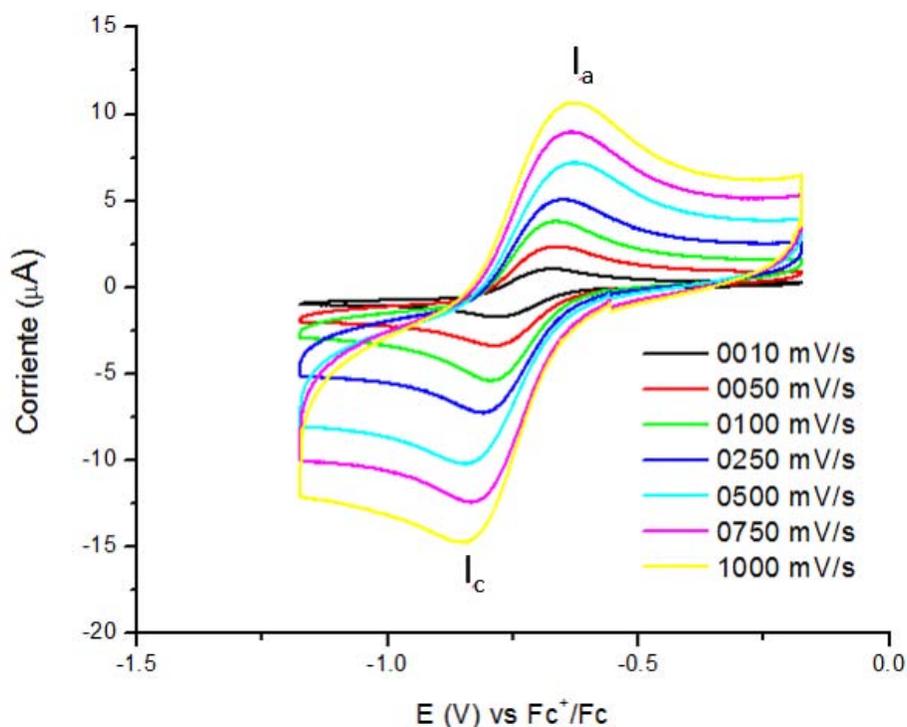


Figura 52. Voltamperograma del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃ 1 mmol L⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L⁻¹ de TBAPF₆ en DMSO. Electrodo de trabajo de carbón vítreo a T=25 °C.

Se observa una señal de reducción I_c y una señal de oxidación I_a para las cuales se propone el siguiente mecanismo:



El resumen de los resultados obtenidos para los compuestos que presentan este comportamiento se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de VC de los compuestos con bipy

*n = Número de electrones intercambiados

Compuesto	E_c vs Fc^+/Fc (mV)	E_a vs Fc^+/Fc (mV)	ΔE_p (mV)	n
<i>[Cu(bipy)(Indo)]NO₃</i>	-823	-4711	352	1
<i>[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	-790	-657	133	1
<i>[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃</i>	-895	-620	275	1

El proceso involucra el intercambio de un solo electrón; sin embargo, la separación entre el E_{pc} y E_{pa} es mucho mayor a 60 mV, por lo que se determinó que los compuestos presentan un comportamiento cuasi-reversible; es decir, la transferencia electrónica es lenta (v_2) y no se encuentra controlada por la difusión de las especies a la superficie del electrodo (v_1) (figura 53).

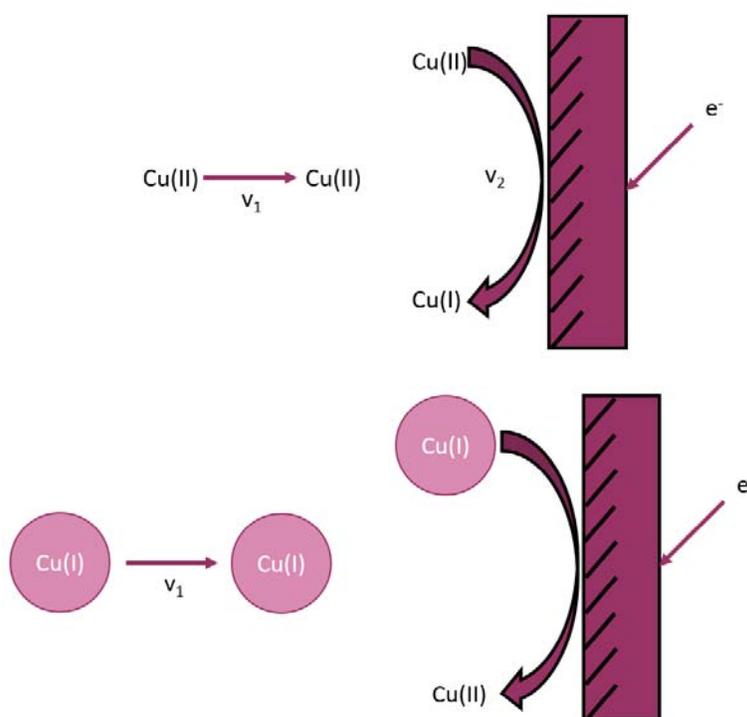


Figura 53. Reducción y oxidación de los compuestos con bipy sobre la superficie del electrodo. Imagen a partir de [110].

6.2.8.2 Voltamperometría cíclica de los compuestos [Cu(fen)(Indo)]NO₃, [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃, [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ y [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃

Se presenta el estudio a diferentes velocidades del proceso Cu(II)/Cu(I) para el compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ a manera de ejemplo (figura 54).

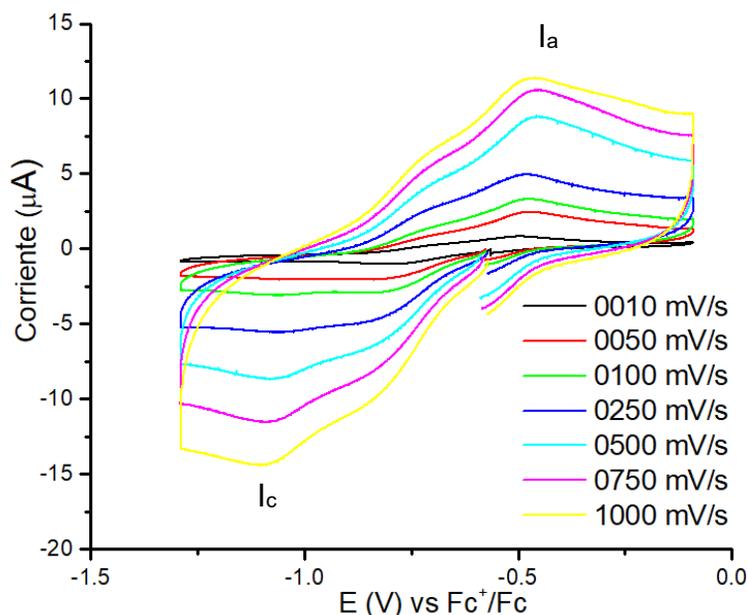


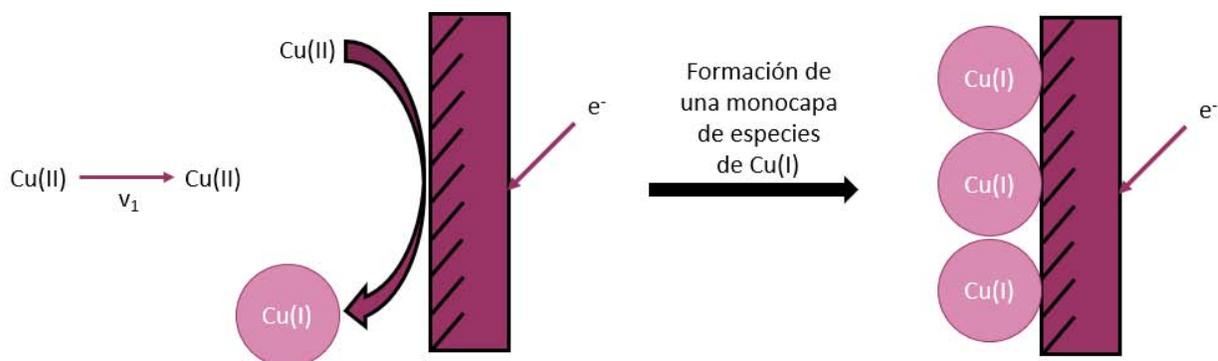
Figura 54. Voltamperograma del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ 1 mmol L⁻¹ en sentido catódico en una disolución 100 mmol L⁻¹ de TBAPF₆ en DMSO.

Electrodo de trabajo de carbón vítreo a T=25 °C.

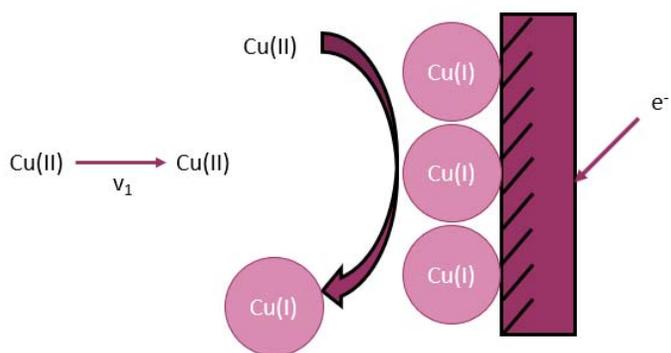
En estos compuestos es posible observar una señal de reducción I_c y una señal de oxidación I_a; sin embargo, ambas señales presentan procesos de adsorción del compuesto en la superficie del electrodo. Los procesos adsorptivos se presentan frecuentemente en compuestos con una gran cantidad de anillos aromáticos, en el caso de los compuestos estudiados se observa que los que poseen como ligante fen presentan procesos adsorptivos. La presencia de un tercer anillo aromático en la fen favorece la adsorción de los compuestos en la superficie del electrodo. La primera molécula que llega a la superficie del electrodo se reduce de Cu(II) a Cu(I), la especie con Cu(I) se adsorbe sobre la superficie del electrodo, formando una monocapa; por lo que la siguiente molécula de Cu(II) se reduce sobre

el electrodo modificado por especies de Cu(I). Al invertir el barrido, todas las especies de Cu(I) regresan a Cu(II) (figura 55). [112, 113]

Reducción



Reducción sobre la monocapa



Oxidación

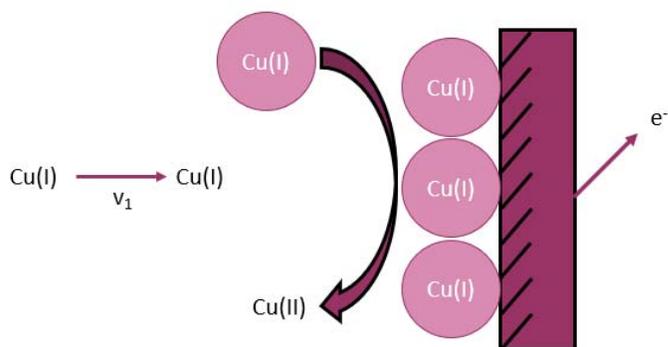
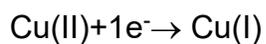
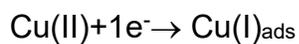
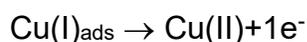


Figura 55. Reducción y oxidación de los compuestos con fen sobre la superficie del electrodo. Imagen a partir de [110].

El mecanismo que se propone es el siguiente:



pico I_c



La tabla 11 muestra el resumen de los valores obtenidos para cada compuesto:

Tabla 11. Resultados de VC de los compuestos con fen

*n = Número de electrones intercambiados

Compuesto	E_c vs Fc^+/Fc (mV)	E_a vs Fc^+/Fc (mV)	ΔE_p (mV)	n
<i>[Cu(fen)(Indo)]NO₃</i>	-815	-501	314	1
<i>[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	-1120	-547	573	1
<i>[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃</i>	-793	-464	329	1
<i>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃</i>	-863	-431	432	1

De igual manera, el proceso involucra el intercambio de un solo electrón con una separación entre el E_{pc} y E_{pa} mucho mayor a 60 mV, por lo que se determinó que presentan un comportamiento cuasi-reversible con transferencia electrónica lenta y no controlado por la difusión de las especies a la superficie del electrodo. Este comportamiento se atribuye al cambio de la geometría alrededor del centro metálico, el cual pasa de un compuesto de Cu(II) con geometría pirámide de base cuadrada a un compuesto de Cu(I) con geometría tetraédrica.

Los valores de E_{pc} y E_{pa} del centro metálico se verán influenciados por el carácter electrodonador o electroatractor de los ligantes, la naturaleza y posición de los sustituyentes, así como la flexibilidad de los ligantes para adoptar ambas geometrías.

Las diiminas fen y bipy se comportan como donadores σ y aceptores π , lo que permite la retrodonación del ión metálico hacia la diimina. La retrononación proporciona estabilidad al sistema al permitir que el Cu(II) lleve a cabo una mejor distribución de la densidad electrónica, facilitando la reducción de los compuestos y convirtiéndolos en buenos oxidantes, hecho que se refleja en el desplazamiento de E_{pc} y E_{pa} hacia valores positivos. El anillo aromático extra de la fen respecto a la bipy permite que la fen distribuya aún mejor la densidad electrónica, estabilizando el estado de oxidación reducido Cu(I) y por tanto, a excepción del compuesto

[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃, los compuestos con fen aparecen a potenciales más positivos que los compuestos con bipy.

A continuación se muestra el valor del E_{1/2} de los compuestos sintetizados respecto al ENH (tabla 12):

Tabla 12. Valores de E_{1/2} vs ENH

Compuesto	E _{1/2} vs ENH (mV)
[Cu(fen)(Indo)]NO ₃	-158
[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	-334
[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	-129
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO ₃	-147
[Cu(bipy)(Indo)]NO ₃	-149
[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	-224
[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	-258

La reducción de los compuestos por reductores endógenos como glutation (GSH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) se ve favorecida termodinámicamente, dando lugar al paso del centro metálico de Cu(II) a Cu(I). La nueva especie de Cu(I) puede llevar a cabo reacciones con el oxígeno molecular, el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido, como se muestra en la figura 56. [114]

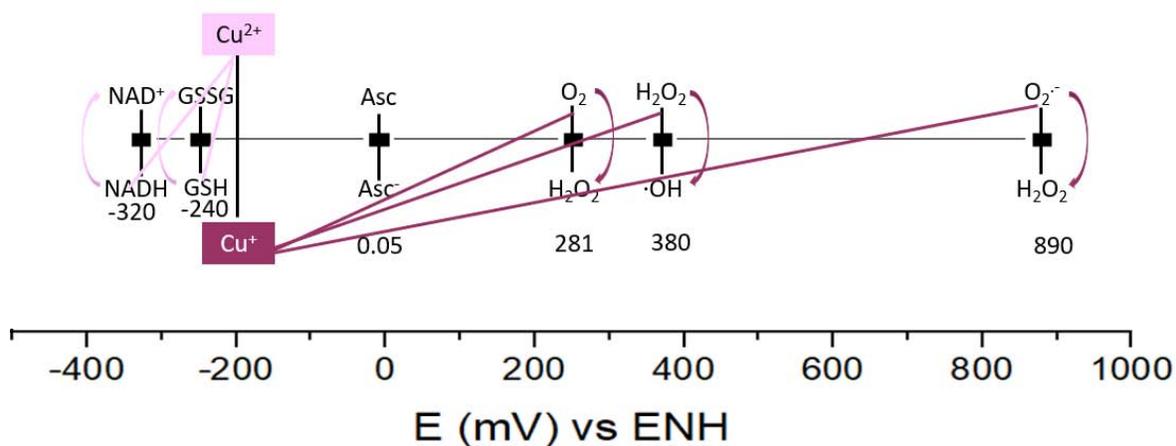
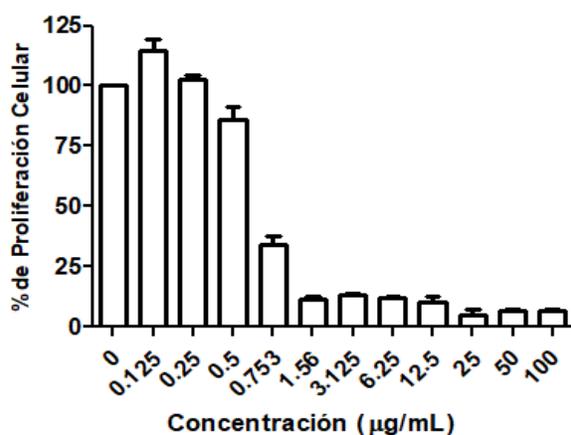


Figura 56. Agentes reductores y oxidantes con los que los compuestos sintetizados pueden reaccionar para generar ERO.

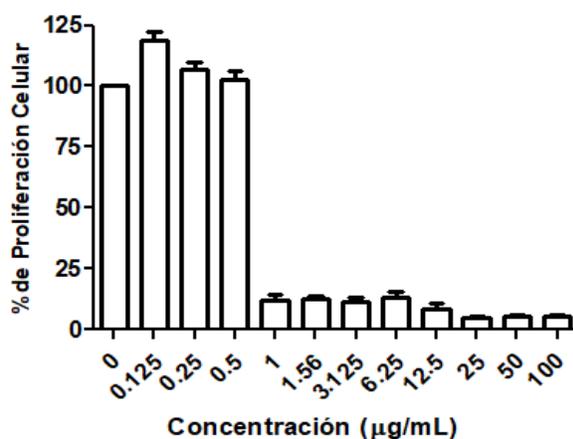
La capacidad de los compuestos sintetizados de generar ERO concuerda con el mecanismo de acción propuesto para las Casiopeínas por Kachadourian *et al.* (figura 13) [35], quienes indican que una vez reducido el compuesto de Cu(II) a Cu(I), éste es capaz de reaccionar con peróxido de hidrógeno para generar el radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo generan daño al ADN mitocondrial, desencadenando un desbalance en la cadena respiratoria mitocondrial e incrementando la producción de ERO.

6.3 Concentración inhibitoria media

La CI_{50} en la línea celular HeLa se tomó como indicador de la actividad antitumoral. Las gráficas de porcentaje de proliferación celular vs concentración para dos compuestos activos en HeLa se muestran a continuación (gráficas 3 y 4):



Gráfica 4. Proliferación celular vs concentración de compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



Gráfica 3. Proliferación celular vs concentración de compuesto [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

Se observa que hay una disminución en el porcentaje de la proliferación celular conforme se incrementa la concentración de los compuestos de coordinación y que a partir de 0.753 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la disminución de la proliferación celular es mayor al 50%. A partir de estas gráficas se obtuvo la concentración inhibitoria media. La tabla 13 muestra la concentración inhibitoria media en la línea celular HeLa para todos los compuestos de coordinación sintetizados.

Tabla 13. Concentración inhibitoria media en la línea celular HeLa

Compuesto	CI ₅₀ en HeLa (μ mol L ⁻¹)
[Cu(fen)(Indo)]NO ₃	2.3 ± 0.02
[Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	0.72 ± 0.10
[Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO ₃	0.67 ± 0.02
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO ₃	1.0 ± 0.03
[Cu(bipy)(Indo)]NO ₃	25.2 ± 1.07
[Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	7.87 ± 0.40
[Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO ₃	2.87 ± 1.02
<i>Cis-platino</i>	12.5 ± 0.70 [115]
Cu(NO ₃) ₂	> 100 [116]
[Cu(fen) ₂ (H ₂ O)](NO ₃) ₂	15.4 ± 1.8 [116]

Es posible observar que a excepción del compuesto [Cu(bipy)(Indo)]NO₃, todos los compuestos presentan una mayor actividad que el *cis*-platino y el [Cu(fen)₂(H₂O)](NO₃)₂. También se observa que los compuestos de coordinación que incorporan fen son más activos que aquellos con bipy. Además, para ambas familias la presencia de sustituyentes metilo en la diimina aumenta la actividad (disminuye la CI₅₀) respecto al compuesto análogo sin sustituyentes, aunque no se observó una correlación entre los valores de CI₅₀ y E_{1/2}.

Con base en los resultados observados en actividad biológica, los compuestos más activos ante la línea tumoral (menor CI₅₀) son [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃, [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ y [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃, por lo que se postularon como los mejores candidatos para llevar a cabo la encapsulación en el nanogel. Estudios previos *in vivo* han mostrado que compuestos análogos con fen dimetilada en las posiciones 4 y 7 presentan una menor toxicidad, por lo que se decidió continuar el trabajo del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃.

6.4 Estudios de interacción

La selección de los posibles monómeros y polímeros que podrían conformar el nanogel se llevó a cabo considerando las condiciones del microambiente tumoral (temperatura superior a los 37 °C y pH disminuido hasta 5.0):

- ❖ Acrilamida (Am), poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) y acrilonitrilo se propusieron por su sensibilidad a temperatura (figura 58 a), b) y c) respectivamente). [75]
- ❖ Quitosán (CS) se propuso por la sensibilidad a pH (figura 58 d). [117]

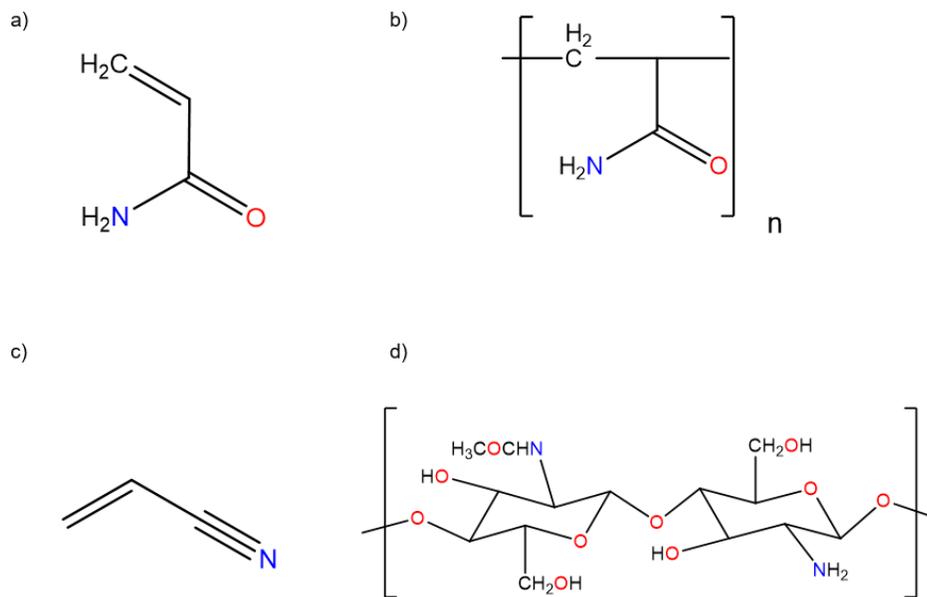


Figura 57. Estructura química de los monómeros y polímeros empleados
 a) Am b) PNIPAAm c) Acrylonitrilo d) CS

Los espectros obtenidos para la Am muestran un aumento en la absorbancia conforme se aumenta la concentración de Am (figura 59 y gráfica 5); es decir, presenta un efecto hipercrómico en todo el intervalo de concentraciones utilizadas. El incremento en la absorbancia puede deberse al incremento en la concentración de Am, que se suma a la señal del compuesto de coordinación o a la formación de una nueva especie Cas-Am con un coeficiente de absorptividad mayor que el del compuesto de coordinación. Dado que el coeficiente de absorptividad molar de la Am es mucho mayor que el del compuesto de coordinación, y que los valores de Δ Absorbancia varían muy poco entre sí (entre 0.080 y 0.100), se propone la formación de la especie Cas-Am, en donde todos los posibles sitios de interacción se encuentran saturados. El intervalo de concentraciones que se empleó fue muy pequeño debido a la interferencia con la absorbancia propia de la Am sobre la banda tomada como referencia.

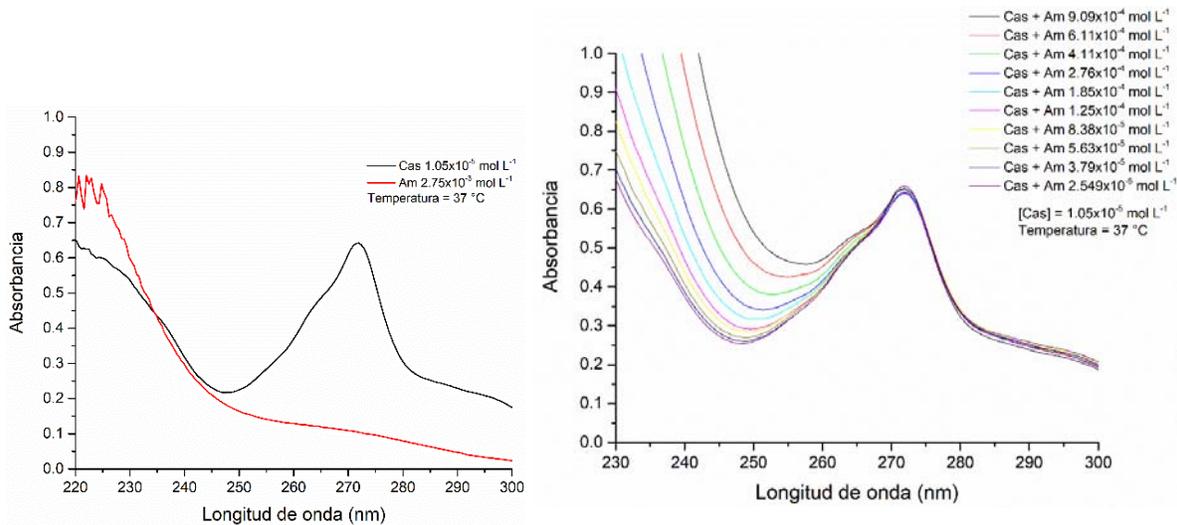
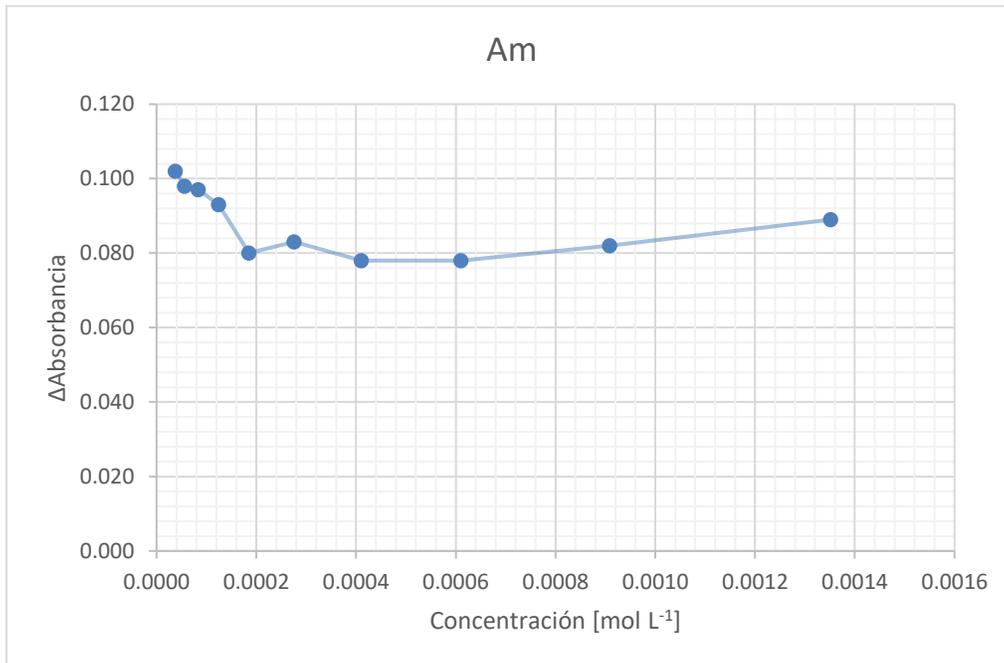


Figura 58. Espectros de absorción en el UV. Cas, Am y la interacción entre ambos.



