



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

**“ESTUDIO ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVOS
COMPUESTOS DE COORDINACIÓN TERNARIOS CON
CURCUMINA”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. YESHENIA MARGARITA FIGUEROA DE PAZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LENA RUIZ AZUARA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, 16 de septiembre del 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ESTUDIO ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVOS COMPUESTOS
DE COORDINACIÓN TERNARIOS CON CURCUMINA”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. YESHENIA MARAGARITA FIGUEROA DE PAZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LENA RUIZ AZUARA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, 16 de septiembre del 2022

MIEMBROS DEL JURADO

- PRESIDENTE:** Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens
- VOCAL:** Dra. Silvia Elena Castillo Blum
- VOCAL:** Dr. Andrés Navarrete Castro
- VOCAL:** Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero
- SECRETARIO:** Dra. Patricia Guadarrama Acosta

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL PROYECTO

- Laboratorio 210, Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Química, UNAM
- Laboratorio 05, Departamento de Química Inorgánica
Facultad de Química, UNAM
- Laboratorio de síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas, Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

DEDICATORIAS

A mis papas, hermanas y abuelitos por aguantar mi ausencia y nunca dejarme de querer. A la nueva integrante de mi familia que sin duda alguna se ha convertido en uno de mis motores en la vida, y por quererme tanto, Shanaia González Figueroa (mi sobrina favorita).

A toda mi familia por siempre estar y celebrar mis logros.

A Alan Bernal Ramírez por tu amor, apoyo incondicional, por cuidarme, por alentarme, por nunca soltar mi mano. Siempre, siempre a ti.

¡LOS AMO A TODOS!

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la dirección de esta tesis, su apoyo incondicional, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, pero sobre todo, por ser un gran ejemplo a seguir en todos los aspectos.

A los proyectos UNAM-PAPIIT IN230020, PAIP 5000-9047, gracias a LANCAD-UNAM-DGTIC-358 por los recursos de supercómputo. A CONACYT por la beca otorgada en el periodo 2017-2 - 2021-2 con número de becario 589195.

A todos los sinodales por su tiempo, comentarios y sugerencias que sin duda alguna mejoraron la presentación de mi proyecto.

A la M. en C. Olivia Soria Arteche y al Dr. Pérez-Villanueva por brindarme un espacio y apoyo en mi corta estancia en la UAM-X, para la síntesis de los ligantes, y a todas las personas que hicieron más llevadera mis días como el Dr. Francisco Palacios, Dr. Francisco, Karen, Edgar y Viridiana.

Al Dr. Luis Ortiz Frade por el conocimiento brindado y por permitirme realizar algunas pruebas que me permitieron plantear los experimentos Voltamperometría Cíclica, en laboratorios del Centro De Investigación y Desarrollo Tecnológico En Electroquímica (CIDETEQ).

A la M. en C. Virginia Gómez Vidales por su apoyo técnico en resonancia paramagnética electrónica y por su asesoramiento.

Al Dr. Diego Martínez Otero por la elucidación de las estructuras cristalinas.

A la Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens, por permitirme realizar los experimentos de susceptibilidad magnética en su laboratorio.

Al M. en C. Mauricio Ballesteros por el apoyo técnico y su asesoramiento en el planteamiento de los experimentos de actividad biológica (lab. 5). A la M. en C. Cynthia Novoa Ramírez por tu apoyo en el laboratorio y la simulación de espectros de RPE, pero sobre todo por brindarme tú amistad. Al Q.B.C. Rogelio Hurtado Alamea por tu apoyo, y conocimiento brindado (lab. 5); pero sobre todo por siempre hacer ameno cualquier lugar (muchas risas!).

Al a la M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz y a la Q. María de la Paz Orta Pérez espectroscopia de masas MALDI-TOF y por la realización de análisis elemental en el Instituto de Química.

Al M. en C. Adrián Espinoza Guillen por el apoyo técnico. A todos los integrantes del laboratorio 210 y 05, por sus sugerencias e interés hacia mi trabajo.

CONGRESOS Y PUBLICACIONES

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio de Química Inorgánica Medicinal 210 y 05, dentro del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear en la Facultad de Química, UNAM.

Los resultados del proyecto fueron presentados en:

- Congreso de Sociedad Química de México. “La química nos une”. “Estudio estructura actividad de nuevos compuestos de coordinación ternarios de Cu (II) con curcumina”. Septiembre 2020. Cartel.
- Simposio de Química Inorgánica Medicinal, SiQIM. “Estudio estructura actividad de nuevos compuestos de coordinación ternarios de Cu(II) con curcumina”. Mayo 2021. Presentación oral.
- Encuentro Virtual de Química Inorgánica, EQI. “Structure-activity studies of new ternary coordination compounds of Cu(II) with curcumin”. Octubre 2021. Cartel virtual.
- Seminarios-Académicos en la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León. “Compuestos de Coordinación de Cobre(II): Un potente Héroe Frente al Cáncer. Síntesis, Caracterización y evaluación biológica de Casiopeínas de Tercera Generación”. Mayo 2022. Presentación oral online.

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación han sido publicados en:

- **Yeshenia Figueroa-DePaz**, Jaime Pérez-Villanueva, Olivia Soria-Arteche, Diego Martínez-Otero, Virginia Gómez-Vidales, Luis Ortiz-Frade and Lena Ruiz-Azuara. Casiopeinas of Third Generations: Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity and Structure-Activity Relationships of Mixed Chelate Compounds with Bioactive Secondary Ligands. *Molecules*, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27113504>.
- Reina Tapia, Miguel; Talavera Contreras, Luis Gabriel; **Figueroa-DePaz, Yeshenia**; Ruiz-Azuara, Lena; Hernández Ayala, Luis. Casiopeinas® as SARS-CoV-2 main protease (Mpro) inhibitors. A combined DFT, molecular docking and ONIOM approach. *New Journal of Chemistry*, 2022, doi: <https://doi.org/10.1039/D2NJ01480G>.

RESUMEN

Las casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación de cobre(II) que han mostrado un importante efecto antineoplásico y baja toxicidad en células normales. Estos compuestos inducen la muerte de las células por apoptosis a través de procesos redox catalíticos con agentes reductores endógenos. Otros estudios incluyeron una variación estructural que mejora la actividad y la selectividad en células cancerosas u otros blancos moleculares como el ADN. En el presente trabajo reportamos el diseño, síntesis, caracterización y actividad antiproliferativa de dieciséis nuevos compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina o dimetoxicurcumina como ligantes secundarios (molécula bioactiva de tipo bidentado monocargado), clasificados como: tercera generación de casiopeínas. Todos los compuestos se caracterizaron por análisis elemental, IR-TF, UV-Vis, conductividad eléctrica, susceptibilidad magnética, espectrometría de masas con MALDI-TOF, voltamperometría cíclica, resonancia paramagnética electrónica en sólido y difracción de rayos X. Se empleó RMN de ^1H y ^{13}C para la caracterización de los ligantes. Se obtuvieron monocristales en DMSO de dos compuestos de coordinación, se demostró que en sólido estos compuestos adoptan una geometría de base cuadrada o pirámide de base cuadrada encontrando al ion nitrato como contraión. Se determinó una relación estequiométrica 1:1:1 (diimina:cobre:curcuminoide). El ensayo de sulforrodamina B se utilizó para evaluar el efecto de citotoxicidad frente a dos líneas celulares de cáncer humano SKLU-1 y HeLa, todos los compuestos de coordinación de cobre presentaron una mayor actividad antiproliferativa respecto a los curcuminoides libres. De forma paralela, se realizaron cálculos computacionales con el nivel de teoría DFT para obtener descriptores electrónicos y el potencial redox. Las relaciones estructura-actividad están fuertemente determinadas por el potencial redox ($E_{1/2}$) del cobre(II) y el volumen molar (V) de los complejos con curcumina. Estos compuestos se pueden utilizar como plantilla para abrir un amplio campo de investigación tanto experimental como teórico. Se discute las mejoras en actividad contra los cambios estructurales sobre los compuestos de primera generación. Se realizaron estudios docking y ONIOM para cuatro moléculas con la proteína M^{pro} , resultando en compuestos candidatos para el tratamiento de SARS-CoV-2.

Índice

DEDICATORIAS.....	- 2 -
AGRADECIMIENTOS	- 3 -
CONGRESOS Y PUBLICACIONES.....	- 4 -
RESUMEN	- 5 -
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	- 9 -
1.1 CÁNCER	- 9 -
1.2 ESTADÍSTICAS DE LA INCIDENCIA Y MORTANDAD DE CÁNCER	- 9 -
1.3 TRATAMIENTOS EMPLEADOS CONTRA EL CÁNCER	- 11 -
1.3.1 QUIMIOTERAPIA	- 12 -
1.3.1.1 Compuestos Orgánicos	- 12 -
1.3.1.2 Compuestos Inorgánicos	- 13 -
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	- 15 -
2.1 DISEÑO DE FÁRMACOS	- 15 -
2.2 CASIOPEÍNAS, FÁRMACOS DIRIGIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.....	- 17 -
2.2.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS CASIOPEÍNAS	- 20 -
2.2.2 ESTUDIOS PRECLÍNICOS	- 21 -
2.3 CURCUMINA	- 23 -
2.3.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	- 23 -
2.3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMOS DE ACCIÓN	- 24 -
2.3.3 ENSAYOS CLÍNICOS DE LA CURCUMINA	- 26 -
2.4 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON CURCUMINA. UNA PERSPECTIVA BIOLÓGICA	- 26 -
2.4.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON METALES DE LA PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA SERIE DE TRANSICIÓN	- 27 -
2.5 ANALÓGOS Y DERIVADOS DE CURCUMINA	- 29 -
2.5.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON ANALOGOS DE CURCUMINA	- 31 -
2.5.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE DERIVADOS DE CURCUMINA Y SUS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN	- 32 -
2.6 COVID-19	- 33 -
2.6.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN COMO POSIBLES TRATAMIENTOS DEL COVID-19.....	- 34 -
2.7 HIPÓTESIS	- 37 -
2.8 OBJETIVO GENERAL	- 37 -
2.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 37 -
CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	- 38 -
3.1 REACTIVOS.....	- 38 -
3.2 EQUIPOS Y CARACTERIZACIÓN	- 38 -
3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO IR-TF	- 39 -
3.2.2 ANÁLISIS ELEMENTAL	- 39 -
3.2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	- 39 -
3.2.4 CONDUCTIVIDAD	- 39 -

3.2.5 SUSCEPTIBILIDAD MÁGNETICA Y MOMENTO MAGNÉTICO.....	- 39 -
3.2.6 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	- 39 -
3.2.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	- 40 -
3.2.8 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (RPE).....	- 40 -
3.2.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL.....	- 40 -
3.2.10 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	- 40 -
3.2.11 PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	- 41 -
3.3 MÉTODOS COMPUTACIONALES.....	- 41 -
3.3.1 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEDIA ONDA.....	- 42 -
3.3.2 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	- 43 -
3.3.3 DOCKING MOLECULAR.....	- 44 -
3.3.4 ESTUDIOS ONIOM QM:MM.....	- 44 -
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 46 -
4.1 SÍNTESIS DE LOS LIGANTES CURCUMINA Y DIMETOXICURCUMINA.....	- 46 -
4.1.1 SÍNTESIS DE CURCUMINA (L1).....	- 46 -
4.1.2 SÍNTESIS DE DIMETOXICURCUMINA (L2).....	- 47 -
4.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H Y ¹³ C.....	- 49 -
4.2.1 RESONANCIA DE ¹ H Y ¹³ C DE LOS LIGANTES CURCUMINA (L1) Y DIMETOXICURCUMINA (L2).....	- 49 -
4.3 SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE(II) CON CURCUMINA (L1) Y DIMETOXI CURCUMINA (L2).....	- 53 -
4.3.1 PUNTOS DE FUSIÓN.....	- 56 -
4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	- 57 -
4.3.3 ANÁLISIS ELEMENTAL.....	- 60 -
4.3.4 CONDUCTIVIDAD.....	- 61 -
4.3.5 SUSCEPTIBILIDAD MAGNÉTICA Y MOMENTO MAGNÉTICO.....	- 62 -
4.3.6 ESPECTROSCOPIA DE UV-Visible.....	- 63 -
4.3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR DESORCIÓN-IONIZACIÓN LASER ASISTIDA POR MATRIZ-TIEMPO DE VUELO (MALDI-TOF).....	- 69 -
4.3.8 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA.....	- 73 -
4.3.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL.....	- 76 -
4.3.10 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	- 82 -
4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	- 87 -
4.4.1 ACTIVIDAD DE CITOTOXICIDAD.....	- 87 -
4.5 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL REDOX TEÓRICO.....	- 89 -
4.5.1 DETERMINACIÓN DE DESCRIPTORES ELECTRÓNICOS.....	- 90 -
4.6 CORRELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	- 92 -
4.7 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE E INHIBICIÓN DE MPRO MEDIANTE SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	- 93 -
4.7.1 ANÁLISIS DEL CENTRO DE COBRE EN LA INTERACCIÓN CAS:M _{PRO} . CÁLCULOS DE ONIOM.....	- 97 -
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	- 98 -
CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS.....	- 100 -
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS.....	- 101 -

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células y puede afectar cualquier parte del cuerpo. Se ha observado que para todos los tipos de cáncer, algunas de las células anormales del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y sin interrupción, estas pueden invadir tejidos cercanos o diseminarse más allá de sus límites habituales a otros órganos por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original, en un proceso que se denomina metástasis, de hecho es la principal causa de muerte por la enfermedad [1].

1.2 ESTADÍSTICAS DE LA INCIDENCIA Y MORTANDAD DE CÁNCER

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muertes a nivel mundial. El 2016, las enfermedades no transmisibles causaron el 54% de muertes en el mundo. En comparación con el año 2012 estas enfermedades causaron el 68% de decesos a nivel mundial. Esto podría reflejar los avances en investigación multidisciplinario que contribuyen a generar información, nuevas técnicas o nuevos tratamientos para estas patologías. Ahora bien, las principales entidades nosológicas que provocaron el 54% de muertes a nivel mundial en el año 2016 fueron las enfermedades cardiovasculares (15.2 millones de defunciones), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (3 millones de fallecimientos), el cáncer (cobró 1.7 millones de vidas), la diabetes (1.6 millones de muertes) y enfermedades atribuibles a la demencia que se duplicaron entre 2000 y 2016, lo cual hizo que esta enfermedad se convirtiera en la quinta causa de muerte en el mundo en 2016 [2].

El 12 de septiembre del 2018 la OMS reportó que el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Los datos mostrados al público dictaron que los cánceres con mayor incidencia y causantes de 9.6 millones de fallecimientos en ese año tanto en hombres como en mujeres fueron: cáncer de pulmón (1.69 millones), cáncer hepático (788 000), cáncer colorrectal (774 000), cáncer gástrico (754 000) y cáncer mamario (571 000). El último reporte en este año (2022) realizado por la OMS menciona que el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo después de enfermedades cardiovasculares y en el año 2020 se atribuyeron casi 10 millones de muertes

en ambos sexos por cáncer, donde el cáncer de pulmón, colorrectal, hígado, estómago y pecho son los más importantes en ese orden (Figura 1) [3].

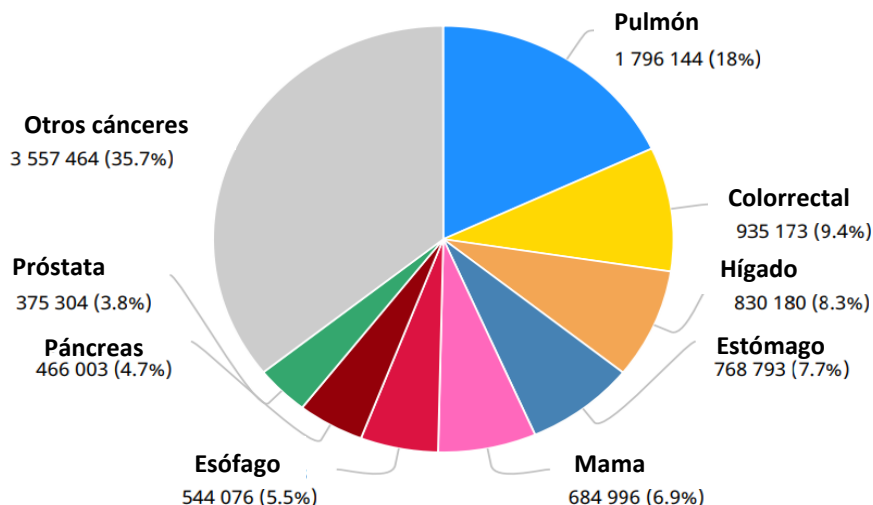


Figura 1. Número de muertes en 2020, en ambos sexos, de todas las edades. (Imagen tomada de la página oficial de la OMS)

Los datos de mortalidad en México reportados en 2018 por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) muestra un panorama similar a las estadísticas presentadas a nivel mundial. En México, el cáncer es la tercera causa de mortandad tanto en hombres como en mujeres, presentándose en ese año un total de 85,754 muertes por esta enfermedad donde sobresalen los de órganos digestivos con 27,455 casos (32%), seguidos de los de órganos genitourinarios con 19,798 casos (23.1%) y los de huesos de cartílagos articulares, del tejido conjuntivo, de la piel y de la mama con 11,647 casos (13.6%). Del total de las muertes por tumores malignos, el 51.5 % corresponde a mujeres y el 48.5% a hombres [4] mientras que durante el periodo de enero-junio de 2021 las cuatro principales causas de muerte a nivel nacional fueron: COVID-19 (145,159), enfermedades del corazón (113,899), diabetes mellitus (74,418) y tumores malignos (44,197). Por ello, desde diciembre 2019, la investigación abocada a encontrar tratamientos para la emergencia sanitaria por COVID-19 también es de alta prioridad y será discutido de manera breve en una sección del proyecto [4].

1.3 TRATAMIENTOS EMPLEADOS CONTRA EL CÁNCER

En los últimos 10 años la incidencia y mortandad tanto en mujeres como en hombres a causa del cáncer ha ido en aumento, lo que ha impulsado la búsqueda para prevenir, combatir y tratar esta patología mediante el desarrollo de distintas metodologías. Hoy en día existen varios tratamientos que pueden emplearse de manera independiente o combinada según el tipo de cáncer (localización del tumor) o según la carcinogénesis (desarrollo del tumor) a estos dos informes se les conoce como estadificación del cáncer (el sistema TNM es el más empleado).

Las metodologías empleadas para el tratamiento de cáncer son: radioterapia, cirugía, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y trasplantes de células madre siendo las primeras tres las más utilizadas. A continuación, se describe de manera breve estos tratamientos [5,6].

- **CIRUGÍA:** es un procedimiento médico en el cual un cirujano con capacitación especial extirpa el tumor maligno de alguna parte del cuerpo. Es un tratamiento local y exitoso para tumores sólidos que están contenidos en un sitio; es decir, no se utiliza para leucemias o para cánceres que se han extendido. Dependiendo del tipo y de lo avanzado que este el cáncer el procedimiento puede emplearse solo o combinado con alguna otra terapia [5].
- **RADIOTERAPIA:** es un tratamiento para cáncer que utiliza dosis altas de radiación (en general, rayos o partículas de alta energía como rayos X o protones) para destruir células cancerosas y reducir tumores, esto porque la radiación daña al ADN y estas dejan de dividirse (lo que evita que se propaguen) o mueren. Una ventaja de este método, es que la radiación se aplica de manera local, lo que significa que trata una parte específica del cuerpo con lo que se puede reducir el daño a células sanas [5,6].
- **QUIMIOTERAPIA:** este es uno de los tratamientos más empleados para cáncer y se caracteriza por la administración de fármacos (que puedan ser citotóxicos, citostáticos y antineoplásicos) para matar, detener o disminuir el crecimiento acelerado de las células cancerosas. Una de las ventajas de este tratamiento es que puede

ser utilizado contra muchos tipos de cánceres. Esta terapia puede ser de tipo oral, intravenosa, inyectada, intraperitoneal, intratecal, intraarterial o tópica. Además, puede combinarse con otro tipo de terapias como las ya mencionadas [7,8].

Debido a los múltiples resultados obtenidos con la quimioterapia en el tratamiento de cáncer, este es uno de los tratamientos más utilizados hoy en día; sin embargo, muchos de los fármacos empleados generan diferentes efectos secundarios o adversos, por esta razón diversos grupos de investigación se han dado la tarea de buscar, diseñar, sintetizar o generar nuevas moléculas que hagan frente a esta patología, con el objetivo que se mejore la actividad biológica de estos frente a diferentes tipos de cánceres y disminuir o evitar los efectos tóxicos en los pacientes.

1.3.1 QUIMIOTERAPIA

Actualmente los quimioterapéuticos se pueden clasificar en diversas categorías: en función de su sitio de acción, su mecanismo de acción, su estructura química o por el modo en el que afectan a las células malignas. En 2003, un grupo de investigación propuso un sistema nuevo de clasificación de fármacos basado en blancos terapéuticos, es decir, el lugar o diana donde el fármaco va a ejercer su función [9]; luego, Xiong-Zhi en 2006 planteó una clasificación basada en mecanismos biológicos celulares [10]; en 2012 otro grupo de investigadores propusieron una clasificación según su efecto farmacológico [11]. Aunque las clasificaciones anteriores son muy novedosas y ayudan al rediseño de fármacos, en química se emplea una clasificación en cuanto a la estructura molecular, lo que hace más sencillo y rápido de analizar según sus propiedades físicas y químicas propias de las moléculas. Esta clasificación está basada en: compuestos orgánicos e inorgánicos:

1.3.1.1 Compuestos Orgánicos

En la actualidad, el tratamiento de diversos tipos de cánceres es asistido con moléculas de índole orgánica, de hecho, los primeros fármacos aplicados fueron de las familias de las acridinas y antraciclinas; como la actinomicina D (1940's) y la doxorubicina (1950's), respectivamente (figura 2). El antibiótico actinomicina D fue empleado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer tales como sarcomas, tumores de Wilms, cáncer en células germinales y melanomas. La doxorubicina es principalmente

empleada en el tratamiento de linfomas Hodgking y otros diferentes tipos de cánceres [11].

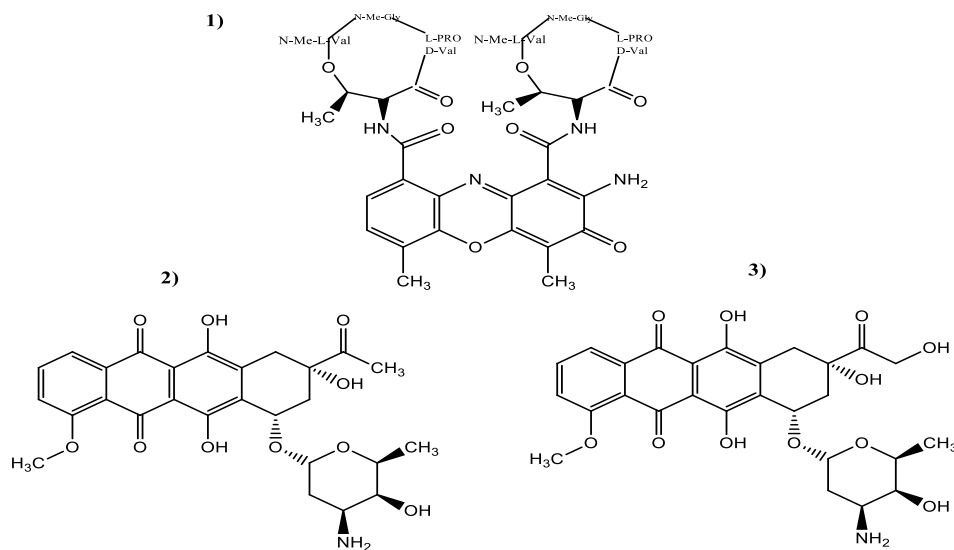


Figura 2. Estructura química de los primeros compuestos orgánicos utilizados para el tratamiento de cáncer. 1) actinomycin D, 2) Daunorubicina y 3) doxorubicina

Los fármacos derivados de acridinas y antraciclina no son selectivos hacia células de cáncer, por lo que son altamente tóxicos para el paciente. Estos efectos condujeron a la búsqueda del mecanismo de acción de dichos compuestos, se encontró que tienen interacción con ácidos nucleicos, es decir; dañan al material genético [11,12].

1.3.1.2 Compuestos Inorgánicos

Los avances en investigación en áreas como la química inorgánica, química de coordinación, bioquímica, bioinorgánica, medicina, farmacia, entre otras, han conducido al desarrollo y evaluación de fármacos inorgánicos para el tratamiento del cáncer, los cuales han mostrado ser una buena alternativa en cuanto a su eficacia respecto a varios compuestos orgánicos empleados en la clínica. El primer compuesto inorgánico utilizado hoy en día es el cisplatino (cis-diclorodiamminoplatino(II)) [13], el cual ha mostrado ser efectivo en el tratamiento contra cáncer avanzado de colon [14], pulmón [15], ovario y de testículos [16]. Estos resultados provocaron interés en varios grupos de investigación para el desarrollo y síntesis de nuevos compuestos que contengan en su estructura metales como átomo central. De este modo se

han sintetizado varios compuestos inorgánicos; dentro de los que se encuentran compuestos que incluyen metales tales como: Ni, V, Mn, Ga, Sn, Ti, Fe, Cu, Zn, Ru, Pd, Pt y Au.

Estudios *in vivo* e *in vitro* de compuesto inorgánicos han mostrado que son efectivos para su uso como quimioterapéuticos, por ejemplo; malonato de galio(III), titanoceno, NAMI-A, KP1019 y Darinaparsin (figura 3). El malonato de galio(III) fue el primer compuesto de galio que entró en fase clínica, éste se administra de forma oral y ha mostrado actividad en cáncer de próstata, mieloma, linfoma, cáncer de vejiga, además de que contribuye considerablemente a la reducción de la degradación de los huesos en la artritis reumatoide. El titanoceno, es un compuesto que contiene titanio como átomo central, cuenta con dos cloruros en posición cis-, es una molécula neutra y es un agente antineoplásico. Se encuentra en fase clínica 1, además no presenta nefrotoxicidad ni mielotoxicidad [17]. El compuesto NAMI-A, es el primer compuesto de rutenio(III) en entrar a fases clínicas debido a su eficacia contra metástasis (principalmente en pulmón) pero es ineficaz en la reducción de tumores primarios (14); además se observaron varios efectos secundarios importantes por lo que no se continuaron los ensayos de Fase II, luego el KP1019 y (N)KP1339 entraron en ensayos clínicos como nueva alternativa con diferentes mecanismos citotóxicos [14].

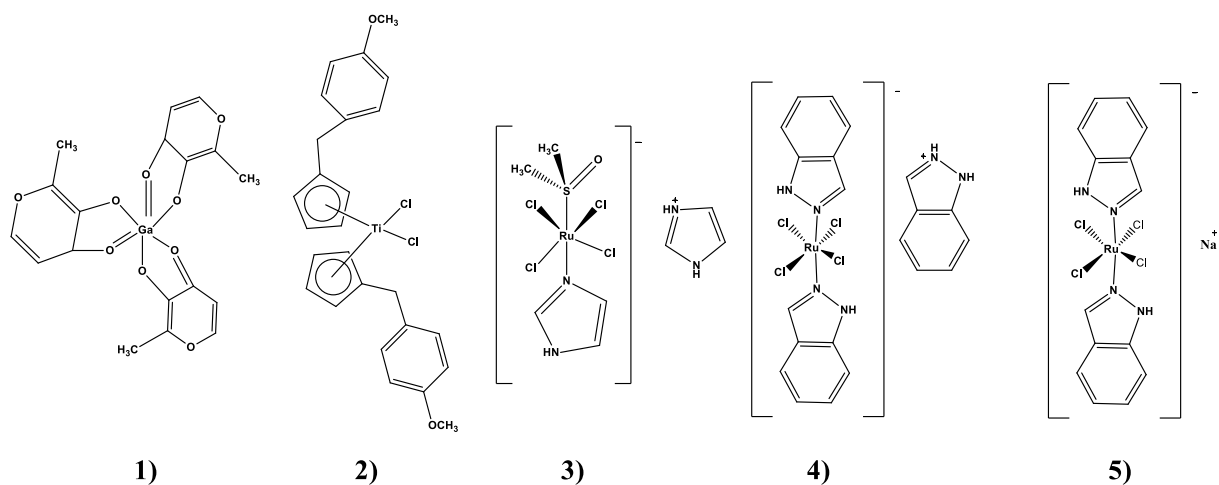


Figura 3. Estructura de los compuestos inorgánicos, 1) malonato de Galio(III), 2) titanoceno, 3) NAMI-A, 4) KP1019, y 5) (N)KP1339.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

La mayoría de los fármacos aludidos con anterioridad, contienen blancos terapéuticos específicos que les otorga la actividad antitumoral. En general, los quimioterapéuticos actúan a nivel de ADN en las células tumorales, mientras que los anticuerpos monoclonales y las pequeñas moléculas interactúan con proteínas de las células tumorales [18]. Esta sección se desarrollará tomando al cáncer como la enfermedad de elección para el diseño de nuevas moléculas que puedan hacer frente a esta patología debido a la resistencia inherente o adquirida que presentan ciertos tipos de cáncer y por supuesto a los datos estadísticos de mortandad alarmantes descritos en la introducción de este trabajo.

2.1 DISEÑO DE FÁRMACOS

El diseño racional de fármacos empleando métodos experimentales, comprende un conjunto de pasos que conduce al desarrollo de nuevos medicamentos con posibilidades de éxito, en los efectos clínicos benéficos y reduciendo costos [19]. También, uno de los retos importantes en el diseño de nuevos fármacos es buscar un compuesto efectivo que pueda tener selectividad por las células cancerígenas y así minimizar los efectos tóxicos en el paciente. Esta investigación necesita la unión de diferentes áreas de conocimiento que acompañen el desarrollo de fármacos hasta convertirlo en un medicamento seguro para su uso clínico. Actualmente, se hace uso de métodos computacionales (*in silico*) que permiten proponer con precisión modelos teóricos, además, son capaces de procesar grandes cantidades de información. En muchos casos han contribuido a comprender el mecanismo de acción de los principios activos de medicamentos o su mejora de los mismos [20,21].

Muchos fármacos ejercen su acción debido a su interacción con una macromolécula presente en el organismo [22,23]. En el diseño racional de fármacos, una de las estrategias utilizadas es conocer el sitio de acción (biomolécula con la que interactúa un ligante), debido a que la estructura tridimensional de muchas macromoléculas se conoce experimentalmente [24]. Así, conociendo la diana terapéutica o la base biológica de una enfermedad es posible el diseño de una molécula, utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico, ya que, con esto podemos definir las características que requiere presentar la molécula nueva para que pueda

interactuar con el sitio de acción de la biomolécula responsable, de tal forma que modifique y se modifique así mismo la patología [16].

En la figura 4 se muestra de manera general las etapas de un modelo clásico para el desarrollo de un medicamento. El proceso comienza con la elección de la enfermedad que queremos atender, se requiere investigar acerca de las causas que provocan la misma, donde en algunos casos puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares asociadas con esa enfermedad. Lo siguiente, comprende la identificación de fármacos que puedan interactuar con la diana molecular, la optimización de sus propiedades fisicoquímicas y la mejora de su actividad biológica. Una vez elegidos los mejores fármacos candidatos se seleccionan los bioensayos que sean de interés para someter dichos candidatos, por ejemplo: ensayos *in vitro* con blancos moleculares aislados de las células, ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos. Los compuestos que cumplen satisfactoriamente todos los requisitos de fases clínicas son aprobados para uso clínico por un agente regulatorio y salen al mercado bajo su farmacovigilancia. Este proceso que he resumido en un párrafo en realidad tarda entre 10 a 20 años aproximadamente y los costos son elevados [20,24].

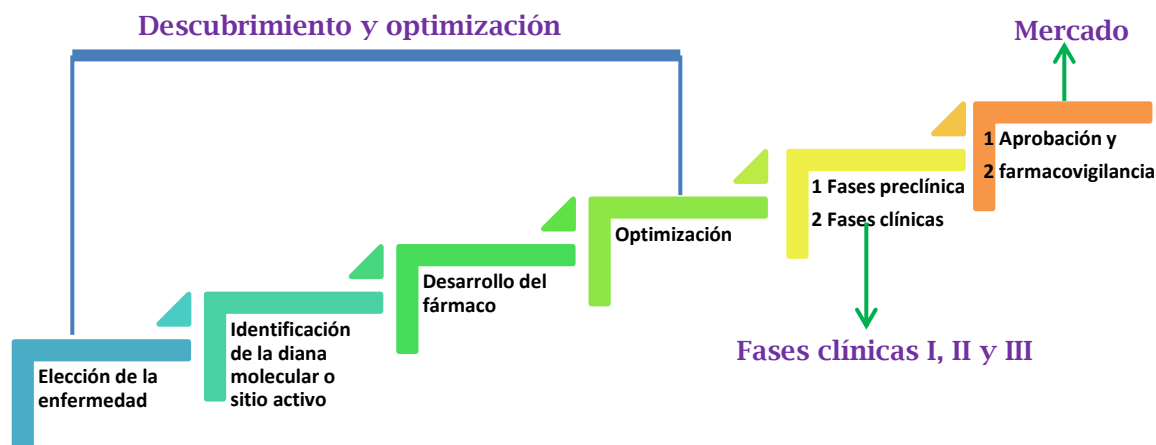


Figura 4. Etapas principales en el desarrollo clásico de un medicamento. (imagen basada en [24])

El diseño de fármacos experimental se ha realizado durante muchos años para la generación de nuevas moléculas o el rediseño estructural especialmente de algunos medicamentos de carácter orgánico; la recolección

de datos fisicoquímicos, electrónicos y biológicos de estas moléculas, de hecho, condujeron a proponer la regla de Lipinski la cual permite filtrar los compuestos que podrían presentar una buena actividad biológica o rol farmacológico con mayor probabilidad de ser absorbibles por vía oral [25,26]. Sin embargo, estas reglas no son eficaces en compuestos de índole inorgánica, por lo que es desafiante para la comunidad científica tratar de encontrar los requerimientos fisicoquímicos que debe presentar este tipo de moléculas para ser un buen candidato de ser medicamento.

El diseño y síntesis de diversos compuestos inorgánicos como agentes antineoplásicos ha ido en aumento. El diseño de fármacos cada día es más utilizado para la generación de nuevos medicamentos inorgánicos orientados a diferentes enfermedades. Un ejemplo de moléculas inorgánicas que han surgido mediante un diseño experimental de fármacos son las casiopeínas®; desarrolladas por la doctora Lena Ruiz Azuara y su grupo de investigación enfocados al tratamiento de cáncer. De hecho, la Cas-III-ia ([Cu(4,4-dimetil-2'2-bipirdina)(acetilacetato)]NO₃) se encuentra comenzando la fase clínica 1 en México [27].

2.2 CASIOPEÍNAS, FÁRMACOS DIRIGIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

Las casiopeínas son compuestos de coordinación de cobre con actividad antiproliferativa, ya que han mostrado actividad biológica sobre una gran cantidad de tumores tanto *in vitro* [28-30], como *in vivo* [31,32]. La fórmula general de estos compuestos de coordinación puede ser [Cu(N-N)(N-O)]NO₃ o [Cu(N-N)(O-O)]NO₃, donde N-N corresponde a diiminas aromáticas; N-O corresponde a α-aminoacidato o péptidos, mientras que O-O corresponde a acetilacetato o salicilaldehidato [33,34]. En general, el ligante primario corresponde a bipyridinas o fenantrolinas sustituidas, caracterizadas por ser donadores por nitrógeno con diferentes sustituyentes las cuales, pueden tener interacciones con ADN [35]. El segundo ligante por lo general, tiene alta afinidad por el cobre, modulan su potencial redox, lipofilicidad, actividad biológica y toxicidad [29]. Las variaciones estructurales en ambos ligantes han permitido la síntesis, caracterización, evaluación biológica y el análisis de datos de más de 100 casiopeínas; por lo que ha sido necesaria su clasificación en diferentes grupos o generaciones (figura 5).

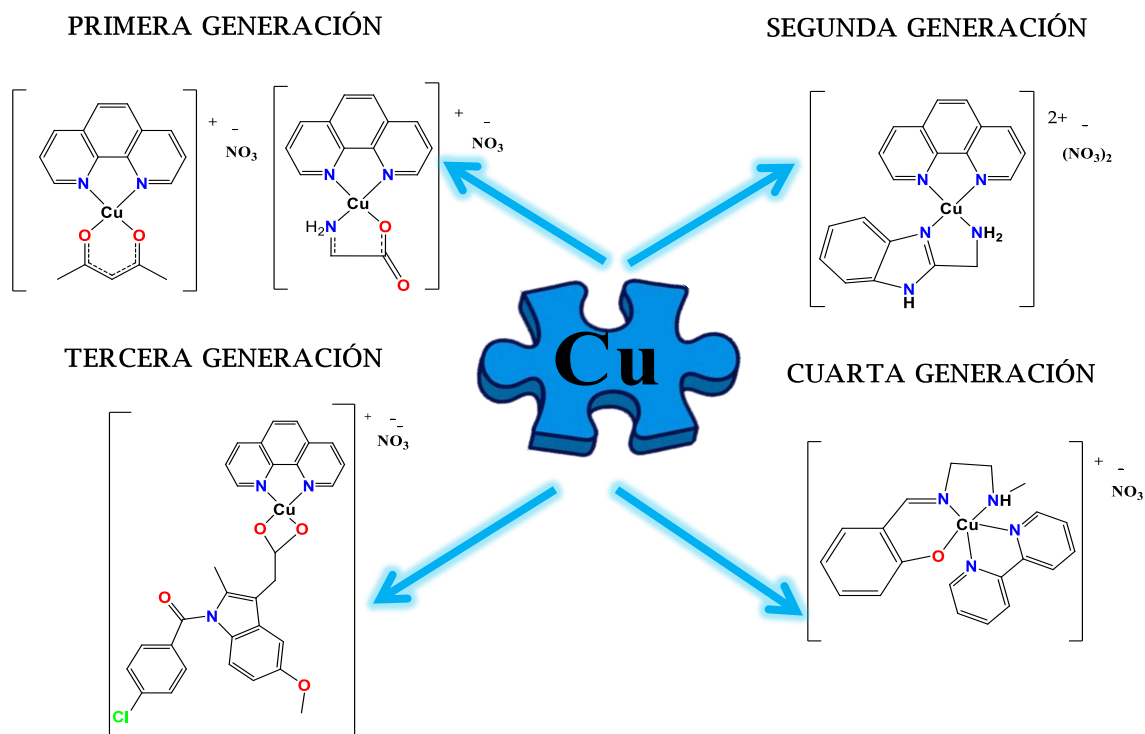


Figura 5. Clasificación de las casiopeínas.

La característica común en las casiopeínas es que presentan como ligante primario a una diimina aromática sustituida (N-N) y al átomo central de cobre(II), el cual es un metal de transición esencial involucrado en una amplia gama de procesos biológicos, destaca especialmente por su participación en reacciones redox en sistemas vivos. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el cobre y sus complejos tienen la habilidad de participar en reacciones catalíticas para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales inducen apoptosis provocando a su vez la peroxidación lipídica de la membrana celular, que a su vez disminuye la fluidez de la membrana e inactiva el enlace entre las enzimas estructurales y la membrana, ocasionando la pérdida de la integridad celular [36,37]. Por otro lado, el mecanismo de homeostasis del cobre en células de mamíferos es bien conocido, lo que lo hace un metal candidato a presentar una menor toxicidad. La diferencia entre las generaciones de casiopeínas, radica en el ligante secundario que le acompaña. La primera generación de casiopeínas se caracteriza por que el ligante secundario es bidentado y monocargado (acetilacetato o glicina); la segunda generación contiene ligantes secundarios bidentados neutros como imidazoles, la tercera y cuarta generación son nuevas y se caracterizan por

que el ligante secundario es una molécula bioactiva bidentada (como la indometacina) o el ligante es tridentado tipo base de Schiff, respectivamente.

La elección de los ligantes primarios, secundarios, los sustituyentes y el cobre como centro metálico fueron considerados en el diseño racional de las casiopeínas. Diversos estudios espectroscópicos y analíticos han permitido elucidar las diferentes geometrías de las casiopeínas siendo la cuadrada plana o pirámide de base cuadrada distorsionada las más comunes, ésta última es posible dada la presencia de una molécula de disolvente en posición apical coordinada al cobre; sin embargo, también pueden presentar geometría octaédrica si dos moléculas de disolventes ocupan las posiciones axiales [38]. Se han recolectado resultados de estudios electroquímicos, propiedades fisicoquímicas y biológicas que fueron utilizados para generar modelos teóricos que puedan arrojar información acerca de los requerimientos fisicoquímicos que son necesarios en las casiopeínas para mejorar su actividad biológica. Bravo-Gómez [29] realizó un estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad biológica (QSAR por sus siglas en inglés; *Quantitative Structure-Activity Relationship*) de un conjunto de 21 casiopeínas de primera generación. Se llevaron a cabo dos análisis principales: (1) el estudio de la influencia de los sustituyentes en el ligante diimina sobre propiedades fisicoquímicas como el potencial de media onda ($E_{1/2}$), su relación con la dosis letal media (DL_{50}) y la concentración mínima inhibitoria (CI_{50}) en varias líneas celulares tumorales y (2) el estudio de la influencia del ligante secundario cuando se cambia al acetilacetato (acac) por glicinato (gly). Los resultados mostraron que la presencia del grupo funcional fenantrolina es necesaria para aumentar la actividad antiproliferativa respecto a los que contienen bipyridina como ligante primario. El cambio del ligante secundario tiene menor influencia sobre la actividad biológica que los cambios en la diimina, pero es posible que este influya en la hidrofobicidad. Además, se observó que existe una relación entre la CI_{50} y el potencial de media onda con la actividad biológica. Este efecto puede deberse al comportamiento redox del centro metálico, ya que este puede reaccionar con algunos reductores endógenos y generar cobre(I) así, los diferentes sustituyentes sobre los ligantes modulan la reducción del cobre(II) potenciando su actividad citotóxica.

La actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* que presentan las casiopeínas está mediada por varios mecanismos de acción como: generación de ROS, toxicidad mitocondrial, e interacción directa con el ADN a través de

intercalación o interacción en el surco menor, los cuales son discutidos a continuación.

2.2.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS CASIOPEÍNAS

Existen varias evidencias que demuestran la actividad antiproliferativa mediante la muerte celular por apoptosis. Con el objetivo de encontrar cuales son las razones que provocan los efectos antes mencionados se han estudiado tres principales mecanismos de acción:

1) Generación de especies reactivas de oxígeno [31] con la oxidación y la degradación del ADN [39,40]. Diversos ensayos experimentales *in vitro* mostraron un incremento de la citotoxicidad al administrar casiopeína y un agente reductor como ácido ascórbico o β -mercaptoetanol provocando la degradación de ADN. En otros ensayos, se encontró que las casiopeínas pueden utilizar al glutatión reducido como fuente de electrones para catalizar la reacción tipo Fenton. De este modo, el glutatión contribuye en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} ; y se propicia la generación de especies reactivas de oxígeno tales como radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) conduciendo a un daño mitocondrial o estrés que desencadena la muerte celular por apoptosis (figura 6).

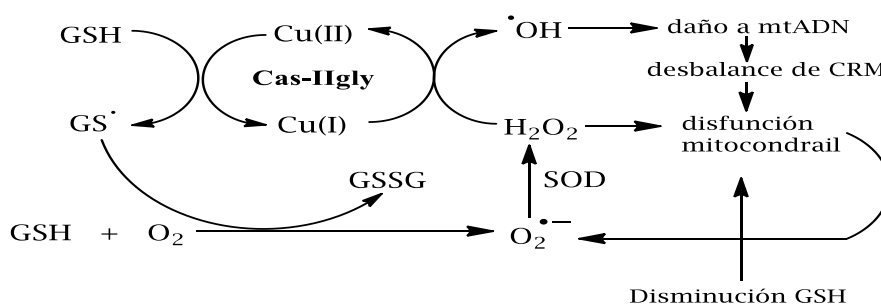


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto para la casiopeína IIgly. Glutatión (GSH), ADN mitocondrial (mtADN), cadena respiratoria mitocondrial (CRM), superóxido dismutasa (SOD) [36].

2) Toxicidad mitocondrial; se ha observado que las casiopeínas afectan varios sitios mitocondriales, provocando la inhibición de la respiración y la síntesis de ATP, lo que podría comprometer los procesos dependientes de la energía, como la duplicación celular [36,37].

3) Daño del ADN a través de la interacción directa con casiopeínas mediante un mecanismo intercalante o no intercalante dependiente de los ligantes primarios y secundarios junto con un daño oxidativo [35,41,42].

Con el fin de mejorar la comprensión del modo de interacción molecular de las casiopeínas con el ADN, se realizaron diversos estudios experimentales utilizando técnicas como; espectroscopía de UV-visible, electroforesis en gel, dicroísmo circular [35], microscopia de fuerza atómica [23], ensayo cometa [41] y fluorescencia [42]. Como resultado global de estos experimentos se observó que las casiopeínas sí interaccionan con ADN, y esta interacción es más favorable y evidente cuando se da en presencia de algún agente reductor, ya sea, endógeno o exógeno. Además, se ha observado que las casiopeínas pueden llegar hasta el núcleo de las células y mantener una interacción con el material genético conduciendo a la degradación de éste [35].

Tovar en 2011 obtuvo un cristal de la casiopeína III-ia con el nucleótido adenina $\{[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetato})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3(\text{adenina})_2\cdot\text{H}_2\text{O}\}$ (Figura 7). El modo de unión que predomina es una interacción de apilamiento tipo π - π entre los ligantes de la casiopeína y dos moléculas de adeninas [43,44]. Estos datos fueron estudiados computacionalmente corroborando esta interacción [43,45-47].

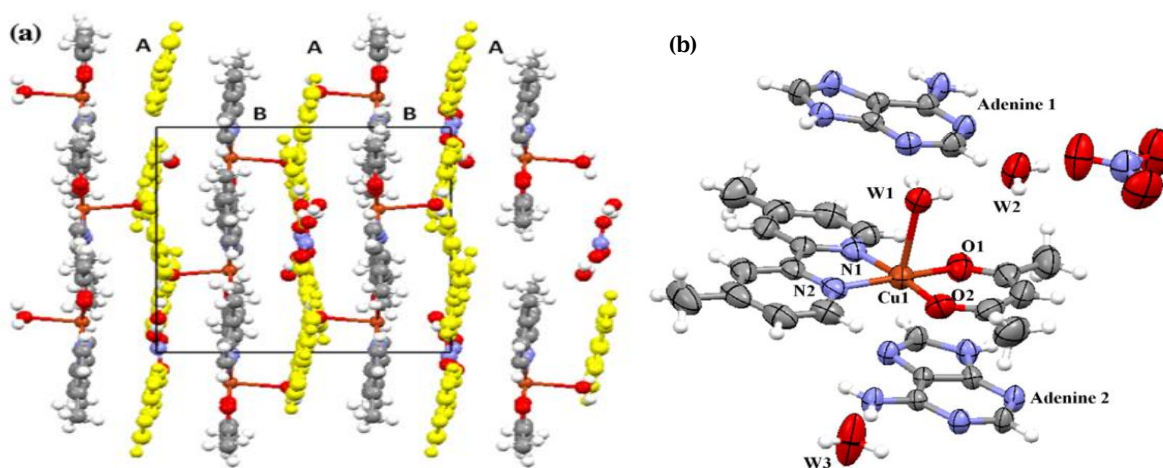


Figura 7. (a) Arreglo cristalino; (A) moléculas de casiopeína III-ia, (B) moléculas de adenina. (b) Aducto entre la casiopeína y dos moléculas de adenina [48].

2.2.2 ESTUDIOS PRECLÍNICOS

Las casiopeínas han mostrado actividad genotóxica, citotóxica y antiproliferativa en diferentes líneas celulares como SiHa, HeLa, MCF-7, HCT,

entre otras [29,30]. Algunos compuestos han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* para identificar su potencial terapéutico contra glioma C6 maligno [37] y en línea de adenocarcinoma de colon HCT-15 [32,49]. Estudios preclínicos mostraron la reducción en el volumen tumoral, los índices de proliferación celular y mitótica, contrario al aumento en el índice apoptótico (figura 8). Además, se evidenció que la sustitución en las diiminas y el cambio de ligante secundario modifican la magnitud de la actividad biológica, como se ha mencionado anteriormente.

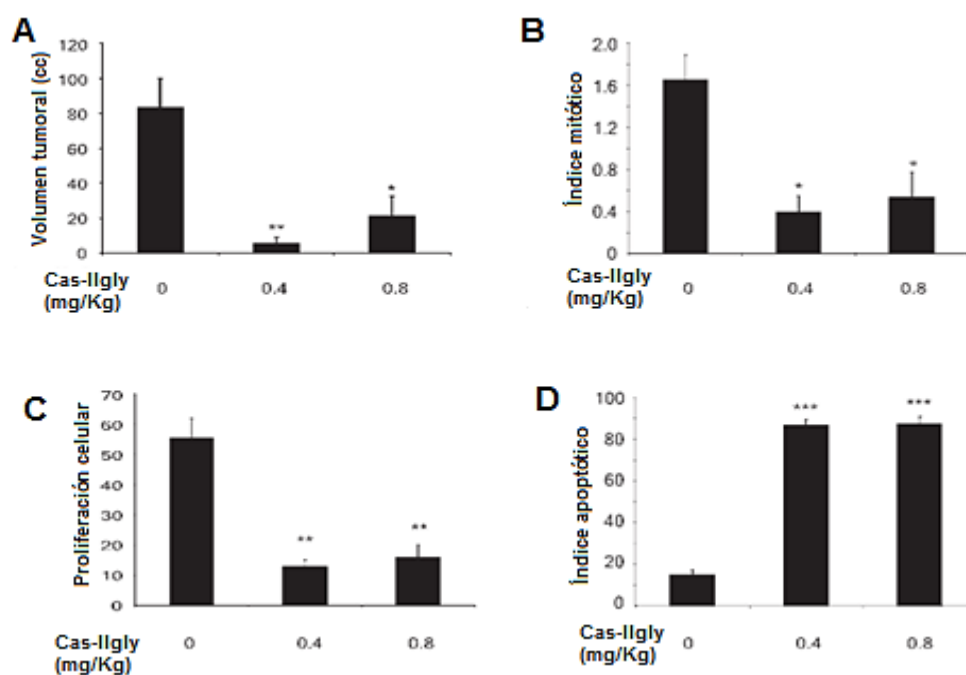


Figura 8. Efecto antitumoral *in vivo* de Cas-IIgly. (A) Comparación del volumen tumoral determinado por desplazamiento de agua. (B) Índice mitótico determinado por análisis microscópico. (C) Índice de proliferación celular determinado por inmunohistoquímica para PCNA. (D) Índice apoptótico determinado por ensayo túnel para ratas con glioma C6 tratadas con Cas-IIgly a dosis de 0,4 y 0,8 mg/kg por día durante 21 días [37].

Dado que las casiopeínas muestran una buena citotoxicidad es razonable preguntarse acerca de su selectividad por las células tumorales, razón por la que han surgido experimentos donde se observa que las casiopeínas no afectan la viabilidad o proliferación de líneas no tumorales como los linfocitos e incluso a macrófagos de sangre periférica humana [50,51]. La casiopeína II-gly ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃) fue administrada en ratas winstar por vía intravenosa, esta provocó anemia hemolítica, pero es reversible a los 15 días (dosis única de 5 mg/Kg) [52].

Estos compuestos generan efectos adversos como toxicidad respiratoria y cardiovascular en diferentes especies [53].

Con el objetivo de generar investigación que contribuya a una mejor calidad de vida en personas que padecen cáncer, el presente proyecto se desarrolló eligiendo esta enfermedad. Particularmente se basa en la generación de nuevos compuestos de coordinación de cobre(II) con una molécula bioactiva como ligante secundario, empleando a la curcumina y dimetoxicurcuma como ligantes.

2.3 CURCUMINA

La curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenol)-1,6-heptadieno-3,5-dicetona) es un componente presente en los rizomas de la hierba perenne llamada *Cúrcuma longa*, cultivada extensamente en los países tropicales en el sur y sureste de Asia, específicamente en China e India. La raíz de cúrcuma tiene tres componentes principales, denominados curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina), los cuales le otorgan su color amarillo-naranja característico. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios para establecer las propiedades medicinales de la cúrcuma y curcumina, incluyendo la actividad antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, anti-Alzheimer e importante potencial anticancerígeno que incluyen supresión de transformación celular, prevención de la proliferación celular de cáncer y es supresor de efectos carcinógenos [54-57]. Por otro lado, se estudió su utilización en métodos analíticos (detección de boro), su potencial para formar complejos para su uso como biomarcadores, etc [58]. Las principales características de la curcumina son: baja solubilidad en el agua, pobre absorción y una rápida eliminación a nivel sistémico, provocando una limitada biodisponibilidad [59-61].

2.3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

La curcumina es una β -dicetona α,β -insaturada, que coexiste en un equilibrio químico ceto-enólico (figura 9). Anjomshoa y otros autores observaron que la curcumina se encuentra mayoritariamente en su forma enólica en disolución, lo que favorece su acción antioxidante [62-65]. Por otro lado, la curcumina existe en forma ceto a pH ácido y neutro; mientras que a

un pH alcalino se encuentra en su forma enol [66]. Físicamente, la curcumina es un sólido amarillo muy poco soluble en agua, medianamente soluble en disolventes polares como metanol, etanol, acetona y muy soluble en disolventes como DMSO y DMF. La curcumina se sintetizó por primera vez en 1910 mediante la condensación aldólica entre la acetilacetona y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído con buenos rendimientos [67] de hecho la misma ruta sintética es utilizada como plantilla para la generación de análogos y derivados de la misma, permitiendo obtener nuevos ligantes con actividad biológica variada [68,69]. La bifuncionalidad ceto-enólica de la curcumina condujo a numerosas investigaciones acerca de la síntesis de nuevos compuestos de coordinación con diferentes metales. Los grupos fenólicos -Ar-OH en la curcumina producen la formación de polímeros insolubles, dada la coordinación del átomo de oxígeno con los orbitales del átomo metálico o mediante la formación de redes poliméricas donde los átomos de oxígeno presentan interacciones tipo puente de hidrógeno con los protones de una molécula vecina [70,71].

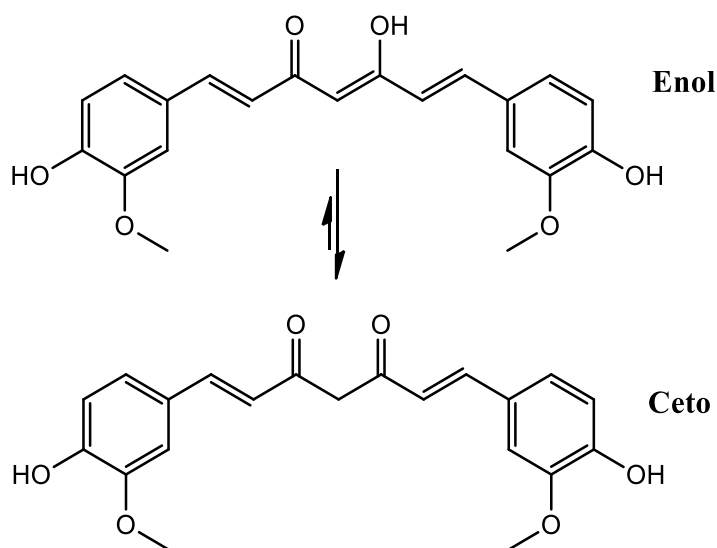


Figura 9. Tautomería ceto-enol de la curcumina.

2.3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMOS DE ACCIÓN

La curcumina presenta un amplio espectro terapéutico, debido a su interacción con diversas dianas moleculares sobre las que puede actuar en diferentes patologías, algunas de ellas se ilustran en la figura 10 [72]. Estas actividades están mediadas por la modulación de varias dianas moleculares, incluidos factores de transcripción, enzimas, proteínas del ciclo celular,

citoquinas, receptores y moléculas de adhesión a la superficie celular [54,73]. En este apartado se estudiará el mecanismo de acción mediante el cual la curcumina actúa sobre determinadas dianas moleculares para el posible tratamiento del cáncer.

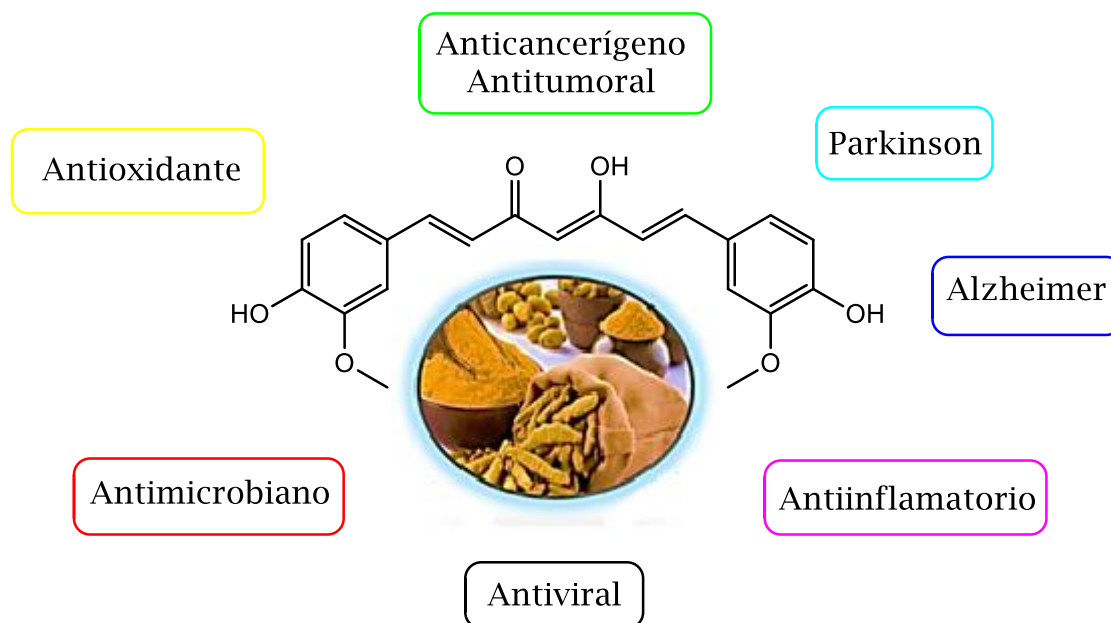


Figura 10. Algunas actividades biológicas de la curcumina contra diferentes enfermedades.

Estudios acerca del principal mecanismo de acción de la curcumina sobre células cancerígenas concluyen que hay una alteración en el ciclo celular de dichas células que inhibe su proliferación (detención en el ciclo celular en la fase G0/G1 y/o G2/M), lo que conduce a la muerte celular por apoptosis. La curcumina induce eficazmente la apoptosis en varias líneas celulares como: K562, MCF-7 y HeLa [74,75]; también induce apoptosis en fibroblastos pulmonares de esclerodermia sin afectar a los fibroblastos pulmonares normales [76]. Jiang y sus colegas mostraron que la curcumina induce contracción celular, condensación de cromatina y fragmentación del ADN por su interacción en el surco menor [77,78]. La inducción de la apoptosis en células de carcinoma de riñón humano promovida por la curcumina es a través de la desfosforilación de Akt, inhibición de Bcl-2, Bcl-xl, inhibidores de apoptosis, liberación de citocromo-c y activación de caspasa-3 [79]. Cabe señalar que en la última década se ha mencionado que la curcumina es un fármaco natural eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, su mecanismo de acción es eliminar radicales libres o bloquear la agregación de las placas β -amiloides, ya que este compuesto puede cruzar

la barrera hematoencefálica debido a su lipofilidad, donde desestabiliza la formación de las fibrillas β -amiloide y eventualmente se une a las placas para evitar la formación de fibrillas β -amiloide [72,80-82].

2.3.3 ENSAYOS CLÍNICOS DE LA CURCUMINA

El consumo cotidiano de la curcumina en países asiáticos (India y China principalmente) es un buen indicativo de la inocuidad de esta sustancia, sin embargo, se debe tener un estudio formal de su toxicidad, por lo que llevó a ensayos de fase clínica I en pacientes con lesiones premalignas o de alto riesgo; los resultados mostraron que una ingesta de hasta 8 g/día durante 3 meses, o de 12 g en una sola toma, no genera efectos adversos o tóxicos. Además se determinó que 3.6 g de curcumina son adecuados para su evaluación en la prevención de tumores malignos [83]. En estudios que se han hecho con respecto a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de este compuesto indican que la curcumina se absorbe poco y se metaboliza rápidamente, lo que limita su biodisponibilidad y por lo tanto su eficacia [84,85]. Una manera en la que se ha abordado el problema de la biodisponibilidad de la curcumina es con la síntesis de nuevos análogos o coordinarla con metales para generar compuestos de coordinación, mejorar su solubilidad y la biodisponibilidad.

2.4 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON CURCUMINA. UNA PERSPECTIVA BIOLÓGICA

Los compuestos de coordinación mixtos con curcumina o curcuminoides coordinados a centros metálicos son estables, más solubles en agua y en disolventes orgánicos comunes respecto a la curcumina a excepción de los compuestos homolépticos que son insolubles. Por esta razón la caracterización estructural por monocristal de este tipo de complejos es aún limitada. Zhou [86], obtuvo cristales de complejos homolépticos de cobre(II) con el ligante curcumina donde unió al átomo de oxígeno de los grupos fenoles con diferentes cadenas de alquilo provocando su baja solubilidad, sin embargo fueron activos en líneas celulares como ASPC-1, MCF-7 y HeLa.

Se han sintetizado compuestos de coordinación mixtos con curcumina unida a B, Al, Ga, Pb, Fe, Ru, Ni, Cr, V, Mg, Pt, Au, Co, Zn, Cu, In, también con algunos metales de tierras raras (La, Pr y Sm), entre muchos otros. Sin

embargo, aunque se mejora su solubilidad respecto a la curcumina, siguen presentando baja solubilidad en agua y en disolventes orgánicos comunes, no así en disolventes muy polares como piridina, dimetilformamida o dimetilsulfóxido. Por esta razón, la caracterización estructural mediante difracción de rayos X de complejos mixtos con curcumina sigue siendo limitada [87]. Empero estos compuestos de coordinación presentan aplicaciones biológicas, en la mayoría de los casos se reportó que presentan actividad antiproliferativa, antineoplásica, actividad microbiana e incluso excelente actividad frente a Alzheimer y Parkinson. También se han encontrado excelentes candidatos a utilizarse como biomarcadores de células cancerígenas para la detección temprana de cáncer. Varios de estos tópicos serán abordados de manera breve en las siguientes secciones.

2.4.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON METALES DE LA PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA SERIE DE TRANSICIÓN

Beck et. al., [88] fueron pioneros en reportar los primeros compuestos de coordinación (homolépticos) con curcumina, bisdesmetoxicurcumina, dimetilcurcumina, diacetilcurcumina, a los cuales coordinaron con: paladio, rodio, iridio, platino, rutenio, níquel, cobre y hierro. Esta investigación sigue siendo utilizada por otros grupos implementando su ruta sintética, donde el paso más importante es realizar la desprotonación del heptanoide de manera previa a la coordinación con el metal para elevar los rendimientos de reacción.

Compuestos de coordinación heterolépticos con curcumina suelen ser más solubles y cristalizables, esta es una forma en la que se ha mejorado la biodisponibilidad de la curcumina. Chakravarty et. al. [89], sintetizaron un complejo ternario de oxidovanadio(IV) con curcumina y dipicolilamina (dpa) junto con sus análogos que tienen restos de BODIPY fotoactivos y mostraron citotoxicidad inducida por luz visible en MCF-7 y células HeLa. Se obtuvieron imágenes celulares mostrando que los compuestos llegan a la mitocondria y sufren muerte celular por apoptosis. Sharma y Chandra [90]; sintetizaron un complejo de oro con curcumina y evaluaron su capacidad inhibitoria en la hinchazón de las patas laterales de ratones por 21 días, inyectaron el complejo de oro en dosis de 30 mg/Kg produciendo un 69% de inhibición de la inflamación lo que resultó mejor con respecto al ácido acetilsalicílico que causa un 49.56 % de protección con dosis de 200 mg/Kg.

Complejos metálicos que contienen a la curcumina han impactado en el área de investigación que involucra el posible tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o en la obtención de radiomarcadores para imágenes de la enfermedad. En este sentido, se han investigado varios complejos de curcumina con galio, tecnecio y renio y algunos de sus derivados. Tres de estos complejos se probaron con éxito para la tinción selectiva de placas de β -amiloide $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Curc})(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{}^{68}\text{Ga}(\text{Curc})^+]$ y $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{PPh}_3)(\text{Curc})]$ [91].

Los reportes de múltiples aplicaciones biológicas de compuestos de coordinación con curcumina como ligante son vastos y es complicado discutir todos los mecanismos de acción que ejercen sobre cada patología estudiada. En la tabla 1 se muestra una colección de algunos datos sobre complejos mixtos con curcumina y sus mecanismo de acción.

Tabla 1. Resumen de datos de compuestos de coordinación con curcumina.

Compuestos de coordinación	Aplicación biológica	Mecanismos de acción
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$	Citotoxicidad en A2780	Interacción con ADN [92]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{BODIPY})]\text{Cl}$	Citotoxicidad en HeLa	Generación de especies reactivas de oxígeno y daño mitocondrial [93]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{R-tpy})]\text{NO}_3$	Citotoxicidad en HeLa y MCF-7	Muerte celular vía apoptosis (Anexina-V-FITC) [94]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{OOCCH}_3)(\text{H}_2\text{O})]$	Actividad SOD	Inhibición de la peroxidación de lípidos en los liposomas [95]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})_2]$	Actividad SOD	Inhibición de la peroxidación de lípidos en los liposomas[96]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{HL1})]$ $[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{HL2})]$	y Citotoxicidad en MCF-7, A549 y HCT-116	Interacción con ADN por intercalación [97]
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{dppz})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{acdppz})]\text{NO}_3$	Fototoxicidad en HeLa, MCF-7 y HepG2	Formación de especies reactivas de oxígeno y muerte por apoptosis
$[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{Fc-aa})]$ y $[\text{Cu}(\text{curcumina})(\text{Fc-MetH})]$	Actividad nucleasa y Fototoxicidad en HeLa y MCF-7	Corte del ADN y apoptosis. Se localizan en el

		citosol [98]
[Cu(curcumina)(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)]Cl		Intercalación con ADN [99]
[Cu(curcumina)(OH) ₂ Cu(curcumina)]	Citotoxicidad en MCF-7, HEPG2, HeLa y HCT-116 [100]	No se investigó
[Re(curcumina)(CO) ₃ (PPh ₃)]	Actividad anti-Alzheimer	Se une a las placas β-amieloides[91]
[Al(curcumina)(etanol) ₂]NO ₃	Actividad anti-Alzheimer	Inhibe la formación de las placas β-amieloides e incluso revierte la formación de las mismas [101]
[Cu(Curcumina)(OAc)(OH)]	Actividad antioxidante y SOD	Procesos redox [102]
[Au(curcumina) ₂]Cl	Antiartrítico/antireumatoide	No mencionado [103]
[Eu(curcumina)(1,10-fenantrolina-5,6-diona)]	Actividad antibacteriana/antifungica	Unión a la pared celular[102]
[Cu(curcumina)(BF ₃ .Et ₂ O)]	Anti viral	Inhibidor de las proteasas VIH-1 y VIH-2[104]
R-tpy = 4'-fenil-2,2':6',2''-terpiridina		
HL1=1,7-bis[4-(2-oximetilenpiridinae)-3metoxil]fenil-1,6-heptadien-3,5-dicetona		
HL2 = 1,7-bis[4-(3-oximetilen-2-clorotiofeno)-3-metoxil] fenil-1,6-heptadien-3,5-dicetona		
dppz= dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina		
acdppz= 11-(9-acridinil)dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina		
Fc-aa= N-ferrocenilmetil-L-tirosina		
Fc-MetH= N-ferrocenilmetil-L-metionina		
OAc= acetato		

2.5 ANALÓGOS Y DERIVADOS DE CURCUMINA

Una solución para mejorar la solubilidad de la curcumina es llevando a cabo la sustitución/eliminación de los grupos fenólicos, que propicié una mejora en la biodisponibilidad, pero conservando sus efectos benéficos farmacológicos. En razón a lo expuesto, se han sintetizado análogos o derivados de la curcumina en diferentes países. En el rediseño se ha sustituido al grupo hidroxilo del anillo aromático por diferentes grupos funcionales como: -OMe, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₂CH₃, -OOCCH₃, -N(CH₃)₂ o indoles sustituidos [105,106], a su vez se ha cambiado la bifuncionalidad ceto-enólica por grupos donadores O, N o S generando derivados conocidos como bases de Schiff [107-111]. México no es una excepción, diversos grupos

de investigación se encuentran sintetizando análogos de curcumina con éxito en cuanto a la actividad antiproliferativa en células de cáncer, un ejemplo son los grupos de investigación de los doctores Enríquez.-Habbib R. [69] y Soria-Arteche [112]. La figura 11 muestra algunos de los derivados de curcumina que han obtenido.

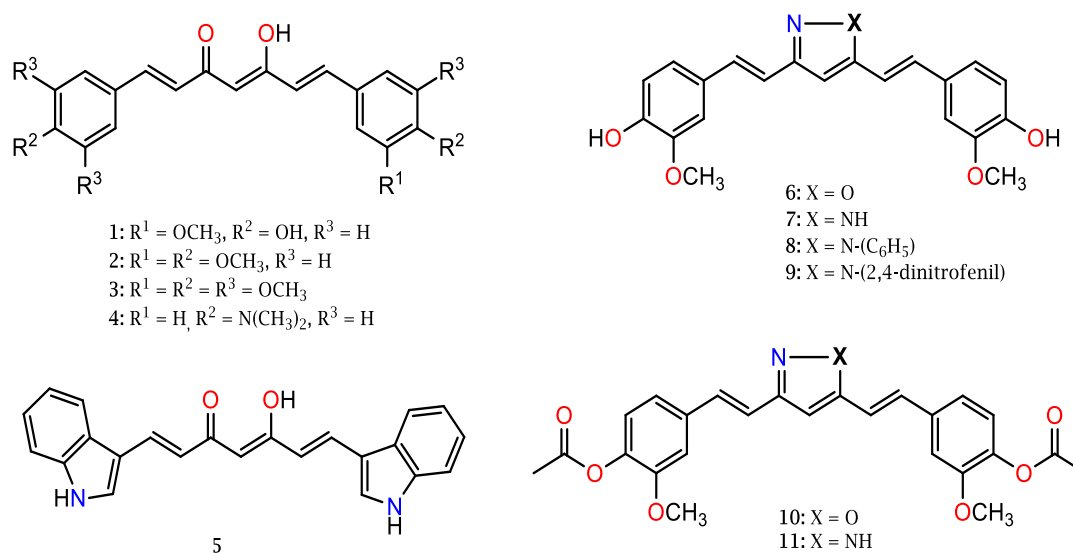


Figura 11. Estructura química de algunos análogos de curcumina sintetizados por Soria-Arteche [112].

Los diez análogos se evaluaron como agentes citotóxicos frente a las líneas celulares de U-251, PC-3, HCT-15, K562 y SKLU-1. Los compuestos 2 y 10 fueron los más activos en HCT-15 y K562 (tabla 2) y más activos que la propia curcumina. Además, 6 y 7 tienen una fuerte actividad antioxidante..

Tabla 2. Valores de CI_{50} (μM) para los compuestos curcumina, 2, 5-8, 10 y 11 contra HCT-15 y K562.

Compuestos	CI_{50}	
	HCT-15	K562
Curcumina	13.9 ± 0.6	9.2 ± 0.4
2	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.3
5	4.8 ± 0.4	13.3 ± 0.6
6	5.8 ± 0.7	22.1 ± 0.9
7	6.2 ± 0.9	6.3 ± 0.6
8	5.0 ± 0.4	4.5 ± 0.2
10	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.4
11	12.7 ± 0.1	8.8 ± 0.3
adriamicina	0.0050 ± 0.0009	0.0140 ± 0.0009

2.5.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN CON ANALOGOS DE CURCUMINA

Los análogos o derivados de curcumina también han sido utilizados como ligantes para la generación de complejos metálicos. Raman N. [68] reportó la síntesis de un nuevo ligante, donde hizo reaccionar un mol de curcumina con un mol del aminoácido cisteína, el cual presenta un grupo de ácido carboxílico y un grupo amino; este último, reacciona con el carbonilo de la curcumina generando un ligante nuevo tipo base de Schiff. Posteriormente, sintetizaron complejos con Zn(II), Ni(II), Cu(II) y Co(II), los cuales se sometieron a diversos análisis fisicoquímico, evaluación biológica y estudios de las interacciones con los ácidos nucleicos. Todos los compuestos presentaron una geometría cuadrado plana (no se obtuvieron monocristales) y fueron más activos en hongos como *Aspergillus niger*, *candida albicans* y *rhizoctonia bataicola* respecto al ligante libre y el posible modo de acción puede ser vía interacción con ADN mediante su intercalación entre los pares de bases. Siposova K. et. al. [81], sintetizaron una amplia variedad de análogos de curcumina con modificaciones estructurales tanto en los anillos aromáticos como en el grupo dicetónico mediante la inserción de un sustituyente alquilo en el átomo de carbono central. Los ligantes mostraron una mayor estabilidad química en condiciones fisiológicas con respecto a la curcumina, mostrando su capacidad para inhibir la generación de agregados A β ₁₋₄₀; mientras que los complejos con cobre(II) pueden interaccionar con ADN y son capaces de combatir la EA. Venugopalan y Deepthi [113] también sintetizaron complejos de coordinación con tres análogos asimétricos de curcumina; los complejos metálicos tienen una estequiometría 1:2 metal:ligante. Las interacciones de los complejos de cobre(II) fueron mayores que las de los ligantes libres con ADN.

Los compuestos de coordinación con zinc son los más estudiados de los complejos metálicos que contienen curcumina o algún derivado. Pucci D. et. al. [71] sintetizaron dos complejos heterolépticos de zinc con curcumina (Figura 12) y dos derivados. Los complejos de zinc sintetizados mostraron buenos resultados en ensayos celulares frente a diferentes líneas de cáncer, en particular con la línea celular LAN-5 (neuroblastoma). También sintetizaron una serie de 5 complejos heterolépticos que probaron como agentes antitumorales mostrando una buena actividad antitumoral como también actividad antiproliferativa [114]. Mendiguchia B. [115], Xue-Zhou [78], Meza-Morales W. [69], Sareen R. [116], Raman N. [108], Priyadharshini [117] han

contribuido a la síntesis y evaluación biológica de complejos de zinc, entre otros autores [100,107,118,119].

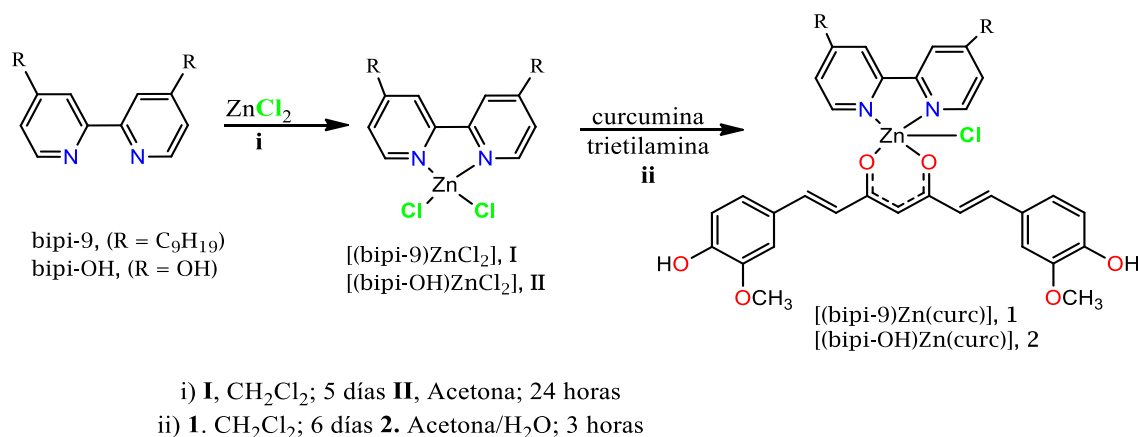


Figura 12. Síntesis de compuestos de coordinación de Zn(II).

2.5.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE DERIVADOS DE CURCUMINA Y SUS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN

Aunque existe una gama amplia de nuevos análogos o derivados de la curcumina, continúa el interés por el desarrollo de congéneres con mejores propiedades anticancerígenas y farmacocinéticas que la curcumina *per se*. La dimetoxicurcumina (DMC) es uno de los análogos más estudiados ya que conserva muchas de las propiedades fisicoquímicas, biológicas y es tres veces más estable metabólicamente que la curcumina. Santosh K. et. al. [120], reportaron que la DMC es un agente antiinflamatorio y antitumoral más efectivo que la curcumina mientras que Kunwar et. al. se interesó en el mecanismo de acción de la dimetoxicurcumina y realizó diversos estudios [121,122], sus resultados mostraron que la DMC es un agente aglutinante del surco menor en el ADN y mediante microscopía confocal observaron que este llega al núcleo de células MCF-7. Estudios del metabolismo y actividad anticancerígena de la DMC indican que inhibe la proliferación e induce la apoptosis en células HCT116 tratadas durante 48 horas, se metabolizó menos extensamente en sistemas microsomales y es más estable *in vivo*. En general, los mecanismos de análogos de curcumina y de sus complejos involucran estrés oxidativo, aumento de ROS, disminución de los niveles de glutatión), disfunción mitocondrial (disminución de ATP sintasa) y modulación en la expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.

La síntesis de complejos metálicos con curcumina o derivados presenta una mayor actividad respecto a los curcuminoides libres. Esta mejora tiene que ver con la modulación que provocan los ligantes sobre las propiedades redox del centro metálico, los cambios de geometría los cuales toman importancia cuando los complejos interactúan con el sitio activo de alguna diana molecular o las propiedades espectrales, para explorar la actividad de unión o escisión del ADN. El objetivo principal de este trabajo es el rediseño, síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de nuevas casiopeínas de tercera generación; es decir, compuestos ternarios de cobre(II). Donde como ligantes primarios se utilizarán bipyridinas y fenantrolinas sustituidas con diferente número de grupos metilo o fenilo; y sustancias bioactivas como ligantes secundarios (curcumina o dimetoxicurcumina). Se espera aumentar la solubilidad de la curcumina, mejorar la actividad biológica y la selectividad contra líneas de células cancerosas en comparación con los medicamentos de uso clínico. Adicionalmente, se realizaron varios estudios DFT para obtener descriptores electrónicos, como volumen molar (V), afinidad electrónica (AE), energía de ionización (EI) y potencial de media onda ($E_{1/2}$) para buscar relaciones estructura-actividad. Los resultados aquí presentados pueden generar estudios fisicoquímicos, evaluaciones *in vitro* e *in vivo* o estudios para determinar el mecanismo de acción de este tipo de compuestos.

2.6 COVID-19

Desde diciembre del 2019 la enfermedad COVID-19 provocada por el virus SARS-CoV-2 ha causado más de 563 millones de infecciones y 6,371,489 muertes alrededor del mundo. La ralentización en la reducción de contagios y la aparición de nuevas cepas del virus mantienen en vilo a la humanidad por el aumento de la transmisibilidad, la virulencia y la disminución de la eficacia de las medidas sanitarias. Hasta ahora hemos combatido las devastaciones de esta enfermedad a través de la vacunación y las medidas de sana distancia. Sin embargo, no existe un tratamiento efectivo contra el COVID-19. En consecuencia, la comunidad científica se ha volcado a investigar y describir la biología del virus para comprender el ciclo de replicación y encontrar formas de interrumpir e inhibir el proceso de infección a través de un medicamento.

Un proceso importante en la replicación del SARS CoV-2 es el proceso proteolítico, en el que los polipéptidos virales se liberan de las poliproteínas ppla y pplab. Una de las proteínas responsables de la proteólisis es la proteasa principal o Mpro [123,124]. Es una cisteína proteasa homodimérica de 67,6 kDa altamente conservada. Una enzima multifuncional que también

controla la replicación y la transcripción primaria del material genético viral [125]. Los residuos Cys 141 e His41 forman una díada catalítica en el sitio activo de la proteína, esencial para su función y Met49, His163 y Gln189 forman una tríada de unión de sustrato [123,126] (figura 13) . Inhibir su acción, puede interrumpir la multiplicación viral. Compuestos que pueden unirse covalentemente a estos residuos y alterar la acción de la enzima Mpro se denominan inhibidores de la proteasa. Dada su importancia, la proteasa principal es una diana terapéutica relevante. Además, las proteínas Mpro homólogas no se conocen en humanos; por tanto, sus inhibidores podrían ser menos tóxicos para nuestra especie. Tal es la importancia de esta enzima que uno de los pocos fármacos aprobados para tratar el COVID19 es el PAXLOVID un inhibidor de Mpro [127]. También, boceprevir y el péptido N3 son reconocidos por la alta eficiencia inhibitoria de esta enzima; algunos estudios computacionales sugieren el remdesivir puede actuar como un inhibidor de la proteasa aun que se conoce que su modo de acción es inhibir la ARN polimerasa del SARS-CoV-2 [124,128].

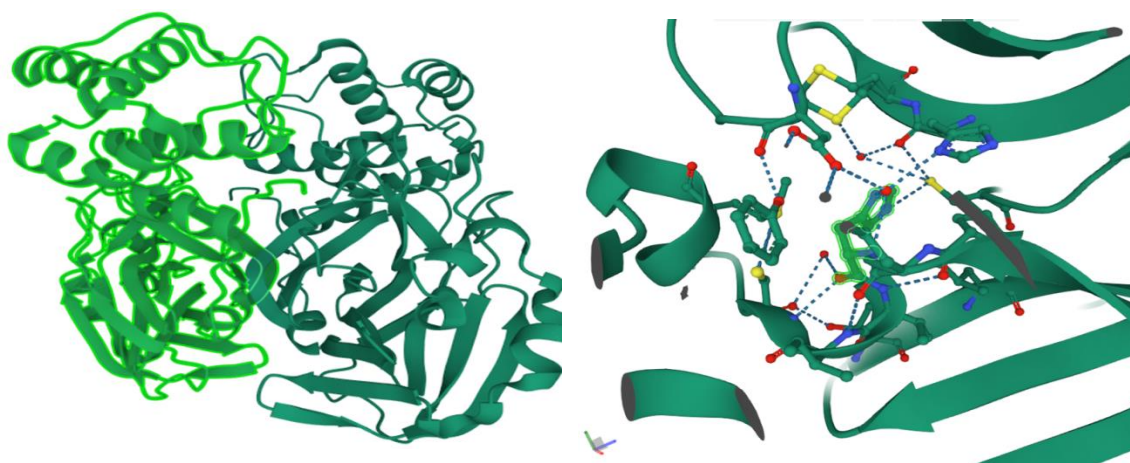


Figura 13. Dominio 3CLpro (verde fosforescente), B) Sitio activo de la proteína Mpro. Tomado de la base de datos PDB:6Y2E [129].

2.6.1 COMPUESTOS DE COORDINACIÓN COMO POSIBLES TRATAMIENTOS DEL COVID-19

El uso de compuestos de coordinación con metales de transición para aplicaciones antivirales es una tendencia emergente y se ha vuelto importante su estudio como una opción terapéutica contra el SARS-CoV-2 y otras cepas mutantes del SARS. Recientemente, algunos estudios han informado que los

complejos metálicos son agentes antivirales para el SARS-CoV-2. Estos complejos presentan un mecanismo de acción multidiana [123,125].

Las características estructurales y químicas de compuestos de coordinación con metales como número de coordinación, geometría y número de oxidación; junto con las propiedades cinéticas, termodinámicas y las propiedades redox ajustables los han colocado como herramientas potenciales para usos medicinales. Complejos de Fe, Ru, Co, Pd, V, Ni, Mn, Zn, Cu, Au, Pt, entre otros; exhiben propiedades antivirales potenciales contra el Ébola, la influenza, el VIH y también los virus del SARS por el mecanismo de interferir con los procesos patogénicos virales primarios, la inhibición de la entrada viral en las células huésped y la inhibición del proceso de replicación del ARN o virus [130-132]. Por ejemplo, los derivados de auranofina pueden inhibir la unión de la proteína espiga a la enzima convertidora de angiotensina (ACE2) e interrumpir la entrada del virus en la célula humana. Además, los complejos metálicos también pueden inhibir la función Mpro. Compuestos de cobre, hierro y cobalto que presentan actividad biológica frente al virus VIH fueron investigados como inhibidor de la Mpro utilizando técnicas computacionales mostrando buenos energías de enlace Mpro-compuestos de coordinación y una constante de inhibición alrededor de 433.86 nM [130].

Los métodos computacionales se han convertido en una parte fundamental de la investigación para el descubrimiento de fármacos. En este contexto, se ha aplicado con éxito un enfoque *in silico* para generar posibles inhibidores de la enzima Mpro. El acoplamiento molecular es una de las estrategias más importantes utilizadas y generalmente se ha aplicado como un primer enfoque en el diseño computacional de fármacos. Esta metodología permite predecir las interacciones que estabilizan el complejo formado por un receptor (generalmente una proteína o un ácido nucleico) y una pequeña molécula unida a él, a nivel molecular. Los protocolos de acoplamiento se pueden diseñar para maximizar el muestreo del espacio conformacional y estimar energías de enlace libres (ΔG_v) confiables. La energía de enlace libre y la constante de inhibición (K_i) son parámetros de puntuación (íntimamente relacionados) que predicen la afinidad de unión entre dos especies después de que se han acoplado, y pueden estimar la eficiencia de un ligando específico como inhibidor enzimático, lo que permite desarrollar relaciones estructura-actividad. El acoplamiento molecular solo brindan una estimación aproximada de la afinidad entre dos moléculas y, por lo tanto, los resultados

pueden cuestionarse. Para eludir esto, se dispone de estrategias computacionales más precisas y robustas. En este contexto, ONIOM (nuestra propia mecánica molecular y orbital molecular integrada de N capas) es una alternativa práctica para superar estas desventajas. Los cálculos de ONIOM combinan la precisión de los métodos de mecánica cuántica (QM) y el bajo costo de la mecánica molecular (MM) [133]. En las últimas décadas, los métodos QM:MM como ONIOM han demostrado su valía para ofrecer simulaciones adecuadas de sistemas complejos como metaloenzimas, compuestos metálicos ligados a proteínas y ADN entre otras macromoléculas biológicamente relevantes. Las características estructurales, las propiedades fisicoquímicas, la capacidad de interacción y el mecanismo biológico multimodal permiten proponer a las casiopeínas de tercera generación como potenciales inhibidores de proteasas. El presente trabajo presenta la interacción de la enzima Mpro con cuatro compuestos de coordinación de cobre(II).

2.7 HIPÓTESIS

La adición de una molécula bioactiva como ligante secundario monocargado (curcumina y dimetoxicurcumina) podrá potenciar o modular la actividad biológica (antiproliferativa) de los compuestos ternarios de cobre(II) exhibiendo valores menores de CI_{50} respecto al cisplatino.

Los cálculos computacionales permitirán estimar el potencial redox y descriptores electrónicos de los compuestos de coordinación. El potencial redox tendrá relación lineal con la actividad biológica.

Las compuestos de coordinación de cobre(II) de cuarta generación con curcumina o dimetoxicurcumina podrán ser inhibidores de la proteína Mpro.

2.8 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar, caracterizar, evaluar *in vitro* y generar información acerca de la relación estructura-actividad de los nuevos compuestos de coordinación ternarios de Cu(II) con curcumina y dimetoxicurcumina

2.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar y caracterizar a la curcumina (L1) y dimetoxicurcumina (L2).
- Sintetizar distintos compuestos ternarios de coordinación de cobre(II) con curcumina y dimetoxicurcumina.
- Caracterizar los ligantes y los compuestos de coordinación obtenidos por métodos espectroscópicos y analíticos convencionales.
- Realizar estudios electroquímicos a los ligantes y los compuestos de coordinación. ($E_{1/2}$)
- Evaluar *in vitro* a los compuestos sintetizados para determinar su actividad antiproliferativa sobre células SKLU-1 y HeLa.
- Realizar cálculos teóricos para determinar el potencial redox de los compuestos de coordinación de cobre(II) obtenidos empleando DFT como nivel de teoría.
- Analizar/Buscar si existen correlaciones estructura-actividad biológica.
- Estudiar de la interacción de casiopeínas con la proteína Mpro del virus SARS-CoV-2.

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS

- Todos los derivados de fenantrolinas y bipyridinas fueron de pureza $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, México)
- Nitrato de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) $\geq 99.99\%$ (Aldrich)
- Acetilacetona ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) $\geq 99\%$ (Merck, México)
- 3,4-dimetoxibenzaldehído ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$) 99% (Sigma-Aldrich, México)
- Óxido de boro (B_2O_3) $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, México)
- t-butilborato ($\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{B}$) $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, México)
- n-butilamina ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$) $\geq 99\%$ (Merck, México)
- Ácido clorhídrico (HCl) $\geq 37\%$ (Sigma-Aldrich, México)
- Hidróxido de sodio (NaOH) $\geq 98\%$
- Bromuro de potasio (KBr) $\geq 99.8\%$ (J.T.Baker)
- TBAPF6 ($\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NPF}_6$) $\geq 99\%$ (Aldrich)
- Todos los disolventes fueron adquiridos de la distribuidora Química Alvi.

Todos estos reactivos fueron empleados en grado reactivo sin purificación adicional.

3.2 EQUIPOS Y CARACTERIZACIÓN

Los estudios de puntos de fusión, espectroscopía de IR, los espectros electrónicos y las mediciones de conductividad eléctrica se realizaron en el laboratorio 210, las mediciones de la susceptibilidad magnética se realizaron en el laboratorio 211 y las pruebas de citotoxicidad se realizaron en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química en la UNAM.

La difracción de rayos X de monocristal de los compuestos de coordinación fue realizada en el Centro Conjunto de Investigación de Química Sustentable CCIQS UAEM-UNAM.

Los estudios de análisis elemental, RMN, RPE y espectroscopía de masas MALDI se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM.

3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO IR-TF

La espectroscopia de infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro Nicolet AVATAR 320 FT-IR en un intervalo de 4000-400 cm^{-1} . Los espectros se visualizan con el programa EZ OMNIC para Windows.

3.2.2 ANÁLISIS ELEMENTAL

El análisis elementales se llevó a cabo utilizando un analizador Perkin-Elmer 2400 CHNS, utilizando cistina como compuestos de calibración.

3.2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C para los ligantes, se obtuvieron empleando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE III HD de 700 MHz y RMN Bruker Fourier 300MHz. Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm relativos al estándar interno de TMS (tetrametilsilano, (Me_4Si)). Se disolvió 26 mg de cada ligante en 1 mL de DMSO- d_6 .

3.2.4 CONDUCTIVIDAD

Las mediciones de conductividad eléctrica se realizaron con un conductímetro JENWAY 4350 conductivity and pH. El equipo fue previamente calibrado usando tres disoluciones de KCl en concentraciones 1.0 mol L^{-1} , 0.1 mol L^{-1} y 0.01 mol L^{-1} . La conductividad de todos los compuestos de coordinación se midió en DMSO a partir de disoluciones 0.001 M.

3.2.5 SUSCEPTIBILIDAD MÁGNETICA Y MOMENTO MAGNÉTICO

La susceptibilidad magnética de cada compuesto de coordinación se determinó con una balanza magnética MKI de Sherwood Scientific Cambridge UK empleando el método de Gouy a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, utilizando una constante de valor de 0.9980. Las correcciones diamagnéticas utilizadas en los cálculos se obtuvieron de Bain G. [134].

3.2.6 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los espectros electrónicos de los ligantes y de los compuestos de coordinación se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de UV-Vis Hewlett Packard 5484. Se utilizó una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm y de 1 mL de volumen. La matriz de diodos del sistema de UV-Vis en un

intervalo de 180 nm a 800 nm fue utilizada. Se prepararon disoluciones de concentración 1mM y 2mM en DMSO.

3.2.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro de masas Bruker Microflex (SX 102 A) equipado con MALDI-Tiempo de vuelo. Las muestras fueron montadas en matrices de DIT o DHB.

3.2.8 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (RPE)

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica en sólido se realizaron utilizando un espectrómetro Jeol JES-TE300 con un sistema criogénico ITC503 en la banda X. Se utilizó un campo centrado en 300 mT a temperatura ambiente con una frecuencia de microondas de 9.04 GHz. Los espectros de RPE se simularon para obtener los tensores g_x , g_y e hiperfinos utilizando el paquete de simulación EasySpin [135] para MATLAB R2019b.

3.2.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL

Se utilizó un difractómetro de rayos X de monocristal Bruker APEX II CCD (utilizando radiación Mo-K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$)) a 100 K de una fuente Incotec ImuS y un monocromador óptico Helios. Las estructuras se resolvieron utilizando fases intrínsecas (SHELXT) y se refinaron mediante mínimos cuadrados de matriz completa en F2 utilizando la interfaz gráfica de usuario shelXle. Los dibujos de estructuras químicas se produjeron utilizando el software Mercury.

3.2.10 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron utilizando un potencióstato/galvanostato PAR273 con un arreglo convencional de tres electrodos. Se prepararon diez mililitros de disoluciones de los compuestos de coordinación empleando DMSO a una concentración 1 mM del complejo y 0.1 M del electrolito soporte (hexafluoro fosfato de tetrabutilamonio, TBAPF₆). La disolución se burbujeó con nitrógeno gaseoso durante 5 min antes de cada medición. Se utilizaron tres electrodos: carbono vítreo como electrodo de trabajo, un alambre de plata como electrodo de pseudoreferencia y un electrodo de Pt como electrodo auxiliar. Todos los experimentos se referenciaron contra el par Fc⁺-Fc. Los experimentos iniciaron en potencial de corriente nula, se corrieron a distintas velocidades de barrido, a 50, 100, 150,

200, 250, 500 y 1000 mV s⁻¹, se realizaron barridos en dirección de potenciales positivos y negativos, por último, se realizaron experimentos de inversión. Los voltamperogramas se realizaron corrigiendo la caída óhmica del sistema.

3.2.11 PRUEBAS BIOLÓGICAS

En una placa de 96 pozos se cultivaron 20 000 células por pozo de SKLU-1 ó HeLa (a un volumen final de 100 µL en medio DMEM suplementado). Cada placa fue incubada a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h, pasado ese tiempo el medio fue retirado, se colocó medio fresco (90 µL) y 10 µL del compuesto a evaluar aumentando la concentración del mismo en diferentes pozos (Stock del compuesto fue de 100% DMSO). Los tratamientos se administraron por cuadruplicado en cada placa; este procedimiento se realizó por triplicado de manera independiente. Una fila de ocho pozos se preparó con 90 µL medio fresco y 10 µL de DMSO (0.37% v/v) la cual se tomó como control de supervivencia celular del 100%.

Las células se expusieron a los compuestos de coordinación durante 24 h, se les retiró el medio y se agregaron 50 µL de TCA al 10% para fijar a la superficie de las placas todas las células que sobrevivieron al tratamiento. La placa fue incubada durante 1 h a 4°C y posteriormente, se lavó 4 veces con agua destilada, luego se deja secar por 8 horas. Una vez seca la placa se le añadió 50 µL de sulforrodamina B (4% m/v en ácido acético 1% v/v) durante treinta minutos a temperatura ambiente sin exposición a la luz. Al finalizar el tiempo de tinción, se retiró la sulforrodamina B de cada pozo y se lavó cuatro veces con ácido acético 1%. La caja se dejó secando toda la noche. Al siguiente día, se agregaron 50 µL de Trizma base (pH=10) para redissolver la sulforrodamina y cuantificar en un lector de microplacas a 570 nm. Con los datos de absorbancia obtenidos se construyó una curva dosis-respuesta con los valores de concentración en micromolar vs porcentaje de inhibición celular.

3.3 MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los métodos computacionales en química son una herramienta utilizada para predecir o describir el comportamiento fisicoquímico de moléculas orgánicas e inorgánicas, gracias al desarrollo de nuevos modelos teóricos que permiten generar funcionales que conlleven a mejores aproximaciones en cuanto a describir electrónicamente sistemas inorgánicos. Para calcular los

potenciales redox de los compuestos de coordinación de cobre se siguió la metodología reportada anteriormente en varios trabajos [82,136,137] .

3.3.1 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEDIA ONDA

El potencial redox fue calculado mediante la construcción de ciclos de Born-Haber, tomando en cuenta los cambios en la energía libre Gibbs de las reacciones redox que pueden ocurrir para las casiopeínas de tercera generación (ecuación 1), por lo que, los cambios en la energía libre de Gibbs en fase gas y en solvatación de la reacción redox fueron calculados. Se trabajó a un nivel de teoría de M052x/LANL2DZ bajo un modelo de solvatación SMD utilizando DMSO como disolvente para simular los experimentos de voltamperometría lo mejor posible. Para los cálculos realizados se utilizó un factor de corrección de -0.258 eV sobre el cambio en la energía libre de Gibbs de solvatación para compensar los cambios en la segunda esfera de solvatación que no se toman en cuenta teóricamente. Por último, se empleó el potencial redox estándar del par redox ferrocinio/ferroceno (ΔG° ferroceno (DMSO)=5.3) calculado en este trabajo con la misma metodología computacional antes descrita.

El potencial redox es difícil de evaluar ya que es una pequeña diferencia entre dos valores muy grandes del total de las energías de dos estados de oxidación. De hecho, la energía de solvatación presenta un cambio significativo durante la reacción redox; porque el cambio en la carga sobre el centro metálico contribuye a la energía total. En este trabajo se optimizaron 16 moléculas de coordinación de cobre en estado de oxidación (II) y en reducción (I) ambas en fase gas y solvatado, luego, se analizan los valores de las energías libres de Gibbs en fase gas y en solvatación. Dado que los compuestos de coordinación de cobre(II) estudiados pueden presentar diferentes geometrías por la coordinación de una o dos moléculas de disolventes como agua o DMSO, se realizaron pruebas con 1 compuesto para saber cómo cambia el potencial redox y obtener mejor predicción o modelo para determinar el potencial de media onda. Se tomó a la casiopeína D2CuL1 ya que se contaba con el potencial de media onda experimental, de estos ensayos se estableció que el proceso redox de las casiopeínas se predice mejor cuando una molécula de agua se considera en el cálculo de forma implícita (ecuación 1).



En términos de energía libre de Gibbs estándar podemos reescribirla como:

- $\Delta G^{\circ}_{OIR} = \Delta G^{\circ}(R)(g) + (n) \Delta G^{\circ}DMSO(g) - \Delta G^{\circ}(O)(g)$
- $\Delta G^{\circ}_{OIR} = \Delta G^{\circ}(R)(ac) + (n) \Delta G^{\circ}DMSO(ac) - \Delta G^{\circ}(O)(ac)$

Se propuso el ciclo Born-Haber (figura 43) para obtener el cambio total en la energía libre de Gibbs tanto en fase gas como en solvatación, una vez obtenidos todos los cambios en las energías libres de Gibbs involucradas se puede calcular el potencial de media onda haciendo uso de la ecuación 2.

$$E^{\circ}_{OIR} = -\frac{1}{F} (\Delta G^{\circ}_{OIR} - \Delta G^{\circ}_{SHE}) \quad \text{..... ecuación 2}$$

Donde $\Delta\Delta G^{\circ}_s$ y ΔG°_{II} corresponden a:

$$\Delta\Delta G^{\circ}_s = \Delta G^{\circ}_s(R) + n\Delta G^{\circ}_s(DMSO) - \Delta G^{\circ}_s(O) \quad \text{.... ec. 3}$$

$$\Delta G^{\circ}_{II} = \Delta G^{\circ}(R(g)) - \Delta G^{\circ}(O(g)) + n\Delta G^{\circ}_s(DMSO) \quad \text{... ec. 4}$$

$$-\Delta G^{\circ}_{OIR} = \Delta G^{\circ}_{II} + \Delta\Delta G^{\circ}_s \quad \text{... ec. 5}$$

3.3.2 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las relaciones entre la estructura-actividad biológica de una o varias moléculas son una herramienta útil para describir o predecir comportamientos biológicos según parámetros estructurales, estéricos o electrónicos. Estas relaciones pueden conducir al diseño racional de nuevas moléculas con propiedades fisicoquímicas o electrónicas óptimas para mejorar la actividad biológica evitando realizar ensayos a prueba y error. Sin embargo, en sistemas donde se presenta un centro metálico es todo un reto ya que la mayoría de las veces los descriptores encontrados para algunos sistemas no funcionan del todo bien cuando se cambia de metal; esto puede ser por varias razones, una de ellas es por el cambio en las geometrías de los compuestos y por supuesto por la falta de funcionales que describan mejor este tipo de sistemas. Se llevó a cabo una correlación de la estructura-actividad de los compuestos de coordinación de cobre(II) para obtener descriptores que puedan sugerir cuáles son los factores que describen mejor el comportamiento de cada compuesto de coordinación de cobre que provoca o potencia su actividad biológica.

3.3.3 DOCKING MOLECULAR

La optimización de geometría y estimación de cargas atómicas se realizó utilizando cálculos a un nivel de la teoría DFT con el funcional M06 y la base LanL2DZ. Se tuvo en cuenta la información experimental de rayos X de las moléculas a optimizar, se removió el fragmento NO_3 y se obtuvieron complejos cuadrados los cuales se utilizaron como geometrías de punto de partida. Se utilizó el método SMD con agua como disolvente. No se detectaron frecuencias imaginarias que confirmaron que las geometrías optimizadas corresponden a un mínimo local en la superficie de energía potencial. El análisis NBO se utilizó para estimar las cargas atómicas para las simulaciones de acoplamiento molecular.

La estructura cristalina de la proteasa principal Mpro se obtuvo del banco de datos de proteínas, PDB ID: 6LU7. Previo a los estudios de acoplamiento, la proteína Mpro y los compuestos D5CuL1 ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)] NO_3) y D5CuL2 ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)] NO_3) se prepararon de la siguiente manera: En la proteína se eliminó un monómero, moléculas de agua, cofactores e inhibidores. Luego, se agregaron hidrógenos polares y cargas de Gastiger utilizando el software MGL Tools 1.5.6; esta estructura modificada se guardó como archivo pdbqt. Las estructuras optimizadas de todos los ligantes se guardaron en archivos pdbqt y las cargas atómicas estimadas se agregaron manualmente. Los estudios de acoplamiento se llevaron a cabo utilizando el software AutoDock 4.2. Se realizó un estudio de algoritmo genético dentro del complejo Mpro-Ligante (Mpro-L) centrado en x: -14,666, y: 16,284, z: 69,417 y tamaño de cuadrícula de 45 x 45 x 45 Å³ con espaciado de 0,375 Å. 150 individuos en población con evaluaciones de 2.5×10^4 para dar como resultado 10 poses acopladas. Para la conformación más estable se reportaron la energía de unión y la constante de inhibición (K_i). Finalmente, esa conformación acoplada se analizó con la interfaz gráfica Discovery Studio 2021.

3.3.4 ESTUDIOS ONIOM QM:MM

Se realizaron cálculos híbridos de mecánica cuántica y mecánica molecular (QM:MM) para la interacción entre los compuestos de coordinación y la MPro. En los cálculos QM/MM se empleó el protocolo ONIOM. Los métodos ONIOM permiten aplicar diferentes niveles de teoría a diferentes fragmentos del sistema analizado para producir resultados estructurales y

energéticos confiables para sistemas muy grandes a un costo computacional relativamente reducido. Bajo este enfoque, sólo se exploraron los compuestos que mostraron el mejor rendimiento inhibitorio en simulaciones de acoplamiento molecular. La geometría del punto de partida corresponde al ligante y los aminoácidos de la proteína (M_{pro}-pocket) de la conformación de acoplamiento elegida. Los residuos restantes se eliminaron utilizando el software Discovery Studio 09. Luego, los aminoácidos del M_{pro}-pocket se completaron manualmente con GaussView. Los cálculos de QM:MM se realizaron en Gaussian 09 en agua con modelo SMD. La optimización se realizó en dos pasos. En primer lugar, se consideraron las interacciones vdW entre M_{pro} y los compuestos de cobre. Las casiopeínas y los residuos más cercanos se calcularon con la metodología M06/LanL2DZ y los residuos restantes se simularon con el campo de fuerza universal (UFF). En la segunda etapa se reoptimizó la geometría considerando las cargas parciales del sistema. Se estudiaron tanto las interacciones vdW como las electrostáticas. Las cargas en los cálculos de MM se asignaron usando el formalismo de equilibrio de carga (QEq). La energía de interacción (DE_{int}) de la interacción proteína-ligante se calculó como la suma de las siguientes energías electrónicas:

$$DE_{int} = E_{tot} - (E_{pMpro} + E_{Cas})$$

donde E_{tot} es la energía ONIOM del sistema completo (M^{pro}+Cas), E_{pMpro} es la energía ONIOM de los aminoácidos de capa alta y capa baja de la M_{pro} y E_{Cas} es la energía de la casiopeína en el cálculo de capa alta.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SÍNTESIS DE LOS LIGANTES CURCUMINA Y DIMETOXICURCUMINA

Los ligantes se sintetizaron siguiendo la metodología realizada por Soria (figura 14). La síntesis se realizó mediante la condensación aldólica de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído ó 3,4-dimetoxibenzaldehído con 2,4-pentanodiona para obtener a la curcumina ((1E,4Z,6E)-5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one) y dimetoxicurcumina ((1E,4Z,6E)-5-hydroxy-1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)hepta-1,4,6-trien-3-one), respectivamente. Luego, la purificación de la curcumina (L1) se realizó utilizando una columna cromatográfica de sílica gel (SiO_2) empleando como eluyentes la mezcla Hexano/AcOEt (30:70 v/v). En cuanto a la purificación del ligante dimetoxicurcumina (L2), se encontró que se puede evitar la columna de sílice (más adelante se detallará el procedimiento). El método utilizado ayudó a disminuir considerablemente el uso de cantidades grandes de los eluyentes y sílica, sin embargo, el rendimiento de reacción fue de entre 32.49 a 38.3%, por lo que la reacción se realizó dos veces para tener 1.6 gramos de producto aproximadamente.

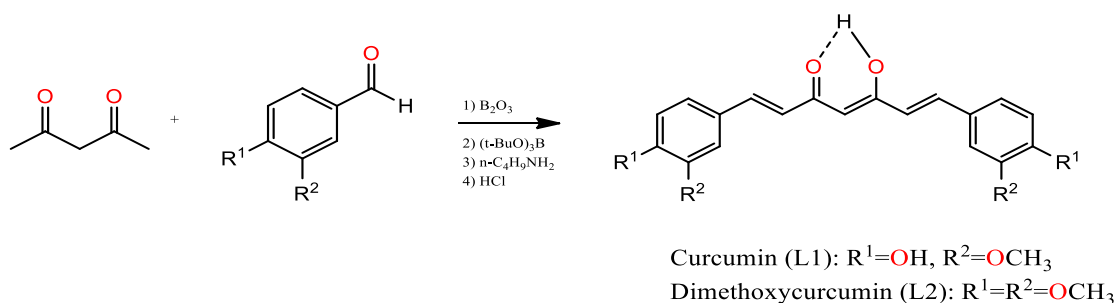


Figura 14. Ruta sintética para obtención de curcumina y dimetoxicurcumina.

4.1.1 SÍNTESIS DE CURCUMINA (L1)

En un matraz de dos bocas se colocaron 1.02 mmol de B_2O_3 en 10 mL de AcOEt anhidro; a esta disolución se le añadieron 2.4 mmol de acetilacetona y se dejó agitar durante 3 horas a 63°C con reflujo en una atmósfera de nitrógeno, se obtuvo un precipitado de color blanco (reacción 1). De forma paralela, transcurridas dos horas de la reacción antes descrita, en otro matraz de dos bocas se colocaron 4.9 mmol de 4-hidroxi-3metoxibenzaldehído en 10 mL de AcOEt anhidro, a esta disolución se le añadieron 4.9 mmol de t-

butilborato y se dejaron agitando durante 1 hora y media a 50°C con reflujo en atmosfera de nitrógeno; se obtuvo una disolución homogénea de color amarillo muy tenue (reacción 2). Esta última reacción se añadió a la reacción número 1 y se dejó agitando durante 1 hora; posteriormente se le añadieron 1.02 mmol de n-butilamina y la reacción se dejó agitando durante 21 horas a 63°C a reflujo y atmósfera de nitrógeno (figura 15).

Transcurridas las 21 horas de reacción se obtuvo una disolución de color anaranjado fosforescente, a esta mezcla se le añadieron 8 mmol de HCl 1N gota a gota; la disolución cambió de color anaranjado a rojo fosforescente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora, se obtuvieron dos fases las cuales fueron separadas con ayuda de un embudo de separación. A la fase acuosa se le realizaron extracciones con acetato de etilo (4 x 20 mL) y la fase orgánica recuperada se juntó con la fase orgánica separada previamente. La fase orgánica se lavó con salmuera, se separó por extracción, luego, la disolución se secó con Na₂SO₄ y se filtró a vacío para recuperar la fase orgánica. La fase orgánica se purificó por cromatografía por columna (SiO₂, Hexano/AcOEt 70:30), se obtuvo un rendimiento de reacción del 60%.

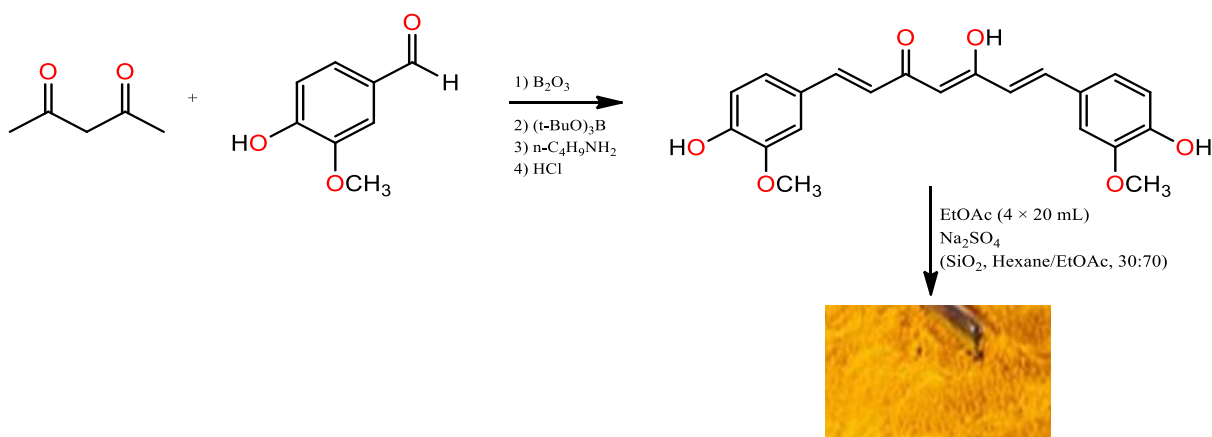


Figura 15. Ruta sintética para obtención del ligante curcumina (L1).

4.1.2 SÍNTESIS DE DIMETOXICURCUMINA (L2)

En un matraz de dos bocas se colocó 2.5 mmol de B₂O₃ en 10 mL de AcOEt anhidro; a esta disolución se le añadieron 5 mmol de acetilacetona y se dejó agitar durante 3 horas a 63°C con reflujo en una atmósfera de nitrógeno, se obtuvo un precipitado de color blanco (reacción 1). De forma paralela, transcurridas dos horas de la reacción antes descrita, en otro matraz de dos

bocas se colocaron 10 mmol de 3,4-dimetoxibenzaldehído en 10 mL de AcOEt anhidro, a esta disolución se le añadieron 10 mmol de t-butilborato y se dejó agitando durante 1 hora y media a 50°C en reflujo y atmosfera de nitrógeno; se obtuvo una disolución homogénea de color amarillo muy tenue (reacción 2). Esta última reacción se añadió a la reacción número 1 y se dejó agitando durante 1 hora; posteriormente se le añadieron 0.5 mmol de n-butilamina y la reacción se dejó agitando durante 21 horas a 63°C a reflujo y atmosfera de nitrógeno (figura 16).

Transcurridas las 21 horas de reacción se obtuvo una disolución de color anaranjado fosforescente, a esta mezcla se le añadieron 5 mmol de HCl 1N gota a gota; la disolución cambió de color anaranjado a rojo fosforescente. La mezcla de reacción fue agitada durante 1 hora y se obtuvieron dos fases de reacción una acuosa y una orgánica, estas fases se separaron mediante un embudo de separación. A la fase orgánica se le añadió salmuera y se separó nuevamente con ayuda de un embudo, luego la fase orgánica se le añadió Na_2SO_4 y se filtra con un matraz kitasato. La fase orgánica obtenida se concentró con ayuda de un rotavapor y se deja en el refrigerador durante toda la noche (se dejó con poco disolvente de AcOEt). En este punto el producto deseado se encuentra en mayor proporción y se puede notar que muy poco de aldehído (materia prima) se puede encontrar. Al día siguiente se encuentra un precipitado color anaranjado brillante (L2) y un líquido color sangre (contiene un poco de materia prima y L2) por lo que este último es tratado aparte. El precipitado color anaranjado brillante se recristalizó en MeOH/Acetona caliente y se enfrió con hielo provocando la precipitación de la dimetoxicurcumina en forma de cristales finos, el rendimiento de reacción fue del 32.5%.

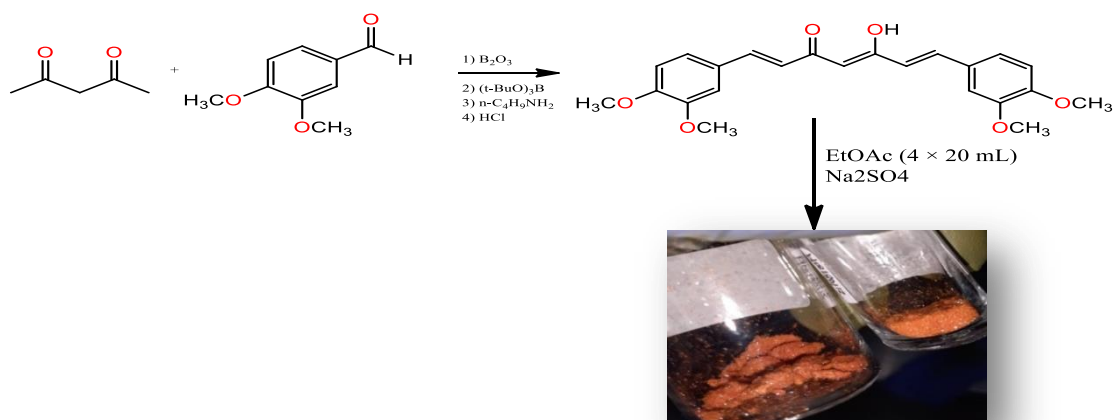


Figura 16. Ruta sintética para obtención de dimetoxicurcumina (L2).

4.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H Y ^{13}C

La resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13 (RMN ^1H y ^{13}C) proporciona información acerca del número, tipo de hidrógenos y tipo de carbonos que conforman una molécula. Por lo que esta técnica se utilizó para la caracterización de los dos ligantes (L1 y L2) sintetizados en este trabajo. Bajo la tesitura de que todos los ligantes presentan un tautomerismo ceto-enólico, se predice que obtendremos la mitad de las señales totales dado que ambos ligantes son moléculas simétricas en cualquier forma tautomérica.

4.2.1 RESONANCIA DE ^1H Y ^{13}C DE LOS LIGANTES CURCUMINA (L1) Y DIMETOXICURCUMINA (L2)

Los resultados experimentales se muestran en la tabla 3 con la numeración asignada a cada uno de los protones presentada en la imagen 17. El espectro de ^1H y ^{13}C RMN del ligante L1 se obtuvieron con un equipo de resonancia de 300 MHz. Por otro lado, la molécula L2 se caracterizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C utilizando un equipo de resonancia de 700 MHz (figuras S2 y S3), dado que el método de purificación empleado para esta molécula no está reportado y se requiere asegurar la obtención de esta molécula, se realizó un experimento HSQC para asignar las señales de carbono que pertenecen a cada protón del ligante (figura S4).

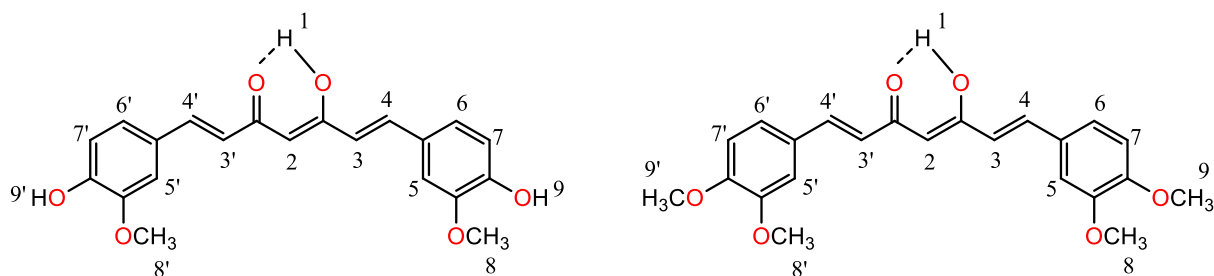


Figura 17. Asignación de numeración dada a cada protón y carbono de los compuestos A) curcumina y B) dimetoxicurcumina.

Los ligantes L1 y L2 presentan 9 protones diferentes. En la figura 17 se muestra que ambos ligantes se encuentran en su forma enólica en solución, ya que se observa una señal ancha para un protón del grupo -OH (H1) de multiplicidad singulete que integra para 1 con desplazamiento químico de 16.41 y 16.29 ppm para L1 y L2, respectivamente. Estos protones están involucrados en un puente de hidrógeno intramolecular (figura 17). El protón metino (H2) de L1 y L2 exhibe un singulete a 6,06 y 6,11 ppm,

respectivamente. Los protones vinílicos α,β - al carbonilo (H3, H3' y H4, H4') se encuentran en 6.76 y 7.55 ppm para el ligante L1 y para el ligante L2 se localizan en 6.83 y 7.59 ppm, todos integran para dos protones y muestran multiplicidad doblete, los valores de acoplamiento trans permitió asignarlas (tabla 3). Los protones aromáticos H5 y H5' se observan como doblete en 7.32 y 7.35 para L1 y L2. Los protones H6, H6' y H7, H7' de cada ligante se encuentran en 7.15 y 6.83 (L1) y 7.26 y 7.01 cada señal integra para dos protones. En el espectro obtenido para la curcumina (figura 18) encontramos una banda de multiplicidad singulete en 9.67 ppm que corresponde al protón del grupo -OH del fenol (H9) y una señal singulete en 3.84 que integra para 6 protones y corresponde a los protones del grupo -OCH₃ (H8). Por otro lado, el espectro de protón para L2 se observaron dos señales, la primera en 3.81 ppm y la segunda en 3.83 ppm que corresponden a los protones H9 y H8 respectivamente, los cuales se asignaron a los grupos metoxilo (-OCH₃).

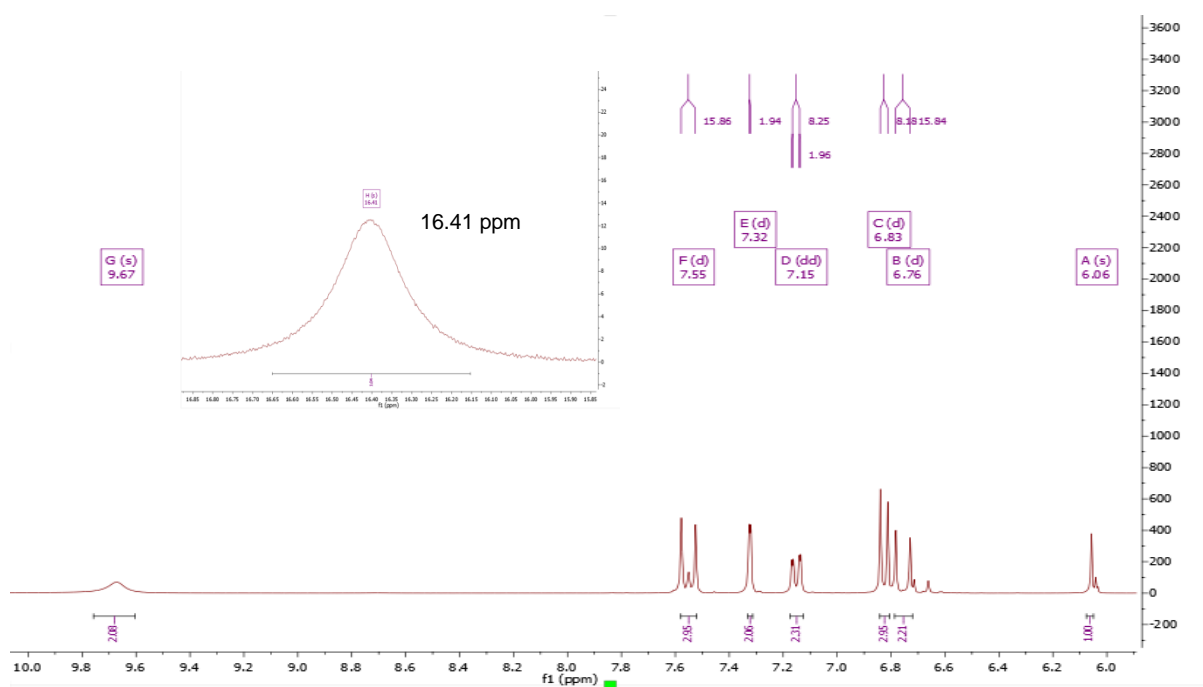
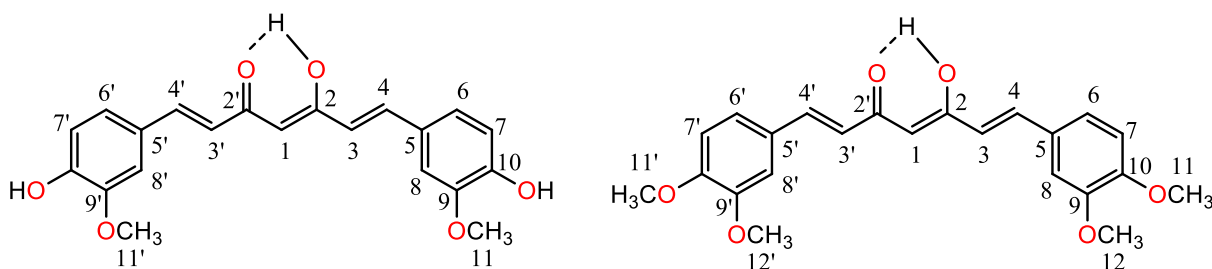


Figura 18. Espectro de RMN-¹H del ligante curcumina en DMSO-d₆

Tabla 3. Desplazamientos en partes por millón de los protones de los ligantes L1 y L2

Ligante	$\delta 1$	$\delta 2$	$\delta 3$	$\delta 4$	$\delta 5$	$\delta 6$	$\delta 7$	$\delta 8$	$\delta 9$
L1	16.41 (s, 1H)	6.06 (s, 1H)	6.76 (d, 2H, J=15.85 Hz)	7.55 (d, 2H, J=15.87 Hz)	7.32 (d, 2H, J=1.97 Hz)	7.15 (dd, 2H, J=1.95, 8.31 Hz)	6.83 (d, 2H, J=8.18 Hz)	3.84 (s, 6H)	9.67 (s, 2H)
L2	16.29 (s, 1H)	6.11 (s, 1H)	6.83 (d, 2H, J=16.73 Hz)	7.59 (d, 2H, J=15.78 Hz)	7.35(s, 2H)	7.26 (dd, 2H, J=8.24 Hz)	7.01 (d, 2H, J=8.24 Hz)	3.83 (s, 3H)	3.81 (s, 3H)

Los resultados experimentales de RMN-¹³C se muestran en la tabla 4 (la asignación de las señales de ¹³C para la curcumina se realizó por comparación de los resultados ya reportados. En este apartado se describirá el procedimiento para la asignación de los carbonos para el ligante dimetoxicurcumina ya que se cuenta con experimento de HSQC (figura S4). En la figura 19 se muestra la numeración asignada a cada uno de los carbonos que presenta el ligante L2. En el espectro ¹³C para la dimetoxicurcumina (figura 20) y en la tabla 4 se observan dos señales con desplazamientos químicos en 39.88 y 40.12 ppm (C11, C11' y C12, C12') atribuido a los metilos de los grupos -OCH₃. El metileno que está entre los dos carbonilos se desplaza a mayores partes por millón 101.49 ppm (C1). Los carbonos C3, C3' y C4, C4' que corresponden a los carbonos insaturados se encuentran en 122.83 y 140.90 ppm. Por último, las señales que presentes en 110.95, 123.40, 112.16, corresponden a los carbonos aromáticos C8, C6 y C7, mientras que los carbonos aromáticos cuaternarios se localizan en 128.05, 149.51 y 151.46 ppm y corresponden a los carbonos C5, C9 y C10, respectivamente. Una última señal es encontrada en 183.69 ppm asignada al C2 que está unido al oxígeno de los carbonilos. Todas las señales fueron asignadas con ayuda del espectro HSQC (figura S4) el cual es un experimento heteronuclear que permite conocer las interacciones C-H a un enlace de distancia.

**Figura 19.** Asignación de numeración dada a cada carbono de los compuestos curcumina y dimetoxicurcumina.**Tabla 4.** Desplazamientos en partes por millón de carbonos de los ligantes L1 y L2.

	L1	L2	
¹³ C	ppm	ppm	HSQC
1	101.30	101.49	6.11 (s)
2	183.66	183.69	
3	123.58	122.83	6.83 (d)
4	141.16	140.90	7.59 (d)
5	126.80	128.05	
6	121.55	123.40	7.26 (d)
7	116.17	112.16	7.01 (d)
8	111.82	110.95	7.35 (s)
9	148.45	149.51	
10	149.81	151.46	
11	56.09	39.88	39.88 (s)
12	56.15	40.12	40.12 (s)

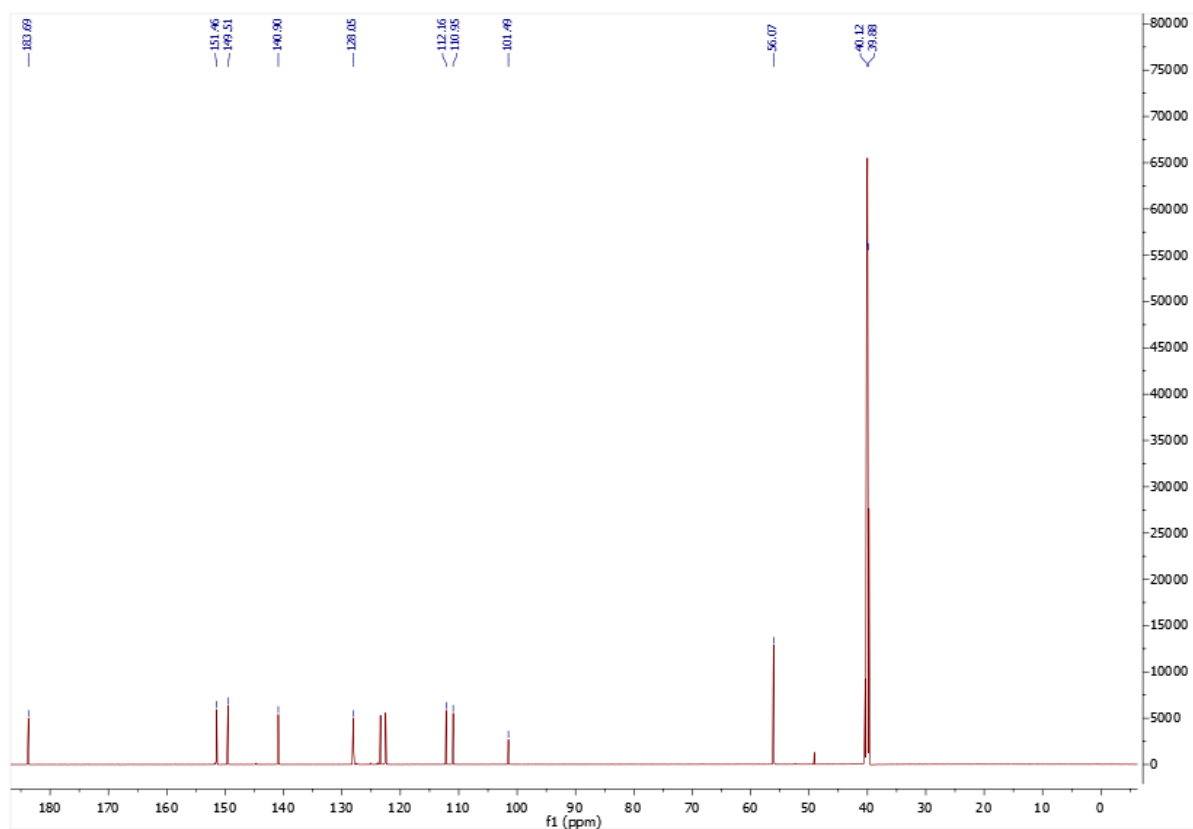


Figura 20. Espectro de RMN-¹³C del ligante dimetoxicurcumina en DMSO-d₆.

4.3 SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE(II) CON CURCUMINA (L1) Y DIMETOXI CURCUMINA (L2)

La síntesis de los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) con fórmula general $[Cu(\text{diimina})(\text{Ln})]\text{NO}_3$ se sintetizaron utilizando el ligante curcumina (L1) y dimetoxicurcumina (L2), su obtención fue basada en la patente para la síntesis de casiopéinas [138,139]; sin embargo, se realizaron modificaciones para elevar los rendimientos de reacción. Para facilitar la discusión de los resultados llamaremos familia 1 y familia 2 a todos los compuestos de coordinación que contengan como parte de su estructura a la curcumina (L1) y dimetoxicurcumina (L2) como ligantes secundarios, respectivamente.

En la obtención de los compuestos de coordinación de la familia 1, el ligante secundario L1 siempre fue el reactivo limitante (1 : 1 : 0.9, es decir; diimina : nitrato de cobre : L1) por la siguiente razón: evitar la generación del compuesto homoléptico de cobre(II) con curcumina, ya que resulta complicado separarlo del compuesto mixto dado que ambos compuestos presentan solubilidades similares, lo que vuelve costosa su purificación. La desprotonación del grupo enol se realizó en una estequiometría 1:1 (moles de curcumina : moles de NaOH) para impedir que los protones de los -OH del fenol sean desprotonados *in situ* y a su vez evitar que se genere una mezcla de productos. En el caso de la obtención los compuestos de coordinación con el ligante L2 (familia 2) la estequiometría siempre fue 1:1:1 (diimina : nitrato de cobre : L2).

De forma general, la síntesis de los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) se realizó de la siguiente manera: se añadieron 0.7 mmol de la diimina previamente disuelta en metanol a una disolución de nitrato de cobre (0.7 mmol) gota a gota, esta reacción se dejó agitando a temperatura ambiente por 30 minutos obteniendo inmediatamente una disolución de color azul la cual puede variar su intensidad según la diimina que se utilice. Posteriormente, a la disolución azul se le añadió gota a gota 0.63 mmol de L1 ó 0.7 mmol de L2 disueltos en metanol previamente desprotonados, este paso se realizó a reflujo a 68°C durante 4 a 5 horas con el propósito de aumentar el rendimiento de reacción. En algunos casos se obtiene un precipitado fino (compuesto mixto) el cual se filtra al vacío mediante un matraz Kitasato y embudo buckner; en otras ocasiones la disolución obtenida fue concentrada en el rotavapor para precipitar el compuesto mixto de cobre(II). La purificación se realizó mediante lavados con AcOEt de los compuestos mixtos

para eliminar el heptanoide (Ln) que no haya reaccionado luego, se lavaron con agua fría para eliminar el subproducto NaNO_3 y posteriormente se lavó con 20 o 30 mL de éter etílico. Una vez seco el compuesto, se pulverizó y se guardó para su caracterización. El esquema de reacción se ilustra en la figura 21.

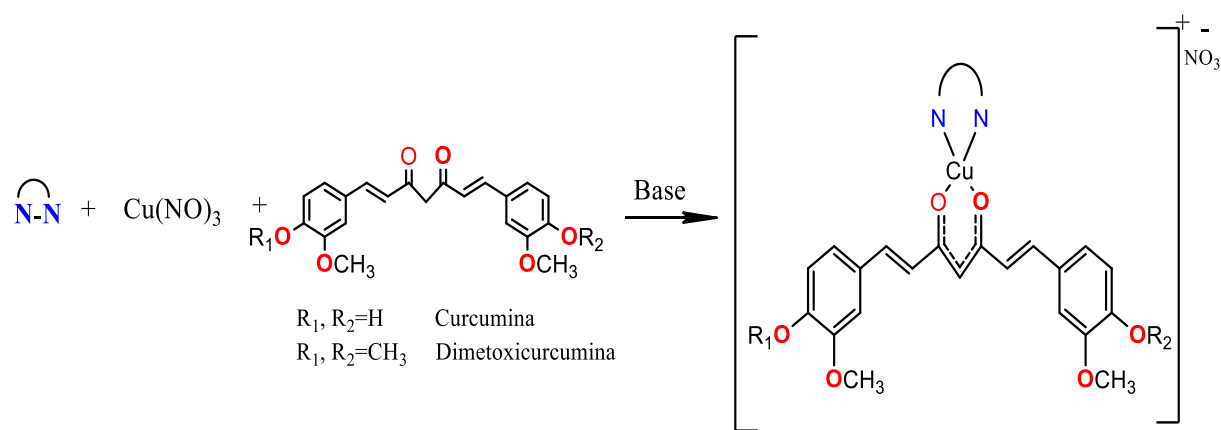


Figura 21. Ruta sintética para obtención de los compuestos de coordinación mixtos de cobre (II) con diiminas, curcumina y dimetoxicurcumina.

En la tabla 5 se presentan las variaciones de los ligantes diimínicos en los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) a manera de resumen.

Tabla 5. Clave de los compuestos mixtos de cobre(II) sintetizados en este trabajo

Clave	Ligante N-N	Ligante O-O	Fórmula general
FAMILIA 1			
D1CuL1	2,2'-bipiridina	(L1)	$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipi})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D2CuL1	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	(L1)	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipi}})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D3CuL1	5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina	(L1)	$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipi}})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D4CuL1	1,10-fenantrolina	(L1)	$[\text{Cu}(1,10\text{-fen})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D5CuL1	4,7-dimetil-1,10-fenantrolina	(L1)	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D6CuL1	5,6-dimetil-1,10-fenantrolina	(L1)	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D7CuL1	3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	(L1)	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fen})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
D8CuL1	4,7-difenil-1,10-fenantrolina	(L1)	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fen})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$
FAMILIA 2			
D1CuL2	2,2'-bipiridina	(L2)	$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipi})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D2CuL2	4,4'-dimetil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D3CuL2	5,5'-dimetil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D4CuL2	1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(1,10\text{-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D5CuL2	4,7-dimetil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D6CuL2	5,6-dimetil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D7CuL2	3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$
D8CuL2	4,7-difenil-1,10-fenantrolina	(L2)	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fen})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$

Los compuestos de coordinación de la familia 1 son muy poco solubles en agua, poco solubles en alcoholes (1.7 mg/mL aprox.) y muy solubles en dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); caso contrario a los compuestos de la familia 2, ya que estos son un poco más solubles en agua y alcoholes respecto a sus análogos de la familia 1 y son también muy solubles en DMSO y DMF.

En la tabla 6 se muestran los porcentajes de rendimientos de reacción de cada compuesto de coordinación mixto de cobre(II) obtenidos en este trabajo, así como el color del polvo.

Tabla 6. Rendimiento de reacción para cada compuesto de coordinación mixto de cobre(II)

CLAVE	RENDIMIENTO %	COLOR
D1CuL1	98.25	Dorado
D2CuL1	94.36	Anaranjado
D3CuL1	96.17	Anaranjado-rojizo
D4CuL1	93.94	Anaranjado oscuro
D5CuL1	80.58	Rojizo
D6CuL1	94.95	Anaranjado oscuro
D7CuL1	95.38	Anaranjado oscuro
D8CuL1	79.9	Anaranjado oscuro
D1CuL2	88.02	Anaranjado
D2CuL2	92.53	Anaranjado
D3CuL2	84.08	Verde claro
D4CuL2	79.93	Verde claro
D5CuL2	82.73	Anaranjado-rojizo
D6CuL2	80.01	Verde musgo
D7CuL2	94.43	Dorado
D8CuL2	79.58	Café amarillento

Para tener una primera idea de la pureza de cada uno de los compuestos de coordinación de cobre(II) se utilizó cromatografía de capa fina de sílice donde en un primer carril se colocó al ligante heptanoide (L1 o L2) y en un segundo carril se coloca al compuesto de coordinación de cobre(II) obtenido. La placa se eluyó con una mezcla de AcOEt/Hexano 7:3 y se reveló con luz UV de longitud de onda larga y corta, cabe mencionar que el compuesto de coordinación de cobre(II) es atraído por la sílice y éste no corre en la placa ni fluoresce, lo que hace fácil observar si aún se tiene materia prima, ya que ésta última presenta un r_f característico y se observa en las dos longitudes de onda.

4.3.1 PUNTOS DE FUSIÓN

Se obtuvo el punto de fusión (p.f.) tanto para los ligantes como de los compuestos de coordinación de cobre(II). La curcumina presenta un p.f. de 174.6 °C, también se observó un cambio de color en el compuesto a 185.3 °C, (de color anaranjado a un rojo intenso) a este punto se le denominó temperatura de descomposición térmica. En el caso de los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) con curcumina (familia 1) se registraron puntos de descomposición, todos ellos cambiaron a un color negro a excepción del compuesto D1CuL1. Todos los compuestos de coordinación presentan temperaturas de descomposición mayores que el ligante curcumina lo que sugiere que se obtuvieron compuestos nuevos o diferentes (tabla 7).

El punto de fusión del ligante dimetoxicurcumina se encuentra en un intervalo de 129.9-130.7°C, mientras que 4 compuestos de coordinación de cobre(II) (familia 2) presentan puntos de fusión mayores y 4 compuestos presentaron solo temperaturas de descomposición, lo que también sugiere que se han obtenido compuestos nuevos (tabla 7).

Tabla 7. Puntos de fusión y descomposición de los ligantes y compuestos de cobre(II)

Clave	Compuesto	P.M (g/mol)	P. de fusión (°C)	P. de descomposición (°C)
Familia 1				
L1	Curcumina	368.37	174.6	185.3
D1CuL1	[Cu(2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	649.1	248	258.9
D2CuL1	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	677.16	---	222.5
D3CuL1	[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	677.16	---	208.6
D4CuL1	[Cu(1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	673.12	---	249.2
D5CuL1	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	737.18	---	200.5
D6CuL1	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	701.18	---	205.4
D7CuL1	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	730.24	---	243.2
D8CuL1	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	825.32	---	246.0
Familia 2				
L2	Dimetoxicurcumina	396.43	129.9	---
D1CuL2	[Cu(2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	677.16	236.9	---
D2CuL2	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	723.22	244.9	---
D3CuL2	[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	723.22	262.7	---
D4CuL2	[Cu(1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	737.21	254.3	---
D5CuL2	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	729.23	---	244.5
D6CuL2	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	729.23	---	237.0
D7CuL2	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	757.28	---	241.0
D8CuL2	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	853.37	---	238.8

4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La caracterización mediante esta técnica resulta muy útil, ya que permitió identificar grupos funcionales que forman parte de los compuestos de coordinación obtenidos, así como los cambios en los desplazamientos o la desaparición/aparición de algunas señales respecto a los ligantes libres (los espectros de IR se presentan en el anexo A (figuras S6 a S15)). Las principales frecuencias de vibración observadas en los espectros de infrarrojo para cada uno de los ligantes (L1 y L2) y de los compuestos de coordinación de cobre(II) sintetizados se presentan en la tabla 8.

En la figura 22 se muestra el espectro del ligante curcumina el cual presenta señales representativas que se describen a continuación. Se observa una banda característica de la vibración de estiramiento O-H del grupo fenol en 3438.63 cm^{-1} , otra señal en 1602.6 cm^{-1} debida a la vibración de estiramiento C=O del carbonilo de la dicetona. La señal en 1510.06 cm^{-1} es asignada a la vibración de estiramiento de C=C del enlace vinílico, las vibraciones de estiramiento de Ar-O aparecen en 1280.5 cm^{-1} y las vibraciones asignadas al estiramiento de metilos y metilenos en 2945 cm^{-1} los cuales están presentes en el anillo aromático que forman parte del grupo metoxilo ($-\text{OCH}_3$). El espectro de Infrarrojo de la dimetoxicurcumina es muy similar al de la curcumina, sin embargo, la diferencia más notable e importante es que las bandas en 2931 cm^{-1} presentan una mayor intensidad, hecho que es esperado por que la única diferencia entre los ligantes es que se sustituyen los grupos $-\text{OH}$ por grupos $-\text{OCH}_3$ sobre el anillo aromático (Figura S15).

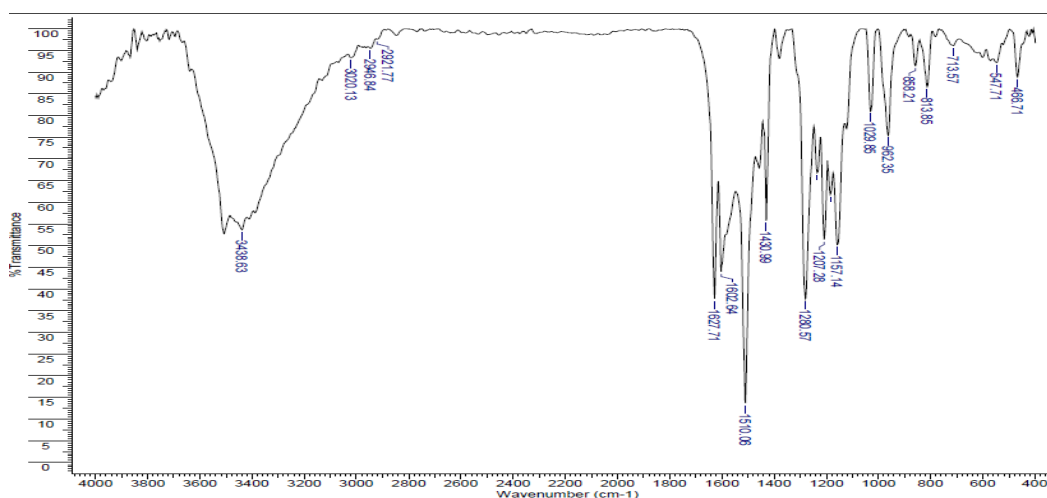


Figura 22. Espectro de infrarrojo de la Curcumina (L1), en pastillas de KBr.

Los espectros de infrarrojo obtenidos para los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) son muy parecidos entre ellos, pero existen cambios en el desplazamiento de algunas señales por efecto del sustituyente, como se observa en la tabla 8. Estos desplazamientos son muy comunes cuando se lleva a cabo la coordinación de ligantes al centro metálico de Cu(II) ya que se producen cambios geométricos y electrónicos que provocan que la energía necesaria absorbida para llevar a cabo transiciones vibracionales sean diferentes respecto cuando no se ha llevado a cabo la coordinación, lo que resulta en un corrimiento de las señales de infrarrojo. Las señales principales del ligante como C=C, C-H y Ar-O siguen encontrándose, lo que confirma que la insaturación ($1508-1511\text{ cm}^{-1}$) sobre la cadena de los heptanoides se conserva aun cuando se ha coordinado al cobre, al igual que los carbonos alifáticos ($2925-2977\text{ cm}^{-1}$) y el anillo aromático al final de la cadena ($1261-1282\text{ cm}^{-1}$), respectivamente. La señal de la vibración reportada para el estiramiento O-H de un grupo fenólico que sin coordinarse aparece como una banda fina en 3600 cm^{-1} ; sin embargo, para los compuestos de coordinación obtenidos se observó una banda intensa y ancha en aproximadamente 3423 cm^{-1} , esta forma se debe a dos razones: la primera a que los oxígenos del fenol podrían estar comprometidos con algún átomo de otra molécula (por ejemplo formando puentes de hidrógeno) y la segunda razón se debe a moléculas de agua de hidratación o de coordinación (ambos sucesos podrían confirmarse por difracción de rayos-X de monocristal). El desplazamiento hacia números de onda menores (tabla 8) es evidente sobre la banda correspondiente a la vibración C-O de la dicetona en los compuestos de coordinación de cobre(II) respecto a las bandas obtenidas para los ligantes L1 y L2 (1627 y 1589 cm^{-1}), esto sugiere que la coordinación de los átomos de oxígeno de la dicetona de los ligantes con el cobre(II) se llevó a cabo. Las señales observadas de 474 a 482 cm^{-1} se asignan a la vibración de enlace entre el cobre y los oxígenos de la dicetona (M-O).

Las señales características de las diiminas libres se presentan alrededor de 3070 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de los enlaces Ar-H, la banda en 1520 cm^{-1} correspondiente a la vibración de los enlaces C=C y la banda en 1620 cm^{-1} atribuida a los enlaces C=N, generalmente estas señales se encuentran muy juntas. También se observan dos señales del esqueleto en 850 y 720 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de las flexiones fuera del plano del enlace Ar-H presente en las fenantrolinas y una señal en 770 cm^{-1} para los ligantes de bipyridinas.

Tabla 8. Señales características de infrarrojo de los ligantes L1, L2 y sus compuestos de coordinación de cobre(II) dados en cm^{-1} .

Compuesto	$\nu\text{O-H}$ (fenol)	$\nu\text{C=N}$	$\nu\text{C-O}$	$\nu\text{C=C}$ (alifático)	$\nu\text{C-H}$	$\nu\text{Ar-O}$	NO_3^- iónico	νMO
Curcumina	3438	---	1627	1510	2946	1280	---	---
D1CuL1	3423	1619	1598	1508	2969	1280	1384	480
D2CuL1	3423	1621	1589	1508	2968	1280	1384	470
D3CuL1	3425	1629	1596	1510	2962	1280	1384	480
D4CuL1	3436	1618	1589	1510	2981	1278	1384	476
D5CuL1	3419	1621	1596	1510	2977	1282	1384	478
D6CuL1	3432	1621	1600	1511	2966	1278	1384	478
D7CuL1	3446	1619	1594	1510	2968	1282	1384	478
D8CuL1	3417	1618	1589	1510	2962	1280	1384	474
Dimetoxicurcumina	3444	---	1589	1510	2931	1261	---	---
D1CuL2	3427	1616	1579	1510	2948	1265	1384	486
D2CuL2	3471	1616	1581	1510	2838	1265	1384	480
D3CuL2	3452	1619	1581	1508	2939	1263	1384	484
D4CuL2	3436	1619	1581	1510	2939	1261	1384	484
D5CuL2	3428	1621	1579	1508	2935	1259	1384	472
D6CuL2	3444	1619	1581	1510	2935	1261	1384	472
D7CuL2	3446	1612	1587	1504	2939	1265	1384	482
D8CuL2	3440	1635	1560	1511	2933	1263	1384	480

Por último, se observó una nueva señal delgada e intensa en 1384 cm^{-1} característica del grupo nitrato como contraión lo que confirma la formación de la sal, sin embargo, para este tipo de compuestos de coordinación de cobre(II) existe una posición vacante para una geometría cuadrada y los iones nitratos también podrían coordinarse directamente al cobre de forma monodentada o bidentada. El ion nitrato tiene una simetría D_{3h} , comúnmente se observan tres bandas: la primera ν_2 deformación fuera del plano ($800\text{-}900\text{cm}^{-1}$), ν_{a3} vibración de estiramiento asimétrico ($1370\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$) y vibración de flexión en el plano doblemente degenerado (700 cm^{-1}). Cuando el anión se encuentra monodentado, se produce un cambio en la simetría provocando modificaciones en todas las bandas y generando dos bandas en

la región de 1290 y 1476 cm^{-1} por cambios en las vibraciones de estiramiento asimétrico y dos bandas más por cambios en las flexiones en el plano. Un caso similar es cuando el anión se encuentra de forma bidentada, se presentan los mismos cambios en las bandas, pero se separan aún más y la banda ν_2 aparece a menores valores de onda. Para todos los compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina y dimetoxicurcumina, solo se observa una banda fina en 1384 cm^{-1} lo que indica que el nitrato se encuentra fuera de la esfera de coordinación del cobre como contraión.

4.3.3 ANÁLISIS ELEMENTAL

En la tabla 9 se muestran los datos experimentales de análisis elemental (A.E.) de los ligantes y de 16 compuestos mixtos de coordinación de cobre(II). Este experimento permitió proponer la fórmula molecular y la masa molar de cada uno de los compuestos, los datos experimentales coinciden con la fórmula $[\text{Cu}(\text{diimina})(\text{curcuminoide})]\text{NO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. En todos los casos se consideró un error del 5% entre los porcentajes experimentales y calculados.

Tabla 9. Tabla de resultados de análisis elemental de los compuestos de coordinación.

Clave	Compuesto	° A.E (%C,%H,%N teórico)	P.M (g/mol)	Formula condensada
L1	Curcumina	68.96; 5.795 (68.46; 5.47)	368.37	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$
D1CuL1	$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	56.26; 3.75; 6.44 (57.36; 4.19; 6.47)	649.1	$\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$
D2CuL1	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	55.45; 4.32; 5.58 (57.01; 4.78; 6.04)	695.17	$\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$
D3CuL1	$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	56.13; 4.53; 5.56 (57.01; 4.78; 6.04)	695.17	$\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$
D4CuL1	$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	56.695; 3.415; 6.4 (58.88; 4.04; 6.24)	673.12	$\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$
D5CuL1	$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	57.73; 4.42; 5.82 (57.02; 4.78; 5.69)	719.19	$\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$
D6CuL1	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	60.93; 3.91; 5.08 (59.95; 4.45; 5.99)	701.18	$\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$
D7CuL1	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	54.4; 4.33; 5.49 (60.94; 4.83; 5.76)	747.24	$\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$
D8CuL1	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{L1})]\text{NO}_3$	63.51; 4.17; 4.91 (65.48; 4.27; 5.09)	825.32	$\text{C}_{45}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$
L2	Dimetoxicurcumina	68.41; 6.12 (69.68; 6.1)	396.43	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_6$
D1CuL2	$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{L2})]\text{NO}_3$	563.04; 4.16; 6.69 (58.53; 4.61; 6.2)	677.16	$\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu}$
D2CuL2	$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{L2})]\text{NO}_3$	57.04; 5.0; 5.83	723.22	$\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_9\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$

		(58.12; 5.15; 5.81)		
D3CuL2	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	56.55; 4.95; 5.68 (58.12; 5.15; 5.81)	723.22	C ₃₅ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu.H ₂ O
D4CuL2	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	54.38; 4.44; 5.38 (57.02; 4.78; 5.69)	737.21	C ₃₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ Cu.2H ₂ O
D5CuL2	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	59.15; 4.82; 6.08 (60.94; 4.83; 5.76)	729.23	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu
D6CuL2	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	58.37; 4.86; 6.08 (60.94; 4.83; 5.76)	729.23	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu
D7CuL2	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	59.26; 5.21; 6.01 (61.85; 5.19; 5.54)	757.28	C ₃₉ H ₃₉ N ₃ O ₉ Cu
D8CuL2	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	63.05; 4.635; 5.10 (66.14; 4.6; 4.92)	853.37	C ₄₇ H ₃₉ N ₃ O ₉ Cu

°Datos del análisis elemental experimental (datos calculados)

4.3.4 CONDUCTIVIDAD

Se muestra la conductividad eléctrica molar en DMSO que presentaron los compuestos de coordinación (tabla 10). De acuerdo a Greenwood [140], se conoce que disoluciones de compuestos en DMSO reportan valores de conductividad entre 50-70 μ S [140] cuando son electrolitos de tipo 1:1 a 25°C, de hecho el compuesto D6CuL1 presenta un valor de 59.1 μ S. Sin embargo, para compuestos de coordinación también se han reportado valores de 35 μ S o valores individuales que oscilan entre 23 μ S (sulfato de potasio octadecilo) y 42 μ S (tiocianato de potasio) [141]. Pearson R., [142,143] reportó un compuesto de coordinación de rutenio ([Ru(en)₂(H₂O)N₂][B(C₆H₅)₄]₂) con una conductividad de 35 μ S, es un electrolito tipo 1:1 donde el valor bajo respecto a lo encontrado por Greenwood se explica por qué la molécula tiene una baja movilidad iónica mediada por el contraión tetrafenilborato.