Gráfica 5. ΔAbsorbancia vs concentración de Am.

El acrilonitrilo presenta un efecto hipocrómico; el cual se atribuye a la formación de una nueva especie con un coeficiente de absorptividad menor (figura 60 y gráfica 6). Es posible distinguir dos zonas, una entre 0 y $1.50 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ en la que hay un incremento del Δ Absorbancia con el incremento de la concentración de acrilonitrilo y una segunda zona a partir de $7.96 \times 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1}$ en la que, aunque también se observa un efecto hipocrómico, el Δ Absorbancia no se ve influenciado por el incremento en la concentración de acrilonitrilo. La segunda zona se asocia a la saturación de los posibles sitios de interacción entre la Cas y el acrilonitrilo.

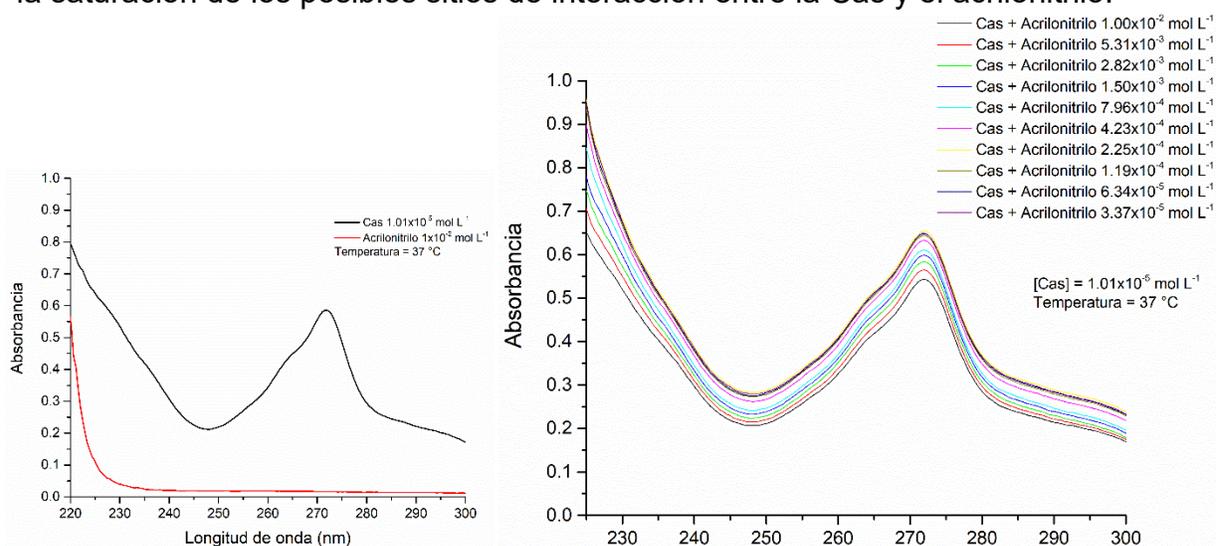
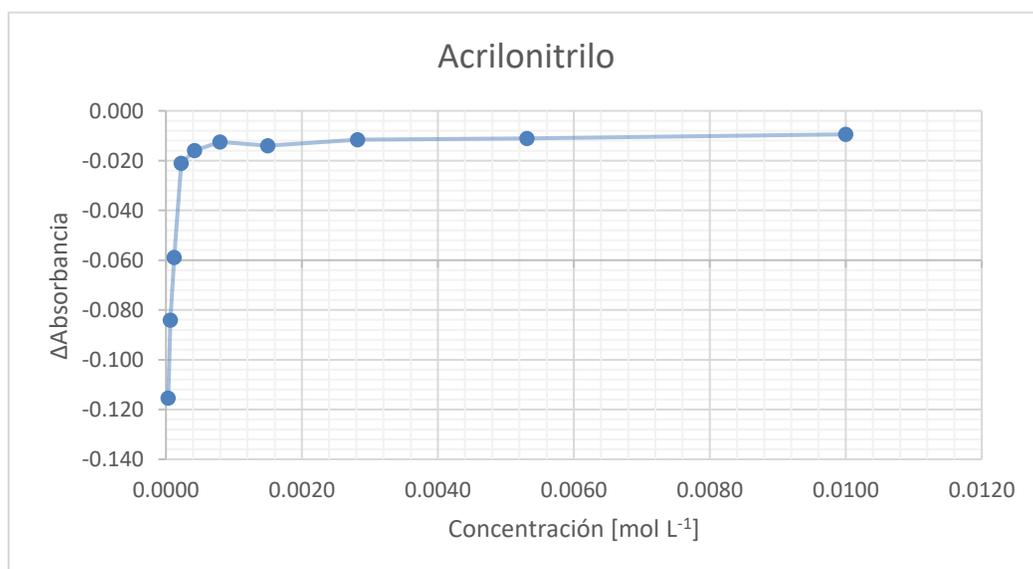


Figura 59. Espectros de absorción en el UV. Cas, acrilonitrilo y la interacción entre ambos.



Gráfica 6. Δ Absorbancia vs concentración de acrilonitrilo.

La PNIPAAm presenta un comportamiento similar al de la Am; es decir, un efecto hipercrómico en todo el intervalo de concentraciones utilizadas (figura 61 y gráfica 7). Nuevamente, el incremento en la absorbancia puede deberse al incremento en la concentración de PNIPAAm, cuya absorbancia se suma a la señal del compuesto de coordinación o a la formación de una nueva especie con un coeficiente de absorptividad mayor. El coeficiente de absorptividad molar de la PNIPAAm es mucho mayor que el del compuesto de coordinación y Δ Absorbancia varía muy poco (entre 0.077 y 0.099), se propone la formación de la especie Cas-PNIPAAm, en donde todos los posibles sitios de interacción se encuentran saturados. El intervalo de concentraciones es pequeño debido a que concentraciones mayores aumentarían la interferencia causada por la absorbancia propia de la PNIPAAm.

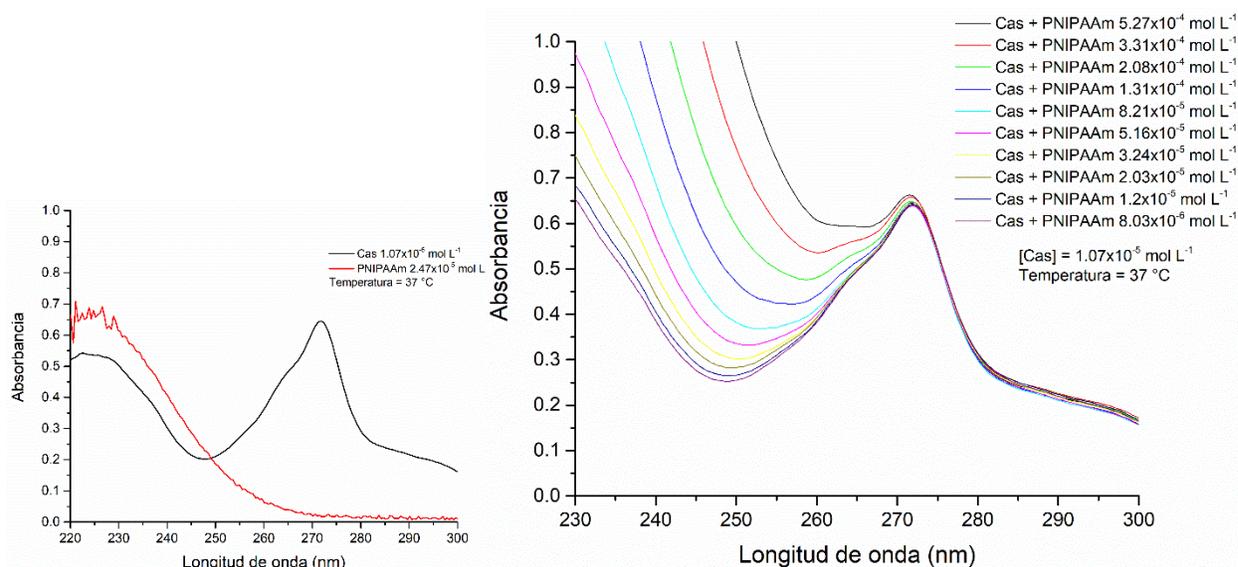
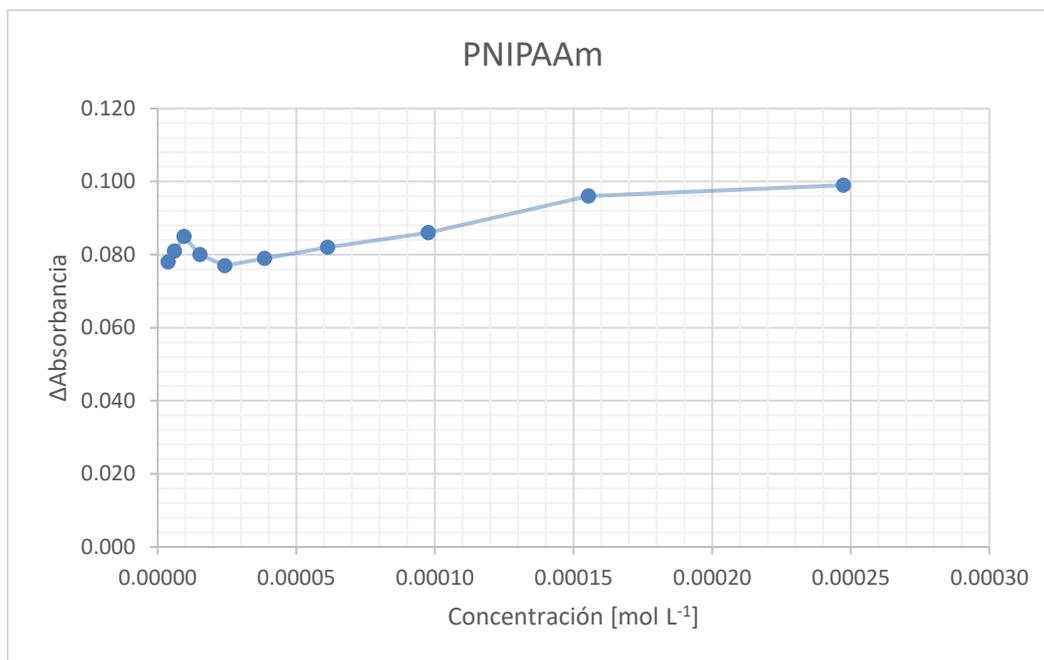


Figura 60. Espectros de absorción en el UV. Cas, PNIPAAm y la interacción entre ambos.



Gráfica 7. Δ Absorbancia vs concentración de PNIPAAm.

El CS mostró un efecto hipocrómico en todo el intervalo de concentraciones utilizadas, esto se atribuye a la formación de una nueva especie con un coeficiente de absorptividad molar menor (figura 62 y gráfica 8). En este caso se observa una mayor variación en el Δ Absorbancia respecto a la modificación en la concentración de CS.

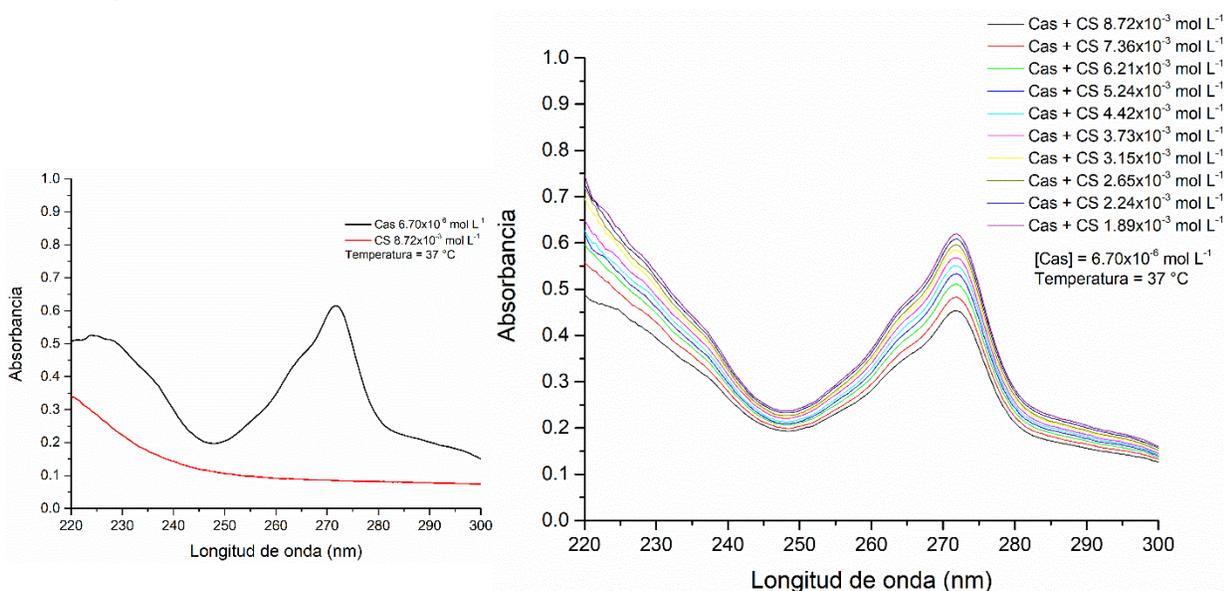
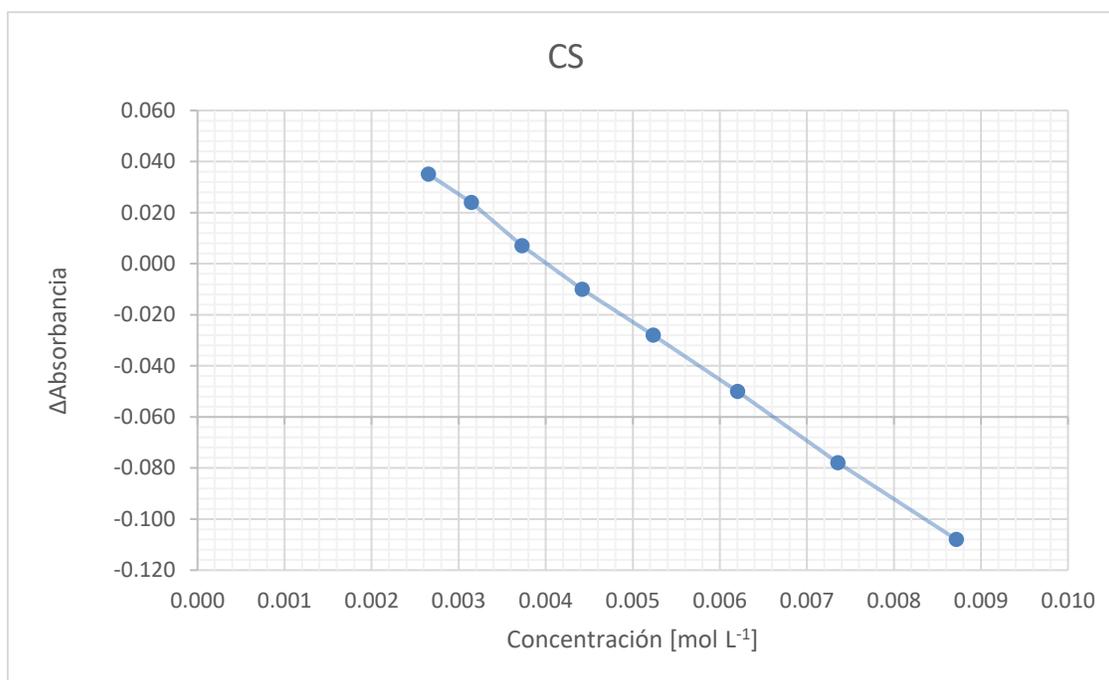


Figura 61. Espectros de absorción en el UV. Cas, CS y la interacción entre ambos.



Gráfica 8. Δ Absorbancia vs concentración de CS.

También se estudió la influencia de la temperatura en el comportamiento de la interacción del compuesto de coordinación con los monómeros o polímeros; observándose que la influencia de ésta sólo es ligeramente observable para la PNIPAAm.

Dado que el CS y la PNIPAAm mostraron una buena interacción con el compuesto de coordinación, y que además la interacción de ésta última se ve influenciada por la temperatura; ambos se seleccionaron como los polímeros constitutivos del nanogel y se procedió con la síntesis de este.

6.5 Síntesis del nanogel #1

La reacción se llevó a cabo con una proporción molar de CS y PNIPAAm 1:16. El gel se obtuvo en una dispersión turbia de color blanco.

6.6 Caracterización del nanogel #1

6.6.1 Tamaño de partícula

Se midió el tamaño de partícula en dispersiones en buffer a pH 5.0 y 7.4, la tabla 14 muestra los resultados obtenidos:

Tabla 14. Tamaño de partícula del nanogel obtenido en la síntesis 1

<i>pH</i>	Temperatura (°C)	Tamaño (nm)
7.4	25	643.44 ± 49.26
	37	378.00 ± 31.18
5.0	25	559.13 ± 48.38
	37	281.87 ± 23.27

Se observa que hay un cambio de tamaño considerable de acuerdo con la temperatura; sin embargo, la influencia del pH es mucho menor; esto se explica por la proporción de los polímeros. Al haber una mayor cantidad de PNIPAAm que de CS, el nanogel presenta el comportamiento LCST típico de sistemas de PNIPAAm, donde a temperaturas inferiores a la LCST hay un nanogel hinchado con interacciones polímero-disolvente que predominan sobre las interacciones polímero-polímero. El nanogel se encuentra en un estado hinchado a bajas temperaturas, comportamiento no deseado para el sistema, por lo que se determinó que, para observar una influencia mayor del pH, se debía modificar la proporción de los polímeros.

6.7 Síntesis del nanogel #2

La reacción se llevó a cabo con una proporción molar de CS y PNIPAAm 25:1. El gel se obtuvo en una dispersión transparente ligeramente turbia con un pH ácido (pH≈6).

6.8 Caracterización del nanogel #2

6.8.1 Tamaño de partícula

Nuevamente, se midió el tamaño de partícula en dispersiones en buffer a pH 5.0 y 7.4, la tabla 15 muestra los resultados obtenidos:

Tabla 15. Tamaño de partícula e índice de polidispersión del nanogel obtenido en la síntesis 2

<i>pH</i>	Temperatura (°C)	Tamaño (nm)	IPD
7.4	25	108.92 ± 12.85	0.573
	37	100.89 ± 8.33	0.540
5.0	25	690.27 ± 7.10	0.530
	37	654.13 ± 32.07	0.512

Se observa que hay un cambio de tamaño considerable de acuerdo con el pH de la dispersión; mientras que la influencia de la temperatura es mucho menor, tal y como se buscaba obtener. Lo anterior se debe a que a pH=5.0 se espera que los grupos amino de las cadenas principales o laterales del CS se encuentren protonadas, lo que genera repulsiones polímero-polímero que conllevan al hinchamiento del nanogel.

6.8.2 Espectroscopia infrarroja del nanogel

Se obtuvieron los espectros de IR de los reactivos PNIPAAm y CS, esto con la finalidad de observar los modos vibracionales asociados a cada uno de los polímeros. Posteriormente se obtuvo el espectro del nanogel sintetizado (figura 63).

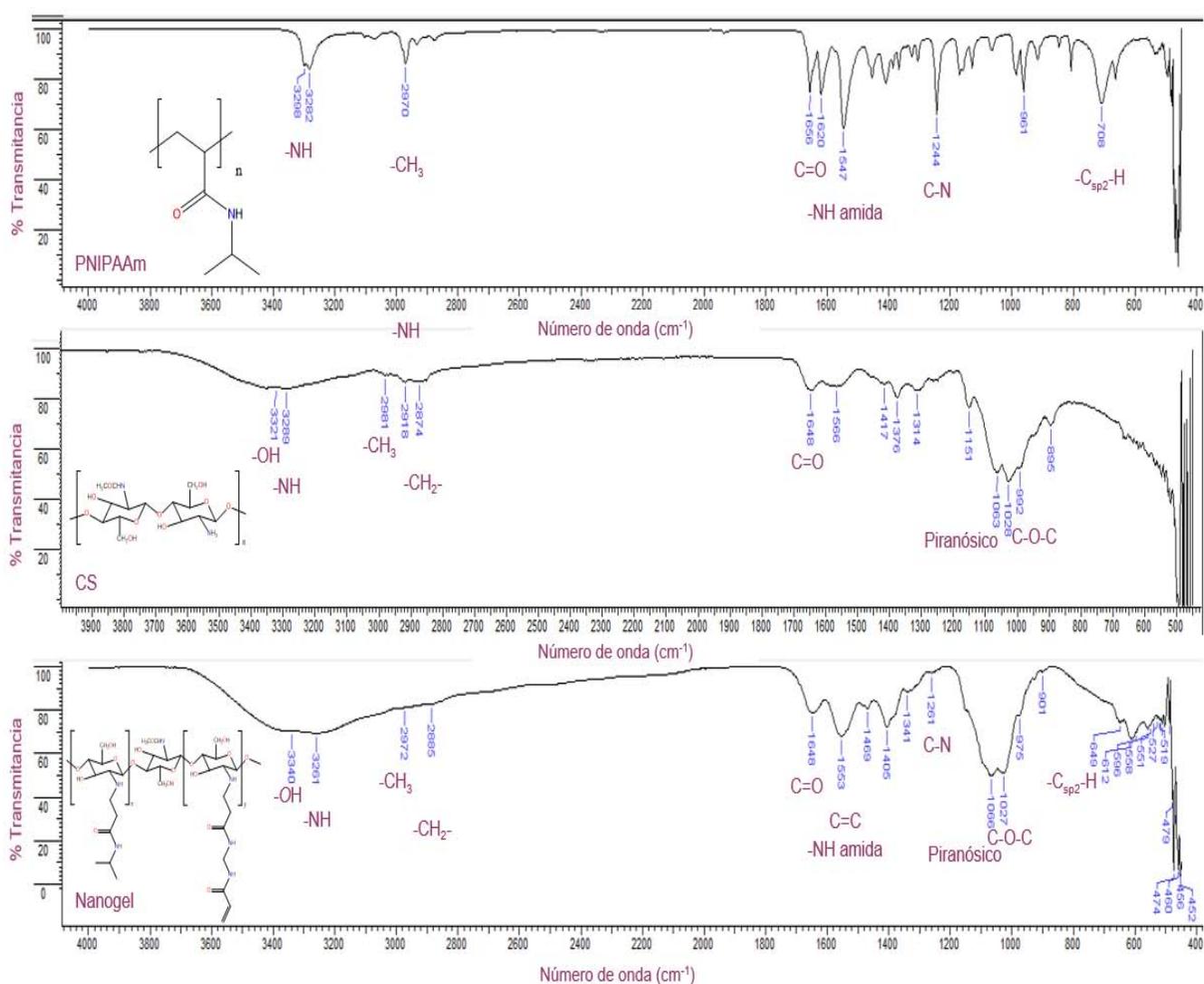


Figura 62. Espectro en el IR de la PNIPAAm, el CS y el nanogel sintetizado.

La PNIPAAm presenta una banda en aproximadamente 3290 cm^{-1} asociada al modo normal vibracional del enlace νNH de la amida secundaria, una banda de baja intensidad en 2970 cm^{-1} debida al modo normal vibracional del enlace νCH_3 , la banda en 1656 cm^{-1} correspondiente al modo normal vibracional del enlace $\nu\text{C}=\text{O}$ y una banda en 1547 cm^{-1} que se debe al modo normal vibracional del enlace νNH de la amida. También se observa una banda en 1244 cm^{-1} asociada al modo normal vibracional del enlace νNC y una banda en 708 cm^{-1} característica del modo normal vibracional $\delta\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$.

Por su parte el CS muestra una banda en 3321 cm^{-1} asociada al modo normal vibracional del enlace νOH , una banda en 3289 cm^{-1} debida a los modos normales vibracionales νNH de las aminas primarias y amidas secundarias presentes en la estructura, en 2961 y 2874 cm^{-1} se observan las bandas debidas a los modos normales vibracionales de los enlaces νCH_3 y νCH_2 respectivamente, en 1648 cm^{-1} la banda característica del modo normal vibracional del enlace $\nu\text{C}=\text{O}$, la banda en 1063 cm^{-1} debida a los modos normales vibracionales del anillo piranósico y en 1028 cm^{-1} la banda debida al modo normal vibracional del enlace νCOC .

Se determinó que el nanogel sintetizado se encontraba constituido por ambos polímeros debido a que éste presenta una combinación de los modos vibracionales de ambos polímeros. [93]

Las siguientes bandas pueden ser asociadas a ambos polímeros: la banda en 3261 cm^{-1} debida a los modos normales vibracionales νNH de las aminas primarias (CS) y amidas secundarias (CS y PNIPAAm), las dos bandas de baja intensidad en 2972 y 2885 cm^{-1} asociadas a los modos normales vibracionales de los enlaces νCH_3 y νCH_2 respectivamente y la banda en 1648 cm^{-1} característica del modo normal vibracional del enlace $\nu\text{C}=\text{O}$.

La presencia de la PNIPAAm se confirma por la banda en 1553 cm^{-1} , atribuida a los modos normales vibracionales del enlace νNH de la amida secundaria, la banda en 1261 cm^{-1} asociada al modo normal vibracional del enlace νNC y la banda en 649 cm^{-1} característica del modo normal vibracional $\delta\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$; mientras que el CS se confirma debido a las bandas en 1066 cm^{-1} típicas de los modos normales vibracionales del anillo piranósico y la banda en 1027 cm^{-1} asignada al modo normal vibracional del enlace νCOC .

Una vez confirmada la inclusión de ambos polímeros en el nanogel, se efectuó el resto de la caracterización.

6.8.3 Potencial zeta

El potencial zeta es una función de la superficie cargada de una partícula y la doble capa (capa de Stern y capa difusa) que existe alrededor, posee signo dependiente de la naturaleza aniónica o catiónica de los iones presentes en la superficie de cada partícula y es un buen parámetro para determinar la estabilidad eléctrica de los sistemas nanométricos (figura 63). Según el manual del Zetasizer, se considera que un valor <-25 mV o >25 mV indica la presencia de sistemas cargados y eléctricamente estables debido a las fuerzas de repulsión.

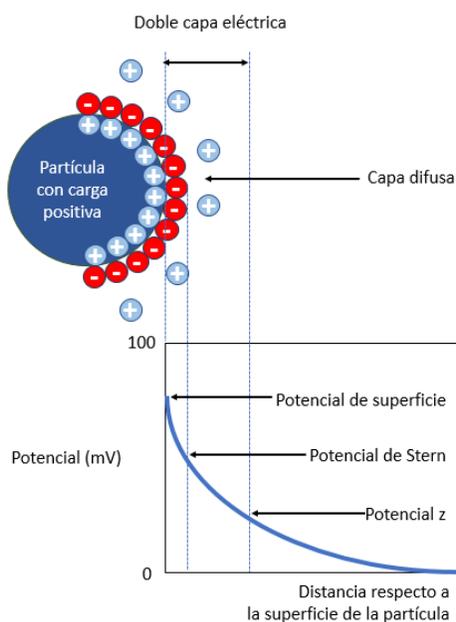


Figura 63. Modelo descriptivo de potencial z.