La mayoría de los compuestos de coordinación de cobre(II) sintetizados en este trabajo mostraron una conductividad eléctrica entre 23.2 a 37.4 μ S, estos valores están por debajo de lo reportado por Greenwood. Estos valores bajos de conductividad eléctrica molar significan que las moléculas conducen electricidad pero de forma moderada, lo que sugiere que estos complejos son electrolitos débiles tipo 1:1. Una posible explicación a estos valores de conductividad eléctrica es que en disolución los complejos forman arreglos de redes entre moléculas mediante los oxígenos de los fenoles o de los metoxilos (ya que pueden unirse al cobre de otra molécula vecina o formar enlaces tipo puente de hidrógeno) lo que conduce a una baja movilidad iónica, sumado a que son moléculas de gran tamaño y peso molecular. Estos resultados son importantes ya que, aunque existen moléculas de coordinación de cobre(II) que contienen dentro de su estructura a la curcumina o análogos, son escasos los reportes de valores de conductividad

eléctrica molar. Por otro lado, existen reportes de conductividad para algunos compuestos homolépticos de coordinación de cobre(II) con ligantes heptanoides donde se obtienen complejos no iónicos y se reportan datos de conductividad eléctrica entre 5 a 9 μS [144], lo que indica que son especies no electrolitos.

Tabla 10. Valores de conductividad de los compuestos de coordinación

COMPUESTO	CONDUCTIVIDAD (μS)
[Cu(2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	37.3
[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	33.02
[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L1)]NO ₃	32.9
[Cu(1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	32.6
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	34.09
[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	59.1
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	31.9
[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(L1)]NO ₃	32.8
[Cu(2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	37.4
[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	23.2
[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(L2)]NO ₃	24.1
[Cu(1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	23.7
[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	33.8
[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	28.7
[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	28.8
[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(L2)]NO ₃	27.2

4.3.5 SUSCEPTIBILIDAD MAGNÉTICA Y MOMENTO MAGNÉTICO

Para compuestos de coordinación que contienen cobre en estado de oxidación 2⁺ (configuración d⁹) dentro de su estructura, el valor del momento magnético efectivo a temperatura ambiente se espera entre 1.7 - 2.2 magnetones de Bohr, por otro lado, en compuestos con dos electrones desapareados se obtienen valores entre 2.6 y 4 MB.

En la tabla 11 se presentan los valores del momento magnético para cada compuesto de coordinación de cobre(II), para la mayoría de los complejos se obtuvo un valor entre 1.79 a 2.30 MB, lo que confirma que el centro metálico de cobre tiene un estado de oxidación 2⁺. Los valores obtenidos de μ_{ef} para D1CuL1, D3CuL1, D4CuL1, D5CuL1 y D6CuL1 están por debajo de 1.7 magnetones de Bohr, este fenómeno se explica de la siguiente manera: los compuestos mixtos de cobre(II) estudiados pueden presentar interacciones intermoleculares con otra molécula vecina, de tal forma que hay

cercanía entre los núcleos de cobre y el espín del electrón que esta desapareado en cada átomo de cobre lo que provoca un acoplamiento entre los momentos de espín electrónico de los electrones desapareados de cada cobre y como resultado se observa un efecto anti ferromagnético que resulta en valores bajos de momento magnético efectivo.

Tabla 11. Valores del momento magnético efectivo para los compuestos de coordinación mixtos de cobre(II) con curcumina y dimetoxicurcumina.

Clave	Fórmula molecular	P.M (g/mol)	X_g (cm ³ /mol)	X_{corr} (cm ³ /mol)	μ_{ef} (MB)	No. e- desapareados
D1CUL1	C ₃₁ H ₂₇ N ₃ O ₉ Cu	649.1	2.14E-07	4.63E-04	1.05	<
D2CUL1	C ₃₃ H ₃₃ N ₃ O ₁₀ Cu	695.17	1.40E-06	1.35E-03	1.79	1
D3CUL1	C ₃₃ H ₃₃ N ₃ O ₁₀ Cu	695.17	2.40E-07	5.44E-04	1.13	<
D4CUL1	C ₃₃ H ₂₇ N ₃ O ₉ Cu	673.12	2.30E-07	5.12E-04	1.10	<
D5CUL1	C ₃₅ H ₃₃ N ₃ O ₁₀ Cu	719.19	5.30E-07	7.68E-04	1.35	<
D6CUL1	C ₃₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ Cu	701.18	1.84E-07	5.15E-04	1.10	<
D7CUL1	C ₃₇ H ₃₇ N ₃ O ₁₀ Cu	747.24	1.53E-06	1.56E-03	1.92	1
D8CUL1	C ₄₅ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu	825.32	1.82E-06	1.97E-03	2.16	1
D1CUL2	C ₃₃ H ₃₁ N ₃ O ₉ Cu	677.16	1.74E-06	1.53E-03	1.91	1
D2CUL2	C ₃₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₀ Cu	723.22	1.49E-06	1.45E-03	1.86	1
D3CUL2	C ₃₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₀ Cu	723.22	1.58E-06	1.52E-03	1.90	1
D4CUL2	C ₃₅ H ₃₅ N ₃ O ₁₁ Cu	737.21	1.54E-06	1.51E-03	1.90	1
D5CUL2	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu	729.23	2.57E-06	2.13E-03	2.26	1
D6CUL2	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu	729.23	1.90E-06	1.61E-03	1.96	1
D7CUL2	C ₃₉ H ₃₉ N ₃ O ₉ Cu	757.28	2.11E-06	1.84E-03	2.10	1
D8CUL2	C ₄₇ H ₃₉ N ₃ O ₉ Cu	853.37	2.45E-06	2.22E-03	2.30	1

4.3.6 ESPECTROSCOPIA DE UV-Visible

Los espectros electrónico en disolución de 16 compuestos de coordinación de cobre(II) se presentan en el anexo A. En la figura 23 se presenta el espectro electrónico de absorción de la curcumina y dimetoxicurcumina, éstos presentan una transición electrónica en 424 nm y 427 nm (63288 y 31485 L mol⁻¹ cm⁻¹) respectivamente, atribuidas a las transiciones π - π^* debido las transiciones de la hiperconjugación electrónica entre los anillos aromáticos y a las dos insaturaciones en la cadena del heptanoide, estas transiciones son permitidas por espín y por Laporte. En varios trabajos existe una gran controversia en cuanto a la asignación de estas transiciones electrónicas donde proponen que la transición alrededor de 420-430 nm es debida a las transiciones π - π^* [145,146] empero, trabajos

recientes [107,147-150] donde se han sintetizado compuestos de coordinación de diferentes metales con curcumina como ligante plantean que estas transiciones son $n-\pi^*$ debidas a los electrones libres del átomo de oxígeno que pueden excitarse a orbitales π^* y la anchura de la banda indica la posible presencia de más de una forma isomérica en el estado fundamental [151].

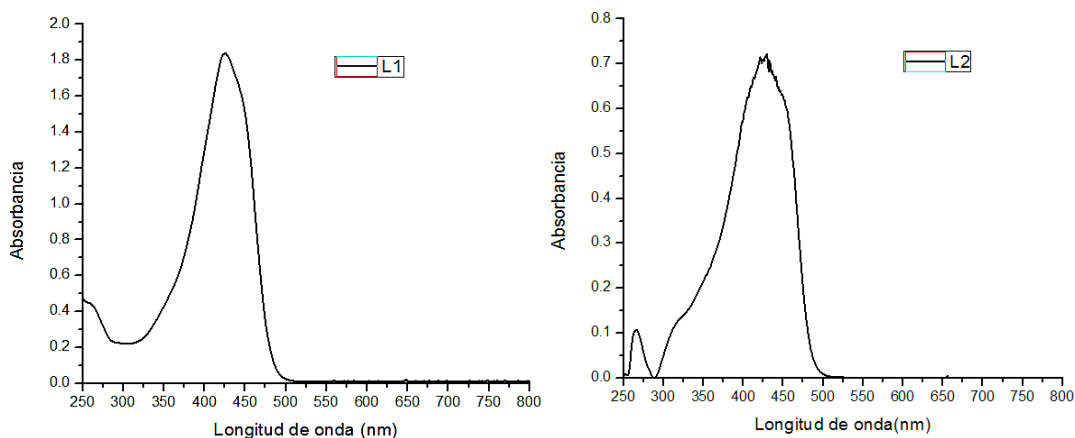


Figura 23. Espectro de UV-vis de la curcumina y la dimetoxicurcumina en DMSO a 23 μM .

Generalmente, los espectros electrónicos de UV-Vis de los compuestos de coordinación de cobre siempre muestran tres transiciones electrónicas (tabla 12), por esta razón solo se discutirán los espectros electrónicos de una molécula al azar para cada familia de compuestos de coordinación de cobre(II). La figura 24 muestra el espectro de UV-Vis del complejo D1CuL1, se aprecia que la primera transición se encuentra entre 285 a 315 nm atribuida a transiciones $\pi-\pi^*$ de los anillos aromáticos de la curcumina y a la contribución de las transiciones de los anillos aromáticos presentes en la bipyridina que se ha coordinado al cobre para la formación del compuesto de coordinación. Este fenómeno es más evidente en los compuestos de coordinación con 4,7-difenil-1,10-fenantrolina donde se observó una mayor absorbancia en las transiciones $\pi-\pi^*$ (figura S32 y S41). La segunda transición electrónica se localiza en 430 nm debido a las transiciones de $n-\pi^*$ presentes en la curcumina, sin embargo se ha desplazado batocromicamente 6 nm, a menor energía lo que sugiere que se ha llevado a cabo la coordinación. La tercera transición electrónica se encuentra en 454 nm se asignó a las transferencias de carga metal-ligante (TCML) u oxidativas, la cual ocurre de los orbitales d del metal hacia los orbitales de antienlace vacíos del ligante.

En la región del visible los ligandos primarios y secundarios no presentan transiciones electrónicas, por lo que las transiciones que se observan en esta región se atribuyen al centro metálico de Cu(II). Existe una cuarta transición electrónica en la región del visible entre 550 a 750 nm aproximadamente debida a las transiciones d-d del cobre (figura 25), estas son permitidas por espín y prohibidas por Laporte y presentan coeficientes de absorptividad muy bajos por lo que se requiere trabajar a concentraciones altas. La anchura de esta transición evidencia una distorsión geométrica alrededor del centro metálico y sugiere más de una transición las cuales pueden estar traslapadas.

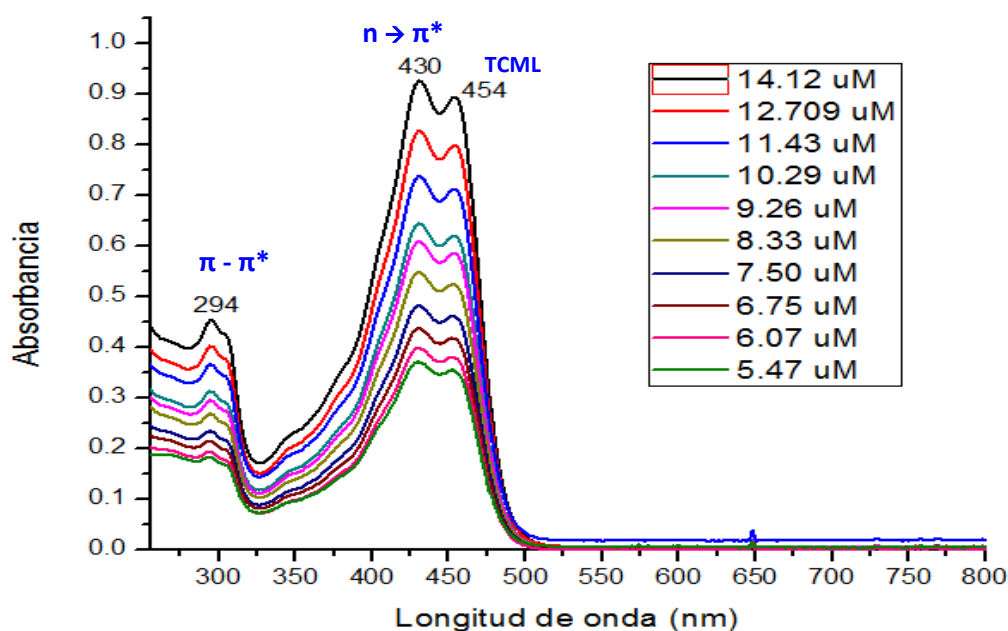


Figura 24. Espectro UV-vis del compuesto de coordinación [Cu(2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃ (D1CuL1), en DMSO.

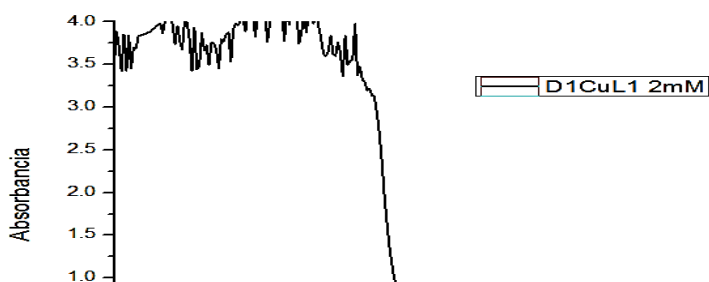


Figura 25. Transiciones d-d del compuesto de coordinación [Cu(2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃ (D1CuL1), en DMSO.

Los compuestos de coordinación de cobre con dimetoxicurcumina presentan espectros muy similares a sus análogos con curcumina en cuanto a números de bandas observadas; sin embargo, la diferencia es que las transiciones n- π^* y las TCML presentan coeficientes de absorptividad molar menor a los compuestos de coordinación de curcumina. La figura 26 muestra el espectro de UV-Vis del complejo [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ (D8CuL2), presenta una transición en 290 nm atribuida a transiciones π - π^* . Estas transiciones presentan intensidades mayores debido a los anillos aromáticos (fenilos) que pueden tener transiciones entre ellos. Este comportamiento también ocurre en compuestos con fenantrolinas respecto a los que contienen bipiridinas. La segunda transición electrónica se encuentra en 436 nm, debido a las transiciones n- π^* correspondientes a la transición de orbitales moleculares no enlazantes (pares de electrones no compartidos) del grupo -C=O ó -O-CH₃ a orbitales moleculares de antienlace. La tercera transición electrónica aparece en 460 nm, se asignó a las transferencias de carga metal-ligante (TCML), asociada con la transición de un electrón desde un orbital d perteneciente al cobre hacia los orbitales pertenecientes al ligante. La última transición electrónica observa entre 550 a 750 nm debida a las transiciones d-d entre los orbitales d del cobre (figura 27), las cuales son permitidas por espín y prohibidas por Laporte.

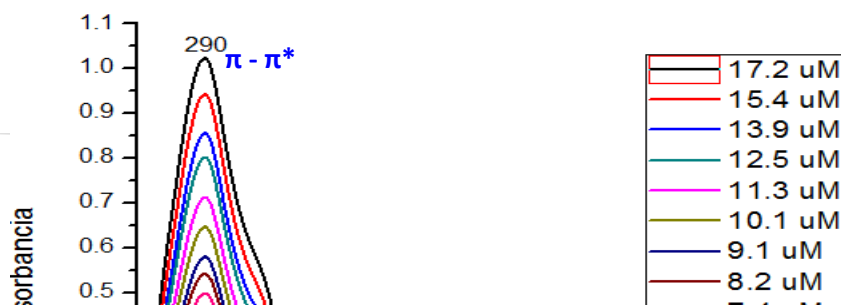


Figura 26. Espectro UV-vis del compuesto de coordinación [Cu(4,7-difenil-1,10-fenatrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ (D8CuL2) en DMSO

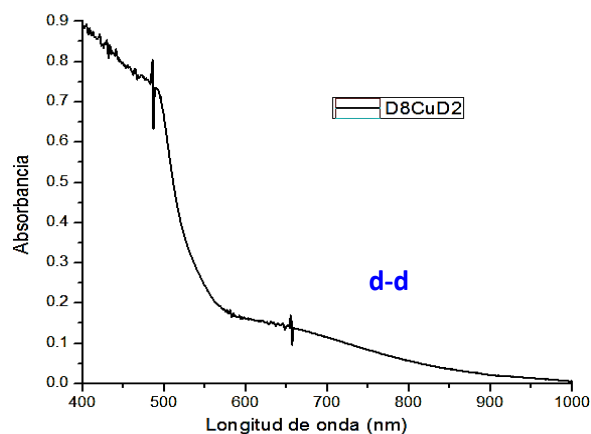


Figura 27. Transiciones d-d del compuesto de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenatrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ (D8CuL2) en DMSO.

En la tabla 12 se observan los máximos de absorción de todas las transiciones electrónicas obtenidas para L1, L2 y todos los compuestos de coordinación de cobre(II). Las transiciones electrónicas de los ligantes se desplazan a mayores longitudes de onda por lo que se vuelven menos energéticas cuando se forma el compuesto de coordinación. Las transiciones d-d del metal fueron observadas, sin embargo, no fue posible asignar un máximo de absorción debido a que existe un traslape con las transiciones de TCML debido a los altos coeficientes de absorción molar de los ligantes. Por otro lado, se ha reportado que para compuestos con geometría cuadrada

se esperan tres transiciones electrónicas e_g al estado b_{1g} , b_{2g} a b_{1g} y a_{1g} a b_{1g} en orden decreciente de energía (figura 28a), sin embargo, solo se observa una banda ancha, resultado de la combinación de las tres bandas (por ley de aditividad de absorbancia) en la región de 600-700 nm. Para compuestos con una geometría pirámide de base cuadrada (figura 28b), también se esperan las mismas tres transiciones electrónicas del cobre, pero, la transición a_{1g} a b_{1g} es de mayor energía, sin embargo, solo se observa una banda ancha por ley de aditividad en la región de 555-665, mientras que para compuestos pseudooctaédricos se espera una sola transición entre 650-800 nm. Las transiciones electrónicas observadas para todos los compuestos de coordinación de cobre(II) obtenidos se encontraron entre 500 hasta 700 nm aproximadamente. Se propone que los compuestos de coordinación adquieren una geometría cuadrada plano o pirámide de base cuadrada (pbc), esta última provocada por la coordinación de una molécula de agua de forma apical con el átomo de cobre para formar una geometría pbc, este hecho es confirmado más adelante en la discusión de difracción de rayos X. Barik [96], Kanhathaisong y Mukherjee [11,152,153] también han reportado la aditividad de absorbancia en las transiciones electrónicas d-d en compuestos de cobre con curcumina.

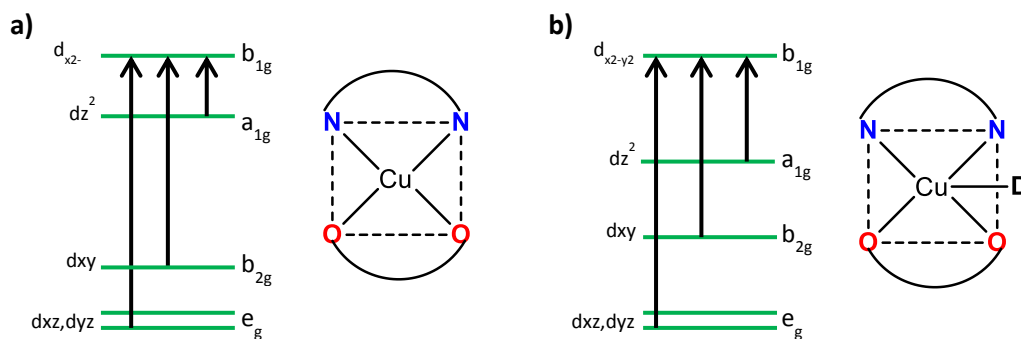


Figura 28. Transiciones propuestas entre orbitales d-d del cobre para una geometría: a) cuadrada y b) pirámide de base cuadrada.

Tabla 12. Máximos de absorción en UV-Vis y coeficiente de extinción molar de los ligantes y los compuestos de coordinación.

Compuestos	$\lambda_{max}(nm)$	ϵ	$\lambda_{max}(nm)$	ϵ	$\lambda_{max}(nm)$	ϵ
------------	---------------------	------------	---------------------	------------	---------------------	------------

	$\pi-\pi^*$	(L/mol cm)	$n-\pi^*$	(L/mol cm)	TCML	(L/mol cm)
L1	260	--	424	63288		
D1CuL1	294	31451	430	64287	454	62853
D2CuL1	292	22776	430	42317	454	41947
D3CuL1	304	28563	426	36928	448	33804
D4CuL1	266	48706	430	57630	454	56402
D5CuL1	268	51897	430	59041	454	56908
D6CuL1	276	42400	428	35698	452	32659
D7CuL1	274	34157	432	33142	456	32775
D8CuL1	282	53109	430	42733	454	40475
L2	266	---	427	31485		
D1CuL2	313	22461	430	24832	458	23216
D2CuL2	310	25161	430	23350	458	21809
D3CuL2	321	17513	430	20741	458	19205
D4CuL2	275	42754	433	33220	458	30807
D5CuL2	276	52001	433	34631	458	32386
D6CuL2	284	44217	433	33226	458	31128
D7CuL2	282	49471	433	32936	458	30671
D8CuL2	290	53569	436	11448	460	10582

4.3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR DESORCIÓN-IONIZACIÓN LASER ASISTIDA POR MATRIZ-TIEMPO DE VUELO (MALDI-TOF)

El análisis de espectroscopia de masas de los ligantes L1 y L2 ([Ligante-H]⁺) muestran un ion molecular de 369 y 397 respectivamente, para L2 el ion molecular también es el pico base (anexo A) lo que sugiere que la molécula está en mayor abundancia esto soporta que nuestro método de purificación es eficiente a pesar de los bajos rendimientos de síntesis. A continuación, se explica el análisis realizado para asignar los posibles fragmentos encontrados para ambos ligantes. Se encontraron tres picos en orden creciente de abundancia relativa en una relación de m/z igual a: 318, 274 y 241, los cuales corresponden a los fragmentos presentados en la figura 29, la fragmentación comienza con la pérdida de los grupos funcionales -OH y -OMe de un anillo aromático, luego se pierden los mismos grupos funcionales pero del segundo anillo aromático, por último es posible que la molécula se fragmente de forma que pierda un anillo aromático por completo, de hecho este corresponde al pico base (figura 29).

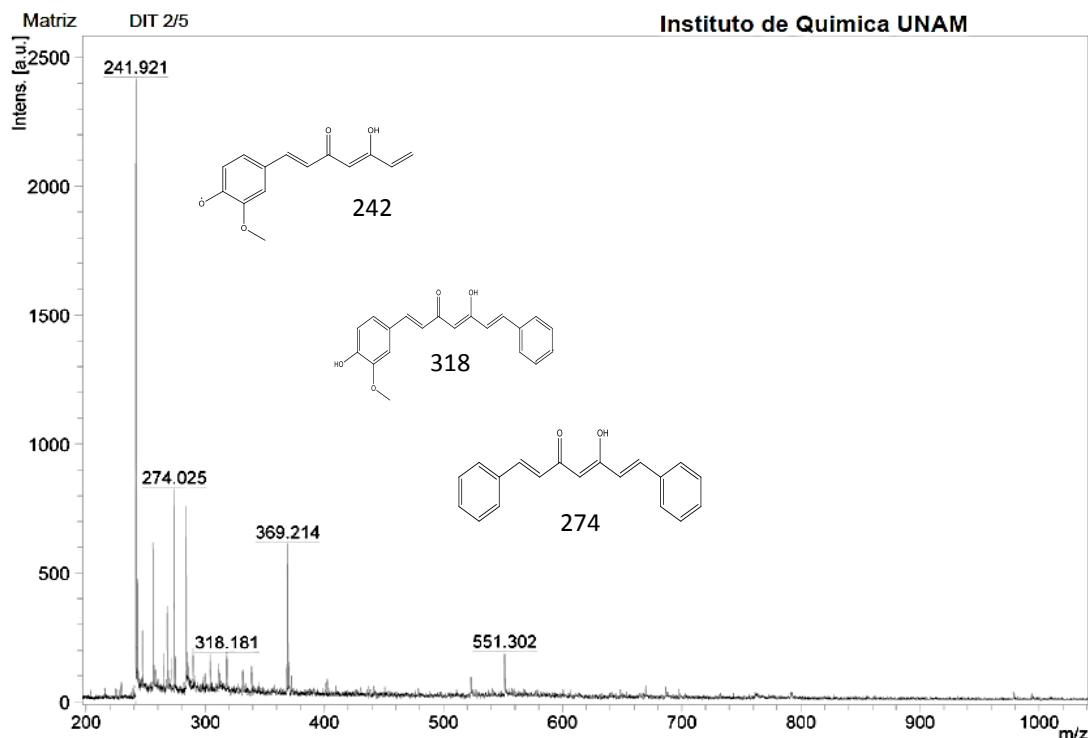


Figura 29. Espectro de masas por MALDI-TOF del ligante curcumina (L1)

El ligante L1 es fotosensible y se puede degradar para formar los compuestos presentados en la figura 30, no se encontró ningún pico asignado al valor carga masa de los productos de degradación lo que propone que el ligante curcumina está puro. El compuesto número seis o el ácido ferúlico de la figura 30 podrían generar compuestos de coordinación no deseados.

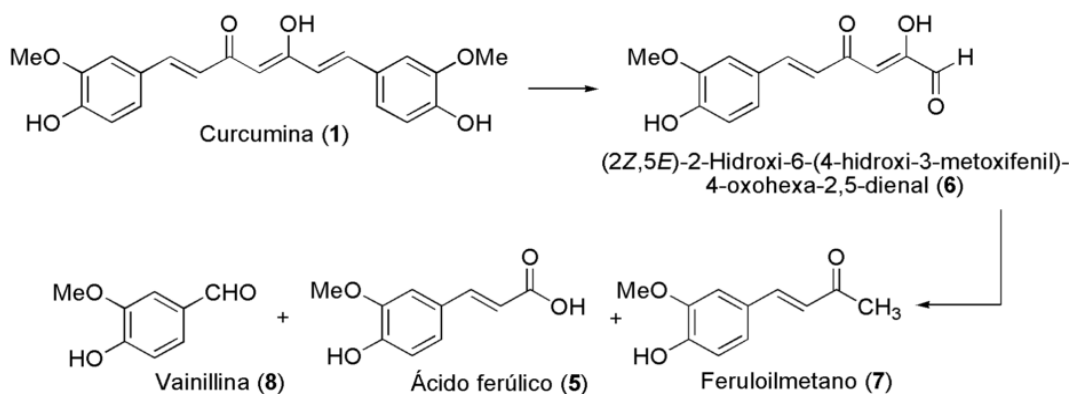


Figura 30. Productos de degradación de la curcumina (L1).

La tabla 13 muestra los picos teóricos y experimentales correspondientes al ion molecular de los compuestos de coordinación de cobre(II), en todos los casos los patrones isotópicos teóricos del cobre concuerdan con los resultados experimentales (anexo A). Varias moléculas mostraron que el ion molecular es también el pico base, los cuales corresponden al fragmento del catión complejo de cobre(II) (Figura S42-S59) que se forma al perder el contraión nitrato ($[\text{DnCuLn}]^+$). Los resultados confirman que la estequiometría de los compuestos de coordinación de cobre (II) es 1:1:1 (diimina : Cu : ligante secundario) que concuerda con los resultados de análisis elemental. Además, todos los compuestos de coordinación con curcumina como ligante secundario exhiben fragmentos con la relación m/z que representan a los complejos sin uno o dos grupos funcionales -OH o -OMe sobre los anillos aromáticos de la curcumina. El mismo comportamiento se observa para todos los complejos con dimetoxicurcumina, pero además se observó la pérdida de 2 o 4 grupos -OMe, este comportamiento se había descrito por los ligantes libres.

Tabla 13. Datos de espectrometría de masas. Ion molecular (m/z) de los ligantes y los complejos de cobre(II).

Compuestos	Peso Molecular (g/mol)	Ion Molecular (teórico m/z)	Ion Molecular (obtenido m/z)
Curcumina (L1)	368.37	368	369.2
$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	649.01	586.1	586.9
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	695.17	614.4	615.0
$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	695.17	614.4	614.0
$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	673.12	610.1	610.9
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	719.19	638.1	638.0
$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	701.18	638.1	638.0
$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	747.24	666.1	667.1
$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$	825.32	762.1	762.1
Dimetoxicurcumina (L2)	396.43	396.4	397.7
$[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	677.16	614.1	615.3
$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	723.22	642.1	643.2
$[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	723.22	642.1	642.1
$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	737.21	638.1	638.0
$[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	729.23	666.1	668.2
$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	729.23	666.1	668.2
$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	757.28	694.2	696.1
$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$	853.37	790.2	791.5

En la Figura 31A, se muestra el espectro de masas MALDI-TOF para el compuesto D4CuL2 elegido al azar para su análisis. Se observan 3 picos con una relación m/z de 522, 582 y 638 los cuales se asignan al catión complejo con la pérdida de 2 grupos funcionales -OMe, 4 grupos -OMe sobre los anillos aromáticos del ligante secundario y el tercero corresponde al ion molecular $[D4CuL2]^+$ (donde pierde al ion NO_3^-), el ion molecular corresponde al pico base, corroborando la obtención de cada complejo de cobre(II) deseados. En las figuras 31B y 31C se observa el patrón isotópico para el cobre.

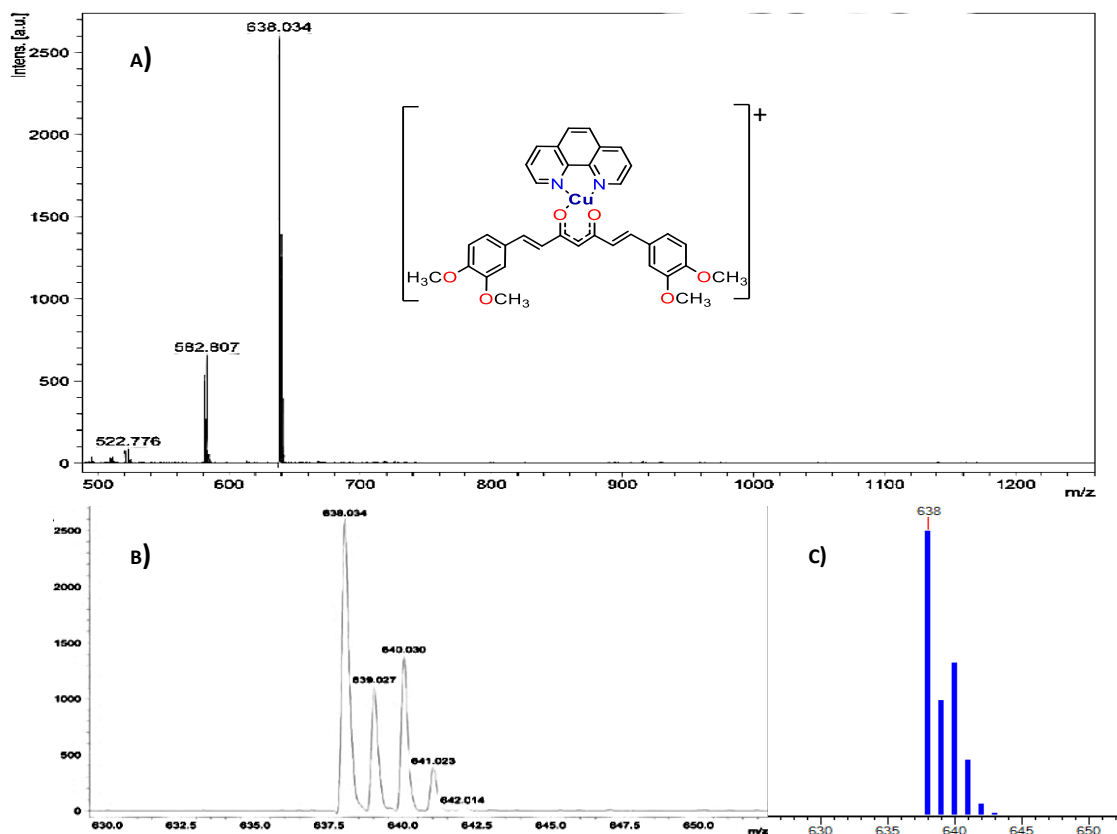


Figura 31. A) Espectro de masas MALDI-TOF de $[D4CuL2]^+$, B) Patrón Isotópico teórico del cobre en el complejo y C) Patrón isotópico del cobre calculado.

4.3.8 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

En general, los espectros RPE en estado sólido de los compuestos de coordinación exhiben simetría axial (Figura 32), típica de una configuración d^9 en un estado fundamental, esto confirma la presencia de Cu(II). Se observaron acoplamiento hiperfinos y superhiperfinos, es decir, un acoplamiento del momento magnético de espín del electrón desapareado del átomo de cobre con el momento magnético de su núcleo y un acoplamiento magnético con el núcleo de un átomo de cobre o un heteroátomo vecino, respectivamente.

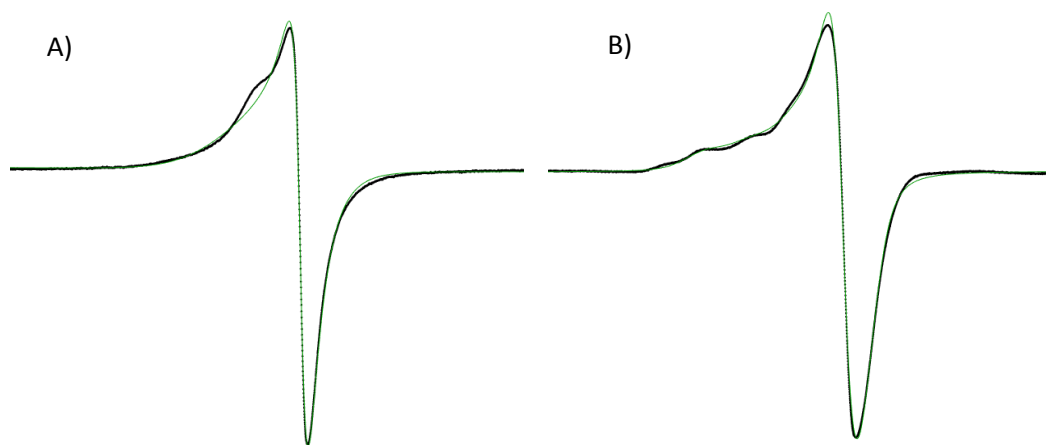


Figura 32. Espectro de RPE en estado sólido (Espectro simulado, línea verde). A) Complejo D7CuL1 y B) Complejo D6CuL2.

La tabla 14 presenta los resultados de g paralela, perpendicular y las constantes de acoplamiento ($g_{||}$, g_{\perp} , $A_{||}$ y A_{\perp}) de todos los complejos. En la mayoría de los casos se obtiene una señal de tipo axial (figura 32), exceptuando el compuesto D4CuL2 que presenta una señal con forma axial pero no es similar a todos los demás, por lo que se discutirá por separado (figura 33). Se puede apreciar que todos los complejos presentan valores de $g_{||}$ mayores a g_{\perp} debido a la anisotropía del sistema. Se encontró que los valores de $g_{||} > g_{\perp} > 2.0023$ son consistentes con un electrón desapareado en el orbital dx^2-dy^2 , que corresponden a geometrías cuadrado plano o pirámide de base cuadrada [154] y todos son mononucleares. Este fenómeno también fue observado por Barik A. [95], en compuestos de coordinación de cobre con curcumina. El valor de $g_{||}$ está influenciado por el ambiente químico del electrón desapareado del Cu^{II} , lo que permitió determinar el carácter iónico o covalente entre el metal y los átomos donadores de los ligantes. Los valores de g inferiores a 2.3 sugieren un entorno predominantemente covalente

alrededor del átomo de cobre en los complejos y los heteroátomos de los ligantes (diimina y heptanoides) interactúan fuertemente con el átomo de cobre [154-156].

Tabla 14. Parámetros de los espectros de RPE en estado sólido de los compuestos de coordinación mixtos de Cu(II) con curcumina y dimetoxicurcumina.

Compuestos	g_i	$g_{ }$	A_i ($1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)	$A_{ }$ ($1 \times 10^{-4} / \text{cm}^{-1}$)	$g_{ }/A_{ }$
D1CuL1	2.07	2.22	3.46	111.09	200.10
D2CuL1	2.08	2.15	2.24	220.67	97.70
D3CuL1	2.07	2.20	0.33	28.83	765.61
D4CuL1	2.07	2.23	8.99	109.00	205.32
D5CuL1	2.07	2.21	2.47	95.67	231.53
D6CuL1	2.09	2.21	0.98	15.62	1408.15
D7CuL1	2.07	2.21	2.34	25.75	860.58
D8CuL1	2.07	2.22	3.61	40.49	549.27
D1CuL2	2.04	2.20	2.21	138.89	158.75
D2CuL2	2.05	2.22	0.45	3.33	6666.00
D3CuL2	2.04	2.24	3.79	171.19	131.37
D4CuL2	---	---	---	---	---
D5CuL2	2.06	2.13	89.03	231.33	92.23
D6CuL2	2.05	2.25	0.19	179.07	126.04
D7CuL2	2.04	2.31	10.01	128.79	179.43
D8CuL2	2.04	2.22	40.26	280.27	79.53

De forma particular para el compuesto de coordinación [Cu(1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ exhibe un espectro de tipo axial, las señales asignadas a los acoplamiento hiperfinos son de baja intensidad, mientras que la parte superhiperfina presenta un desdoblamiento en la señal debido al acoplamiento del electrón libre con el núcleo de algún heteroátomo (figura 33). La parte superhiperfina se desdobra en 3 señales, las cuales pueden predecirse utilizando No. de líneas = (2nI+1), como el espín nuclear del nitrógeno es 1 entonces se predicen 3 señales si solo se acopla con un nitrógeno (n= número de núcleos).

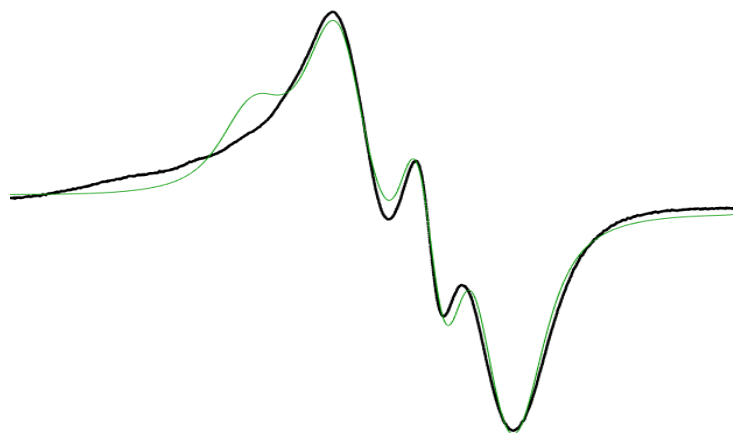


Figura 33. Espectro de RPE en estado sólido de dos lotes del compuesto $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$. Espectro simulado, línea verde.

Entender que geometría presentan los complejos de coordinación en disolución se llevó a cabo un estudio de RPE a 77 K empleando disoluciones en DMSO de concentración 2 mM dada la alta solubilidad de los compuestos en este disolvente. La figura 34 presenta un espectro de RPE en disolución para $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$ en el cual se pueden observar cuatro líneas hiperfinas que corresponden al acoplamiento del electrón desapareado del átomo de cobre con su núcleo (^{63}Cu abundancia isotópica= 69.17%). Presenta un momento de espín nuclear $I=3/2$ podemos predecir la aparición de cuatro señales. Se obtuvo un espectro de tipo axial con valores $g_z > g_y = g_x$ debido a que existe una contribución mayor sobre el eje z y diferente a la contribución en los ejes x e y. Este tipo de señales y sus valores confirman la presencia de especies monoméricas de Cu(II) y una geometría que puede ser cuadrado plano, pirámide de base cuadrada u octaedro elongado [95].

Los estudios de RPE en DMSO no se han obtenido espectros con acoplamientos hiperfinos definidos, por lo que, esta parte del proyecto aún continua en desarrollo. Mantener al disolvente DMSO para que poder compararlos con los resultados de UV-Vis; utilizar concentraciones de 0.5mM y 1mM o realizar una dilución magnética con el objetivo de observar la parte hiperfina. Diferentes grupos de investigación han utilizado la técnica de RPE para la caracterización en líquido de compuestos de coordinación de cobre(II) con curcuminoides reportan experimentos en metanol [34,157], acetonitrilo

[158] o DMF [159,160] por lo que el cambio de disolvente es una opción para resolver este problema.

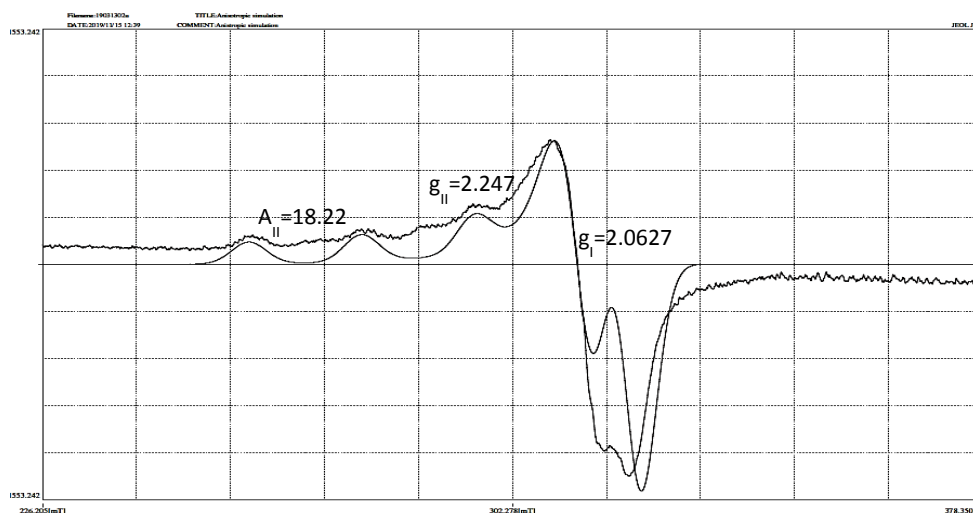


Figura 34. Espectro de RPE en disolución del compuesto de coordinación [Cu(2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃; línea sólida corresponde al espectro calculado

4.3.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL

Se obtuvieron pequeños cristales de los complejos análogos D5CuL2 y D6CuL2 (Figuras 35 y 36), ambos compuestos son provenientes de una solución saturada del ligante en DMSO en mezcla cualitativa con metanol. La muestra se dejó en reposo para que cristalizara a temperatura ambiente. La Tabla S1 resume los datos del cristal, los parámetros de recolección y los refinamientos. El análisis de difracción de rayos X de ambos complejos mostró un sistema cristalino triclinico con grupo espacial P-1. La figura 35 muestra que el centro metálico del átomo cobre tiene un número de coordinación de cuatro (tetradentada) exhibiendo una geometría cuadrada plana donde un ligante 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina está coordinada al Cu²⁺ a través de dos átomos de nitrógeno y un ligante dimetoxicurcumina coordinado al átomo de cobre a través de los átomos de oxígeno que forman la dicetona completando la esfera de coordinación. La figura 36 muestra a un compuesto donde el ion Cu(II) tiene una geometría pirámide de base cuadrada dado el número de coordinación de cinco donde el ligante 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina está coordinada al Cu²⁺ a través de dos átomos de nitrógeno, un ligante dimetoxicurcumina coordinado al átomo de cobre a

través de dos átomos de oxígeno que forman la dicetona y una molécula de agua completando la esfera de coordinación. Las distancias de enlace y los parámetros de ángulo seleccionados para D5CuL2 y D6CuL2 se enumeran en la tabla 15. La distancia de enlace Cu-N-N-diimina son más largas respecto a Cu-O-O-enonalo alrededor del átomo de cobre, debido a la mayor densidad electrónica en el átomo de oxígeno.

Tabla 15. Distancias de enlace (Å) y ángulos (°) para los compuestos de coordinación D5CuL2 y D6CuL2.

Compuestos	Enlace	Distancia	Enlace	Ángulos (°)
	Átomo-Átomo (Å)		Átomo-tomo (Å)	
D5CuL2 Geometría cuadrada plana	Cu-N1	1.977	O1-Cu-O2	94.68
	Cu-N2	1.993	N1-Cu-N2	81.84
	Cu-O1	1.906	O1-Cu-N1	92.37
	Cu-O2	1.886	O2-Cu-N2	89.45
	Cu-O (H ₂ O)	5.456	O1-Cu-N2	168.51
	Cu-O (NO ₃)	6.582	O2-Cu-N1	166.09
D6CuL2 Geometría pirámide de base cuadrada	Cu-N1	2.013	O1-Cu-O2	94.68
	Cu-N2	2.022	N1-Cu-N2	81.84
	Cu-O1	1.921	O1-Cu-N1	92.37
	Cu-O2	1.911	O2-Cu-N2	89.45
	Cu-O (H ₂ O)	2.260	O1-Cu-N2	168.51
	Cu-O (NO ₃)	4.958	O2-Cu-N1	166.09

Las similitudes entre los cristales obtenidos son que los cuatro grupos funcionales metoxilo en los anillos de fenilo que están rotacionalmente libres apuntan en direcciones opuestas, lo cual también fue informado por Pucci para compuestos de coordinación de [Zn(4,4'-C₉H₁₉-22'-bipy)Zn(curcumina)]Cl [71,161]. La segunda similitud comprende que ambos compuestos cristalizaron con un ion nitrato como contraión (5 Å de distancia entre el cobre y el oxígeno del nitrato), confirmado por FTIR y espectrometría de masas. Es probable que las moléculas de agua o disolvente se coordinen con el cobre en solución y generen geometrías piramidales de base cuadrada debido a la naturaleza dinámica del sistema. Los números CCDC de los complejos D5CuL2 y D6CuL2 contienen los datos cristalográficos complementarios presentados en este documento (CCDC-2169382 y CCDC-2169383).

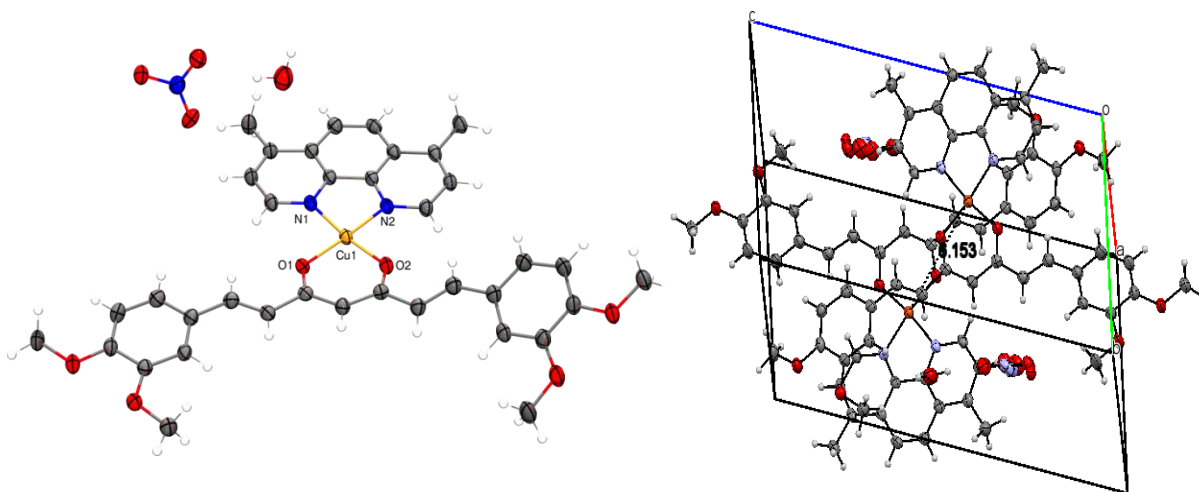


Figura 35. Estructura molecular ORTEP del complejo D5CuL2 con elipsoides de desplazamiento al 50% de nivel de probabilidad. Arreglo del complejo D5CuL2 en su celda unidad.

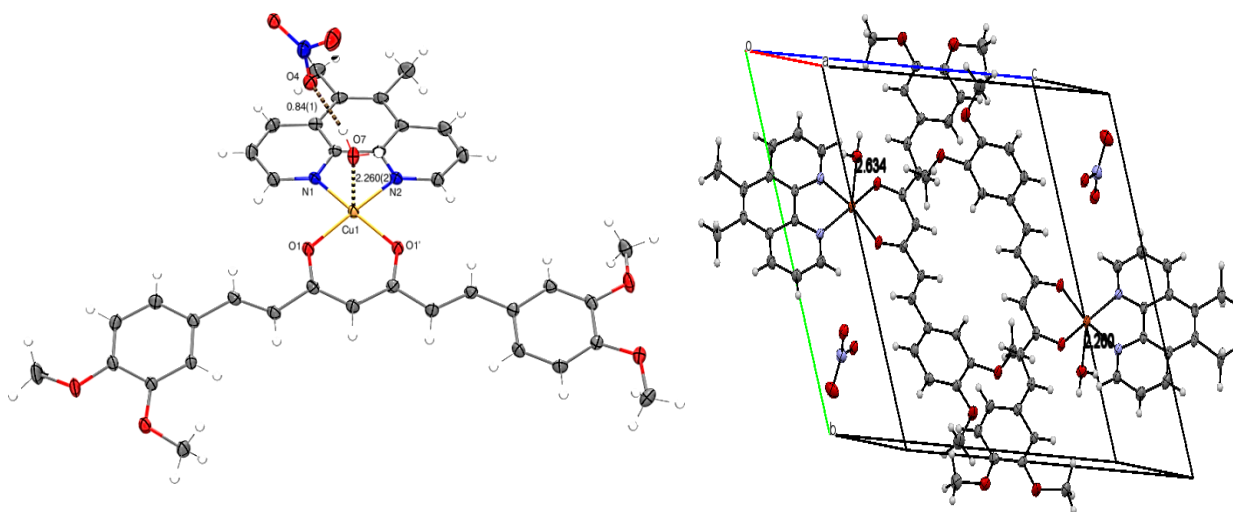


Figura 36. Estructura molecular ORTEP del complejo D6CuL2 con elipsoides de desplazamiento al 50% de nivel de probabilidad. Arreglo del complejo D6CuL2 en su celda unidad

En un arreglo cuadrado plano se esperan ángulos de enlace al centro metálico de 90°, en la tabla 15 se puede observar que dos de los ángulos del compuesto D5CuL2 son menores al valor esperado. Debido a la distorsión observada en la geometría, se realizó el cálculo del parámetro τ_4 cuyo valor determina la geometría más probable en torno al centro metálico para compuestos tetracoordinados, ya sea cuadrado plano ($\tau_4=0$), balancín ($0.18<\tau_4<0.64$), pirámide trigonal ($\tau_4=0.85$) o tetraédrica ($\tau_4=1$). Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\tau_4 = \frac{360 - (\alpha + \beta)}{141}$$

Donde α y β son los ángulos más grandes entre los átomos coordinados al centro metálico. Para el compuestos [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ (D5CuL2) el valor obtenido de τ_4 es 0.180 por lo que la geometría tiende a cuadrada plana. Para el caso del compuesto [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)(H₂O)]NO₃ (D6CuL2) se espera una geometría ya sea pirámide de base cuadrada o bipirámide trigonal dado que es un compuesto pentacoordinado, estas geometrías exhiben ángulos de 90° y 120° sin embargo, en el cristal se observan valores menores provocadas por distorsiones en los ángulos, por esta razón se calculó el parámetro τ_5 para discernir entre las geometrías más probable al rededor del átomo de cobre(II). Un valor de τ_5 cercano a 0 sugiere una geometría pirámide de base cuadrada y si el valor es cercano a 1 la geometría sería bipirámide trigonal. La ecuación empleada fue:

$$\tau_5 = \frac{\theta - \varphi}{60}$$

Donde θ y φ corresponde a los ángulos más grandes entre los átomos coordinados al centro metálico. El valor de para el compuestos D6CuL2 es 0.04 por lo que la geometría es pirámide de base cuadrada distorsionada.

El arreglo cristalino de estas moléculas no muestra apilamientos entre los anillos aromáticos de las biperidinas como se ha encontrado en varias casiopeínas de segunda y cuarta generación [162]. En lugar de eso, se observa que el arreglo intermolecular entre dos moléculas está mediado por la cercanía o apilamiento entre el heptanoides (ligantes secundarios) con la parte diiminica y así sucesivamente como se muestra en las figuras 36 y 37 corroborando que no hay cercanía entre los átomos de cobre, por lo que se

determinó un momento magnético característico a 1 electrón desapareado mediante susceptibilidad magnética. Adicionalmente se puede observar dos moléculas por celda unidad.

Además, el compuesto $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ (D5CuL2) presenta interacciones intermoleculares cortas entre los oxígenos de los metoxilos y el protón de otro grupo metoxilo. En el arreglo cristalino que observado en la figura 37 se puede observar que la distancia entre cada átomo de Cu^{2+} es de 4.12 y 6.15 Å.

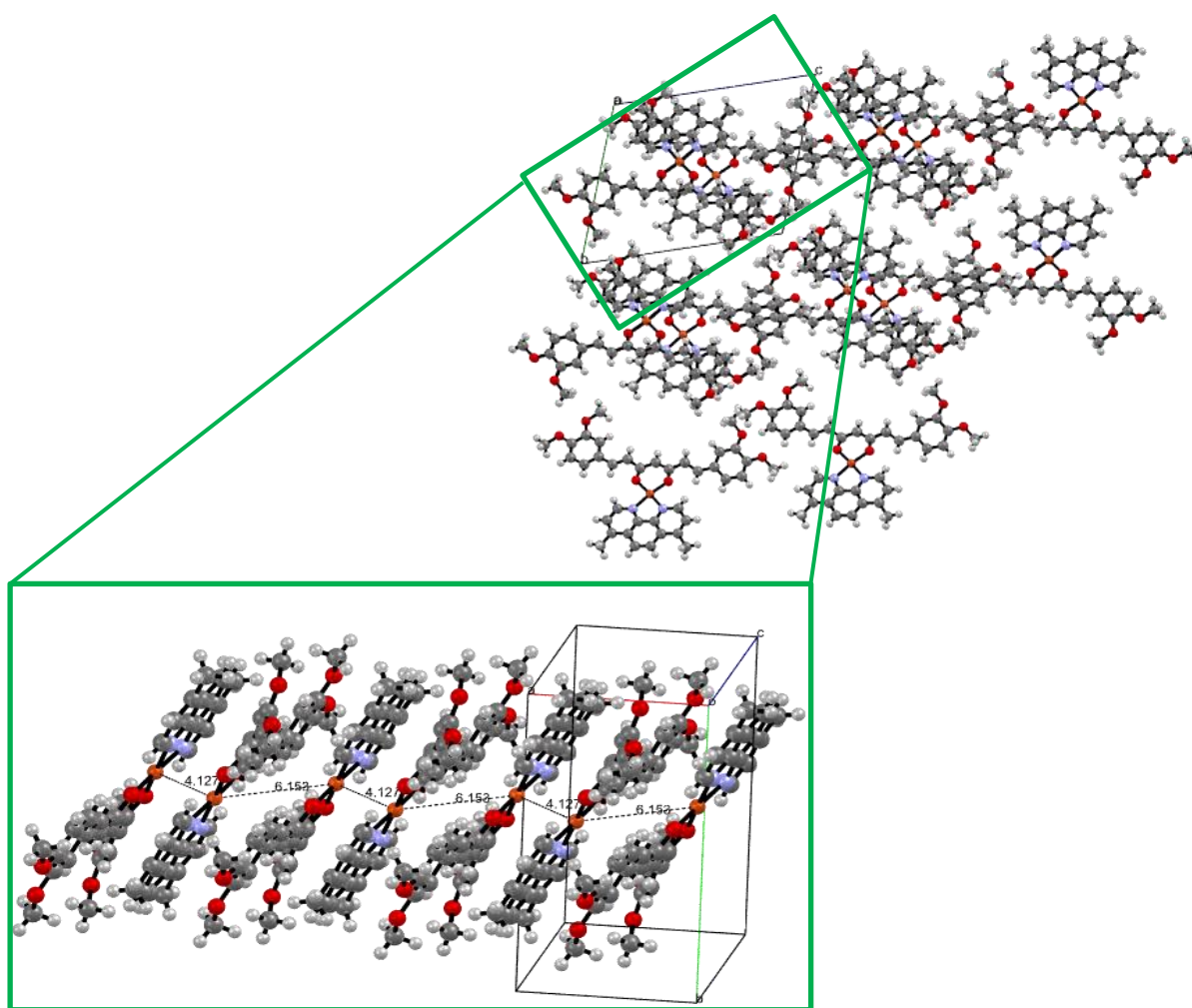


Figura 37. Interacciones cortas (vista del eje a) y arreglo supramolecular del compuesto D5CuL2.

El compuesto [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ (D6CuL2) se estabiliza por puentes de hidrógeno intermoleculares débiles entre los oxígenos de los metoxilos y el protón de las moléculas de agua, da lugar a un arreglo supramolecular sobre el eje a con canales. Esto último también puede ocurrir en disolución. En el arreglo cristalino que observado en la figura 38 se puede observar que la distancia entre cada átomo de Cu²⁺ es de 10.060 Å.

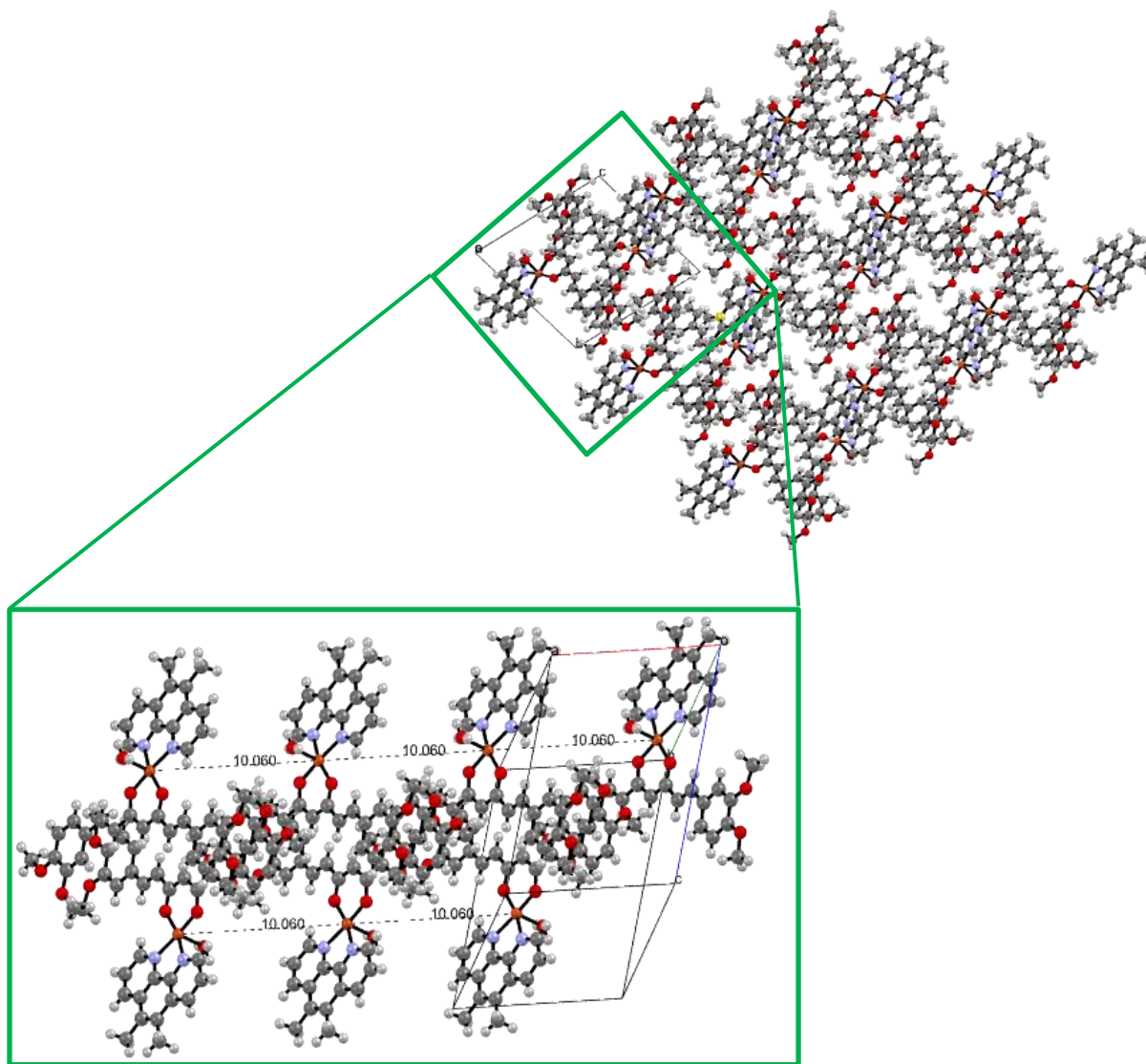


Figura 38. Interacciones cortas (vista del eje a) y arreglo supramolecular del compuesto D6CuL2.

4.3.10 VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

Se determinó el comportamiento redox de todos los compuestos de coordinación de cobre, ya que éste es uno de los parámetros utilizados en casiopeínas que ha demostrado su relación con la actividad biológica de las mismas [29,163]. Se determinaron parámetros como E_{na} , E_{nc} , i_{na} , y i_{nc} a partir de los cuales se calculó el potencial de media onda $E_{1/2}$. Las mediciones se realizaron en DMSO y todos los experimentos se referenciaron internamente con el par ferrocino(Fc^+)/ferroceno(Fc).

En este trabajo se comparó el comportamiento electroquímico de los curcuminoides (L1 y L2) con el de los complejos de cobre(II). Todos los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron a partir del potencial de circuito abierto en la dirección negativa utilizando un rango de potencial de -1.5 a 1.5 V. Los ligantes mostraron una señal de reducción I_c en -0.978 V para la curcumina (Figura 39A) y -1.05 V para la dimetoxicurcumina (Figura 39B). Cuando se aumentó la velocidad de barrido, se observó un proceso de oxidación I_c (Figura 39A), que es típico de un mecanismo E_{Ci} asociado con los restos de reducción C=O, similar a las moléculas de quinona ($R-COCHCO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow R-COHCHCOH-R$) [164]. Además, la curcumina mostró un pico de oxidación ancho I_a en 0.488 V, al que generalmente se le asigna un proceso redox con una cinética electródica lenta asociada con la oxidación de fenol [165,166]. L2 no mostró un proceso de oxidación debido al cambio de $-OH$ por el grupo funcional $-OCH_3$, la principal diferencia estructural entre estos ligantes. Adicionalmente, se realizó un estudio de inversión a 100 mV/s para asociar correctamente cada proceso redox para los curcuminoides (Figuras S60 y S77).

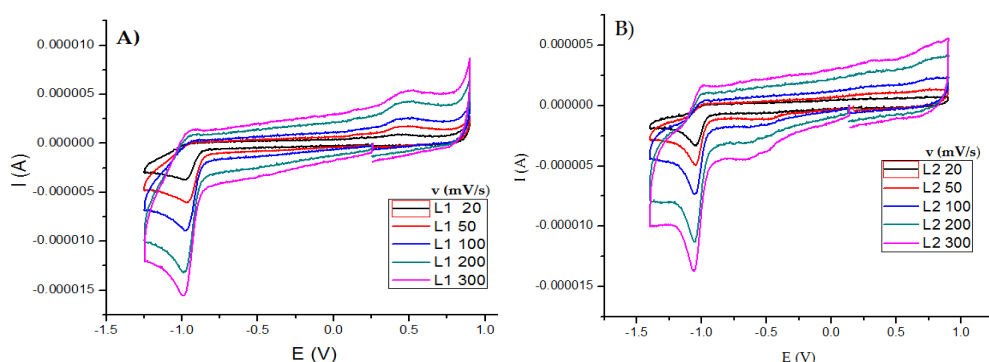


Figura 39. Voltamogramas cíclicos para ligantes a 0.001 M en DMSO con hexafluorofosfato de tetrabutilamonio a 0.1 M. (A) Curcumina y (B) dimetoxicurcumina. Velocidades de escaneo en el rango de 20 a 300 mV/s. Todos los experimentos se referenciaron al par Fc^+/Fc .

Varios autores [57,96,147,166-168] proponen que el proceso redox que ocurre en la curcumina es el presentado en la figura 40, de hecho, este proceso de oxidación se puede dar sin exponerlo a una diferencia de potencial, y se le ha denominado proceso de autooxidación de la curcumina.

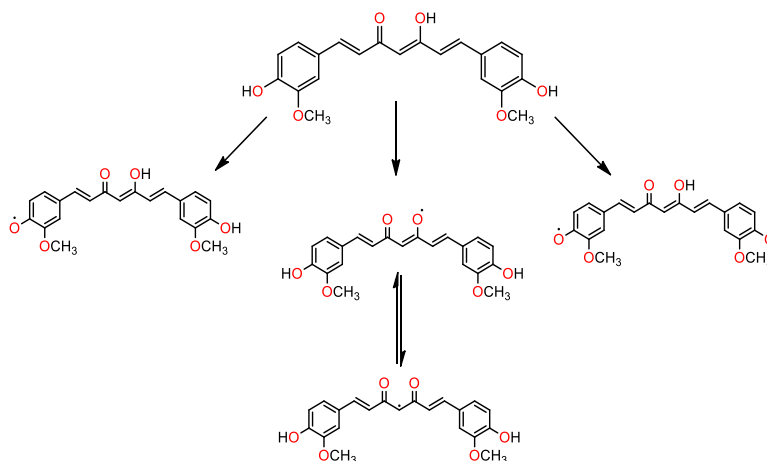


Figura 40. Propuesta de estudio de inversiones

Todos los voltamogramas cíclicos de los compuestos de coordinación de cobre(II) con L1 y L2 son similares entre sí; por lo tanto, discutiremos los resultados de los compuestos D2CuL1 y D4CuL2 como ejemplo. En general, todos los complejos exhibieron dos comportamientos similares; primero, los resultados muestran que la reducción de los ligantes no ocurre en los complejos debido a la coordinación con el cobre; este hecho es importante porque sugiere que la generación de compuestos de coordinación de cobre (II) evita la autooxidación y degradación [166,169] de los ligantes libres, lo que se ha observado en estudios farmacocinéticos *in vivo* [61]. En segundo lugar, se observaron dos señales resultantes del proceso de reducción del metal. La figura 41A muestra que el voltamograma D2CuL1 del primer proceso (Ia) a -0.484 V , causado por la reducción de cobre(II) en el compuesto ($\text{CuII} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{CuI}$), y el segundo proceso (IIa) en -0.739 V se asignó a la reducción de las especies de cobre(I) generadas en el primer proceso (Ia) hacia la formación de cobre(0). La señal Ib en 0.023 V está asociada con la oxidación del cobre(I) ($\text{CuI} \rightarrow \text{CuII} + 1\text{e}^-$). Los estudios de inversión permitieron asociar la señal Ia con Ib. Epa, Epc y ΔE se determinaron a una velocidad de 100 mV/s (Figura 41B).

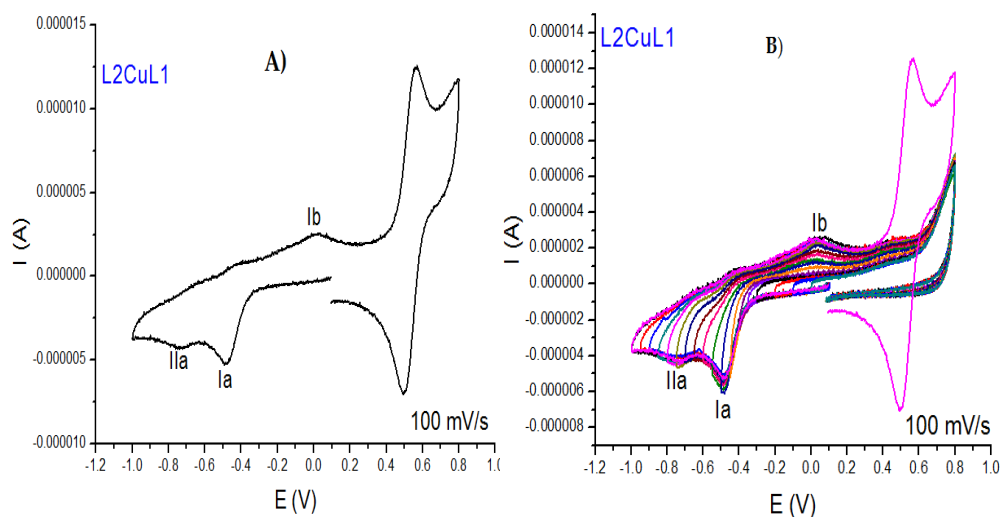


Figura 41. Voltamogramas cíclicos para 0.001 M de D2CuL1 en DMSO con hexafluorofosfato de tetrabutylamonio 0.1 M. (A) voltamogramas a 100 mV/s y (B) estudio de inversión a 100 mV/s. Todos los experimentos se referenciaron al par Fc⁺/Fc.

Aunque el comportamiento electroquímico es similar para todos los compuestos estudiados en este trabajo, es evidente que ambos picos catódicos son más intensos en la familia de compuestos de coordinación con el ligante L2 (Figura 42A), y los picos se desplazan a diferentes potenciales debido a sustituyentes en los anillos aromáticos de las diiminas. La figura 42A muestra el voltamograma D4CuL2, donde un pico catódico a -0.373 V se atribuye a la reducción del átomo de cobre ($\text{CuII} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{CuI}$), y un segundo pico catódico en -0.708 V se asocia con la reducción del átomo de cobre (I) que luego se reduce a cobre(0) ($\text{CuI} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{Cu0}$). Tres picos anódicos (IIIb, IIb y Ib) que aparecen en -0.364 V, -0.111 V y 0.168 V respectivamente (Figura 42B), pueden asociarse a la redisolución de especies de cobre(0) o a la adsorción de ligantes siendo liberado en la formación de un depósito de Cu(0). Los procesos anódicos y catódicos se asociaron mediante estudios de inversión (Figura 42B).

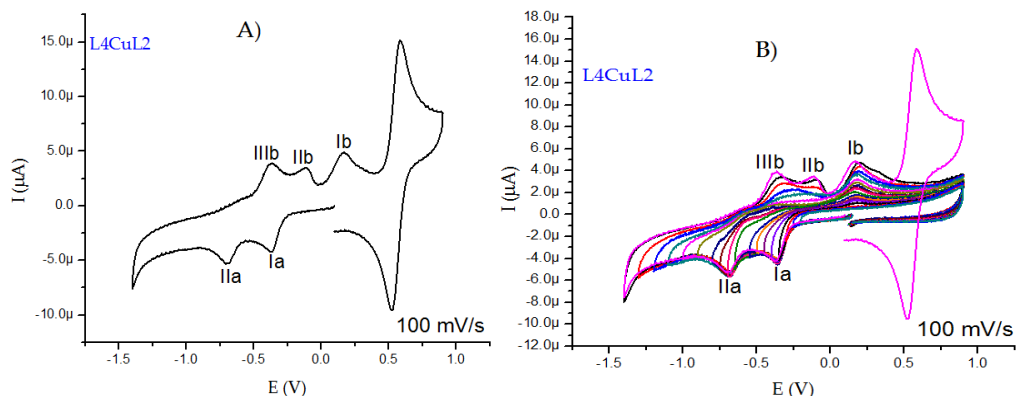


Figura 42. Voltamogramas cíclicos para 0.001 M de D4CuL2 en DMSO con hexafluorofosfato de tetrabutylamonio 0.1 M. (A) Voltamogramas a 100 mV/s y (B) estudio de inversión a 100 mV/s. Todos los experimentos se referenciaron al par Fc⁺/Fc.

El proceso relacionado con la actividad biológica del compuesto de coordinación de cobre(II) es la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la oxidación de Cu(I) a Cu(II); por lo tanto, la determinación de parámetros como E_{pa} , E_{pc} , ΔE y $E_{1/2}$ se calcularon para esos procesos (tabla 16). La separación entre E_{pc} y E_{pa} es superior a 60 mV; por lo que se determinó que los complejos presentan un comportamiento cuasi reversible, es decir, la transferencia electrónica es lenta y no está controlada por la difusión. Este comportamiento se puede atribuir al cambio de geometría alrededor del centro metálico; un ejemplo es cuando un compuesto de Cu^{II} con geometría piramidal de base cuadrada cambia a un compuesto de Cu^I con geometría tetraédrica.

En general, los compuestos de coordinación con L1 muestran potenciales de media onda más negativos y, por lo tanto, se oxidan fácilmente en comparación con los compuestos de coordinación con L2 (Tabla 16). Esto sugiere la posibilidad de que la curcumina presente un proceso de autooxidación, permitiendo que el cobre actúe como agente reductor. En los compuestos de coordinación con bipyridina, se produce un aumento de la densidad electrónica en el átomo de cobre, por lo que es difícil que gane un electrón (valores más negativos). Los complejos con fenantrolina facilitan la distribución de carga en los anillos aromáticos y no cerca del centro del metal, por lo que el cobre podría ganar un electrón (valores menos negativos).

Tabla 16. Resumen de parámetros obtenidos por voltamperometría cíclica para compuestos de coordinación de cobre(II).

Compuestos	Epc (V)	Epa (V)	E (V)	E _{1/2} (V) (Fc ⁺ /Fc)
L1	-0.978	0.488	1.467	---
D1CuL1	-0.429	0.130	0.560	-0.668
D2CuL1	-0.484	0.023	0.507	-0.758
D3CuL1	-0.474	0.067	0.542	-1.164
D4CuL1	-0.407	0.140	0.547	-0.665
D5CuL1	-0.440	0.123	0.563	-0.712
D6CuL1	-0.611	-0.04	0.571	-0.705
D7CuL1	-0.405	0.154	0.560	-0.679
D8CuL1	-0.491	0.126	0.617	-0.657
L2	-1.05	---	---	---
D1CuL2	-0.444	0.139	0.623	-0.656
D2CuL2	-0.469	0.117	0.586	-0.709
D3CuL2	-0.390	0.162	0.552	-0.656
D4CuL2	-0.373	0.168	0.541	-0.656
D5CuL2	-0.447	0.088	0.535	-0.701
D6CuL2	-0.388	0.158	0.546	-0.682
D7CuL2	-0.396	0.096	0.492	-0.690
D8CuL2	-0.171	0.122	0.293	-0.559

De la tabla anterior podemos ver diferentes tendencias: Se observó que para realizar la reducción de los ligantes se necesita mayor energía; es decir, se da a potenciales más negativos respecto a los compuestos de coordinación. De hecho, la reducción del ligante en los complejos ya no se lleva a cabo posiblemente por la donación de densidad electrónica hacia el metal, por lo que generar compuestos de coordinación mejora la estabilidad en cuanto a la autooxidación de los ligantes libres.

Los compuestos de coordinación con curcumina presentan valores de potencial redox más negativos, es decir, son más reductores por que le cuesta más reducirse al átomo de cobre respecto a los que contienen dimetoxicurcumina, esto se explica porque el grupo funcional -OH es un inductor de densidad electrónica más fuerte respecto al grupo -OCH₃, el cual es un inductor de densidad electrónica moderado. Por último, en ambas familias de compuestos de coordinación que los compuestos que tienen fenantrolinas presentan valores de potencial redox más positivos respecto a los que contienen bipyridinas. Esto es porque al aumentar un anillo aromático sobre la diimina facilita la distribución de carga sobre los anillos aromáticos en vez de contenerse en el centro metálico, por lo que al cobre se le facilita ganar un electrón (valores más positivos).

Los valores de potencial de media onda de las casiopeínas de primera generación con ligante acetilacetona (acac) se emplearon para comparar los valores de potencial redox contra los obtenidos en este trabajo, ya que este ligante corresponde a la fracción central de los ligantes L1 y L2 por lo que podemos discutir cómo se modifica el potencial redox cuando se extiende la cadena a siete carbonos y se añaden los anillos aromáticos al final de la misma para formar a L1 y L2 (figura 43). Los valores de $E_{1/2}$ de las casiopeínas con acac presentan valores de potencial más positivos respecto a los nuevos compuestos de coordinación, es decir, el cobre de las casiopeínas de primera generación se reduce de manera fácil respecto a los que tienen dimetoxicurcumina o curcumina como ligante secundario. La explicación que se da a este hecho es por la electrodonación de todo el sistema conjugado hacia el cobre.

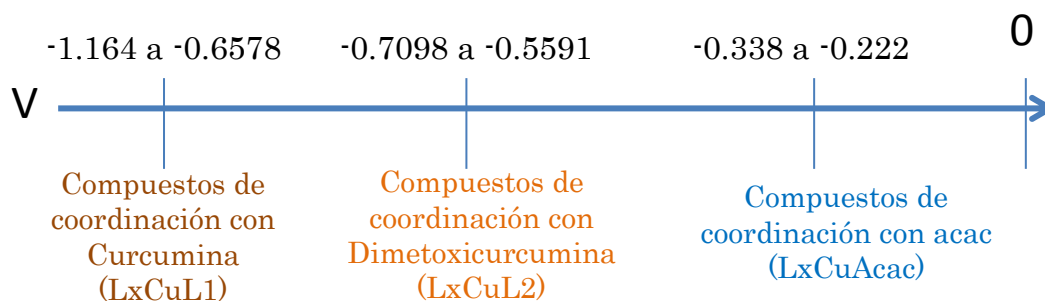


Figura 43. Rango de los potenciales redox de compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina, dimetoxicurcumina y acetilacetato.

4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los datos *in vitro* obtenidos mediante ensayos de proliferación proporcionan información inicial útil sobre la citotoxicidad de los agentes en diferentes líneas celulares. La CI_{50} en las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical epitelial humano) y SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano) se tomaron como indicador de actividad antiproliferativa.

4.4.1 ACTIVIDAD DE CITOTOXICIDAD

La tabla 17 muestra los datos de los valores de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). Los ligantes libres exhiben una importante actividad de citotoxicidad frente a las líneas celulares; sin embargo, los complejos metálicos estudiados muestran una actividad significativamente mayor frente

a las mismas líneas celulares. Estos datos sugieren que la generación de compuestos de coordinación de cobre mejora la citotoxicidad de los ligantes libres. Este comportamiento se ha estudiado en varios complejos de quelatos mixtos con curcumina [86], dimetoxicurcumina [99] y análogos [102], lo que sugiere que la mejora de solubilidad y estabilidad de los complejos en medios biológicos deben ser los factores principales. Proponemos que el potencial redox y la lipofilidad juegan un papel importante.

En general, se observa que las moléculas que contienen fenantrolina como ligante primario son más activas que los compuestos de coordinación que contienen bipyridinas. Además, los compuestos con sustituciones con grupos metilo en las posiciones -5,6 son ligeramente más activos que aquellos con grupos metilo en las posiciones -4,7; este efecto fue observado por Chikira [71,170-172], quien sugirió que el efecto podría deberse a la interacción con el ADN, ya que los sustituyentes en las posiciones -4 o -7 reducen la asociación entre los compuestos de cobre(II) y el ADN. Por otra parte, parece que cuanto mayor es el peso molecular, más activos son los compuestos de coordinación; sin embargo, los compuestos tetrametilados y difenilados son menos activos que los compuestos dimetilados; este fenómeno puede deberse a que dichas moléculas son más lipofílicas y su paso por la membrana celular podría ser diferente, por lo que su actividad disminuye. En este trabajo, el compuesto D1CuL1 no mostró un efecto citotóxico contra la línea celular HeLa; esto abre camino para evaluar a esta molécula en diferentes líneas celulares de cáncer para determinar si esta molécula puede presentar selectividad por líneas celulares de tipo pulmonar como se observó en las SKLU-1.

En general, los compuestos de coordinación de cobre(II) sintetizados en este trabajo muestran una mejora en la actividad biológica en comparación con las casiopeínas de primera generación (tabla 17) que contienen el ligante secundario acetilacetato. Esto sugiere que aumentar la cadena alifática y agregar anillos aromáticos al final de la cadena mejora esta actividad biológica; sin embargo, las casiopeínas de tercera generación son menos solubles en agua. En reportes previos se observó que en las casiopeínas de primera generación con diferentes aminoácidos como ligantes secundarios, la hidrofobicidad de los ligantes aumenta la captación celular de cobre(II) *in vitro* [173]. Las propiedades hidrofóbicas cobran mayor importancia, influyendo directamente en la actividad biológica y son un descriptor en el transporte del fármaco al sitio de acción [174,175].

Tabla 17. Resultados de las CI_{50} de los compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina frente a adenocarcinoma de pulmón humano.

Compuestos	CI_{50} SKLU-1 (μM)	CI_{50} HeLa (μM)	CI_{50} HeLa (μM) de Casiopeínas de primera generación
L1	52.56 \pm 2.1	50.44 \pm 2.3	---
D1CuL1	41.53 \pm 0.5	N/A	42 \pm 3.1 [29]
D2CuL1	14.36 \pm 0.8	26.49 \pm 0.7	41.7 \pm 0.31 [30]
D3CuL1	8.90 \pm 0.2	35.78 \pm 0.7	---
D4CuL1	5.29 \pm 0.9	7.61 \pm 0.6	10.7 \pm 0.9 [29]
D5CuL1	2.68 \pm 0.2	1.91 \pm 0.8	3.2 \pm 0.03 [30]
D6CuL1	2.60 \pm 0.5	2.21 \pm 0.5	2.83 \pm 0.09 [30]
D7CuL1	4.48 \pm 1.5	4.48 \pm 0.5	2.37 \pm 0.4 [30]
D8CuL1	6.25 \pm 0.9	6.74 \pm 0.5	4.2 \pm 0.6 [29]
L2	56.58 \pm 1.8	109.05 \pm 0.5	---
D1CuL2	21.82 \pm 0.4	44.62 \pm 1.1	42 \pm 3.1 [29]
D2CuL2	9.49 \pm 1.3	37.6 \pm 1.9	41.7 \pm 0.31 [30]
D3CuL2	6.84 \pm 1.1	30.56 \pm 2.5	---
D4CuL2	4.56 \pm 0.6	13.26 \pm 1.5	10.7 \pm 0.9 [29]
D5CuL2	1.22 \pm 0.1	2.01 \pm 0.0005	3.2 \pm 0.03 [30]
D6CuL2	1.19 \pm 0.007	1.78 \pm 0.1	2.83 \pm 0.09 [30]
D7CuL2	2.68 \pm 0.1	1.2 \pm 0.05	2.37 \pm 0.4 [30]
D8CuL2	2.38 \pm 0.3	2.07 \pm 0.3	4.2 \pm 0.6 [29]
Cisplatino	9.56	5.1 \pm 0.4 [29]	42 \pm 3.1 [29]

4.5 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL REDOX TEÓRICO

Por otro lado, los valores obtenidos por el modelo (Figura 44) fueron cercanos a los valores experimentales, por lo que el procedimiento para determinar el potencial redox teórico permite que pueda ser utilizado en casos en los que no se disponga de resultados experimentales. Algo importante de resaltar es que se obtienen cambios en las geometrías de las moléculas. Se observó que para la mayoría de las moléculas en estado de oxidación Cu^{II} presentan una geometría cuadrada plana y al ser reducidas ésta cambia a una geometría tetraédrica; lo cual es usual en compuestos Cu^{II}/Cu^I . Se obtiene una energía libre de Gibbs de solvatación muy alta en los complejos de cobre(II) respecto a los complejos de cobre(I); esto puede deberse a que el complejo de cobre(II) genera un campo eléctrico más alto. El cambio de energía libre de Gibbs para la reacción redox en solución decrece comparado con el cambio de energía libre de Gibbs en fase gas (tabla 18).

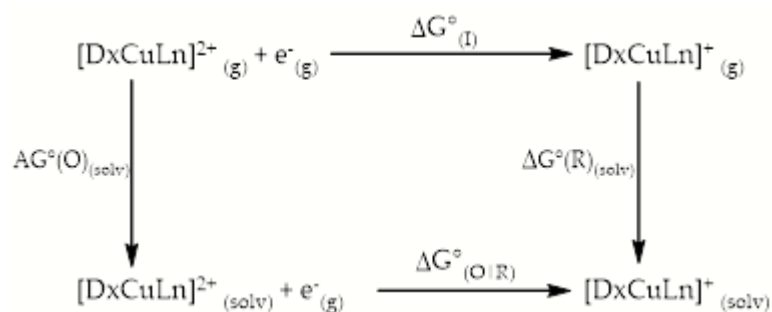


Figura 44. Ciclo de Born-Haber utilizado para el cálculo del cambio de energía libre de Gibbs estándar ($\Delta G^{\circ}_{\text{OIR}}$) de complejos mixtos de quelato de cobre(II).

Figura 18. Datos teóricos obtenidos computacionalmente para el cálculo del potencial redox.

Compuesto	$G^{\circ}(\text{O})_{(\text{g})}$ (eV)	$G^{\circ}(\text{R})_{(\text{g})}$ (eV)	$G^{\circ}_{\text{s}}(\text{O})$ (eV)	$G^{\circ}_{\text{s}}(\text{R})$ (eV)	$\Delta G^{\circ}_{\text{II}}$ (eV)	$\Delta \Delta G^{\circ}_{\text{s}}$ (eV)	$-\Delta G^{\circ}_{\text{OIR}}$ (eV)	$-\Delta G^{\circ}_{\text{OIR}}$ (eV)	$E^{\circ}_{\text{OIR (calc)}}$ (V)	$E_{1/2 \text{ exp}}$ (V)
D1CuL1	-52744.61	-52749.42	-52747.48	-52751.11	-5.3313	0.65151	4.679829	4.421829	-0.878171	-0.66805
D2CuL1	-54865.94	-54870.68	-54868.74	-54872.31	-5.2579	0.629991	4.627962	4.369962	-0.930038	-0.75895
D3CuL1	-54865.90	-54870.58	-54868.66	-54872.30	-5.2071	0.521775	4.685418	4.427418	-0.872582	-1.164
D4CuL1	-54802.21	-54807.13	-54805.04	-54808.83	-5.4485	0.616248	4.832298	4.574298	-0.725702	-0.6654
D5CuL1	-56923.50	-56928.24	-56926.27	-56930.03	-5.2629	0.454167	4.808754	4.550754	-0.749246	-0.7125
D6CuL1	-56923.2	-56928.04	-56926.01	-56929.67	-5.3299	0.621162	4.708827	4.450827	-0.849173	-0.7058
D7CuL1	-59044.59	-59049.25	-59047.30	-59050.91	-5.1834	0.532602	4.650885	4.392885	-0.907115	-0.6794
D8CuL1	-67272.56	-67277.13	-67275.41	-67279.05	-5.1023	0.417582	4.684797	4.426797	-0.873203	-0.6578
D1CuL2	-54864.08	-54868.95	-54866.83	-54870.50	5.3881	0.666711	4.721463	4.463463	-0.836537	-0.656
D2CuL2	-56985.43	-56990.12	-56988.08	-56991.73	-5.2145	0.515133	4.699431	4.441431	-0.858569	-0.7098
D3CuL2	-56985.37	-56990.09	-56988.01	-56991.68	-5.2480	0.530955	4.717062	4.459062	-0.840938	-0.6562
D4CuL2	-56921.67	-56926.56	-56924.43	-56928.21	-5.4068	0.57699	4.829895	4.571895	-0.728105	-0.6567
D5CuL2	-59042.96	-59047.66	-59045.66	-59049.36	-5.2266	0.478521	4.748085	4.490085	-0.809915	-0.7017
D6CuL2	-59042.70	-59047.48	-59045.40	-59049.13	-5.2987	0.523638	4.775085	4.517085	-0.782915	-0.6827
D7CuL2	-61164.05	-61166.65	-61166.68	-61170.39	-5.1245	0.366282	4.758291	4.500291	-0.799709	-0.6904
D8CuL2	-69392.00	-69396.56	-69394.78	-69398.41	-5.0860	0.403785	4.682232	4.424232	-0.452801	-0.5591

4.5.1 DETERMINACIÓN DE DESCRIPTORES ELECTRÓNICOS

Las relaciones estructura-actividad biológica son una herramienta útil para describir o predecir el comportamiento biológico según parámetros estructurales, electrónicos o experimentales. Estas relaciones pueden conducir al diseño racional de nuevas moléculas con propiedades fisicoquímicas o electrónicas óptimas para mejorar la actividad biológica. Sin embargo, para sistemas con un centro metálico, los descriptores no describen de la segunda esfera de coordinación cuando se cambia el metal. Esto ocurre

por varias razones, como el cambio en las geometrías de los complejos o por la falta de funcionales que describan mejor este tipo de sistemas.

Es necesario identificar parámetros que elucidan si existe una relación entre la estructura/propiedades electrónicas y la actividad citotóxica de los compuestos de coordinación de cobre(II). El potencial redox ($E_{1/2}$), el volumen molar (V), la energía de ionización (EI) y la afinidad electrónica (AE) se obtuvieron computacionalmente a partir de un cálculo de punto único basado en geometrías optimizadas y de cálculos de punto único de moléculas aniónicas y catiónicas, respectivamente (tabla 19). Las estructuras de los complejos de cobre(II) se construyeron asumiendo una geometría piramidal de base cuadrada con la estructura cristalina de los compuestos CasIII-ia como plantilla [34]. El modelo computacional estuvo de acuerdo con las distancias y ángulos de enlace con las estructuras de rayos X obtenidas en este trabajo (Figuras 35 y 36).

Tabla 19. Volumen molar (cm^3/mol), energía de ionización (EI), afinidades electrónicas (AE) y potencial redox teórico ($E_{1/2}$) para los complejos en estudio.

Compuestos	Molar Volumen (cm^3/mol)	EI (eV)	AE (eV)	$E_{1/2}$ (V)
D1CuL1	383.712	8.04749134	2.82789556	-0.878171
D2CuL1	462.274	7.99361656	2.76906755	-0.930038
D3CuL1	466.413	8.00534368	2.7998987	-0.872582
D4CuL1	410.031	8.10950385	2.87669331	-0.725702
D5CuL1	437.24	8.04221051	2.80906527	-0.749246
D6CuL1	417.529	8.07647188	2.85005565	-0.849173
D7CuL1	373.335	8.01205011	2.79094547	-0.907115
D8CuL1	492.824	8.07950481	2.86419938	-0.873203
D1CuL2	451.839	8.07429826	2.84794598	-0.836537
D2CuL2	450.172	8.01993014	2.78888151	-0.858569
D3CuL2	386.932	8.03231631	2.82004192	-0.840938
D4CuL2	393.699	8.13593635	2.8959002	-0.728105
D5CuL2	422.974	8.06659075	2.82811977	-0.809915
D6CuL2	466.821	8.10139715	2.86922906	-0.782915
D7CuL2	545.631	8.03569891	2.8086884	-0.799709
D8CuL2	536.71	8.09949401	2.87311289	-0.452801

4.6 CORRELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Aunque hay un gran conjunto de 16 complejos que tienen similitudes estructurales, decidimos relacionar los parámetros obtenidos con la actividad biológica para cada familia de complejos según el ligantes secundario. Para la familia de compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina, se encontró que el potencial redox experimental ($E_{1/2}$) y el volumen molar son adecuados para describir la actividad antiproliferativa en la línea celular tumoral SKLU-1 (Figura 45). Se observó que cuanto menos negativo es el potencial de media onda, mayor es la actividad citotóxica. El aumento en el volumen molar implica un mejor efecto antiproliferativo sólo para los compuestos con ligantes de bipyridina. Este fenómeno se observó por primera vez para complejos de cobre y rutenio con ligantes diimínicos [163]. La familia de compuestos de coordinación cobre(II) con dimetoxicurcumina no mostró relación con ningún descriptor para las líneas celulares SKLU.

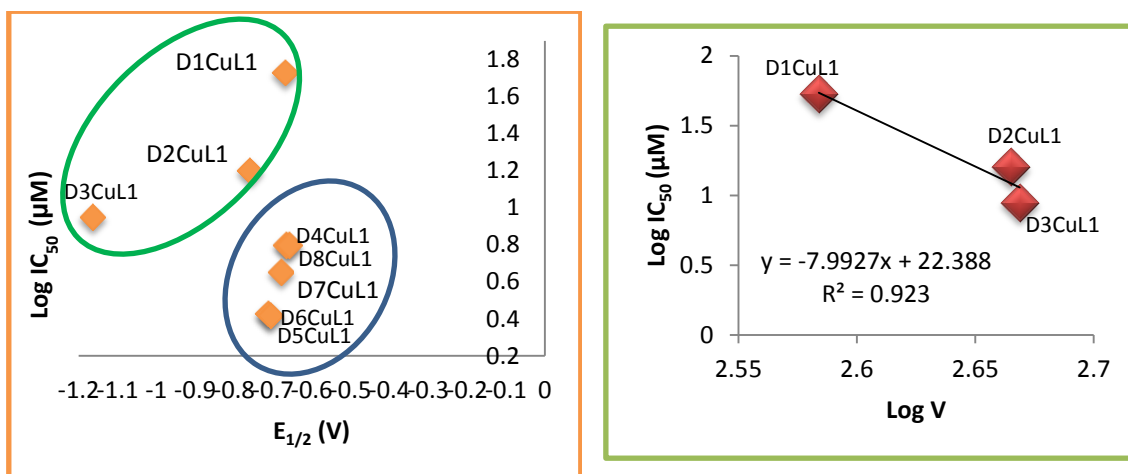


Figura 45. Relación entre volumen molar o potencial redox con actividad antiproliferativa de compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina con CI_{50} en SKLU-1.

Se realizó una búsqueda de relación estructura-actividad utilizando los valores de CI_{50} en células HeLa para cada familia de compuestos. Para la familia de compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina, se encontró que el potencial redox experimental ($E_{1/2}$) es adecuado para describir la actividad antiproliferativa (Figura 46). Los resultados más importantes de los estudios de relaciones estructura-actividad son que el potencial redox y el volumen molar pueden explicar la actividad antiproliferativa de la familia de complejos con curcumina, lo que sugiere que su mecanismo de acción podría deberse a un aumento en la generación de ROS, causando un estrés oxidativo similar al comportamiento de la primera generación de casiopeínas [28]. Por

otro lado, se observó que la familia de compuestos de coordinación de cobre(II) con dimetoxicurcumina no muestra relación con ninguno de los parámetros discutidos aquí. Esta observación no sugiere que el mecanismo de acción de estas moléculas sea vía redox sino que no existe una relación matemática entre estos parámetros. Por el contrario, aunque los compuestos de coordinación de cobre(II) con dimetoxicurcumina pueden llevar a cabo procesos redox, no se observó relación con la actividad biológica en HeLa y SKLU-1. Esto sugiere que su mecanismo de acción podría ser la interacción con el ADN, que también es un blanco molecular de la primera generación de casiopeínas [35].

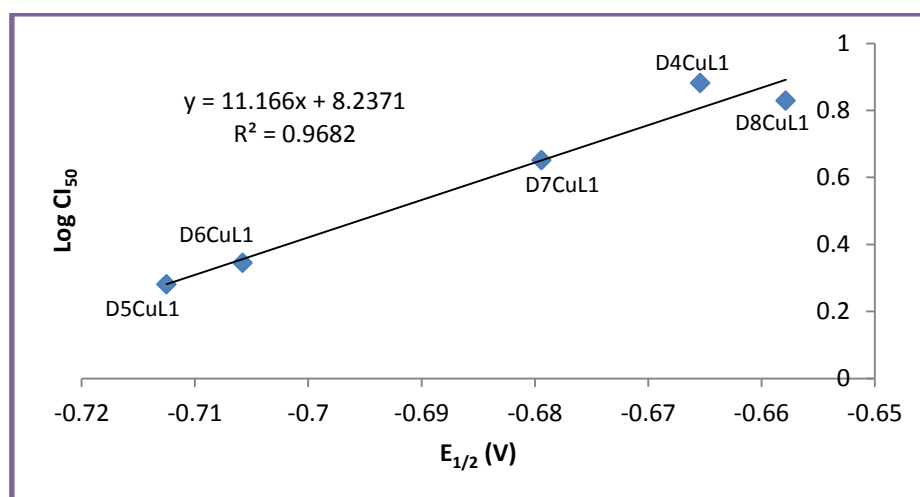


Figura 46. Relación entre el potencial redox y la actividad antiproliferativa de los compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina con CI_{50} en HeLa.

4.7 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE COBRE E INHIBICIÓN DE MPRO MEDIANTE SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

La proteína Mpro es una enzima multifuncional que controla la replicación y transcripción primaria del material genético viral y es una de las dianas en el virus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad COVID-19. Por lo anterior, la comunidad científica sigue investigando, describiendo el ciclo de replicación del virus [126] para interrumpir su mecanismo y proponer nuevas formas de tratamiento accesibles, estables, pero sobre todo eficaces. Los compuestos que pueden unirse covalentemente a los residuos de la

proteína Mpro y, por lo tanto, interrumpir la acción de la enzima, se denominan inhibidores de la proteasa como: Boceprevir, Remdesivir y el péptido N3, los cuales son fármacos prometedores [123,124,128,176]. Dada su importancia la proteasa Mpro es una importante diana terapéutica[127].

El acoplamiento molecular es una de las estrategias más importantes utilizadas y generalmente se ha aplicado como un primer paso en el diseño computacional de fármacos. Esta metodología permite predecir las interacciones que estabilizan a el complejo formado por un receptor (generalmente una proteína o un ácido nucleico) y una molécula unida el a nivel molecular. La energía libre de unión (ΔG_u) y la constante de inhibición (k_i) son parámetros útiles que proporcionan información sobre el reconocimiento molecular, la estabilidad de un determinado complejo proteína-ligante y, al mismo tiempo puede ayudar a predecir el rendimiento de un ligante específico como inhibidor enzimático [177].

Aunque el acoplamiento molecular ha sido un método ampliamente utilizado, los resultados pueden cuestionarse si no hay una validación experimental. Existen otras estrategias computacionales más precisas y robustas. En este contexto, ONIOM (*Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics*) es una alternativa práctica para superar estas desventajas [133]. Los cálculos de ONIOM combinan la precisión de los métodos de mecánica cuántica (QM) y el bajo costo de los enfoques de mecánica molecular (MM) para tratar sistemas grandes.

Se optimizaron cuatro moléculas sintetizadas en este trabajo, D2CuL1, D2CuL2, D5CuL1 y D5CuL2, y también dos inhibidores de Mpro-SARS-CoV-2: el péptido N3 y Boceprevir y también el fármaco Remdesivir. Las geometrías mostraron una geometría cuadrada plana alrededor del centro de cobre. Estos compuestos presentan un comportamiento pseudo aromático caracterizado por fuertes interacciones Cu-O ($\sim 1.9 \text{ \AA}$) y un plano perfecto a lo largo de la esfera de coordinación, como en D5CuL1.

Todos los compuestos se acoplaron a la proteína Mpro. En la tabla 20 se presentan los valores de unión (ΔG_u) e inhibición (K_i) para los 4 complejos estudiados, el péptido N3 y Boceprevir, con fines comparativos. Los sistemas mejor valorados son aquellos que presentan un valor de ΔG_u más negativo, lo que indica una interacción más estable y un valor de K_i menor, que corresponde a un mayor rendimiento de inhibición. Los siguientes estudios sólo se realizaron para D2CuL1 el cual fue el mejor valorado.

En la tabla 20 se presentan todos los aminoácidos (AA) que, según simulaciones de acoplamiento molecular, podrían estar involucrados en la estabilización de estos sistemas. Como característica metodológica importante, los valores teóricos de K_i concuerdan con los encontrados experimentalmente para los dos inhibidores reconocidos (Boceprevir y N3) [124,128], lo que demuestra la confiabilidad del protocolo de acoplamiento empleado. Los compuestos más prometedores son los derivados D2CuL1. Todas aquellas casiopeínas forman complejos más estables que Boceprevir (energías de unión más negativas).

Tabla 20. Afinidades de unión, constantes de inhibición e interacciones potenciales para los aductos de Mpro-ligante mejor calificados.

Ligantes	ΔG_U (kcal/mol)	K_i (μ M) [log k_i]	Aminoácidos (Cas-Mpro)
D2CuL1	-8.76	0.38 [-0.42]	Thr26, His41, Met49, Cys145, His164, His165, Glu166, Gln189
D2CuL2	-7,59	2,73 [0,44]	
D5CuL1	-8,53	0,56 [-0,25]	
D5CuL2	-7,01	7,23 [0,86]	
Boceprevir	-8.17	1.03 (1.18*) [-0.19]	His41, Met49, Asn142, Ser144, Gly143, Cys145, His164, Met165, Glu166, Gln189
N3	-4.89	162.3 (132.0**) [2.42]	His41, Met49, Asn142, Gly143, Cys145, His163, Met165 Y Gln189

La inhibición de todos los compuestos estudiados se muestra en la Figura 47. Dado que el rango de valores de K_i calculados es amplio (0.1-1000 mmol/L), log K_i proporciona una mejor descripción de este fenómeno. En la Figura 47, las casiopeínas están representadas por barras azules, los monoquelatos, los donadores bioactivos y los inhibidores bien reconocidos corresponden a barras rojas, verdes y moradas, respectivamente. En general, las casiopeínas producen complejos más estables que los monoquelatos, especies donantes bioactivas y Boceprevir con Mpro en ese orden. Además, cuanto más estable sea el complejo formado con un determinado ligante, más capaz será de inhibir eficientemente la actividad de la proteína. Teniendo en cuenta que, al formar complejos estables, los sitios catalíticos de la enzima se

bloquean y su función natural podría inhibirse y examinando los resultados presentados en la Figura 47, está claro que la especificidad de casiopeína:Mpro es significativa. Todas las casiopeínas muestran valores de inhibición por debajo de 10 mmol/L, muchas de ellas tienen valores de K_i en orden nanomolar ($\log K_i > 0$). Esta especificidad sugiere que el compuesto ternario podría ser el componente inhibidor activo.

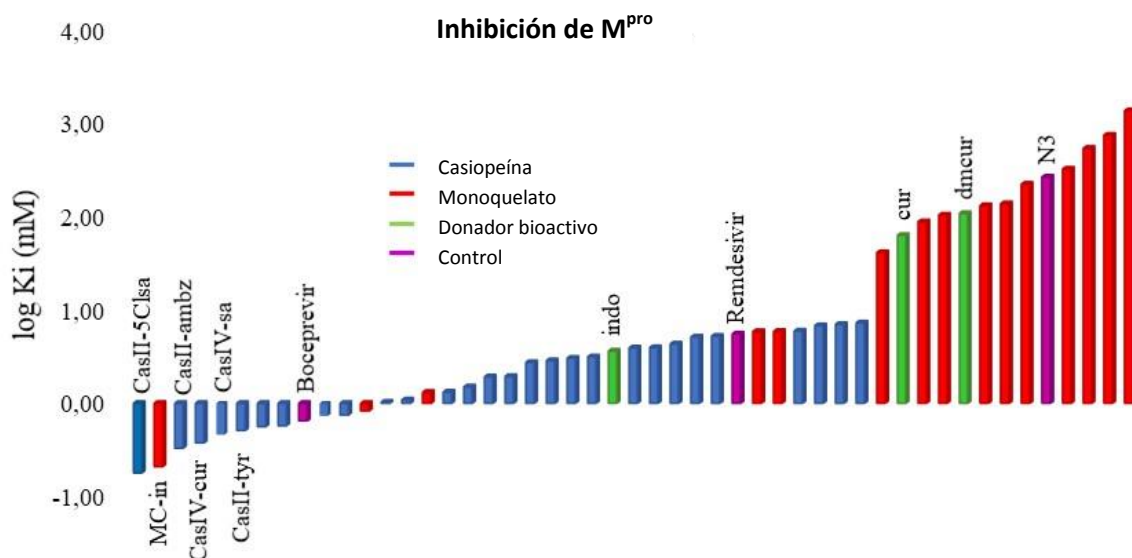


Figura 47. Gráfico de constante de inhibición para todos los compuestos.

Teniendo en cuenta los compuestos de curcumina, D2CuL1 podrían interactuar con más residuos en comparación con D5CuL1 sugiere que los compuestos se unen mediante la parte de la diimina a cuatro aminoácidos (tres de ellos son iguales: His41, Met49 y Gln189), pero la diferencia surge del resto curcumina (figura 48). Aparentemente, el tamaño de la fenantrolina provoca un impedimento estérico, disminuyendo el número de interacciones en las que estos compuestos pueden estar involucrados, y reduciendo la energía de estabilización y, por tanto, su potencial de inhibición.

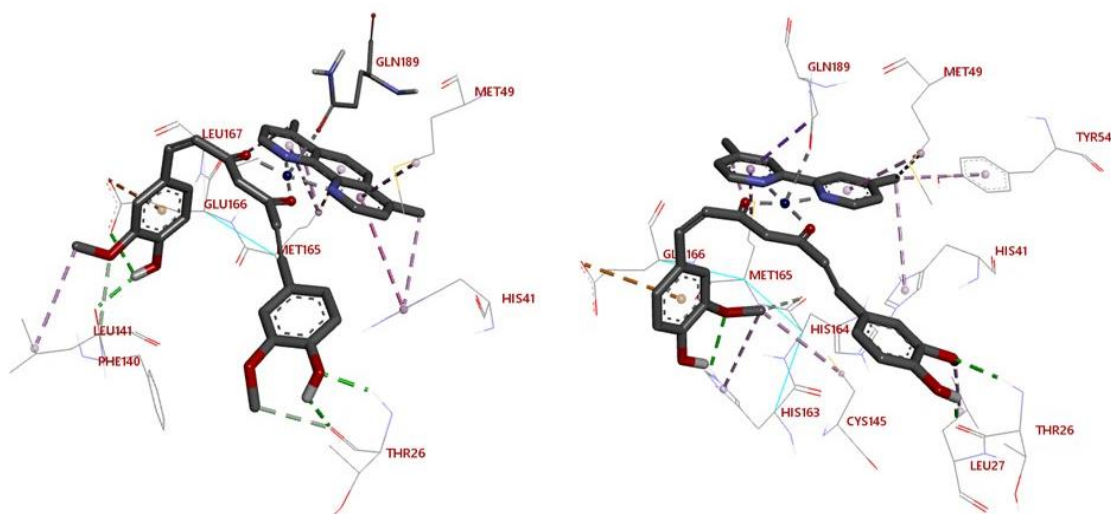


Figura 48. Diagramas de interacción 3D de los complejos D5CuL1:Mpro (izquierda) y D2CuL1:Mpro (derecha). Para reconocer las interacciones principales, se eliminó la mayor parte de la proteína. Solo se presentaron las principales interacciones. Ambos complejos tienen un rendimiento de estabilización similar. D2CuL1 presenta un $\Delta G_v = -8.76$ Kcal/mol y D5CuL1, $\Delta G_v = -8.53$ Kcal/mol.

Aunque es necesaria la presencia de ambos donantes (N-N y O-O), para encontrar los mejores candidatos para inhibir la acción de Mpro, se ha considerado que los ligantes secundarios parecen tener la mayor influencia en la estabilización del complejo y su potencial para interrumpir la acción de la proteasa. Los fragmentos de curcumina y dimetoxicurcumina pueden formar varios enlaces de hidrógeno con residuos del sitio activo como His163 y Thr26. En la mayoría de los casos estudiados, el átomo de cobre podría estar participando como especie electrostática, formando principalmente interacciones de carga- π . En resumen, las simulaciones de acoplamiento sugieren que el centro metálico de las casiopéinas curcumina y dimetoxicurcumina podría producir un enlace de coordinación con un grupo carbonilo de Gln189. Este hecho destaca la importancia del residuo en la estabilización del complejo y la inhibición de la actividad de la proteasa.

4.7.1 ANÁLISIS DEL CENTRO DE COBRE EN LA INTERACCIÓN CAS:M_{PRO}. CÁLCULOS DE ONIOM

En general, las geometrías optimizadas obtenidas con ONIOM difieren ligeramente de los resultados del acoplamiento. Sin embargo, estas desviaciones conducen a interacciones mejoradas entre las casiopéinas probadas y la proteasa principal del SARS-CoV-2. La Figura 49 muestra el aducto formado entre D2CuL1.

Por otro lado, el complejo D2CuL1:Mpro está estabilizado con cinco enlaces H...O y H...N-H y un enlace de coordinación Cu-O (figura 49). Se encontraron tres enlaces H clásicos y uno no convencional entre D2CuL1 y Thr26, His163 del sitio activo, donde interactúa con el resto de la curcumina a través de estas mismas fuerzas intermoleculares. Estos resultados indican que los oxígenos donadores de la curcumina son esenciales para la estabilización del complejo porque sus grupos hidroxilo actúan como donante/aceptor de enlaces H. Además, los sustituyentes metoxilo pueden desarrollar interacciones similares. Los 2.2 Å medidos para la distancia Cu-O están en el rango característico de un enlace de coordinación [177]

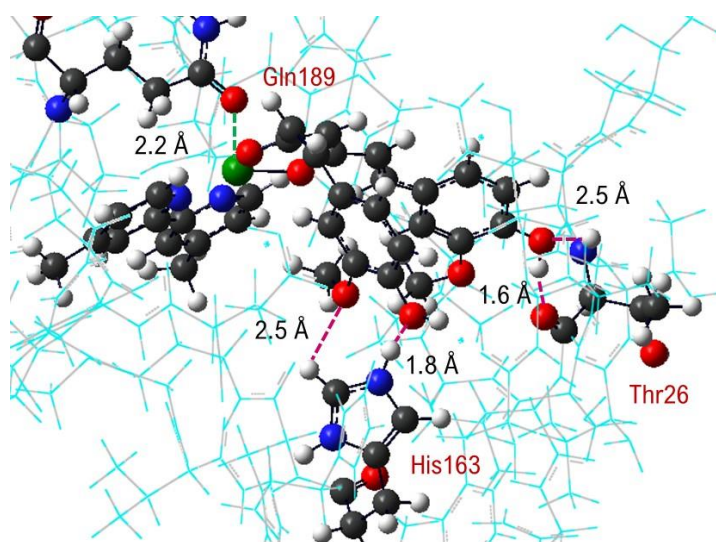


Figura 49. Acercamiento en el complejo D2CuL1:MPro.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se sintetizaron los ligantes curcumina y dimetoxicurcumina con alta pureza. Este último tuvo una nueva ruta para su purificación optimizando los costos y el gasto de eluyentes, ésta es distinta a las reportadas.

Se prepararon dieciséis compuestos mixtos de coordinación de cobre(II) (tercera generación de casiopeínas) y se caracterizaron mediante distintas técnicas analíticas, mostrando una estequiometría 1:1:1 (diimina:Cu:curcuminoide). La geometría depende del número de ligantes en la esfera de coordinación generando una geometría cuadrada plana sin embargo, moléculas de agua pueden o no coordinarse al centro metálico y estabilizarse con geometrías de tipo pirámide de base cuadrada, como se observó por difracción de rayos X, ambas geometrías también son posibles en disolución. Se obtuvieron dos monocristales de dos compuestos de coordinación de cobre(II) con dimetoxicurcumina los cuales permitieron observar que el ligante puede presentar interacciones intermoleculares tipo puente de hidrogeno entre el protón de los metoxilos y el oxígeno de los metoxilos de otra molécula, esto no se ha observado en la literatura para este tipo de ligante.

Voltamperometría cíclica permitió observar que los compuestos de coordinación con curcumina son menos oxidantes respecto a los que tienen dimetoxicurcumina, este comportamiento está mediado por el cambio del grupo funcional de hidroxilo a metoxilo, lo que sugiere que mientras más sustituyentes electrodonadores sobre el anillo aromático de los heptanoides el potencial redox aumenta hacia regiones oxidantes.

La actividad antiproliferativa medida de los compuestos de coordinación contra células HeLa y SKLU-1 mostró una actividad biológica mejorada en comparación con los ligantes libres y la inclusión de una molécula bioactiva como ligante secundario en las casiopeínas mejora su actividad biológica. La mayoría de los compuestos de coordinación de cobre(II) obtenidos son más activos en ambas líneas celulares que el metalofármaco más utilizado en la clínica, el cisplatino. Estos resultados permitieron proponer una hipótesis y es que: la toxicidad de las casiopeínas sintetizadas en este trabajo puede disminuir por la presencia de estas sustancias bioactivas, dada su baja toxicidad tanto en células normales como *in vivo*, lo que las convierte en una potencial alternativa para el tratamiento del cáncer.

El potencial redox experimental ($E_{1/2}$) es adecuado para describir la actividad antiproliferativa en la línea celular tumoral SKLU-1 para

compuestos de coordinación de cobre(II) con curcumina, lo cual fue validado con modelos teóricos.

Se estudiaron cuatro compuestos de coordinación de cobre como agentes inhibidores de la proteasa Mpro. Los compuestos de cobre presentan una geometría plana alrededor del centro metálico. Los hallazgos del acoplamiento molecular mostraron que todos los compuestos pueden formar complejos estables con la Mpro del SARS-CoV-2.

Las interacciones encontradas sugieren un potencial inhibición de la actividad proteasa de la enzima. Las casiopeínas de tercera generación tienen el mejor desempeño inhibitor, incluso que los compuestos Boceprevir o N3; inhibidores reconocidos de Mpro. El gran efecto inhibitorio se debe a que las casiopeínas son capaces de unirse a aminoácidos clave para llevar a cabo la función de la enzima. Los cálculos de acoplamiento molecular y ONIOM predicen que las casiopeínas pueden interactuar y potencialmente inhibir la función de la proteasa principal del SARS-CoV-2 a través de su interacción con los aminoácidos clave de la enzima.

CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS

Dado los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación se han generado diferentes posibilidades en cuanto a los próximos estudios a realizar utilizando estos compuestos de coordinación de cobre con curcumina y dimetoxicurcumina como ligantes secundarios. Entre otras actividades, se enlista el siguiente abanico de posibilidades.

1. Buscar las condiciones óptimas necesarias para la obtención de monocristales de los compuestos de coordinación que no pudieron ser obtenidos hasta este momento.
2. Evaluar a los complejos en más líneas celulares de cáncer para analizar si pudieran ser selectivas a una sola línea cancerígena.
3. Evaluar a los complejos en líneas celulares normales para conocer su toxicidad.
4. Identificar el mecanismo de acción de los complejos.
5. Realizar ensayos de actividad antioxidante.
6. Realizar ensayos de citometría de flujo para observar el tipo de muerte celular.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS

- [1] C.D.I. DEL CÁNCER, La importancia del diagnóstico en cáncer, 2008.
- [2] OMS, Cáncer, (2022). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [3] G. cancer Observatory, CANCER TODAY, (2022). https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group.
- [4] INEGI, ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2021 (PRELIMINAR), (2022). <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf>.
- [5] C. Gonzalez, Cirugia, Man. Enferm. Oncol. (2004) 23-9.
- [6] National Cancer Institute, La radioterapia y usted, n.d.
- [7] J. Tessler, Y. Varela, D. Rosso., Quimioterapia, Antineoplásicos e Inmunosupresores, (2004). <http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quimioterapicos-antineoplasticos-e-inmunosupresores.pdf>.
- [8] National Cancer Institute, La quimioterapia y usted, Nci. (2007) 1-88. <https://doi.org/08-1136S>.
- [9] E. Espinosa, P. Zamora, J. Feliu, M. González Barón, Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets, Cancer Treat. Rev. 29 (2003) 515-523. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00116-6).
- [10] X.-Z. Wu, A new classification system of anticancer drugs - based on cell biological mechanisms., Med. Hypotheses. 66 (2006) 883-887. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.11.036>.
- [11] A. Mukherjee, W.D. Sasikala, Drug-DNA intercalation: From discovery to the molecular mechanism, Adv. Protein Chem. Struct. Biol. (2013). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8>.
- [12] J.B. Chaires, Drug-DNA interactions, Curr. Opin. Struct. Biol. (1998). [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80064-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80064-X).
- [13] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode [17], Nature. 205 (1965) 698-699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- [14] M. Gambino, Dinorah; Moreno, Vitudes; Navarro, Aplicaciones de los compuestos metálicos en Medicina. Una Visión bioinorgánica, Editorial Académica Española, 2012. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007->

1776.2003.03.004.

- [15] Z. Guo, P.J. Sadler, Metals in Medicine: Metal-based drugs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 1512-1531.
- [16] G.L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 1995. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [17] P. Zhang, P.J. Sadler, Advances in the design of organometallic anticancer complexes, *J. Organomet. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.03.038>.
- [18] Z. Suo, S.J. Lippard, K.A. Johnson, Single d(GpG)/cis-diammineplatinum(II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization, *Biochemistry.* 38 (1999) 715-726. <https://doi.org/10.1021/bi981854n>.
- [19] F.I. Saldívar-González, J.J. Naveja, O. Palomino-Hernández, J.L. Medina-Franco, Getting SMART in drug discovery: chemoinformatics approaches for mining structure-multiple activity relationships, *RSC Adv.* 7 (2017) 632-641. <https://doi.org/10.1039/C6RA26230A>.
- [20] J.L. Medina-Franco, F. Lopez-Vallejo, R. Castillo, Diseño de fármacos asistido por computadora, *Educ. Química.* 17 (2006).
- [21] J.L. Medina-Franco, E. Fernán-Dezde Gortari, J. Jesús Naveja, Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora, *Educ. Quím.* 26 (2015) 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.05.002>.
- [22] Z. Liu, R. Liu, Z. Zhou, Y. Zu, F. Xu, Structural changes of linear DNA molecules induced by cisplatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457 (2015) 688-692. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.050>.
- [23] L. Becco, A. Rodríguez, M.E. Bravo, M.J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopéinas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity, *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010>.
- [24] F. Saldívar-González, F.D. Prieto-Martínez, J.L. Medina-Franco, Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional, *Educ. Quím.* 28 (2017) 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>.
- [25] farmacología para Todos, "DISEÑO MOLECULAR DE NUEVOS FÁRMACOS AYUDADO POR COMPUTADORA," in: *Farmacol. Para Todos*, n.d.: pp. 1-38. http://www.fis.unam.mx/~ramon/CursoDF/Material_Didactico/Varios/disenomolecular-de-nuevos-farmacos-ayudado-por-computadora-pdf.
- [26] A. Rescifina, C. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 95-115. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.029>.

- [27] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiñones, L.R. De Lira, Á. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, M.E. Bravo-Gómez, Knighth's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel, *Met. Based. Drugs.* 8 (2001) 19-28. <https://doi.org/10.1155/MBD.2001.19>.
- [28] A. Rivero-Müller, L. Ruiz, N. Plant, M. Dobrota, Mixed chelate copper complex , Casiopeina IIgly[®] , binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.002>.
- [29] M.E. Bravo-Gómez, J.C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, 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 (2009) 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006>.
- [30] S.G. Davila-Manzanilla, Y. Figueroa-de-Paz, C. Mejia, L. Ruiz-Azuara, Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin, *Eur. J. Med. Chem.* 129 (2017) 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.045>.
- [31] A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212, *J. Inorg. Biochem.* 126 (2013) 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001>.
- [32] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solís, C. Gómez-Ruiz, E. Rodríguez-Aguilera, L. Macías-Rosales, E. Cortés-Barberena, C. Cedillo-Peláez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo, *BioMetals.* 21 (2008) 17-28. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9089-4>.
- [33] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, L. Gasque, Structure of (1,10-Phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) Nitrate, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 2 (1987) 428-430. <https://doi.org/10.1107/S0108270187095507>.
- [34] A. Tovar-Tovar, L. Ruíz-Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosales-Hoz, Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia) with methionine, by UV-visible and EPR techniques, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1045-1053. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.02.023>.
- [35] Y. Figueroa-DePaz, J.C. García-ramos, L. Ortiz-frade, J. Serment-guerrero, L. Ruiz-azuara, DNA, a target of mixed chelate copper (II) compounds (Casiopeinas[®]) studied by electrophoresi , UV - vis and circular dichroism

- techniques ., J. Inorg. Biochem. 231 (2022) 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111772>.
- [36] R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day, Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells, *Toxicology*. 268 (2010) 176-183.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.010>.
- [37] C. Trejo-Solís, G. Palencia, S. Zuñiga, A. Rodríguez-Ropon, L. Osorio-Rico, S. Torres Luvia, I. Gracia-Mora, L. Marquez-Rosado, A. Sánchez, M.E. Moreno-García, A. Cruz, M.E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enriquez, J. Sotelo, Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms, *Neoplasia*. 7 (2005) 563-574. <https://doi.org/10.1593/neo.04607>.
- [38] L.G.A.R.M.-E. SOLANS, X. AND L. RUIZ-RAMiREZ, A. MARTiNEZ, 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.* (1993) 890-893.
<https://doi.org/10.1107/S0108270192000556>.
- [39] A. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz, M. Dobrota, Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 189-199.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.002>.
- [40] G.E.N. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobrota, Induction of Apoptosis by a Novel Copper- based Anticancer Compound , Casiopeina II , in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells, *Toxicol. Vitr.* 14 (2000) 1-5. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(99\)00082-x](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(99)00082-x).
- [41] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas??, *Toxicol. Vitr.* (2011).
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008>.
- [42] M.E. Bravo-Gómez, C. Campero-Peredo, D. García-Conde, M.J. Mosqueira-Santillán, J. Serment-Guerrero, L. Ruiz-Azuara, DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning, *Polyhedron*. 102 (2015) 530-538.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.10.034>.
- [43] J.C. García-ramos, A. Tovar-tovar, J. Hernández-lima, F. Cortés-guzmán, R. Moreno-esparza, L. Ruiz-azuara, A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine, *Polyhedron*. 30 (2011) 2697-2703.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.07.022>.
- [44] J.C. arlo. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A.L. uis. Alonso-

- Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Álamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortes-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara, The π -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu(II) antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study, *Chemistry*. 20 (2014) 13730-13741. <https://doi.org/10.1002/chem.201402775>.
- [45] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza, π -Stacking between Casiopeinas[®] and DNA bases, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 14510-14515. <https://doi.org/10.1039/c1cp20183b>.
- [46] R. Galindo-Murillo, L. Ru-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Corte-Guzma, Molecular recognition between DNA and a copper - based anticancer complexw, *Phys . Chem . Chem . Phys . Phys . Chem . Chem . Phys.* 14 (2012) 15539-15546. <https://doi.org/10.1039/c2cp42185b>.
- [47] R. Galindo-Murillo, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T.E. Cheatham, F. Cortés-Guzmán, Intercalation processes of copper complexes in DNA, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 5364-5376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv467>.
- [48] R. Solans, X., Ruíz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L., y Moreno-Esparza, Mixed chelate complexesII. 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, *ActaCryst. C.* 49 (1993) 890-893.
- [49] Y. Xu, Q. Zhang, F. Lin, L. Zhu, F. Huang, L. Zhao, R. Ou, Casiopeina II-gly acts on lncRNA MALAT1 by miR-17-5p to inhibit FZD2 expression via the Wnt signaling pathway during the treatment of cervical carcinoma, *Oncol. Rep.* 42 (2019) 1365-1379. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7268>.
- [50] J.C. García-Ramos, G. Vértiz-Serrano, L. Macías-Rosales, R. Galindo-Murillo, Y. Toledano-Magaña, J.P. Bernal, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer CuII Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017 (2017) 1728-1736. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601199>.
- [51] A. Ryuji, K. Masakazu, H. Shigeo, The effect of copper and copper o-phenanthroline complexes on cattle erythrocytes, *Jpn. J. Vet. Sci.* 45 (1983) 77-83.
- [52] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramírez, J.A. Howarth, M. Dobrota, Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II, *Toxicology.* 194 (2003) 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.08.009>.
- [53] M. Leal-garcía, L. García-ortuño, L. Ruiz-azuara, I. Gracia-mora, J. Luna-delvillar, H. Sumano, M.L.E.T. Al, Assessment of Acute Respiratory and Cardiovascular Toxicity of Casiopeinas in Anaesthetized Dogs, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101 (2007) 151-158. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.00038.x>.

- [54] C. Tamvakopoulos, K. Dimas, Z.D. Sofianos, S. Hatziantoniou, Z. Han, Z.L. Liu, J.H. Wyche, P. Pantazis, Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1269-1277. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1839>.
- [55] O.T.E. Svny, A. April, *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 2007. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5>.
- [56] M. Pulido-Moran, J. Moreno-Fernandez, C. Ramirez-Tortosa, M.C. Ramirez-Tortosa, Curcumin and health, *Molecules.* 21 (2016) 1-22. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>.
- [57] A. Siviero, E. Gallo, V. Maggini, L. Gori, A. Mugelli, F. Firenzuoli, A. Vannacci, Curcumin, a golden spice with a low bioavailability, *J. Herb. Med.* 5 (2015) 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.03.001>.
- [58] H. Malekzad, P. Sahandi Zangabad, H. Mirshekari, M. Karimi, M.R. Hamblin, Noble metal nanoparticles in biosensors: recent studies and applications, *Nanotechnol Rev.* (2016). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0014>.
- [59] P. Sanphui, G. Bolla, Curcumin - A biological wonder molecule: A crystal engineering point of review, *Cryst. Growth Des.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00646>.
- [60] R. Jamwal, Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers, *J. Integr. Med.* 16 (2018) 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.07.001>.
- [61] R.A. Sharma, W.P. Steward, A.J. Gescher, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin, *Mol. Targets Ther. Uses Curcumin Heal. Dis.* 595 (2007) 453-470. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_20.
- [62] W. Meza-Morales, J.C. Machado-Rodriguez, Y. Alvarez-Ricardo, M.A. Obregón-Mendoza, A. Nieto-Camacho, R.A. Toscano, M. Soriano-García, J. Cassani, R.G. Enríquez, A new family of homoleptic copper complexes of curcuminoids: Synthesis, characterization and biological properties, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24050910>.
- [63] A.B. Kunnumakkara, D. Bordoloi, C. Harsha, K. Banik, S.C. Gupta, B.B. Aggarwal, Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways, *Clin. Sci.* 131 (2017) 1781-1799. <https://doi.org/10.1042/CS20160935>.
- [64] S.C. Gupta, S. Prasad, H. Kim, S. Patchva, L.J. Webb, K. Priyadarsini, B.B. Aggarwal, Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies, (2011). <https://doi.org/10.1039/c1np00051a>.
- [65] S. Anjomshoa, M. Namazian, M.R. Noorbala, The Effect of Solvent on Tautomerism, Acidity and Radical Stability of Curcumin and Its Derivatives Based on Thermodynamic Quantities, *J. Solution Chem.* 45 (2016) 1021-1030. <https://doi.org/10.1007/s10953-016-0481-y>.

- [66] Z. Ma, N. Wang, H. He, X. Tang, Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application, *J. Control. Release.* 316 (2019) 359–380. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.053>.
- [67] H.J.J. Pabon, Synthesis of curcuminoids and evaluation of their cytotoxic and antioxidant properties, *RECUEIL.* 83 (1964) 379–386. <https://doi.org/10.1002/recl.19640830407>.
- [68] T. Chandrasekar, N. Pravin, N. Raman, Biosensitive metal chelates from curcumin analogues: DNA unwinding and anti-microbial evaluation, *Inorg. Chem. Commun.* 43 (2014) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2014.02.019>.
- [69] W. Meza-Morales, M. Mirian Estévez-Carmona, Y. Alvarez-Ricardo, M.A. Obregón-Mendoza, J. Cassani, M.T. Ramírez-Apan, C. Escobedo-Martínez, M. Soriano-García, W.F. Reynolds, R.G. Enríquez, Full structural characterization of homoleptic complexes of diacetylcurcumin with Mg, Zn, Cu, and Mn: Cisplatin-level Cytotoxicity in Vitro with Minimal Acute Toxicity in Vivo, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24081598>.
- [70] M.I. Khalil, A.M. Al-Zahem, M.M. Qunaibit, Synthesis, characterization, and antitumor activity of binuclear curcumin-metal(II) hydroxo complexes, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 1683–1689. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0727-9>.
- [71] D. Pucci, T. Bellini, A. Crispini, I. D'Agnano, P.F. Liguori, P. Garcia-Orduña, S. Pirillo, A. Valentini, G. Zanchetta, DNA binding and cytotoxicity of fluorescent curcumin-based Zn(II) complexes, *Medchemcomm.* 3 (2012) 462–468. <https://doi.org/10.1039/c2md00261b>.
- [72] J. Elguero, Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties, *An. La Real Acad. Nac. Farm.* 81 (2015) 278–310.
- [73] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal, P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises reviews Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises, *Mol. Pharm.* 4 (2007) 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>.
- [74] A. Paul, S. Bhattacharya, Chemistry and biology of DNA-binding small molecules, *Curr. Sci.* 102 (2012) 212–231. <https://doi.org/https://www.jstor.org/stable/24083849>.
- [75] Roy M., C. S., M. Siddiqi, K. Bhattacharya, Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 3 (2002) 61–67.
- [76] E. Tourkina, P. Goos, J.C. Oates, A. Ludwicka-bradley, R.M. Silver, S. Hoffman, Curcumin-Induced Apoptosis in Scleroderma Lung Fibroblasts Role of Protein Kinase C ϵ , *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 31 (2004) 28–35. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0354OC>.
- [77] P. Haris, V. Mary, P. Aparna, K.V. Dileep, C. Sudarsanakumar, A comprehensive approach to ascertain the binding mode of curcumin with DNA, *Spectrochim.*

- Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 175 (2017) 155-163.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.11.049>.
- [78] X.Z. Zhao, T. Jiang, L. Wang, H. Yang, S. Zhang, P. Zhou, Interaction of curcumin with Zn(II) and Cu(II) ions based on experiment and theoretical calculation, *J. Mol. Struct.* 984 (2010) 316-325.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.09.049>.
- [79] J. Woo, Y. Kim, Y. Choi, D. Kim, K. Lee, J.H. Bae, D. Sik, J. Chang, Y. Jeong, Y. Han, J. Park, T.K. Kwon, Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-X L and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt, *Carcinogenesis*. 24 (2003) 1199-1208.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgg082>.
- [80] E. Ferrari, R. Benassi, S. Sacchi, F. Pignedoli, M. Asti, M. Saladini, Curcumin derivatives as metal-chelating agents with potential multifunctional activity for pharmaceutical applications, *J. Inorg. Biochem.* (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.06.002>.
- [81] E. Ferrari, R. Benassi, M. Saladini, G. Orteca, Z. Gazova, K. Siposova, In vitro study on potential pharmacological activity of curcumin analogues and their copper complexes, *Chem. Biol. Drug Des.* 89 (2017) 411-419.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12847>.
- [82] L. Yan, Y. Lub, X. Lia, A density functional theory protocol for the calculation of redox potentials of copper complexes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016).
<https://doi.org/10.1039/c5cp06638g>.
- [83] L. Cheng, C. Hsu, M.M. Hsu, Y. Ho, B. Lin, Phase I Clinical Trial of Curcumin, a Chemopreventive Agent, in Patients with High-risk or Pre-malignant Lesions, *Anticancer Res.* 21 (2001) 2895-2900.
- [84] P. Manikandan, R. Anandan, S. Nagini, Evaluation of Azadirachta indica leaf fractions for in vitro antioxidant potential and protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6990-6996. <https://doi.org/10.1021/jf901351n>.
- [85] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal, P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises reviews Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises, *Mol. Pharmacol.* 4 (2007) 807-818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>.
- [86] J. Wang, D. Wei, B. Jiang, T. Liu, J. Ni, S. Zhou, Two copper(II) complexes of curcumin derivatives: Synthesis, crystal structure and in vitro antitumor activity, *Transit. Met. Chem.* 39 (2014) 553-558.
<https://doi.org/10.1007/s11243-014-9831-z>.
- [87] S. Wanninger, V. Lorenz, A. Subhan, F.T. Edelman, Metal complexes of curcumin - synthetic strategies, structures and medicinal applications, *Chem.*

- Soc. Rev. 44 (2015) 4986-5002. <https://doi.org/10.1039/C5CS00088B>.
- [88] F. Kühlwein, K. Polborn, W. Beck, Metal complexes of dyes. IX. Transition metal complexes of curcumin and derivatives, *Zeitschrift Fur Anorg. Und Allg. Chemie.* 623 (1997) 1211-1219. <https://doi.org/10.1002/zaac.19976230806>.
- [89] U. Bhattacharyya, B. Kumar, A. Garai, A. Bhattacharyya, A. Kumar, S. Banerjee, P. Kondaiah, A.R. Chakravarty, Curcumin “drug” Stabilized in Oxidovanadium(IV)-BODIPY Conjugates for Mitochondria-Targeted Photocytotoxicity, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 12457-12468. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01924>.
- [90] K.K. Sharma, S. Chandra, D.K. Basu, Synthesis and antiarthritic study of a new orally active diferuloyl methane (curcumin) gold complex, *Inorganica Chim. Acta.* 135 (1987) 47-48. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)83260-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)83260-0).
- [91] M. Sagnou, D. Benaki, C. Triantis, T. Tsotakos, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou, I. Pirmettis, M. Papadopoulos, M. Pelecanou, Curcumin as the OO bidentate ligand in “2 + 1” complexes with the $[M(CO)_3]^+(M = Re, 99mTc)$ tricarbonyl core for radiodiagnostic applications, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 1295-1303. <https://doi.org/10.1021/ic102228u>.
- [92] M. H. M. Leung, T. Harada, T. W. Kee, Delivery of Curcumin and Medicinal Effects of the Copper(II)-Curcumin Complexes, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 2070-2083. <https://doi.org/10.2174/1381612811319110008>.
- [93] A. Bhattacharyya, A. Dixit, K. Mitra, S. Banerjee, A.A. Karande, A.R. Chakravarty, BODIPY appended copper(II) complexes of curcumin showing mitochondria targeted remarkable photocytotoxicity in visible light, *Medchemcomm.* 6 (2015) 846-851. <https://doi.org/10.1039/c4md00425f>.
- [94] B. Deka, A. Bhattacharyya, S. Mukherjee, T. Sarkar, K. Soni, Ferrocene conjugated copper (II) complexes of terpyridine and traditional Chinese medicine (TCM) anticancer ligands showing selective toxicity towards cancer cells, *Appl. Organomet. Chem.* (2018) 1-14. <https://doi.org/10.1002/aoc.4287>.
- [95] A. Barik, B. Mishra, L. Shen, H. Mohan, R.M. Kadam, S. Dutta, H.Y. Zhang, K.I. Priyadarsini, Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 811-822. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.005>.
- [96] A. Barik, B. Mishra, A. Kunwar, R.M. Kadam, L. Shen, S. Dutta, S. Padhye, A.K. Satpati, H.Y. Zhang, K. Indira Priyadarsini, Comparative study of copper(II)-curcumin complexes as superoxide dismutase mimics and free radical scavengers, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 431-439. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.012>.
- [97] X. Xue, J. Wang, G. Si, C. Wang, S. Zhou, Synthesis , DNA-binding properties and cytotoxicity evaluation of two copper (II) complexes based on curcumin, *Transit. Met. Chem.* (2016). <https://doi.org/10.1007/s11243-016-0027-6>.

- [98] T.K. Goswami, S. Gadadhar, B. Gole, A.A. Karande, A.R. Chakravarty, Photocytotoxicity of copper(II) complexes of curcumin and N-ferrocenylmethyl-L-amino acids, *Eur. J. Med. Chem.* 63 (2013) 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.026>.
- [99] N. Shahabadi, M. Falsafi, N.H. Moghadam, DNA interaction studies of a novel Cu(II) complex as an intercalator containing curcumin and bathophenanthroline ligands, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 122 (2013) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.002>.
- [100] M.I. Khalil, A.M. Al-Zahem, M.M. Qunaibit, Synthesis, characterization, and antitumor activity of binuclear curcumin-metal(II) hydroxo complexes, *Med. Chem. Res.* (2014). <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0727-9>.
- [101] T. Jiang, L. Wang, S. Zhang, P.C. Sun, C.F. Ding, Y.Q. Chu, P. Zhou, Interaction of curcumin with Al(III) and its complex structures based on experiments and theoretical calculations, *J. Mol. Struct.* 1004 (2011) 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.07.059>.
- [102] S. Wanninger, V. Lorenz, A. Subhan, F.T. Edelmann, Metal complexes of curcumin - synthetic strategies, structures and medicinal applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4986–5002. <https://doi.org/10.1039/c5cs00088b>.
- [103] K.K. Sharma, S. Chandra, D.K. Basu, Synthesis and antiarthritic study of a new orally active diferuloyl methane (curcumin) gold complex, *Inorganica Chim. Acta.* 135 (1987) 47–48. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)83260-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)83260-0).
- [104] M. et al Mesa C, Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa* L. extracts and curcuminoids, *Ars Pharm.* 413 (2000) 307–321.
- [105] S. Zhou, X. Xue, B. Jiang, Y. Tian, Metal complexes of a novel bis- β -diketone-type ligand and its copper(II) complexes of two-photon biological imaging, *Sci. China Chem.* 55 (2012) 334–340. <https://doi.org/10.1007/s11426-011-4470-0>.
- [106] D.R. Sherin, S.G. Thomas, K.N. Rajasekharan, Mechanochemical synthesis of 2,2-difluoro-4, 6-bis(β -styryl)-1,3,2-dioxaborines and their use in cyanide ion sensing, *Heterocycl. Commun.* 21 (2015) 381–385. <https://doi.org/10.1515/hc-2015-0096>.
- [107] A. Kareem, M.S. Khan, S.A.A. Nami, S.A. Bhat, A.U. Mirza, N. Nishat, Curcumin derived Schiff base ligand and their transition metal complexes: Synthesis, spectral characterization, catalytic potential and biological activity, *J. Mol. Struct.* 1167 (2018) 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.001>.
- [108] N. Raman, Y. Pitchaikani Raja, A. Kulandaisamy, Synthesis and characterisation of Cu(II), Ni(II), Mn(II), Zn(II) and VO(II) Schiff base complexes derived from o-phenylenediamine and acetoacetanilide, *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.* 113 (2001) 183–189. <https://doi.org/10.1007/BF02704068>.

- [109] I.S. Pillai, P. Venkatesh, Synthesis, spectroscopic characterization and DNA interaction of schiff base curcumin Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes, 7 (2015) 186-201. <http://derpharmachemica.com/archive.html>.
- [110] N. Raman, T. Chandrasekar, G. Kumaravel, L. Mitu, Synthesis of innovative biochemical active mixed ligand metal(II) complexes with thiazole containing Schiff base: In vitro antimicrobial profile, *Appl. Organomet. Chem.* (2017) 1-13. <https://doi.org/10.1002/aoc.3922>.
- [111] J. Annaraj, S. Srinivasan, K.M. Ponvel, P.R. Athappan, Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion® and clay modified electrodes, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 669-676. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.018>.
- [112] M.C. Lozada-García, R.G. Enríquez, T.O. Ramírez-Apán, A. Nieto-Camacho, J.F. Palacios-Espinosa, Z. Custodio-Galván, O. Soria-Arteche, J. Pérez-Villanueva, Synthesis of curcuminoids and evaluation of their cytotoxic and antioxidant properties, *Molecules.* 22 (2017) 1-12. <https://doi.org/10.3390/molecules22040633>.
- [113] T. V Deepthi, P. Venugopalan, Synthesis , DNA binding and cytotoxic studies on three copper (II) complexes of unsymmetrical synthetic analogues of curcumin, 8972 (2016). <https://doi.org/10.1080/00958972.2016.1227973>.
- [114] A. Valentini, F. Conforti, A. Crispini, A. De Martino, R. Condello, C. Stellitano, G. Rotilio, M. Ghedini, G. Federici, S. Bernardini, D. Pucci, Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 484-491. <https://doi.org/10.1021/jm801276a>.
- [115] B.S. Mendiguchia, I. Aiello, A. Crispini, Zn(II) and Cu(II) complexes containing bioactive O,O-chelated ligands: homoleptic and heteroleptic metal-based biomolecules† Barbara, *Dalt. Trans.* (2013) 1-14. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- [116] R. Sareen, N. Jain, K.L. Dhar, Curcumin-Zn(II) complex for enhanced solubility and stability: an approach for improved delivery and pharmacodynamic effects, *Pharm. Dev. Technol.* 7450 (2015) 1-6. <https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1041042>.
- [117] P. N., I.S. Pillai, S. S, P. Venkatesh, Synthesis, spectroscopic characterization and DNA interaction of schiff base curcumin Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes, *Der Pharma Chem.* 7 (2015) 186-201. <http://derpharmachemica.com/archive.html>.
- [118] F.S. Yan, J.L. Sun, W.H. Xie, L. Shen, H.F. Ji, Neuroprotective effects and mechanisms of curcumin-Cu(II) and -Zn(II) complexes systems and their pharmacological implications, *Nutrients.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10010028>.
- [119] R. Banerjee, Inhibitory Effect of Curcumin-Cu (II) and Curcumin-Zn (II)

Complexes on Amyloid-Beta Peptide Fibrillation, 2014 (2014).

- [120] S.K. Sandur, M.K. Pandey, B. Sung, K.S. Ahn, A. Murakami, G. Sethi, P. Limtrakul, V. Badmaev, Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 1765-1773. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm123>.
- [121] A. Kunwar, S. Jayakumar, A.K. Srivastava, K.I. Priyadarsini, Dimethoxycurcumin-induced cell death in human breast carcinoma MCF7 cells: Evidence for pro-oxidant activity, mitochondrial dysfunction, and apoptosis, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 603-614. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0786-y>.
- [122] A. Kunwar, E. Simon, U. Singh, R.K. Chittela, D. Sharma, S.K. Sandur, I.K. Priyadarsini, Interaction of a Curcumin Analogue Dimethoxycurcumin with DNA, *Chem. Biol. Drug Des.* 77 (2011) 281-287. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01083.x>.
- [123] K. Ampornpanai, X. Meng, W. Shang, Z. Jin, M. Rogers, Y. Zhao, Z. Rao, Z. Liu, H. Yang, L. Zhang, P.M.O. Neill, S.S. Hasnain, Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23313-7>.
- [124] L. Fu, F. Ye, Y. Feng, F. Yu, Q. Wang, Y. Wu, C. Zhao, H. Sun, B. Huang, P. Niu, H. Song, Y. Shi, X. Li, W. Tan, J. Qi, G.F. Gao, Both boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18233-x>.
- [125] E. Lam-cabanillas, G. Llamo-hoyos, A. Mendoza-blas, MOLECULAR BASIS OF COVID-19 PATHOGENESIS AND IN SILICO STUDIES OF POTENTIAL PHARMACOLOGICAL TREATMENT, *Rev. Fac. Med. Hum.* 21 (2021) 417-432. <https://doi.org/10.25176/RFMH.v21i1.3327>.
- [126] V. Philip, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, V. Thiel, Coronavirus biology and replication: implications for SARS- , *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (2021) 155-170. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- [127] Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors, *Nature*. 582 (2020) 289-296. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
- [128] C. Ma, M.D. Sacco, B. Hurst, J.A. Townsend, Y. Hu, T. Szeto, X. Zhang, B. Tarbet, M.T. Marty, Y. Chen, J. Wang, Boceprevir , GC-376 , and calpain inhibitors II , XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease, *Cell Res.* 30 (2020) 678-692. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0356-z>.
- [129] A.S.R. D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, Crystal structure of the free enzyme of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) main protease, *Nucleic Acids Res.* (2021).

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>.

- [130] M. Pal, D. Musib, A.J. Zade, N. Chowdhury, M. Roy, Computational Studies of Selected Transition Metal Complexes as Potential Drug Candidates against the SARS-CoV-2 Virus, *Med. Chem. Drug Discov.* 6 (2021) 7429-7435. <https://doi.org/10.1002/slct.202101852>.
- [131] J. Karges, S.M. Cohen, Metal Complexes as Antiviral Agents for SARS-CoV-2, *ChemBioChem.* 22 (2021) 2600-2607. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100186>.
- [132] M. Gil-moles, U. Basu, B. Rolf, H. Hoffmeister, T. Sebastian, Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics **, *Chem. Eur. J.* 26 (2020) 15140-15144. <https://doi.org/10.1002/chem.202004112>.
- [133] M. Svensson, R.D.J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber, K. Morokuma, ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels - Alder Reactions and Pt(P(t - Bu) 3) 2 + H 2 Oxidative Addition, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 19357-19363.
- [134] G.A. Bain, J.F. Berry, Diamagnetic corrections and Pascal's constants, *J. Chem. Educ.* 85 (2008) 532-536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed085p532>.
- [135] S. Stoll, A. Schweiger, EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *J. Magn. Reson.* 178 (2006) 42-55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- [136] J.R. Valdéz-camacho, A. Ramírez-solís, J. Escalante, L. Ruiz-azuara, M. Hô, Theoretical determination of half-wave potentials and glycinate-containing copper (II) complexes, *J. Mol. Model.* (2020).
- [137] K. Arumugam, U. Becker, Computational redox potential predictions: Applications to inorganic and organic aqueous complexes, and complexes adsorbed to mineral surfaces, 2014. <https://doi.org/10.3390/min4020345>.
- [138] L. Ruiz-Azuara, 07/628,628: 5,576,326, 1996.
- [139] L. Ruiz-Azuara, 07/628,628: RE 35,458, 1997.
- [140] P.M. Boorman, N.N. Greenwood, M.A. Hildon, No Title, *J Chem. Soc. A.* (1968) 2466.
- [141] W.J. Geary, The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81-122. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80009-0).
- [142] Geoff Rayner-Canham, Química inorganica descriptiva, Segunda, Pearson Educación, 2000. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>.

- [143] R. Splinter, Action potential transmission and volume conduction, *Handb. Phys. Med. Biol.* 56 (2010) 5-1-5-9. <https://doi.org/10.1201/9781420075250>.
- [144] J. Joseph, A. Suman, K. Nagashri, R.S. Joseyphus, N. Balakrishnan, Synthesis, characterization and biological studies of copper(II) complexes with 2-aminobenzimidazole derivatives, *J. Mol. Struct.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.02.021>.
- [145] K.I. Priyadarsini, Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 10 (2009) 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>.
- [146] L. Shen, H. Ji, Theoretical study on physicochemical properties of curcumin, *Spectrochim. Acta - Part A.* 67 (2007) 619-623. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.08.018>.
- [147] A. Masek, E. Chrzescijanska, M. Zaborski, Characteristics of curcumin using cyclic voltammetry, UV-vis, fluorescence and thermogravimetric analysis, *Electrochim. Acta.* 107 (2013) 441-447. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.037>.
- [148] M.S. Refat, Synthesis and characterization of ligational behavior of curcumin drug towards some transition metal ions: Chelation effect on their thermal stability and biological activity, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 105 (2013) 326-337. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.041>.
- [149] K.K. and V.D. John, Synthesis, Characterization, and Antitumour Studies of metal chelates of some synthetic curcuminoids, 33 (2003) 343-358. <https://doi.org/10.1081/SIM-120017791>.
- [150] K. Krishnankutty, P. Venugopalan, Metal chelates of curcuminoids, *Synth. React. Inorg. Met. Chem.* 28 (1998) 1313-1325. <https://doi.org/10.1080/00945719809349407>.
- [151] D. Patra, C. Barakat, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2020) 1034-1041. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.04.016>.
- [152] S. Kanhathaisong, S. Rattanaphani, V. Rattanaphani, T. Manyum, a Spectroscopic Investigation of the Complex of Turmeric Dye With Copper (II) in Aqueous Solution, *Suranaree J. Sci. Technol.* 18 (2011) 159-165.
- [153] N. Mukherjee, A. Raghavan, S. Podder, S. Majumdar, Photocytotoxic Activity of Copper (II) and Zinc (II) Complexes of Curcumin and (Acridinyl) dipyrrophenazine, (2019) 9647-9658. <https://doi.org/10.1002/slct.201902281>.
- [154] E. Garribba, G. Micera, The determination of the geometry of Cu(II) complexes. An EPR spectroscopy experiment, *J. Chem. Educ.* 83 (2006) 1229-1232.

<https://doi.org/10.1021/ed083p1229>.

- [155] E.H. Ismail, D.Y. Sabry, H. Mahdy, M.M.H. Khalil, Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-phenanthroline and their Anticancer Applications, *J. Sci. Res.* 6 (2014) 509-519. <https://doi.org/10.3329/jsr.v6i3.18750>.
- [156] M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W.E. Antholine, DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: Mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 163-173. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00378-1).
- [157] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.D.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: Cytotoxicity and DNA cleavage, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414-6424. <https://doi.org/10.1021/ic101791r>.
- [158] M. Pradeep Kumar, S. Tejaswi, A. Rambabu, V.K.A. Kalalbandi, Shivaraj, Synthesis, crystal structure, DNA binding and cleavage studies of copper(II) complexes with isoxazole Schiff bases, *Polyhedron.* 102 (2015) 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.07.052>.
- [159] N. Aliaga-Alcalde, P. Marqués-Gallego, M. Kraaijkamp, C. Herranz-Lancho, H. Den Dulk, H. Görner, O. Roubéau, S.J. Teat, T. Weyhermüller, J. Reedijk, Copper curcuminoids containing anthracene groups: Fluorescent molecules with cytotoxic activity, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 9655-9663. <https://doi.org/10.1021/ic101331c>.
- [160] K. Das, U. Panda, A. Datta, S. Roy, S. Mondal, C. Massera, T. Askun, P. Celikboyun, E. Garribba, C. Sinha, K. Anand, T. Akitsu, K. Kobayashi, An enolato-bridged dinuclear Cu(ii) complex with a coumarin-assisted precursor: A spectral, magnetic and biological study, *New J. Chem.* 39 (2015) 7309-7321. <https://doi.org/10.1039/c5nj00789e>.
- [161] A. Valentini, F. Conforti, A. Crispini, A. De Martino, R. Condello, G. Rotilio, M. Ghedini, G. Federici, S. Bernardini, D. Pucci, C. Stellitano, Synthesis , Oxidant Properties , and Antitumoral Effects of a Heteroleptic Palladium (II) Complex of Curcumin on Human Prostate Cancer Cells Synthesis , Oxidant Properties , and Antitumoral Effects of a Heteroleptic Palladium (II) Complex of Curcumin , 1 (2009) 484-491. <https://doi.org/10.1021/jm801276a>.
- [162] C. Novoa-Ramírez, A. Silva-Becerril, F. Olivera-Venturo, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, L. Ruiz-Azuara, N/N Bridge Type and Substituent Effects on Chemical and Crystallographic Properties of Schiff-Base (Salen/Salphen) Ni(II) Complexes, *Crystals.* 10 (2020) 616. <https://doi.org/10.3390/cryst10070616>.
- [163] M. Reina, L.F. Hernández-Ayala, M.E. Bravo-Gómez, V. Gómez, L. Ruiz-Azuara,

Second generation of Casiopeinas®: A joint experimental and theoretical study, *Inorganica Chim. Acta.* 517 (2020) 120201. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120201>.