Los resultados de potencial z obtenidos se muestran en la tabla 16:

Tabla 16. Resultados de potencial zeta

<i>pH</i>	Temperatura (°C)	Potencial Z (mV)
7.4	25	-6.81 ± 0.45
	37	-5.81 ± 1.90
5.0	25	22.97 ± 0.55
	37	23.50 ± 0.35

Los valores de potencial z a $\text{pH}=7.4$ son pequeños y negativos, lo que concuerda con la estructura esperada del nanogel en estas condiciones, donde se espera que los grupos amina de las cadenas del CS se encuentren neutros. Por otro lado, a $\text{pH}=5.0$ la protonación de estos grupos amino genera una diferencia de potencial positivo. [118]

El nanogel a $\text{pH}=5.0$ presenta una estabilidad eléctrica mayor que a $\text{pH}=7.4$. Hay una ligera influencia de acuerdo con la temperatura de medición, la cual se debe a la presencia de la PNIPAAm.

6.8.4 Calorimetría diferencial de barrido

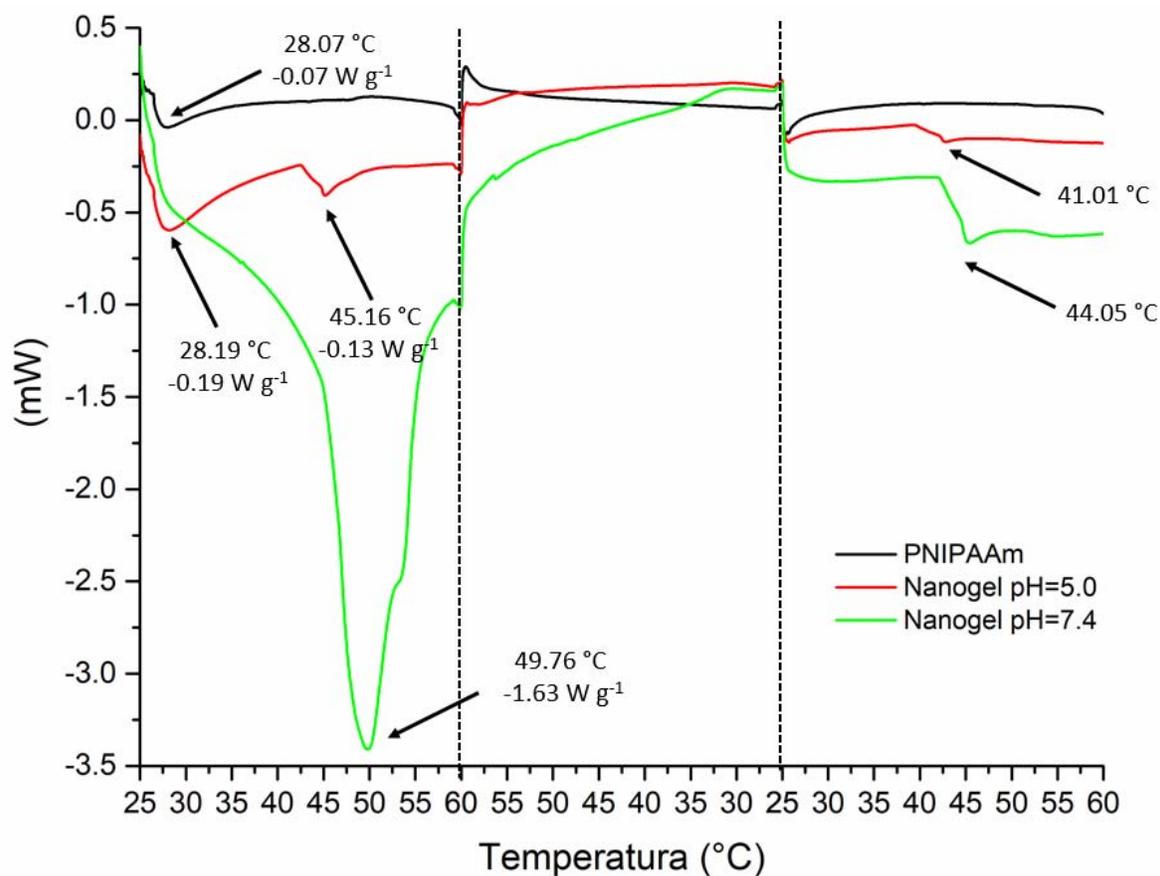
La calorimetría diferencial de barrido permite observar una serie de transiciones de fase en los materiales y la energía asociada a éstas. La literatura reporta que la PNIPAAm presenta una transición de fase a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que ésta se ve desplazada por la copolimerización con CS, por lo que se estudió el comportamiento térmico del nanogel obtenido a las diferentes condiciones de pH y se comparó con la PNIPAAm empleada como reactivo. El CS no presenta transiciones de fase en el intervalo de temperaturas empleadas, por lo que no se estudió su comportamiento térmico.

En el gráfico obtenido para PNIPAAm reactivo se observa un proceso de tipo endotérmico en $28.07\text{ }^{\circ}\text{C}$, el cuál únicamente se presenta en el primer ciclo y es muy cercano al valor reportado en la literatura (grafica 9).

El nanogel a $\text{pH}=5.0$ presenta dos procesos de tipo endotérmico en 28.19 y $45.16\text{ }^{\circ}\text{C}$, el primero se asocia a la presencia de PNIPAAm que no se encuentra interaccionando con el CS y el segundo a PNIPAAm interaccionando con el CS; se observa que éste último también se presenta durante el segundo ciclo, pero ligeramente desplazado a menor temperatura ($41.01\text{ }^{\circ}\text{C}$). El nanogel a $\text{pH}=7.4$ presenta un sólo proceso de tipo endotérmico en $49.76\text{ }^{\circ}\text{C}$, el cual nuevamente se debe a PNIPAAm interaccionando con el CS y se presenta en el segundo ciclo a menor temperatura ($44.05\text{ }^{\circ}\text{C}$) (grafica 9).

La energía involucrada en la transición de fase a $\text{pH}=7.4$ (-1.20 Wg^{-1}) es mucho mayor que para la transición a $\text{pH}=5.0$ (-0.13 Wg^{-1}), lo cual indica que a $\text{pH}=7.4$ la interacción entre PNIPAAm y CS es mayor. Este comportamiento se debe a que en medio ácido el nanogel se encuentra cargado, por lo que las cadenas

poliméricas se encuentran alejadas, dando lugar a interacciones débiles; mientras que a pH=7.4 el nanogel no está cargado y se encuentra colapsado, lo que conlleva



Gráfica 9. Gráfico de DSC de la PNIPAAm, el nanogel a pH=5.0 y el nanogel a pH=7.4.

que las cadenas poliméricas interactúen fuertemente. [57, 76]

6.8.5 Microscopia electrónica de barrido

Las microscopias obtenidas para el nanogel liofilizado, una dispersión del nanogel a pH=5.0 y una dispersión del nanogel a pH=7.4 se muestran a continuación:

La micrografía del nanogel liofilizado muestra hebras de polímero que dan lugar a la formación de algunos pliegues u hojas en toda la superficie del material (figura 64).

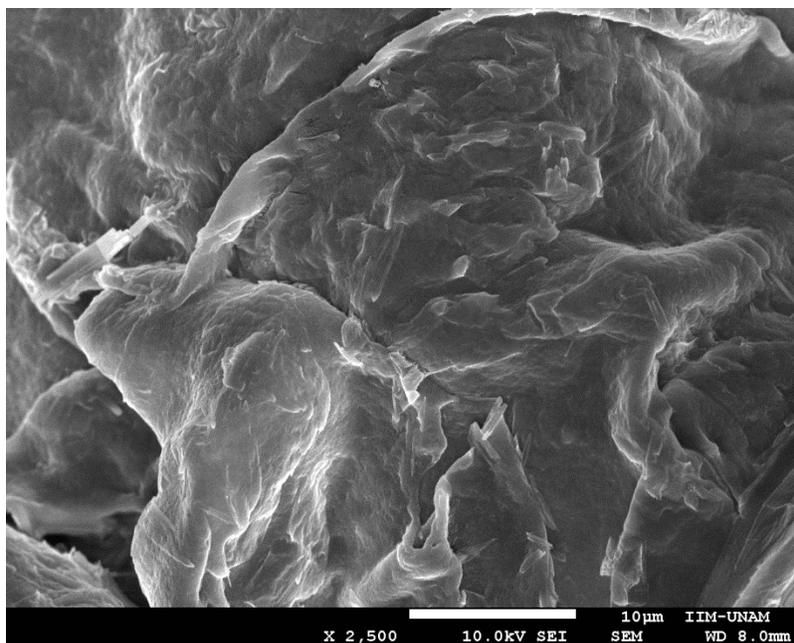


Figura 64. Micrografía del nanogel liofilizado.

La micrografía de la dispersión del nanogel a pH= 5.0 muestra estructuras rómbicas con bordes rectos muy bien definidos, aparentemente huecos de tamaños variados de entre 3 y 5 µm (figura 65).

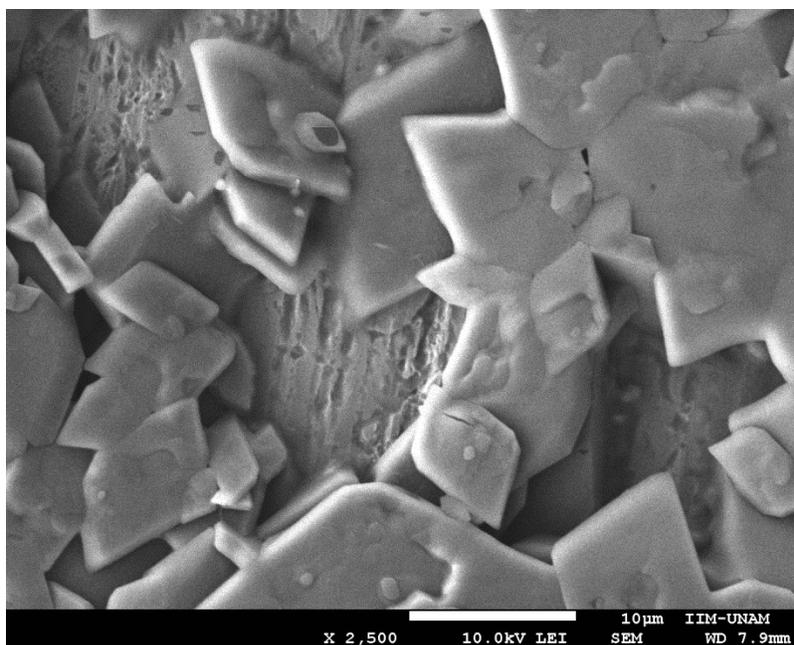


Figura 65. Micrografía del nanogel en dispersión a pH=5.0.

La micrografía de la dispersión del nanogel a pH=7.4 muestra la formación de láminas fusionadas muy delgadas; el acercamiento permite observar que éstas estructuras poseen un espesor de 0.11 μm y se encuentran separadas unas de otras por aproximadamente 0.8 μm (figura 66).

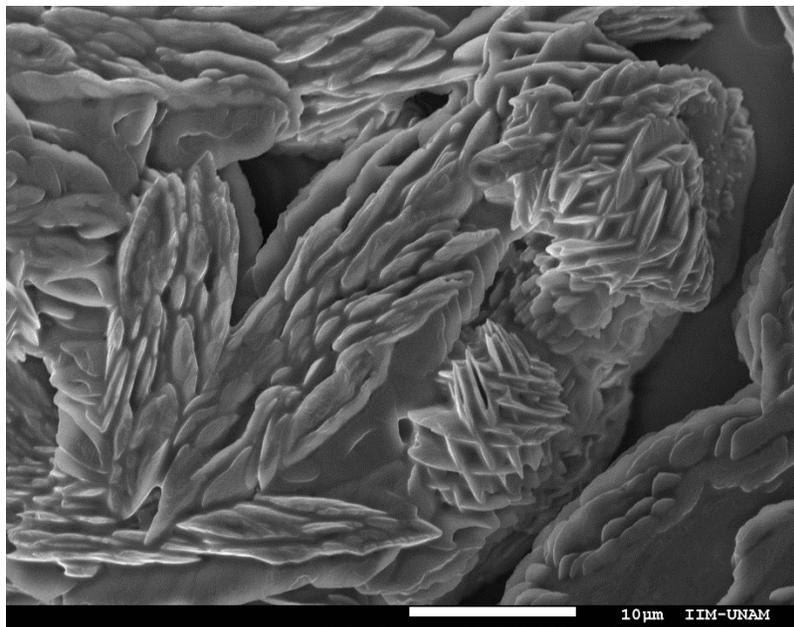


Figura 66. Micrografía del nanogel en dispersión a pH=7.4.

Para todos los casos es notable que los tamaños observados en microscopía son muy diferentes a los obtenidos por dispersión dinámica de luz; sin embargo, esto puede atribuirse a que se llevaron a cabo después del proceso de liofilizado, lo que pudo haber modificado considerablemente la morfología. Por otro lado, en muestras no rígidas como lo son los hidrogeles hay una gran influencia del método de preparación de la muestra para microscopía en la morfología observada, por lo que es posible que al llevar a cabo el secado de la muestra se haya modificado la estructura original. Diferentes estudios han sugerido la formación de emulsiones para estabilizar las estructuras sensibles de los nanogeles. [92, 119]

6.9 Curvas de calibración

Considerando la ecuación de la línea recta a pH=5.0, se obtuvo un intercepto $b = 0.0320401$ y una pendiente $m = 49508.9$ con un coeficiente de correlación 0.998845. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia} = 0.0320401 + 49508.9 * \text{Concentración (mol L}^{-1}\text{)}$$

Por otro lado, a pH=7.4 se obtuvo un intercepto $b = 0.0825014$ y una pendiente $m = 34440.9$ con un coeficiente de correlación 0.99871. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia} = 0.0825014 + 34440.9 * \text{Concentración (mol L}^{-1}\text{)}$$

6.10 Encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

La encapsulación se realizó en las condiciones a las que el nanogel se encuentra hinchado; es decir, baja temperatura (20°C) y pH ácido (5.0). Reportes en la literatura informan que bajo estas condiciones puede haber una mayor absorción de fármaco. Posteriormente se cerró con un incremento de pH a 7.4.

6.11 Separación del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en cada uno de los métodos:

a) Centrifugación # 1

Los espectros de absorción en el UV mostraban un cambio en la línea base, por lo que se determinó que no había una separación efectiva con este método. Una probable explicación a esto es que dado que los nanogeles son muy pequeños y tienen una masa pequeña, la fuerza centrífuga empleada (2598 rcf) no fue suficiente para sedimentarlos. Se decidió incrementar la fuerza.

b) Centrifugación #2

Los espectros de absorción en el UV obtenidos después del incremento en la fuerza centrífuga (19 098 rcf) nuevamente mostraban un cambio en la línea base, por lo que la centrifugación continuaba siendo un método de separación ineficiente.

c) Filtración #1

Los espectros de absorción en el UV no mostraban un cambio en la línea base ni modificaciones en la forma del espectro, por lo que había una separación efectiva con este método; sin embargo, no era posible recuperar el nanogel cargado con el compuesto para posteriormente llevar a cabo los experimentos de liberación.

d) Membrana de diálisis

Los espectros de absorción en el UV muestran un incremento en la concentración externa con respecto al tiempo. Se observa que a los 120 minutos la concentración exterior de compuesto es de 8.79×10^{-6} mol L⁻¹ y a los 240 la concentración es 8.88×10^{-6} mol L⁻¹; es decir, hay un incremento únicamente del

1.01%. Con base en la concentración inicial de compuesto colocada en el interior de la bolsa de diálisis y la dilución ($9.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), el 93.51 % atraviesa membrana a los 120 minutos (figura 67).

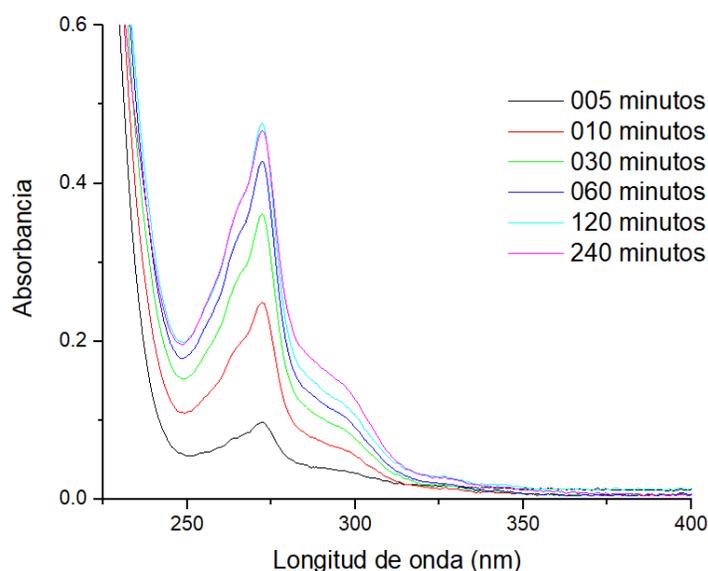


Figura 67. Espectros electrónicos de absorción en el ultravioleta (225-400 nm) en buffer HOAc/NaOAc a pH=5.0 y T=25 °C.

Una vez corroborado que la cantidad de compuesto que se adhería a la membrana no era muy grande, se procedió a llevar a cabo la separación del compuesto cargado en el nanogel y del compuesto libre. La bolsa de diálisis no resultó ser un buen método debido a que el nanogel se adhería a la membrana de diálisis, impidiendo el paso del compuesto libre e imposibilitando la cuantificación certera de éste.

e) Filtración #2

Los espectros de absorción en el UV no mostraban un cambio en la línea base, por lo que había una separación efectiva, aunado a esto, el sistema nanogel cargado con fármaco no permanecía adherido a la superficie del filtro una vez que se colocaba en disolución; por lo que se montó el siguiente sistema (figura 68):

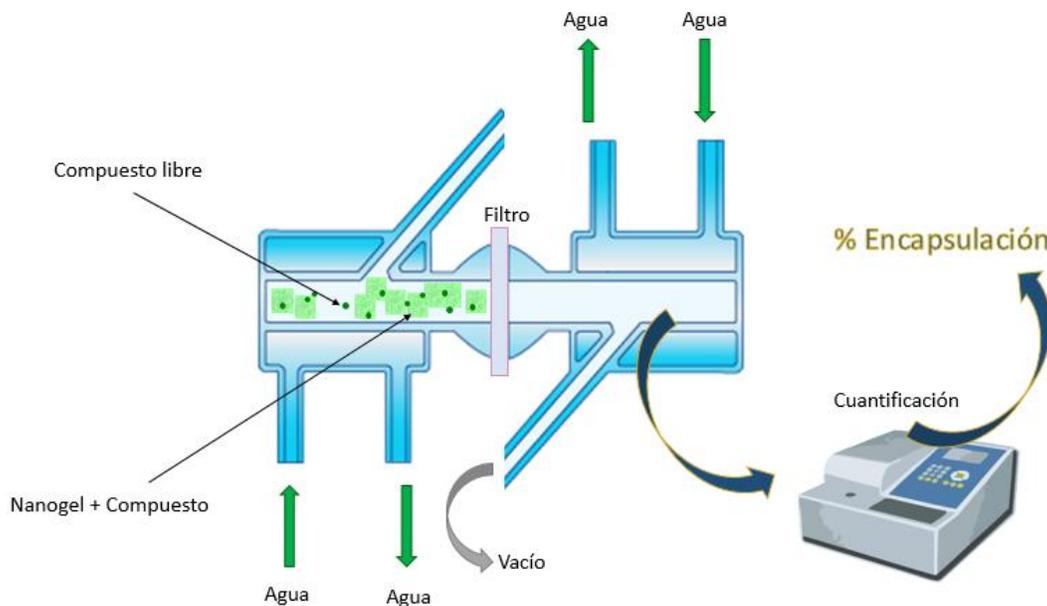


Figura 68. Esquema del sistema de separación.

Del lado izquierdo se agrega la dispersión en la que se llevó a cabo la encapsulación, se aplica vacío para promover el paso únicamente del compuesto libre a través del filtro hacia la celda derecha. Una vez separados, se procede a cuantificar la cantidad de compuesto libre y a partir de éste dato se calcula el % de encapsulación.

En cada uno de los 6 sistemas que se montaron (tres para pH=5.0 y tres para pH= 7.4) se logró encapsular en promedio 0.9899 ± 0.201 mg de compuesto por cada 20 mg de nanogel. Con base en la cantidad inicial de compuesto agregado se obtuvo un porcentaje de encapsulación del 69.47 ± 1.41 %. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 17:

Tabla 17. Resumen de resultados de encapsulación

Sistema	mg de nanogel	C de compuesto Inicial (mg/mL)	C de compuesto libre(mg/mL)	% E	mg compuesto/ mg de nanogel
A	20.2	1.425	0.4437	68.87	0.0486
B	19.9	1.425	0.4537	68.16	0.0488
C	19.9	1.425	0.4143	70.92	0.0508
B	20.0	1.425	0.4150	70.87	0.0505
E	19.8	1.425	0.4601	67.71	0.0487
F	19.8	1.425	0.4236	70.27	0.0503

6.12 Liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

Una vez llevada a cabo la separación del compuesto libre, se procedió a dispersar el nanogel cargado con compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃, agregando el buffer requerido en la celda izquierda, como se muestra en la figura 69 y se tomaron muestras a los tiempos correspondientes.

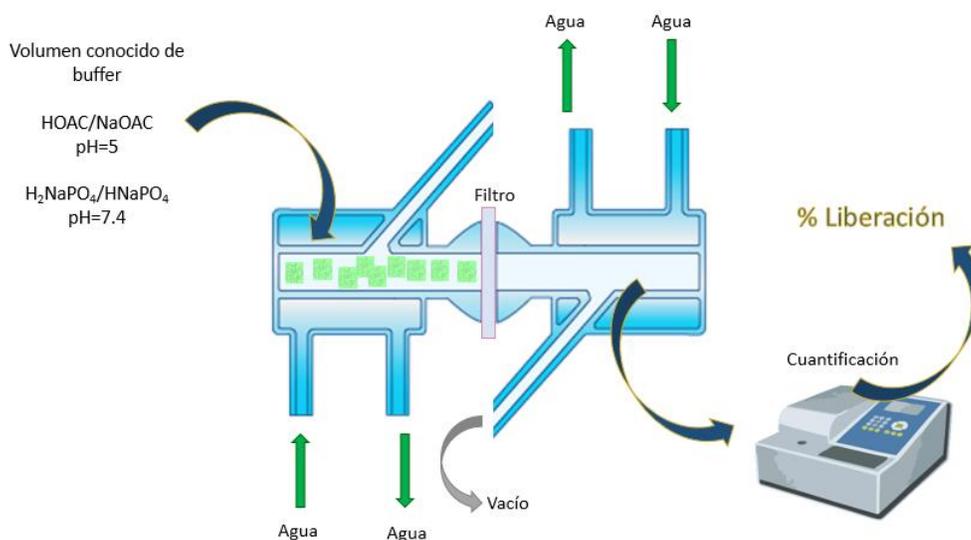
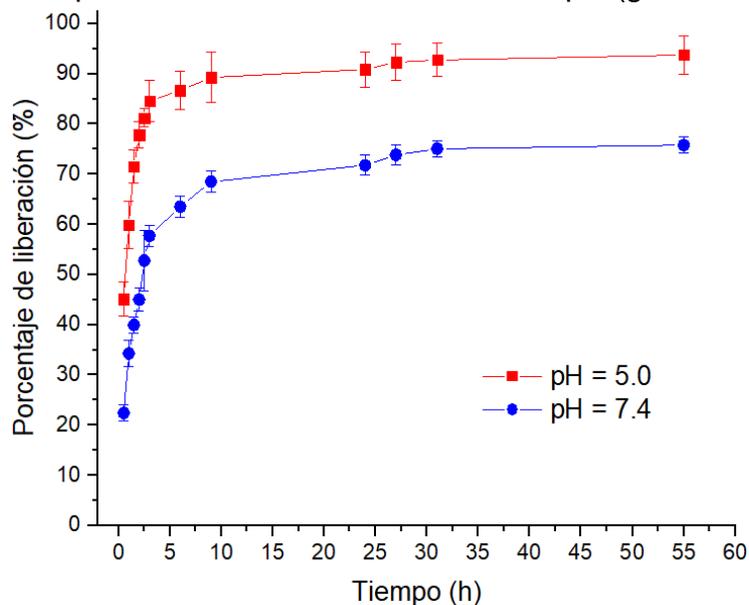


Figura 69. Esquema del sistema de liberación.

A continuación se muestra la gráfica de porcentaje de compuesto liberado con respecto al tiempo a las diferentes condiciones de pH (gráfica 10).



Gráfica 10. Porcentaje de compuesto liberado (%) vs tiempo (h).

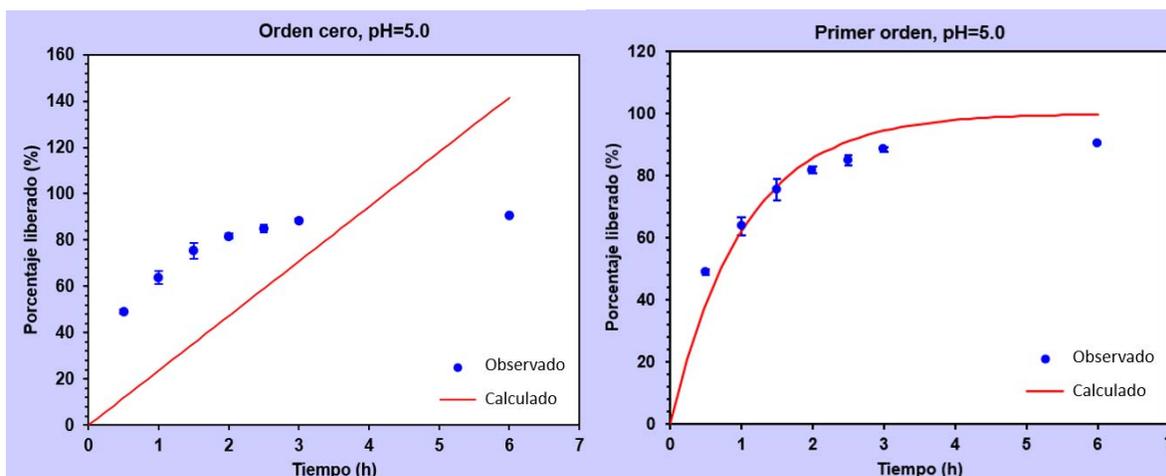
Se observa que la liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ se ve fuertemente influenciada por las condiciones de pH; llevándose a cabo a una mayor velocidad en pH=5, similar al que se encuentra en el microambiente tumoral. Lo anterior se explica debido a que a pH=5.0 los grupos amina del CS se protonan, generando repulsiones entre las cadenas poliméricas, lo que conlleva al hinchamiento del nanogel y a la liberación del fármaco con una mayor velocidad.

En ambos casos se presenta una liberación rápida durante las primeras 6 horas (efecto burst). La posible causa del efecto burst en este sistema es que el compuesto que se encuentra interaccionando con la superficie del nanogel se desprende rápidamente, mientras que el que se encuentra embebido entre las cadenas poliméricas, tarda un mayor tiempo en ser liberado. Con el paso del tiempo la liberación se vuelve lenta en ambos casos.

Posteriormente se llevó a cabo el ajuste de las cinéticas de liberación con diferentes modelos: orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Peppas-Sahlin a las dos condiciones de pH. [120]

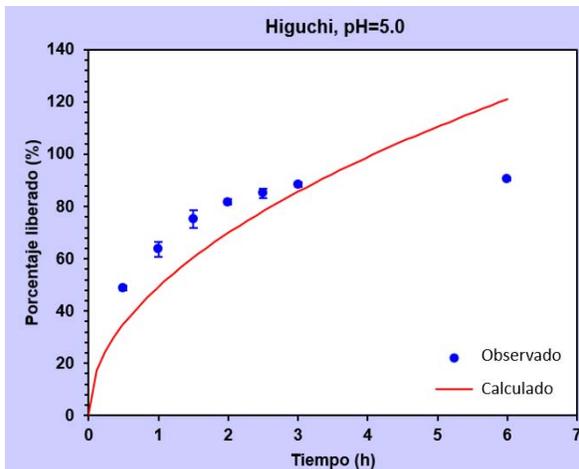
a) Cinética de liberación a pH=5.0

A continuación, se muestran las gráficas obtenidas para cada uno de los modelos simulados (gráficas 11-15).

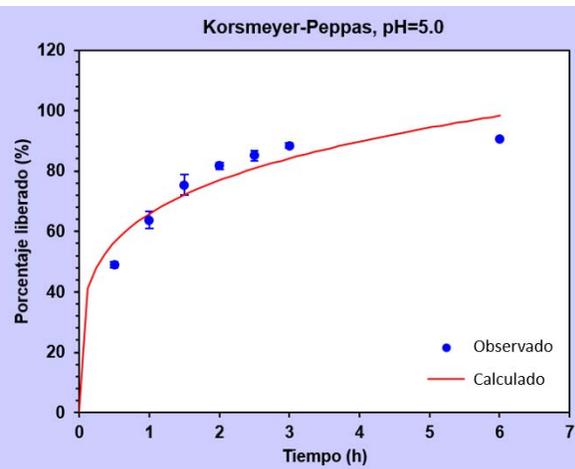


Gráfica 11. Ajuste de liberación.
Orden cero, pH=5.0.

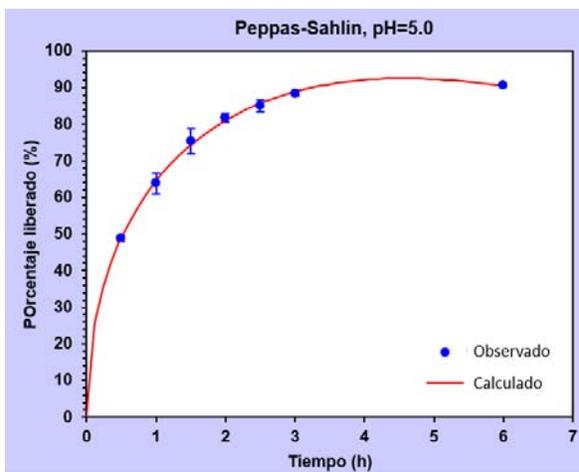
Gráfica 12. Ajuste de liberación.
Primer orden, pH=5.0.



Gráfica 14. Ajuste de liberación.
Higuchi, pH=5.0.



Gráfica 13. Ajuste de liberación.
Korsmeier-Peppas, pH=5.0



Gráfica 15. Ajuste de liberación.
Peppas-Sahlin, pH=5.0.

La tabla 18 muestra los parámetros estadísticos asociados a cada uno de los modelos simulados a pH=5.0.

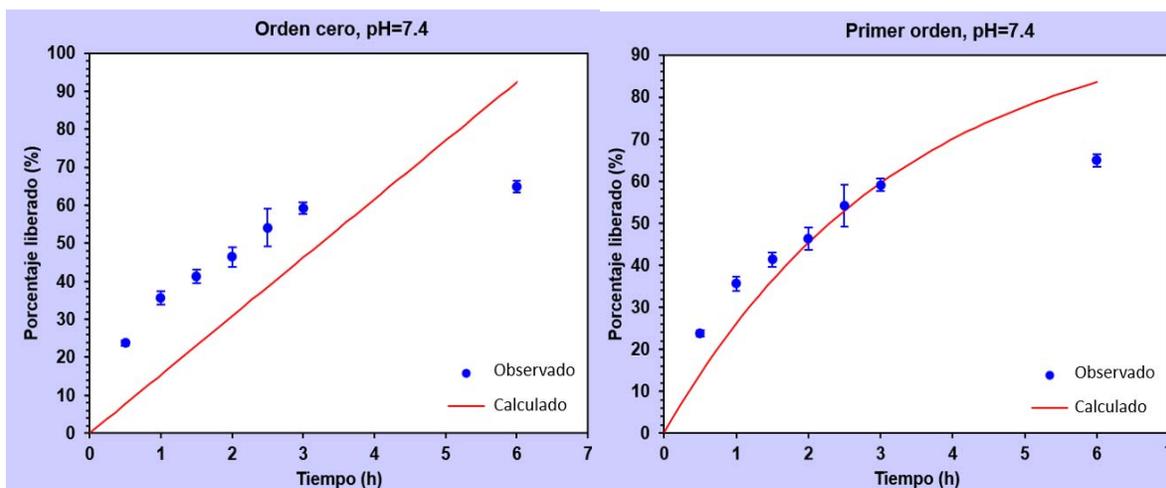
Tabla 18. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar la cinética de liberación a diferentes modelos a pH=5.0

Modelo	Parámetros	RSQR	MSC	SS	AIC
Orden cero	k_0	-5.8255	-2.2062	9399.3439	66.0360
Primer orden	k_1	0.7793	1.2266	303.9544	42.0066
Higuchi	k_1	-0.2823	-0.5331	1766.3925	54.3246
Korsmeier-Peppas	k_1, n	0.8511	1.3486	205.4604	41.1528
Peppas-Sahlin	k_1, k_2	0.9877	4.2028	17.2097	21.1737

Se observa que, a pH=5.0 el modelo Peppas-Sahlin es el que presenta el mejor ajuste al obtener el mayor coeficiente de correlación (RSQR) con un valor de 0.9877, la mayor suma de cuadrados (MSC) con un valor de 4.2028, la menor desviación estándar (SS) con un valor de 17.2097 y el menor criterio de Akaike (AIC) con un valor de 21.1737.

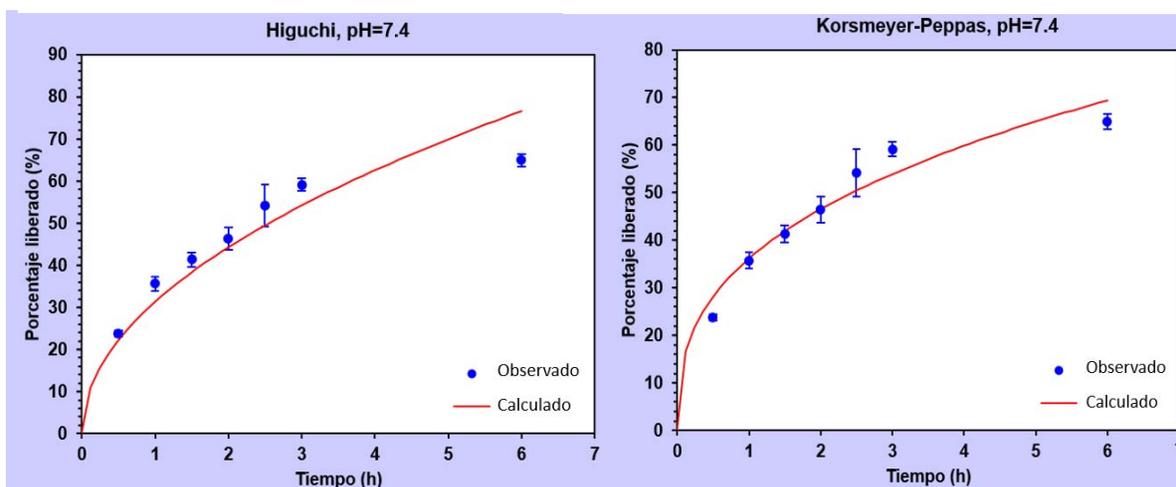
b) Cinética de liberación a pH=7.4

A continuación, se muestran las gráficas obtenidas para cada uno de los modelos (gráficas 16-20).



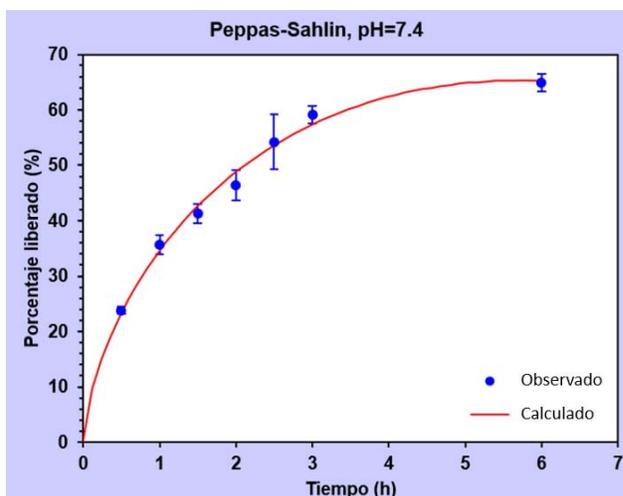
Gráfica 19. Ajuste de liberación.
Orden cero, pH=7.4.

Gráfica 17. Ajuste de liberación.
Primer orden, pH=7.4.



Gráfica 18. Ajuste de liberación.
Higuchi, pH=7.4.

Gráfica 16. Ajuste de liberación.
Korsmeyer-Peppas, pH=7.4.



Gráfica 20. Ajuste de liberación.

Peppas-Sahlin, pH=7.4.

La tabla 19 muestra los parámetros estadísticos asociados a cada uno de los modelos simulados.

Tabla 19. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar la cinética de liberación a diferentes modelos a pH=7.4

Modelo	Parámetros	RSQR	MSC	SS	AIC
Orden cero	k ₀	-0.9731	-0.9642	2431.0070	56.5426
Primer orden	k ₁	0.5315	0.4737	574.8930	46.4773
Higuchi	k ₁	0.8119	1.3932	232.7521	40.0409
Korsmeyer-Peppas	k ₁ , n	0.9257	2.0515	92.1557	35.4327
Peppas-Sahlin	k ₁ , k ₂	0.9807	3.3030	23.6731	26.6724

Nuevamente, se observa que el modelo de Peppas-Sahlin es el que presenta el mejor ajuste al obtener el mayor coeficiente de correlación (RSQR) con un valor de 0.9807, una de las dos mayores sumas de cuadrados (MSC) con 3.3030, la menor desviación estándar con un valor de 23.6731 y uno de los dos menores criterios de Akaike (AIC) con un valor de 26.6724.

El modelo de Peppas-Sahlin [121] permite una aproximación dada por la contribución de dos mecanismos, uno de difusión y otro de relajación, considerando que ambos procesos son aditivos. La cinética de liberación puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$$

Donde M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado, k_1 y k_2 son constantes cinéticas con unidades t^{-m} y m es el coeficiente de difusión de Fick y se encuentra relacionado con la forma geométrica del sistema. El primer término describe la difusión de tipo Fick, la cual es la difusión pasiva debida al gradiente de concentraciones que hay entre el nanogel y el medio; el segundo término es la contribución de la relajación de las cadenas poliméricas (Caso-II). La tabla 20 muestra las constantes cinéticas obtenidas para cada pH. [120, 122]

Tabla 20. Parámetros del modelo de Peppas-Sahlin para la cinética de liberación

	k_1	k_2	m
pH=5.0	82.402 ± 0.942	-18.350 ± 0.382	0.522 ± 0.010
pH=7.4	40.907 ± 1.815	-6.397 ± 0.408	0.665 ± 0.024

En ambas condiciones se observa que el valor de $k_1 \gg k_2$, indicando que la difusión de Fick es el mecanismo que predomina la liberación del fármaco y que el valor de k_2 es negativo, lo que sugiere que liberación del compuesto debida a la relajación de las cadenas poliméricas es prácticamente inexistente. El valor de m indica una geometría de tipo esférica. [122]

Dado que, en ambas condiciones, el segundo mejor ajuste se obtuvo para el modelo de Korsmeyer-Peppas, a continuación, se muestra la tabla con las constantes obtenidas con dicho modelo (tabla 21):

Tabla 21. Parámetros del modelo Korsmeyer-Peppas para la cinética de liberación

	k_1	n
pH=5.0	65.849 ± 0.652	0.223 ± 0.005
pH=7.4	36.120 ± 1.642	0.365 ± 0.008

El modelo de Korsmeyer-Peppas permite una aproximación dada por la contribución de más de un mecanismo y es frecuentemente utilizado en formas de administración poliméricas. La cinética de liberación puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n$$

Nuevamente, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado, k_1 es la constante cinética y n es el coeficiente que indica el mecanismo de liberación. Valores de n menor a 0.5 indican difusión de Fick como mecanismo de liberación.

Los resultados obtenidos en la simulación de los modelos concuerdan con los reportes encontrados en la literatura para este tipo de sistemas, ya que diversos autores mencionan que los hidrogeles generalmente ajustan bien a estos modelos y que, además, la difusión de Fick es el mecanismo de liberación predominante para compuestos que son solubles en agua. [123]

7. Resumen de resultados

La incorporación de indometacina en compuestos de coordinación de cobre con diiminas aromáticas 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina permite la obtención de compuestos con estructura general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{Indo})]\text{NO}_3$.

El uso de diversas técnicas permitió la caracterización de los compuestos, observándose que todos presentan un centro metálico de cobre en estado de oxidación 2^+ con una geometría pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada C_{4v} .

Los compuestos sintetizados se obtuvieron con buena pureza de acuerdo con el análisis elemental obtenido, el cual coincide con el calculado con un porcentaje de error menor al 5 %.

El átomo de $\text{Cu}(\text{II})$ presenta una esfera de coordinación en el plano xy de tipo CuN_2O_2 , por lo que se encuentra unido covalentemente a dos átomos de nitrógeno donados por la unión bidentada del ligante diimina aromático y a dos átomos de oxígeno donados por la unión bidentada de la indometacina.

La posición axial a lo largo del eje z se encuentra ocupada por moléculas de disolvente. Esta disminución en la interacción a lo largo del eje z conlleva a la estabilización de los orbitales d_{xz} , d_{yz} y d_{z^2} y, por tanto, cuando hay una disminución de simetría para pasar de un campo octaédrico O_h a uno de pirámide de base cuadrada C_{4v} , estos rompen la degeneración y bajan en energía. El centro metálico presenta entonces un estado basal $^1\text{B}_1$.

El anión nitrato está fuera de la esfera de coordinación, por lo que en disolución los compuestos se comportan como electrolitos 1:1.

La descomposición de los compuestos se observa a temperaturas superiores a los 143°C .

Los compuestos absorben energía en la región del UV, lo que conlleva a transiciones de alta energía de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ en los ligantes diimina y a procesos de transferencia de carga metal-ligante MLCT en valores de longitud de onda de 230, 280, y 300 nm respectivamente. En la región del visible, la absorción conlleva a transiciones de menor energía en el átomo de Cu : $^2\text{B}_1 \rightarrow ^2\text{E}$, $^2\text{B}_1 \rightarrow ^2\text{B}_2$ y $^2\text{B}_1 \rightarrow ^2\text{A}_1$, aunque sólo se observan dos de ellas en 640 y 760 nm.

En el estudio electroquímico de los compuestos se observan procesos asociados a la presencia de los ligantes diimina, de la indometacina y del centro metálico; sin embargo, sólo se llevó a cabo el estudio detallado del proceso Cu(II)/Cu(I), ya que es el involucrado en el mecanismo de acción propuesto. En disolución de DMSO, todos los compuestos de coordinación estabilizan Cu(II) y Cu(I); aunque el ΔE indica un comportamiento cuasi-reversible, con transferencia electrónica lenta y procesos no controlados por la difusión de las especies a la superficie del electrodo.

En general, los $E_{1/2}$ vs ENH muestran que los compuestos son capaces de reaccionar con reductores endógenos para pasar a un estado reducido con el centro metálico en estado de oxidación 1^+ . La especie de Cu(I) posee la capacidad de generar ERO a través de la reducción de oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno y radical superóxido.

La actividad antiproliferativa de los compuestos frente a la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa) muestra una disminución de la proliferación celular con dependencia de la concentración. Los valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) se encuentran en un intervalo entre 0.67 y 25.2 μM , por lo que, en general son más activos que el *cis*-platino, fármaco de referencia. Es importante destacar que aquellos compuestos que incorporan en su estructura a las diiminas fen son más activas que los compuestos con bipy y en ambas familias, la presencia de sustituyentes metilo en los anillos aromáticos incrementa la actividad.

El compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ se seleccionó como fármaco modelo para llevar a cabo el diseño de un nanogel sensible a los estímulos de temperatura incrementada y pH ácido. El estudio de la interacción por espectroscopia de absorción en el ultravioleta del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ con monómeros o polímeros sensibles a temperatura como Am, acrilonitrilo y PNIPAAm, y sensibles a pH como el CS, mostró que los polímeros PNIPAAm y CS presentan una buena interaccionan con el compuesto de coordinación en todo el intervalo de concentraciones utilizadas. Dado que únicamente la PNIPAAm mostró una influencia de la temperatura en la interacción con el compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃, ambos polímeros fueron seleccionados como materias primas para la síntesis del nanogel.

El nanogel se sintetizó vía la copolimerización de la PNIPAAm y el CS. La caracterización muestra que el nanogel se encuentra conformado por ambos polímeros y sufre un proceso de hinchamiento al ser sometido a condiciones de pH ácidas, al incrementar su tamaño de aproximadamente 100 nm en pH=7.4 a 670 nm en pH=5.0.

El nanogel es estable eléctricamente en medio ácido, muestra transiciones de fase muy similares a las reportadas en la literatura para la PNIPAAm.

La encapsulación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en las condiciones en las que éste se encuentra hinchado (pH ácido y baja temperatura), resultó en un porcentaje de encapsulación del 69.47 ± 1.41 %, con aproximadamente 0.0496 ± 0.0010 mg de compuesto por cada mg de nanogel.

La liberación del compuesto por parte del nanogel en diferentes condiciones de pH (buffer HAOAc/NaOAc a pH= 5.0 y buffer H₂NaPO₄/HNa₂PO₄ a pH=7.4) muestra un incremento en la velocidad de liberación del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃ en condiciones ácidas, lo cual se debe a que en éstas condiciones el nanogel se hincha y permite la liberación del compuesto.

La cinética de liberación se ajustó a diversos modelos que podrían explicar el comportamiento del nanogel; el mejor ajuste para ambas condiciones se obtuvo con el modelo de Peppas-Sahlin, por lo que la liberación involucra la difusión pasiva debida al gradiente de concentraciones entre el interior del nanogel y la disolución y la relajación de las cadenas poliméricas.

Al mostrar el comportamiento deseado, el sistema podría ser útil para la liberación del compuesto en el microambiente tumoral.

8. Conclusiones

Se lograron sintetizar y caracterizar siete nuevos compuestos de coordinación con estructura general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{Indo})]\text{NO}_3$.

El centro metálico posee una geometría pirámide de base cuadrada distorsionada con un núcleo tipo CuN_2O_2 y la posición axial ocupada por una molécula de disolvente.

La presencia de metilos en diferentes posiciones de las diiminas aromáticas conlleva a la modificación de la distribución de la densidad electrónica en el centro metálico, lo cual genera diferencias en las propiedades de cada uno de los compuestos.

La incorporación de indometacina en la esfera de coordinación del cobre permitió obtener compuestos con mejor actividad antitumoral frente a la línea celular HeLa que el fármaco de referencia *cis*-plaino.

El nanogel sintetizado muestra un hinchamiento dependiente de los estímulos de temperatura y el pH; aunque la proporción superior de CS respecto a PNIPAAm conlleva a una mayor influencia del pH.

El compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ se logró encapsular en el nanogel a $\text{pH}=5.0$ y $20\text{ }^\circ\text{C}$ con una eficiencia del $69.47 \pm 1.41\%$.

La liberación del compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$ presenta un efecto burst y se ve influenciada por el pH de la dispersión, llevándose a cabo con mayor velocidad a $\text{pH}=5.0$.

La cinética de liberación presenta un buen ajuste respecto al modelo de Peppas-Sahlin, por presenta la contribución de dos mecanismos: la difusión del fármaco y la relajación de las cadenas poliméricas.

8. Perspectivas

Determinar el % de inhibición de COX-2 como indicador de la actividad antiinflamatoria de cada uno de los compuestos de coordinación.

Determinar la CI_{50} en líneas celulares humanas sanas.

Determinar la CI_{50} en líneas celulares humanas del nanogel cargado y no cargado con el compuesto $[Cu(4,7\text{-dimetil-fen})(Indo)]NO_3$.

Determinar la CI_{50} en COX-2 del nanogel cargado y no cargado con el compuesto $[Cu(4,7\text{-dimetil-fen})(Indo)]NO_3$

Optimizar las características fisicoquímicas del nanogel para la liberación del compuesto $[Cu(4,7\text{-dimetil-fen})(Indo)]NO_3$.

9. Bibliografía

1. Bradbury RH (2007) Topics in medicinal chemistry. Cancer. Springer, UK
2. Organización Mundial de la Salud (2014) Perfiles oncológicos de los países: México
3. Lorraine P (2017) Cancer. In: Natl. Cancer Inst. <https://www.cancer.gov/>
4. Wang M, Zhao J, Zhang L, et al (2017) Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* 8:761–773
5. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70 . doi: 10.1007/s00262-010-0968-0
6. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674 . doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
7. Whiteside TL (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27:5904–5912 . doi: 10.1038/onc.2008.271
8. Lluís JM, Buricchi F, Chiarugi P, et al (2007) Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: Activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* 67:7368–7377 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0515
9. Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650–9 . doi: 10.1056/NEJM198612253152606
10. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, et al (2013) Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 13:1 . doi: 10.1186/1475-2867-13-89
11. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, et al (2002) Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 8:1284–1291
12. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K (2006) Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 66:6699–6707 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0983
13. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T (2012) The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125:5591–5596 . doi: 10.1242/jcs.116392

14. Centeno-Llanos SM (2012) Evaluación de la hematotoxicidad del compuesto antineoplásico Casiopeína III-ia. Facultad de Química, UNAM.
15. Caley A, Jones R (2012) The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg - Oxford* 30:186–190 . doi: 10.1016/j.mpsur.2015.01.005
16. Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH (1969) Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 222:385
17. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205:698
18. Ruiz-Azuara L, De la Rosa M, Gracia-Mora I, Mendoza Á (1995) Casiopeínas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and genotoxic compounds. *J Inorg Biochem* 59:207
19. Kostova I (2006) Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1:1–22 . doi: 10.2174/157489206775246458
20. Rehder D (2008) Introduction to bioinorganic chemistry. Lecture notes. *Intro to Bioinorg Chem* 2:1–44
21. Cowan J (1997) *Inorganic biochemistry. An introduction*, 2nd ed. Wiley-VCH, New York, USA
22. Gambino D, Moreno V, Navarro M (2012) *Aplicaciones de los compuestos metálicos en medicina*. España
23. Sava G, Zorzet S, Turrin C, et al (2003) Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis : Selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res* 9:1898–1905
24. Leijen S, Burgers SA, Baas P, et al (2015) Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest New Drugs* 33:201–214 . doi: 10.1007/s10637-014-0179-1
25. Casas F, Moreno M, Sánchez G, et al (2002) *Química bioinorgánica*. Editorial Síntesis, España
26. Angelova M, Asenova S, Nedkova V (2011) Copper in the human organism. *9:88–98*
27. Ruiz-Azuara L Casiopeínas. 458, 107, 005. US Patent Re35, 458, February

18, 1

28. Ruiz-Azuara L (1996) Casiopeínas. 326, Vo. 5576, 326. 107, 005. US Patent Re35.
29. García-Ramos JC, Galindo-Murillo R, Cortés-Guzmán F, Ruiz-Azuara L (2013) Metal-based drug-DNA interactions. *J Mex Chem Soc* 57:245–259
30. Alemón-Medina R, Breña-Valle M, Muñoz-Sánchez JL, et al (2007) Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). *Cancer Chemother Pharmacol* 60:219–228 . doi: 10.1007/s00280-006-0364-9
31. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, et al (2008) Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* 21:17–28 . doi: 10.1007/s10534-007-9089-4
32. Trejo-Solís C, Palencia G, Zuñiga S, et al (2005) Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia* 7:563–574 . doi: 10.1593/neo.04607
33. Galindo-Murillo R, Ruiz-Azuara L, Moreno-Esparza R, Cortés-Guzmán F (2012) Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys Chem Chem Phys* 14:15539 . doi: 10.1039/c2cp42185b
34. Becco L, Rodríguez A, Bravo-Gómez ME, et al (2012) New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *J Inorg Biochem* 109:49–56 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010
35. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, et al (2010) Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology* 268:176–183 . doi: 10.1016/j.tox.2009.12.010
36. Bravo-Gómez ME, García-Ramos JC, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L (2009) Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *J Inorg Biochem* 103:299–309 . doi:

10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006

37. Dávila-Manzanilla S (2010) Determinación de la concentración intracelular de cobre en células tumorales HeLa tratadas con compuestos de coordinación del tipo [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(a-aminoácido)]NO₃ (Casiopeínas). Universidad Nacional Autónoma de México
38. Bravo-Gómez ME, Dávila-Manzanilla S, Flood-Garibay J, et al (2012) Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds. *J Mex Chem Soc* 56:85–92
39. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2007) Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11ma ed. Mc Graw Hill, México
40. Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232–235 . doi: 10.1038/newbio231232a0
41. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, et al (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci* 96:7563–7568 . doi: 10.1073/pnas.96.13.7563
42. Dai Y, Wang W-H (2006) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:2884–9
43. Wargovich J, Steele E, Kelloff GJ (1996) Aberrant crypts as a biomarker potential chemopreventive for colon cancer: evaluation agents in the Rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:355–360
44. Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Pavón N, et al (2006) Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 212:79–88 . doi: 10.1016/j.taap.2005.06.023
45. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145–182 . doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145
46. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 62:625–631

47. Eli Y, Przeddecki F, Levin G, et al (2001) Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 61:565–71 . doi: 10.1016/S0006-2952(00)00578-5
48. van der Velden DL, Cirkel GA, Houthuijzen JM, et al (2018) Phase I study of combined indomethacin and platinum-based chemotherapy to reduce platinum-induced fatty acids. *Cancer Chemother Pharmacol* 81:911–921 . doi: 10.1007/s00280-018-3563-2
49. Bourn J, Cekanova M (2018) Cyclooxygenase inhibitors potentiate receptor tyrosine kinase therapies in bladder cancer cells in vitro. 1727–1742 . doi: 10.2147/DDDT.S158518
50. Nagano CS, Bush AI (2008) Sensitive, selective, and irreversible inhibition of cyclooxygenase-2 activity. *ChemMedChem* 3:223–225 . doi: 10.1002/cmdc.200700217
51. Weder JE, Hambley TW, Kennedy BJ, et al (1999) Anti-inflammatory dinuclear copper(II) complexes with indomethacin. Synthesis, magnetism and EPR spectroscopy. Crystal structure of the N , N -Dimethylformamide adduct. *Inorg Chem* 38:1736–1744 . doi: 10.1021/ic981100x
52. Bonin AM, Yáñez JA, Fukuda C, et al (2010) Inhibition of experimental colorectal cancer and reduction in renal and gastrointestinal toxicities by copper-indomethacin in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 66:755–764 . doi: 10.1007/s00280-009-1220-5
53. Tarushi A, Raptopoulou CP, Psycharis V, et al (2014) Structure and biological perspectives of Cu(II)-indomethacin complexes. *J Inorg Biochem* 140:185–198 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.07.006
54. Boodram JN, Mcgregor IJ, Bruno PM, et al (2016) Breast cancer stem cell potent copper(II)-non-steroidal anti-inflammatory drug complexes. *Angew Chemie - Int Ed* 55:2845–2850 . doi: 10.1002/anie.201510443
55. Chien YW (1992) *Novel drug delivery systems*, 2nd ed. CRC Press, USA
56. Bajpai A, Shukla S, Saini R, Tiwari A (2010) *Stimuli responsive drug delivery systems: From introduction to application*. Smithers, UK
57. Talevi A, Gantner ME, Ruiz ME (2014) *Applications of nanosystems to*