- [164] A. Masek, E. Chrzescijanska, M. Zaborski, Characteristics of curcumin using cyclic voltammetry, UV-vis, fluorescence and thermogravimetric analysis, *Electrochim. Acta.* 107 (2013) 441-447. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.037>.
- [165] D. Bala, C. Mihailciuc, Synthesis , characterization , electrochemical behavior and antioxidant activity of new copper (II) coordination compounds with curcumin derivatives, (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.02.006>.
- [166] J. Zhu, K.Z. Sanidad, E. Sukamtoh, G. Zhang, Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin, *Food Funct.* 8 (2017) 907-914. <https://doi.org/10.1039/c6fo01770c>.
- [167] A. Barzegar, The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin, *Food Chem.* 135 (2012) 1369-1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.070>.
- [168] B. Dinesh, K.S. Shalini Devi, A.S. Kumar, Curcumin-quinone immobilised carbon black modified electrode prepared by in-situ electrochemical oxidation of curcumin-phytonutrient for mediated oxidation and flow injection analysis of sulfide, *J. Electroanal. Chem.* 804 (2017) 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.054>.
- [169] C. Schneider, O.N. Gordon, R.L. Edwards, P.B. Luis, Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 7606-7614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00244>.
- [170] N. Aliaga-Alcalde, P. Marqués-Gallego, M. Kraaijkamp, C. Herranz-Lancho, H. Den Dulk, H. Görner, O. Roubeau, S.J. Teat, T. Weyhermüller, J. Reedijk, Copper curcuminoids containing anthracene groups: Fluorescent molecules with cytotoxic activity, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 9655-9663. <https://doi.org/10.1021/ic101331c>.
- [171] M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W.E. Antholine, DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: Mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids, *J. Inorg. Biochem.* (2002). [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00378-1).
- [172] T. Hirohama, Y. Kuranuki, E. Ebina, T. Sugizaki, H. Arie, M. Chikira, P.T. Selvi, M. Palaniandavar, Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: Studies on DNA binding properties and nuclease activity, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1205-1219. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.020>.
- [173] M.E. Bravo-gómez, S. Dávila-manzanilla, J. Flood-garibay, M.Á. Muciño-, Á. Mendoza, J.C. García-ramos, R. Moreno-esparza, L. Ruiz-azuara, Secondary

Ligand Effects on the Cytotoxicity of Several Casiopeína's Group II Compounds, *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (2012) 85–92.

- [174] V.T. Yilmaz, C. Icel, F. Suyunova, M. Aygun, N. Aztopal, E. Ulukaya, Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridylamine: Synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death, *Dalt. Trans.* 45 (2016) 10466–10479. <https://doi.org/10.1039/c6dt01726f>.
- [175] S. Moghassemi, A. Hadjizadeh, Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review, *J. Control. Release.* 185 (2014) 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>.
- [176] F.I. Khan, T. Kang, H. Ali, D. Lai, Remdesivir Strongly Binds to RNA-Dependent RNA Polymerase , Membrane Protein , and Main Protease of SARS-CoV-2: Indication From Molecular Modeling and Simulations, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710778>.
- [177] S. Lazareno, N.J.M. Birdsall, Estimation of antagonist Kb from inhibition curves in functional experiments: alternatives to the Cheng-Prusoff equation, 14 (1993) 237–239.

ANEXO A

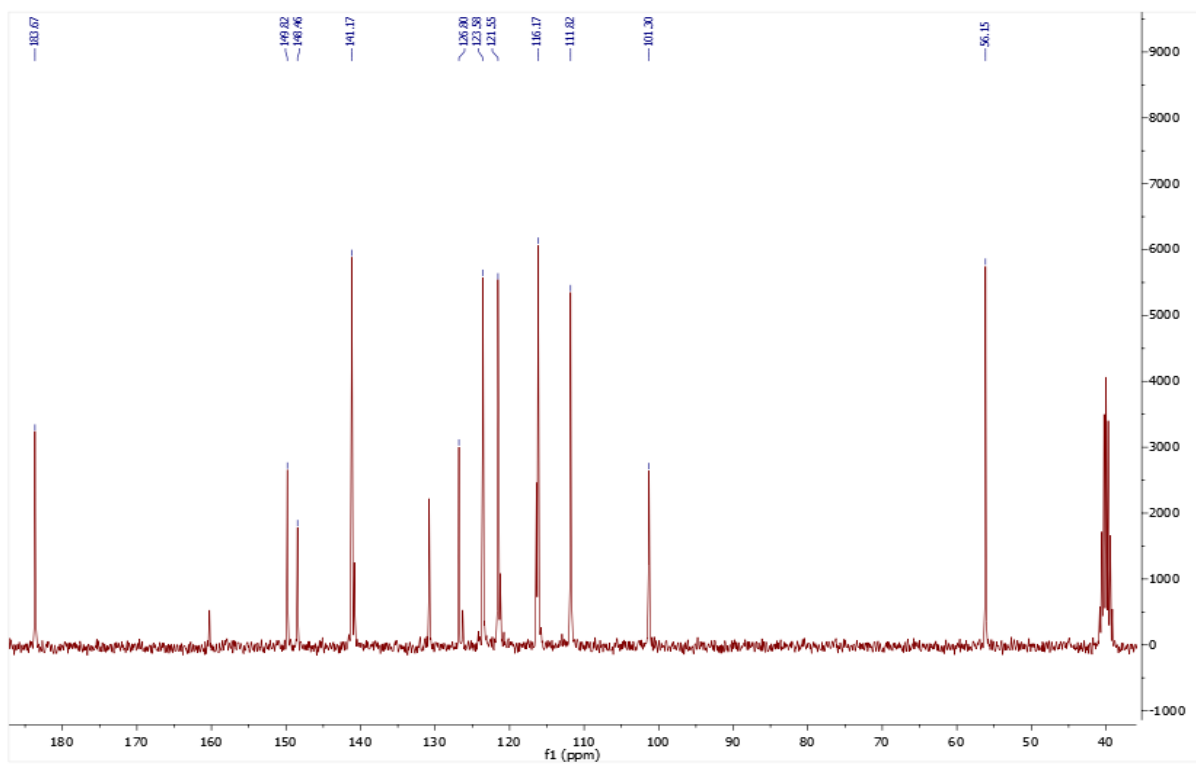


Figura S1. Espectro de RMN ^{13}C a 300 MHz de la curcumina en DMSO-d_6 .

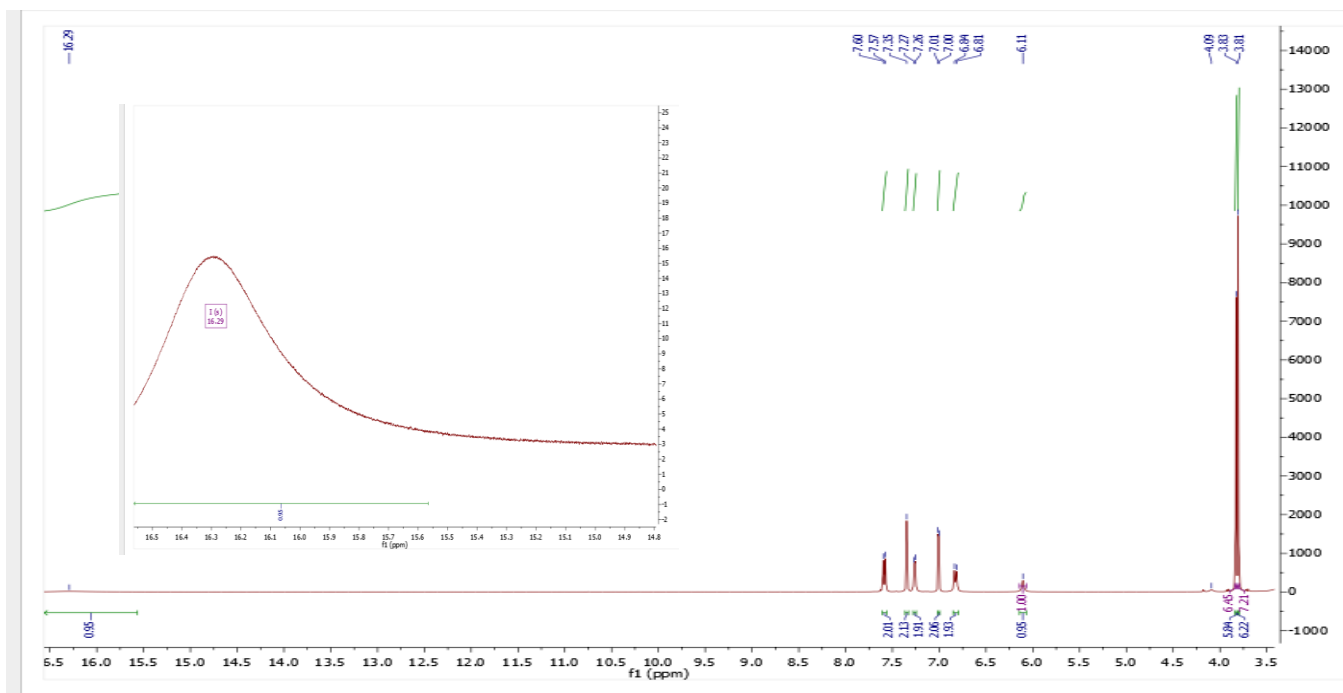


Figura S2. Espectro de RMN ^1H a 700 MHz de la dimetoxicurcumina DMSO-d_6 .

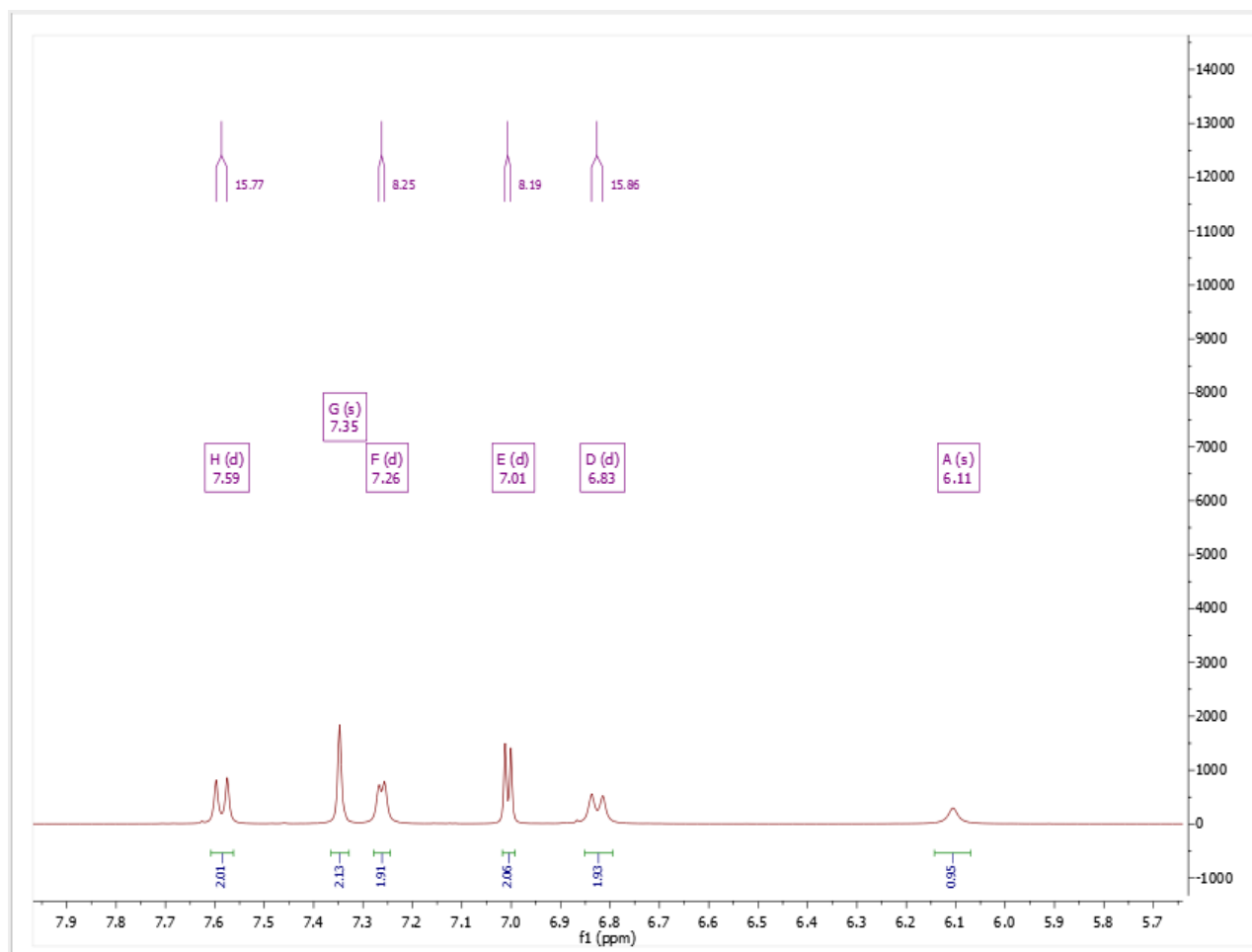


Figura S3. Expansión del espectro de ^1H RMN a 700 MHz de la dimetoxicurcumina DMSO-d_6 .

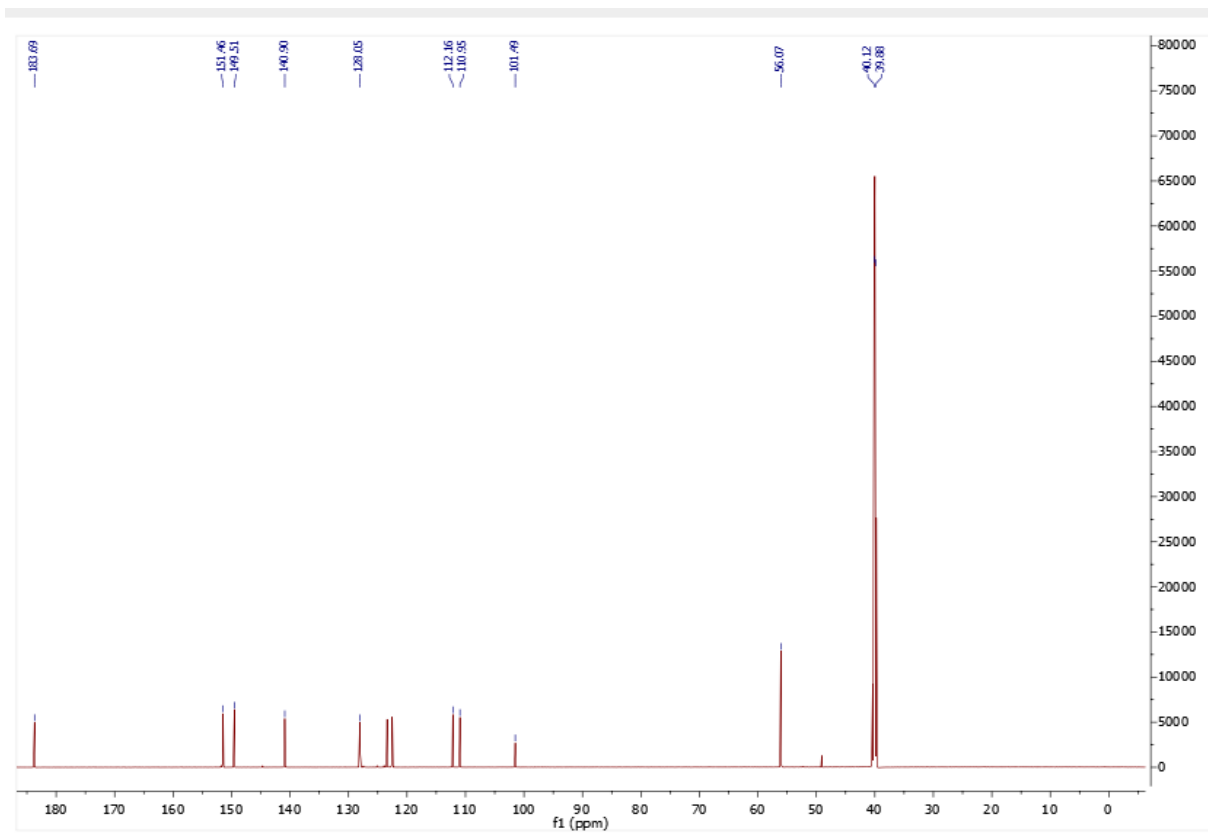


Figura S4. Espectro de ^{13}C RMN a 700 MHz de la dimetoxicurcumina DMSO-d_6 .

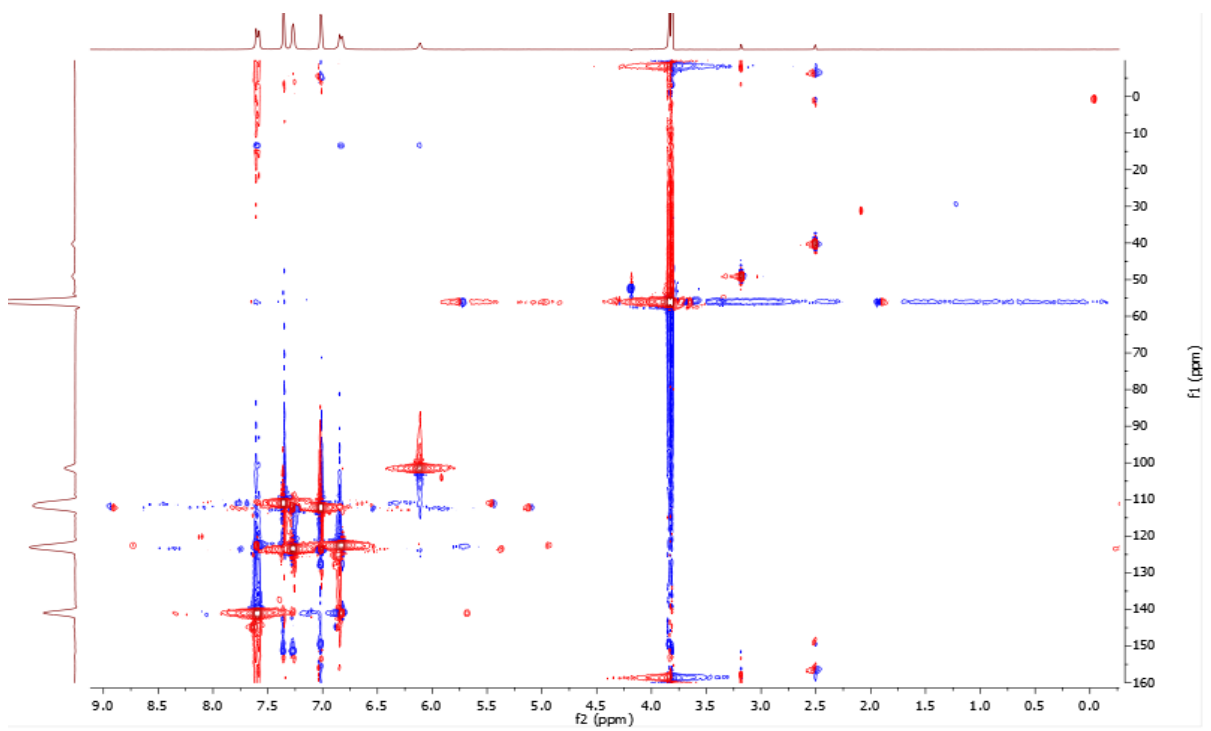


Figura S5. Espectro de HSQC a 700 MHz de la dimetoxicurcumina DMSO-d₆.

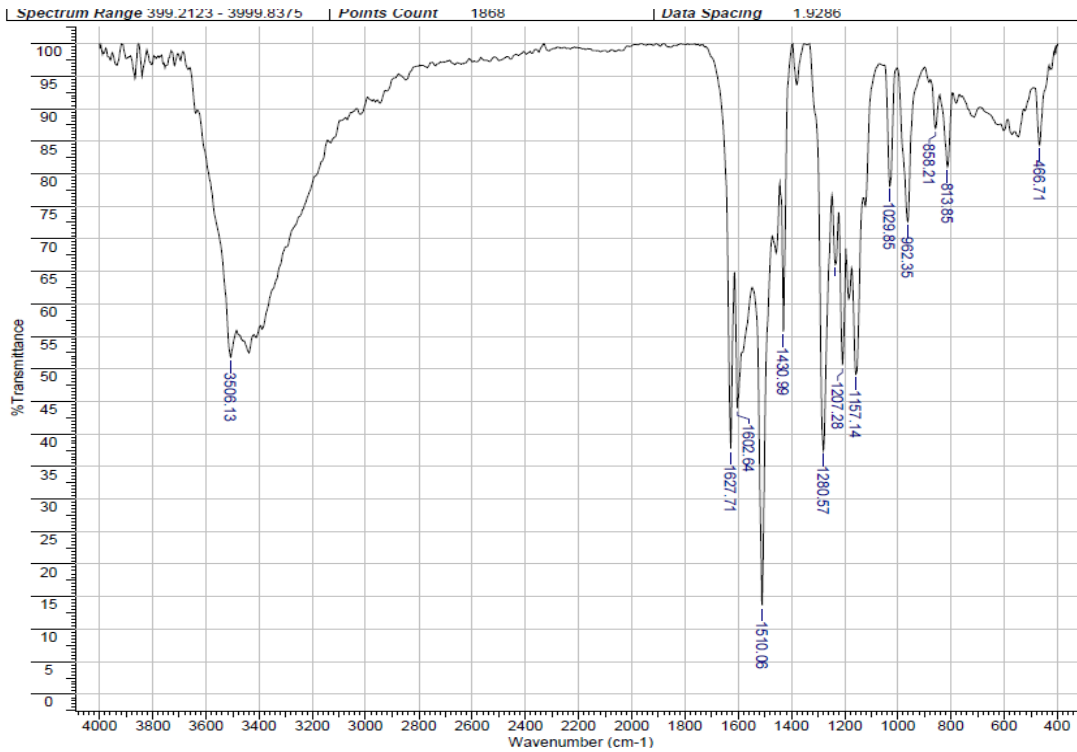


Figura S6. Espectro de infrarrojo del ligante curcumina

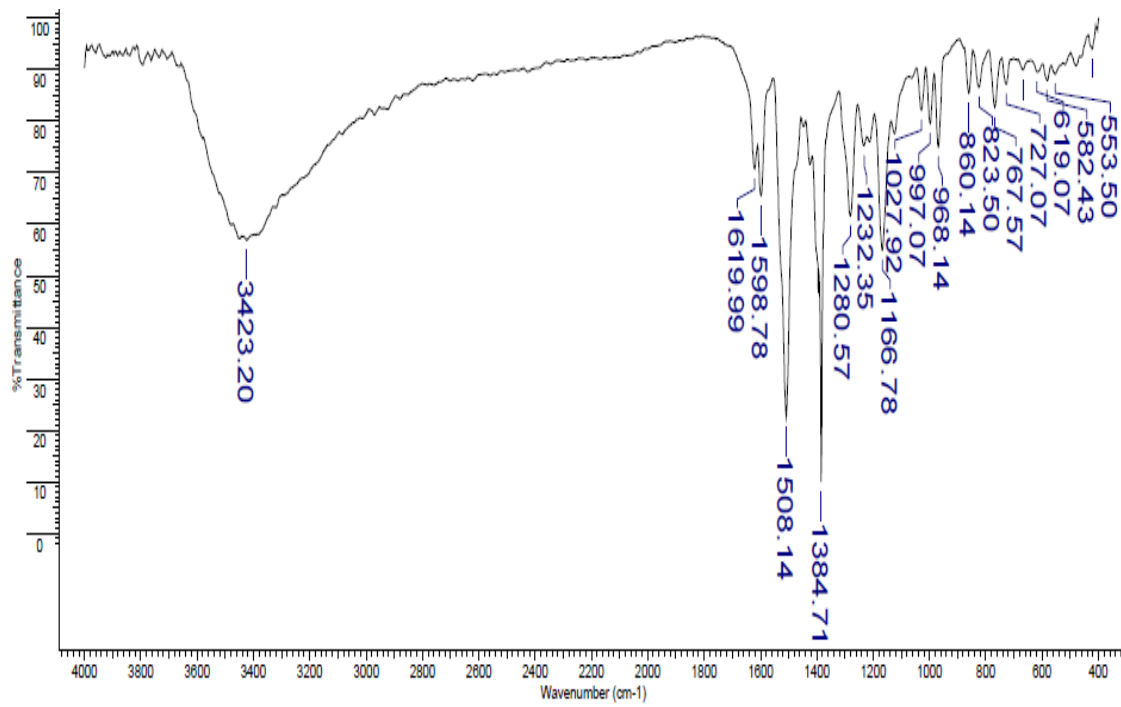


Figura S7. Espectro de infrarrojo de [Cu(2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃

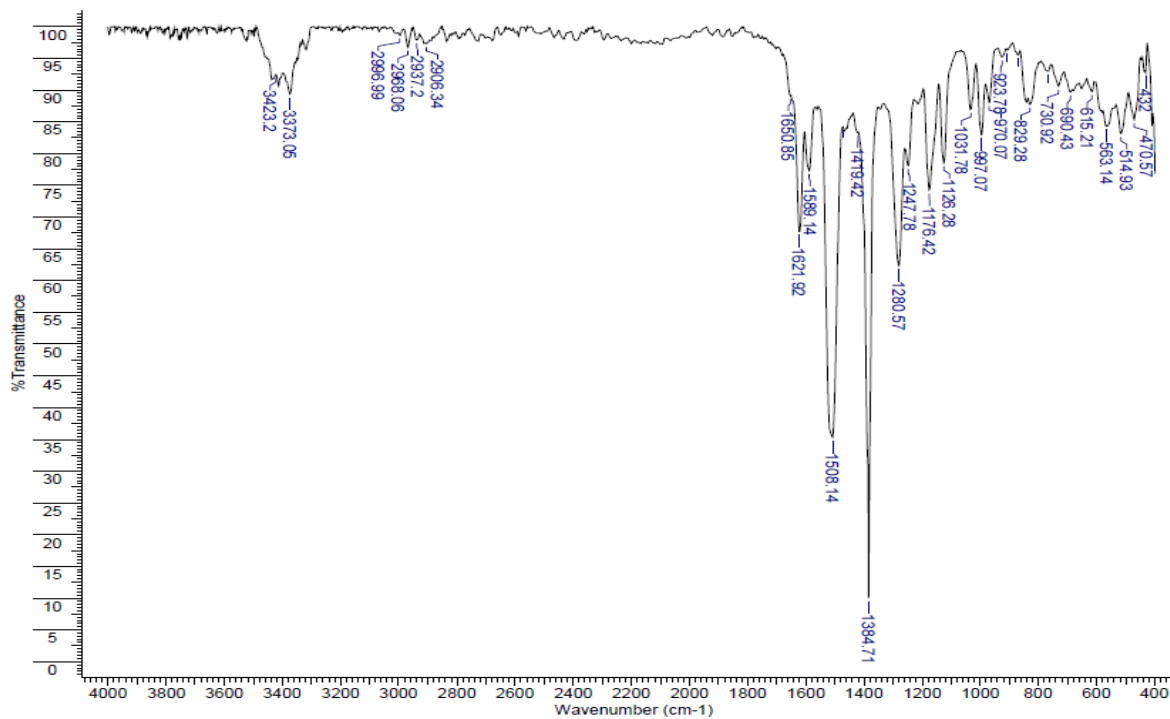


Figura S8. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃.

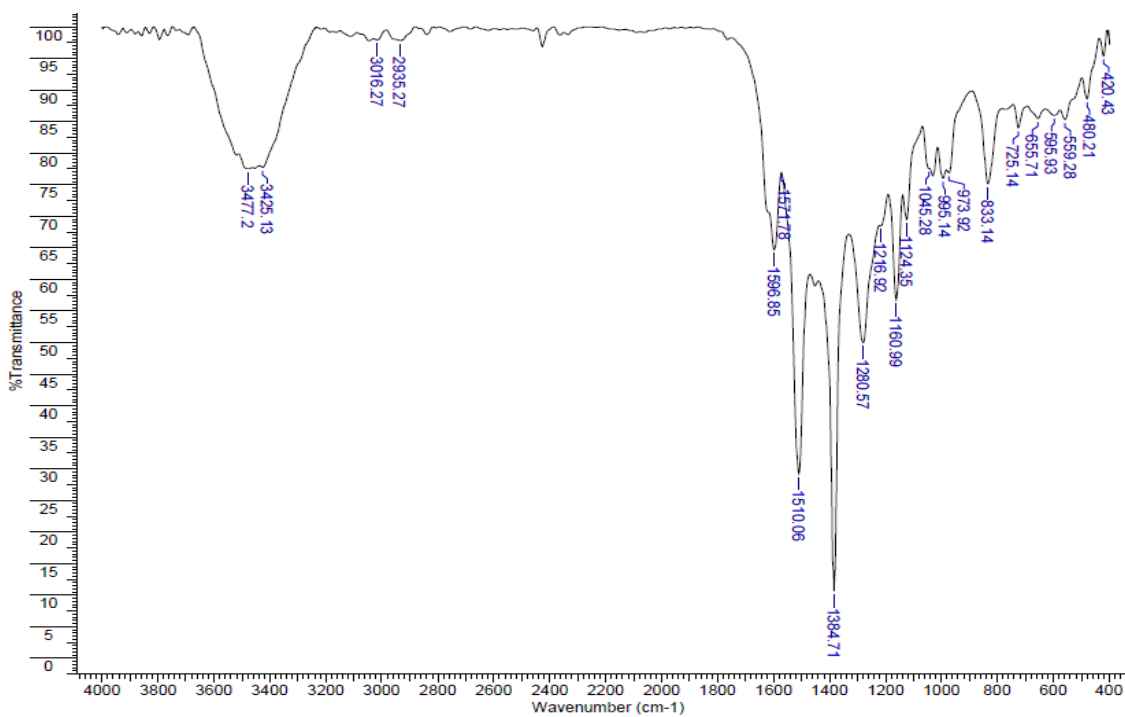


Figura S9. Espectro de infrarrojo de [Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃.

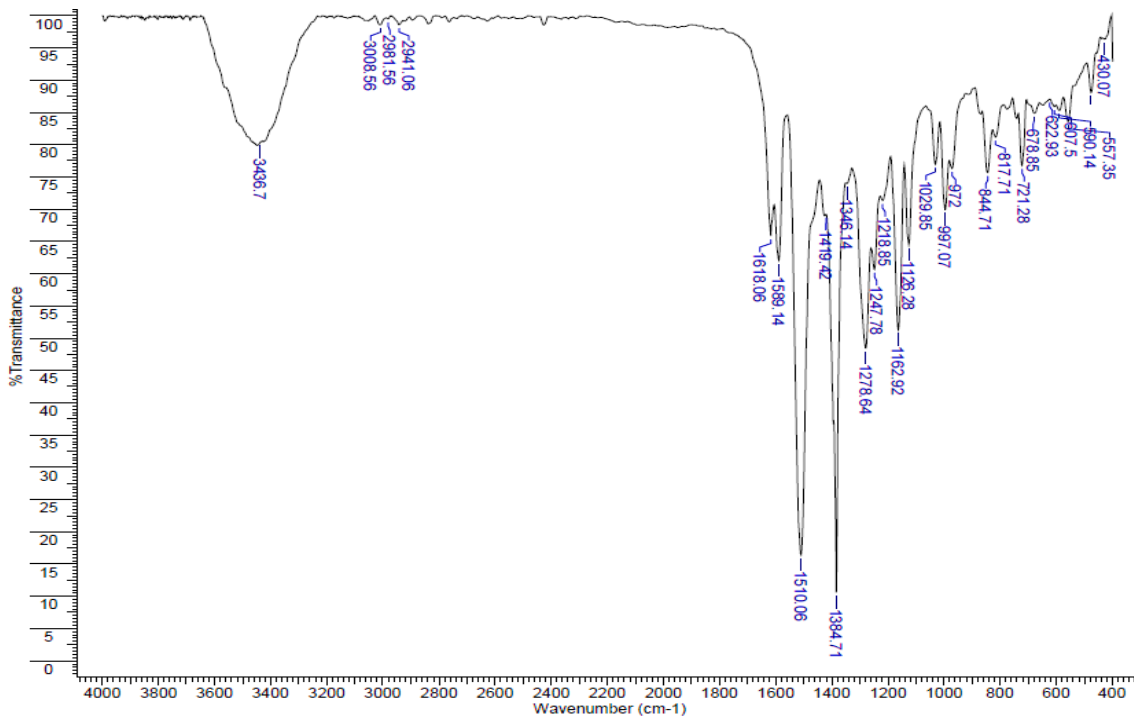


Figura S10. Espectro de infrarrojo de [Cu(1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

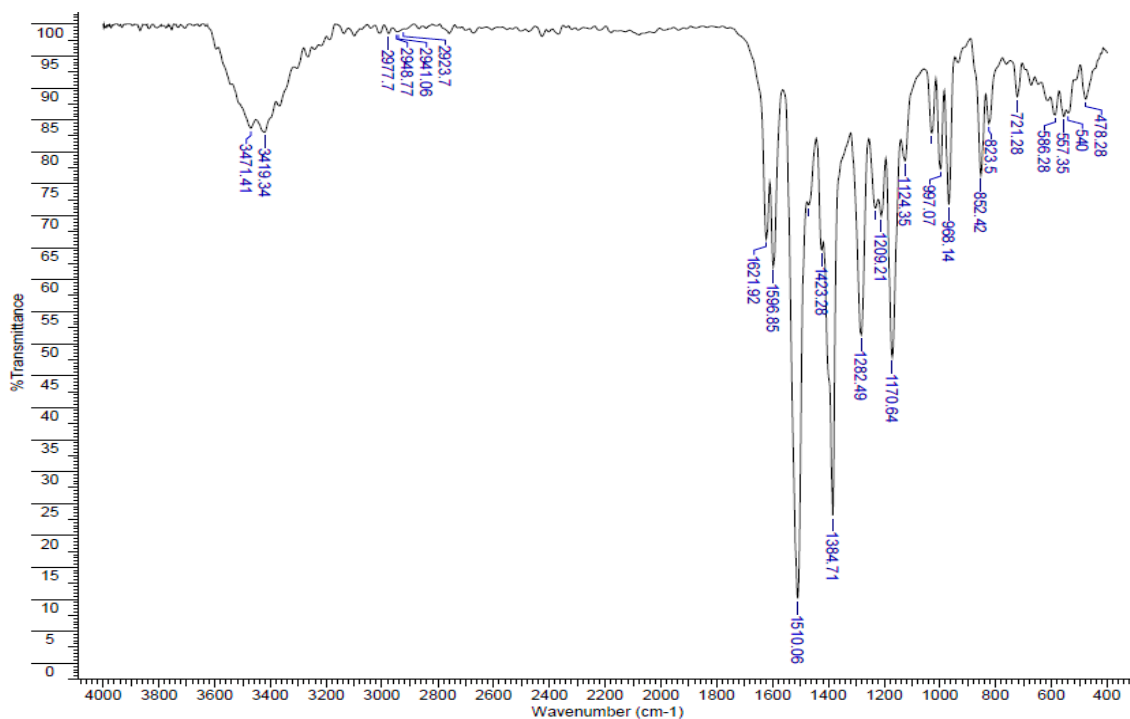


Figura S11. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

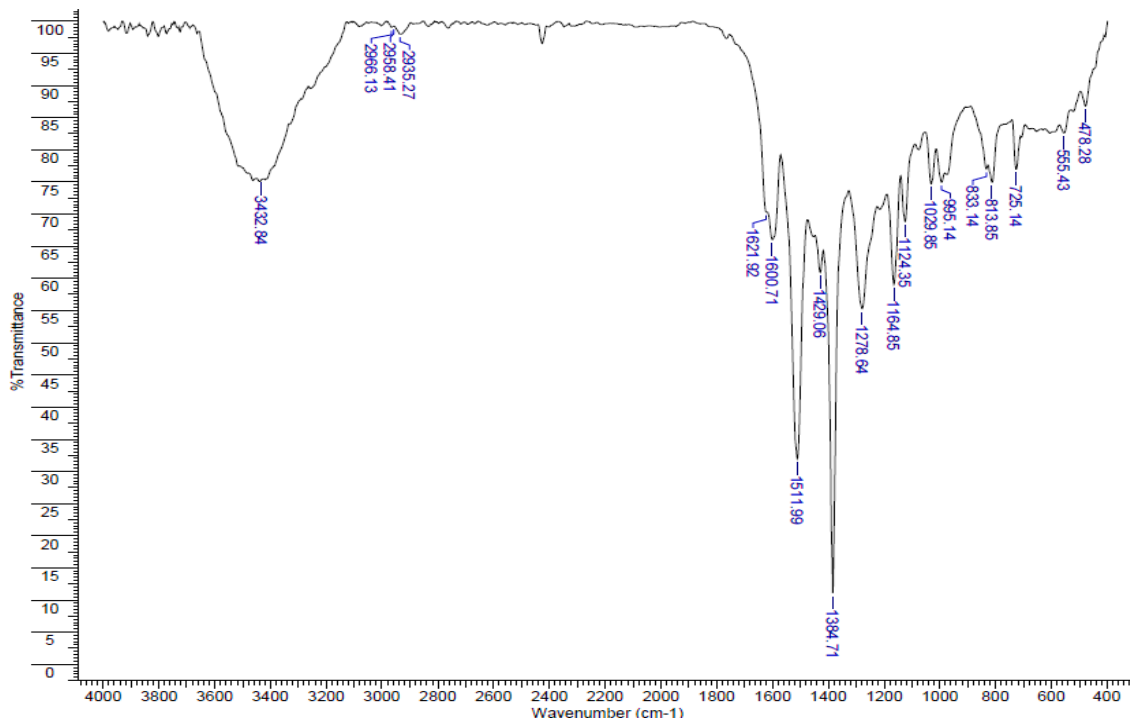


Figura S12. Espectro de infrarrojo de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

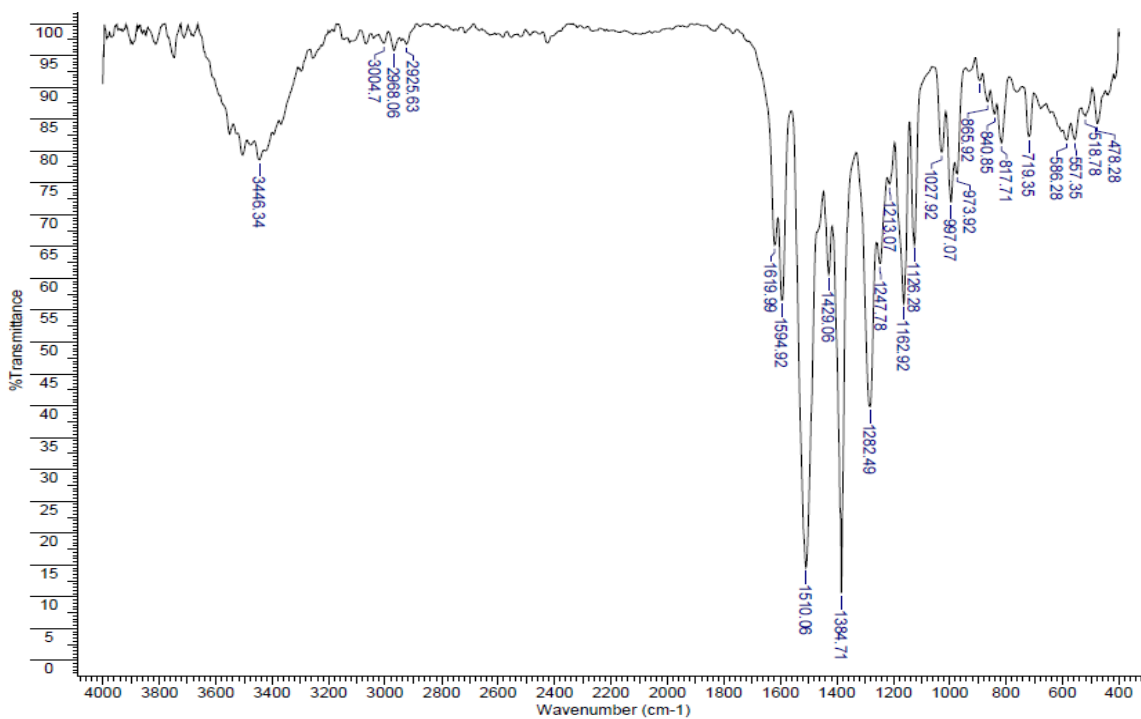


Figura S13. Espectro de infrarrojo de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

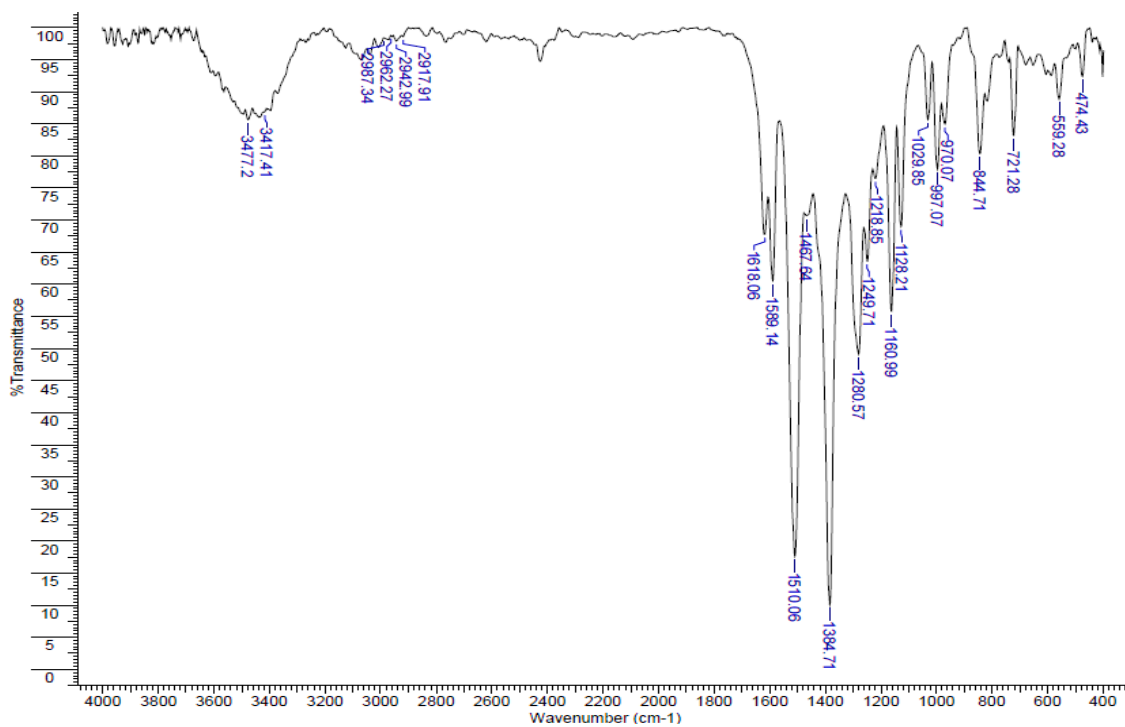


Figura S14. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

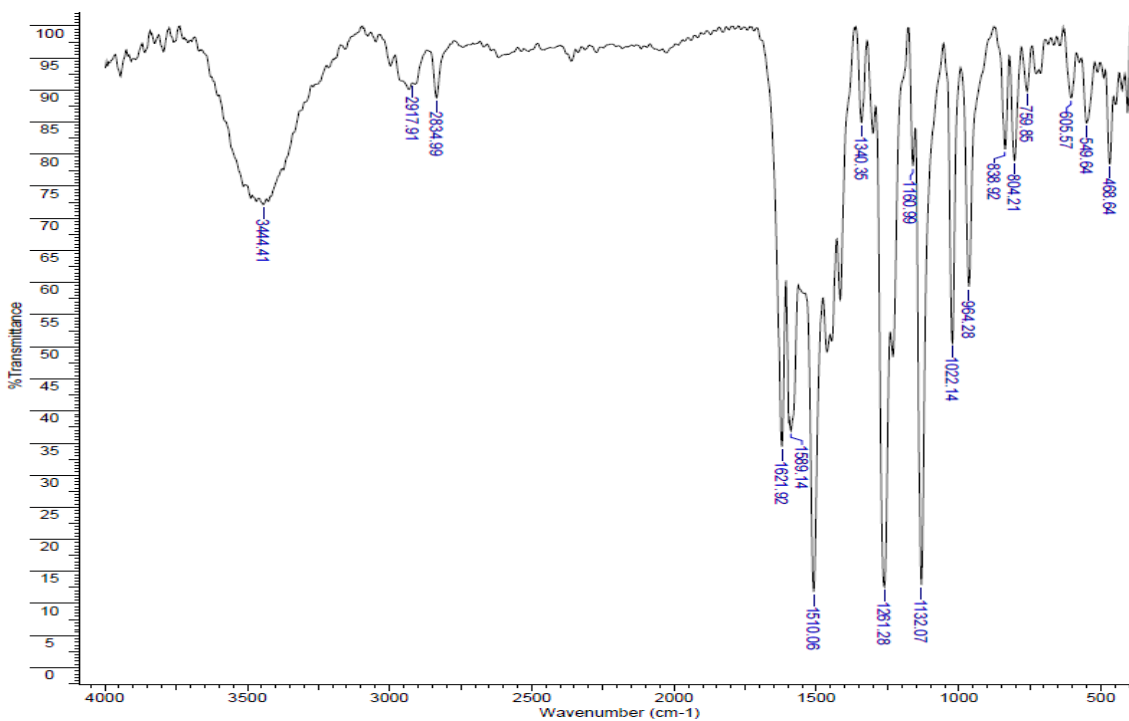


Figura S15. Espectro de infrarrojo del ligante dimetoxicurcumina.

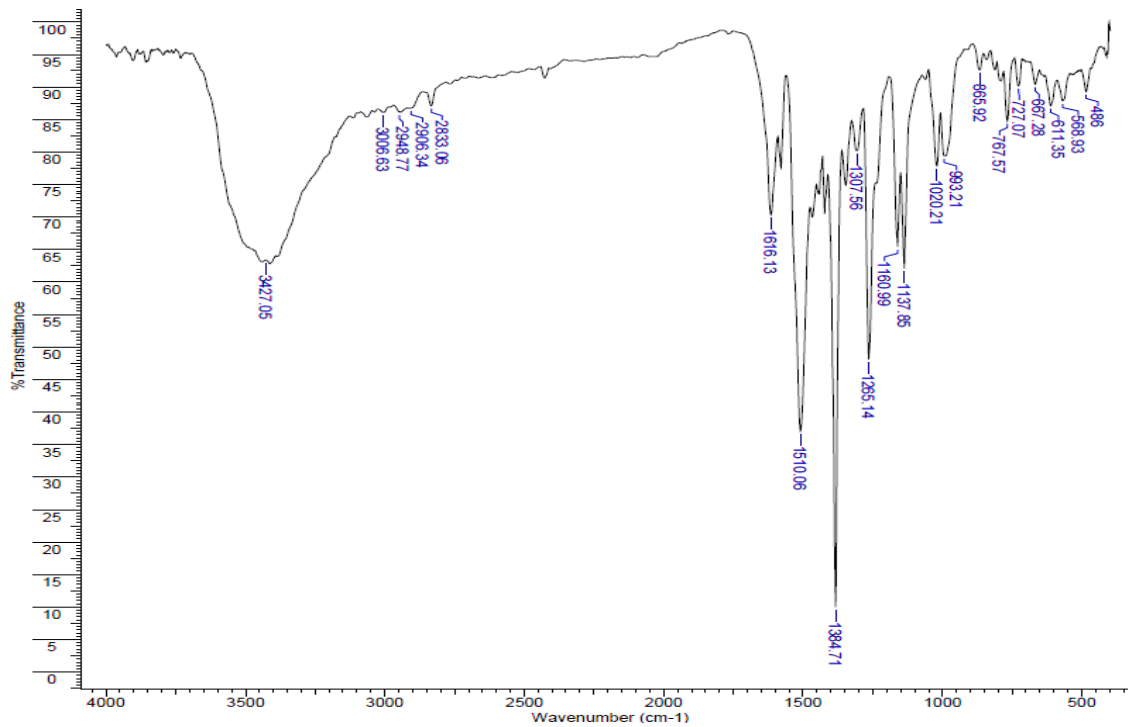


Figura S16. Espectro de infrarrojo de [Cu(2,2'-bipiridina)(dimetoxicurcumina)]NO₃

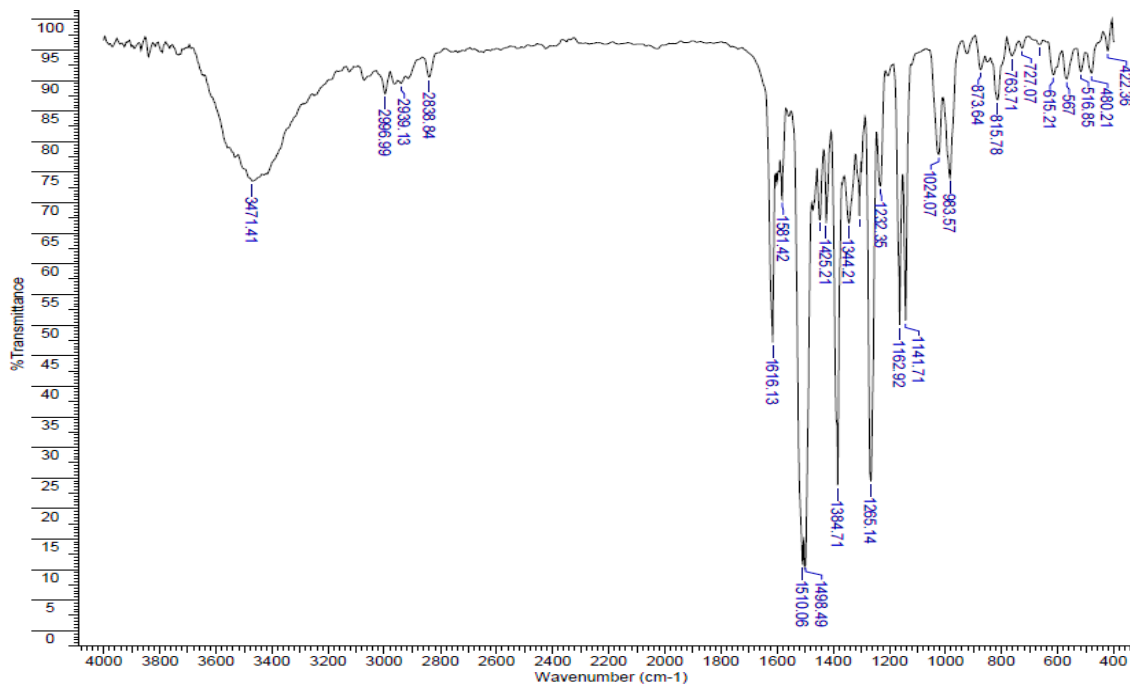


Figura S17. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

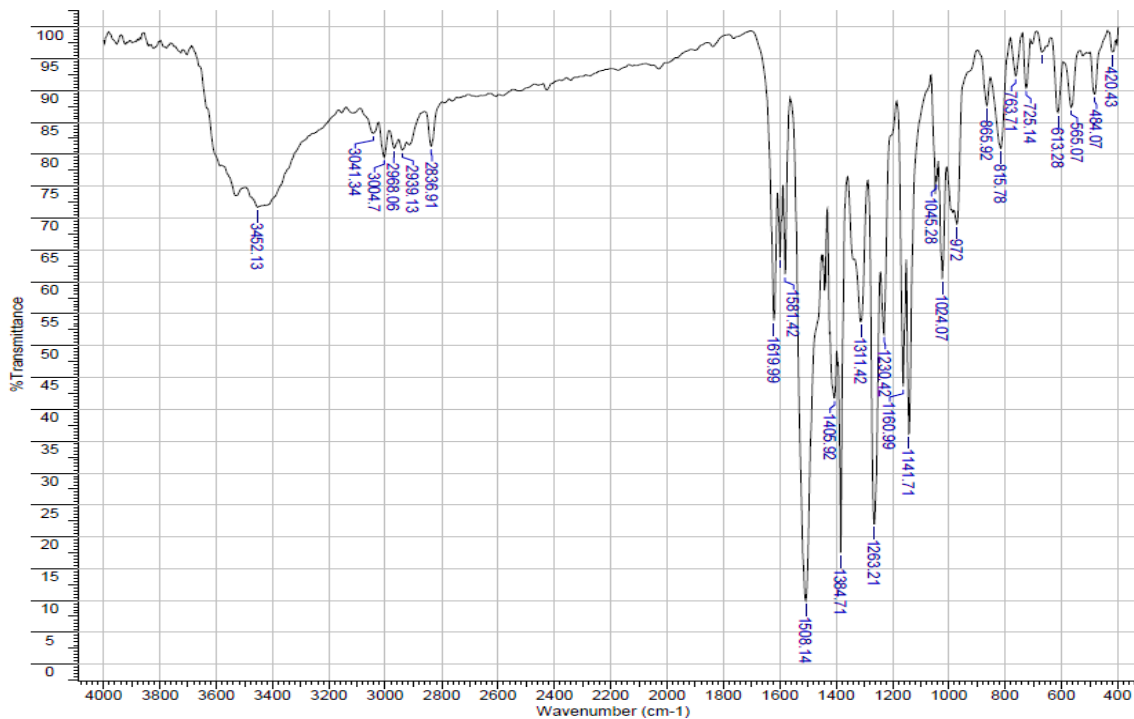


Figura S18. Espectro de infrarrojo de [Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

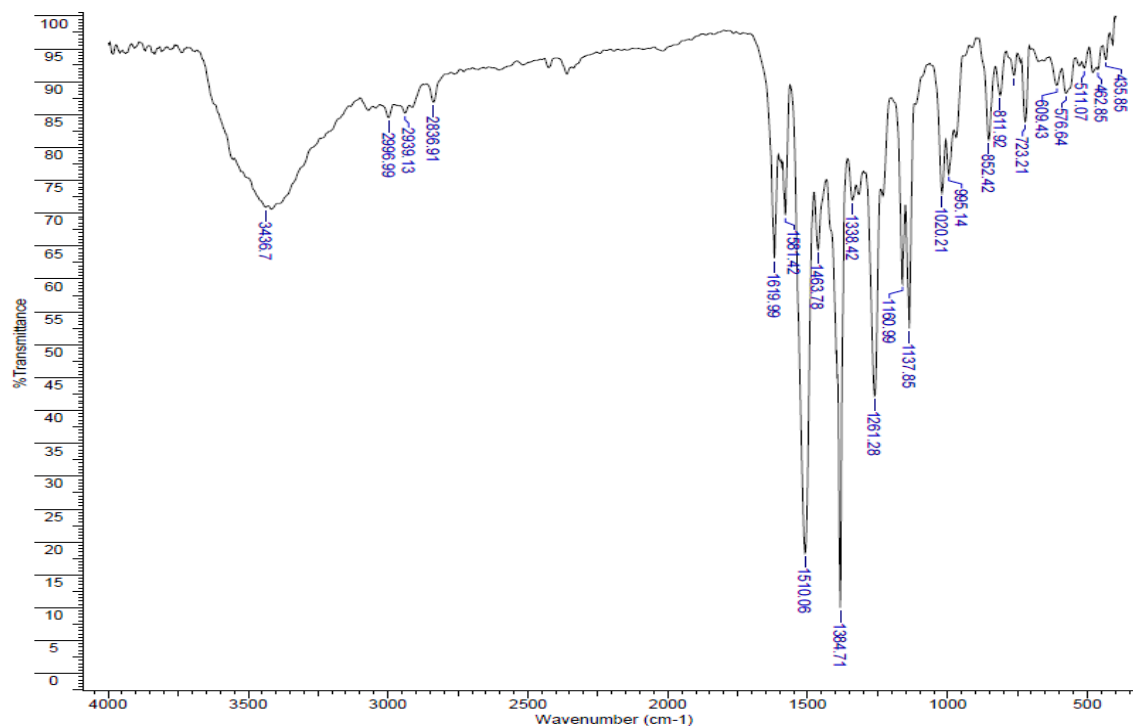


Figura S19. Espectro de infrarrojo de [Cu(1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

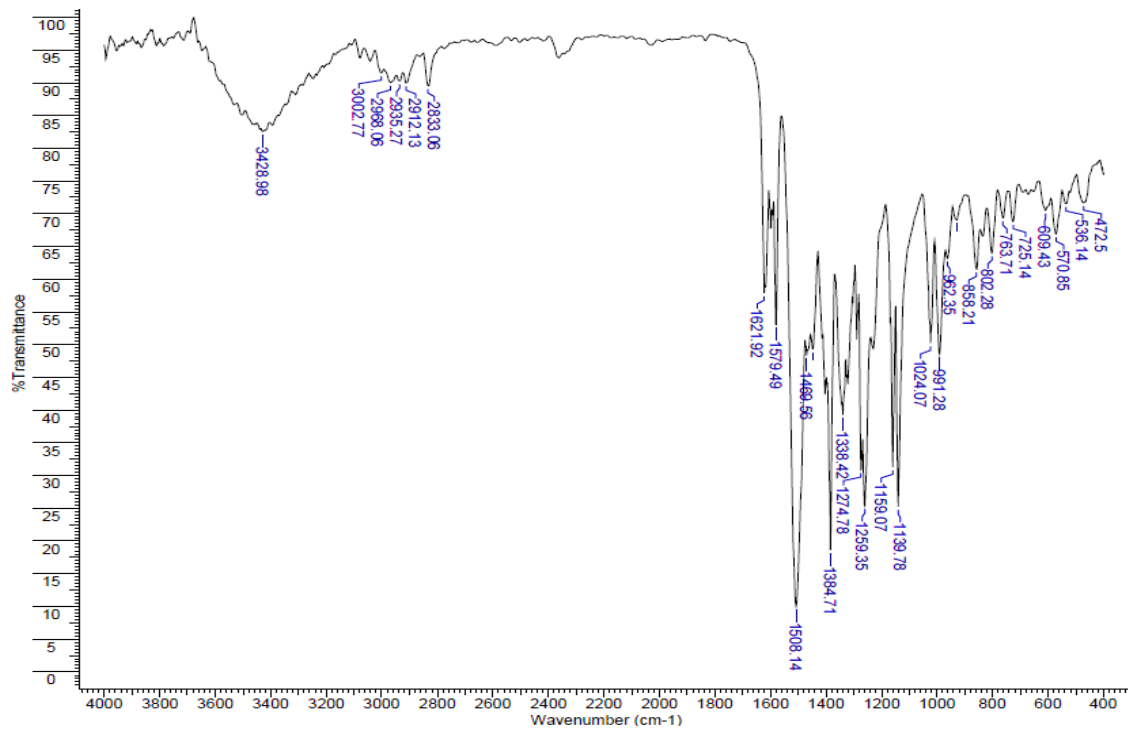


Figura S20. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃

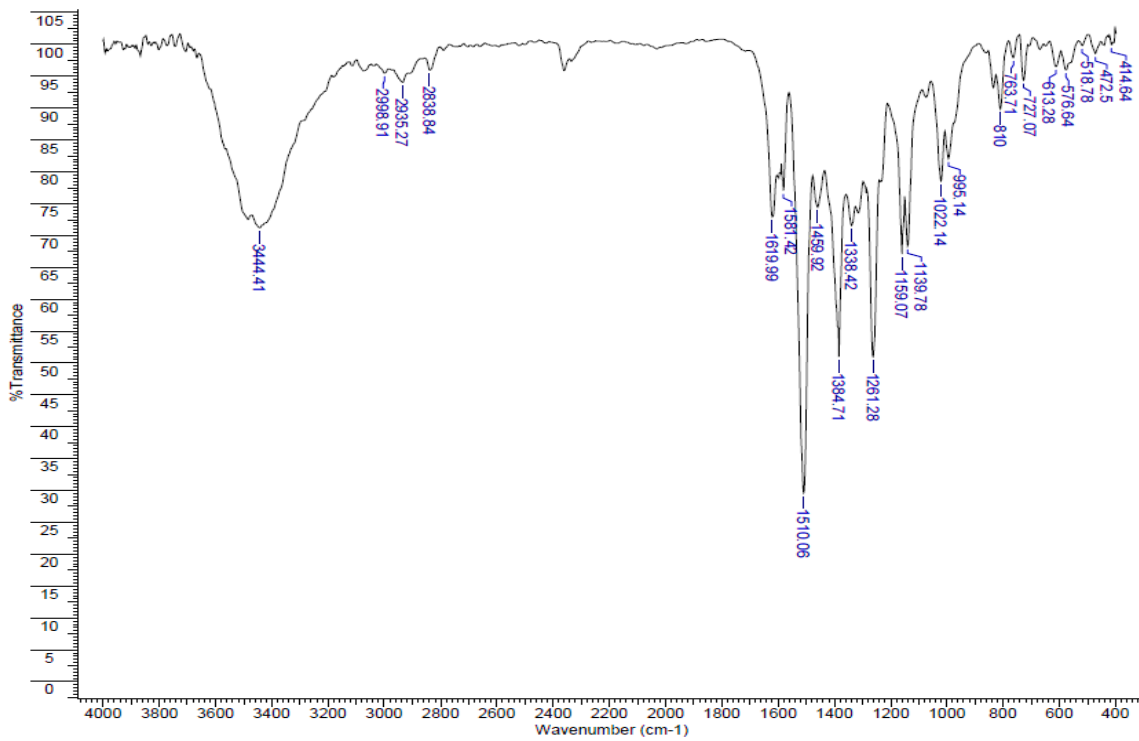


Figura S21. Espectro de infrarrojo de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

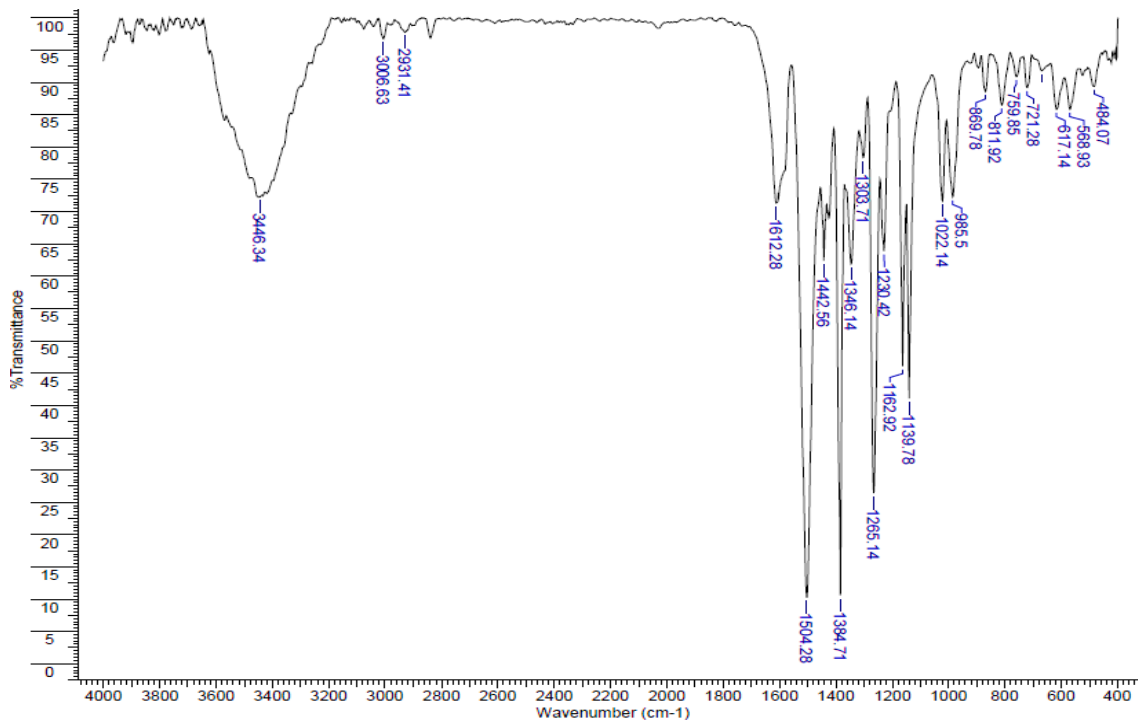


Figura S22. Espectro de infrarrojo de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

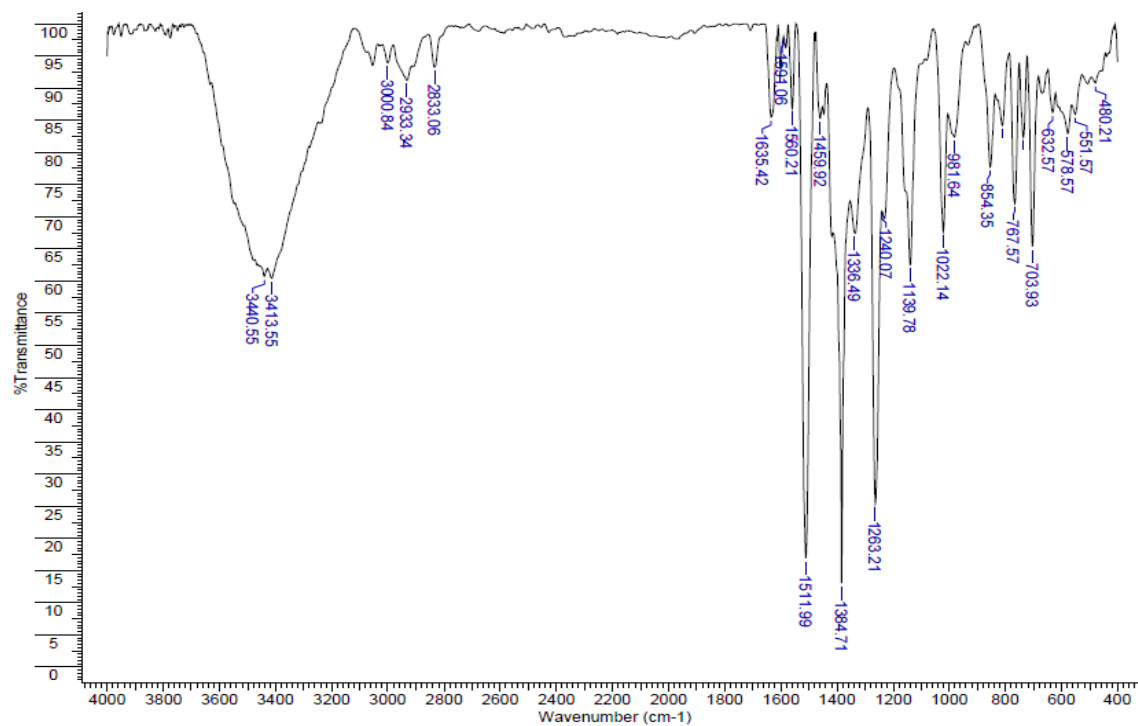


Figura S23. Espectro de infrarrojo de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃.

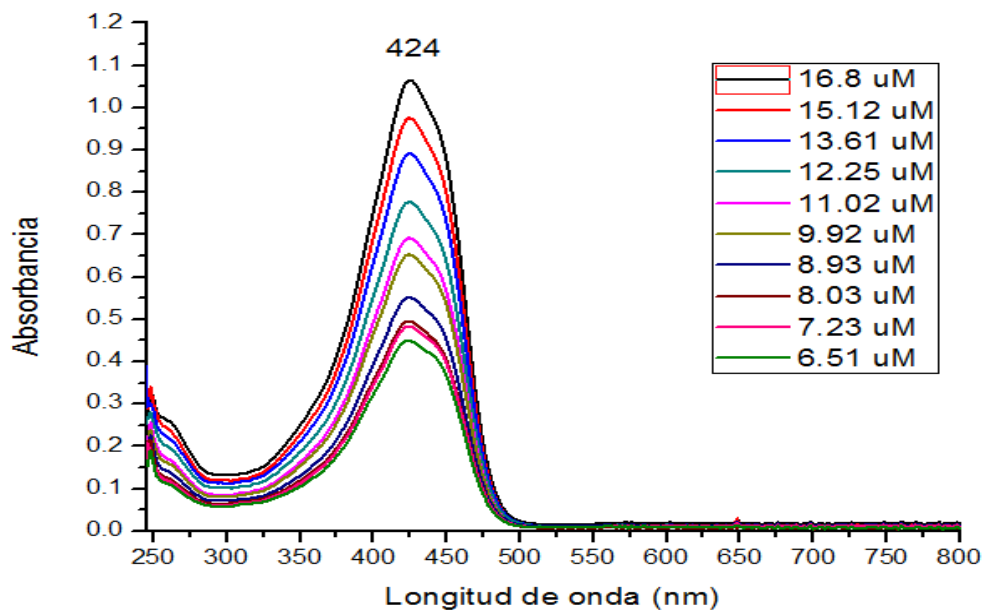


Figura S24. Espectro de UV-Vis del ligante curcumina en DMSO.

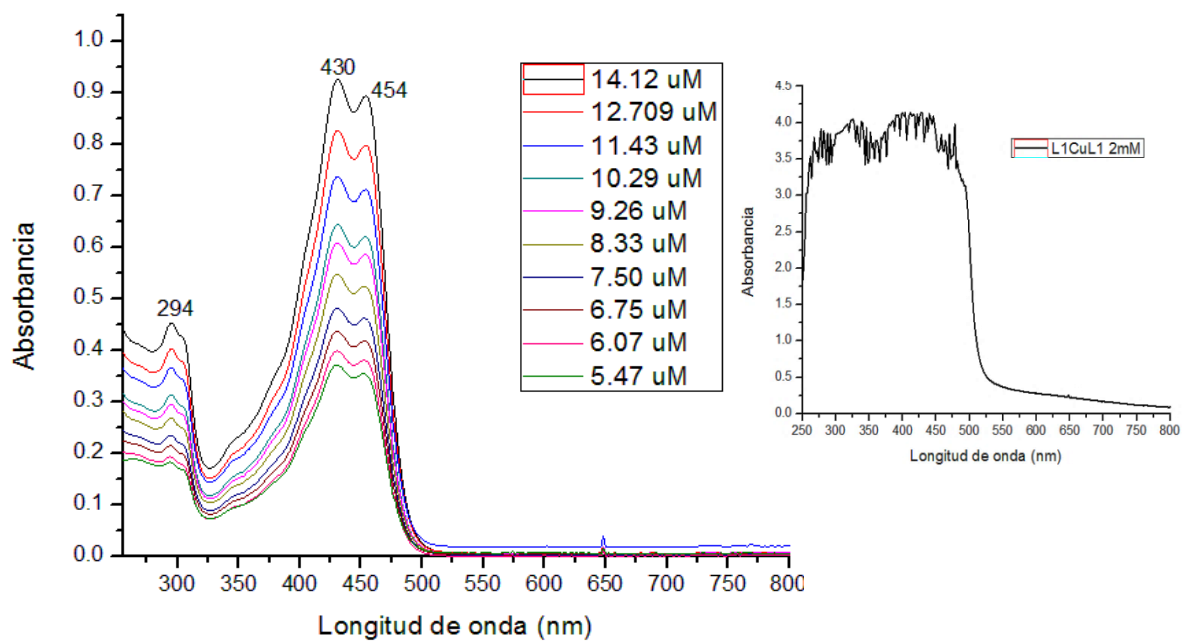


Figura S25. Espectro de UV-Vis de $[Cu(2,2'\text{-bipiridina})(curcumina)]NO_3$ en DMSO.

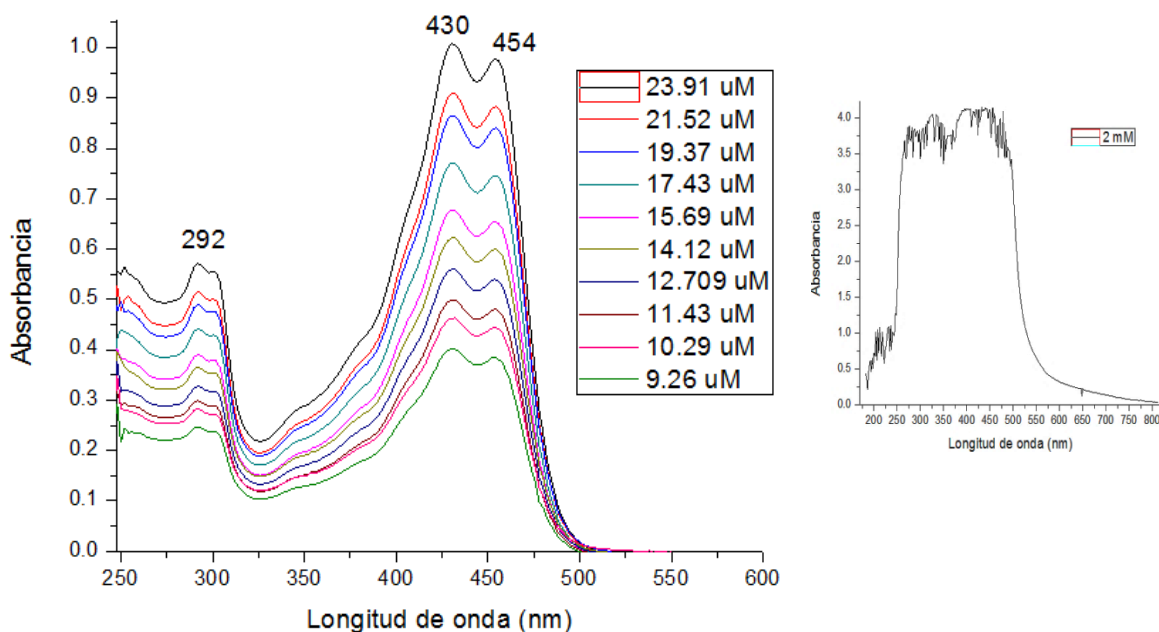


Figura S26. Espectro de UV-Vis de [Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

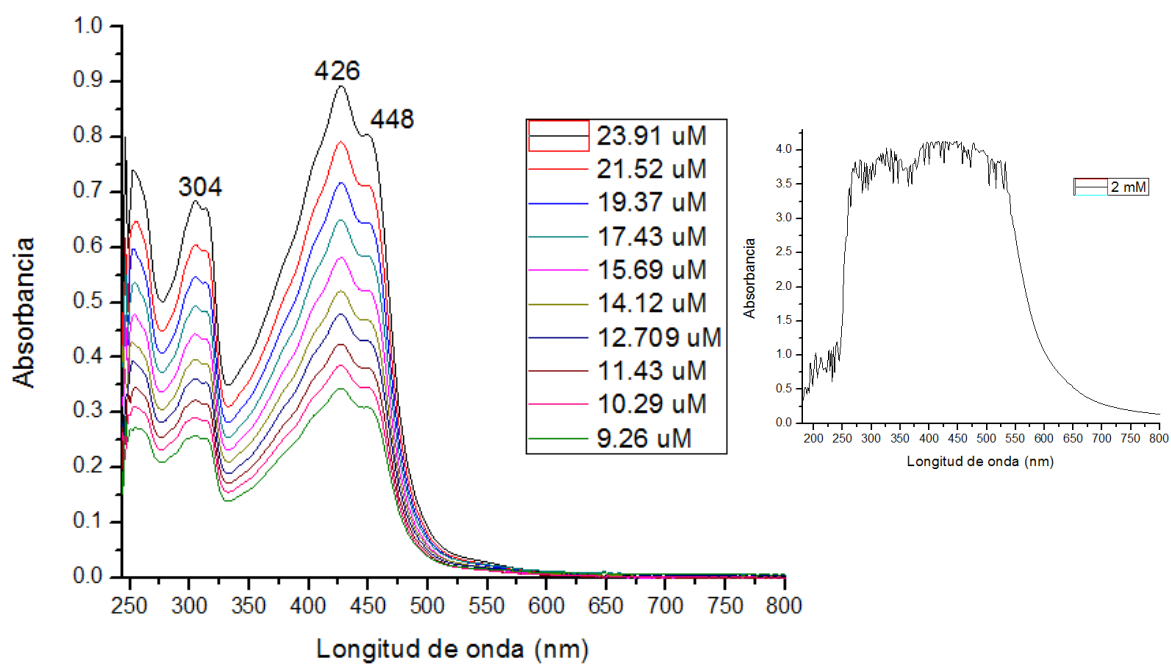


Figura S27. Espectro de UV-Vis de [Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

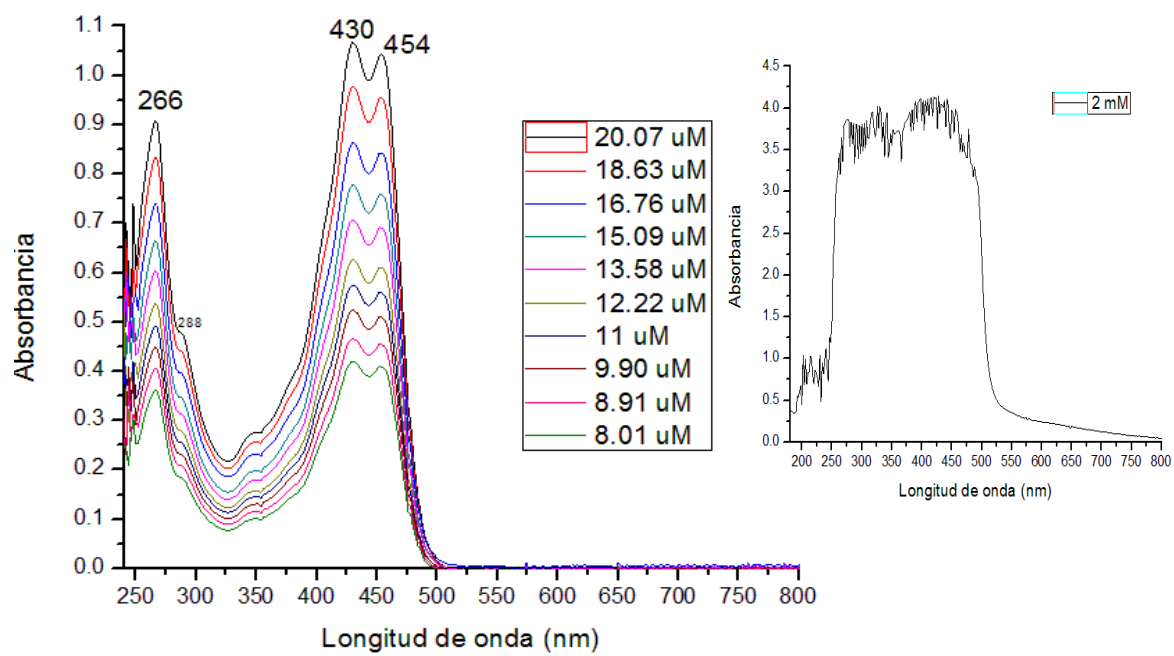


Figura S28. Espectro de UV-Vis de [Cu(1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

Figura S29. Espectro de UV-Vis de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

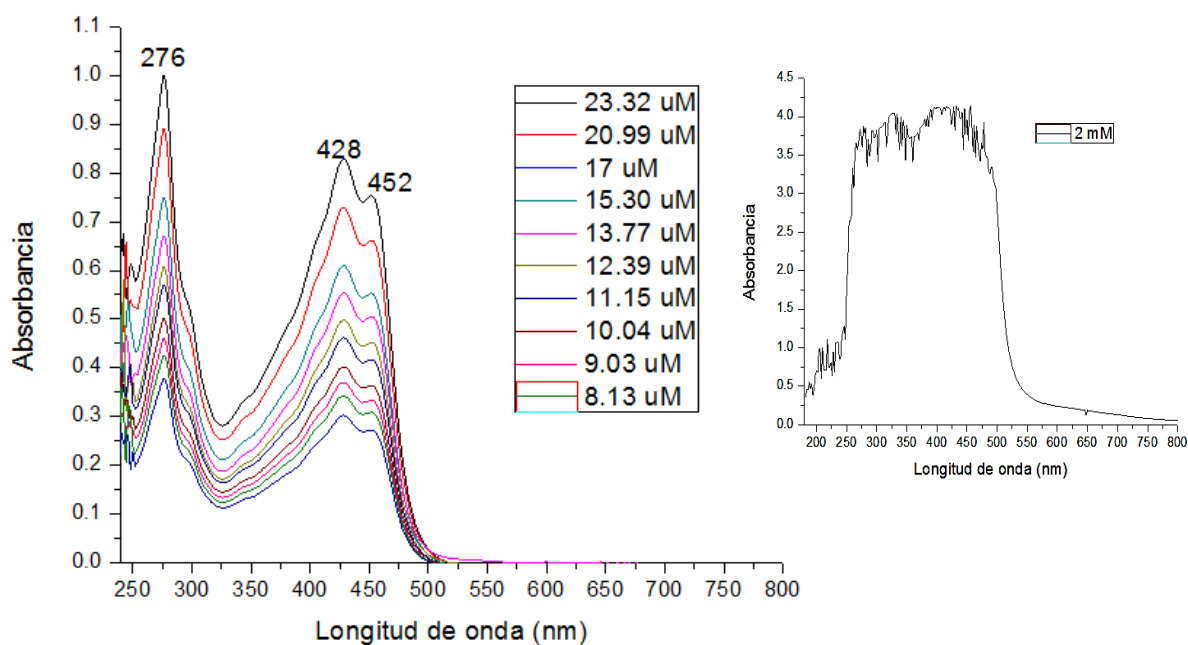


Figura S30. Espectro de UV-Vis de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

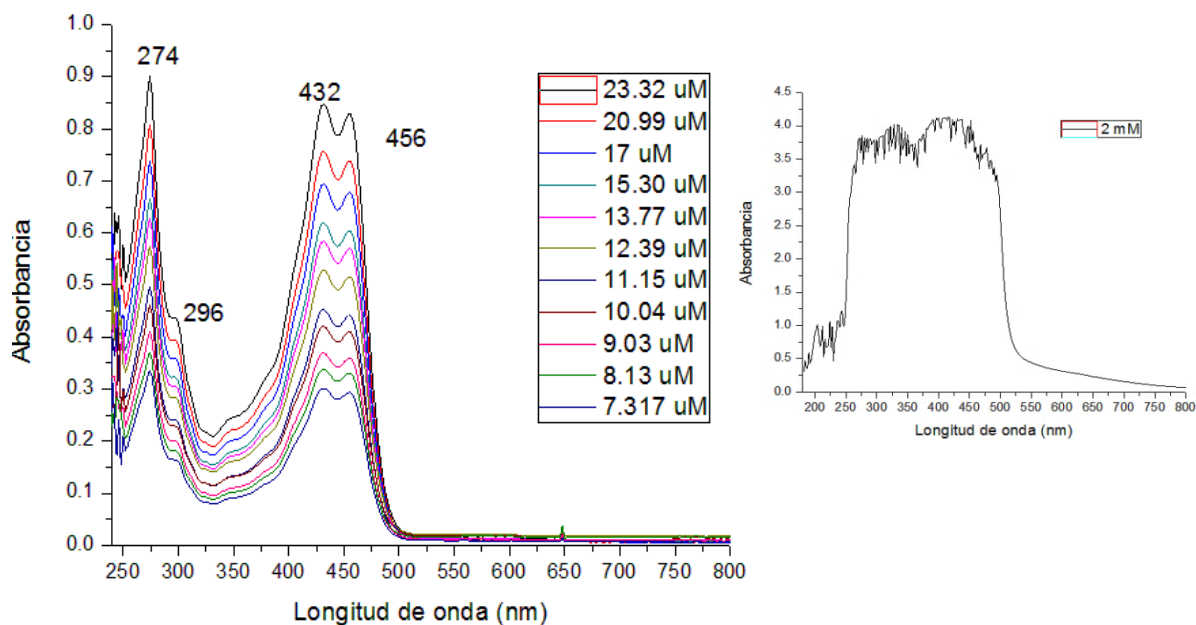


Figura S31. Espectro de UV-Vis de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

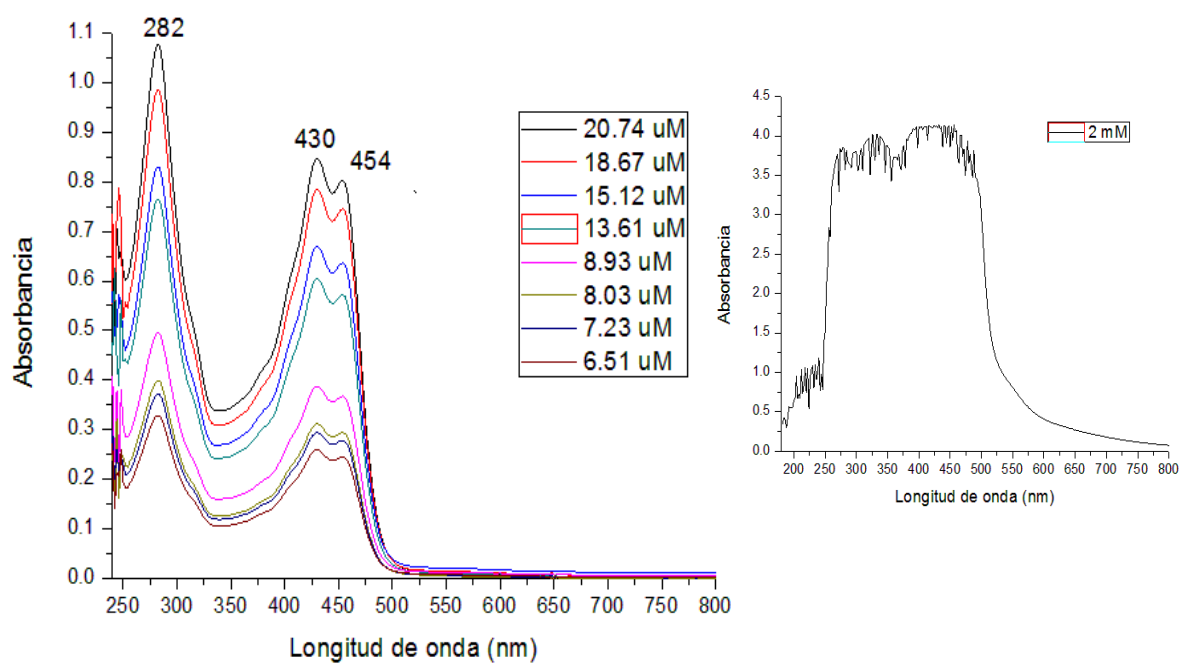


Figura S32. Espectro de UV-Vis de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃ en DMSO.

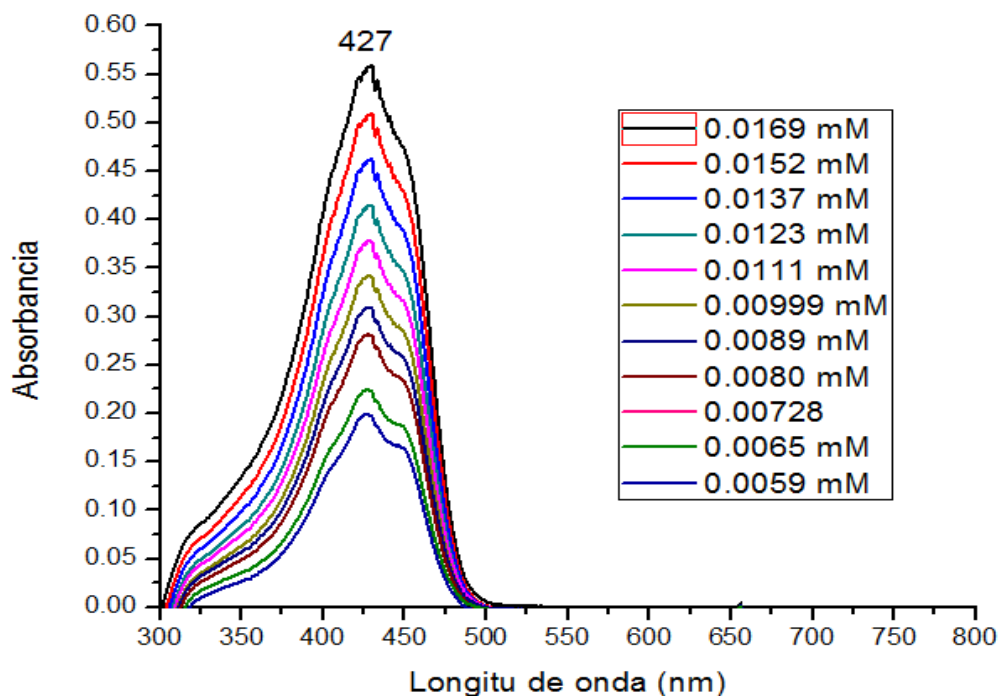


Figura S33. Espectro de UV-Vis del ligante dimetoxicurcumina en DMSO.

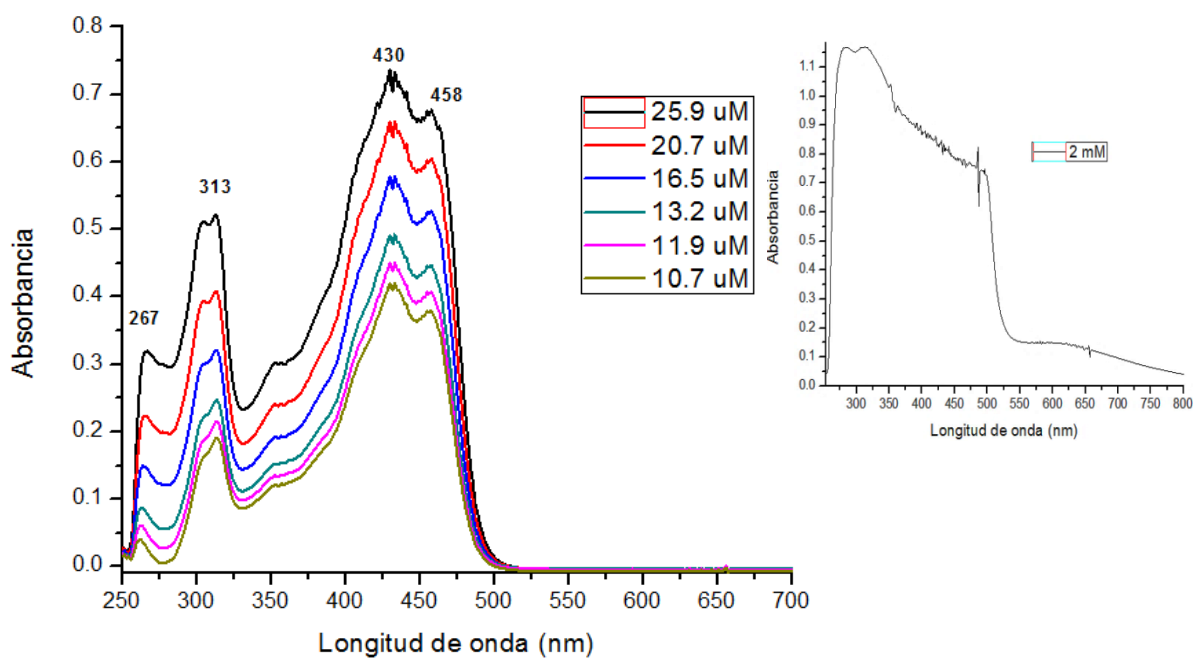


Figura S34. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipyridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

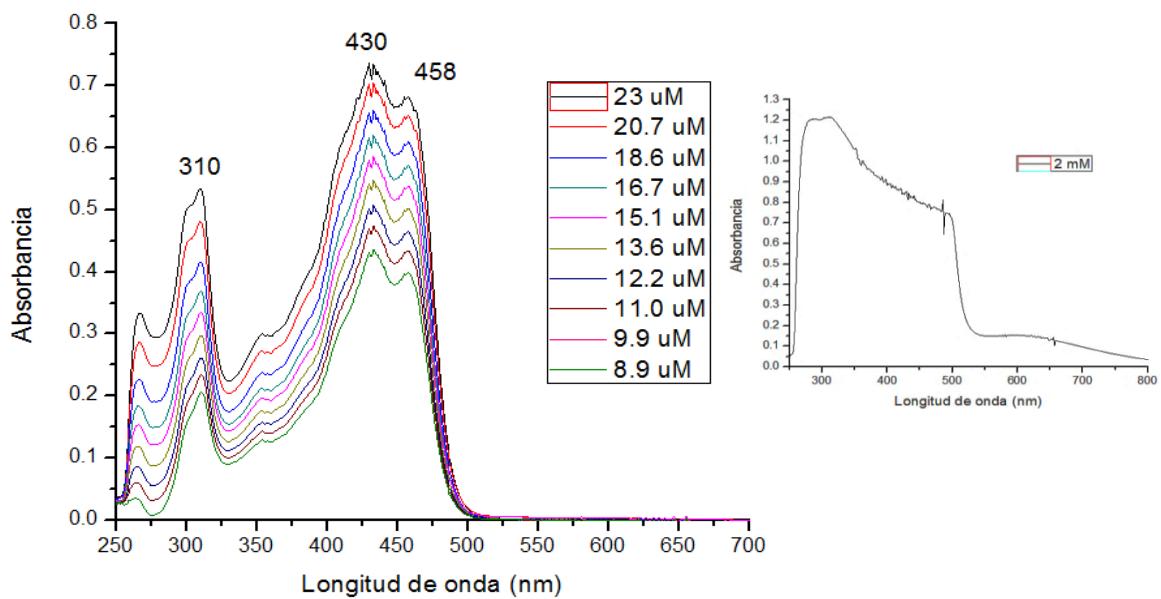


Figura S35. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipyridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

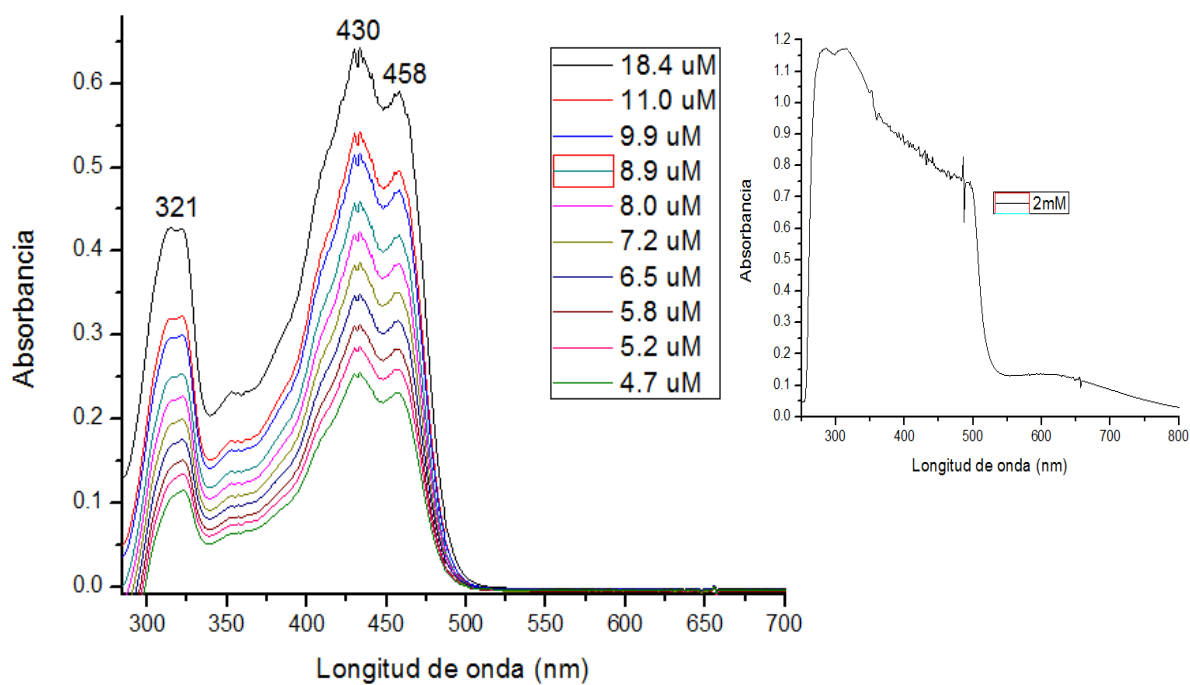


Figura S36. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina)}(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

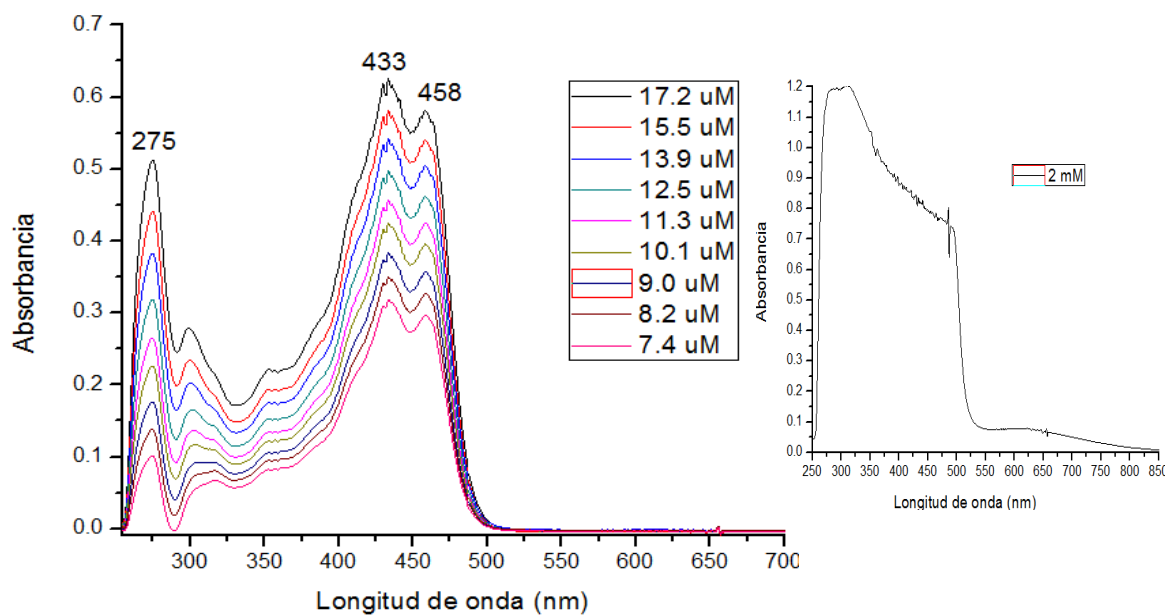


Figura S37. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina)}(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

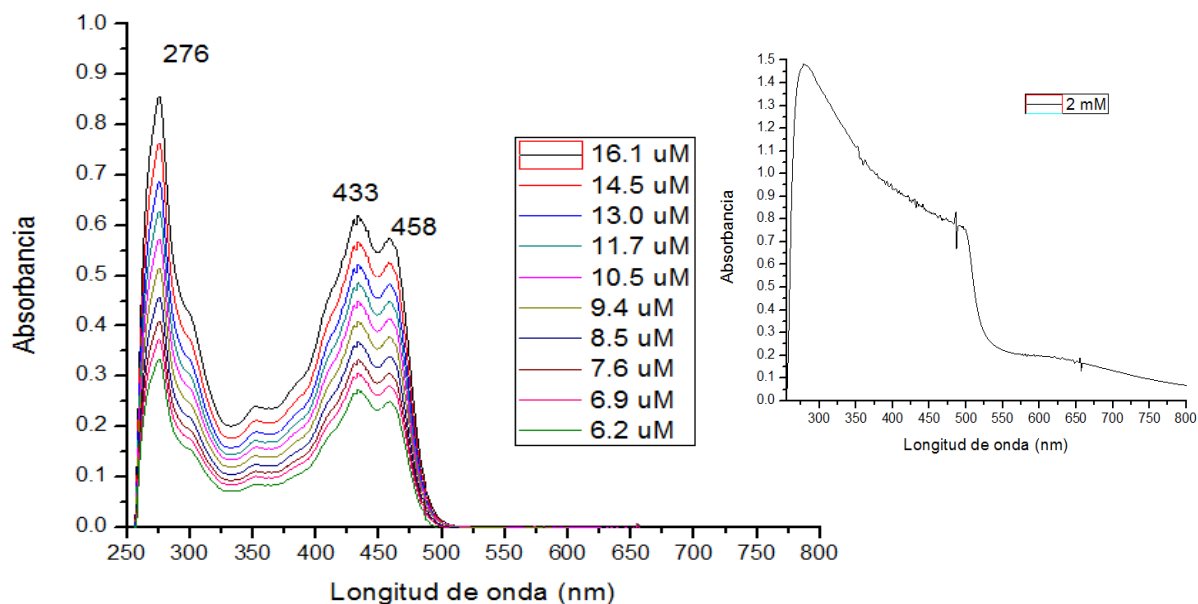


Figura S38. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

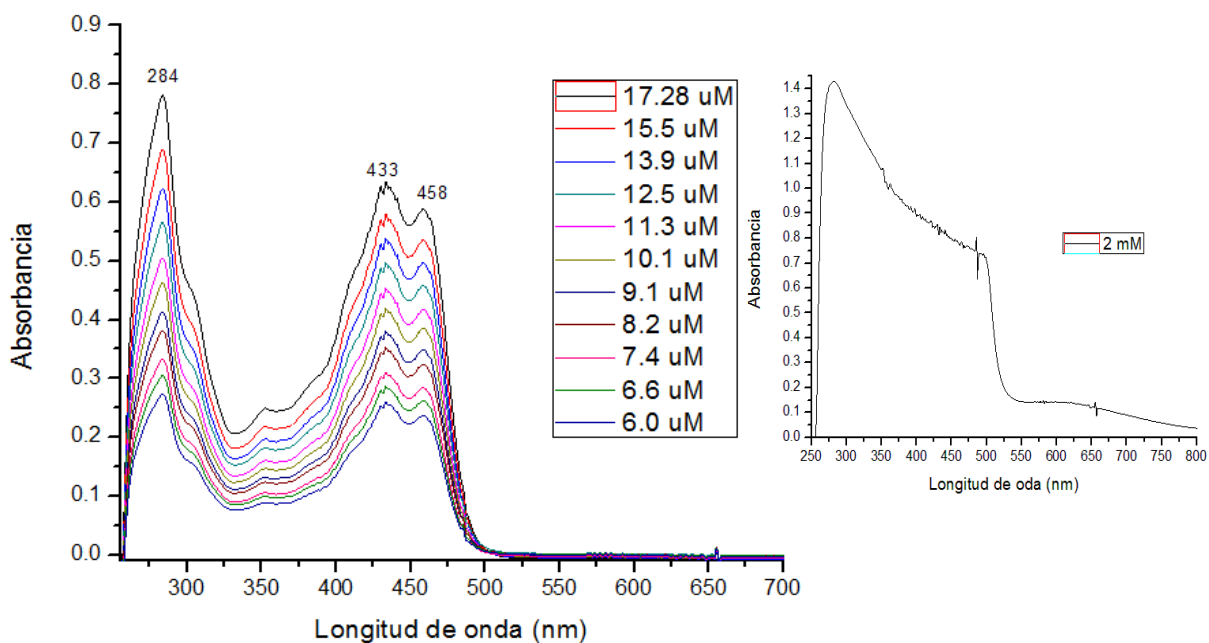


Figura S39. Espectro de UV-Vis de $[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$ en DMSO.

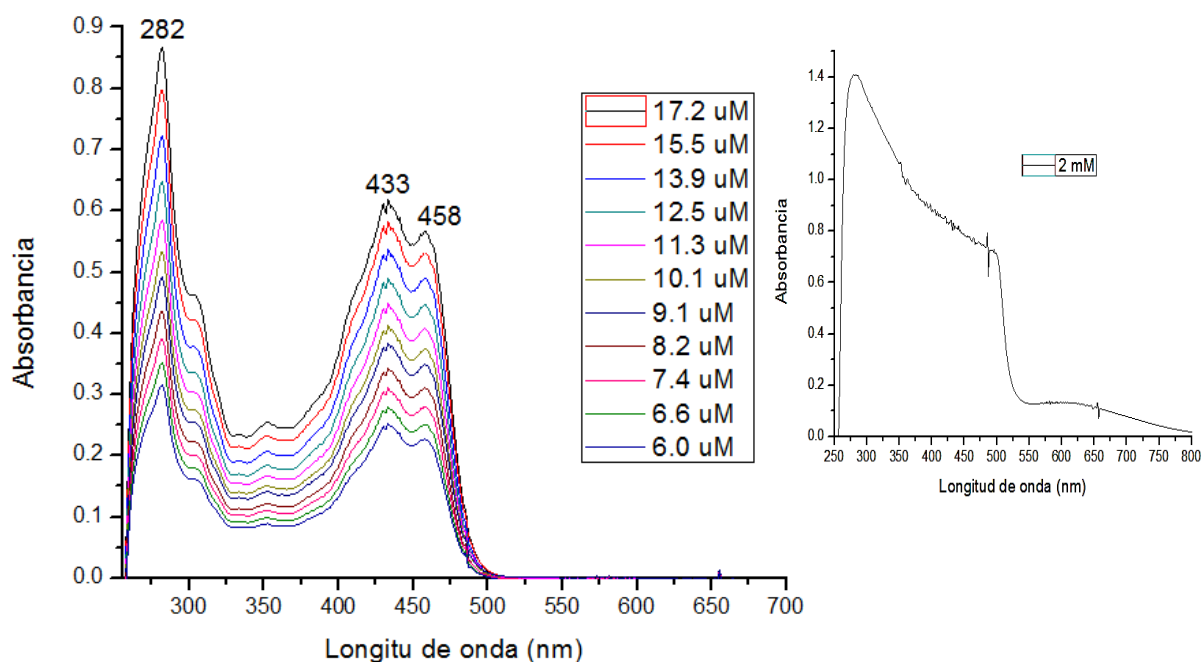


Figura S40. Espectro de UV-Vis de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ en DMSO.

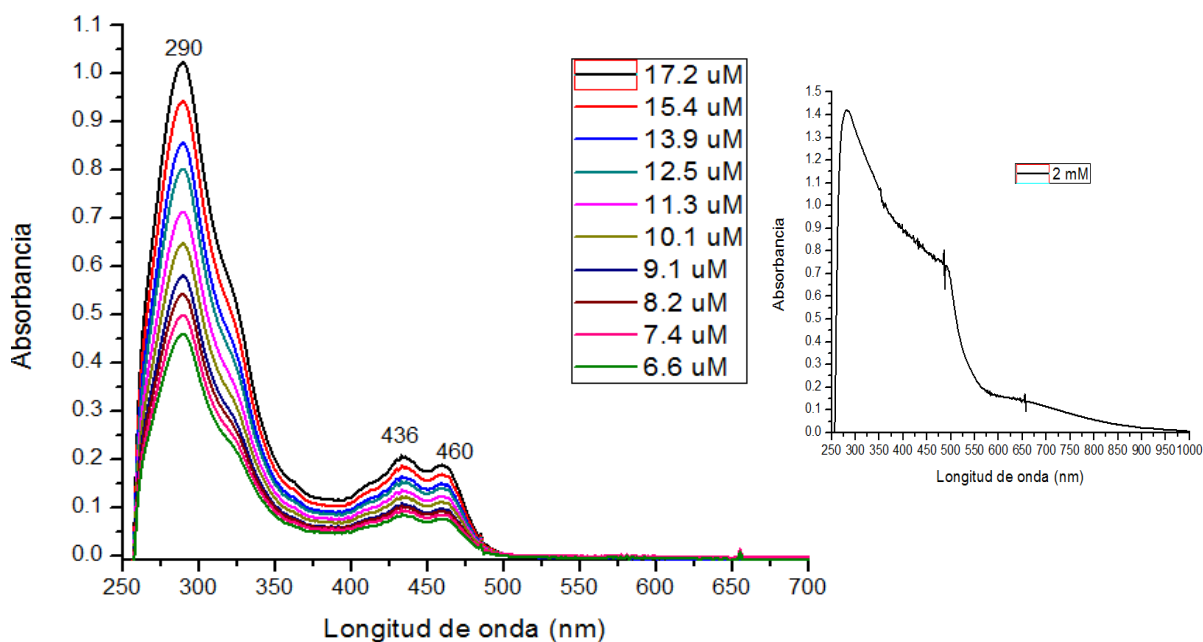


Figura S41. Espectro de UV-Vis de [Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(dimetoxicurcumina)]NO₃ en DMSO.

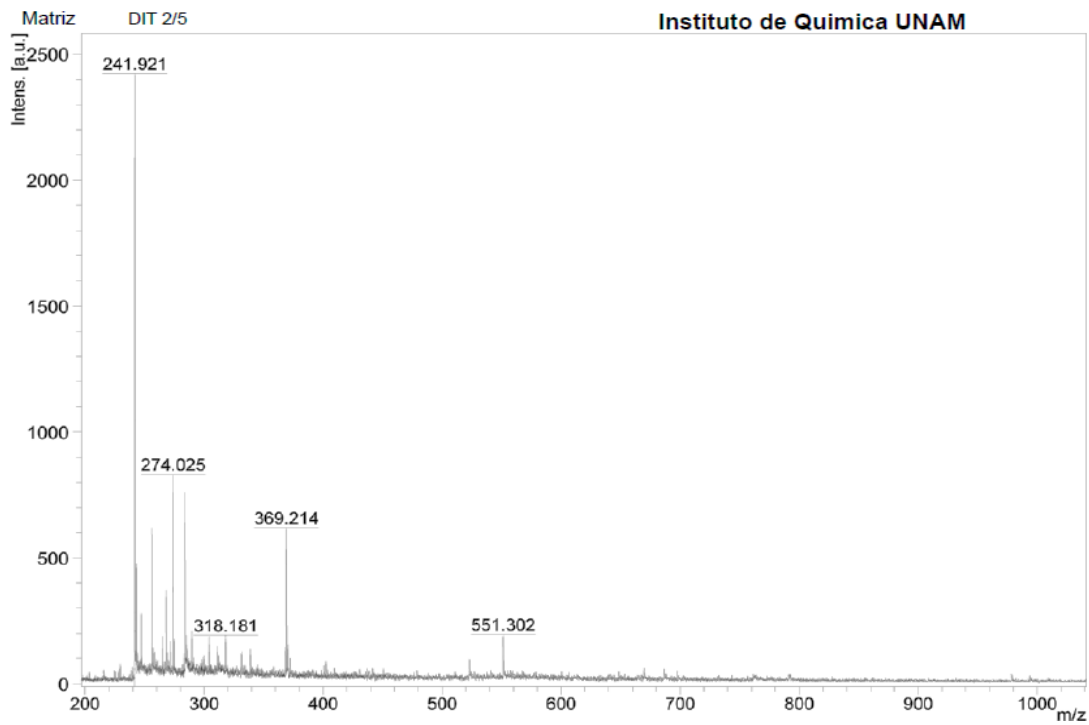


Figura S42. Espectro de masas MALDI del ligante curcumina

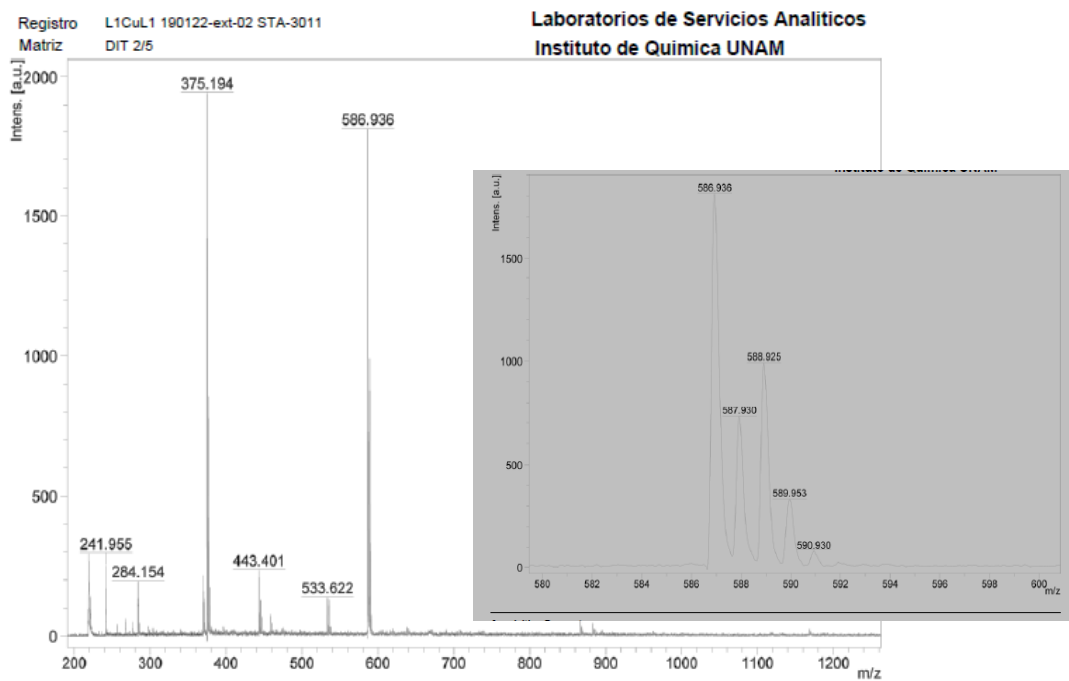


Figura S43. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$

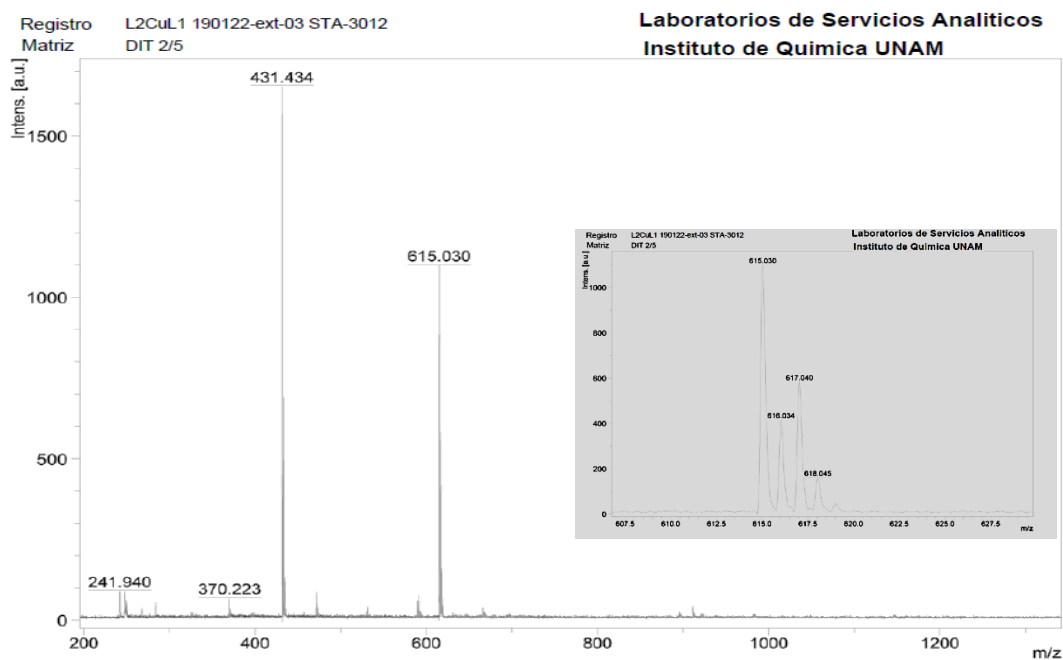


Figura S44. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$.

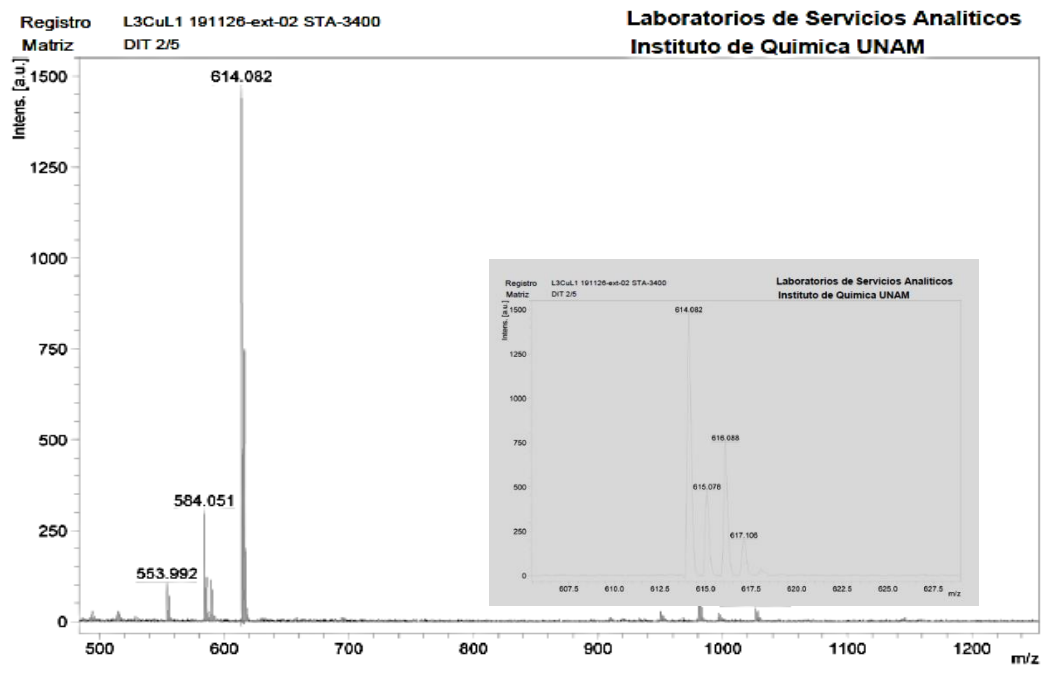


Figura S45. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$.

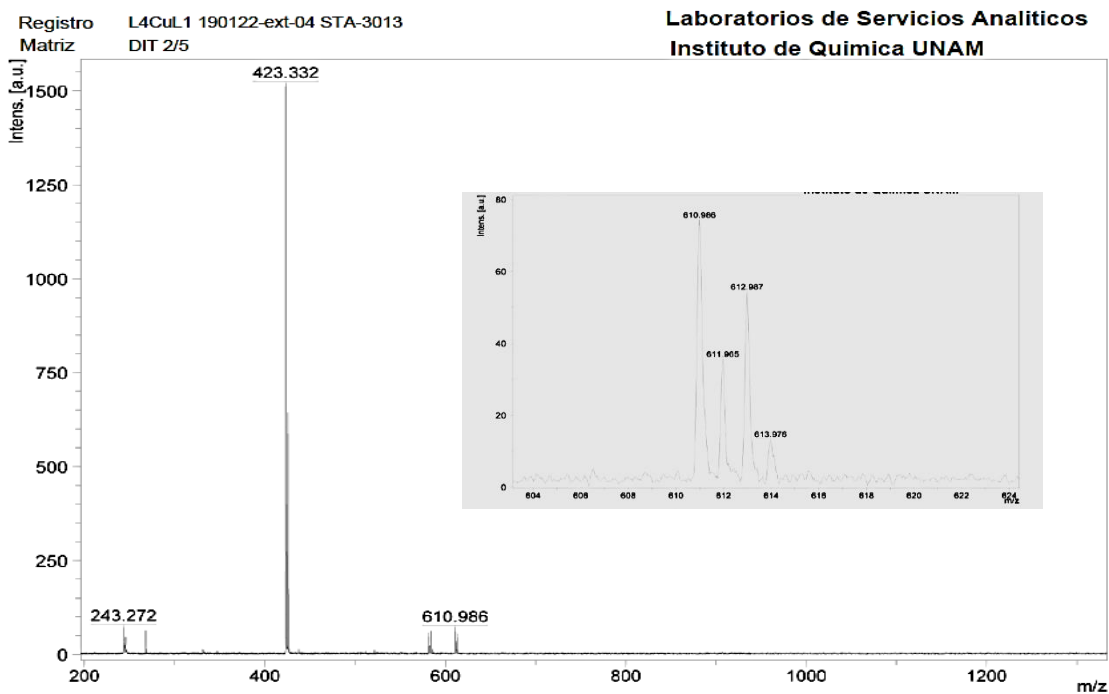


Figura S46. Espectro de masas MALDI de [Cu(1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

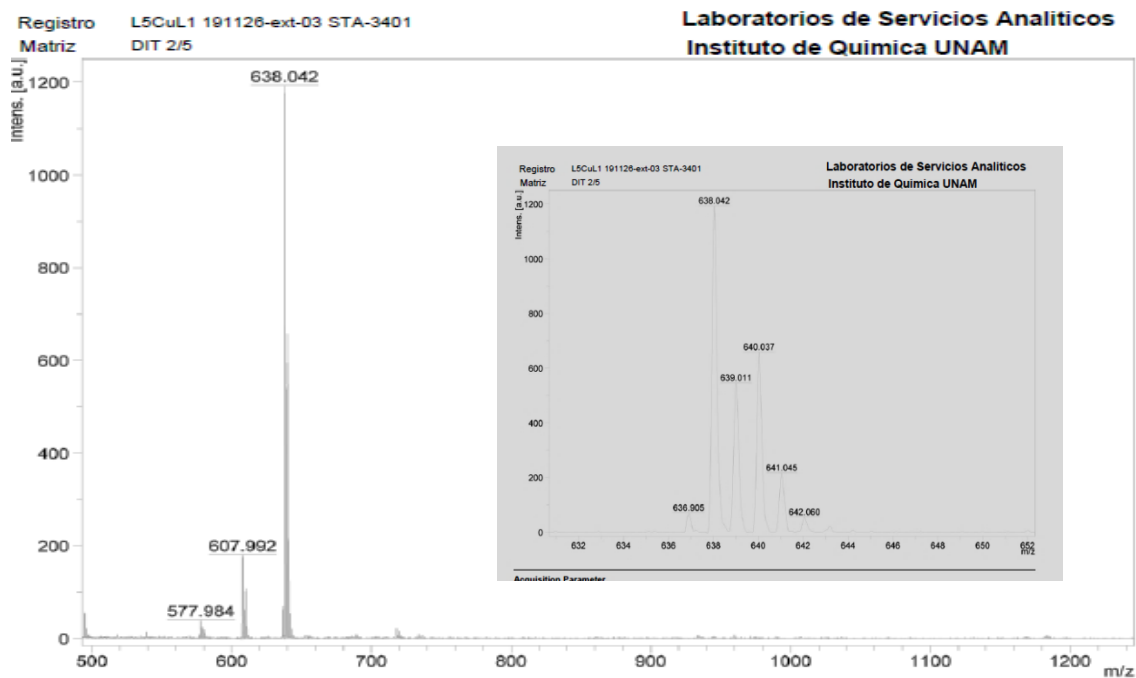


Figura S47. Espectro de masas MALDI de [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

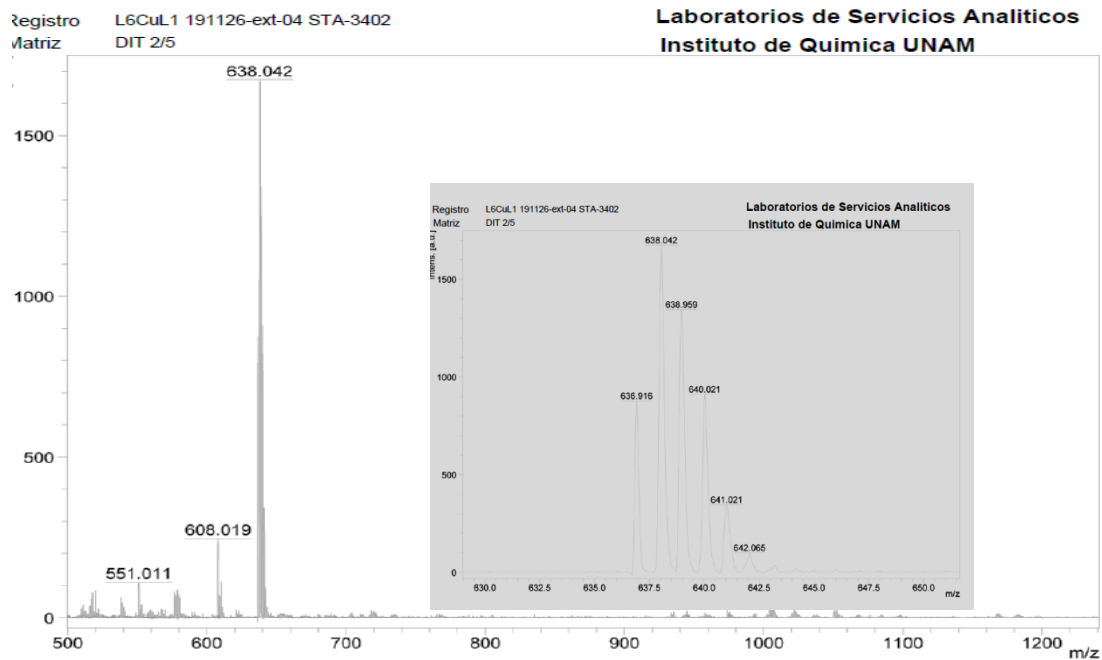


Figura S48. Espectro de masas MALDI de [Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

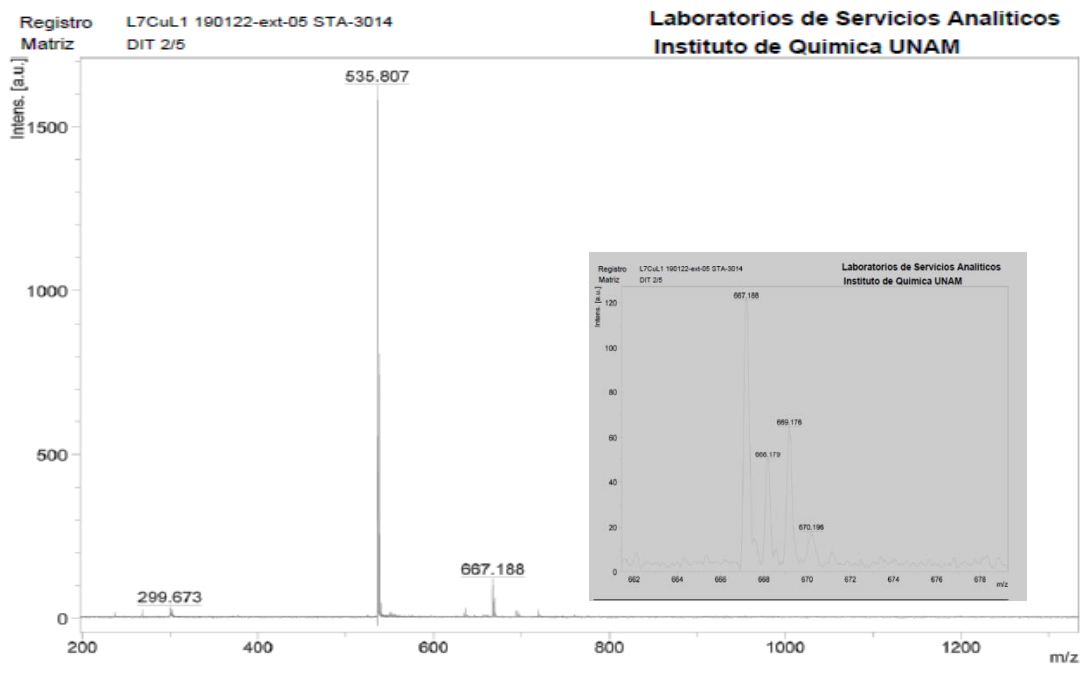


Figura S49. Espectro de masas MALDI de [Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(curcumina)]NO₃.

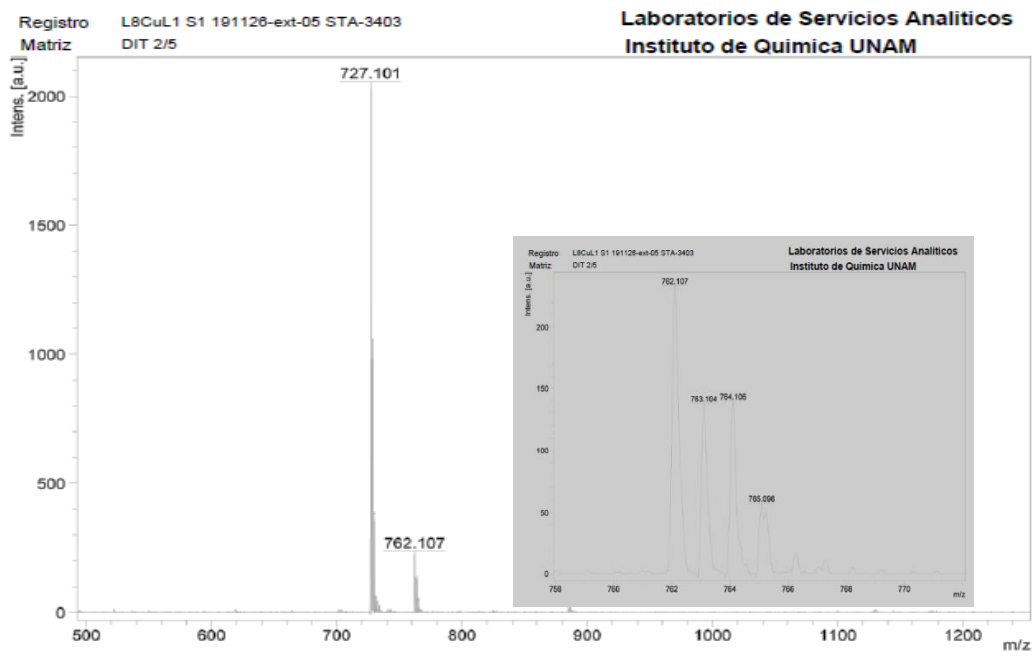


Figura S50. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-}1,10\text{-fenantrolina})(\text{curcumina})]\text{NO}_3$.

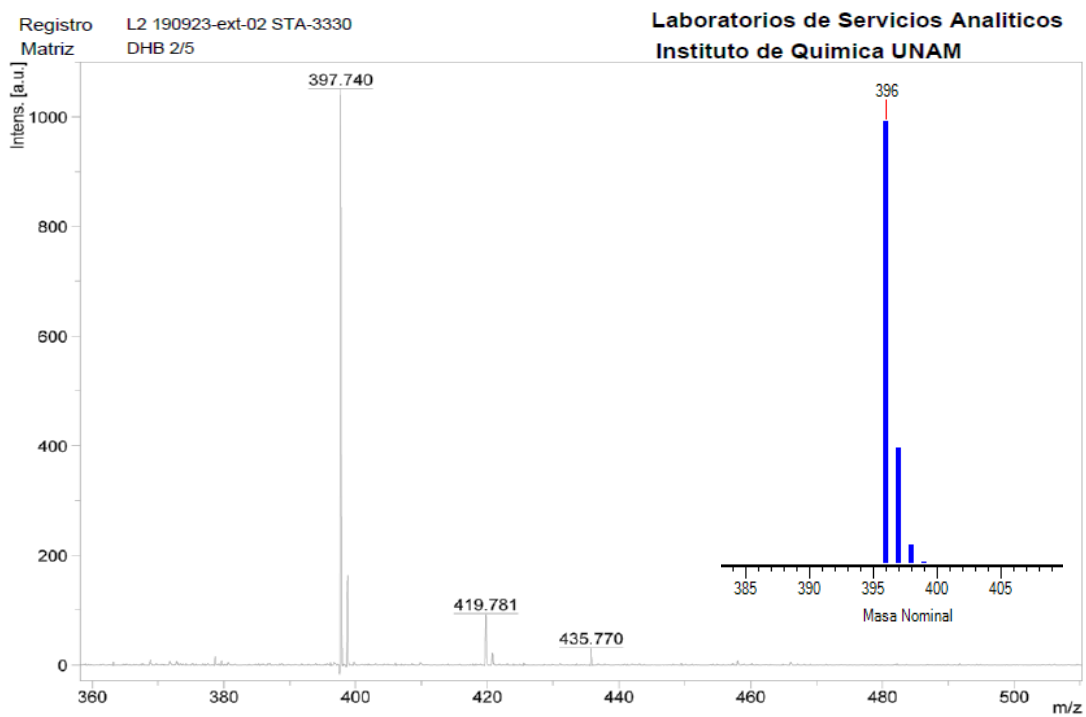


Figura S51. Espectro de masas MALDI del ligante dimetoxicurcumina.

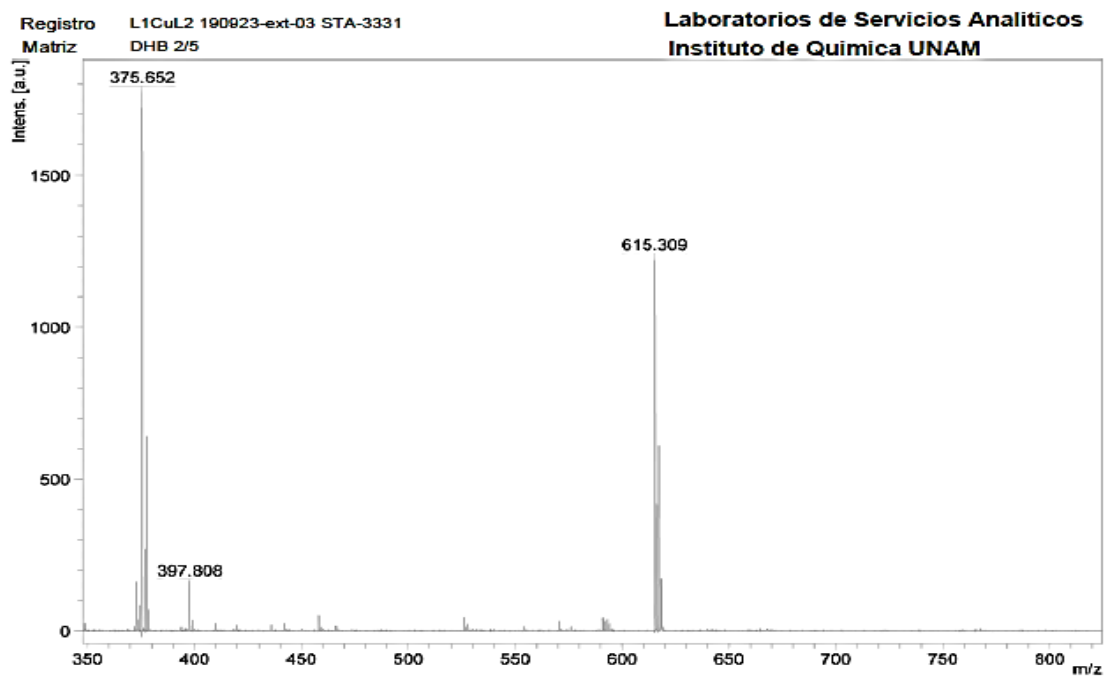


Figura S52. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$

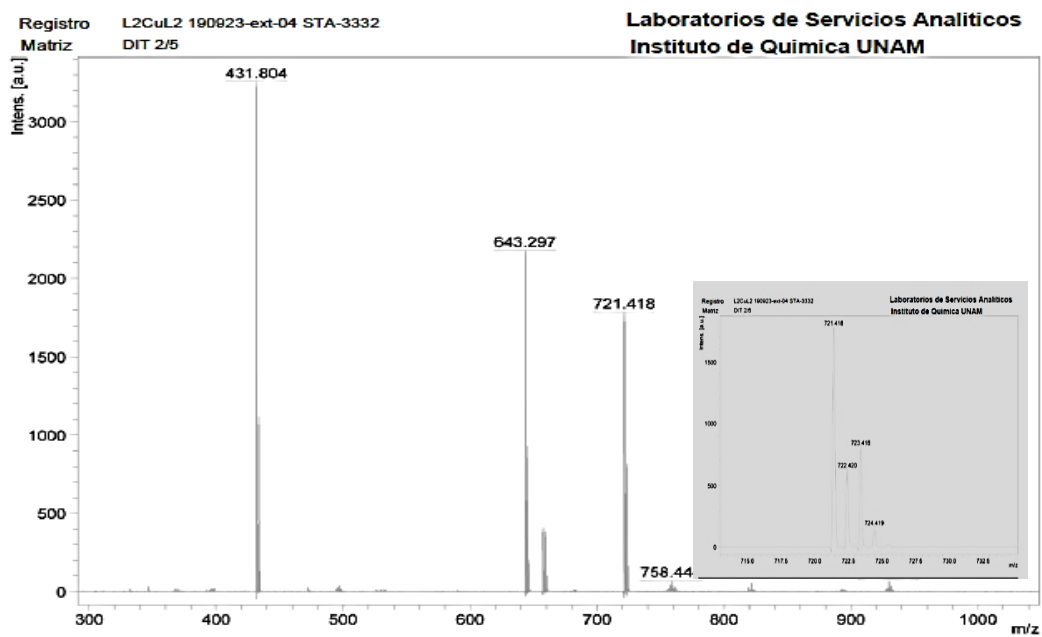


Figura S53. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$.

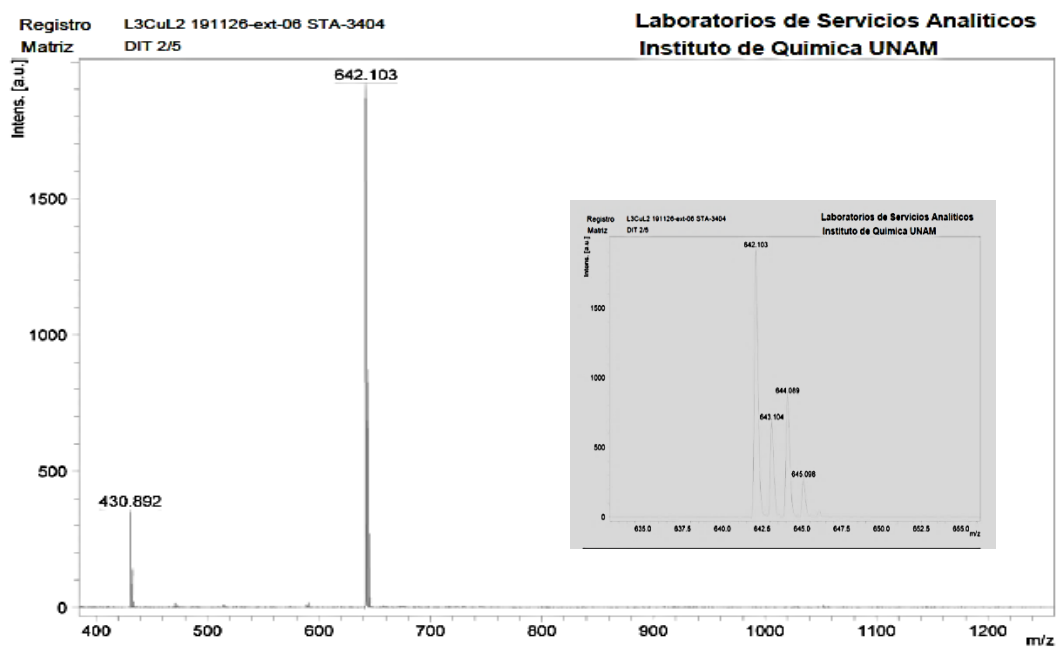


Figura S54. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$

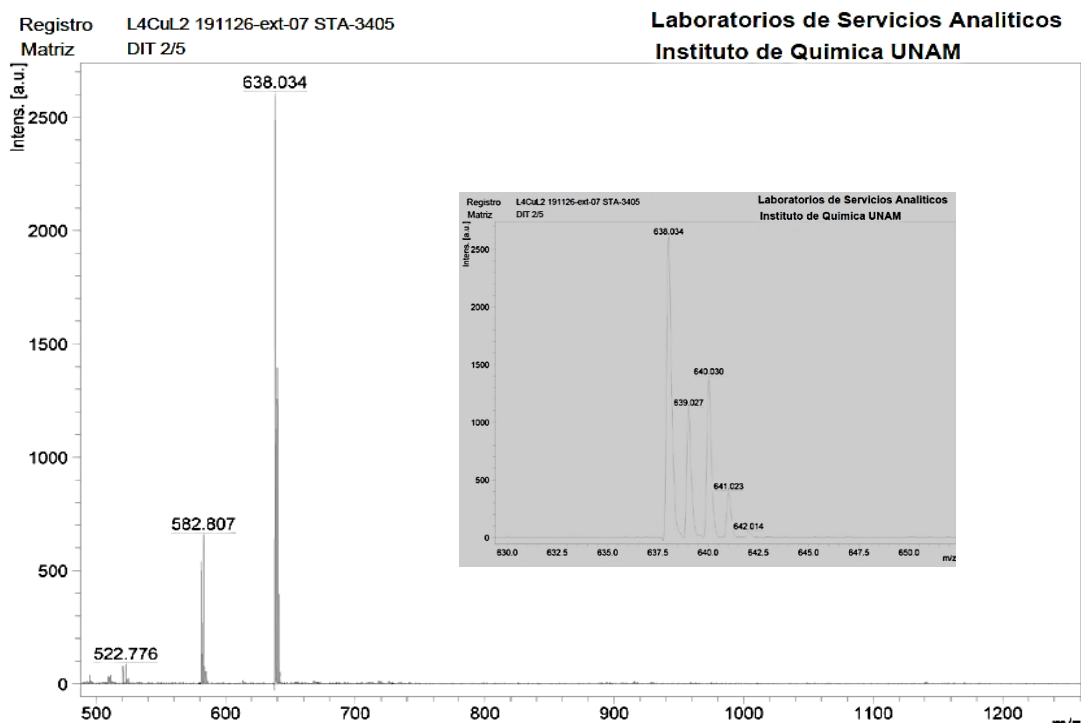


Figura S55. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$

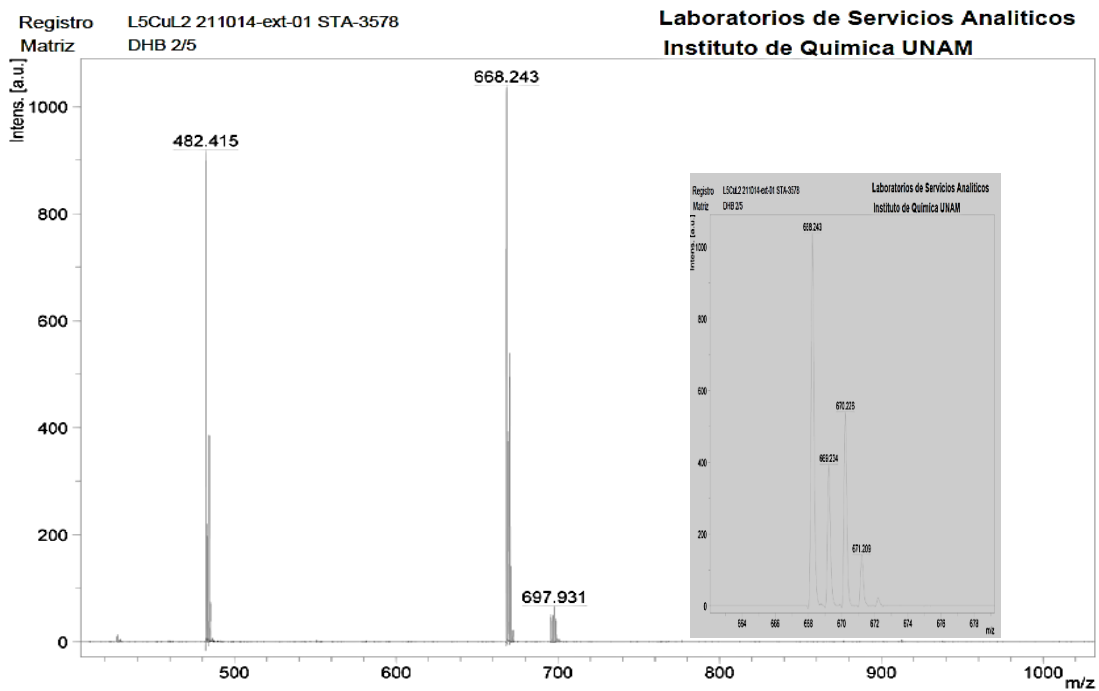


Figura S56. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(4,7\text{-dimetil-1,10\text{-fenantrolina)}(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$

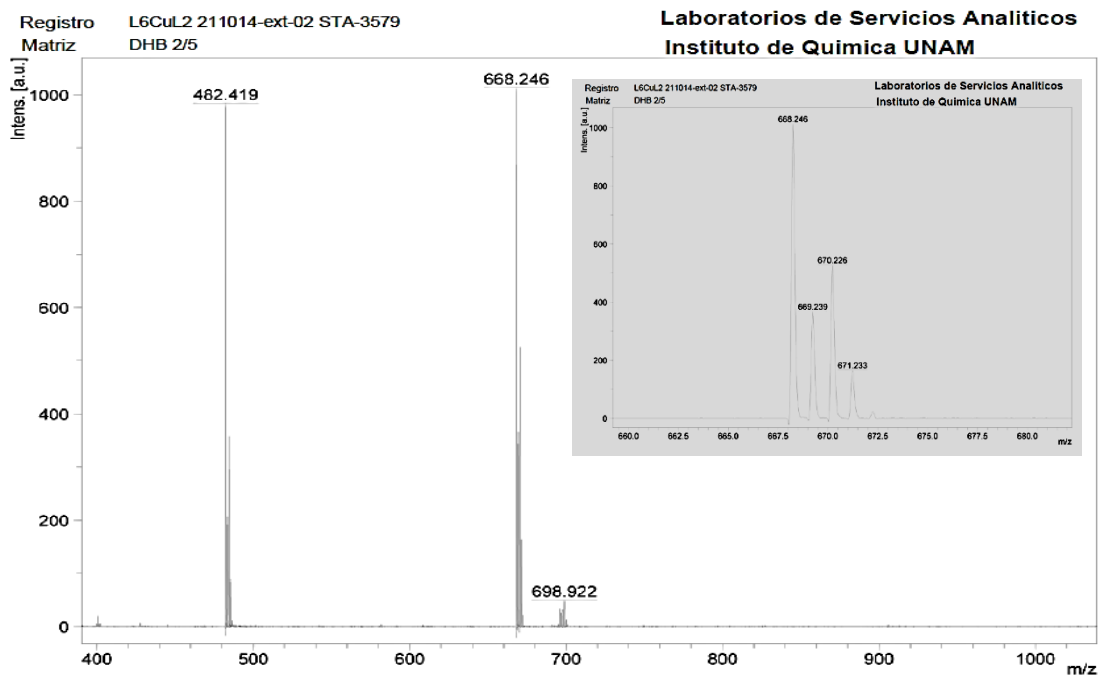


Figura S57. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-1,10\text{-fenantrolina)}(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$.

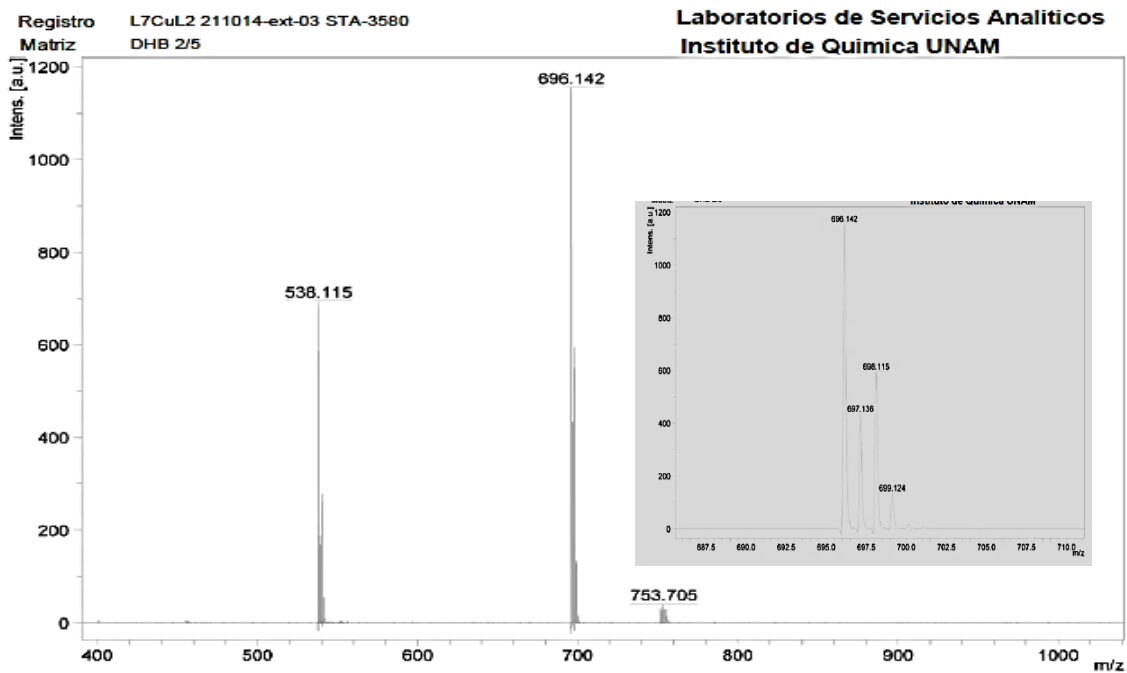


Figura S58. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$.

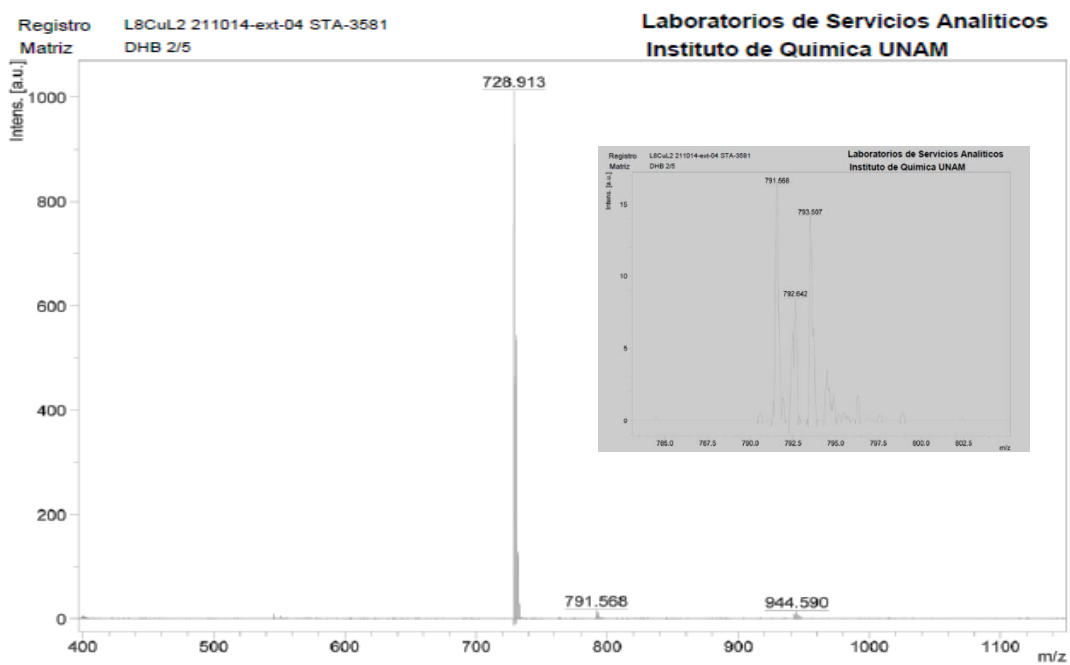


Figura S59. Espectro de masas MALDI de $[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolina})(\text{dimetoxicurcumina})]\text{NO}_3$.

Article

Casiopeinas of Third Generations: Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity and Structure–Activity Relationships of Mixed Chelate Compounds with Bioactive Secondary Ligands

 Yeshenia Figueroa-DePaz ¹, Jaime Pérez-Villanueva ² , Olivia Soria-Arteche ², Diego Martínez-Otero ³, Virginia Gómez-Vidales ⁴, Luis Ortiz-Frade ⁵  and Lena Ruiz-Azuara ^{1,*} 

- ¹ Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico City 04510, Mexico; yeshita_19@hotmail.com
- ² Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Mexico City 04960, Mexico; jpvillanueva@correo.xoc.uam.mx (J.P.-V.); soriao00@gmail.com (O.S.-A.)
- ³ Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atzacmulco, Km.14.5, Toluca 50200, Mexico; diegomtz@unam.mx
- ⁴ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.U., Mexico City 04510, Mexico; gomvidal@gmail.com
- ⁵ Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C. Parque Tecnológico Querétaro, Sanfandila, Pedro de Escobedo, Querétaro 76703, Mexico; laofrade@gmail.com
- * Correspondence: lenar701@gmail.com



Citation: Figueroa-DePaz, Y.; Pérez-Villanueva, J.; Soria-Arteche, O.; Martínez-Otero, D.; Gómez-Vidales, V.; Ortiz-Frade, L.; Ruiz-Azuara, L. Casiopeinas of Third Generations: Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity and Structure–Activity Relationships of Mixed Chelate Compounds with Bioactive Secondary Ligands. *Molecules* **2022**, *27*, 3504. <https://doi.org/10.3390/molecules27113504>

Academic Editor: João D. G. Correia

Received: 29 April 2022

Accepted: 27 May 2022

Published: 30 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Casiopeinas are a family of copper(II) coordination compounds that have shown an important antineoplastic effect and low toxicity in normal cells. These compounds induce death cells by apoptosis through a catalytic redox process with endogenous reducing agents. Further studies included a structural variation, improving the activity and selectivity in cancer cells or other targets. In the present work we report the third generation, which contains a bioactive monocharged secondary ligand, as well as the design, synthesis, characterization and antiproliferative activity, of sixteen new copper(II) coordination compounds with curcumin or dimethoxycurcumin as secondary ligands. All compounds were characterized by elemental analysis, FTIR, UV-Vis, magnetic susceptibility, mass spectra with MALDI-flight time, cyclic voltammetry, electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and X-ray diffraction. Crystallization of two complexes was achieved in dimethylsulfoxide (DMSO) with polar solvent, and crystal data demonstrated that a square-based or square-base pyramid geometry are possible. A 1:1:1 stoichiometry (diimine: copper: curcuminoid) ratio and the possibility of a nitrate ion as a counterion were supported. ¹H, ¹³C NMR spectra were used for the ligands. A sulforhodamine B assay was used to evaluate the cytotoxicity effect against two human cancer cell lines, SKLU-1 and HeLa. Electronic descriptors and redox potential were obtained by DFT calculations. Structure–activity relationships are strongly determined by the redox potential ($E_{1/2}$) of copper(II) and molar volume (V) of the complexes. These compounds can be used as a template to open a wide field of research both experimentally and theoretically.