- anticancer drug therapy (Part I. Nanogels, nanospheres, nanocapsules). *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 9:83–98 . doi: 10.2174/1574891X113089990038
58. Patjhak Y, Thassu D (2009) Drug delivery nanoparticles formulation and characterization. USA
59. Neamtu I, Rusu AG, Diaconu A, et al (2017) Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. *Drug Deliv* 24:539–557 . doi: 10.1080/10717544.2016.1276232
60. Gillian SLS, Nor Abu S, Mohd HZ, et al (2010) Enhanced topical delivery and anti-inflammatory activity of methotrexate from an activated nanogel. *Eur J Pharm Biopharm* 76:275–281 . doi: 10.1016/j.ejpb.2010.06.014
61. Pineda-Contreras BA, Schmalz H, Agarwal S (2016) pH dependent thermoresponsive behavior of acrylamide–acrylonitrile UCST-type copolymers in aqueous media. *Polym Chem* 7:1979–1986 . doi: 10.1039/C6PY00162A
62. Liechty, W. B., Kryscio, D.R., Slaughter, B. V. and Peppas NA (2010) Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 1:149–173 . doi: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847.Polymers
63. Tourrette A, De Geyter N, Jovic D, et al (2009) Incorporation of poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan microgel onto plasma functionalized cotton fibre surface. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 352:126–135 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.10.014
64. Ding Y, Yin H, Shen S, et al (2017) Chitosan-based magnetic/fluorescent nanocomposites for cell labelling and controlled drug release. *New J Chem* 41:1736–1743 . doi: 10.1039/c6nj02897g
65. Abou Taleb MF, Alkahtani A, Mohamed SK (2015) Radiation synthesis and characterization of sodium alginate/chitosan/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels: a drug delivery system for liver cancer. *Polym Bull* 72:725–742 . doi: 10.1007/s00289-015-1301-z
66. Arias JL, Reddy LH, Couvreur P (2012) Fe₃O₄/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer. *J Mater Chem* 22:7622–7632 . doi: 10.1039/c2jm15339d

67. Farshi- Azhar F, Olad A (2014) A study on sustained release formulations for oral delivery of 5-fluorouracil based on alginate-chitosan/montmorillonite nanocomposite systems. *Appl Clay Sci* 101:288–296 . doi: 10.1016/j.clay.2014.09.004
68. Varukattu NB, Vivek R, Rejeeth C, et al (2018) Nanostructured pH-responsive biocompatible chitosan coated copper oxide nanoparticles: A polymeric smart intracellular delivery system for doxorubicin in breast cancer cells. *Arab J Chem* 0–10 . doi: 10.1016/j.arabjc.2018.04.012
69. Miranda Calderón JE (2012) Estudio y caracterización de un sistema de liberación controlada de Casiopeína III-ia. Facultad de Química, UNAM
70. Miranda-Calderón JE, Medina-Torres L, Tinoco-Mendez M, et al (2011) Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan. Toward a Cas III-ia drug delivery system. *Carbohydr Res* 346:121–126 . doi: 10.1016/j.carres.2010.07.007
71. Ali A, Ahmed S (2018) A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int J Biol Macromol* 109:273–286 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078
72. Dai YN, Li P, Zhang JP, et al (2008) Swelling characteristics and drug delivery properties of nifedipine-loaded pH sensitive alginate-chitosan hydrogel beads. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 86:493–500 . doi: 10.1002/jbm.b.31046
73. Patel VR, Amiji MM (1996) pH-sensitive swelling and drug release properties of chitosan — poly (ethylene oxide) semi-interpenetrating polymer network. doi: 10.1021/bk-1996-0627.ch017
74. Zhang W, Jin X, Li H, et al (2018) Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release. *Carbohydr Polym* 186:82–90 . doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.008
75. Xiong W, Wang W, Wang Y, et al (2011) Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 84:447–453 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.040

76. Haq MA, Su Y, Wang D (2017) Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C* 70:842–855 . doi: 10.1016/j.msec.2016.09.081
77. Schmaljohann D (2006) Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58:1655–1670 . doi: 10.1016/j.addr.2006.09.020
78. Davaran S, Alimirzalu S, Nejati-koshki K (2014) Physicochemical characteristics of Fe₃O₄ magnetic nanocomposites based on poly (N-isopropylacrylamide) for anti-cancer drug delivery. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.1.49
79. Strong LE, Dahotre SN, West JL (2014) Hydrogel-nanoparticle composites for optically modulated cancer therapeutic delivery. *J Control Release* 178:63–68 . doi: 10.1016/j.jconrel.2014.01.014
80. Xue N, Qiu XP, Chen Y, et al (2016) Effect of chain architecture on the phase transition of star and cyclic poly(N-isopropylacrylamide) in water. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 54:2059–2068 . doi: 10.1002/polb.24114
81. Xia Y, Burke NAD, Stöver HDH (2006) End group effect on the thermal response of narrow-disperse poly(N -isopropylacrylamide) prepared by atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 39:2275–2283 . doi: 10.1021/ma0519617
82. Belali S, Karimi AR, Hadizadeh M (2017) Novel nanostructured smart, photodynamic hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) bearing porphyrin units in their crosslink chains: A potential sensitizer system in cancer therapy. *Polym (United Kingdom)* 109:93–105 . doi: 10.1016/j.polymer.2016.12.041
83. Qi X, Wei W, Li J, et al (2016) Development of novel hydrogels based on Salecan and poly(N-isoacrylamide-co-methacrylic acid) for controlled doxorubicin release. *R Soc Chem* 69869–69881 . doi: 10.1039/c6ra10716h
84. Jaiswal MK, Banerjee R, Pradhan P, Bahadur D (2010) Thermal behavior of magnetically modalized poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan based nanohydrogel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 81:185–194 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.009
85. Guo BL, Gao QY (2007) Preparation and properties of a pH/temperature-

- responsive carboxymethyl chitosan/poly(N-isopropylacrylamide)semi-IPN hydrogel for oral delivery of drugs. *Carbohydr Res* 342:2416–2422 . doi: 10.1016/j.carres.2007.07.007
86. Fong Y, Chen C-H, Chen J-P (2017) Intratumoral delivery of doxorubicin on folate-conjugated graphene oxide by in-situ forming thermo-sensitive hydrogel for breast cancer therapy. *Nanomaterials* 7:388 . doi: 10.3390/nano7110388
 87. Ruiz-Azuara L *Casiopeínas*. 326, Vo. 5576, 326. 107, 005. US Patent Re35.
 88. Ruiz-Azuara L (1992) *Casiopeínas*. 458, 107, 005. US Patent Re35, 458, February 18, 1
 89. Kissinger PT, Heineman WR (1983) Cyclic voltammetry. *J Chem Educ* 60:9242–5 . doi: 10.1002/anie.201004874
 90. Mabbott GA (1983) An introduction to cyclic voltammetry. *J Chem Educ* 60:697 . doi: 10.1021/ed060p697
 91. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63 . doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
 92. Jiang Y, Chen J, Deng C, et al (2014) Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 35:4969–4985 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.001
 93. Nakamoto K (2009) *Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds*, 4th ed. Wiley Interscience, USA
 94. Solans X, Ruiz-Ramírez L, Gasque L, Briansó JL (1987) Structure of (1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate. *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun* 43:428–430 . doi: 10.1107/S0108270187095507
 95. Solans X, Ruiz-Ramirez L, Martinez a, et al (1993) Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrato)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun* C49:890–893 . doi: 10.1107/S0108270192000556
 96. Cotton FA, Wilkison G (1969) *Química inorgánica avanzada*, 2a edición. Limusa Wiley, México

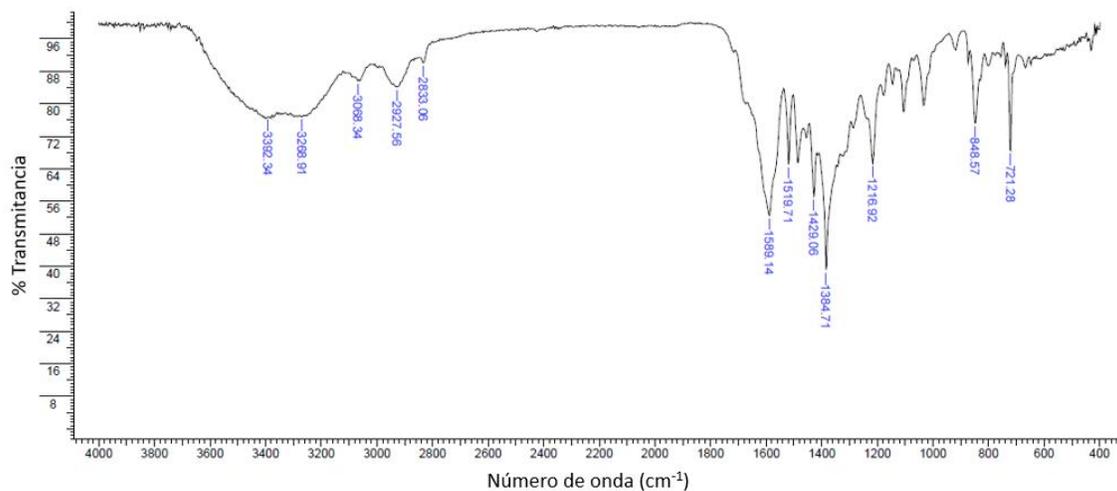
97. Rodgers GE (2003) Descriptive Inorganic, Coordination & Solid-State Chemistry, 3th editio. USA
98. Eady RR, Hasnain SS (2003) Bio-coordination chemistry
99. Basolo F, Johnson R, Busch R (1980) Introducción y desarrollo historico de los compuestos de coordinación. España
100. Lawrance GA (2009) Introduction to Coordination Chemistry. Australia
101. Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL (1997) Química inorgánica. Principios Estruct. y React. 4:148–162
102. Morgan YR, Turner P, Kennedy BJ, et al (2006) Preparation and characterization of dinuclear copper – indomethacin anti-inflammatory drugs. 324:150–161
103. Drago RS (1992) Physical Methods for Chemists, 2nd editio. Florida, USA
104. Dimiza F, Fountoulaki S, Papadopoulos AN, et al (2011) Non-steroidal antiinflammatory drug–copper(ii) complexes: Structure and biological perspectives. Dalt Trans 40:8555 . doi: 10.1039/c1dt10714c
105. Perontsis S, Hatzidimitriou AG, Begou OA, et al (2016) Characterization and biological properties of copper(II)-ketoprofen complexes. J Inorg Biochem 162:22–30 . doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.06.001
106. Duin E (2012) Electron paramagnetic resonance theory 2.1. USA
107. Kivelson D, Neiman R (1961) EPR studies on the bonding in copper complexes. J Chem Phys 35:149–155 . doi: 10.1063/1.1731880
108. Garribba E, Micera G (2006) The determination of the geometry of Cu(II) complexes: An EPR spectroscopy experiment. J Chem Educ 83:1229 . doi: 10.1021/ed083p1229
109. Peisach J, Blumberg WE (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. Arch Biochem Biophys 165:691–708 . doi: 10.1016/0003-9861(74)90298-7
110. Labanowska M, Bidzińska E, Para A, Kurdziel M (2012) EPR investigation of Cu(II)-complexes with nitrogen derivatives of dialdehyde starch. Carbohydr Polym 87:2605–2613 . doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.034
111. Sataraddi SR, Patil SM, Bagoji AM, et al (2014) Electrooxidation of

- Indomethacin at Multiwalled Carbon Nanotubes-Modified GCE and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Form and Human Biological Fluids. *Anal Chem* 2014:1–9 . doi: 10.1155/2014/816012
112. Brown AP, Anson FC (1977) Complexes to graphite electrode surfaces. *Anal Chem* 49:203–206
 113. Lever A (1998) Surface electrochemistry of inorganic complexes. *Pure Appl Chem* 70:755–763
 114. Goldstein S, Czapski G (1986) Mechanisms of reactions of some copper complexes in the presence of DNA with O₂·, H₂O₂ and molecular oxygen. *J Am Chem Soc* 108:2244–2250
 115. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K (2012) A novel water soluble ligand bridged cobalt(ii) coordination polymer of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (isonicotinic) hydrazone: Evaluation of the DNA binding, protein interaction, radical scavenging and anticancer activity. *Dalt Trans* 41:4365–4377 . doi: 10.1039/c2dt12274j
 116. Anbu S, Paul A, Ravishankaran R, et al (2014) Phenyl carbohydrazone conjugated 2-oxoindoline as a new scaffold that augments the DNA and BSA binding affinity and anti-proliferative activity of a 1,10-phenanthroline based copper(II) complex. *Inorganica Chim Acta* 423:183–193 . doi: 10.1016/j.ica.2014.07.016
 117. Mi FL, Sung HW, Shyu SS (2002) Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydr Polym* 48:61–72 . doi: 10.1016/S0144-8617(01)00212-0
 118. Singh AK (2016) Engineered nanoparticles: structure, properties and mechanisms of toxicity, 1st editio. Academic Press
 119. Chung JE, Yokoyama M, Yamato M, et al (1999) Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly (butylmethacrylate). *J Control Release* 62:115–127 . doi: 10.1016/s0168-3659(99)00029-2
 120. Fernández JA, Santos RG, Estévez GF (2009) Cinética de liberación de cefalexiana desde un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. *An la Real Acad Nac Farm* 75:345–363

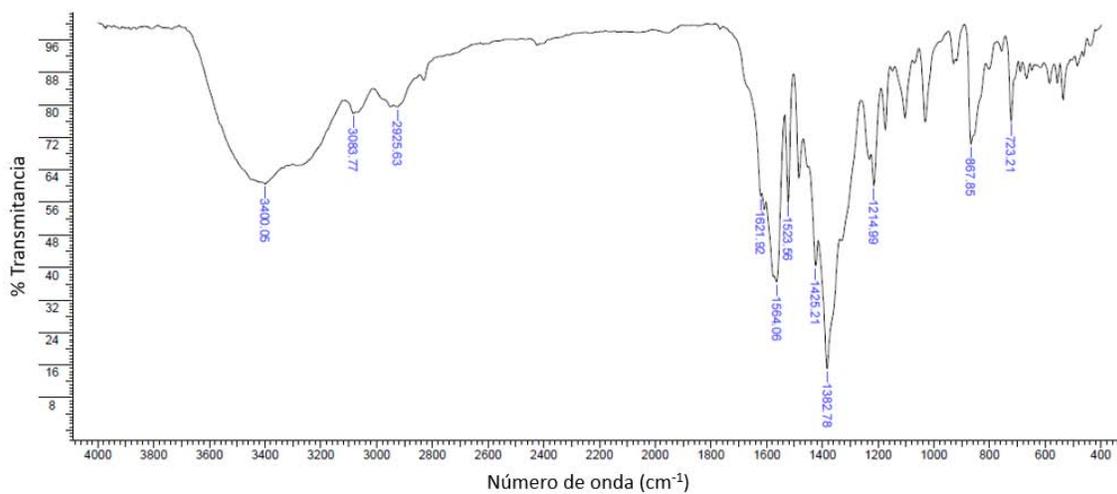
121. Bruschi M (2015) Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. UK
122. Peppas NA, Sahlin JJ (1989) A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm* 57:169–172 . doi: 10.1016/0378-5173(89)90306-2
123. Ravindra-Badu B, Naveeb-Badu K (2016) Calculation of predominant drug release mechanism using Peppas-Sahlin model (substitution method): A linear regression approach. *Int J Pharm* 6:128–137

Anexo 1. Espectroscopia de infrarrojo

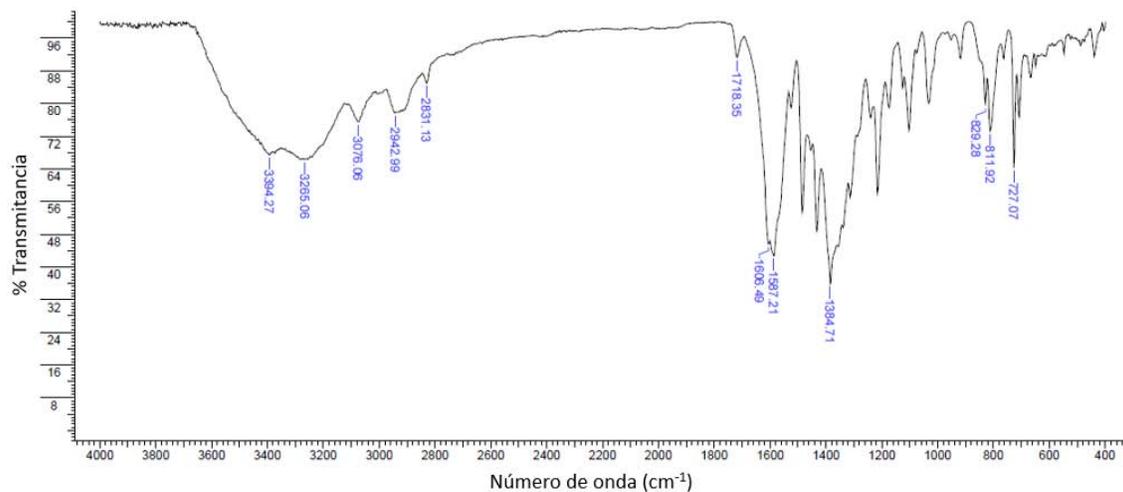
Espectro de infrarrojo del compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$



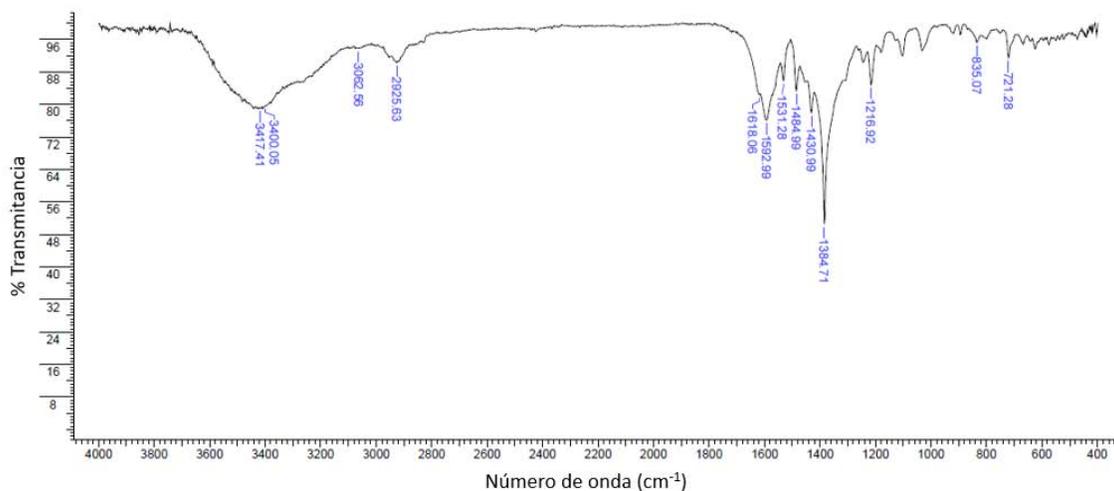
Espectro de infrarrojo del compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$



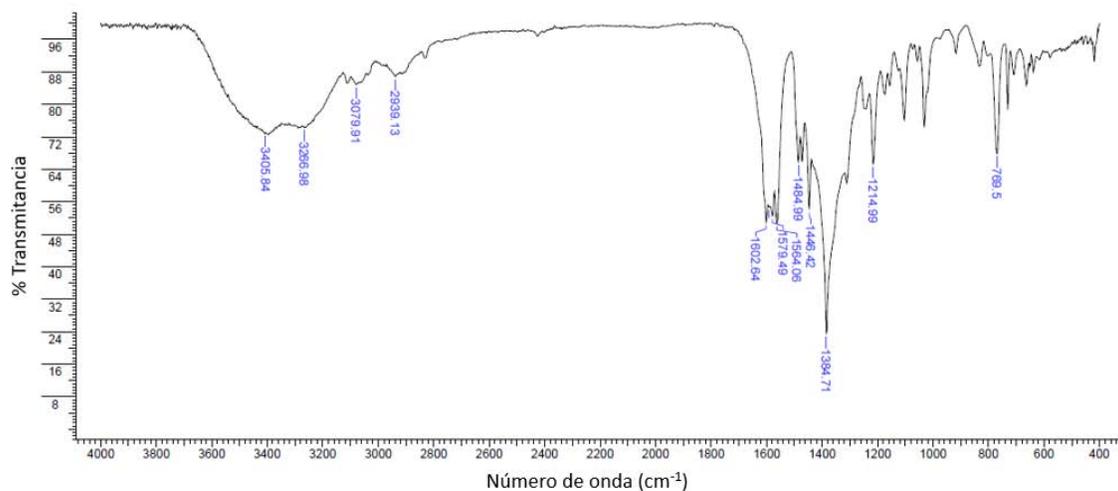
Espectro de infrarrojo del compuesto [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



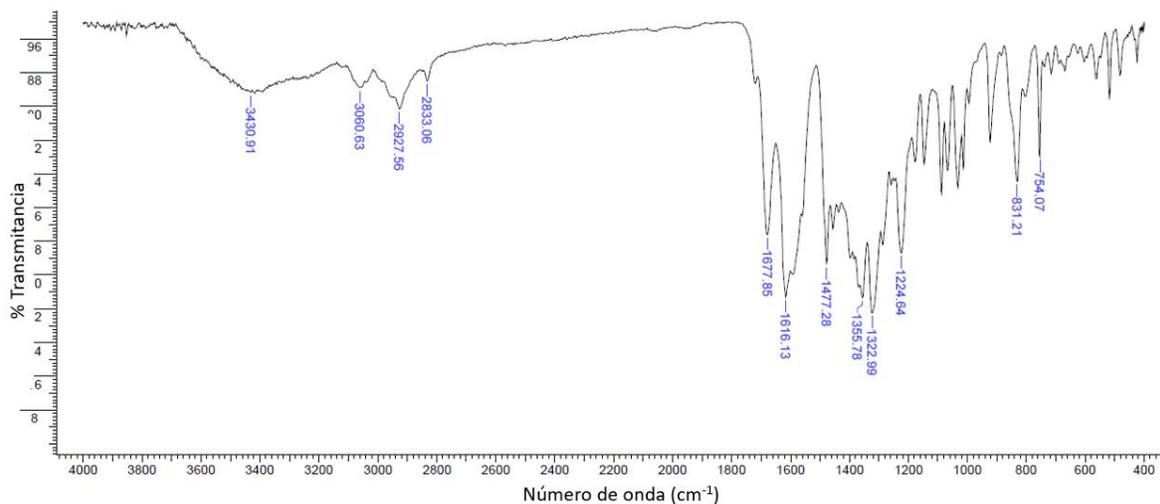
Espectro de infrarrojo del compuesto [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃



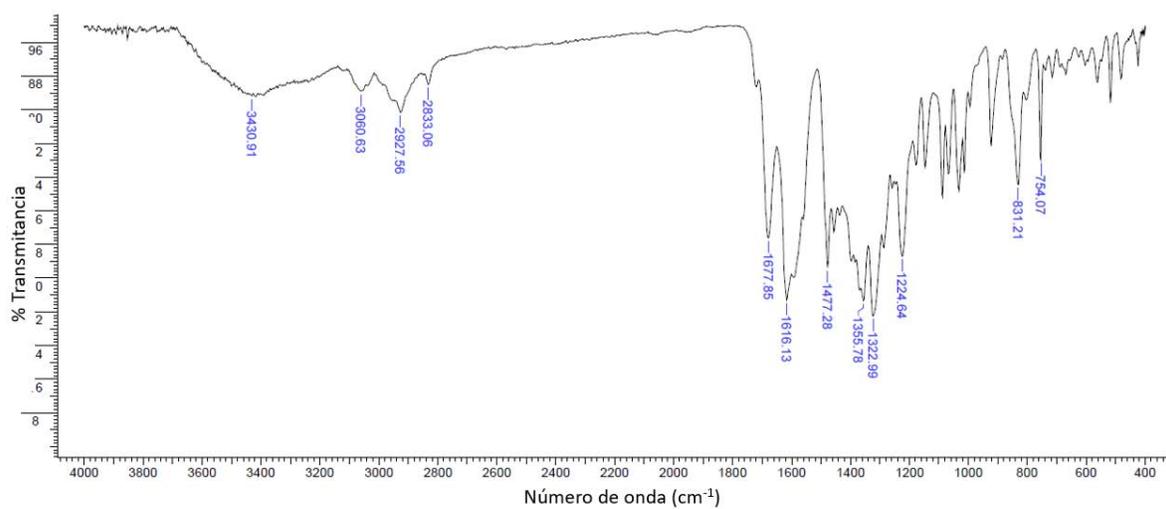
Espectro de infrarrojo del compuesto [Cu(bipy)(Indo)]NO₃



Espectro de infrarrojo del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃

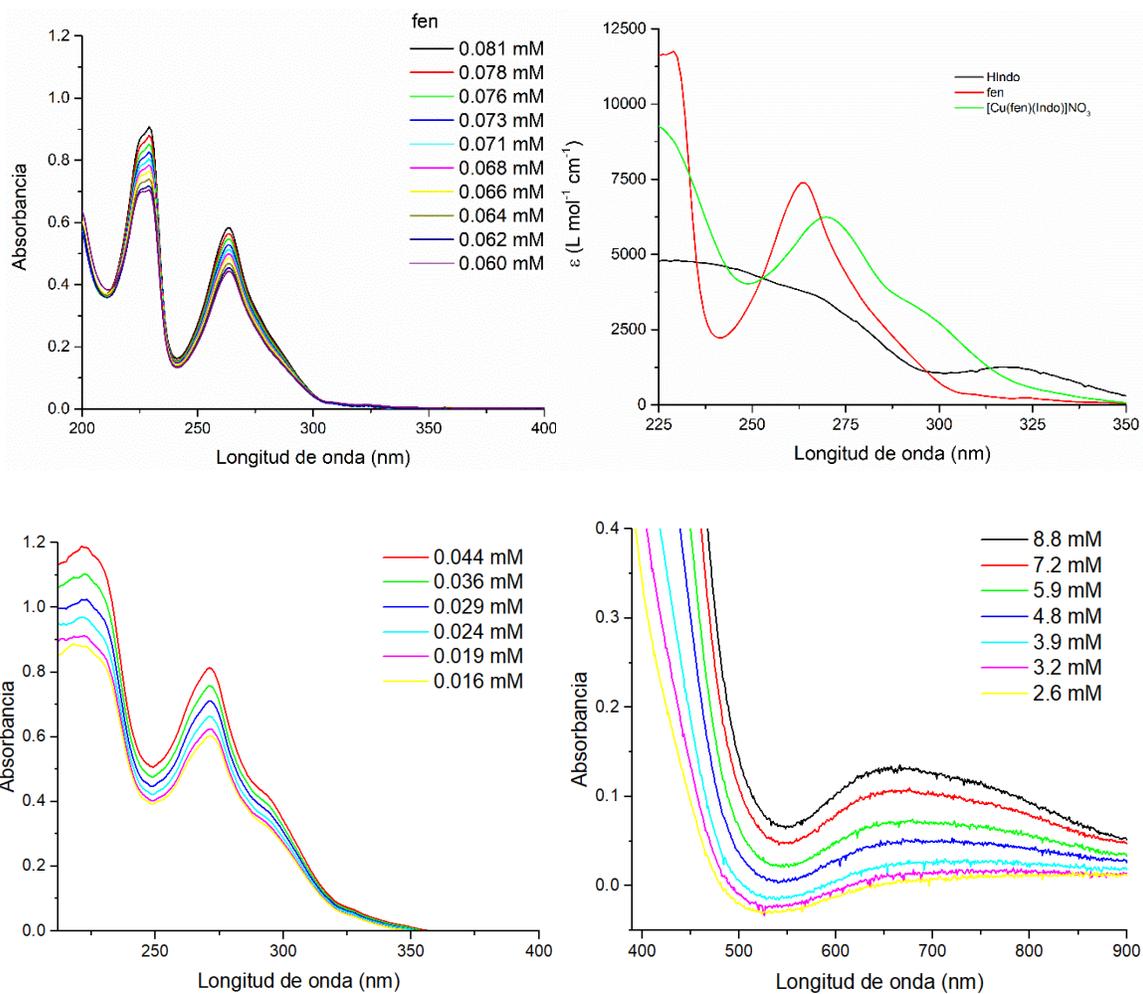


Espectro de infrarrojo del compuesto [Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃

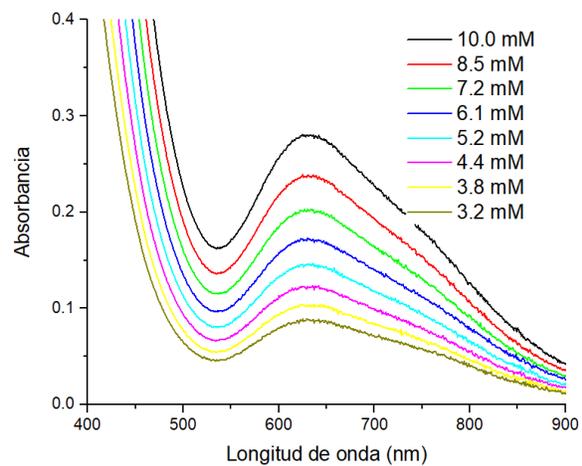
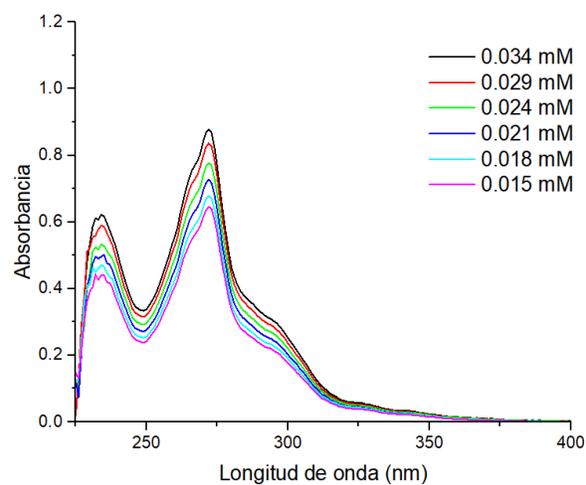
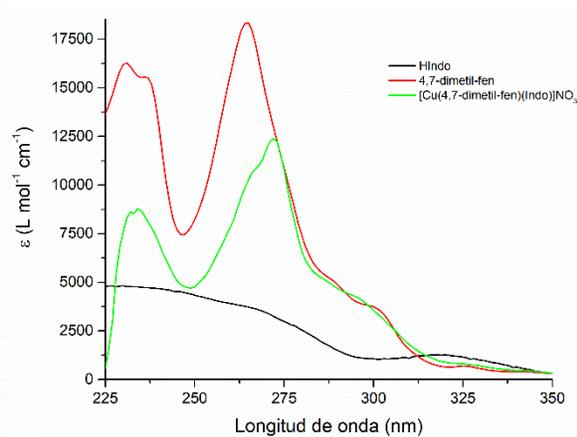
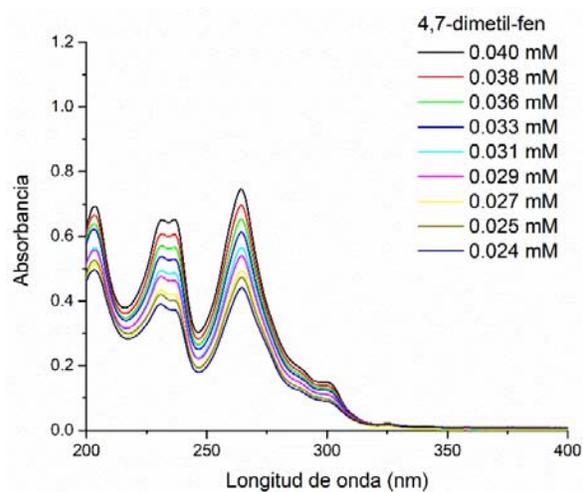


Anexo 2. Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis

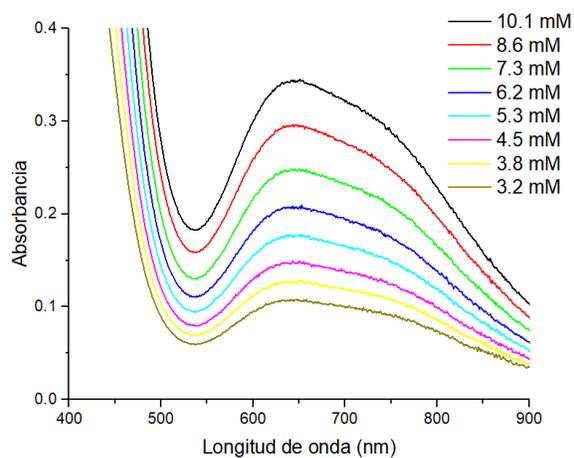
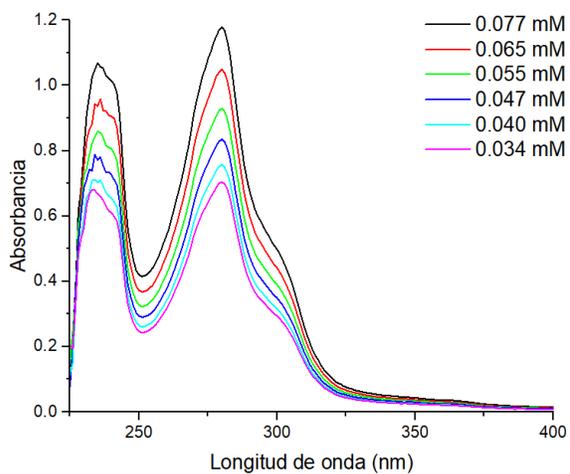
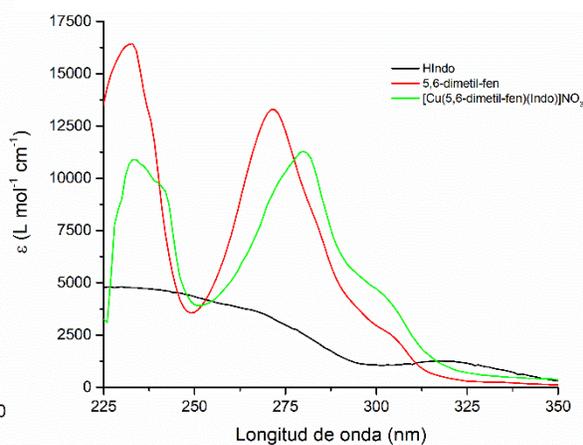
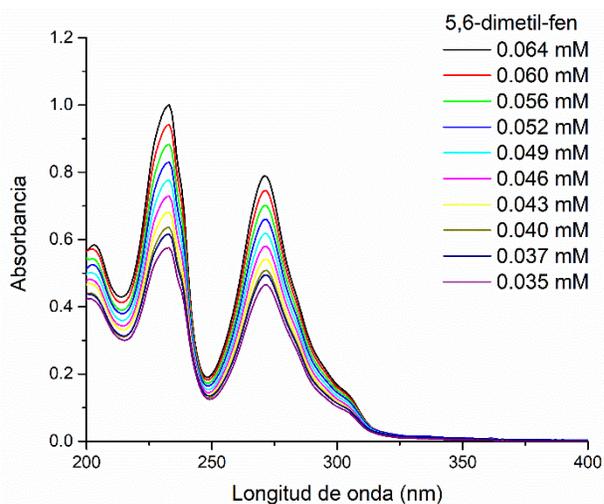
Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis de fen y el compuesto $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{Indo})]\text{NO}_3$



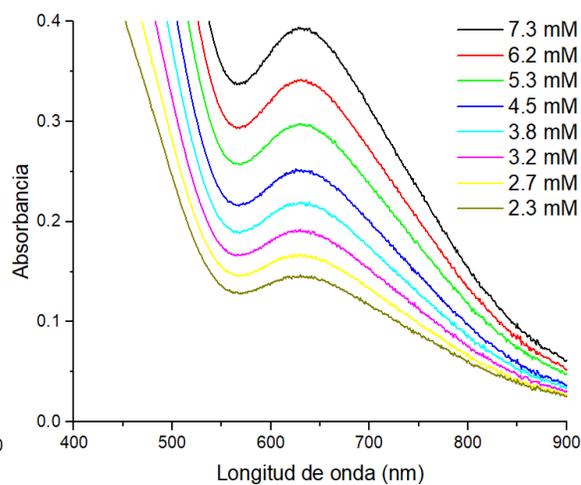
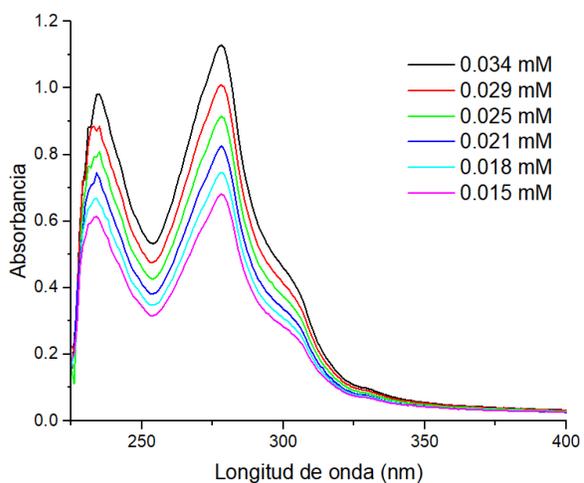
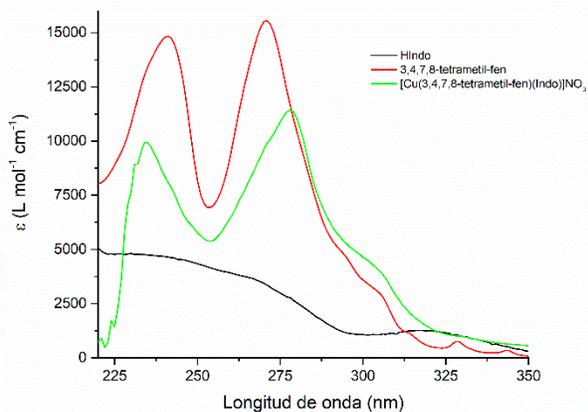
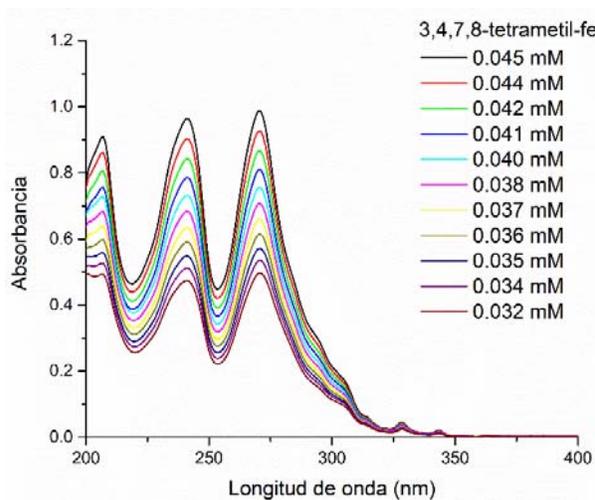
Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis de 4,7-dimetil-fen y del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



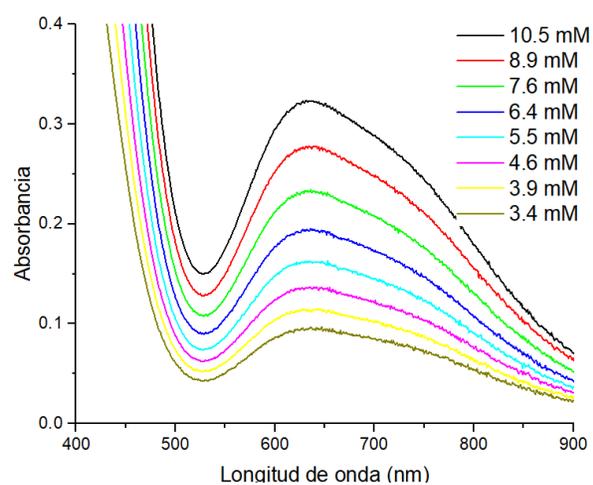
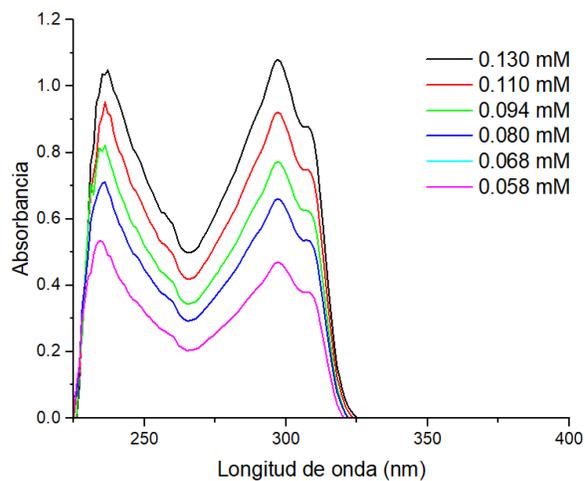
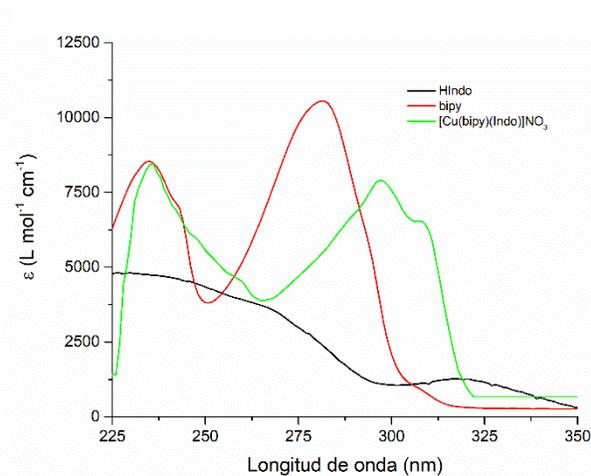
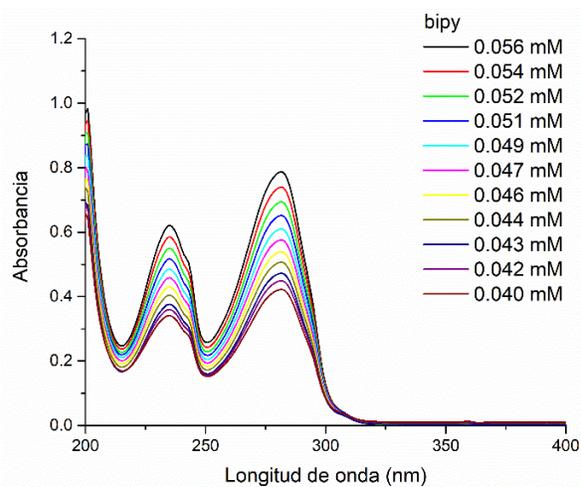
Espetros electrónicos de absorción en el UV-Vis de 5,6-dimetil-fen y del compuesto [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



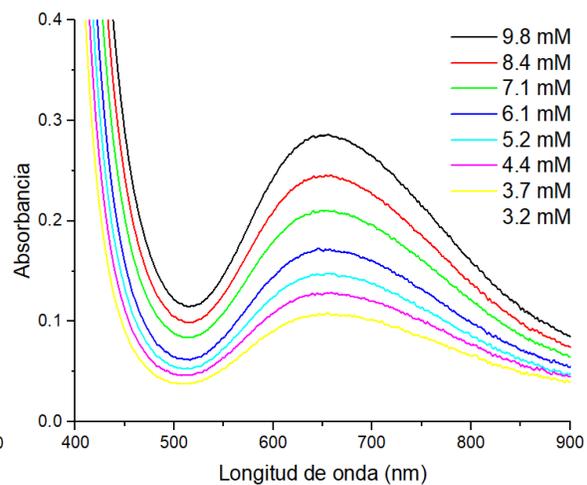
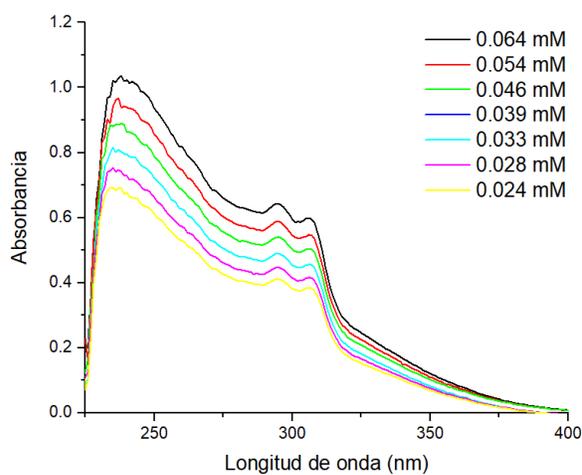
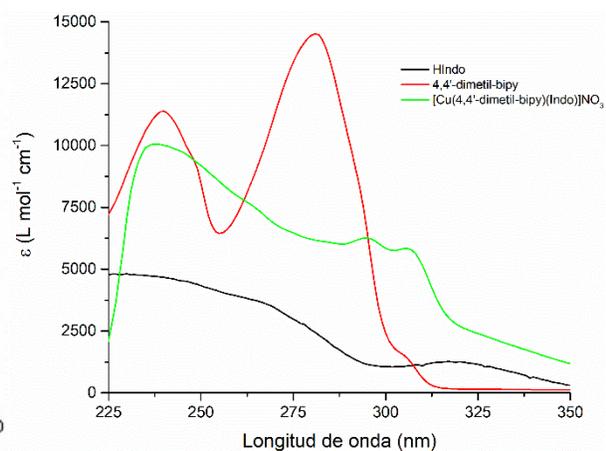
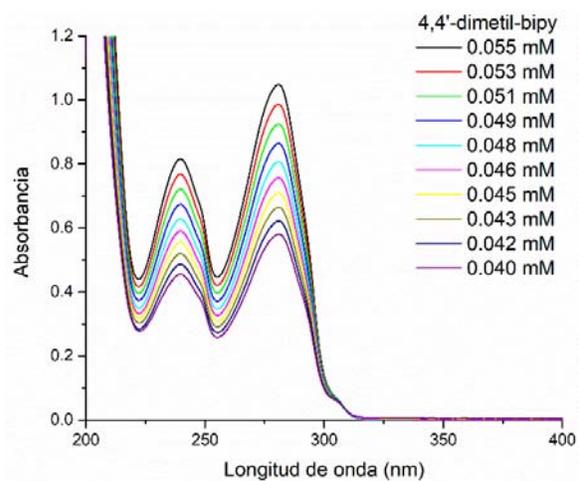
Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis de 3,4,7,8-tetrametil-fen y del compuesto [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃



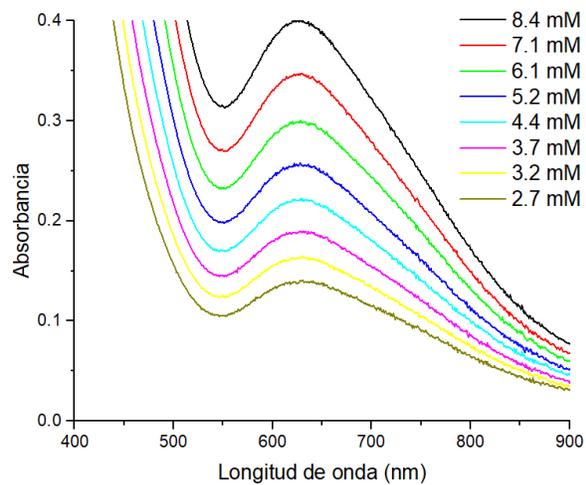
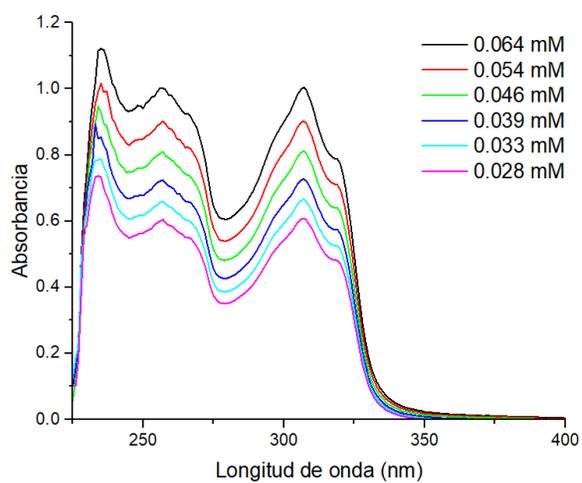
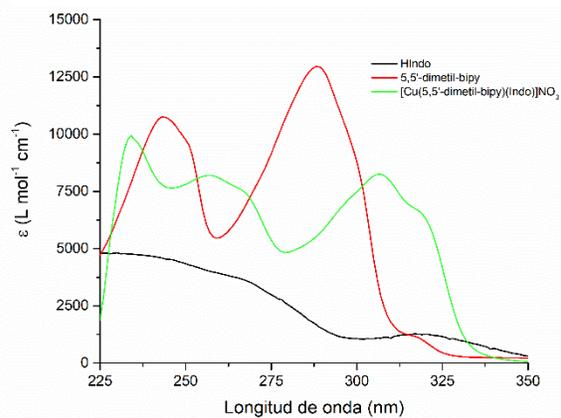
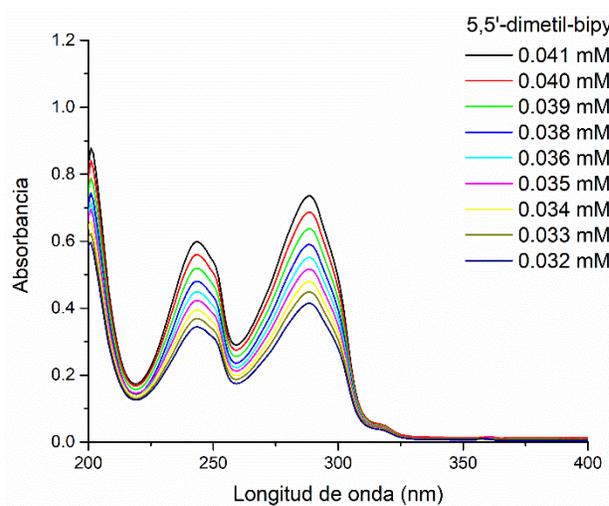
Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis de bipy y del compuesto $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$



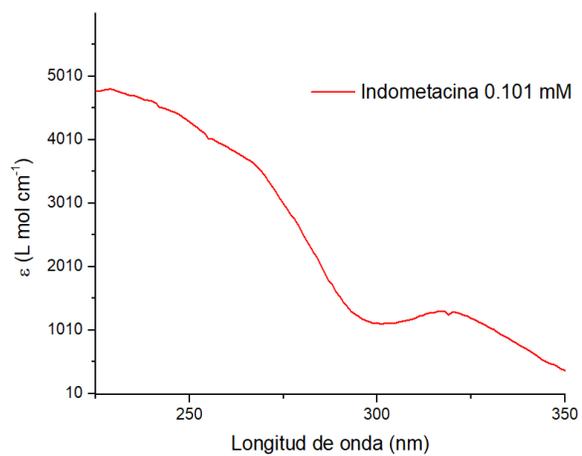
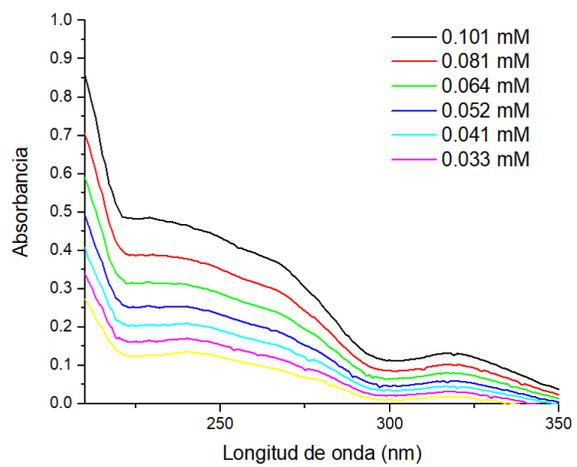
Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃



Espectros electrónicos de absorción en el UV-Vis de 5,5'-dimetil-bipy y del compuesto $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-bipy})(\text{Indo})]\text{NO}_3$



Espectros electrónicos de absorción en el UV de la indometacina

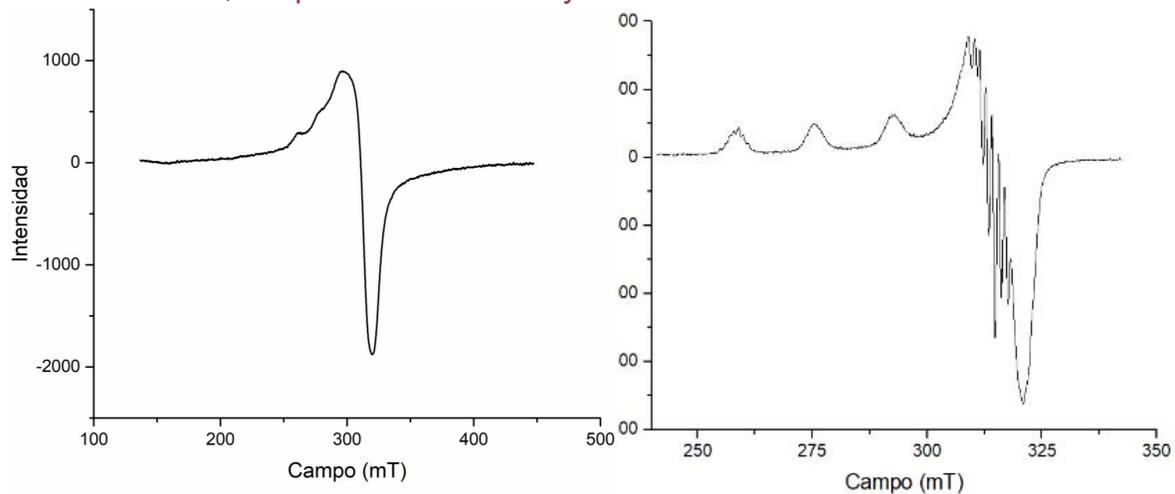


Anexo 3. Espectros de resonancia paramagnética electrónica

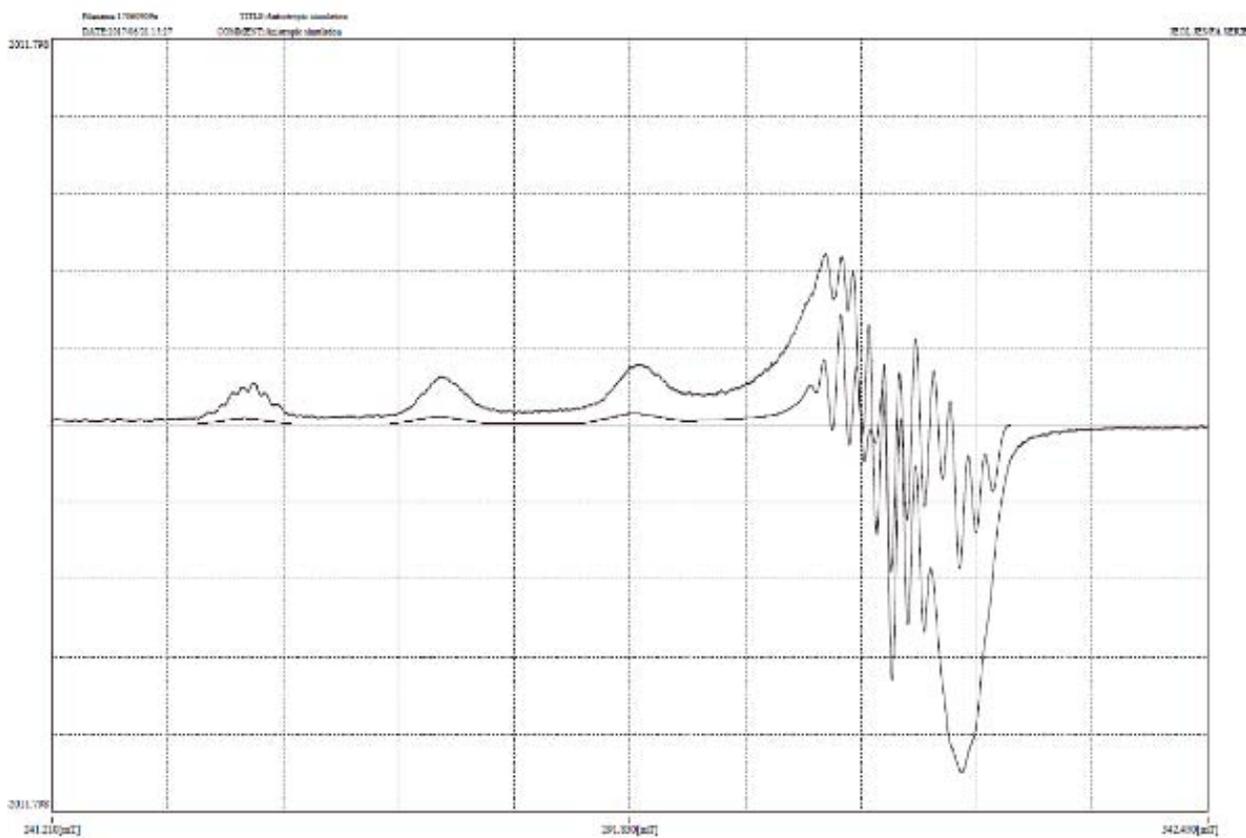
Espectros de resonancia paramagnética electrónica del compuesto



Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

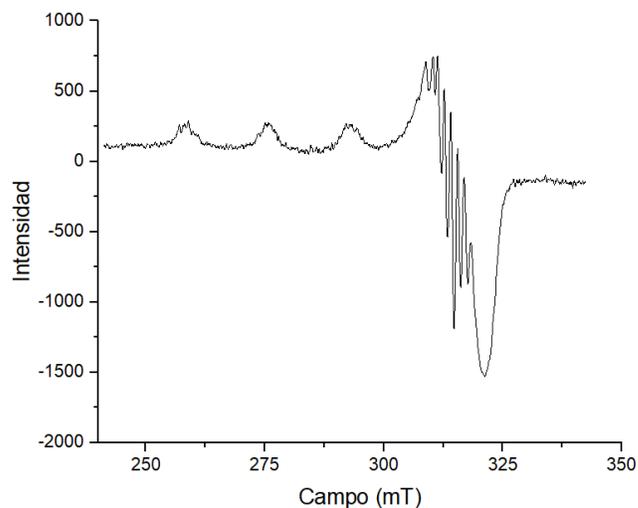
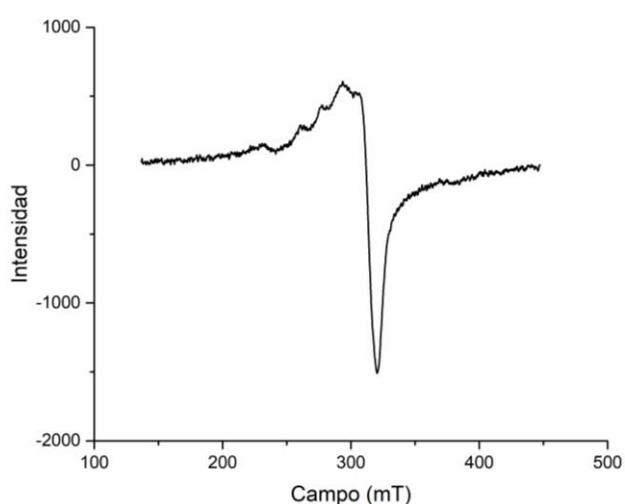


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

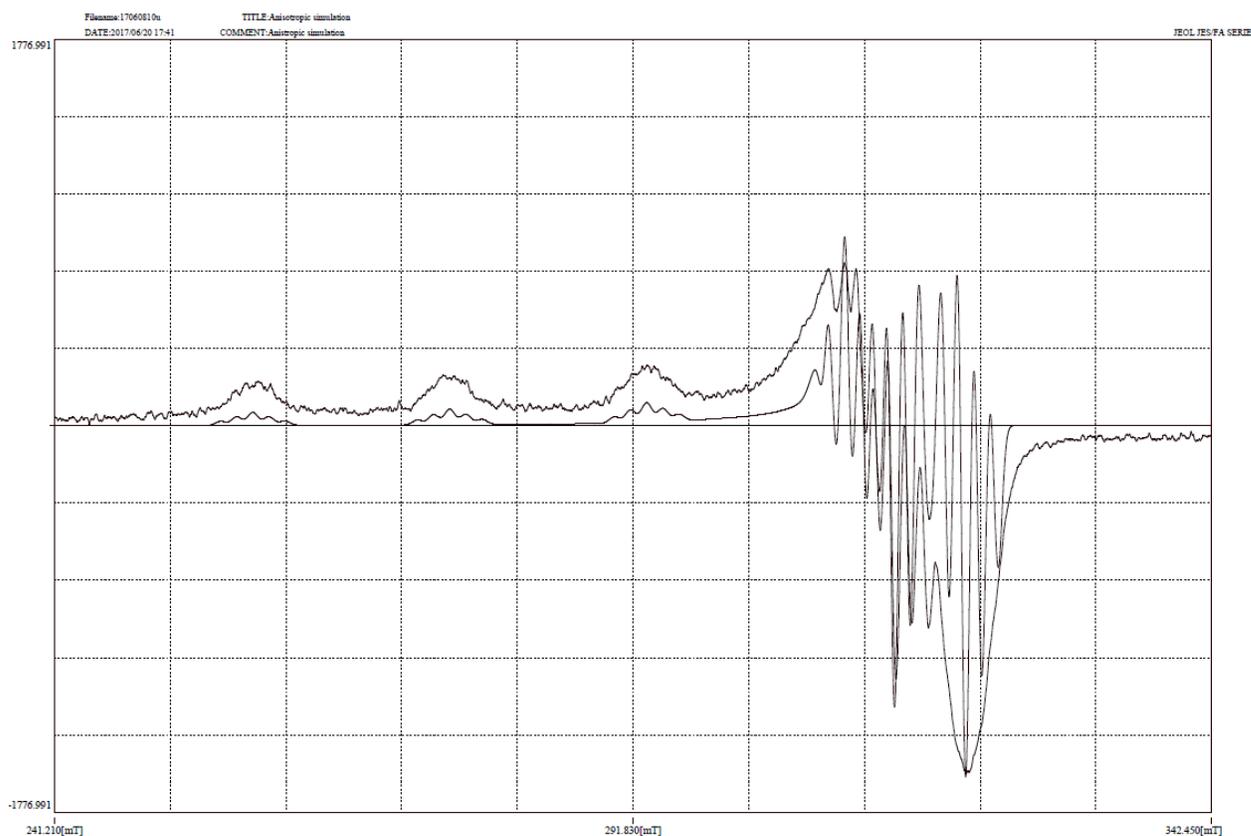


Espectros de resonancia paramagnética electrónica
del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

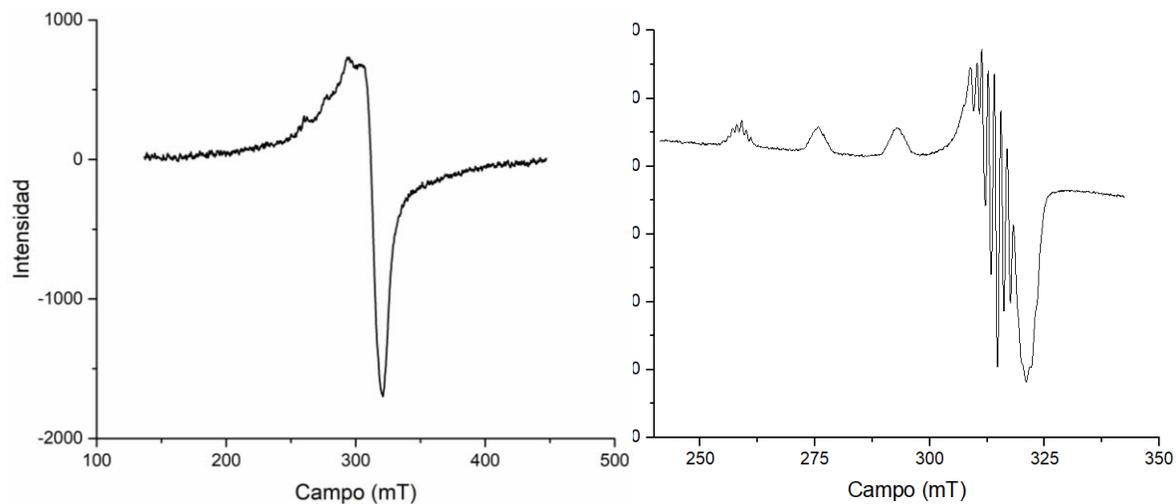


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

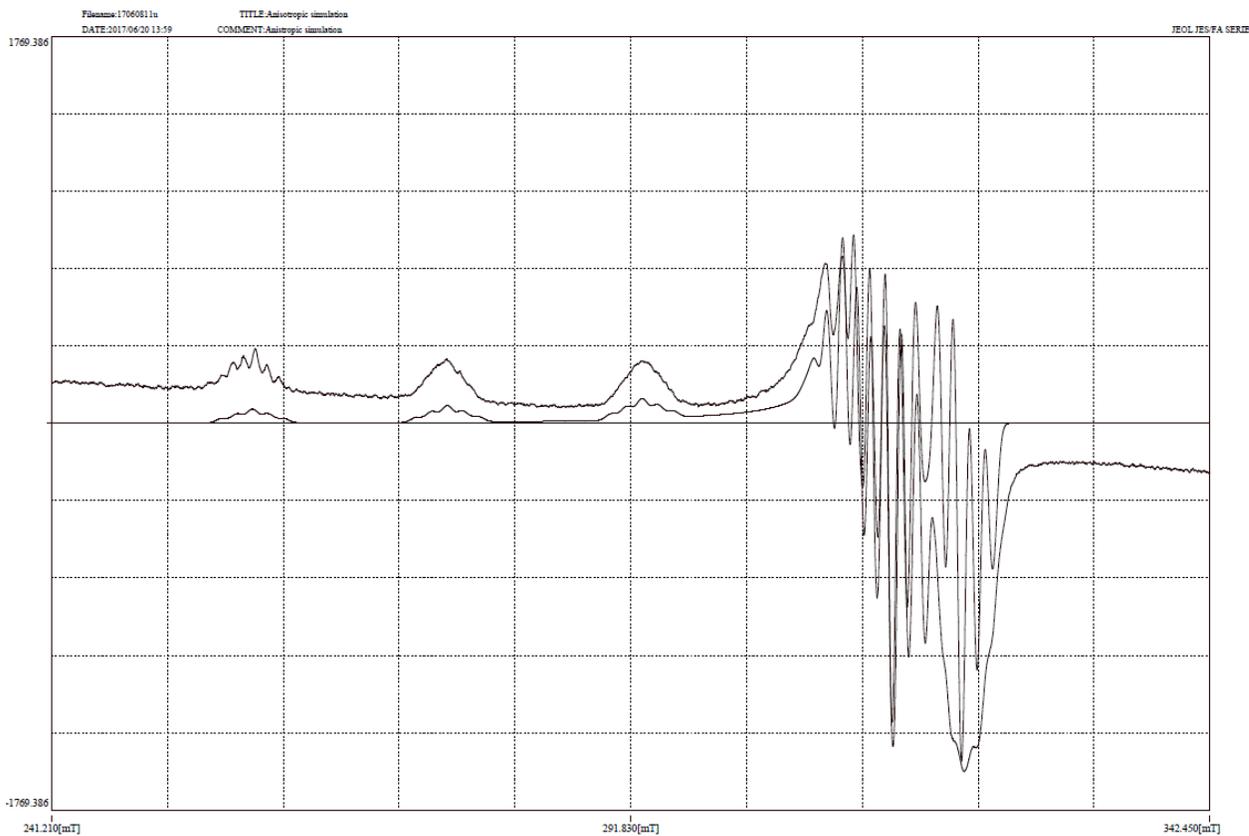


Espectros de resonancia paramagnética electrónica
del compuesto [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

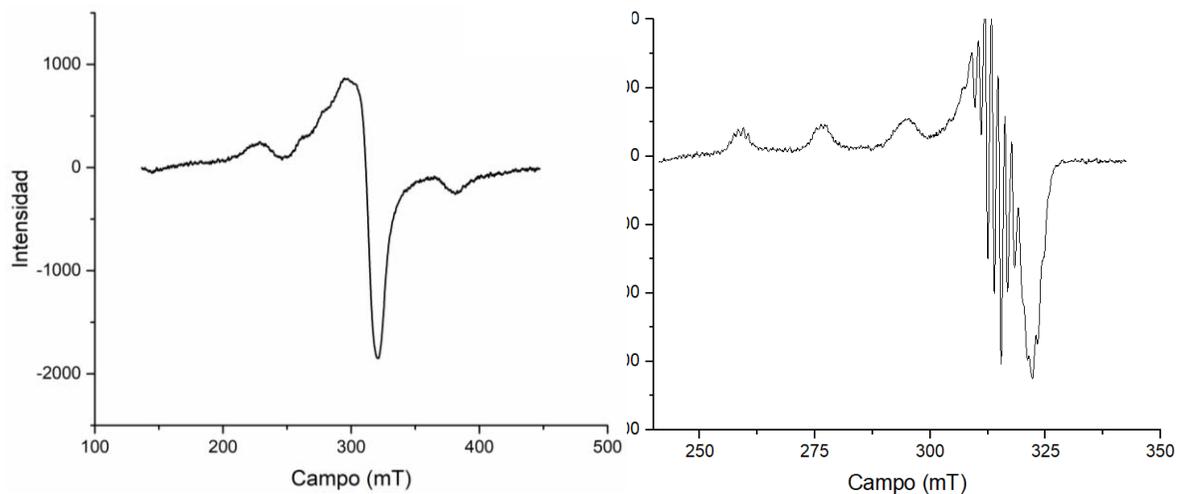


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

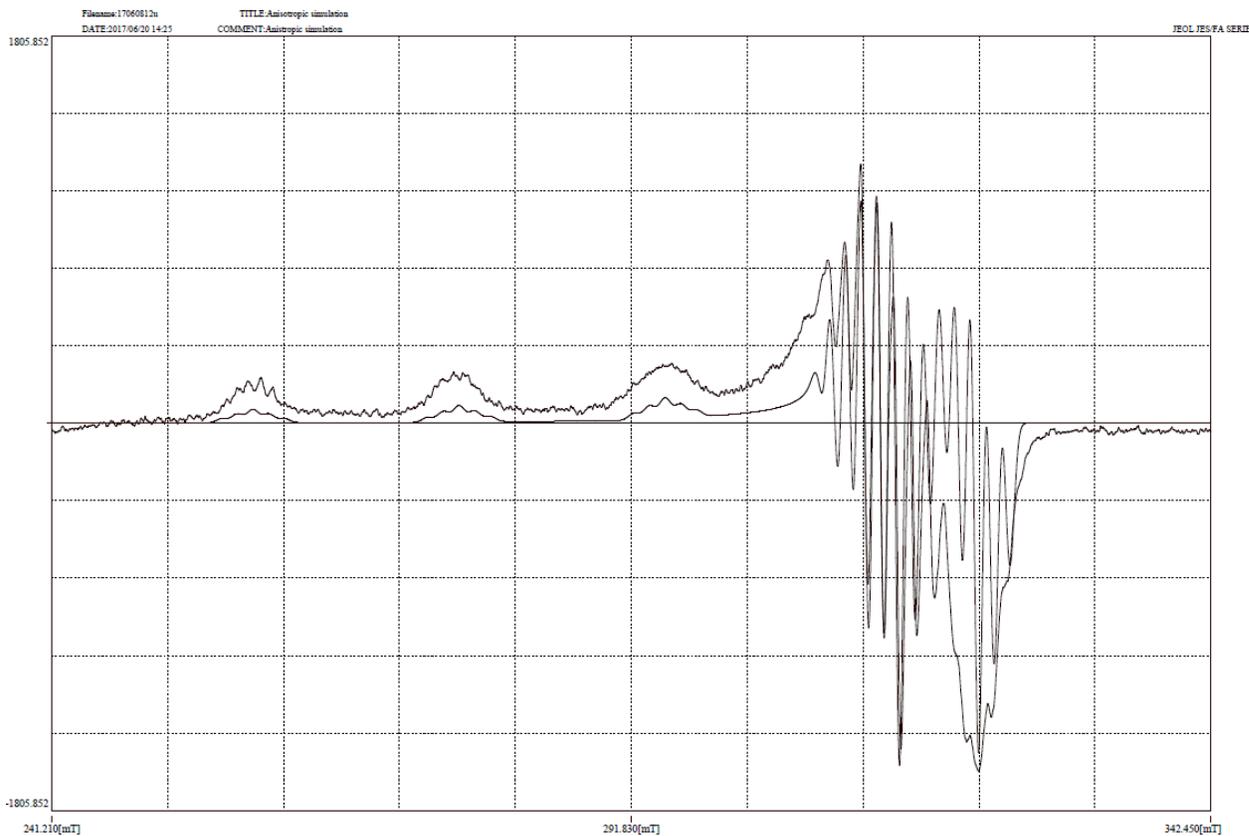


Espectros de resonancia paramagnética electrónica
del compuesto [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

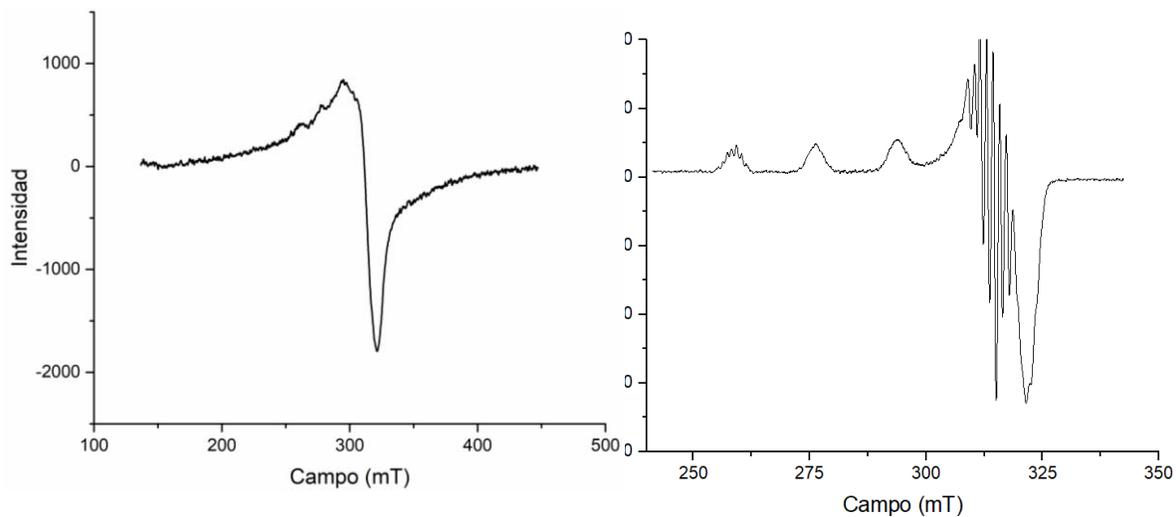


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

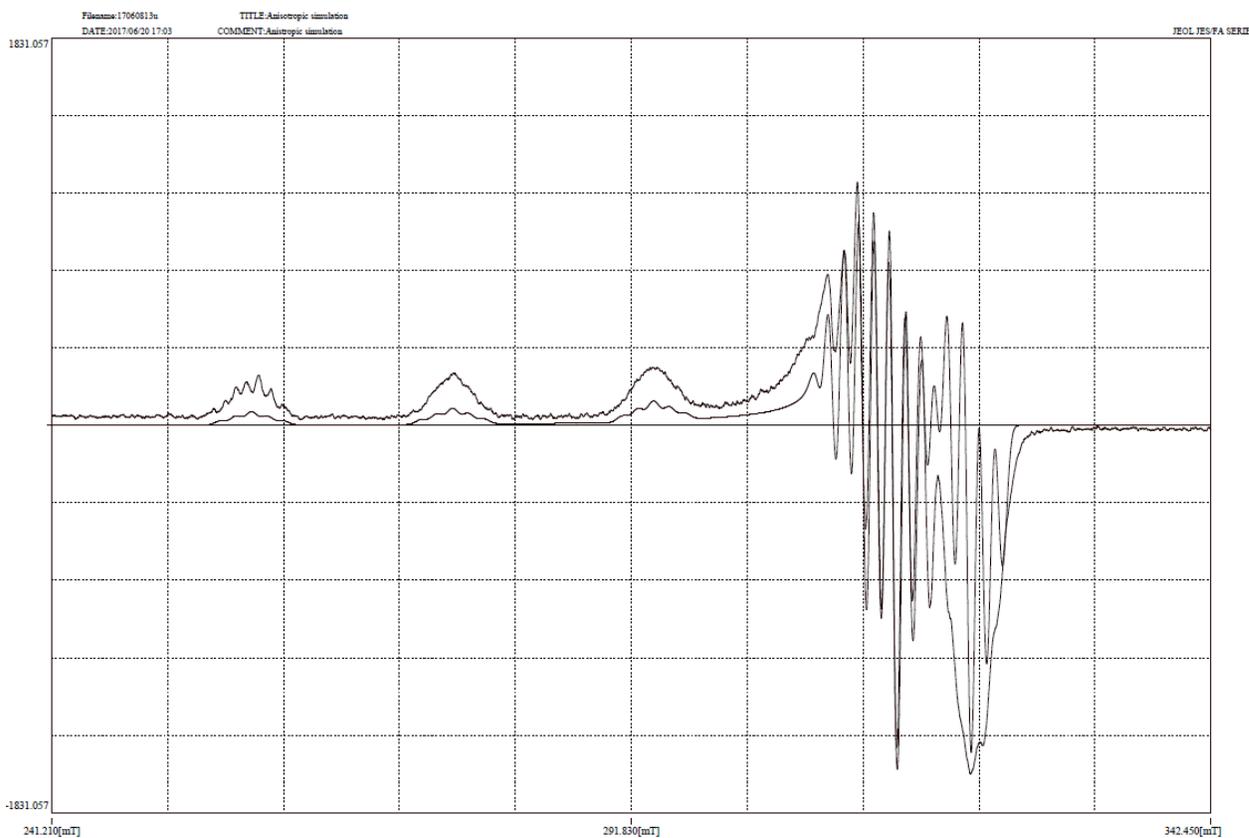


Espectros de resonancia paramagnética electrónica del compuesto [Cu(bipy)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

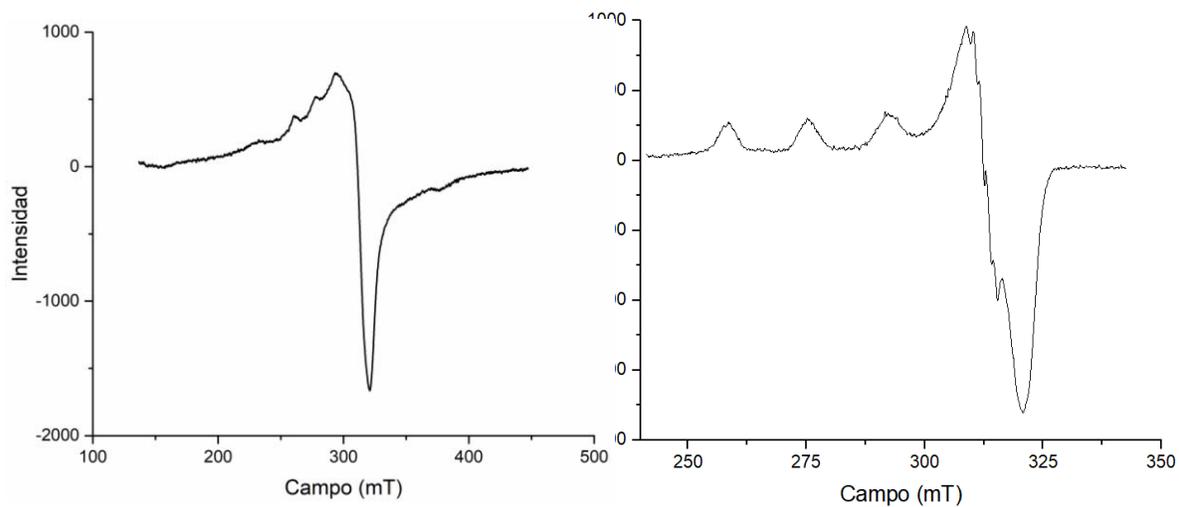


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

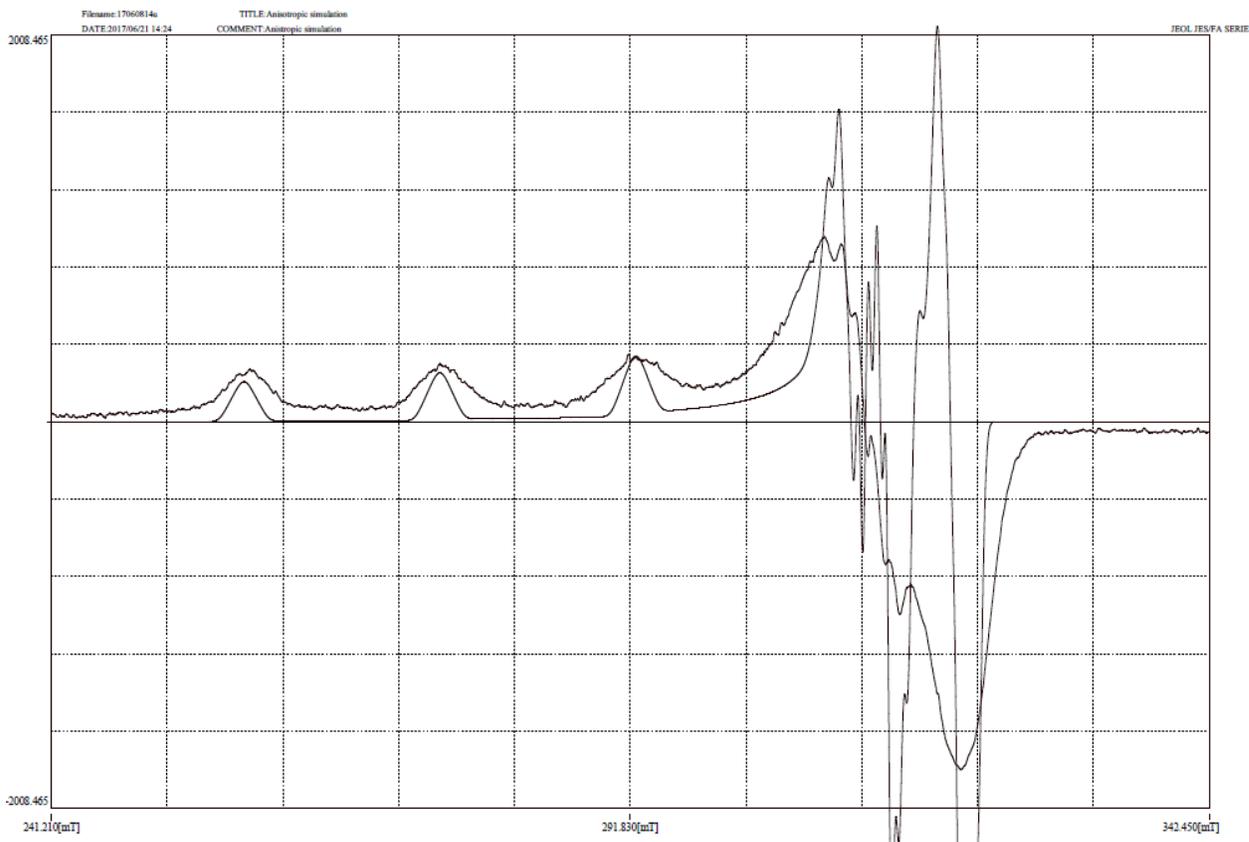


Espectros de resonancia paramagnética electrónica del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