Keywords: metallodrugs; Casiopeinas; copper; curcumin; dimethoxycurcumin; cytotoxic activity; redox potential; DFT

1. Introduction

Historically, design of coordination compounds has led to the synthesis, characterization and biological evaluation of new molecules. In this sense, rare earth [1] and transition metals [2–5], as a structural part of the molecule, are used for different purposes. Prominent examples include the ability to participate in enzymatic and redox processes [6,7] and interactions with various biological targets for specific biological activity. The design of new

molecules has addressed various pathologies, such as Alzheimer's disease [8], Parkinson's disease [9] and cancer [10], to name a few.

According to the World Health Organization (WHO) [11], in 2020, almost 10 million people worldwide are estimated to have died from cancer, both men and women, making cancer the second leading cause of death from non-communicable disease (NCD). Therefore, research groups have focused on the design of coordination compounds with good biological activity and selectivity against different types of cancer. Cisplatin [12] is a well-known coordination compound that is already commercialized, and its derivatives, such as carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin and lobaplatin, are used clinically for the treatment of many types of cancer, such as prostate and colorectal cancer [13]. However, these treatments present severe side effects, including peripheral neuropathies, immunosuppression, nephrotoxicity and ototoxicity, among others [12].

Casiopeinas has emerged as an alternative to improve biological activity with respect to commercial compounds and reduce or eliminate adverse effects. Casiopeinas were synthesized for the first time in 1987 [14,15] as mixed chelate copper(II) compounds presenting an essential metal, given their presence in the body, as well as ligands that modify the redox properties of the metal; these follows a general molecular formula, $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ and $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, where N-N is 2,2'-bipyridines or 1,10-phenanthrolines with or without substituents (primary ligands), O-O is acetylacetonate or salicylaldehydes and N-O can be aminoacidates or peptidates (secondary ligands). Casiopeinas have shown good cytotoxic activity against several cancer cell lines and antineoplastic activity in vitro and in vivo [16,17]. Several mechanisms of action have been proposed to explain these activities, including genotoxicity as a result of DNA interaction [18,19] and overproduction of reactive oxygen species (ROS) [20,21] mediated by endogenous reducers [22] and mitochondrial imbalance [23,24]. On the contrary, it has been shown that Casiopeinas do not present considerable cytotoxic effects in normal cells, which highlights them as potential antitumor agents; in fact, one molecule is already being tested in a clinical phase 1 trial in Mexico.

Due to favorable biological results presented by Casiopeinas against cancer line cells, a quantitative structure-activity relationship (QSAR) study [25] was implemented wherein it was observed that first, the phenanthroline ligand increases the biological activity of these molecules and, second, redox potential is related to their cytotoxic activity and is regulated by the secondary ligand (N-O and O-O). In view of these observations, we designed a third generation of Casiopeinas with a bioactive substance used as a second ligand. Our hypothesis is that the addition of bioactive molecule will increase the antiproliferative activity against various lines of cancer. More interestingly, we chose curcumin as a secondary ligand. Curcumin is a heptanoid compound and the principal bioactive substance presented in a perennial herb known as *Curcuma longa* [26].

The structure of curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dione) contains an α,β -unsaturated diketonic group. It can be used a polydentate ligand to chelate metals such as copper(II). On the other hand, curcumin exhibits a wide spectrum of biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant [27], antiviral [28], antimicrobial [29] and anticancer activity [30–32]. Furthermore, beneficial activity has been observed against various neurodegenerative pathologies, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease [33], which makes curcumin a possible treatment. However, oral administration of curcumin has been highlighted as a major problem, and its bioavailability is low due poor gastrointestinal absorption, fast elimination and low aqueous solubility in systemic circulation [34,35]. Curcumin is of particular interest in the pharmaceutical field because of its low toxicity; phase 1 studies show that it is not toxic in humans, even at high doses of 8 g/day, and evidence its chemotherapeutic effects [31].

The low aqueous solubility, as well as the chemical and metabolic instability, of curcumin [36] has led to the synthesis of curcumin analogs in order to increase its solubility [37] and improve its bioavailability. An example of this is dimethoxycurcumin [38], a dimethoxylated analog in -ortho and -para position with respect to the heptanoic chain;

studies have shown that its cytotoxic activity against cell lines (such as SKLU-1, HCT-15 and K562, among others) is increased with relative to curcumin [37,39], as well as improvement in terms of water solubility and polar solvents (MeOH, EtOH). Another way to improve the bioavailability of curcumin is to generate coordination compounds with curcumin or analogs (curcuminoids). In fact, there are homoleptic and mixed metal compounds with metals such as Zn [40,41], Mg [39,42], Gd [43–45], Fe [46], Ni [47] and Cu [48–51]; however, characterization of such metal complexes by X-ray is scarce due to their low solubility.

Therefore, the main objective of this work is to synthesize, characterize and evaluate third-generation Casiopeinas in vitro, i.e., ternary copper(II) compounds, with bipyridines and phenanthrolines substituted with different numbers of methyl groups as first ligands and a bioactive substance (curcumin or dimethoxycurcumin) as secondary ligands to increase curcumin's solubility and improve biological activity and selectivity against cancer cell lines compared to drugs for clinical use. Additionally, several DFT studies were carried out to obtain electronic descriptors, such as molar volume (V), electron affinity (EA), ionization energy (IE) and half-wave potential ($E_{1/2}$) to search for structure–activity relationships. The results presented here can generate physicochemical studies, in vitro and in vivo evaluations or studies to determine the mechanism of action of this type of compound.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of Curcumin (L1) and Dimethoxycurcumin (L2) Ligands

L1 and L2 were synthesized by condensation of a benzaldehyde molecule with acetylacetone (acac) under an N_2 atmosphere. Heptanoids were obtained in moderate yields. The structures of heptanoids were confirmed by melting points, elemental analysis, FT-IR and mass spectra. 1H , ^{13}C NMR data of curcumin and dimethoxycurcumin indicate both molecules exist almost in the enol form in solution, for which the spectrum in DMSO- d_6 (Figures S1–S7) displays singlets at 16.40 and 16.29 ppm. These protons are involved in an intramolecular hydrogen bridge, and the methine proton exhibits one singlet at 6.06 and 6.11 ppm, respectively, in accordance with the structure shown in Figure 1. Curcumin is less soluble in water, methanol and ethanol than dimethoxycurcumin, but both compounds are fairly soluble in DMSO and DMF. UV-vis spectrophotometric analysis of L1 and L2 solutions showed a maximum at 428 and 436 nm, respectively (63,288 and 31,485 L/mol·cm).

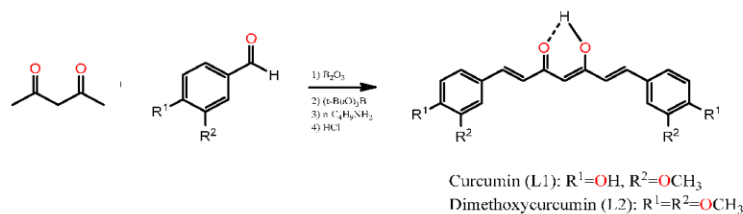


Figure 1. Synthesis of curcumin (L1) and dimethoxycurcumin (L2).

2.2. Synthesis and Characterization of Copper Complexes $[Cu(Dn)(L1)]NO_3$ and $[Cu(Dn)(L2)]NO_3$

Sixteen novel ternary heteroleptic complexes of copper(II) of diimine with curcumin or dimethoxycurcumin were synthesized and characterized by elemental analysis, FTIR, conductivity, susceptibility, UV-vis, MALDI-MS and cyclic voltamperometry. Substituents of bipyridine or phenanthroline codes are show in Figure 2. All coordination compounds of copper(II) are slightly more soluble than free ligands (curcumin and dimethoxycurcumin) in water, methanol and ethanol and fairly soluble in DMSO and DMF. Therefore, we chose dimethylsulfoxide as solvent to ensure complete solubility of each compound and performed homogeneous characterization.

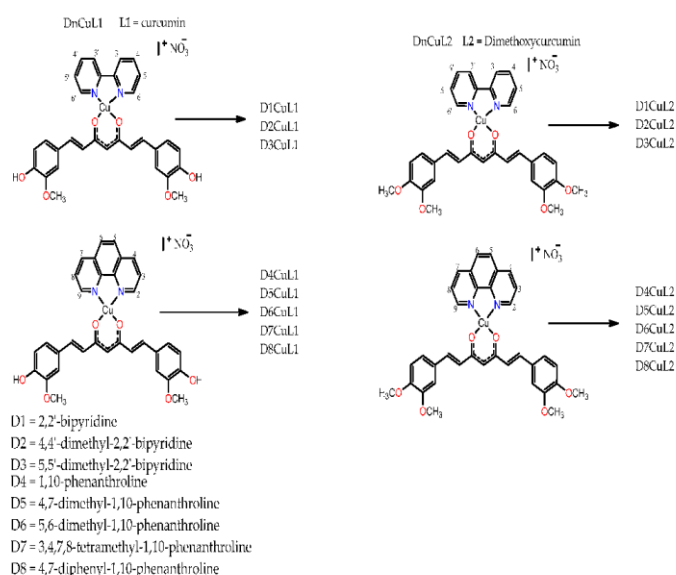


Figure 2. Structure of the studied mixed chelate copper(II) compound.

2.2.1. Molar Conductivity, Magnetic Moments and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy

According to Greenwood [52], molar conductivity values in the range of 50–70 μS are common in type 1:1 electrolytes in DMSO at 25 $^{\circ}\text{C}$; these values are widely used in the literature. The only compound that showed a value in this range is D6CuL1 (59.1 μS), which indicates that it is a 1:1 electrolyte. However, most compounds presented values within the range of 23.2–37.4 μS ; these values are below those reported by Greenwood. Low molar conductivity does not necessarily mean that complexes are not ionic species; in fact, all molecules conduct electricity but only moderately, suggesting that the ionic nature of type 1:1 electrolytes is weak, and in solution, the nitrate ion acts as a counterion. We propose that these results indicate that a small fraction of the compound presents dissociation. On the other hand, values lower than 50 μS could be explained by the low ionic mobility of the complex cation entity with +1 charge, which could be the cause of the low observed electrolytic conductivity. Geary [53] reported data showing coordination complexes with low electrical conductivity values (35 μS). These results are interesting because although there are reports of the synthesis of mixed copper(II) coordination compounds that contain curcumin or analogs within their structure, it is not common for authors to use this technique for their characterization. There are few reports of the molar conductivity values of mixed copper(II) compound in water [54] or DMF [55–57]. On the other hand, there are conductivity reports for some copper(II) coordination compounds wherein non-ionic complexes were obtained and electrical conductivity data in DMSO were reported, with values between 6 and 11 μS , which indicates that these are non-electrolyte species [58]. Therefore, our compounds show a small dissociation of an NO_3^- counterion.

Magnetic susceptibility values of the complexes allow for determination of the effective magnetic moment (μ_{eff}) [59]. Most of the coordination compounds exhibited values between 1.79 and 2.3 BM, corresponding to the one unpaired electron characteristic of paramagnetic molecules that contain copper(II) of configuration d^9 , whereas five coordination compounds with curcumin as secondary ligand showed low values of μ_{eff} due to

antiferromagnetic coupling between two unpaired electrons in each copper atom of two different molecules.

In general, the solid-state EPR spectra of mixed chelated copper(II) coordination compounds exhibited axial symmetry, which is typical of a d^9 configuration in a fundamental state with hyperfine and superhyperfine couplings (Figure 3). The g values calculated for the studied copper(II) complexes are within the range of 2.04–2.09 (Table S1), as $g_{\parallel} > g_{\perp}$, which is consistent with an unpaired electron in the dx^2-dy^2 orbital, i.e., coordination geometries corresponding to a square planar or square-based pyramid [60,61]. Values of $g_{\parallel} < 2.3$ suggest a covalent environment [62] around for the copper in the complexes and that heteroatoms of ligands (diimine and heptanoids) interact strongly with copper atoms.

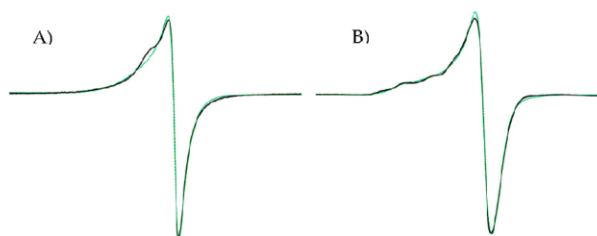


Figure 3. EPR spectra. (A) Complexed D7CuL1 and (B) complexed D6CuL2.

2.2.2. Infrared Spectra

The characteristic bands of curcumin include the O–H stretching vibration of the phenol group observed at 3438 cm^{-1} , a band at 1628 cm^{-1} due to the intramolecular hydrogen bond of the enol and a band at 1510 cm^{-1} assigned to the C=C stretching vibration of the vinyl bond. Dimethoxycurcumin shows a similar spectrum to that of curcumin; the difference is that the stretching vibration band of methyl and methylene groups at 2946 cm^{-1} is more evident because a proton is exchanged for a methyl group. On the other hand, the modifications observed in the spectra of all mixed coordination compounds are very similar. The most considerable difference is in the displacements observed in the vibration band (C=O) with respect to secondary ligands (1627 cm^{-1}) described below. A band was found between 1576 and 1599 cm^{-1} corresponding to the C–O vibration in the enol, which indicates that coordination of the ligands with the metal occurred. A new band at 1384 cm^{-1} was found in the spectrum of coordination compounds corresponding to the nitrate group as a counterion. Other bands appeared around 478 cm^{-1} due to M–O vibration, suggesting that the interaction between copper and oxygen atoms of β -diketone is involved in the coordination sphere.

2.2.3. UV-Vis Spectrophotometric Analysis

UV-vis absorption spectra of ligands L1 and L2 showed a main band at 424 nm and 427 nm , respectively, due to $n-\pi^*$ transitions corresponding to charge transfer effects (Figure 4A). Bands at 260 and 266 nm are assigned to $\pi-\pi^*$ transitions of the aromatic ring; however, these bands are not evident at the low concentrations used to maintain absorbance values below 1 to employ the Beer-Lambert law and calculate the molar extinction coefficients. In coordination compounds, the electronic spectrum always exhibits three bands (Table 1); for this reason, we will only discuss one compound from each family of complexes (Figure 4A). The first band occurs at $266\text{--}321\text{ nm}$ because $\pi-\pi^*$ transitions are mediated by the contribution of the aromatic rings of curcuminoids, as well as the addition of aromatic rings of diimine. The second absorption maximum (λ_{max}) in the range of $428\text{--}436\text{ nm}$ was attributed to the ligand–metal charge transfer due to the bathochromic shift with respect to λ_{max} of curcumin, indicating coordination of the carbonyl group of secondary ligands to copper atoms. It is worth mentioning that these transitions are not

those of maximum absorption for D8CuL1 and D8CuL2 compounds, as these transitions have phenyl groups that increased the absorbance of the $\pi\text{-}\pi^*$ transitions (Figure 4A). The third band is observed at values between 448 and 460 nm and can be assigned to metal charge transfer, evidencing an electronic π -backbonding (Figure 4A). The extinction coefficients for the copper(II) complexes are high values, as they are totally allowed by Laporte and spin, giving rise to more intense absorptions, unlike the d-d transitions, which are prohibited by Laporte and generate broad bands as a result of the combination of the three allowed transitions for a square-based pyramid geometry in the region of 555–665 nm (Figure 4B,C), where a water molecule can be coordinated in the axial positions of copper. However, square-based geometry (600–700 nm) is also possible, as water molecules may not coordinate to the copper atom, as observed in the obtained monocystals.

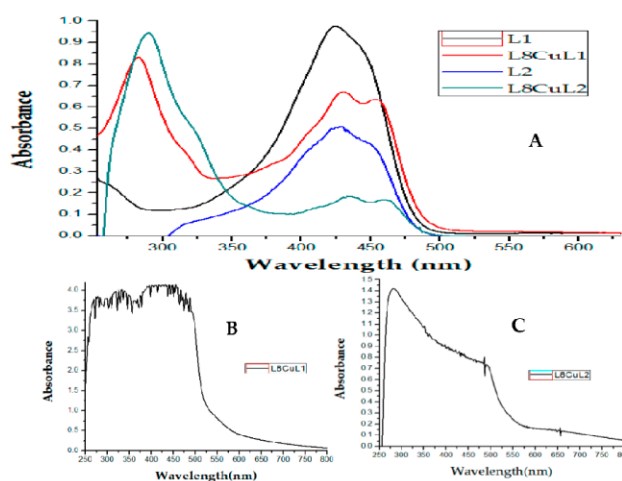


Figure 4. (A) Electronic absorption spectra of L1 (15 μM), L2 (15 μM), D8CuL1 (15 μM) and D8CuL2 (15 μM); (B) d-d transitions for D8CuL1 (2 mM); (C) d-d transitions for D8CuL2 (2 mM).

Table 1. UV-vis spectral band assignments and molar extinction coefficient (ϵ) of ligands and copper complexes.

Compound	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	ϵ	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	ϵ	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	ϵ
	$\pi\text{-}\pi^*$		TCLM		TCML	
D1CuL1	294	31,451	430	64,287	454	62,853
D2CuL1	292	22,776	430	42,317	454	41,947
D3CuL1	304	28,563	426	36,928	448	33,804
D4CuL1	266	48,706	430	57,630	454	56,402
D5CuL1	268	51,897	430	59,041	454	56,908
D6CuL1	276	42,400	428	35,698	452	32,659
D7CuL1	274	34,157	432	33,142	456	32,775
D8CuL1	282	53,109	430	42,733	454	40,475
D1CuL2	313	22,461	430	24,832	458	23,216
D2CuL2	310	25,161	430	23,350	458	21,809
D3CuL2	321	17,513	430	20,741	458	19,205
D4CuL2	275	42,754	433	33,220	458	30,807
D5CuL2	276	52,001	433	34,631	458	32,386
D6CuL2	284	44,217	433	33,226	458	31,128
D7CuL2	282	49,471	433	32,936	458	30,671
D8CuL2	290	53,569	436	11,448	460	10,582

2.2.4. Mass Spectra

Mass spectroscopic analysis of L1 and L2 ligands ($[\text{Ligand} + \text{H}]^+$) showed a molecular ion peak at m/z of 369 and 397, respectively, for the last the molecular ion, as well as the base peak, suggesting that the obtained molecule is found in greater abundance; therefore, our purification method is efficient, despite the low synthesis yields. The Table 2 shows the theoretical and obtained molecular ion peaks of copper(II) coordination compounds; the theoretical copper isotopic patterns are in agreement with the experimental results.

Table 2. Mass spectral data (m/z) of ligands and copper(II) complexes.

Compound	Molecular Weight (g/mol)	Molecular Ion (Theoretical m/z)	Molecular Ion (Obtained m/z)
Curcumin (L1)	368.37	368	369.2
[Cu(2,2'-bipyridine)(curcumina)]NO ₃ (D1CuL1)	649.01	586.1	586.9
[Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(curcumin)]NO ₃ (D2CuL1)	695.17	614.4	615.0
[Cu(5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(curcumin)]NO ₃ (D3CuL1)	695.17	614.4	614.0
[Cu(1,10-phenanthroline)(curcumin)]NO ₃ (D4CuL1)	673.12	610.1	610.9
[Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(curcumin)]NO ₃ (D5CuL1)	719.19	638.1	638.0
[Cu(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(curcumin)]NO ₃ (D6CuL1)	701.18	638.1	638.0
[Cu(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(curcumin)]NO ₃ (D7CuL1)	747.24	666.1	667.1
[Cu(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)(curcumin)]NO ₃ (D8CuL1)	825.32	762.1	762.1
Dimethoxycurcumin (L2)	396.43	396.4	397.7
[Cu(2,2'-bipyridine)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D1CuL2)	677.16	614.1	615.3
[Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D2CuL2)	723.22	642.1	643.2
[Cu(5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D3CuL2)	723.22	642.1	642.1
[Cu(1,10-phenanthroline)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D4CuL2)	737.21	638.1	638.0
[Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D5CuL2)	729.23	666.1	668.2
[Cu(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D6CuL2)	729.23	666.1	668.2
[Cu(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D7CuL2)	757.28	694.2	696.1
[Cu(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)(dimethoxycurcumin)]NO ₃ (D8CuL2)	853.37	790.2	791.5

For many molecules, it was observed that the molecular ion corresponds to the base peak; these data suggest that the most predominant species is the complex cation of copper(II) ($[\text{DnCuLn}]^+$) (Figures S8–S15), which is formed by loss of the counterion (NO₃). On the other hand, the results confirm that the stoichiometry of the copper(II) coordination compounds is 1:1:1 (diimine: Cu: secondary ligand), as determined by elemental analysis.

In addition, all coordination compounds with curcumin as secondary ligand exhibited m/z data, which represent the complex fragments without one or two –OH or –OMe groups over the aromatic rings of curcumin. The same behavior was observed for all complexes with dimethoxycurcumin with the loss of 2 or 4 –OMe groups. Figure 5 shows the behaviors described above for D4CuL2; the peak at m/z of 638 is assigned to molecular ion $[\text{D4CuL2}]^+$, and the peaks at m/z 582 and 522 are assigned to the fragment of the molecule that loses 2 or 4 –OMe groups, respectively.

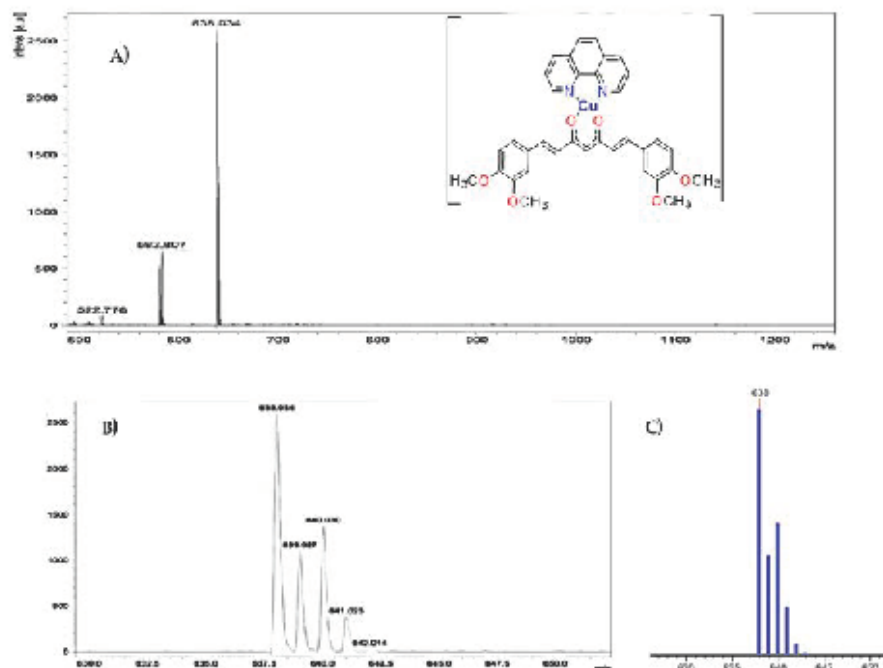


Figure 5. (A) MALDI-TOF mass spectra of [L4CuL2]⁺; (B) calculated isotopic spectral pattern of complex; theoretical and (C) isotopic spectral patterns.

2.2.5. Cyclic Voltammetry Measurements

In this work, the electrochemical behavior of curcuminoids (L1 and L2) was compared with that of copper(II) complexes using DMSO as solvent. All cyclic voltammograms were obtained from open-circuit potential in the negative direction using a potential range of -1.5 – 1.5 V. Ligands showed a reduction signal I_c at -0.978 V for curcumin (Figure 6A) and -1.05 V for dimethoxycurcumin (Figure 6B). When the scan rate was increased, an oxidation process I_o was observed (Figure 6A), which is typical for an EC_i mechanism associated with the reduction C=O moieties, similar to quinone molecules ($R-COCHCO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow R-COHCHCOH-R$) [63]. Furthermore, curcumin showed a broad oxidation peak I_a at 0.488 V, which is generally assigned a redox process with a slow electrode kinetic associated with phenol oxidation [64,65]. L2 did not show this oxidation process due to the change from $-OH$ to $-OCH_3$, which is the main structural difference between these ligands. An inversion study was carried out to correctly associate each redox process for curcuminoids (Figures S16 and S17).

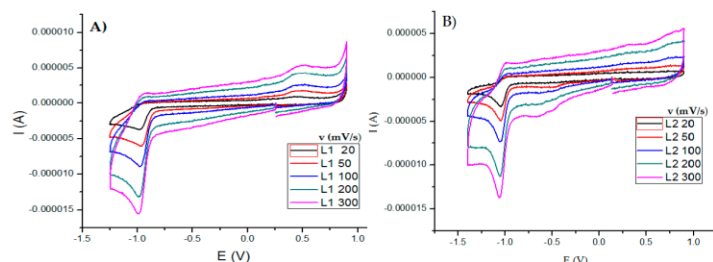


Figure 6. Cyclic voltammograms for 0.001 M ligands in DMSO with 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate. (A) Curcumin and (B) dimethoxycurcumin. Scan rates in the range of 20–300 mV/s. All experiments were referenced to the pair Fc^+/Fc .

All cyclic voltammograms of the copper(II) coordination compounds with L1 and L2 are similar to one another; therefore, we will discuss the results of L2CuL1 and L4CuL2 compounds as an example. In general, all complexes exhibited two similar behaviors first; results show that the reduction of ligands does not take place in the complexes due to the coordination with copper; this fact is important because it suggests that generating copper(II) coordination compounds avoids the autoxidation and degradation [36,65] of free ligands, which has been observed in *in vivo* pharmacokinetic studies [34]. Second, two signals resulting from the metal reduction process were observed. Figure 7A shows that the L2CuL1 voltammogram of the first process (Ia) at -0.484 V is caused by the copper(II) reduction in the compound ($\text{CuII} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{CuI}$), and the second process (IIa) at -0.739 V is assigned to the reduction of the copper(I) species generated in the first process (Ia) towards the formation of copper(0). Signal Ib at 0.023 V is associated with copper(I) oxidation ($\text{CuI} \rightarrow \text{CuII} + 1\text{e}^-$). Inversion studies allowed signal Ia to be associated with Ib. Epa, Epc and ΔE were determined at a speed of 100 mV/s (Figure 7B).

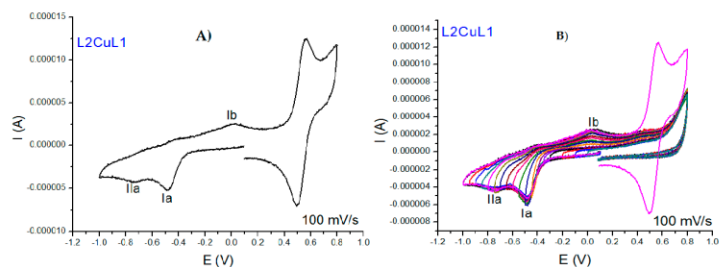


Figure 7. Cyclic voltammograms for 0.001 M of L2CuL1 in DMSO with 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate. (A) voltammograms at 100 mV/s and (B) inversion study at 100 mV/s. All the experiments were referenced to the pair Fc^+/Fc .

Although we have mentioned that the electrochemical behavior is similar for all the compounds studied in this work, it is important that both cathodic peaks are more evident in the family of coordination compounds with L2 (Figure 8A), and the peaks shift to different potentials due to substituents on the aromatic rings of the diimines. Figure 8A shows the L4CuL2 voltammogram, where a cathodic peak at -0.373 V is ascribed to the reduction of the copper atom ($\text{CuII} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{CuI}$), and a second cathodic peak at -0.708 V is associated with the reduction of the copper(I) species to form copper(0) ($\text{CuI} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{Cu0}$). Three anodic peaks (IIIb, IIb and Ib) appearing at -0.364 V, -0.111 V and 0.168 V (Figure 8B), respectively, can be associated to the redissolution of copper(0) species or to

the adsorption of ligands being released in the formation of a Cu(0) deposit. Anodic and cathodic processes were associated by inversion studies (Figure 8B).

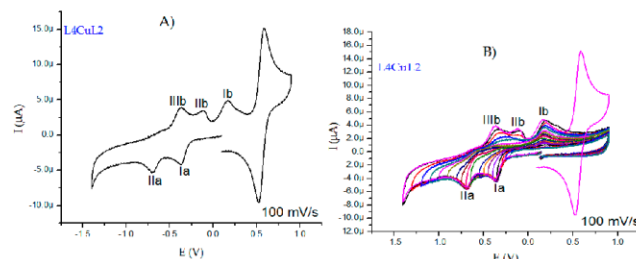


Figure 8. Cyclic voltammograms for 0.001 M of L4CuL2 in DMSO with 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate. (A) Voltammograms at 100 mV/s and (B) inversion study at 100 mV/s. All the experiments were referenced to the pair Fc^+/Fc .

The process related to the biological activity of the coordination compound of copper(II) is the reduction of Cu(II) to Cu(I) and the reoxidation of Cu(I) to Cu(II) [65]; therefore, the determination of parameters such as E_{pa} , E_{pc} , ΔE and $E_{1/2}$ were terminated only for those processes (Table 3). The separation between E_{pc} and E_{pa} is greater than 60 mV; hence, it was determined that the complexes present a quasi-reversible behavior, i.e., the electronic transfer is slow and is not controlled by the diffusion. This behavior can be attributed to the change in geometry around the metallic center; an example is when a Cu(II) compound with square-based pyramidal geometry changes to a Cu(I) compound with a tetrahedral geometry.

Table 3. Summary of cyclic voltametric parameters for copper(II) coordination compounds.

Compound	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	ΔE (V)	$E_{1/2}$ (V) (Fc^+/Fc)
L1	−0.978	0.488	1.467	---
D1CuL1	−0.429	0.130	0.560	−0.668
D2CuL1	−0.484	0.023	0.507	−0.758
D3CuL1	−0.474	0.067	0.542	−1.164
D4CuL1	−0.407	0.140	0.547	−0.665
D5CuL1	−0.440	0.123	0.563	−0.712
D6CuL1	−0.611	−0.04	0.571	−0.705
D7CuL1	−0.405	0.154	0.560	−0.679
D8CuL1	−0.491	0.126	0.617	−0.657
L2	−1.05	---	---	---
D1CuL2	−0.444	0.139	0.623	−0.656
D2CuL2	−0.469	0.117	0.586	−0.709
D3CuL2	−0.390	0.162	0.552	−0.656
D4CuL2	−0.373	0.168	0.541	−0.656
D5CuL2	−0.447	0.088	0.535	−0.701
D6CuL2	−0.388	0.158	0.546	−0.682
D7CuL2	−0.396	0.096	0.492	−0.690
D8CuL2	−0.171	0.122	0.293	−0.559

In general, coordination compounds with L1 show more negative half-wave potentials and are therefore more easily oxidized compared to coordination compounds with L2 (Table 3). This suggests the possibility that curcumin presents an autoxidation process [65], allowing copper to act as the reducing agent. In coordination compounds with bipyridine, there is an increase in the electron density on the copper atom, so it is difficult for it to gain

one electron (more negative values). Complexes with phenanthroline facilitate charge distribution on the aromatic rings and not close to the metal center, so copper could gain one electron (less negative values).

2.2.6. X-ray

Obtaining single crystals of mixed chelate copper(II) coordination compounds with curcuminoids as ligands is complicated due to the low solubility of the complexes, with few reports in the literature [39,66,67]. Small crystals of the analogous complexes D5CuL2 and D6CuL2 were obtained (Figures 9 and 10). The sample was left undisturbed for crystallization at room temperature. X-ray diffraction analysis of D5CuL2 (Figure 9) shows that the metal center of copper(II) is four-coordinated with a square planar geometry. Figure 10 shows that the Cu(II) ion has a five-coordinate square-based pyramid geometry with a t at 0.04. Selected bond distances and angle parameters for D5CuL2 and D6CuL2 are listed in Table 4.

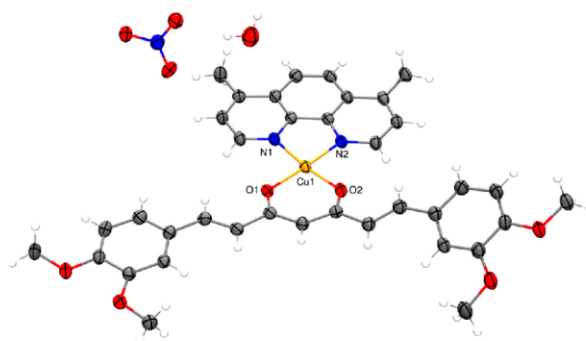


Figure 9. Molecular structure of complex D5CuL2 with displacement ellipsoids at 50% probability level.

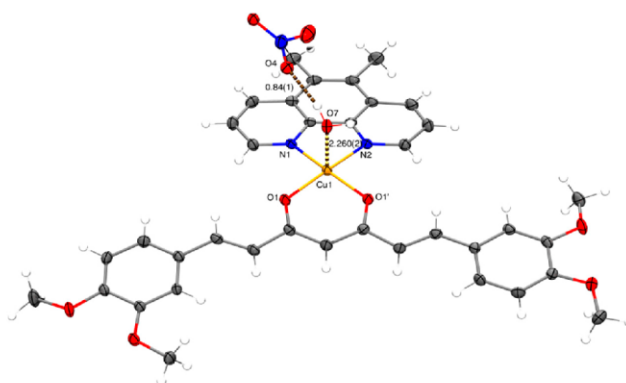


Figure 10. Molecular structure of complex D6CuL2 with displacement ellipsoids at 50% probability level.

Table 4. Selected bond lengths (Å) and angles (°) for compounds D5CuL2 and D6CuL2.

Compound	Bond Atom-Atom (Å°)	Lengths	Bond Atom-Atom (Å°)	Angles (°)
D5CuL2 square planar geometry	Cu-N1	1.977	O1-Cu-O2	94.68
	Cu-N2	1.993	N1-Cu-N2	81.84
	Cu-O1	1.906	O1-Cu-N1	92.37
	Cu-O2	1.886	O2-Cu-N2	89.45
	Cu-O (H ₂ O)	5.456	O1-Cu-N2	168.51
	Cu-O (NO ₃)	6.582	O2-Cu-N1	166.09
D6CuL2 square-based pyramid geometry	Cu-N1	2.013	O1-Cu-O2	94.68
	Cu-N2	2.022	N1-Cu-N2	81.84
	Cu-O1	1.921	O1-Cu-N1	92.37
	Cu-O2	1.911	O2-Cu-N2	89.45
	Cu-O (H ₂ O)	2.260	O1-Cu-N2	168.51
	Cu-O (NO ₃)	4.958	O2-Cu-N1	166.09

The similarities include that the obtained crystals are that the four methoxy groups on the rotationally free phenyl rings point in opposite directions, which was also reported by Pucci [68]; and that the nitrate ion always acts as the counter ion, as confirmed by FTIR. It is probable that water or solvent molecules coordinate with the copper ion in solution and generate square-based pyramidal geometries because of the dynamic nature of the system. CCDC numbers of D5CuL2 and D6CuL2 complexes contain the supplementary crystallographic data presented in this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (accessed on 28 April 2022) (from CCDC-2169382 and CCDC-2169383).

2.3. Biological Assays

It is important to generate new molecules to identify a candidate that can be used for the treatment of cancer in order to reduce/eliminate side effects, drug resistance and poor bioavailability. In vitro data obtained by proliferation assays provide useful initial information on the cytotoxicity of the agents in different cell lines.

Cytotoxicity Activity

The secondary ligands and coordination compounds were tested against SKLU-1 (human lung adenocarcinoma) and HeLa (human epithelial cervical carcinoma) cell lines. Table 5 shows the data of the inhibitory concentration 50 (CI₅₀) values. Free ligands exhibit important cytotoxicity activity against the cell lines; however, the studied metal complexes show significantly higher activity against the same cell lines. These data suggest that generating copper coordination compounds improves cytotoxicity activity; this department has been studied in several mixed chelate complexes with curcumin [50], dimethoxycurcumin [39] and analogs [67], suggesting that solubility and stability in biological media must be the main factors. We propose that redox potential plays an important role.

In general, it is also observed that molecules that contain phenanthroline as a primary ligand are more active than coordination compounds that contain bipyridines. Additionally, compounds with substitutions with methyl groups at positions -5,6 are slightly more active than those with methyl groups at positions -4,7; this effect was observed by Chikira [68–71], who suggested that the effect could be due to interaction with DNA, as substituents in positions -4 or -7 decreased the association between the copper(II) compounds and DNA. On the other hand, it appears that the higher the molecular weight, the more active the coordination compounds; however, tetramethylated and diphenylated compounds are less active than dimethylated compounds; this phenomenon may be due to the fact that such molecules are more lipophilic and their crossing through the cell membrane is different, so activity decreases. Interestingly, in this work, the D1CuL1 compound did not show a cytotoxic effect against the tested HeLa cell lines; this led to further evaluations in different

cancer cell lines to determine whether this molecule can present selectivity for lung-type cell lines.

In general, the copper(II) coordination compounds synthesized in this work show an improvement in biological activity compared to the first-generation Casiopeinas (Table 5) that contain the secondary ligand acetylacetonate (acac), which is the feedstock used to obtain the L1 and L2 heptanoids. This suggests that increasing the aliphatic chain and adding aromatic rings at the end of the chain improves this biological activity; however, third-generation Casiopeinas are less soluble in water. Previous reports mention that in first-generation Casiopeinas with different amino acids, the hydrophobicity of the ligands increases the cellular uptake of copper(II) in vitro [72]. Hydrophobic properties become more important, directly influencing biological activity, and are a descriptor in the transport of the drug to the site of action [73,74].

Table 5. Cytotoxicity assays for secondary ligands and complexes with L1 and L2 against SKLU-1 and HeLa cell lines.

Compound	IC ₅₀ SKLU-1 (μM)	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ HeLa (μM) of First-Generation Casiopeinas
L1	52.56 ± 2.1	50.44 ± 2.3	-
D1CuL1	41.53 ± 0.5	N/A	42 ± 3.1 [25]
D2CuL1	14.36 ± 0.8	26.49 ± 0.7	41.7 ± 0.31 [75]
D3CuL1	8.90 ± 0.2	35.78 ± 0.7	-
D4CuL1	5.29 ± 0.9	7.61 ± 0.6	10.7 ± 0.9 [25]
D5CuL1	2.68 ± 0.2	1.91 ± 0.8	3.2 ± 0.03 [75]
D6CuL1	2.60 ± 0.5	2.21 ± 0.5	2.83 ± 0.09 [75]
D7CuL1	4.48 ± 1.5	4.48 ± 0.5	2.37 ± 0.4 [75]
D8CuL1	6.25 ± 0.9	6.74 ± 0.5	4.2 ± 0.6 [25]
L2	56.58 ± 1.8	109.05 ± 0.5	-
D1CuL2	21.82 ± 0.4	44.62 ± 1.1	42 ± 3.1 [25]
D2CuL2	9.49 ± 1.3	37.6 ± 1.9	41.7 ± 0.31 [75]
D3CuL2	6.84 ± 1.1	30.56 ± 2.5	-
D4CuL2	4.56 ± 0.6	13.26 ± 1.5	10.7 ± 0.9 [25]
D5CuL2	1.22 ± 0.1	2.01 ± 0.0005	3.2 ± 0.03 [75]
D6CuL2	1.19 ± 0.007	1.78 ± 0.1	2.83 ± 0.09 [75]
D7CuL2	2.68 ± 0.1	1.2 ± 0.05	2.37 ± 0.4 [75]
D8CuL2	2.38 ± 0.3	2.07 ± 0.3	4.2 ± 0.6 [25]
Cisplatin	9.56	5.1 ± 0.4 [25]	42 ± 3.1 [25]

2.4. Structure–Activity Relationships

Biological structure–activity relationships are a useful tool to describe or predict biological behavior according to structural, electronic or experimental parameters. These relationships can lead to the rational design of new molecules with optimal physicochemical or electronic properties to enhance biological activity. However, a challenge associated with systems with a metallic center is that most of the time, the descriptors do not work when the metal is changed. This occurs for various reasons, such as the change in the geometries of the complexes or due to the lack of functionals that better describe this type of system.

It is necessary to identify parameters that elucidate whether there is a relationship between the structure/electronic properties and the cytotoxic activity of the copper(II) coordination compounds. The redox potential ($E_{1/2}$), molar volume (V), ionization energy (IE) and electron affinity (EA) were obtained computationally from a single-point calculation based on optimized geometries and from single-point calculations of anionic and cationic molecules, respectively (Table 6). Complexes of copper(II) structures were constructed assuming a square-based pyramid geometry with the crystal structure of CasIII-ia compounds as a template [76]. Surprisingly, computational model was in agreement with the distances and bond angles with the X-ray structures obtained in this work (Figures 9 and 10). On the other hand, the values obtained by the model (Figure 11) were close to the experimental

values, so the procedure to determine the theoretical redox potential is valuable, as it can be used in cases in which experimental results are unavailable.

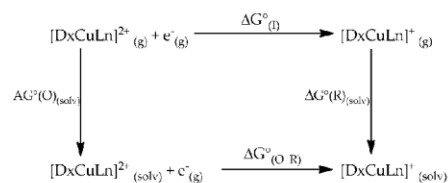


Figure 11. Born-Haber cycle used for the calculation of standard Gibbs free-energy change ($\Delta G^{\circ}_{\text{O|R}}$) of mixed chelate copper(II) complexes.

Table 6. Molar volume (cm^3/mol), ionization energy (IE), electron affinities (EA) and theoretical redox potential ($E_{1/2}$) for complexes under study.

Compound	Molar Volume (cm^3/mol)	IE (eV)	EA (eV)	$E_{1/2}$ (V)
D1CuL1	383.712	8.04749134	2.82789556	-0.878171
D2CuL1	462.274	7.99361656	2.76906755	-0.930038
D3CuL1	466.413	8.00534368	2.7998987	-0.872582
D4CuL1	410.031	8.10950385	2.87669331	-0.725702
D5CuL1	437.24	8.04221051	2.80906527	-0.749246
D6CuL1	417.529	8.07647188	2.85005565	-0.849173
D7CuL1	373.335	8.01205011	2.79094547	-0.907115
D8CuL1	492.824	8.07950481	2.86419938	-0.873203
D1CuL2	451.839	8.07429826	2.84794598	-0.836537
D2CuL2	450.172	8.01993014	2.78888151	-0.858569
D3CuL2	386.932	8.03231631	2.82004192	-0.840938
D4CuL2	393.699	8.13593635	2.8959002	-0.728105
D5CuL2	422.974	8.06659075	2.82811977	-0.809915
D6CuL2	466.821	8.10139715	2.86922906	-0.782915
D7CuL2	545.631	8.03569891	2.8086884	-0.799709
D8CuL2	536.71	8.09949401	2.87311289	-0.452801

Although there is a large set of 16 complexes that have structural similarities, we decided to relate the parameters calculated for each family separately, that is, according to the secondary ligand. For the family of copper(II) coordination compounds with curcumin, the experimental redox potential ($E_{1/2}$) and molar volume were found to be adequate to describe the antiproliferative activity in the SKLU-1 tumor cell line (Figure 12). We determined that the more negative the half-wave potential, the greater the cytotoxic activity. The molar volume implies a better antiproliferative effect only for the compounds with bipyridine ligands; this phenomenon was first observed for copper and ruthenium complexes [77]. The family of copper(II) coordination compounds with dimethoxycurcumin did not show a relationship with any descriptor for the SKLU and Hela cell lines.

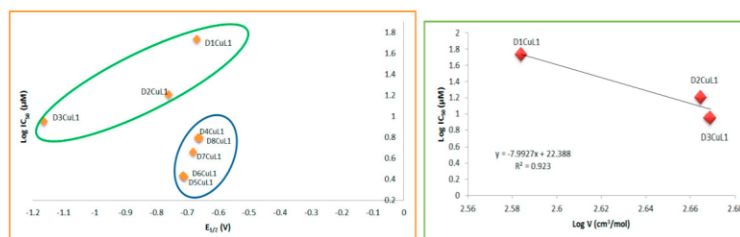


Figure 12. Relationship between molar volume or redox potential with antiproliferative activity of copper(II) coordination compounds with curcumin with Cl_{50} in SKLU-1.

A structure–activity relationship search was also performed using the IC_{50} values in HeLa cells for each family of compounds. For the family of copper(II) coordination compounds with curcumin, the experimental redox potential ($E_{1/2}$) was found to be suitable to describe antiproliferative activity (Figure 13). The most important results from structure–activity relationships studies are that redox potential and molar volume can explain the antiproliferative activity of the family of complexes with curcumin, suggesting that its mechanism of action could be due to an increase in ROS generation, causing oxidative stress similar to behavior of first-generation of Casiopeinas [24]. On the other hand, it was observed that the family of copper(II) coordination compounds with dimethoxycurcumin shows no relationship with any parameter discussed here. This observation does not suggest that the mechanism of action of these molecules is not via redox but that there is no mathematical relationship between these parameters. On the contrary, although copper(II) coordination compounds with dimethoxycurcumin can carry out redox processes, a relationship with biological activity was not observed in HeLa and SKLU-1. This suggests that their mechanisms of action could be interaction with DNA, which is also a molecular target of the first generation of Casiopeinas.

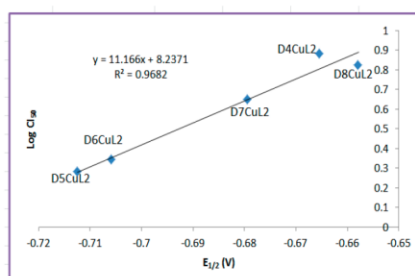


Figure 13. Relationship between redox potential and antiproliferative activity of copper(II) coordination compounds with curcumin with Cl_{50} in HeLa.

3. Materials and Methods

All 1,10-phenantrolines and 2,2'-bipyridines with different substituents, copper(II) nitrate hemipentahydrate ($Cu(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$), 2,4-pentanedione ($C_5H_8O_2$), 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde ($C_8H_8O_3$), 3,4-dimethoxybenzaldehyde ($C_9H_{10}O_3$), n-butylamine ($C_4H_{11}N$), tributyl borate ($C_{12}H_{27}BO_3$), boric acid (H_3BO_3), potassium bromide (KBr), TBAPF₆ ($C_{14}H_{27}NPF_6$), trizma buffer and sulforhodamine B were acquired from Sigma-Aldrich, and solvents employed to synthesize (A.R. grade) were purchased from Quimica Alvi (Ciudad de Mexico, Mexico). All reagents were used directly without further purifica-

tion. Penicillin-streptomycin and fetal bovine serum were purchased from GIBCO. DMEM-F12, trichloroacetic acid (TCA) and glacial acetic acid were purchased from J.T Baker.

3.1. Instrumentation

Elemental analyses of prepared compounds were performed with a Perkin-Elmer CHN 2400 elemental analyzer. Melting points ($^{\circ}\text{C}$) were determined in capillary Pyrex using an SMP30 Stuart scientific instrument. Infrared spectra were analyzed on a Nicolet AVATAR 320 FT-IR spectrophotometer using KBr pellets in an interval range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Magnetic moments of metal complexes were determined at room temperature on a magnetic susceptibility balance (Sherwood Scientific MKI, Cambridge UK) with the Gouy method. Ultraviolet-visible spectra (UV-vis) were obtained on a Hewlett Packard 5484 A UV-visible system diode array spectrophotometer in a range of 180 nm to 700 nm in dimethylsulfoxide (DMSO). Molar conductance of metal complexes was measured by a JENWAY 4330 conductivity-pH meter equilibrated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ using samples with final concentrations of 1 mM in DMSO. The spectra of EPR were measured in X-Band mode solid-state using a JEOL JES-TE300 spectrometer at a microwave frequency of 9.4 GHz and a center field of 300 mT at room temperature. The EPR spectra were simulated to obtain g_{\perp} , g_{\parallel} and hyperfine tensors using the EasySpin simulation package [78] for MATLAB R2019b. ^1H and ^{13}C NMR spectra of ligands were obtained on a Bruker Fourier 300 MHz and Bruker AVANCE III HD 700 MHz spectrometer using TMS (tetramethylsilane, Me_4Si) as internal standard. The solvent used was $\text{DMSO-}d_6$, which was acquired from Sigma-Aldrich. Mass spectra were recorded with a JEOL, SX 102 A spectrometer on a Bruker Microflex platform equipped with MALDI-flight time. Cyclic voltametric measurements were performed in DMSO using a PAR27 potentiostat/galvanostat with a conventional three-electrode array.

3.2. Syntheses of Ligands and Coordination Compounds

3.2.1. Syntheses of Ligands Curcumin (L1) and Dimethoxycurcumin (L2)

Ligands were synthesized using known procedures describe by Pabon, with a modification introduced by Soria [37], which involves an aldol condensation reaction of 2,4-pentanedione with 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde or 3,4-dimethoxybenzaldehyde to obtain curcumin (L1) and dimethoxycurcumin (L2), respectively (Figure 1). Pure 1,7-diarylheptanoid was obtained by column chromatography over silica gel (SiO_2) using a hexane/EtOAc (30:70 *v/v*) mixture as the eluent. The pure compound was recrystallized in a methanol–acetone mixture. Ligands were characterized by elemental analysis, melting point, UV-vis spectrophotometry, NMR (^1H and ^{13}C) and mass spectrometry.

Curcuma (L1): bright orange solid (50% yield); $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (368.37 g/mol); elemental analysis, %calculated (%found): C, 68.46 (68.78); H, 5.47 (5.49). m.p.: $174.6\text{ }^{\circ}\text{C}$; FT-IR (cm^{-1}): 3438 $\nu(\text{O-H})$, 1628 $\nu(\text{C=O})$, 1510 $\nu(\text{C=C})$, 2946 $\nu(\text{C-H})$, 1280 $\nu(\text{Ar-O})$; MALDI MS M^+ (m/z): 368 (369); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ 3.84 (s, 6H), 6.06 (s, 1H), 6.76 (d, 2H, $J = 15.85\text{ Hz}$), 6.83 (d, 2H, $J = 8.18\text{ Hz}$), 7.15 (dd, 2H, $J = 1.95, 8.31\text{ Hz}$), 7.32 (d, 2H, $J = 1.97\text{ Hz}$), 7.55 (d, 2H, $J = 15.87\text{ Hz}$), 9.67 (s, 2H), 16.41 (br s, 1H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ 56.15 (C-H), 56.09 (C-H), 101.30 (C-H), 111.82 (C_{aryl}), 116.17 (C_{aryl}), 121.55 (C_{aryl}), 123.58 (C_{vinyl}), 126.80 (C_{aryl}), 141.16 (C_{vinyl}), 148.45 (C_{aryl}), 149.81 (C_{aryl}), 183.66 (C=O).

Dimethoxycurcumin (L2): orange solid (33% yield); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_6$ (396.43 g/mol); Elemental analysis, %calculated (%found): C, 69.68 (69.41); H, 6.1 (6.12). m.p.: $129.9\text{ }^{\circ}\text{C}$; FT-IR (cm^{-1}): 3444 $\nu(\text{O-H})$, 1622 $\nu(\text{C=O})$, 1510 $\nu(\text{C=C})$, 2917 $\nu(\text{C-H})$, 1261 $\nu(\text{Ar-O})$; MALDI MS M^+ (m/z): 396 (397); ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 700 MHz): δ 3.80 (s, 6H), 3.83 (s, 6H), 6.11 (s, 1H), 6.83 (d, 2H, $J = 16.73\text{ Hz}$), 7.01 (d, 2H, $J = 8.24\text{ Hz}$), 7.26 (dd, 2H, $J = 8.24\text{ Hz}$), 7.35 (d, 2H), 7.59 (d, 2H, $J = 15.78\text{ Hz}$), 16.29 (br s, 1H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 700 MHz): δ 56.32 (C-H), 56.06 (C-H), 101.49 (C-H), 110.70 (C_{aryl}), 112.29 (C_{aryl}), 122.83 (C_{vinyl}), 123.74 (C_{aryl}), 128.09 (C_{aryl}), 140.97 (C_{vinyl}), 149.51 (C_{aryl}), 151.43 (C_{aryl}), 183.69 (C=O).

3.2.2. General Synthesis Procedure of Ternary Complexes of [Cu(Dn)(L1)]NO₃ and [Cu(Dn)(L2)]NO₃

In order to obtain mixed chelate copper(II) coordination compounds with L1 and L2 as secondary ligands, a general method was carried out following the methodology previously reported in [79–81]; however, a slight modification was made to raise reaction yields. Broadly, copper(II) nitrate hemipentahydrate (0.7 mmol, 1 M) was dissolved in 25 mL pure methanol solution, and diimine (0.7 mmol) was dissolved in 60 mL methanol solution. The latter solution was added dropwise to the copper(II) salt solution and stirred for 40 min. Then, after the addition, the previously deprotonated ligands, L1 or L2 (0.63 mmol, 0.232 g), were added. The reaction mixture was left for 5–6 h under continuous stirring with reflux. A change of color was observed. After cooling to room temperature, the formed solid was vacuum-filtered. Products were washed with EtOAc (3 × 20 mL) and cold water to remove residual reactants. The resulting precipitates were dried in a vacuum at room temperature. Between families of coordination compounds, the color of the precipitated powder depends on the presence of diimine.

[Cu(D1)(L1)]NO₃: golden solid (98% yield); C₃₁H₂₇N₃O₉Cu (649.1 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 57.36 (57.13); H, 4.19 (4.17); N, 6.47 (6.46). m.p.: 248.0 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3423 ν(O-H), 1619 ν(C=N), 1598 ν(C-O), 1508 ν(C=C), 2969 ν(C-H), 1280 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 480 ν(M-O); μ_{eff} = 1.05 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 37.3 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 586.11 (586.9).

[Cu(D2)(L1)]NO₃: orange solid (94% yield); C₃₃H₃₁N₃O₉Cu.H₂O (695.17 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 57.01 (56.77); H, 4.78 (4.76); N, 6.04 (6.07). Decomposition temperature: 222.5 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3423 ν(O-H), 1621 ν(C=N), 1589 ν(C-O), 1508 ν(C=C), 2939 ν(C-H), 1280 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 470 ν(M-O); μ_{eff} = 1.79 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 33.03 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 614.47 (615.03).

[Cu(D3)(L1)]NO₃: reddish solid (96% yield); C₃₃H₃₁N₃O₉Cu.H₂O (695.17 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 57.01 (57.29); H, 4.78 (4.79); N, 6.04 (6.01). Decomposition temperature: 208.6 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3425 ν(O-H), 1600 ν(C=N), 1596 ν(C-O), 1510 ν(C=C), 2935 ν(C-H), 1280 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 480 ν(M-O); μ_{eff} = 1.13 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 32.9 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 614.47 (614.08).

[Cu(D4)(L1)]NO₃: orange solid (94% yield); C₃₃H₂₇N₃O₉Cu (673.12 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 58.88 (58.63); H, 4.04 (4.02); N, 6.24 (6.28). Decomposition temperature: 249.2 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3436 ν(O-H), 1618 ν(C=N), 1589 ν(C-O), 1510 ν(C=C), 2944 ν(C-H), 1278 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 476 ν(M-O); μ_{eff} = 1.10 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 32.6 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 610.11 (610.98).

[Cu(D5)(L1)]NO₃: reddish solid (80% yield); C₃₅H₃₁N₃O₉Cu.H₂O (719.19 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 58.45 (58.70); H, 4.62 (4.59); N, 5.84 (5.82). Decomposition temperature: 200.5 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3419 ν(O-H), 1621 ν(C=N), 1596 ν(C-O), 1510 ν(C=C), 2977 ν(C-H), 1282 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 478 ν(M-O); μ_{eff} = 1.35 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 34.0 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 638.14 (638.04).

[Cu(D6)(L1)]NO₃: orange solid (95% yield); C₃₅H₃₁N₃O₉Cu (701.18 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 59.95 (60.20); H, 4.45 (4.47); N, 5.99 (5.97). Decomposition temperature: 205.4 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3432 ν(O-H), 1621 ν(C=N), 1600 ν(C-O), 1511 ν(C=C), 2936 ν(C-H), 1278 ν(Ar-O), 1384.7 ν(NO₃), 478 ν(M-O); μ_{eff} = 1.10 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 59.1 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 638.14 (638.04).

[Cu(D7)(L1)]NO₃: orange solid (95% yield); C₃₇H₃₅N₃O₉Cu.H₂O (747.24 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 59.47 (59.20); H, 4.99 (4.97); N, 5.62 (5.59). Decomposition temperature: 243.2 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3446 ν(O-H), 1619 ν(C=N), 1594 ν(C-O), 1510 ν(C=C), 2925 ν(C-H), 1282 ν(Ar-O); 1384.7 ν(NO₃), 478 ν(M-O); μ_{eff} = 1.92 B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 31.9 μS. MALDI MS M⁺ (m/z): 666.17 (667.18).

[Cu(D8)(L1)]NO₃: orange solid (80% yield); C₄₅H₃₅N₃O₉Cu (825.32 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 65.48 (65.51); H, 4.27 (4.25); N, 5.09 (5.12). Decomposition temperature: 246.0 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3417 ν(O-H), 1618 ν(C=N), 1589 ν(C-O),

1510 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2942 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1280 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 474 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 2.16$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 32.8 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 762.17 (762.10).

[Cu(D1)(L2)]NO₃: orange solid (88% yield); C₃₃H₃₁N₃O₉Cu (677.16 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 58.53 (58.24); H, 4.61 (4.59); N, 6.2 (6.18). m.p.: 236.9 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3427 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1616 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1579 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1510 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2948 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1265 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 486 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 1.91$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 37.4 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 614.14 (615.30).

[Cu(D2)(L2)]NO₃: orange solid (92% yield); C₃₅H₃₅N₃O₉Cu.H₂O (723.22 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 58.12 (57.86); H, 5.15 (5.12); N, 5.81 (5.83). m.p.: 244.9 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3471 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1616 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1581 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1510 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2939 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1265 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 480 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 1.86$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 23.2 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 642.17 (643.29).

[Cu(D3)(L2)]NO₃: light green solid (84% yield); C₃₅H₃₅N₃O₉Cu.H₂O (723.22 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 58.12 (58.39); H, 5.15 (5.18); N, 5.81 (5.84). m.p.: 262.7 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3452 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1619 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1581 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1508 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2939 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1263 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 484 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 1.9$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 24.1 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 642.17 (642.10).

[Cu(D4)(L2)]NO₃: light green solid (80% yield); C₃₅H₃₁N₃O₉Cu.2H₂O (737.21 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 57.02 (56.75); H, 4.78 (4.76); N, 5.69 (5.66). m.p.: 254.3 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3436 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1619 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1581 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1510 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2939 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1261 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 462 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 1.9$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 23.7 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 638.14 (638.03).

[Cu(D5)(L2)]NO₃: solid (% yield); C₃₇H₃₅N₃O₉Cu (729.23 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 60.94 (60.68); H, 4.83 (4.82); N, 5.76 (5.74). Decomposition temperature: 244.5 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3428 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1621 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1579 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1508 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2935 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1259 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 472 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 2.26$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 33.8 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 666.17 (668.24).

[Cu(D6)(L2)]NO₃: solid (% yield); C₃₇H₃₅N₃O₉Cu (729.23 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 60.94 (61.19); H, 4.83 (4.85); N, 5.76 (5.79). Decomposition temperature: 237.0 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3444 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1619 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1581 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1510 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2935 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1261 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 472 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 1.96$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 28.7 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 666.17 (668.24).

[Cu(D7)(L2)]NO₃: solid (% yield); C₃₉H₃₉N₃O₉Cu (757.28 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 61.85 (61.56); H, 5.19 (5.21); N, 5.54 (5.51). Decomposition temperature: 241.0 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3446 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1612 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1579 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1504 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2931 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1265 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 484 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 2.10$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 28.8 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 694.21 (696.14).

[Cu(D8)(L2)]NO₃: solid (% yield); C₄₇H₃₉N₃O₉Cu (853.37 g/mol); elemental analysis, %calculated (%founded): C, 66.14 (65.86); H, 4.60 (4.63); N, 4.92 (4.94). Decomposition temperature: 238.8 °C; FT-IR (cm⁻¹): 3413 $\nu(\text{O}-\text{H})$, 1625 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1562 $\nu(\text{C}-\text{O})$, 1511 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 2933 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1263 $\nu(\text{Ar}-\text{O})$; 1384.7 $\nu(\text{NO}_3^-)$, 480 $\nu(\text{M}-\text{O})$; $\mu_{\text{eff}} = 2.30$ B.M. Molar conductance Λ (DMSO) = 27.2 μS . MALDI MS M^+ (m/z): 790.21 (791.56).

3.3. Cyclic Voltammetry Studies

Cyclic voltammetry was performed using a typical three-electrode cell comprising a pseudo-reference Ag, working glassy carbon electrodes and platinum wire as counter electrode. All electrochemical experiments were carried out using 1mM solutions of each coordination compound in DMSO in the presence of 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate [NBu₄][PF₆] as supporting electrolyte. Before to each experiment, the working electrode was cleaned and polished with diamond powder (3 μm). All of the solutions were degassed with nitrogen prior to measurement. Cyclic voltammetry was initiated from open-circuit potential to the negative direction; the scan rate employed was 100 mVs⁻¹ in both cathodic and anodic directions. On the other hand, by varying the scanning speed, the kinetics of the reactions can be studied, or the appearance of

intermediate species can be detected accordingly in redox processes. We performed cyclic voltammetry with a variable scan rate between 20 and 1000 mV/s in the reductive direction. All potentials were reported versus the coupled ferrocene as internal standard ($E^{\circ}\text{Fc}^+/\text{Fc}$) according to IUPAC.

3.4. X-ray Crystallography

Single-crystal compounds D5CuL2 and D6CuL2 were coated with hydrocarbon oil (Parabar) for isolation, mounted on a glass fiber and placed on the goniometer head of the diffractometer for analysis. Suitable crystals were collected on a Bruker APEX II CCD diffractometer using Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 100 K from an Incoatec ImuS source and a Helios optic monochromator. The structures were solved using intrinsic phasing (SHELXT) and refined by full-matrix least-squares on F2 using the shelXle GUI. The crystallographic data and refinement details for the complexes reported in this paper are summarized in Table 7. Chemical structure drawings were produced using Mercury software.

Table 7. Crystallographic data and structural refinement parameters for D5CuL2 and D6CuL2.

Collection Parameters	D5CuL2	D6CuL2
Empirical formula	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu	C ₃₇ H ₃₅ N ₃ O ₉ Cu
Formula weight	729.23 g/mol	729.23 g/mol
Temperature (K)	100	100
Wavelength (Å)	1.5417	0.71073
Crystal system	Triclinic	Triclinic
Space group	P-1	P-1

Table 7. Cont.

Collection Parameters	D5CuL2	D6CuL2
a (Å)	7.7004 (7)	10.0604 (7)
b (Å)	13.7026 (12)	13.6229 (9)
c (Å)	17.1812 (15)	14.0129 (9)
α (°)	110.132 (5)	70.5193 (12)
β (°)	94.503 (6)	76.4453 (13)
γ (°)	91.987 (6)	71.7320 (13)
Volume (Å ³)	1693.2 (3)	1701.1 (2)
Z	2	1
D _{calc} (mg/m ³)	1.466	1.485
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.462	0.709
F(000)	778	793
Crystal size (mm ³)	0.300 × 0.041 × 0.036	0.150 × 0.092 × 0.056
Theta range for data collection (°)	2.752 to 68.243	1.558 to 27.442
Index ranges	−9 ≤ h ≤ 9, −16 ≤ k ≤ 16, −20 ≤ l ≤ 20	−13 ≤ h ≤ 13, −17 ≤ k ≤ 17, −18 ≤ l ≤ 18
Reflections collected	45,131	27,234
Independent reflections	5817 [R(int) = 0.0466]	7773 [R(int) = 0.0363]
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	5818/563/584	7773/360/582
Goodness-of-fit on F2	1.086	1.040
Final R indices (I > 2σ(I))	R1 = 0.0538, wR2 = 0.1580	R1 = 0.0355, wR2 = 0.0889
R indices (all data)	R1 = 0.0588, wR2 = 0.1637	R1 = 0.0477, wR2 = 0.0889
Largest diff. peak and hole e Å ⁻³	0.878 and −0.651	0.366 and −0.520
Extinction coefficient	n/a	n/a

3.5. Biological Assays

Cytotoxicity Activity

The cytotoxicity of curcumin (L1), dimethoxycurcumin (L2) and all complexes on tumor cells was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B assay against two human cancer cell lines: SKLU-1 (non-small cell lung cancer) and HeLa (cell cervix cancer). The cell lines were cultured in supplemented DMEM-F12 medium (containing 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin-streptomycin). The plates were kept at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity. The viability of the cells used in the experiments was major at 95% as determined with trypan blue; after confluence, cells were used for all IC₅₀ determinations. The next day, medium was withdrawn, and 90 µL of new medium and 10 µL of the individual complexes were added to each well. Test samples were dissolved in 1 mL of DMSO to afford stock solutions (10 mM). After 24 h of treatment, the medium was retired, and plates were fixed by adding 100 µL trichloroacetic acid (TCA) and stored in a fridge for 60 min at 4 °C. The supernatant was scrapped, and the wells were washed thrice with water and air-dried. The fixed cells were stained with 50 µL of sulforhodamine B solution for 30 min in the dark; then, SRB solution was discarded, and plates were washed with 100 µL of acetic acid (1% v/v) and air-died. A volume of 50 µL of Tris was added to the plates to solubilize the SRB. Finally the plates were read at a wavelength of 570 nm. The results correspond to the average of 4 independent assays in triplicate for each combination. The concentration of complexes required for 50% inhibition of cell viability is commonly termed IC₅₀ and calculated with a dose–response curve, which was plotted for each compound; the resulting concentration that resulted was estimated through fit sigmoidal analysis with Origin Pro 8 software.

3.6. Structure–Activity Relationships

3.6.1. Computational Methods

Computational chemistry is a useful tool that can help to explain or predict the behavior and chemical reactivity of one or more molecules. We studied the redox potential behavior of these coordination compounds through computational calculations that involve obtaining physicochemical parameters such as Gibbs energies in the gas phase and with a solvation model. We calculated the redox potential of all families of coordination compounds of copper(II) (represents the oxidized complex) and its reduced species (coordination compounds of copper(I)) using Born–Haber cycles (Figure 11). DFT calculations were carried out to optimize geometries and determinate Gibbs energies of each compound with Gaussian 09.

3.6.2. Computational Details

The crystal structure of copper(II) complexes were used as initial molecular geometries for optimization at the global hybrid functional M05-2x/LanL2DZ theoretical level with an SMD solvent model in which dimethylsulfoxide was employed as dissolvent to simulate the cyclic voltammetry experiment. Then, the obtained optimized molecules were used as a starting point for optimization of their reduced species (copper(I) complexes). Molecular geometries of copper(II/I) complexes were optimized in the gas phase at the same level of theory. The Gibbs free energy change from solvation theory calculations and gas phase calculations of each species was used to evaluate the standard Gibbs free energy change, $\Delta G^{\circ}_{O|R}$ (Equation (1)):

$$-\Delta G^{\circ}_{O|R} = \Delta G^{\circ}_I + \Delta \Delta G^{\circ}_{II} \quad (1)$$

where the Gibbs free energy change for the gas phase oxidation reaction is ΔG°_I (Equation (2)), and the Gibbs free energy change of solvation is ΔG°_{II} (Equation (3)).

$$\Delta G^{\circ}_I = \Delta G^{\circ}[\text{CuDxLn}]^+_{(g)} - \Delta G^{\circ}[\text{CuDxLn}]^{2+}_{(g)} \quad (2)$$

$$\Delta G^{\circ}_{II} = \Delta G^{\circ}[\text{CuDxLn}]^+_{solv} - \Delta G^{\circ}[\text{CuDxLn}]^{2+}_{solv} \quad (3)$$

We calculated the redox potential of a half reaction for a one-electron exchange using the Nernst equation (Equation (4)), where F is the Faraday constant. Here, experimental redox potentials are reported with respect to ferrocene/ferrocenium ($E^\circ_{\text{Fc}^+/\text{Fc}}$) as internal standard reference. Therefore, the same methodology and theoretical level applied to copper complexes was used to calculate the Gibbs free energy change of ferrocene/ferrocenium, with a redox-coupled $\Delta G^\circ_{[\text{FeCp}_2]^{0/+}}$ value of 5.3 eV at the same level of theory.

$$E^\circ_{\text{O|R}} = -\frac{1}{F} \left(\Delta G^\circ_{\text{O|R}} - \Delta G^\circ_{[\text{FeCp}_2]^{0/+}} \right) \quad (4)$$

4. Conclusions

The ligands curcumin and dimethoxycurcumin were synthesized. For the latter, a good route for its purification was identified. Sixteen mixed chelate copper(II) coordination compounds were prepared (third generation of Casiopeinas) and characterized, showing a 1:1:1 stereochemistry (diimine:Cu:curcuminoid). These complexes can have a square-based pyramid or square planar geometry, depending on whether the water molecules are coordinated or not to the metal center according to X-ray diffraction. The synthesis of copper(II) complexes with curcumin and dimethoxycucumin can be used as a template for the generation of new molecules that present novel properties.

The measured cytotoxic activity of the coordination compounds against HeLa and SKLU-1 showed an improved biological activity compared to free ligands and that including a bioactive molecule as a secondary ligand in the Casiopeinas enhances their biological activity. One hypothesis to be resolved is that the toxicity of Casiopeinas may decrease due to the presence of these curcuminoids, given their low toxicity both in normal cells and in vivo, making them a potential alternative for the treatment of cancer.

It was found that the experimental redox potential ($E_{1/2}$) is adequate to describe the antiproliferative activity in the SKLU-1 tumor cell line for copper(II) coordination compounds with curcumin, which was validated with theoretical models. Increased activity of coordination compounds is important in pharmaceuticals. Our results will allow us to generate important research around the most active molecules to guide them towards pharmaceutical applications.

Supplementary Materials: The following are available online at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27113504/s1>. CCDC-2169382 and CCDC-2169383 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (accessed on 28 April 2022).

Author Contributions: Conceptualization, L.R.-A.; data curation, Y.F.-D.; D.M.-O. and V.G.-V., formal analysis, Y.F.-D.; funding acquisition, L.R.-A.; investigation, Y.F.-D., J.P.-V., O.S.-A., L.O.-F. and L.R.-A.; resources, J.P.-V., O.S.-A., L.O.-F., L.R.-A., methodology, Y.F.-D., D.M.-O., V.G.-V., J.P.-V., O.S.-A., L.O.-F. and L.R.-A.; software, Y.F.-D.; supervision, L.R.-A.; validation, J.P.-V., O.S.-A., L.O.-F., and L.R.-A.; visualization, Y.F.-D., J.P.-V., O.S.-A., D.M.-O., L.O.-F., and L.R.-A.; writing—original draft, Y.F.-D.; writing—review and editing, Y.F.-D., J.P.-V., O.S.-A., D.M.-O., V.G.-V., L.O.-F. and L.R.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by UNAM-PAPIIT IN230020; Project Grant UNAM-PAIP 5000-9047 and Scholarships from CONACYT awarded to YFP (No. Scholarships 589195). We also thank LANCAD-UNAM-DGTIC-358 for use of the supercomputer and Instituto de Química-UNAM for elemental and mass spectroscopic analyses.

Acknowledgments: We thank Cynthia S. Novoa Ramírez for her support to simulate the EPR spectra, Rogelio Hurtado Alamea for writing a review and Adrian Espinoza-Guillen for technical support.

Conflicts of Interest: The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Guzmán-Méndez, O.; González, F.; Bernès, S.; Flores-Álamo, M.; Ordóñez-Hernández, J.; García-Ortega, H.; Guerrero, J.; Qian, W.; Aliaga-Alcalde, N.; Gasque, L. Coumarin Derivative Directly Coordinated to Lanthanides Acts as an Excellent Antenna for UV-Vis and Near-IR Emission. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 908–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Farrell, N. Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents, Met. Complexes as Drugs Chemother. *Agents* **1989**, *11*, 809–840. [[CrossRef](#)]
3. Annaraj, J.; Srinivasan, S.; Ponvel, K.; Athappan, P. Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion[®] and clay modified electrodes. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 669–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Akimenko, N.; Cheltsov, P.; Balcarová, Z.; Kleinwächter, V.; Yevdokimov, Y.U. A study of interactions of platinum (II) compounds with DNA by means of CD spectra of solutions and liquid crystalline microphases of DNA. *Gen. Physiol. Biophys.* **1985**, *4*, 597–608.
5. Sharma, K.; Chandra, S.; Basu, D. Synthesis and antiarthritic study of a new orally active diferuloyl methane (curcumin) gold complex. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *135*, 47–48. [[CrossRef](#)]
6. Manikandan, P.; Anandan, R.; Nagini, S. Evaluation of *Azadirachta indica* Leaf Fractions for in Vitro Antioxidant Potential and Protective Effects against H₂O₂-Induced Oxidative Damage to pBR322 DNA and Red Blood Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6990–6996. [[CrossRef](#)]
7. Barik, A.; Mishra, B.; Shen, L.; Mohan, H.; Kadam, R.; Dutta, S.; Zhang, H.-Y.; Priyadarsini, K.I. Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *39*, 811–822. [[CrossRef](#)]
8. Huang, W.; Wei, W.; Shen, Z. Drug-like chelating agents: A potential lead for Alzheimer's disease. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 52088–52099. [[CrossRef](#)]
9. Binolfi, A.; Lamberto, G.R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertocini, C.W.; Souza, J.M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C.O. Site-Specific Interactions of Cu(II) with α and β -Synuclein: Bridging the Molecular Gap between Metal Binding and Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11801–11812. [[CrossRef](#)]
10. Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2013**, *114*, 815–862. [[CrossRef](#)]

11. WHO. Cancer Today. 2020. Available online: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1 (accessed on 22 February 2022).
12. Alderden, R.A.; Hall, M.D.; Hambly, T. The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 728–734. [CrossRef]
13. Guo, Z.; Sadler, P.J. Metals in Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1512–1531. [CrossRef]
14. Solans, X.; Ruiz-Ramírez, L.; Gasque, L.; Briansó, J.L. Structure of (1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1987**, *43*, 428–430. [CrossRef]
15. Solans, X.; Ruiz-Ramírez, L.; Martínez, A.; Gasque, L.; Briansó, J.L. Structures of chloro(glycinato)(1,10-phenanthroline)copper(II) monohydrate (I) and aqua(1,10-phenanthroline)(L-phenylalaninato)copper(II) nitrate monohydrate (II). *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1988**, *44*, 628–631. [CrossRef] [PubMed]
16. Carvallo-Chaigneau, F.; Trejo-Solís, C.; Gómez-Ruiz, C.; Rodríguez-Aguilera, E.; Macías-Rosales, L.; Cortés-Barberena, E.; Cedillo-Peláez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; et al. Constantino-Casas, Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* **2007**, *21*, 17–28. [CrossRef]
17. Trejo-Solís, C.; Palencia, G.; Zuñiga, S.; Rodríguez-Ropon, A.; Osorio-Rico, L.; Luvia, S.T.; Gracia-Mora, I.; Marquez-Rosado, L.; Sánchez, A.; Moreno-García, M.E.; et al. Sotelo, Cas Igly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia* **2005**, *7*, 563–574. [CrossRef]
18. Serment-Guerrero, J.; Cano-Sanchez, P.; Reyes-Perez, E.; Velazquez-García, F.; Bravo-Gomez, M.; Ruiz-Azuara, L. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeínas[®]. *Toxicol. Vitro* **2011**, *25*, 1376–1384. [CrossRef]
19. Figueroa-DePaz, Y.; Resendiz-Acevedo, K.; Dávila-Manzanilla, S.G.; García-Ramos, J.C.; Ortiz-Frade, L.; Serment-Guerrero, J.; Ruiz-Azuara, L. DNA, a target of mixed chelate copper(II) compounds (Casiopeínas[®]) studied by electrophoresis, UV-vis and circular dichroism techniques. *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *231*, 111772. [CrossRef]
20. Gutiérrez, A.G.; Vázquez-Aguirre, A.; García-Ramos, J.C.; Flores-Alamo, M.; Hernández-Lemus, E.; Ruiz-Azuara, L.; Mejía, C. Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *126*, 17–25. [CrossRef]
21. Hernández-Esquivel, L.; Marín-Hernández, A.; Pavón, N.; Carvajal, K.; Moreno-Sánchez, R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeínas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *212*, 79–88. [CrossRef]
22. Ramírez-Palma, L.G.; Espinoza-Guillen, A.; Nieto-camacho, F.; López-Guerra, A.; Gómez-Vidales, V.; Cortés-Guzmán, F.; Ruiz-Azuara, L. Intermediate Detection in the Casiopeína—Cysteine Interaction Ending in the Disulfide Bond Formation and Copper Reduction. *Molecules* **2021**, *26*, 5729. [CrossRef] [PubMed]
23. Marín-Hernández, A.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Ramírez, L.; Moreno-Sánchez, R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas[®]) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1979–1989. [CrossRef]
24. Kachadourian, R.; Brechbuhl, H.M.; Ruiz-Azuara, L.; Gracia-Mora, I.; Day, B.J. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology* **2010**, *268*, 176–183. [CrossRef] [PubMed]
25. Bravo-Gómez, M.E.; García-Ramos, J.C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L. 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.* **2009**, *103*, 299–309. [CrossRef] [PubMed]
26. Stanić, Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge—A Review. *Plant Foods Hum. Nut.* **2016**, *72*, 1–12. [CrossRef]
27. Epstein, J.; Sanderson, I.R.; MacDonald, T.T. Curcumin as a Therapeutic Agent: The Evidence from in vitro, Animal and Human Studies. *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 1545–1557. [CrossRef]
28. Nelson, K.M.; Dahlin, J.L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1620–1637. [CrossRef]
29. Aggarwal, B.B.; Surh, Y.J.; Shishodia, S. (Eds.) *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; Volume 595.
30. Kunnumakkara, A.B.; Bordoloi, D.; Padmavathi, G.; Monisha, J.; Roy, N.K.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Curcumin, the golden nutraceutical: Multitargeting for multiple chronic diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1325–1348. [CrossRef]
31. Cheng, A.L.; Hsu, C.-H.; Lin, J.K.; Hsu, M.M.; Ho, Y.-F.; Shen, T.S.; Ko, J.Y.; Lin, J.T.; Lin, B.-R.; Ming-Shiang, W.; et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2895–2900.
32. Pabon, H.J.J. Synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil* **1964**, *83*, 379–386. [CrossRef]
33. Leung, M.H.M.; Harada, T.; Kee, T.W. Delivery of Curcumin and Medicinal Effects of the Copper(II)-Curcumin Complexes. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2070–2083. [CrossRef] [PubMed]
34. Sharma, R.A.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin. *Mol. Targets Ther. Uses Curcumin Health Dis.* **2007**, *595*, 453–470. [CrossRef]
35. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Newman, Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises reviews Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 807–818. [CrossRef]

36. Schneider, C.; Gordon, O.N.; Edwards, R.L.; Luis, P.B. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7606–7614. [CrossRef] [PubMed]
37. Kunwar, A.; Simon, E.; Singh, U.; Chittela, R.K.; Sharma, D.; Sandur, S.K.; Priyadarsini, I.K. Interaction of a curcumin analogue dimethoxycurcumin with DNA. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, *77*, 281–287. [CrossRef] [PubMed]
38. Meza-Morales, W.; Estévez-Carmona, M.M.; Alvarez-Ricardo, Y.; Obregón-Mendoza, M.A.; Cassani, J.; Ramírez-Apan, M.T.; Escobedo-Martínez, C.; Soriano-García, M.; Reynolds, W.F.; Enriquez, R.G. Full Structural Characterization of Homoleptic Complexes of Diacetylcurcumin with Mg, Zn, Cu, and Mn: Cisplatin-level Cytotoxicity in Vitro with Minimal Acute Toxicity in Vivo. *Molecules* **2019**, *24*, 1598. [CrossRef] [PubMed]
39. Shahabadi, N.; Falsafi, M.; Moghadam, N.H. DNA interaction studies of a novel Cu(II) complex as an intercalator containing curcumin and bathophenanthroline ligands. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *122*, 45–51. [CrossRef]
40. Banerjee, R. Inhibitory Effect of Curcumin-Cu(II) and Curcumin-Zn(II) Complexes on Amyloid-Beta Peptide Fibrillation. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2014**, *2014*, 325873. [CrossRef]
41. Mary, C.P.V.; Vijayakumar, S.; Shankar, R. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes—A DFT approach. *J. Mol. Graph. Model.* **2018**, *79*, 1–14. [CrossRef]
42. Correa-Ascencio, M.; Galván-Miranda, E.K.; Rascón-Cruz, F.; Jiménez-Sandoval, S.J.; Cea-Olivares, R.; Jancik, V.; Toscano, R.A.; García-Montalvo, V. Lanthanide(III) Complexes with 4,5-Bis(diphenylphosphino)yl-1,2,3-triazolate and the Use of 1,10-Phenanthroline As Auxiliary Ligand. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4109–4116. [CrossRef]
43. Refat, M.S. Synthesis and characterization of ligational behavior of curcumin drug towards some transition metal ions: Chelation effect on their thermal stability and biological activity. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *105*, 326–337. [CrossRef] [PubMed]
44. Pröhl, M.; Schubert, U.; Weigand, W.; Gottschaldt, M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *307*, 32–41. [CrossRef]
45. Rigamonti, L.; Orteca, G.; Asti, M.; Basile, V.; Imbriano, C.; Saladini, M.; Ferrari, E. New curcumin-derived ligands and their affinity towards Ga³⁺, Fe³⁺ and Cu²⁺: Spectroscopic studies on complex formation and stability in solution. *N. J. Chem.* **2018**, *42*, 7680–7690. [CrossRef]
46. Priyadarshini, N.; Iyyam, P.S.; Subramanian, S.; Venkatesh, P. Venkatesh, Synthesis, spectroscopic characterization and DNA interaction of schiff base curcumin Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes. *Pharma Chem.* **2015**, *7*, 186–201. Available online: <http://derpharmachemica.com/archive.html> (accessed on 28 April 2022).
47. Pi, Z.; Wang, J.; Jiang, B.; Cheng, G.; Zhou, S. A curcumin-based TPA four-branched copper(II) complex probe for in vivo early tumor detection. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *46*, 565–571. [CrossRef] [PubMed]
48. Zhou, S.; Xue, X.; Jiang, B.; Tian, Y. Metal complexes of a novel bis-β-diketone-type ligand and its copper(II) complexes of two-photon biological imaging. *Sci. China Chem.* **2011**, *55*, 334–340. [CrossRef]
49. Xue, X.; Wang, J.; Si, G.; Wang, C.; Zhou, S. Synthesis, DNA-binding properties and cytotoxicity evaluation of two copper(II) complexes based on curcumin. *Transit. Met. Chem.* **2016**, *41*, 331–337. [CrossRef]
50. Wang, J.; Wei, D.; Jiang, B.; Liu, T.; Ni, J.; Zhou, S. Two copper(II) complexes of curcumin derivatives: Synthesis, crystal structure and in vitro antitumor activity. *Transit. Met. Chem.* **2014**, *39*, 553–558. [CrossRef]
51. J]Porkodi, J.; Raman, N. Synthesis, characterization and biological screening studies of mixed ligand complexes using flavonoids as precursors. *Appl. Organomet. Chem.* **2017**, *32*, e4030. [CrossRef]
52. Boorman, P.M.; Greenwood, N.N. and Hildon, M.A. Some diphenyl complexes of tungsten-(III) and -(IV). *J. Chem. Soc. A* **1968**, 2466. [CrossRef]
53. Geary, W. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Co-ord. Chem. Rev.* **1971**, *7*, 81–122. [CrossRef]
54. Ismail, E.H.; Sabry, D.Y.; Mahdy, H.; Khalil, M.M.H. Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-phenanthroline and their Anticancer Applications. *J. Sci. Res.* **2014**, *6*, 509–519. [CrossRef]
55. Goswami, T.K.; Gadadhar, S.; Gole, B.; Karande, A.A.; Chakravarty, A.R. Photocytotoxicity of copper(II) complexes of curcumin and N-ferrocenylmethyl-l-amino acids. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 800–810. [CrossRef] [PubMed]
56. Deepthi, T.V.; Venugopalan, P. Synthesis, DNA-binding, and cytotoxic studies on three copper(II) complexes of unsymmetrical synthetic analogues of curcumin. *J. Coord. Chem.* **2016**, *69*, 3403–3416. [CrossRef]
57. Banerjee, S.; Chakravarty, A.R. Metal Complexes of Curcumin for Cellular Imaging, Targeting, and Photoinduced Anticancer Activity. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2075–2083. [CrossRef]
58. Joseph, J.; Suman, A.; Nagashri, K.; Joseyphus, R.S.; Balakrishnan, N. Synthesis, characterization and biological studies of copper(II) complexes with 2-aminobenzimidazole derivatives. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1137*, 17–26. [CrossRef]
59. Bain, G.A.; Berry, J.F. Diamagnetic Corrections and Pascal's Constants. *J. Chem. Educ.* **2008**, *85*, 532–536. [CrossRef]
60. Garribba, E.; Micera, G. The Determination of the Geometry of Cu(II) Complexes: An EPR Spectroscopy Experiment. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1229–1232. [CrossRef]
61. García-Giménez, J.L.; González-Álvarez, M.; Liu-González, M.; Macías, B.; Borrás, J.; Alzuet, G. The development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenanthroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 923–934. [CrossRef]

62. Raman, N.; Sobha, S. Synthesis, characterization, DNA interaction and antimicrobial screening of isatin-based polypyridyl mixed ligand Cu(II) and Zn(II) complexes. *J. Serbian Chem. Soc.* **2010**, *75*, 773–788. [[CrossRef](#)]
63. Masek, A.; Chrzciszjanska, E.; Zaborski, M. Characteristics of curcumin using cyclic voltammetry, UV–vis, fluorescence and thermogravimetric analysis. *Electrochim. Acta* **2013**, *107*, 441–447. [[CrossRef](#)]
64. Călinescu, M.; Fiastru, M.; Bala, D.; Mihailciuc, C.; Negreanu-Pîrjol, T.; Jurca, B. Synthesis, characterization, electrochemical behavior and antioxidant activity of new copper(II) coordination compounds with curcumin derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* **2019**, *23*, 817–827. [[CrossRef](#)]
65. Zhu, J.; Sanidad, K.Z.; Sukamtoh, E.; Zhang, G. Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. *Food Funct.* **2017**, *8*, 907–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Meza-Morales, W.; Machado-Rodriguez, J.C.; Alvarez-Ricardo, Y.; Obregón-Mendoza, M.A.; Nieto-Camacho, A.; Toscano, R.A.; Soriano-García, M.; Cassani, J.; Enriquez, R.G. A New Family of Homoleptic Copper Complexes of Curcuminoids: Synthesis, Characterization and Biological Properties. *Molecules* **2019**, *24*, 910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wanninger, S.; Lorenz, V.; Subhan, A.; Edelmann, F.T. Metal complexes of curcumin—Synthetic strategies, structures and medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4986–5002. [[CrossRef](#)]
68. Pucci, D.; Bellini, T.; Crispini, A.; D’Agnano, I.; Liguori, P.F.; Garcia-Orduña, P.; Pirillo, S.; Valentini, A.; Zanchetta, G. DNA binding and cytotoxicity of fluorescent curcumin-based Zn(II) complexes. *MedChemComm* **2012**, *3*, 462–468. [[CrossRef](#)]
69. Aliaga-Alcalde, N.; Marqués-Gallego, P.; Kraaijkamp, M.; Herranz-Lancho, C.; Dulk, H.D.; Gömer, H.; Roubeau, O.; Teat, S.J.; Weyhermüller, T.; Reedijk, J. Copper Curcuminoids Containing Anthracene Groups: Fluorescent Molecules with Cytotoxic Activity. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 9655–9663. [[CrossRef](#)]
70. Chikira, M.; Tomizawa, Y.; Fukita, D.; Sugizaki, T.; Sugawara, N.; Yamazaki, T.; Sasano, A.; Shindo, H.; Palaniandavar, M.; Antholine, W.E. DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: Mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 163–173. [[CrossRef](#)]
71. Hirohama, T.; Kuranuki, Y.; Ebina, E.; Sugizaki, T.; Arai, H.; Chikira, M.; Selvi, P.T.; Palaniandavar, M. Copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-derived ligands: Studies on DNA binding properties and nuclease activity. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1205–1219. [[CrossRef](#)]
72. Bravo-gómez, M.E.; Dávila-manzanilla, S.; Flood-garibay, J.; Muciño, M. Á.; Mendoza, Á.; García-ramos, J.C.; Moreno-esparza, R.; Ruiz-azuara, L. Secondary Ligand Effects on the Cytotoxicity of Several Casiopeína’s Group II Compounds. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 85–92. [[CrossRef](#)]
73. Yilmaz, V.T.; Işel, C.; Suyunova, F.; Aygun, M.; Aztopal, N.; Ulukaya, E. Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridylamine: Synthesis, structures, DNA/BSA binding, nuclease activity, molecular docking, cellular uptake, cytotoxicity and the mode of cell death. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 10466–10479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Moghasssemi, S.; Hadjizadeh, A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *J. Control. Release* **2014**, *185*, 22–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Davila-Manzanilla, S.G.; Figueroa-De-Paz, Y.; Mejia, C.; Ruiz-Azuara, L. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *129*, 266–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Tovar-Tovar, A.; Ruiz-Ramirez, L.; Campero, A.; Romerosa, A.; Moreno-Esparza, R.; Rosales-Hoz, M.J. Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1045–1053. [[CrossRef](#)]
77. Reina, M.; Hernández-Ayala, L.F.; Bravo-Gómez, M.E.; Gómez, V.; Ruiz-Azuara, L. Second generation of Casiopeínas®: A joint experimental and theoretical study. *Inorganica Chim. Acta* **2020**, *517*, 120201. [[CrossRef](#)]
78. Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55. [[CrossRef](#)]
79. Ruiz-Azuara, L. United States Patent 07/628,843: RE 35,458, 1997.
80. Ruiz-Azuara, L. United States Patent 07/628,628: 5,576,326, 1996.
81. Ruiz-Azuara, L. United States Patent 07/628,628: RE 35,458, 1997.



Cite this: *New J. Chem.*, 2022, **46**, 12500

Casiopeinas[®] as SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}) inhibitors: a combined DFT, molecular docking and ONIOM approach†

Miguel Reina, Luis Gabriel Talavera-Contreras,[†] Yeshenia Figueroa-DePaz, Lena Ruiz-Azuara[†] and Luis Felipe Hernández-Ayala^{†*}

Casiopeinas[®] are well-known planar copper compounds with potent anticancer activity; their general formula is [Cu(N-N)(L-L)]ⁿ⁺ (*n* = 1, 2), where N-N = 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline or 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine and L-L = different bidentate chelates. CasIII-ia: [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetyl-acetonate)]NO₃ is now being tested in clinical trials. In this work, a study of the potential inhibition of the SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}) with Casiopeinas was carried out employing a combined computational strategy. Electronic structure DFT calculations indicate that the compounds present a square planar geometry and, in some cases, the coordination sphere has pseudo aromatic properties. Molecular docking examinations suggest that Casiopeinas form stable complexes with M^{Pro} and therefore, can potentially inhibit this natural function by its bonding to the main amino acids of the active site. In this context, Casiopeinas disrupt the protease action more efficiently than the recognized inhibitors such as the N3 peptide or boceprevir. Hybrid QM:MM ONIOM calculations indicate that the copper atom is covalently bonded to glutamine 189 (Gln189), a key amino acid of the M^{Pro}, the N-N donor could be participating in many π -interactions, and the atoms of the L-L fragment are bonded to the M^{Pro} residues through classical and non-conventional hydrogen bonds. According to computational simulations, structural and electronic features of Casiopeinas promote their interaction with the enzyme and the potential disruption of the M^{Pro} function.

Received 25th March 2022,
Accepted 26th May 2022

DOI: 10.1039/d2nj01480g

rsc.li/njc

Introduction

In December 2019, in Wuhan China, an outbreak of pneumonia of unknown etiology appeared. Shortly after, the agent responsible for this infection was identified. The new pathogen is a member of the coronavirus family, and it has been named SARS-CoV-2 due to its similarity to the virus that was found in the same country in 2002. The condition produced by SARS-CoV-2 is now known as COVID-19 disease, and it has caused 513 million infections and 6.2 million deaths around the globe.¹ At the time of writing, COVID19 pandemic continued to grow at significant rates (590 thousand infections and nearly 2100 deaths every day).¹ In addition to the regrettable loss of life, the collapse of healthcare systems around the globe, and the stoppage of economic and social activities have been very significant. Furthermore, the slowdown in the reduction of infections and the appearance of new strains of the virus keep

humanity in suspense due to the increase in transmissibility, virulence, and the decrease in the effectiveness of the available sanitary measures that these strains can cause. Until now, we have fought the ravages of this disease through vaccination and healthy distance and personal protection measures. However, effective treatment against COVID-19 does not exist. In this regard, remdesivir is a nucleotide prodrug that has been presented as an antiviral therapy alternative according to the National Institute of Health guidelines.²

Consequently, the scientific community has turned to investigate and describe the virus biology. By understanding the fundamental steps of the replication cycle, it is possible to find ways to interrupt it and inhibit the infection process. An important process of the SARS-CoV-2 replication is the proteolytic process, in which the viral polypeptides are released from pp1a and pp1ab polyproteins.^{3,4} One of the proteins responsible for proteolysis is the main protease or M^{Pro}.⁵ It is a multifunctional enzyme that is also in control of the replication and primary transcription of the viral genetic material.⁶ By inhibiting its action, viral multiplication can be interrupted. The M^{Pro} active region contains a catalytic dyad (His41 and Cys145) and a substrate union triad (Met49, His163 and Gln189).⁶ Compounds that can covalently bind to these residues and disrupt

Laboratorio de Química Inorgánica Medicinal, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad de México, CP 04510, México.
E-mail: hdz.ayala@yahoo.com.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2nj01480g>

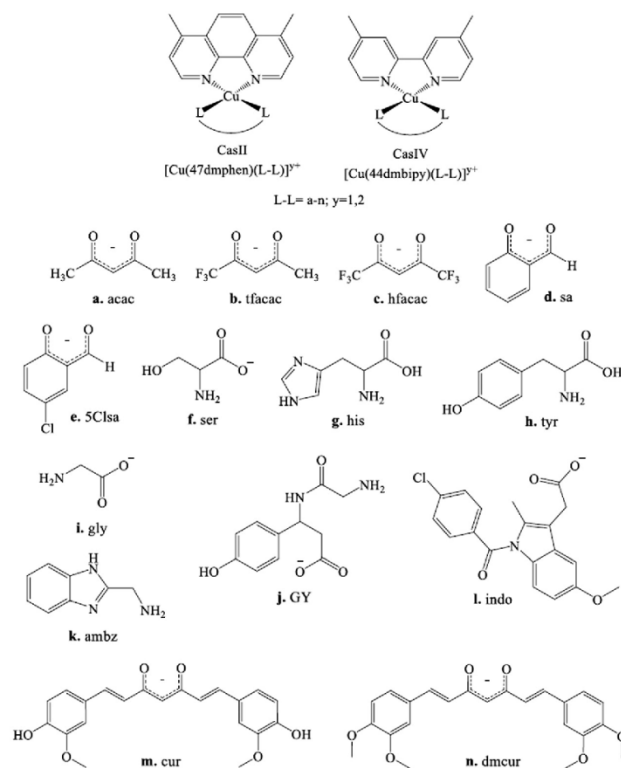
the action of M^{Pro} enzyme are called protease inhibitors. Boceprevir and N3 peptide are recognized by the high inhibitory efficiency this enzyme.^{6,8,9} Although remdesivir is capable of inhibiting efficiently the SARS-CoV-2 RNA polymerase,¹⁰ some computational studies suggest that it can act as a protease inhibitor.^{11,12} In this regard, a series of promising M^{Pro} inhibitors have been designed in a high-throughput virtual screening experiment.¹³ Interestingly, a library of compounds that potentially serve as protease inhibitors (or starting point materials to synthesize them) are also available.¹³ Given its importance, the main protease is a relevant therapeutic target. Additionally, homologous M^{Pro} proteins are not known in humans; therefore, their inhibitors would hardly be toxic for our species. Such is the importance of this enzyme that one of the few drugs approved to treat COVID19, PAXLOVID, is an M^{Pro} inhibitor.¹⁴

Recently, some studies have reported metal complexes to be antiviral agents for SARS-CoV-2.¹⁵ These complexes can present a multi-target action mechanism. For instance, auranofin derivatives can inhibit the binding of the spike protein to the angiotensin converting enzyme (ACE2) and disrupt the entry of the virus into the human cell.¹⁶ In the same way, these compounds can inhibit the papain-like protease PL^{Pro}, the other fundamental enzyme in the proteolytic process.¹⁶ Furthermore, metal complexes can also inhibit M^{Pro} function. Selenium derivatives and rhenium complexes have been investigated using experimental and computational techniques.^{17–19} As the reference N3 inhibitor, these compounds can covalently bind to the amino acids of the M^{Pro} active site, particularly with the Cys 145.^{17,19} For that purpose, the affinity S-Se and an unoccupied position in Re(I) complexes promote the covalent bond.

On the other hand, Casiopeinas are a family of ternary copper(II) compounds with the general formula [Cu(N-N)(L-L)]ⁿ⁺ ($n = 1,2$), where N-N represents methyl or phenyl substituted bipyridines or phenanthrolines. For their systematic study, these compounds have been categorized into families and generations according to the donor atoms they present. CasII family is characterized by the presence of 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline as a primary donor and CasIV family is characterized by 4,4'-dimethylbipyridine as an N-N fragment. An important exception is that regardless of the N-N fragment that the compound contains, if it has acetylacetonate or its derivatives as secondary donors, it belongs to the CasIII family. Concerning the Casiopeinas generations, in the first one, secondary L-L fragments are bidentate donors as aminoacids, salicylaldehydes or peptidates. In the second generation, this donor is a neutral species and finally, in the third generation of Casiopeinas, this fragment is a bioactive donor species as curcumin or indomethacin derivatives, among others. Bioactive donors, themselves, have several biological benefits such as antiinflammatory and anticarcinogenic activity.^{19,20} These compounds have shown antitumoral, antiparasitic and antibacterial activity.^{21–23} Biological assays suggest that Casiopeinas possess a multitarget action mechanism.^{23–26} In this regard, the copper center plays a central role in biological effect, and it can interact with several biomolecules.^{27–30} In addition, the metallic center triggers the overproduction of reactive oxygen species by

Cu^{II}/Cu^I redox-catalytic processes.³¹ The increase of radical species leads to cell damage. Particularly, the borderline Pearson acid nature of Cu^{II} and the electronic modulation provided by N-N and L-L donors, allows the complex the ability to bond with a variety of heteroatoms. For instance, the copper atom of Casiopeinas can form Cu-O and Cu-N bonds with phosphate groups and nitrogenous bases founded in DNA,^{29,32} and the interaction between glutathione and Casiopeinas can generate adducts by the Cu-S linkage.³³ Typically, Casiopeinas and related Cu^{II} compounds are pyramidal or octahedral compounds in solid state.^{34,35} The equatorial plane is constituted by the aromatic diimine (N-N) and the secondary (L-L) donors. Completing the coordination sphere, the nitrate (NO₃⁻) or aquo species can be found in axial positions. In aqueous solution, conductivity and electron paramagnetic resonance measurements suggest that the nitrate ligands can be replaced by solvent molecules.³⁶ In biological media, nucleotides^{37,38} and other relevant biological species^{27–30,32,33,35} interact with copper compounds through donor exchange mechanism. In Scheme 1, Casiopeinas examined in this study are presented.

Computational methods have become a fundamental part of drug discovery research.^{39,40} In this context, an *in silico* approach has been successfully applied to generate potential inhibitors of the M^{Pro} enzyme.¹³ This protocol makes it possible to discover systems that would otherwise go unnoticed and reveal interesting insights about the action mechanism. Molecular docking is one of the most important strategies used and it has been generally applied as a first approach in the computational drug design. This methodology allows to predict the interactions that stabilize the complex formed by a receptor (generally a protein or a nucleic acid) and a small molecule linked to it, at a molecular level. Docking protocols can be designed to maximize the conformational space sampling and estimate reliable free binding energies (ΔG_{U}). Therefore, they have been presented in successful and robust virtual screening studies in the search of potential main protease inhibitors.⁴¹ Free energy and the inhibition constant (K_{i}) are scoring parameters (intimately related) that predict the binding affinity between two species after they have docked, and they can estimate the efficiency of a specific ligand as an enzyme inhibitor, allowing to develop structure-activity relationships.⁴² Although molecular docking has been a widely used method, docking scores only provide a rough estimate of the affinity between two molecules and therefore, the results can be questioned without experimental validation that supports the simulations. To circumvent this, more precise and robust computational strategies are available. In this context, ONIOM (our own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics) is a practical alternative to overcome these disadvantages.⁴³ ONIOM calculations combine the accuracy of quantum mechanical (QM) methods and low-cost of molecular mechanics (MM) approaches to treat large systems. This resulted in producing reliable geometry and energy data at reduced computational time. In the last few decades, the QM:MM methods as ONIOM have proved their worth to offer adequate simulations of complex systems as metalloenzymes,⁴⁴ metal compounds bounded to



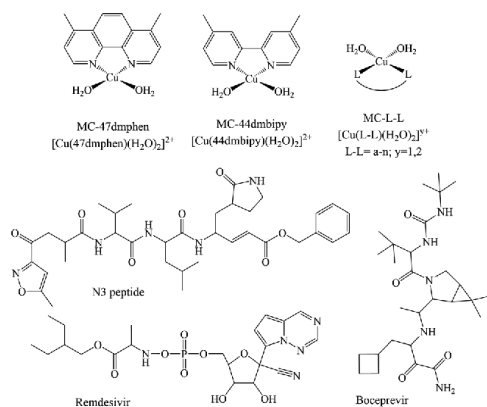
Compound formula	Abbreviation	Compound formula	Abbreviation
1a. [Cu(47dmphen)(acac)] ⁺	CasIII-Ea	2a. [Cu(44dmbipy)(acac)] ⁺	CasIII-ia
1b. [Cu(47dmphen)(tfacac)] ⁺	CasIII-Et	2b. [Cu(44dmbipy)(tfacac)] ⁺	CasIII-it
1c. [Cu(47dmphen)(hfacac)] ⁺	CasIII-Eh	2c. [Cu(44dmbipy)(hfacac)] ⁺	CasIII-ih
1d. [Cu(47dmphen)(sa)] ⁺	CasII-5ClSa	2d. [Cu(44dmbipy)(sa)] ⁺	CasIV-5ClSa
1e. [Cu(47dmphen)(5ClSa)] ⁺	CasII-sa	2e. [Cu(44dmbipy)(5ClSa)] ⁺	CasIV-sa
1f. [Cu(47dmphen)(ser)] ⁺	CasII-ser	2f. [Cu(44dmbipy)(ser)] ⁺	CasIV-ser
1g. [Cu(47dmphen)(his)] ⁺	CasII-his	2g. [Cu(44dmbipy)(his)] ⁺	CasIV-his
1h. [Cu(47dmphen)(tyr)] ⁺	CasII-tyr	2h. [Cu(44dmbipy)(tyr)] ⁺	CasIV-tyr
1i. [Cu(47dmphen)(gly)] ⁺	CasII-gly	2i. [Cu(44dmbipy)(gly)] ⁺	CasIV-gly
1j. [Cu(47dmphen)(GY)] ⁺	CasII-GY	2j. [Cu(44dmbipy)(GY)] ⁺	CasIV-GY
1k. [Cu(47dmphen)(ambz)] ²⁺	CasII-ambz	2k. [Cu(44dmbipy)(ambz)] ⁺	CasIV-ambz
1l. [Cu(47dmphen)(indo)] ⁺	CasII-indo	2l. [Cu(44dmbipy)(indo)] ⁺	CasIV-indo
1m. [Cu(47dmphen)(cur)] ⁺	CasII-cur	2m. [Cu(44dmbipy)(cur)] ⁺	CasIV-cur
1n. [Cu(47dmphen)(dmcur)] ⁺	CasII-dmcur	2n. [Cu(44dmbipy)(dmcur)] ⁺	CasIV-dmcur

Scheme 1 Casiopeinas examined in this study.

proteins⁴⁵ and DNA⁴⁶ among other biologically relevant macromolecules.⁴⁷

The structural features, the physicochemical properties, the interaction capability, and the multimodal biological mechanism make it possible to propose Casiopeinas as potential protease inhibitors. Due to this, in the present work, the interaction of the M^{Pro} enzyme with 28 Casiopeinas (Scheme 1) is presented. Additionally, we evaluated 16 related

Cu^{II} compounds called as monochelates (MC) with general formulae [Cu(N-N)(H₂O)₂]²⁺ and [Cu(L-L)(H₂O)₂]ⁿ⁺ (n = 1,2) to investigate the possible active form (Scheme 2). In addition, bioactive donors such as indomethacin, curcumin and dimethoxycurcumin (Scheme 1 l, n and m items, respectively) could have important protease inhibitor activity and they were also tested. Finally, the results of the above-mentioned compounds were compared with some well-known protease



Scheme 2 General structures of the 16 monocheleates with general formulae [Cu(N-N)(H₂O)₂]²⁺ and [Cu(L-L)(H₂O)₂]⁺ (*n* = 1,2), and N3 peptide, remdesivir and boceprevir that were also evaluated for comparison purposes.

inhibitors as boceprevir and N3 inhibitors and the antiviral remdesivir. All compounds were optimized by DFT methods, then docked to the M^{Pro} enzyme, and finally, only the most promising compounds regarding the docking scores were analyzed by quantum mechanics/molecular mechanics QM/MM hybrid ONIOM calculations.

Some agreements regarding chemical and biochemical language

Biochemistry and coordination chemistry share several concepts that, if not clarified, can make it difficult to read and understand studies involving both fields such as presented here. For instance, coordination compounds are generally known as complexes. Contrastingly, in a biochemical context, a protein bound to the small molecule is also called a complex. A similar scenario occurs with the concept of a ligand. In the field of proteins, a ligand is a substance capable of binding to a receptor (protein, nucleic acid, or any other biologically relevant molecule) for a biochemical purpose. In contrast, in coordination chemistry, a ligand is an ion or a molecule capable of forming a dative bond with an electron acceptor to form a coordination entity. In the context of this work, Casiopeinas and monocheleates can form complexes with M^{Pro} but they can also be complexes by themselves. Simultaneously, Casiopeinas and monocheleates are formed by several ligands (from the point of view of coordination chemistry), and are themselves ligands also when interacting with an enzyme to form the corresponding adducts (from a biochemical standpoint). To avoid any confusion and controversies, it is convenient to define the terms that will be used in this work:

- Complex or adduct: it will be the entity formed by M^{Pro} and any small molecule as Casiopeina, monocheleate, bioactive donor species or a reference inhibitor.

- Coordination compound: Casiopeinas will be called as coordination or copper compounds.

- Ligand: any molecule bound to the M^{Pro} enzyme will be called as a ligand. Casiopeinas and monocheleates can act as ligands when bonded to M^{Pro}.

- Donor: N-N and L-L fragments will be known as donors, primary and secondary donors, respectively.

Results and discussion

Casiopeinas and other ligands optimized geometries

Prior to docking studies, all Cu^{II} compounds were optimized using M06 functional and LanL2DZ pseudopotential. To corroborate the reliability of this calculation methodology (M06/Lan2DZ), theoretical bond distances and bond angles were computed and compared to crystallographic results of a series of copper compounds. This analysis is presented in Table S1 (ESI[†]). The obtained results indicate an excellent agreement between the calculated and experimental parameters.

To emulate and simplify their aqueous solution behavior, Casiopeinas were optimized as [Cu(N-N)(L-L)]ⁿ⁺ (*n* = 1,2) square planar complexes. Also, the diaquo-monocheleate complexes [Cu(N-N)(H₂O)₂]²⁺ and [Cu(L-L)(H₂O)₂]ⁿ⁺ (*n* = 1,2) were studied to simulate if those species could be generated by the replacement of the primary or the secondary ligand, respectively, by two water molecules in each case. Additionally, the three bioactive donor species were optimized employing the same DFT level. As previously stated, these molecules present anti-inflammatory and multifunctional capabilities. Finally, two M^{Pro}-SARS-CoV-2 inhibitors, N3 peptide and boceprevir, and the proposed COVID19 drug remdesivir were also optimized. The optimized geometries of CasII-gly, CasII-ambz, CasIV-cur, [Cu(indo)(H₂O)₂]⁺, dimethoxycurcumin and boceprevir are presented in Fig. 1. All coordination compounds (1a, 1b, 1c and 1d) present a square arrangement around the copper center. In some cases, geometrical deviations were observed. For instance, CasII-ambz (Fig. 1(b)) and CasIV-ambz (Fig. S1, ESI[†]) present a slightly distorted square geometry. Moreover, a peculiar feature is presented by the L-L groups that contain two oxygen as donor atoms (salicylaldehyde, acetylacetonate and curcumin analogs). These compounds show pseudo-aromatic features. For instance, CasIV-cur (Fig. 1(d)) presents strong Cu-O interactions (~1.9 Å), electron delocalization in the O-Cu-O bonds and a perfect plane along the coordination sphere. In the monocheleates, the distance of Cu-O(H₂O) is larger than the one found between the copper center and the atoms of primary or secondary donors, revealing the lability of the water molecules. For the indomethacin derivative (Fig. 1(a)), this distance is 0.3 Å longer. Remaining optimized geometries can be found in Fig. S1 (ESI[†]).

Complexes interaction and M^{Pro} inhibition study by molecular docking simulations

All compounds were docked to the M^{Pro} protein. In Table 1, the docking scores (ΔG_{U_i} , K_i) are presented for 6 best rated

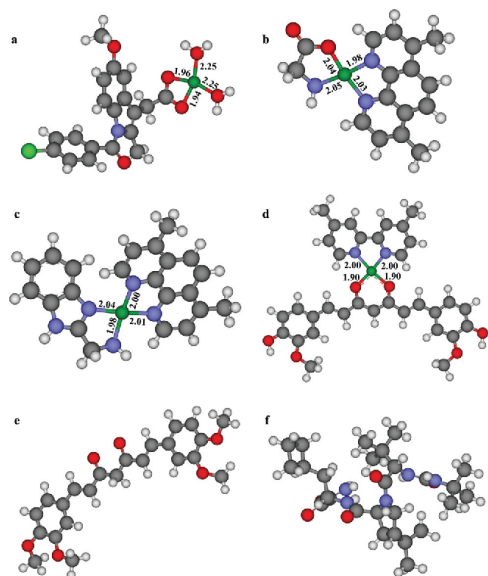


Fig. 1 Optimized M06/LanL2DZ structures of MC-indo (a), CasII-gly (b), CasII-ambz (c), CasIV-cur (d), dimetoxycurcumin (e) and boceprevir (f). Distances are in Å.

compounds (CasII-5ClSa, $[\text{Cu}(\text{indomethacin})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ (monochelate), CasII-ambz, CasIV-cur, CasIV-sa and CasII-tyr). For comparison purposes, N3 and boceprevir values can also be found. The best rated systems are those that present the best docking scores. A more negative ΔG_{U} value suggests an improved affinity, and a smaller K_{i} value could imply a higher inhibition potency. Clearly, the main goal to present only the 6 best rated compounds is to focus on systems with the greatest anti-SARS-CoV-2 potential.

In Table 1 are presented all the amino acids (AA's) that, according to molecular docking simulations, could be involved in stabilizing these systems. As an important methodological feature, theoretical K_{i} values agree with the experimental value found for boceprevir ($K_{\text{i}} = 1.18 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 8.0 \mu\text{M}$) and for N3 compound ($\text{IC}_{50} = 124.93 \mu\text{M}$),^{6,8,9} showing the reliability of the

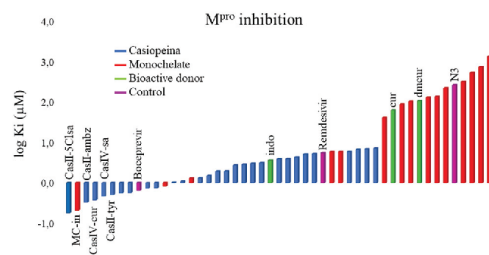


Fig. 2 Graph of $\log K_{\text{i}}$ for all compounds. Casiopeinas are represented by blue bars. These compounds show the more significant inhibitor M^{Pro} potential ($0.1 \mu\text{M} < K_{\text{i}} < 10 \mu\text{M}$, $\log K_{\text{i}} > 1.0 \mu\text{M}$).

employed docking protocol. The most promising compounds are the CasII-5ClSa, $[\text{Cu}(\text{in})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$, CasII-ambz, CasIV-cur, CasIV-sa and CasII-tyr derivatives. All these Casiopeinas present better docked scoring values than the references. This suggests that these compounds could form more stable complexes than boceprevir (more negative binding energies, ΔG_{U} between 0.5 and 1.1 kcal mol⁻¹) and potentially they could present a better inhibition efficiency (K_{i} values are in nanomolar order). Docking score values for all compounds are summarized in Table S2 (ESI[†]).

The inhibition score values of all studied compounds are shown in Fig. 2. Because the range of calculated K_{i} values is wide (0.1–1000 mmol L⁻¹), $\log K_{\text{i}}$ provides a better description of this phenomenon. In Fig. 2, Casiopeinas are represented by blue bars, monochelates, bioactive donors and well-recognized inhibitors that correspond to red, green, and purple bars, respectively. In general, Casiopeinas could produce more stable complexes than monochelates, bioactive donor species and boceprevir with M^{Pro} . In addition, Fig. S2 (ESI[†]) presents this analysis considering ΔG_{U} (kcal mol⁻¹) instead of $\log K_{\text{i}}$. The binding and inhibition values present the expected trend, *i.e.*, the more stable the complex formed with a certain ligand, the more this agent will be able to efficiently inhibit the activity of the protein. By forming stable complexes, the enzyme's catalytic sites could be blocked, and its natural function can be inhibited. When examining the results presented in Fig. 2, they suggest that Casiopeinas could inhibit M^{Pro} function more efficiently over other compounds. All Casiopeinas show score values below 10 μM L⁻¹, many of them have K_{i} values in

Table 1 Docking scores and potential interactions for the best rated M^{Pro} -ligand adducts

Ligand	ΔG_{U} (kcal mol ⁻¹)	K_{i} (μM) [$\log K_{\text{i}}$]	AA's (M^{Pro} -Cas)
CasII-5ClSa	-9.25	0.18 [-0.74]	His41, Cys44, Met49, Pro52, Tyr54, Cys145, His163, Met165, Glu166, Arg188, Gln189
MC-indo	-9.12	0.21 [-0.68]	His41, Met49, Tyr54, Phe140, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Leu167, His172, Gln189
CasII-ambz	-8.84	0.33 [-0.48]	Thr26, His41, Met49, Asn142, Cys145, His163, Met165, Gln189
CasIV-cur	-8.76	0.38 [-0.42]	Thr26, His41, Met49, Cys145, His164, His165, Glu166, Gln189
CasIV-sa	-8.74	0.46 [-0.34]	His41, Met49, Pro52, His163, Met165, Glu166, Gln189
CasII-tyr	-8.58	0.51 [-0.29]	His41, Asn142, Cys145, His163, Met165, Glu166, Gln189
Boceprevir ^a	-8.17	0.64 [-0.19]	His41, Met49, Asn142, Ser144, Gly143, Cys145, His164, Met165, Glu166, Gln189
N3 ^b	-4.89	162.3 [2.42]	His41, Met49, Asn142, Gly143, Cys145, His163, Met165 Y Gln189

^a Boceprevir: $\text{IC}_{50} = 8.0 \mu\text{M}$, $K_{\text{i}} = 1.18 \mu\text{M}$ ^{8,9} ^b N3 peptide: $\text{IC}_{50} = 124.9 \mu\text{M}$ ⁶

nanomolar order ($\log K_i > 0$). The specificity suggests that the ternary compound could be the active inhibition species.

Furthermore, Cas:M^{Pro} complexes could be stabilized by several interactions such as π -charge, hydrogen bonds (classic and non-conventional), π - π stacking, among others. The complex formed by the best rated compound, CasII-5ClSa, and M^{Pro} is presented in the right side of Fig. 3. Also, the left side of the Figure shows, in 2D and 3D diagrams, the stabilizing interactions to facilitate their localization.

As stated before, DFT optimizations show that CasII-5ClSa presents a planar arrangement and a pseudo-aromatic nature, features that allow to bind to up to five protease residues responsible for the protease activity (His41, Met49, Cys145, His163 and Gln189). This indicates that this compound could strongly inhibit the natural M^{Pro} function. In the complex stabilization, the Cu^{II} center participates in two π -charge interactions with His41 and Glu166 residues, respectively. The aromaticity of the salicylaldehyde donor promotes π -interactions with Cys145 (S/π interaction), the chlorine substituent generates a non-conventional halogen bond with Phe140 and π - π interaction with His163. S/π interactions are formed between π -electrons of aromatics and the lone pair of the sulfur atom. These interactions are important in protein folding/unfolding and therefore in their stabilization.⁴⁸ The 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline moiety completes the stabilizing interactions and is the fragment in which the most contacts can take place, interacting mainly through π -effects, and by alkyl interactions with methyl groups. Other interesting compounds are the curcumin analogues, CasII-cur and CasIV-cur. The analysis of these complexes can offer valuable information on the diimine influence of Casiopeinas acting as

protease inhibitor systems. Fig. 4 shows 3D diagrams with the main interactions for curcumin derivatives in the docked complexes.

As can be observed, both compounds, CasII-cur and CasIV-cur could be interacting with almost the same residues. Due to the structural similarity, this pattern is observed for all the studied Casiopeinas. Because ΔG_U values for Casiopeinas under study do not exceed 0.5 kcal mol⁻¹, it is possible to assume that both families, CasII and CasIV present similar affinity for the protease. Nevertheless, the inhibition values can drastically vary, and in some cases, the K_i magnitude can duplicate, and thus, it is worth to examine the differences between the two derivatives. Considering the curcumin compounds, CasIV-cur could interact with more residues compared to CasII-cur. Both compounds are attached *via* diimine to four amino acids (three of them are the same: His41, Met49 and Gln189), but the difference arises from the curcumin moiety. Apparently, the size of phenanthroline causes steric hindrance, decreasing the number of interactions in which these compounds can be involved, and reducing the stabilization energy and thus, its inhibition potential. An opposite trend was observed for CasII-ambz, CasIV-ambz, CasII-indo and CasIV-indo (Fig. S3, ESI[†]) derivatives, suggesting that steric effects of the primary donor are not the only factor to consider in the interaction path. These observations and the poor ability of monochelates to bind to the enzyme indicate that the specific combination of both donors is fundamental to improve the ability of Casiopeinas to interact with M^{Pro}. The curcuminoid derivatives (CasII-cur, CasIV-cur, CasII-dmcur and CasIV-dmcur) are among the best evaluated compounds. The curcumin fragments have a great capacity of interaction and, therefore, can

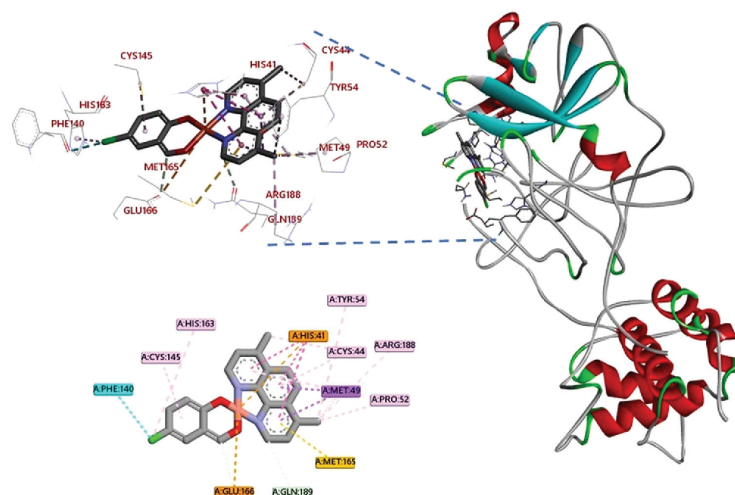


Fig. 3 Docked simulations of the CasII-5ClSa:M^{Pro} complex. In the right side can be found the complete complex. In the top of the left side is shown a 3D diagram with the principal connections between the Casiopeina and protein. 2D diagrams are at the bottom of the left side.

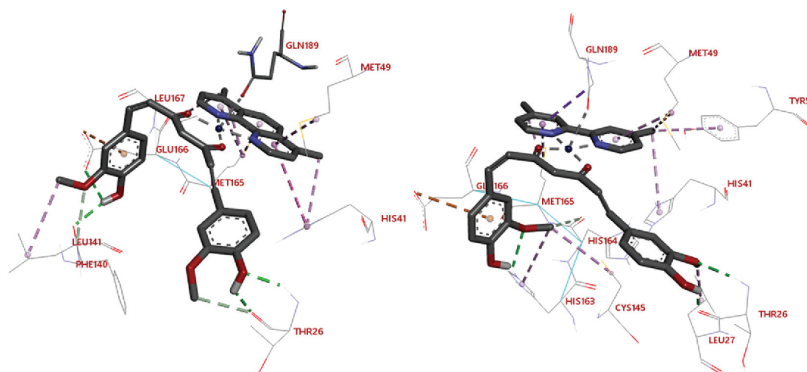


Fig. 4 3D interaction diagrams of CasII-cur:MP^{pro} (left) and CasIV-cur:MP^{pro} (right) complexes. To recognize principal interactions, most of the protein was removed. Only the main interactions were presented. Both complexes show similar affinity for the M^{pro} active site. CasII-cur presents $\Delta G_U = -8.76$ kcal mol⁻¹ and CasIV-cur, $\Delta G_U = -8.53$ kcal mol⁻¹.

stand out as promiscuous ligands. These derivatives have been proposed that can interact with multiple SARS-CoV-2 targets⁴⁹ and potentially, they can exhibit distinct pharmacological effects.⁵⁰

Although the presence of both donors is necessary, to find the best candidates to inhibit the action of M^{pro}, the L-L moiety has been considered to be most significant, as it seems to have the greatest influence on complex stabilization and its potential to disrupt the protease action. Curcumin and dimethoxycurcumin fragments can form several hydrogen bonds with active site residues as His163 and Thr26. This same phenomenon is repeated with the 2-aminomethylbenzimidazole and indomethacin moieties, both can generate donors and acceptors of hydrogen bonds. Molecules that contain classical and non-conventional hydrogen bonds produce compounds that show an improved inhibition potential.^{51–53} Fig. S4 (ESI[†]) presents the 2D diagrams of stabilizing complex interactions for the remaining best rated compounds.

In most of the studied cases, the copper atom could be participating as an electrostatic species mainly forming π -charge interactions. In summary, docking simulations suggest that the metal center of the Casiopeinas with tyrosine, curcumin and dimethoxycurcumin could produce a coordination bond with a carbonyl group of Gln189. This fact highlights the importance of the residue in the complex stabilization and the inhibition of the protease activity. Finally, the restrictions of molecular docking make it necessary to explore these potential bonds with more accurate computational models.

Analysis on the copper center in Cas:M^{pro} interaction. ONIOM calculations

ONIOM study was performed to describe accurately Cas:M^{pro} interaction. This approach offers detailed insights about the role of the copper center, and the donors in the complex stabilization. Additionally, several key interactions can be analyzed with a low-cost methodology.

In general, the optimized geometries obtained with ONIOM slightly differ from docking results. However, these deviations lead to enhanced interactions between tested Casiopeinas and the main protease of SARS-CoV-2. Fig. 5 shows the adduct formed between CasII-5ClSa and the pocket of the M^{pro} enzyme by the most important interactions in the ONIOM high layer.

ONIOM calculations suggest several favorable interactions between CasII-5ClSa and the M^{pro} residues around the metallic compound. The closest amino acids are His41, His163 and Gln189, all of them are crucial for enzyme function.^{6,7} The diimine moiety interacts with His41 through a π -stacking, π -charge Cu \cdots N and a H-bond O \cdots H. The chlorine substituent and the polar hydrogen atom of protonated His163 produce a classic Cl \cdots H interaction. Furthermore, the carbonyl group of Gln189 interacts electrostatically with the metallic center. Likewise, this amino acid can form non-conventional H \cdots O and H \cdots N H-bonds. For the salicylaldehyde analog, CasIV-sa (Fig. S6a, ESI[†]), a similar interaction would be expected, except for the loss of the Cl atom. However, an important change was

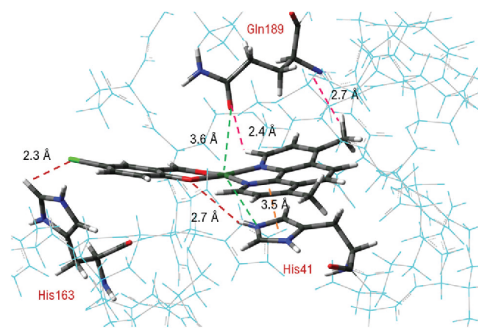


Fig. 5 Complex CasII-5ClSa:M^{pro}_{pocket}

found during the complex optimization. The lack of one Cu-O (C=O, salicylaldehyde) bond and the formation of Cu-O(C=O of Leu167) were observed. These donor exchanges radically alter the conformation of the complex from that observed in molecular docking. Only two H-bonds (H...O Gln189 and O...H His41) were established. These changes diminish the energy interaction regarding the CasII-5CIsa analog (see below).

On the other hand, the CasIV-cur:M^{Pro} complex is stabilized with five H...O and H...N H-bonds and one Cu-O coordination bond. Fig. 6 shows a close-up of the complex high layer. Three classic and one non-conventional H-bonds were found between CasIV-cur and Thr26. His163 of the active site interacts with the curcumin moiety through these same intermolecular forces. These results indicate that the curcumin donor is essential for complex stabilization because its hydroxyl groups act as H-bond donors/acceptors. Moreover, methoxyl substituents can develop similar interactions. 2.2 Å is the Cu-O distance in the characteristic range of a coordination bond.⁵⁴ This interaction is also observed for CasII-ambz (Fig. 7) and CasII-tyr (Fig. S6b, ESI†) compounds. Therefore, Gln189 could be an interesting target to study the inhibition of the protease catalytic activity through its binding to copper compounds.

The optimized geometry of CasII-ambz shows differences with the docking pose. It is the only compound that was stabilized with four amino acids surrounding it. However, the ONIOM calculation shows that His163 moves away from the Casiopeina and no observable interactions were detected. As in CasIV-sa, CasII-ambz undergoes a lack of a coordination bond. In this case, the breaking of the Cu-N(-NH₂ of 2-aminomethylbenzimidazole) bond and the formation of Cu-O(C=O of Gln189) produce a tetrahedral geometry around the copper atom. The CasII-ambz and CasII-sa:M^{Pro} pocket complexes are the unique examples of this type of arrangement in the

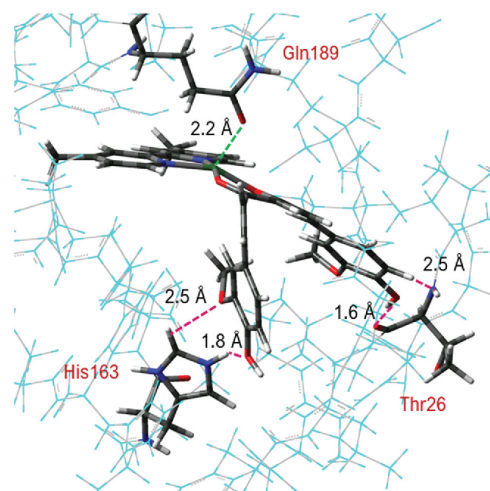


Fig. 6 Close-up of the high layer of the CasIV-cur:M^{Pro} pocket complex.

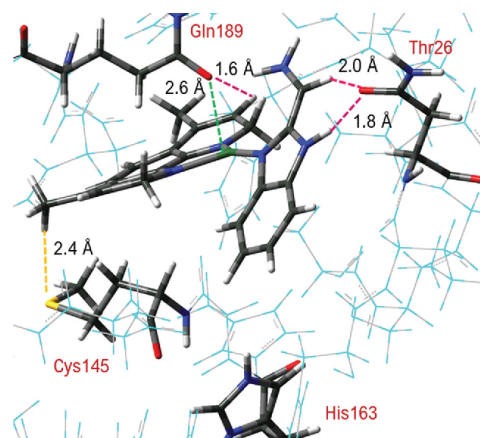


Fig. 7 Close-up of the high layer of the CasII-ambz:M^{Pro} pocket complex.

ONIOM calculations. Additionally, the Gln189 closeness gets up a strong H...O interaction (1.6 Å). Even the CasIV-ambz analog (Fig. S6c, ESI†) does not show this tetrahedral rearrangement. As in CasIV-cur, the auxiliary donor (2-aminomethylbenzimidazole) can form classic and non-conventional H-bonds with Thr26. Above observations suggest that this residue would also be fundamental in the anchorage of some Casiopeinas to the active site of M^{Pro}. Moreover, all results suggest that the secondary donor could be fundamental to the complexes' stabilization by hydrogen interactions. Completing the interaction forces, an unconventional S...H linkage was observed. That interaction has already been observed in PAXLOVID¹⁴ and other metal protease inhibitors.⁵⁵⁻⁵⁷

ONIOM calculations revealed that the structural diversity of Casiopeinas can enhance the stabilization of the Cas:M^{Pro} complexes. To sum up, while the N-N fragment can interact through π -interactions, L-L forms H-bonds primarily, and the copper atom is able to bind to several M^{Pro} residues. In addition, some of these compounds take advantages of their pseudo aromaticity to generate more interactions. Finally, other compounds can lose the Cu-N bond to form stable complexes. ONIOM simulations indicate that the Casiopeinas structure forms a greater number of interactions than suggested by molecular docking. However, the energetics is fundamental to fully understand the interactions in the complexes. Total electronic interaction energy ΔE_{int} was used to quantify the intermolecular stabilization of the Cas:M^{Pro} complexes. Table 2 presents ΔE_{int} values.

The electronic interaction energy contains both VdW, electrostatic contributions and a polarization of the compound wave function by the electrostatic field of the protein. For that, although the system employed in ONIOM calculations is smaller than that used in docking simulations, the obtained energy is supposed to be more accurate. Moreover, both energy calculations follow the same affinity trend (probably inhibition as well).

Table 2 Electronic interaction energies of the M^{Pro} pocket and Casiopeinas

Compound	ΔE_{int} (kcal mol ⁻¹)
CasII-5Clsa	-98.52
CasII-ambz	-82.73
CasIV-cur	-78.66
CasIV-sa	-72.19
CasII-tyr	-66.44

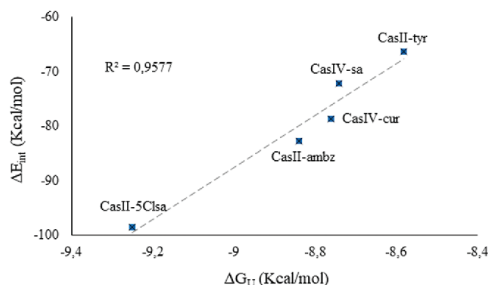


Fig. 8 Correlation of free binding (ΔG_U) and electronic interaction (ΔE_{int}) energies ΔG_U is the scoring function from molecular docking simulations and the ΔE_{int} energy from intermolecular interactions in the ONIOM calculations.

The correlation is presented in Fig. 8. Although this result could validate the accuracy of the computational protocol, experimental validation is necessary. The offered insights help to screen the most promising Casiopeinas and identify the interactions that could potentially promote the inhibition of the M^{Pro} enzyme. At the same time, these findings can help in the design of experiments that are suitable to exploring the proposed inhibitory mechanisms. For this reason, it is planned to carry out inhibitory tests with the enzyme and the best rated Casiopeinas in subsequent studies.

Conclusions

In this work, fifty compounds were studied as M^{Pro} inhibitor agents. Casiopeinas and related copper compounds have a planar arrangement around the metallic center. That result agrees with literature reports for aqueous solution. The molecular docking findings showed that all compounds can form stable complexes with the M^{Pro} of SARS-CoV-2. The interactions founded suggest potential inhibition of the protease activity of the enzyme. Casiopeinas presented higher efficiency compared to proven protease inhibitors. The best rated compounds can bound to the amino acids responsible for the catalytic enzyme function. Several interactions stabilize Cas:Mpro complexes, among them, the N-N moiety can produce many effects (p-stacking, p-alkyl and p-charge). ONIOM calculations reveal the role of the Casiopeinas copper atom and the L-L fragment in its stabilization at the M^{Pro} active site. The copper atom can covalently bond with Gln189, and the L-L fragment is bound to

residues such as His163 or Cys145, through classic and no-conventional H-bonds. Thr26 functions as an anchor of the coordination compound to the M^{Pro} pocket. Molecular docking and ONIOM calculations predict that Casiopeinas can interact and potentially inhibit the function of the main protease of SARS-CoV-2 through its interaction with key amino acids of the enzyme.

Computational methods

Geometry optimization and atomic charges estimation

Computational calculations were carried out in Gaussian 09⁵⁸ using Density Functional Theory (DFT) calculations. The second generation Minnesota M06 functional⁵⁹ was employed, and the Los Alamos LanL2DZ⁶⁰ basis set was applied to describe all the atoms. This methodology has shown reliability to calculate both energetic and structural features of Cu^{II} complexes, including Casiopeinas.^{32,36,61,62} As far as possible, experimental X-ray information was taken into account. Removing the apical NO_3 fragment from known Casiopeinas crystals, square complexes were obtained and used as starting point geometries. Remaining compounds were constructed manually in GaussView6. To simulate solvent (H_2O) effects, a SMD protocol⁶³ was employed. No imaginary frequencies were detected confirming that the optimized geometries correspond to a local minimum on the potential energy surface. NBO analysis was used to estimate atomic charges for molecular docking simulations.

Molecular docking

The crystal structure of main protease M^{Pro} was obtained from protein data bank, PDB ID: 6LU7.⁶ Prior to docking studies, M^{Pro} and the tested compounds (Casiopeinas, monochelates, bioactive species and inhibitors) were prepared as follows. In the protein, a monomer, water molecules and inhibitors were removed. Then, polar hydrogens and Gasteiger charges were added using MGL Tools 1.5.6 software,⁶⁴ and this modified structure was saved as the pdbqt file. The optimized structures of all ligands were saved to pdbqt files, and the estimate atomic charges were added manually. The docking studies were carried out using AutoDock 4.2 software.⁶⁴ A genetic algorithm study inside the M^{Pro} -Ligand (M^{Pro} -L) complex centered at $x: -14.666$, $y: 16.284$, $z: 69.417$ and grid size of $45 \times 45 \times 45 \text{ \AA}^3$ with spacing 0.375 \AA was performed. 150 individuals in population with 2.5×10^4 evaluations resulted in 10 docked poses. For the most stable conformation, docking scores (free binding energy, ΔG_U and inhibition constant, K_i) were reported. Finally, that docked conformation was analyzed using the Discovery Studio 2021⁶⁵ graphic interface.

QM:MM ONIOM

As it is still not possible to treat the complete Casiopeina- M^{Pro} system using pure quantum mechanics (QM) calculations and to obtain a more accurate description of the interaction between the coordination compounds and M^{Pro} , quantum mechanics/molecular mechanics (QM:MM) hybrid calculations

were performed. In QM/MM calculations, the ONIOM³⁴ protocol was employed. This methodology has been successfully applied in the treatment of large systems that contain metal compounds bonded to biologically relevant molecules.^{44–47} ONIOM methods allow to apply different levels of theory to different fragments of the analyzed system to produce reliable structural, and this energetically results to very large systems at a relatively reduced computational cost. Only the compounds that showed the best scoring in molecular docking simulations were explored using this approach. The starting point geometry corresponds to the ligand and the amino acids on the protein pocket (M^{PFO}_{pocket}) of the best rated docking conformation. Remaining residues were removed using Discovery Studio 09 software. Then, the amino acids of the M^{PFO}_{pocket} were manually completed with GaussView 6. Charges of amino acids were treated appropriately: glutamate and aspartate residues were assigned as negative, while lysine and arginine residues were assigned as positive. This model is known as the “active site only” and it has demonstrated reliability in the prediction of the structure and reactivity of metal-protein systems.^{66–68} QM:MM calculations were made on Gaussian 09 in water using the SMD model. Two layers were employed to define the complete systems. The high layer (QM) corresponds to the ligand and the closest amino acids (> 4.0 Å), and the low layer (MM) is constituted by remaining residues. The optimization was made in two steps. First, the vdW interactions between M^{PFO} and the copper compounds were considered. The Casiopeina and the closest residues were computed using M06/LanL2DZ methodology, and the remaining residues were simulated with the universal force field (UFF).⁶⁹ In the second stage, the geometry was re-optimized considering the partial charges in the system. Both vdW and electrostatic interactions were studied. The charges in the MM calculations were assigned using the charge equilibration (QE) formalism.⁷⁰ Zero imaginary frequencies confirm that the minimized structures are local minima. The electronic energies were computed by single point calculations from the optimized system.

Interaction energy (ΔE_{int}) of the protein–ligand interaction was calculated as the sum of the following electronic energies:

$$\Delta E_{int} = E_{tot} - (E_{pM^{PFO}} + E_{Cas})$$

where E_{tot} is the ONIOM energy of the complete system (M^{PFO} + Cas), $E_{pM^{PFO}}$ is the ONIOM energy of the high layer and low layer amino acids of the M^{PFO} pocket, and E_{Cas} is the energy of the Casiopeina in the high layer calculation.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank UNAM-DGTIC (projects LANCAD-UNAM-DGTIC-358 and UNAM-DGTIC-COVID-005) for the supercomputer

resources and technical support. LGTC thanks CONACYT-CVU 689679 for the scholarship.

References

- 1 WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int/> (accessed April 2022).
- 2 NIH COVID-19 treatment guidelines. Antiviral therapy, Remdesivir. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/antiviral-therapy/remdesivir/> (accessed April, 2022).
- 3 P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder and V. Thiel, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, **19**, 155–170.
- 4 P. Zhou, X. L. Yang, X. G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H. R. Si, Y. Zhu, B. Li, C. L. Huang, H. D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R. D. Jiang, M. Q. Liu, Y. Chen, X. R. Shen, X. Wang, X. S. Zheng, K. Zhao, Q. J. Chen, F. Deng, L. L. Liu, B. Yan, F. X. Zhan, Y. Y. Wang, G. F. Xiao and Z. L. Shi, *Nature*, 2020, **579**, 270–273.
- 5 F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y. M. Chen, W. Wang, Z. G. Song, Y. Hu, Z. W. Tao, J. H. Tian, Y. Y. Pei, M. L. Yuan, Y. L. Zhang, F. H. Dai, Y. Liu, Q. M. Wang, J. J. Zheng, L. Xu, E. C. Holmes and Y. Z. Zhang, *Nature*, 2020, **579**, 265–269.
- 6 Z. Jin, X. Du, Y. Xu, Y. Deng, M. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, X. Li, L. Zhang, C. Peng, Y. Duan, J. Yu, L. Wang, K. Yang, F. Liu, R. Jiang, X. Yang, T. You, X. Liu, X. Yang, F. Bai, H. Liu, X. Liu, L. W. Guddat, W. Xu, G. Xiao, C. Qin, Z. Shi, H. Jiang, Z. Rao and H. Yang, *Nature*, 2020, **582**, 289–293.
- 7 K. Ampornpanai, X. Meng, W. Shang, Z. Jin, M. Rogers, Y. Zhao, Z. Rao, Z. J. Liu, H. Yang, L. Zhang, P. M. O'Neill and S. S. Hasnain, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 3061.
- 8 C. Ma, M. D. Sacco, B. Hurst, J. A. Townsend, Y. Hu, T. Szeto, X. Zhang, B. Tarbet, M. T. Marty, Y. Chen and J. Wang, *Cell Res.*, 2020, **30**, 678–692.
- 9 L. Fu, F. Ye, Y. Feng, F. Yu, Q. Wang, Y. Wu, C. Zhao, H. Sun, B. Huang, P. Niu, H. Song, Y. Shi, X. Li, W. Tan, J. Qi and G. F. Gao, *Nat. Commun.*, 2020, **11**, 4417.
- 10 G. Kokic, H. S. Hillen, D. Tegunov, C. Dienemman, F. Seitz, J. Schimtzova, L. Farnung, A. Siewart, C. Höbartner and P. Cramer, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 279.
- 11 F. I. Kahn, T. Kang, H. Ali and D. Lai, *Font. Pharmacol.*, 2021, **12**, 710778.
- 12 H. L. Nguyen, N. Q. Thai, D. C. Truong and M. S. Li, *J. Phys. Chem. B*, 2020, **124**(50), 11337–11348.
- 13 M. Jukić, B. Škrlić, G. Tomšić, S. Pleško, Č. Podlipnik and U. Bren, *Molecules*, 2021, **26**(10), 3003.
- 14 D. R. Owen, C. M. N. Allerton, A. S. Anderson, L. Aschenbrenner, M. Avery, S. Berritt, B. Boras, R. D. Cardin, A. Carlo, K. J. Coffman, A. Dantonio, L. Di, H. Eng, R. A. Ferre, K. S. Gajiwala, S. A. Gibson, S. E. Greasley, B. L. Hurst, E. P. Kadar, A. S. Kalgutkar, J. C. Lee, J. Lee, W. Liu, S. W. Mason, S. Noell, J. J. Novak, R. S. Obach, K. Ogilvie, N. C. Patel, M. Pettersson, D. K. Rai, M. R. Reese, M. F. Sammons, J. G. Sathish, R. S. P. Singh,

- C. M. Steppan, A. E. Stewart, J. B. Tuttle, L. Updyke, P. R. Verhoest, L. Wei, Q. Yang and Y. Zhu, *Science*, 2021, **374**, 1586–1593.
- 15 J. Karges and S. M. Cohen, *ChemBioChem*, 2021, **22**, 2600–2607.
- 16 M. Gil-Moles, U. Basu, R. Büssing, H. Hoffmeister, S. Türc, A. Varchmin and I. Ott, *Chem. – Eur. J.*, 2020, **26**, 15140–15144.
- 17 C. Ma, Y. Hu, J. A. Townsend, P. I. Lagarias, M. T. Marty, A. Kolocouris and J. Wang, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2020, **3**(6), 1265–1277.
- 18 J. Karges, M. Kalaj, M. Gembicky and S. M. Cohen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2021, **60**, 10716–10723.
- 19 V. Furlan, J. Konc and U. Bren, *Molecules*, 2018, **23**(12), 3351.
- 20 J. R. Vane, *Nat. New Biol.*, 1971, **231**, 232–235.
- 21 Y. Rufino-González, M. Ponce, J. C. García-Ramos, M. N. Martínez-Gordillo, R. Galindo-Murillo, A. González-Maciel, R. Reynoso-Robles, A. Tovar-Tovar, M. Flores-Alamo, Y. Toledano-Magaña and L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.*, 2019, **195**, 83–89.
- 22 A. R. Barbosa, K. R. Caleffi-Ferracioli, C. Q. F. Leite, J. C. García-Ramos, Y. Toledano-Magaña, L. Ruiz-Azuara, V. L. D. Siqueira, F. R. Pavan and R. F. Cardoso, *Chemotherapy*, 2015, **16**(61), 249–255.
- 23 J. C. García-Ramos, A. Grizett Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, Y. Toledano-Magaña, A. L. Alonso-Sáenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, C. Mejía and L. Ruiz-Azuara, *Biomaterials*, 2017, **20**(1), 43–58.
- 24 C. Silva-Platas, C. A. Villegas, Y. Oropeza-Almazán, M. Carrancá, A. Torres-Quintanilla, O. Lozano, J. Valero-Elizondo, E. C. Castillo, J. Bernal-Ramírez, E. Fernández-Sada, L. F. Vega, N. Treviño-Saldaña, H. Chapoy-Villanueva, L. Ruiz-Azuara, C. Hernández-Brenes, L. Elizondo-Montemayor, C. E. Guerrero-Beltrán, K. Carvajal, M. E. Bravo-Gómez and G. García-Rivas, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2018, 8949450.
- 25 J. Serment-Guerrero, M. E. Bravo-Gomez, E. Lara-Rivera and L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **166**, 68–75.
- 26 C. Campero-Peredo, M. E. Bravo-Gómez, S. L. Hernández-Ojeda, S. R. Olguin-Reyes, J. J. Espinosa-Aguirre and L. Ruiz-Azuara, *Toxicol. In Vitro*, 2016, **33**, 16–22.
- 27 I. Correia, S. Borovic, I. Cavaco, C. P. Matos, S. Roy, H. M. Santos, L. Fernandes, J. L. Capelo, L. Ruiz-Azuara and J. Costa Pessoa, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **175**, 284–297.
- 28 M. E. Bravo-Gómez, C. Campero-Peredo, D. García-Conde, M. J. Mosqueira-Santillán, J. Serment-Guerrero and L. Ruiz-Azuara, *Polyhedron*, 2015, **102**, 530–538.
- 29 Y. Figueroa-DePaz, K. Resendiz-Acevedo, S. G. Dávila-Manzanilla, J. C. García-Ramos, L. Ortiz-Frade, J. Serment-Guerrero and L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.*, 2022, **231**, 111772.
- 30 R. Alemón-Medina, M. E. Bravo-Gómez, M. I. Gracia-Mora and L. Ruiz-Azuara, *Toxicol. In Vitro*, 2011, **25**, 868–873.
- 31 A. Grizett Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J. C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara and C. Mejía, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **126**, 17–25.
- 32 R. Galindo-Murillo, J. C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T. E. Cheatham and F. Cortés-Guzmán, *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 5364–5376.
- 33 L. G. Ramírez-Palma, A. Espinoza-Guillén, F. Nieto-Camacho, A. E. López-Guerra, V. Gómez-Vidales, F. Cortés-Guzmán and L. Ruiz-Azuara, *Molecules*, 2021, **26**, 5729.
- 34 A. Tovar-Tovar, J. C. García-Ramos, M. Flores-Alamo and L. Ruiz-Azuara, *Acta Crystallogr.*, 2011, **E67**, m1796–m1797.
- 35 A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza and M. J. Rosales-Hoz, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1045–1053.
- 36 V. Ugone, F. Pisanu, D. Sana and E. Garriba, *J. Inorg. Biochem.*, 2021, **224**, 111566.
- 37 J. C. García-Ramos, A. Tovar-Tovar, J. Hernández-Lima, F. Cortés-Guzmán, R. Moreno-Esparza and L. Ruiz-Azuara, *Polyhedron*, 2011, **30**, 2697–2703.
- 38 R. Galindo-Murillo, J. Hernández-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara and R. Moreno-Esparza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 14510–14515.
- 39 A. Maruca, F. Ambrosio, A. Lupia, I. Romeo, R. Rocca, F. Moraca, C. Talarico, D. Bagetta, R. Catalano, G. Costa, A. Artese and S. Alcaro, *Phys. Sci. Rev.*, 2019, **4**(6), 20180113.
- 40 A. Lupia, F. Moraca, D. Bagetta, A. Maruca, F. A. Ambrosio, R. Rocca, R. Catalano, I. Romeo, C. Talarico, F. Ortuso, A. Artese and S. Alcaro, *Phys. Sci. Rev.*, 2020, **5**(5), 20180114.
- 41 M. Jukić, D. Janežič and U. Bren, *Molecules*, 2020, **25**(24), 5808.
- 42 D. A. Craig, *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, **14**(3), 89–91.
- 43 M. Svensson, S. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber and K. Morokuma, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 19357–19363.
- 44 L. W. Chung, H. Hirao, X. Li and K. Morokuma, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, 327–350.
- 45 H. Farrokhpour, H. Hadadzadeh, F. Darabi, F. Abyar, H. A. Rudbari and T. Ahmadi-Bagheri, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 35390–35404.
- 46 M. Dehkhodaei, M. Sahihi, H. A. Rudbari and F. Momenbeik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2018, **23**, 181–192.
- 47 L. W. Chung, W. M. C. Sameera, R. Ramozzi, A. J. Page, M. Hatanaka, G. P. Petrova, T. V. Harris, X. Lin, Z. Ke, F. Liu, H. Li, L. Ding and K. Morokuma, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 5678–5796.
- 48 A. L. Ringer, A. Senenko and C. D. Sherrill, *Protein Sci.*, 2007, **16**(10), 2216–2223.
- 49 B. A. C. Rattis, S. G. Ramos and M. R. N. Celes, *Front. Pharmacol.*, 2020, **12**, 675287.
- 50 W. M. Atkins, *FEBS J.*, 2020, **287**, 1306–1322.
- 51 Y. Itoh, Y. Nakashima, S. Tsukamoto, T. Kurohara, M. Suzuki, Y. Sakae, M. Oda, Y. Okamoto and T. Suzuki, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 767.
- 52 D. Chen, N. Oezguen, C. Ferguson, S. M. Dann and T. R. Savidge, *Sci. Adv.*, 2016, **2**, e1501240.
- 53 U. Gowthaman, M. Jayakanthan and D. Sundar, *BMC Bioinf.*, 2008, **9**, s12–s14.
- 54 I. Persson, D. Lundberg, E. G. Bajnóczi, K. Klementiev, J. Just and K. G. V. Sigfridsson Clauss, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**(14), 9538–9550.
- 55 K. Sargsyan, C. C. Lin, T. Chen, C. Grauffel, Y. P. Chen, W. Z. Yang, H. S. Yuan and C. Lim, *Chem. Sci.*, 2020, **11**, 9904–9909.

- 56 C. Ma, Y. Hu, J. A. Townsend, P. I. Lagarias, M. T. Marty, A. Kolocouris and J. Wang, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2020, **3**, 1265–1277.
- 57 J. Karges, M. Kalaj, M. Gembicky and S. M. Cohen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2021, **60**, 10716–10723.
- 58 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09*, Gaussian Inc, Wallingford, 2009.
- 59 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, 2008, **120**, 215–241.
- 60 M. Dolg, U. Wedig and H. Stoll, *J. Chem. Phys.*, 1989, **90**, 1730–1734.
- 61 J. Baldenebro-López, J. Castorena-González, N. Flores-Olguín, J. Almaral-Sánchez and D. Glossman-Mitnik, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**(12), 16005–16019.
- 62 M. Reina, L. F. Hernández-Ayala, M. E. Bravo-Gómez, V. Gómez-Vidales and L. Ruiz-Azuara, *Inorg. Chim. Acta*, 2021, **517**, 120201.
- 63 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 6378–6396.
- 64 G. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. Sanner, R. Belew, D. Goodsell and A. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**(16), 2785–2791.
- 65 *BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio 2021, V.21 1.0*, Dassault Systèmes, San Diego, 2020.
- 66 A. Bassan, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn and L. Que, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 2939–2941.
- 67 P. E. M. Siegbahn and T. Borowski, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 729–738.
- 68 M. R. A. Blomberg, A. J. Johansson and P. E. M. Siegbahn, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 7992–7997.
- 69 A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III and W. M. Skiff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**(25), 10024–10035.
- 70 A. K. Rappé and W. A. Goddard III, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 3358–3363.