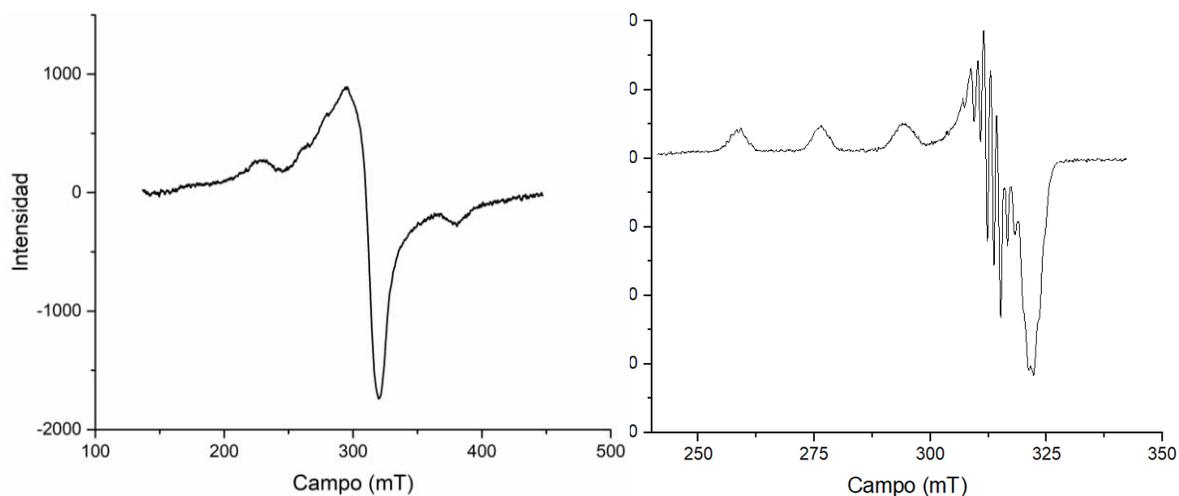


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

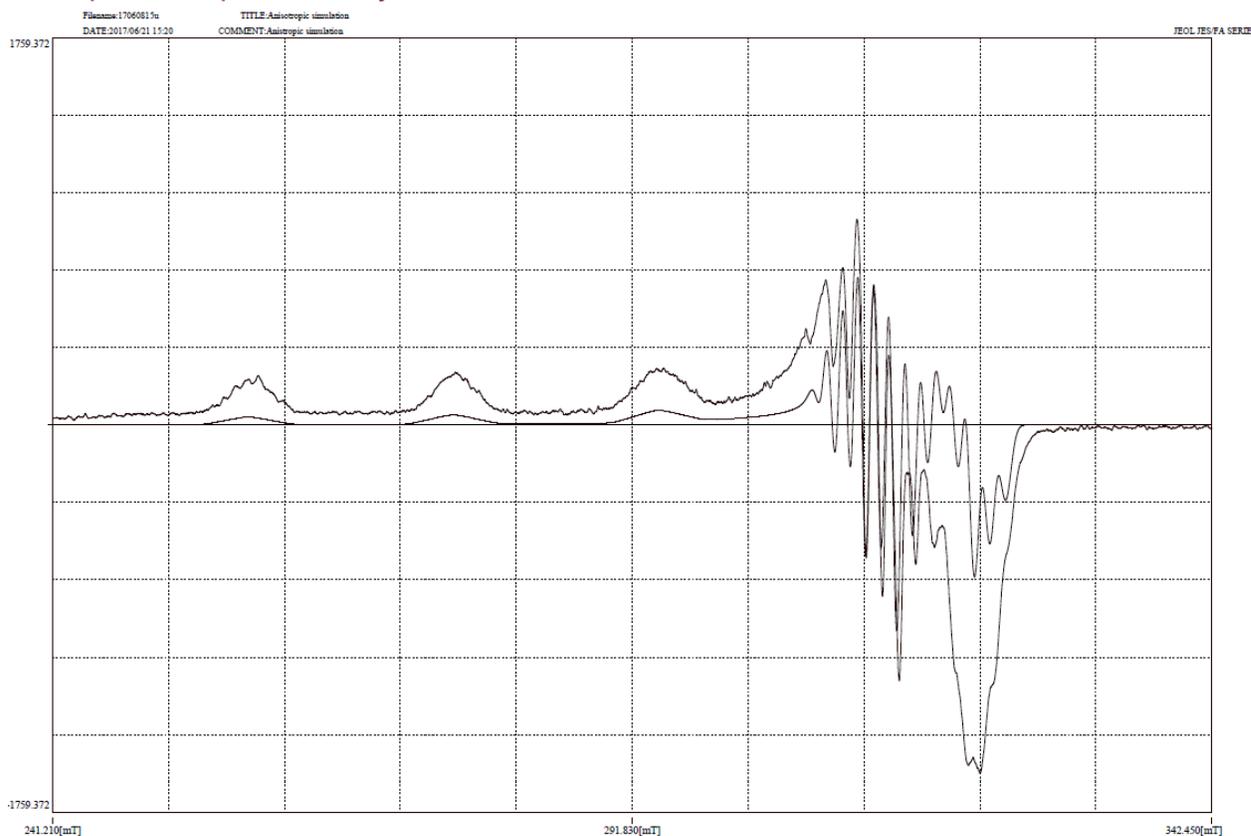


Espectros de resonancia paramagnética electrónica
del compuesto [Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃

Estado sólido, temperatura ambiente y disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

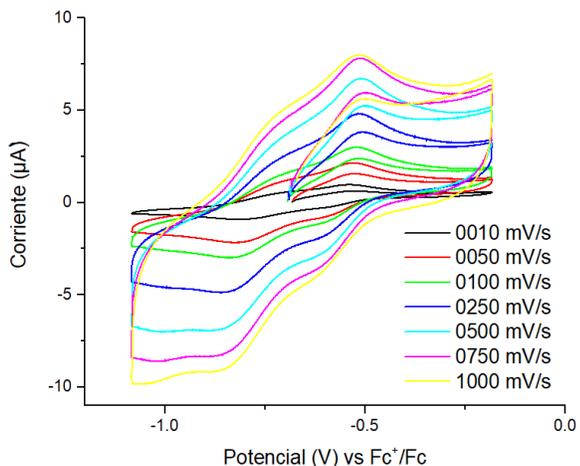
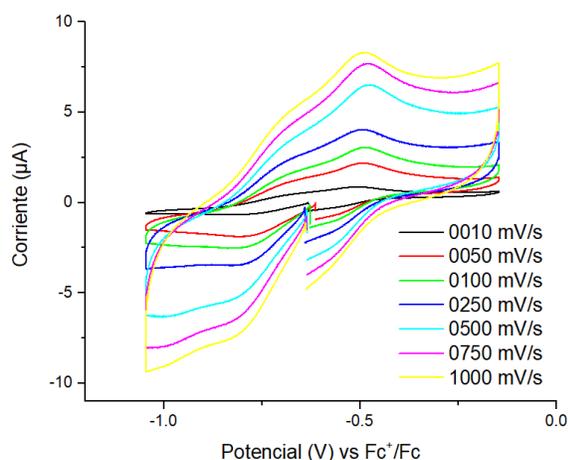


Espectro experimental y simulado en disolución 3 mmol L⁻¹ en MeOH a 77 K.

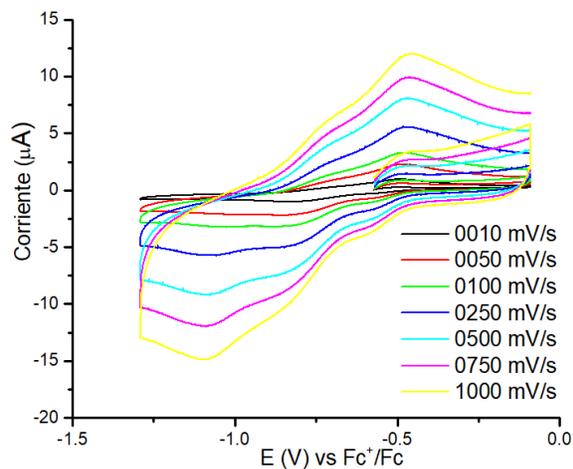
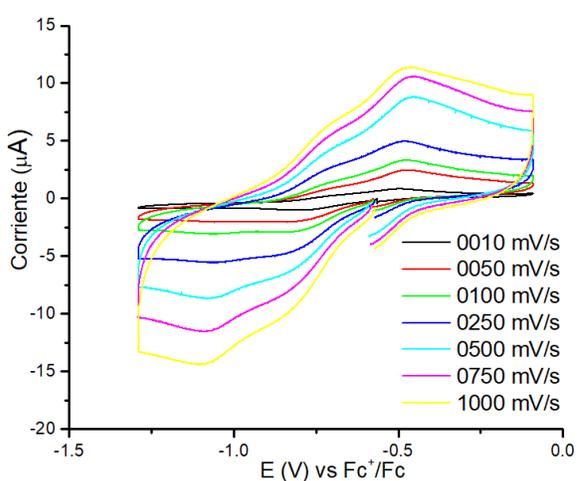


Anexo 4. Voltamperogramas

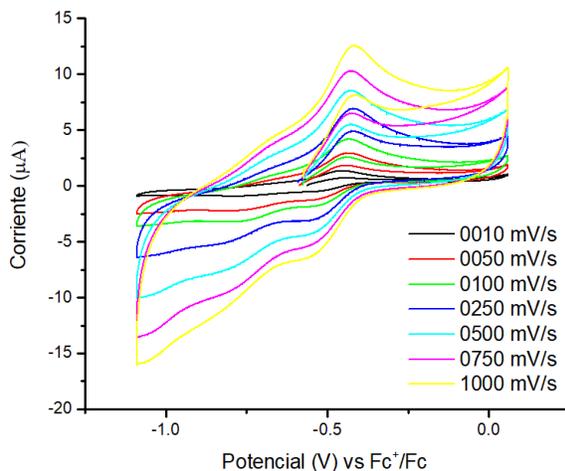
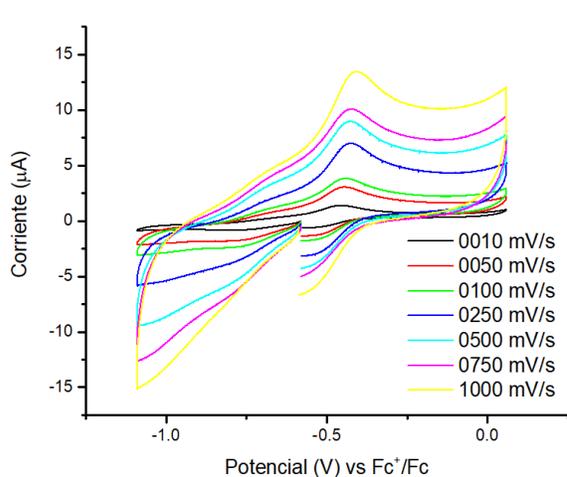
Voltamperogramas del compuesto [Cu(fen)(Indo)]NO₃



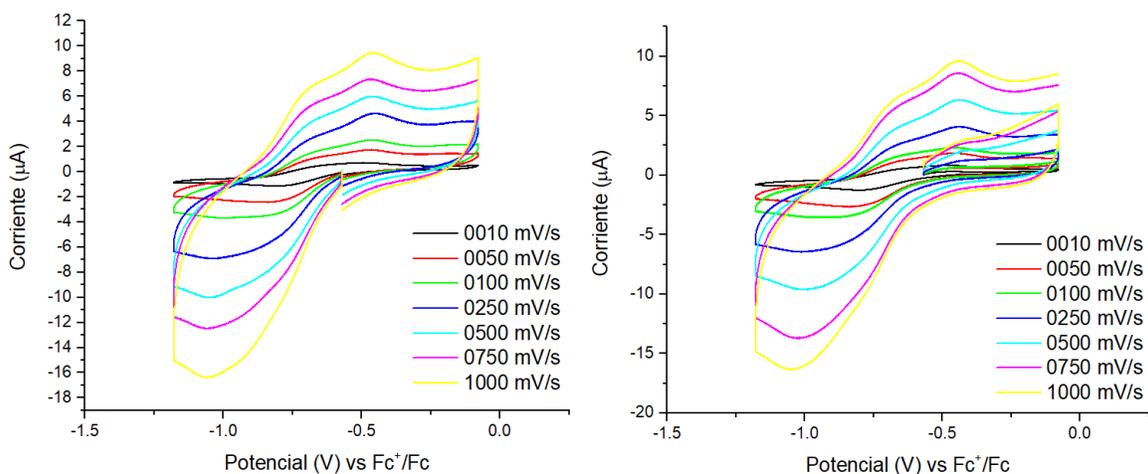
Voltamperogramas del compuesto [Cu(4,7-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



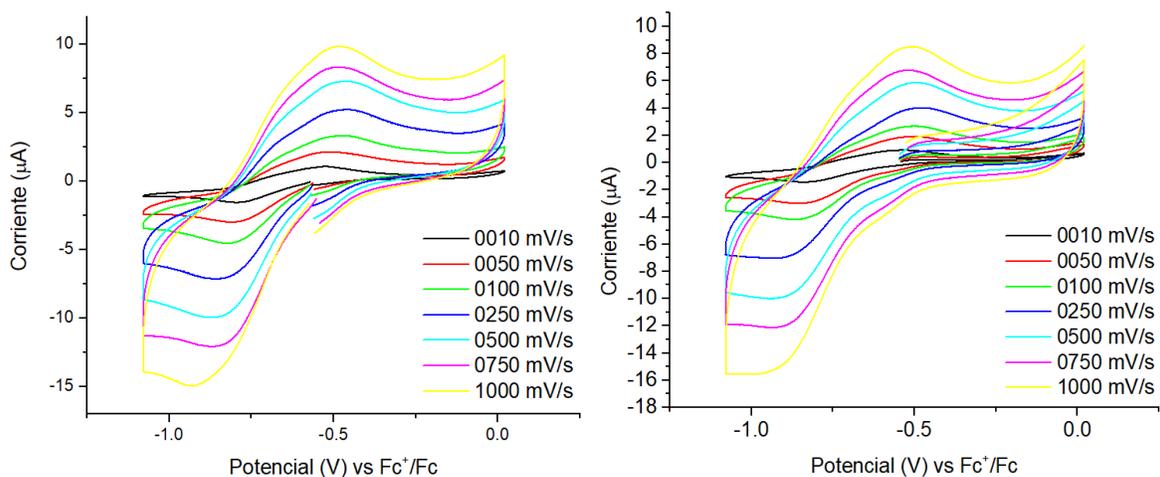
Voltamperogramas del compuesto [Cu(5,6-dimetil-fen)(Indo)]NO₃



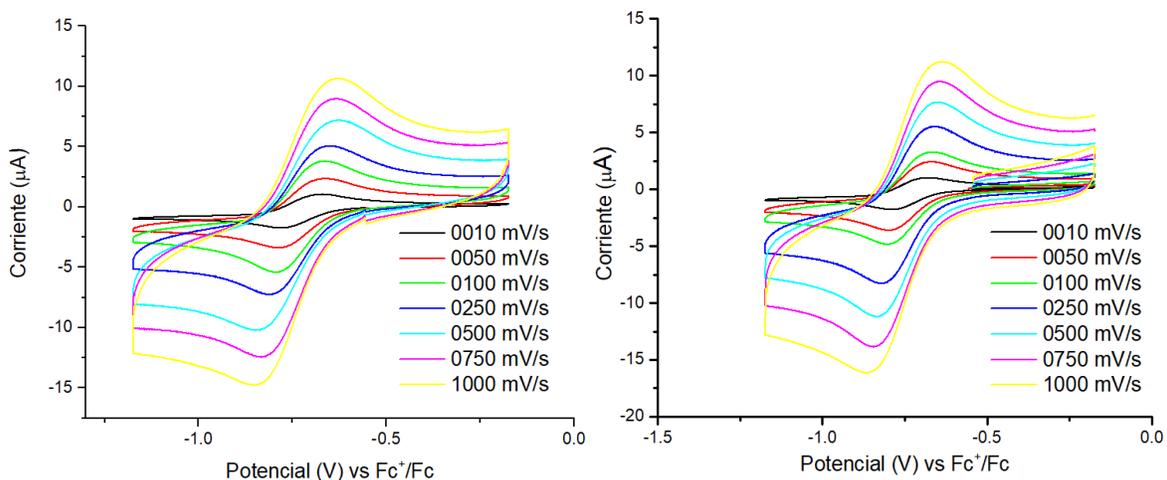
Voltamperogramas del compuesto [Cu(3,4,7,8-tetrametil-fen)(Indo)]NO₃



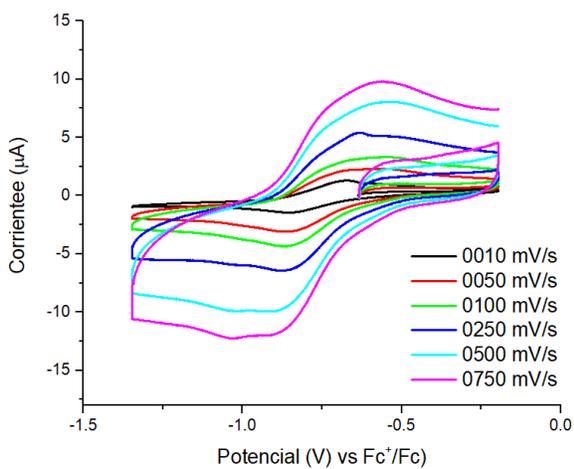
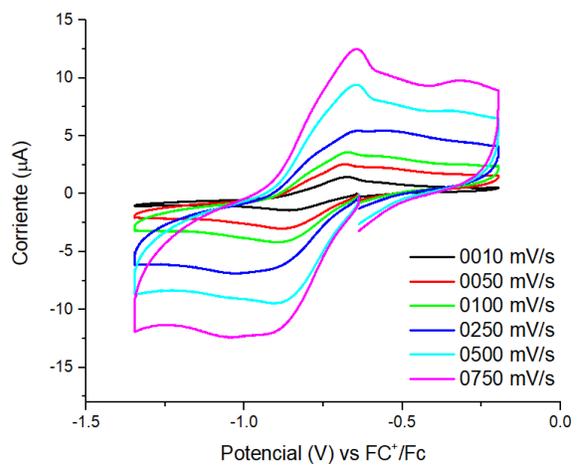
Voltamperogramas del compuesto [Cu(bipy)(Indo)]NO₃



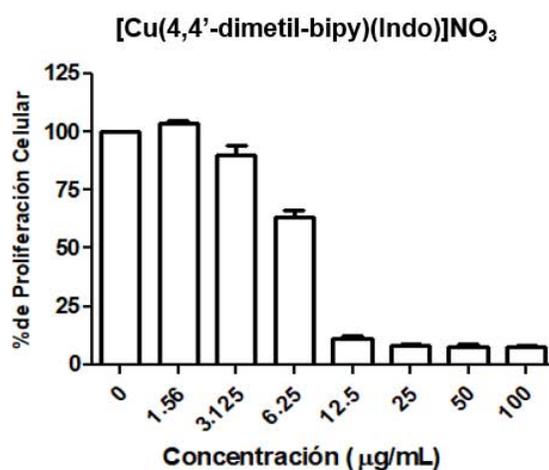
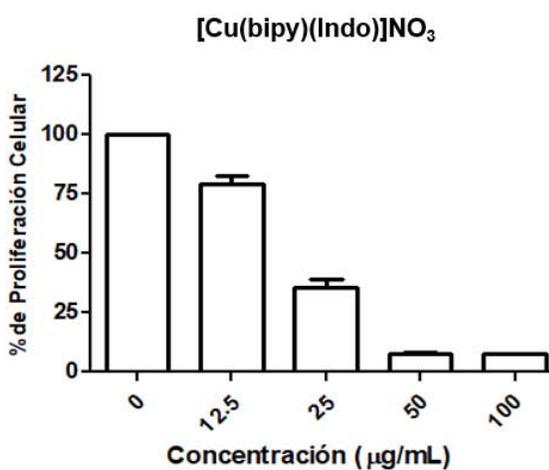
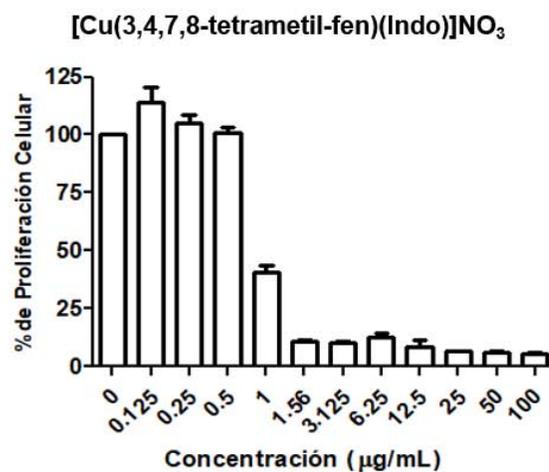
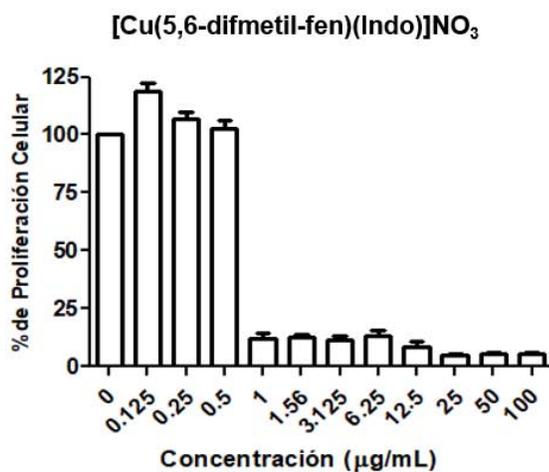
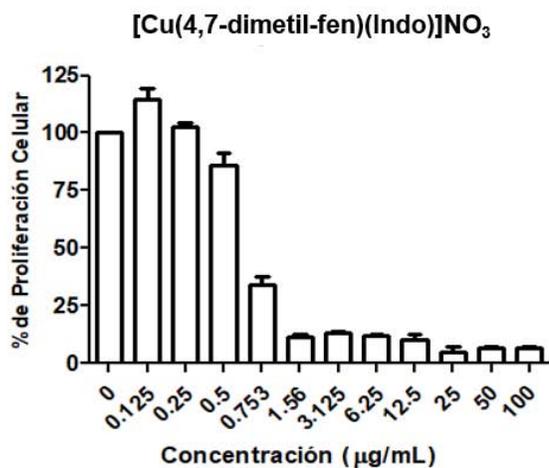
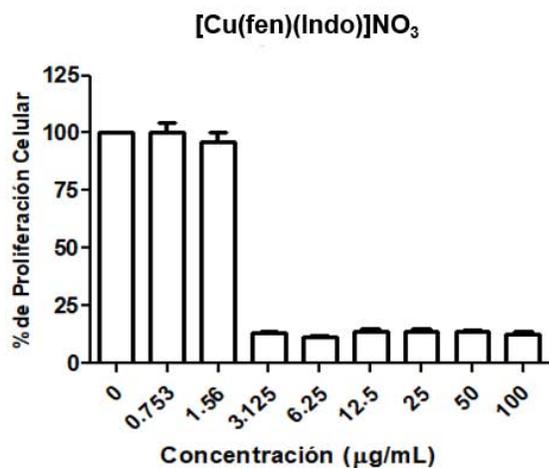
Voltamperogramas del compuesto [Cu(4,4'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃

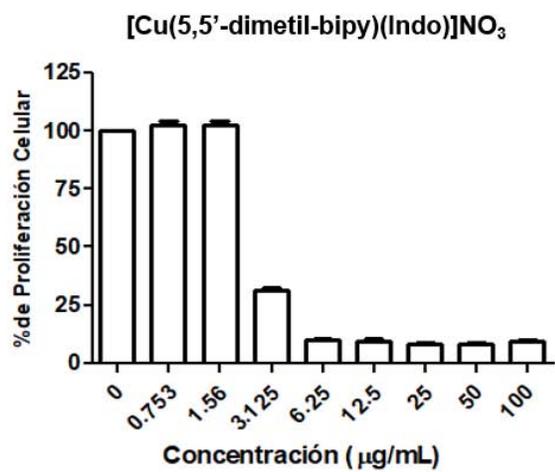


Voltamperogramas del compuesto [Cu(5,5'-dimetil-bipy)(Indo)]NO₃



Anexo 5. Gráficas de actividad antiproliferativa





Anexo 6. Datos de porcentaje de encapsulación

Porcentaje de encapsulación pH=5.0					
Tiempo (h)	Sistema A	Sistema B	Sistema C	Promedio	Desviación Estándar
0.5	45.06	41.77	48.53	45.12	3.38
1	55.56	59.28	64.89	59.91	4.69
1.5	74.20	67.87	72.57	71.54	3.29
2	77.68	75.37	80.51	77.85	2.57
2.5	80.68	79.76	83.22	81.22	1.79
3	82.80	81.79	89.24	84.61	4.04
6	85.34	83.70	90.99	86.68	3.82
9	87.16	85.76	94.98	89.30	4.97
24	89.02	88.74	94.97	90.91	3.52
27	90.51	89.90	96.57	92.32	3.69
31	91.20	90.52	96.57	92.76	3.31
55	91.85	91.27	98.12	93.75	3.80
Porcentaje de encapsulación pH=7.4					
Tiempo (h)	Sistema D	Sistema E	Sistema F	Promedio	Desviación Estándar
0.5	20.60	22.90	23.76	22.42	1.63
1	31.31	35.57	35.97	34.28	2.58
1.5	38.27	41.61	39.91	39.93	1.67
2	43.45	47.59	43.96	45.00	2.26
2.5	45.91	55.68	56.71	52.77	5.96
3	55.30	59.17	58.75	57.74	2.12
6	61.18	65.04	64.40	63.54	2.07
9	66.06	69.97	69.41	68.48	2.12
24	69.46	73.24	72.67	71.79	2.04
27	71.62	74.81	75.16	73.86	1.95
31	73.34	76.73	75.16	75.07	1.70
55	74.37	77.61	75.55	75.84	1.64